

# 3

## Doxiciclina hiclato, formulaciones de liberación controlada y cromatografía líquida de alta resolución para su detección en plasma

Elsa Cristina Mazabel Riera<sup>1</sup>  
y Santiago Monsalve Buriticá<sup>2</sup>

### 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. En el caso de formulaciones de liberación controlada es necesario realizar ensayos *in vitro* (Celdas de Franz), así como también *in vivo* (estudios farmacocinéticos) para analizar su comportamiento. La

- 
1. MV. Egresada de la Corporación Universitaria Lasallista. Grupo de Investigación en Medicina Veterinaria – GIVET.
  2. MV, MSc, DrSc(c). Docente Investigador Corporación Universitaria Lasallista. Grupo de Investigación en Medicina Veterinaria – GIVET.

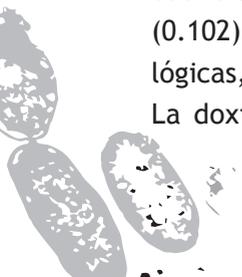
absorción, distribución y eliminación de la doxiciclina dependen de múltiples factores. Se han utilizado varios métodos para determinar concentraciones de doxiciclina en tejidos biológicos que incluyen técnicas microbiológicas, fluorimétricas, cromatografía gas-líquido, cromatografía en capa delgada, técnicas de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), técnicas espectrofotométricas de masas y electroforesis capilar. Sin embargo, la técnica con HPLC es una de las más usadas ya que tiene una alta sensibilidad, especificidad y velocidad de detección.

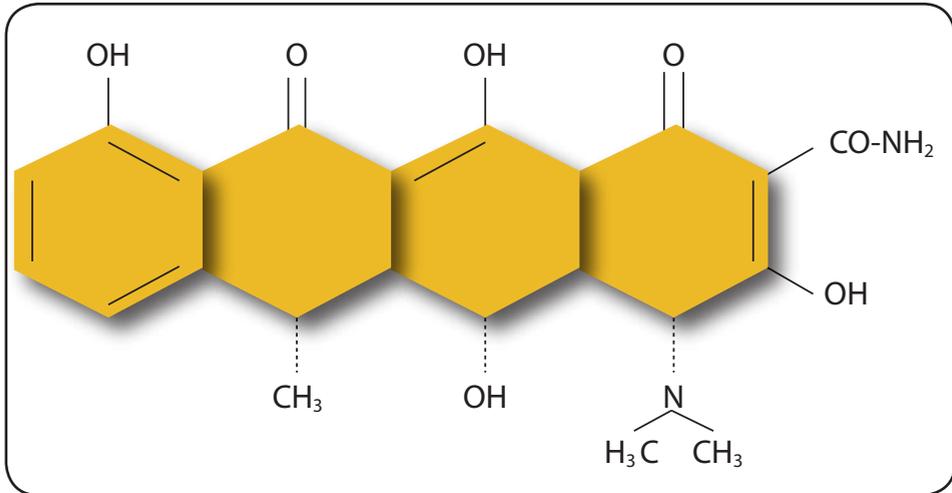
**Palabras clave:** Tetraciclinas, ehrlichiosis monocítica canina, HPLC, liberación controlada de medicamentos, doxiciclina.

## Introducción

Las tetraciclinas han sido utilizadas ampliamente desde su descubrimiento en 1953 cuando fue comercializada por primera vez por Laboratorios Lederle®. Durante muchos años, la tetraciclina fue la primera opción en el tratamiento sistémico del acné en pacientes humanos (1). Con el tiempo las dificultades que representaba la ingesta de 4 dosis al día, y la necesidad de tomarla en ayunas para que cumpliera un buen efecto bacteriostático, llevó al desarrollo de antibióticos sintéticos de la familia de las tetraciclinas, empezando con el desarrollo de la doxiciclina en 1967 (2). La doxiciclina es un antibiótico semisintético de la familia de las tetraciclinas (3-6) que se caracteriza por tener actividad frente a una amplia gama de microorganismos Gram positivos y Gram negativos (6-8). La doxiciclina es considerada un antibiótico de segunda generación (9). En términos de estructura se pueden distinguir de las originales tetraciclinas por sustituciones en las posiciones 5 y 6 (figura 1).

Aunque estas sustituciones causan pocas variaciones en las propiedades bacteriostáticas, sí cambian sus propiedades fisicoquímicas (9). En particular, su lipofilia es bastante diferente a la de las tetraciclinas, la doxiciclina tiene un coeficiente de partición más alto (0.63) en comparación con las tetraciclinas (0.102). La mayor lipofilia le permite un mayor paso por las membranas biológicas, lo que le facilita la penetración en los tejidos corporales (2,3,9,10). La doxiciclina es el tratamiento de elección para múltiples infecciones

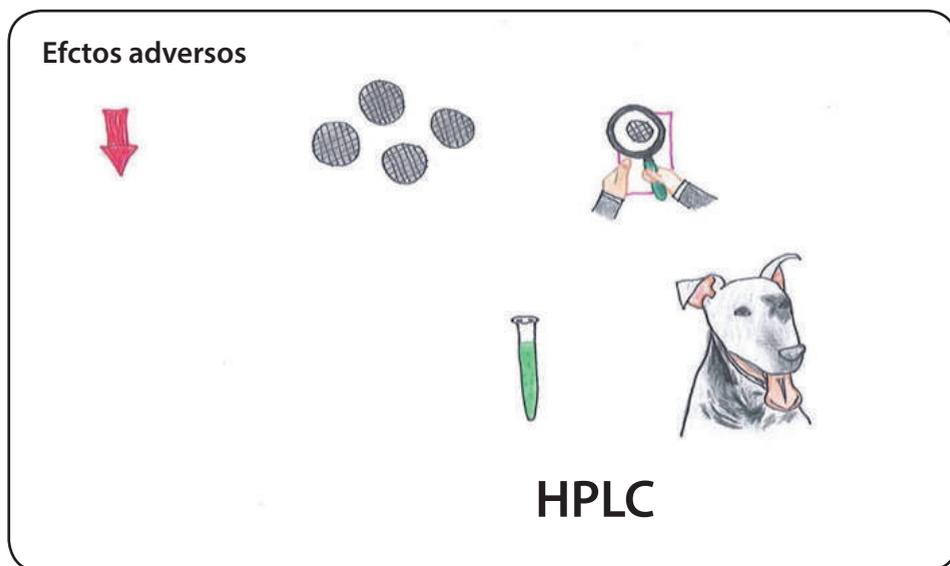




**Figura 1.** Estructura química de la doxiciclina.

Fuente: elaboración propia.

rickettsiales (7,8,11) incluyendo *Ehrlichia canis*, agente de la ehrlichiosis monocítica canina (12,13). 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 pues requiere una administración prolongada para cumplir con la totalidad del protocolo terapéutico (4,8,14). No obstante, las formulaciones de liberación controlada de doxiciclina (como la microencapsulación) pueden reducir estos efectos adversos y mejorar la eficacia del antibiótico durante largos períodos de tratamiento (4,15). En el caso de formulaciones nuevas, es necesario realizar ensayos *in vitro* para analizar su comportamiento 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 (16). 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 (6), siendo la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) la más adecuada ya que tiene una sensibilidad, especificidad y velocidad de determinación de ensayos muy alta (7,17) (figura 2).



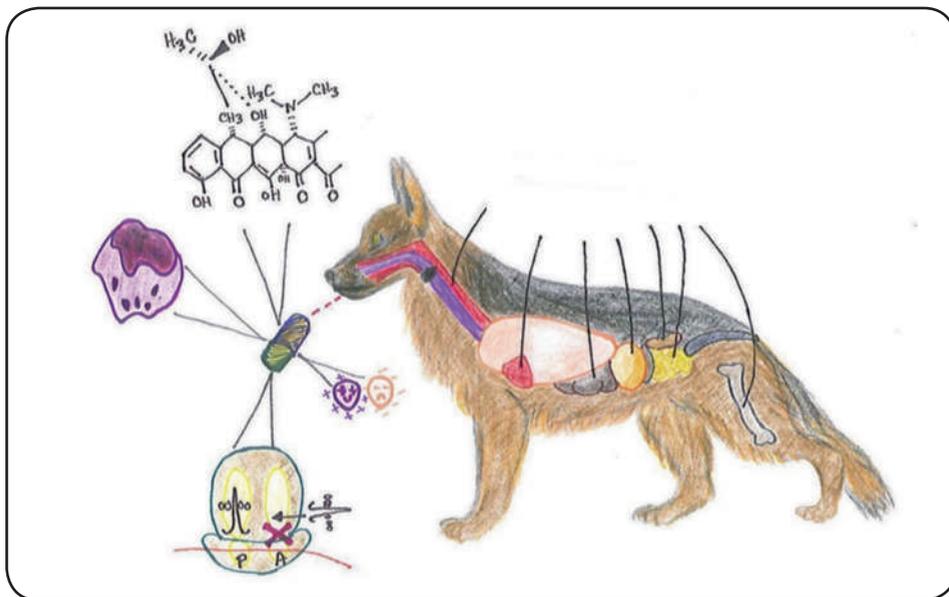
**Figura 2.** Con la finalidad de disminuir los efectos adversos que causa la administración oral de doxiciclina se han desarrollado las formulaciones de liberación controlada como los microencapsulados. Al tratarse de nuevas formulaciones es necesario analizarlas, para ello resulta útil la realización de ensayos *in vitro/in vivo*, siendo el método más sensible para analizar la doxiciclina el HPLC.

Fuente: elaboración propia.

## Características de la doxiciclina

La doxiciclina es un antibiótico de segunda generación de la familia de las tetraciclinas (3,5,6) que se caracteriza por ser un isómero estructural de esta (8,18) ya que puede distinguirse de la original por una diferencia estructural en la posición 5 y 6 (9). Tiene un amplio espectro de actividad contra una amplia variedad de microorganismos Gram positivos y Gram negativos, incluyendo Rickettsiales, Chlamydiales y Micoplasmas, ejerciendo un efecto bacteriostático sobre estas al acoplarse 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, paralizando la incorporación de aminoácidos durante la síntesis proteica (19-22). Se describe a su vez como el tratamiento de elección contra bacterias del orden Rickettsiales (3,6,12). Este antibiótico también se incluye en la resolución de

microorganismos de importancia médico veterinario, uno de los más comunes comprende a la especie *Ehrlichia canis*, la cual afecta principalmente a los monocitos en ejemplares caninos (23) (figura 3).



**Figura 3.** La doxiciclina es un isómero estructural de la tetraciclina. Actúa como un bacteriostático que se acopla con gran afinidad a la porción aminoacil de la subunidad 30s ribosomal impidiendo la unión del ARNt a este sitio. Tiene efecto sobre una amplia gama de microorganismos Gram positivos y Gram negativos. A pesar de ser el tratamiento de elección en la ehrlichiosis canina, su uso ha sido cuestionado debido a la presencia de efectos adversos cuando es administrado oralmente (esofagitis, efectos cardiovasculares, irritación gástrica, alteraciones digestivas, capacidad para fijar el calcio, efectos tóxicos en células renales y hepáticas cuando se administra en altas dosis).

Fuente: elaboración propia.

La forma farmacéutica más común de la doxiciclina en caninos para administración oral es la tableta, siendo la doxiciclina hiclato el principal compuesto utilizado; sin embargo, han sido reportados efectos secundarios debido a su propiedad irritante sobre el tracto gastrointestinal (14). Dentro de los efectos indeseables principalmente se reporta el vómito, la irritación gástrica

y la esofagitis (4,24). Debido a un alto acople a las proteínas plasmáticas es requerido administrar en altas concentraciones el medicamento con el fin de asegurar una terapéutica adecuada (se describen estos efectos como dependientes de la dosis) (20). Adicionalmente se reportan alteraciones de la microflora intestinal, efectos cardiovasculares, como arritmias cardíacas, depósito en el tejido óseo y capacidad para fijar el calcio (lo cual produce decoloración dental por defectos del esmalte), retardo en el crecimiento y efectos tóxicos sobre las células hepáticas y renales cuando el antibiótico es suministrado en altas dosis (25) (figura 3).

## Formulaciones de liberación controlada

En las últimas décadas se ha dado un creciente interés en la industria farmacéutica veterinaria por el desarrollo de formulaciones de liberación controlada de doxiciclina ya que estos podrían reducir los efectos adversos y mejorar la eficacia durante largos períodos de tratamiento (26,27). Dentro de estas se incluyen formulaciones enterales y parenterales de acción prolongada (4,5,26,28,29). Entre las formulaciones enterales se describe la microencapsulación (sistema de administración de micropartículas) como uno de los sistemas de suministro de fármacos prometedores ya que permite 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 forma 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 menores (15).

Los estudios farmacocinéticos son una herramienta útil para evaluar las propiedades de las formas de dosificación desarrolladas después de su administración *in vivo* (6). 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 donadora 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 (30). Shanmuganathan y colaboradores (31) utilizaron un modelo de difusión con celdas de Franz como parte de un estudio *in vitro* para la preparación y caracterización de microsferas de quitosano para la liberación de doxiciclina, con el cual lograron definir el sistema de dosificación relativo a la absorción percutánea del fármaco (31).

## Farmacocinética

Los perfiles de liberación *in vivo* 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 (32). El proceso de absorción comprende los mecanismos de liberación del fármaco de su forma farmacéutica, su disolución, la entrada al organismo desde el lugar de administración, los mecanismos de transporte y la eliminación presistémica, así como las características de cada vía de administración, la velocidad, la cantidad con que el fármaco accede a la circulación y los factores que pueden alterarla (33). La doxiciclina por tener un coeficiente de partición alto cuenta con una mayor solubilidad en lípidos, lo que explica su absorción superior en comparación con otras tetraciclinas después de la administración oral, característica útil para una buena distribución del fármaco hacia los tejidos (a excepción del líquido cefalorraquídeo) (2,3,9,10,34). La doxiciclina presenta una mayor absorción por vía oral con rangos que oscilan entre el 90% y el 100% de biodisponibilidad debido a su alta liposolubilidad, sin embargo, esto puede tener como inconveniente la unión en mayor medida a proteínas plasmáticas, principalmente a la albúmina (35), en comparación con otras tetraciclinas (36). La unión oscila entre el 82 y el 93% (37) lo cual podría representar un problema pues los fármacos que se fijan fácilmente a las proteínas no penetran igual que los que tienen una unión menor, esto podría



inferir una actividad reducida puesto que solo la fracción libre puede actuar en su objetivo (38). Por ello, para poder mantenerse con concentraciones mínimas inhibitorias (MIC) se requiere la administración de dosis consideradas altas y de manera constante (que podrían conllevar a efectos indeseados) para que se ejerza una acción bacteriostática. También se ha asociado a la unión con transferrina en su fracción  $\beta$ -globulina en humanos (39). Desde el punto de vista terapéutico, una alta biodisponibilidad no siempre es lo más apropiado ya que una mayor absorción podría asociarse con un incremento en la aparición de efectos adversos, y, como premisa farmacocinética, lo deseable de un fármaco es que mantenga niveles séricos adecuados durante tiempos prolongados (33).

En general, las tetraciclinas en disolución suelen ser más estables frente al pH ácido y en su mayoría se comportan como anfóteros, por lo tanto, pueden actuar como aniones (formando sales de sodio) o como cationes (como clorhidratos) (36). La absorción ocurre principalmente en el intestino delgado superior (34). La dieta puede producir interacción con las tetraciclinas por la formación de precipitados insolubles que pueden llegar a causar una reducción en la cantidad del antibiótico que se absorbe (por cationes divalentes tales como  $\text{Ca}^{+2}$ ,  $\text{Mg}^{+2}$  y  $\text{Fe}^{+2}$ ) (36). A pesar de esto y a diferencia de otras tetraciclinas, ha sido reportado que la doxiciclina puede tener un efecto poco significativo en la formación de dichos precipitados por la propiedad quelante propia de estos iones luego de un tratamiento en conjunto con la ingesta de alimentos. Los cationes divalentes son elementos considerados bajos en la dieta y en consecuencia la interacción con las tetraciclinas no ha sido considerada representativa (33,34,40). No obstante, se ha reportado que algunos parámetros farmacocinéticos como la biodisponibilidad y el área bajo la curva (AUC) podrían verse afectados hasta un 20% cuando el antibiótico es suministrado en conjunto con los alimentos (35,37,41), lo cual podría ser un inconveniente gracias a la posibilidad de no cumplir con las concentraciones mínimas inhibitorias en la gama de patógenos sensibles.

Respecto a la distribución, la cinética de absorción cuantifica la entrada de fármaco en la circulación sistémica y engloba los procesos de liberación del fármaco de su forma farmacéutica, disolución, absorción propiamente dicha y eliminación presistémica, incluyendo el estudio de la velocidad de absorción, de la cantidad absorbida y de los factores que la alteran (33). En términos generales luego de empezar el proceso de absorción de doxiciclina se pueden encontrar trazas en sangre después de 15 minutos de adminis-



tración oral (9) con un volumen de distribución de 0.7 l/Kg en promedio, y con una concentración máxima (C<sub>max</sub>) detectable entre las 2 y 3 horas después de ser administrada (37). Las características lipofílicas y el alto volumen de distribución de la doxiciclina en ejemplares caninos facilitan una amplia distribución por todo el organismo que permite la acumulación de estas sustancias en diversos tejidos (20). La doxiciclina es clasificada como fármaco de acción prolongada por presentar un largo tiempo de vida media con una semivida promedio de 10.36 h en perros (42) y entre 16 a 18 horas en humanos (20,34,43).

La eliminación de la doxiciclina se realiza principalmente a través de la bilis, a diferencia de las otras tetraciclinas las cuales tienen como mecanismo de excreción la vía renal (36). La eliminación de la doxiciclina por vía urinaria es muy escasa (30 - 42%) (9,10,20) y por lo tanto es uno de los fármacos recomendados en pacientes con infección extrarrenal y fallo renal (20,34). La doxiciclina puede atravesar la barrera placentaria afectando al feto y, de igual manera, puede ser eliminada por la leche (35). Las tetraciclinas se someten a la circulación enterohepática y gran parte del fármaco excretado en la bilis se reabsorbe en el intestino, este proceso contribuye a expandir su tiempo de vida media (35). Las concentraciones hepáticas pueden alcanzar datos similares a los niveles séricos, mientras que la bilis puede contener hasta una proporción 11 veces mayor del antibiótico (9,10), aunque se han reportado concentraciones 25 veces superiores en bilis que en suero (37). A diferencia de otras tetraciclinas como la minociclina, la doxiciclina no se metaboliza en el cuerpo y no hay datos de trazas de metabolitos encontrados en sangre, orina y heces (9,10). Una vez la doxiciclina ha alcanzado la luz intestinal, una parte de esta es quelada probablemente para iones Ca<sup>2+</sup> y Mg<sup>2+</sup>, y luego de la formación de este, ya no puede ser absorbida y pierde gran parte de su actividad antibacteriana. Finalmente, la doxiciclina no quelada se reabsorbe lo que le permite ingresar de nuevo para ser reciclada enterohepáticamente (9).

El aclaramiento renal en ejemplares caninos normalmente varía en promedio en  $1.68 \pm 0.44$  ml/min/Kg (42) dato similar al que se presenta en humanos (9,10). El pH de la orina puede cambiar la difusión de la doxiciclina en el tejido



renal, por lo que una orina acidificada aumenta sus concentraciones en este tejido, mientras que una alcalinización aumentaría su aclaramiento (9,44).

## HPLC como herramienta sensible para su detección

La industria veterinaria en las últimas décadas ha reportado múltiples estudios de farmacocinética de doxiciclina en diferentes especies animales que comprenden caninos (21,22,29), felinos (3,14), rumiantes (5,11), equinos (8,18,19,28), primates (45), ratas (24) y elefantes marinos (46). La realización de estudios farmacocinéticos requiere métodos analíticos sensibles para permitir la determinación de concentraciones bajas del fármaco en muestras pequeñas (6).

Se han utilizado varios métodos para determinar niveles 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 (6,7). La técnica HPLC tiene una alta sensibilidad, especificidad y velocidad de detección (7). 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 y 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 y requiere que la fase móvil sea forzada a través de una bomba (a menudo a presiones superiores a 500 psi) para separar los componentes de una mezcla basándose en diferentes tipos de interacciones químicas entre las sustancias analizadas. Un cromatógrafo básico está compuesto por un sistema de control de fase móvil, un inyector, una columna y un detector (47). Entre los detectores utilizados para el procesamiento de la doxiciclina con HPLC se encuentra el espectrómetro de masas con tecnología de triple cuadrupolo (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 por fuera del cuadrupolo, evitando impactar en el detector. El triple cuadrupolo consiste en tres cuadrupolo 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 (47).

Otro detector (a base de aerosoles para la cromatografía líquida) es el detector de aerosoles cargado (CAD) que 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 dan 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 (48).

## Conclusiones

La doxiciclina es el tratamiento indicado para diversos microorganismos, sin embargo puede generar efectos adversos (inclusive en concentraciones terapéuticas) principalmente cuando su administración es prolongada. Para disminuir estos efectos indeseables se han desarrollado formulaciones de liberación controlada que, al ser innovaciones, requieren de la protocolización de ensayos preclínicos y clínicos (*in vitro* e *in vivo*) para determinar la seguridad en el uso de nuevas propuestas micro y nanotecnológicas. Dentro de los ensayos *in vivo* es importante ahondar en los ensayos farmacocinéticos para determinar el comportamiento de las nuevas formulaciones (absorción, distribución y eliminación) en comparación con las moléculas que se encuen-



tran disponibles en el mercado. La técnica cromatográfica de alta resolución es una de las herramientas más sensibles para la detección de la doxiciclina en muestras donde hay poca concentración del fármaco.

## Referencias

1. Smith K., Leyden J.J. Safety of doxycycline and minocycline: A systematic review. *Clin Ther.* 27(9):1329-42.
2. Barza M., Schiefe R. Antimicrobial spectrum, pharmacology and therapeutic use of antibiotics. Part 1: Tetracyclines. *Am J Hosp Pharm.*34:49-57.
3. Riond J.L., Vaden S.L., Riviere J.E. Comparative Pharmacokinetics of Doxycycline in Cats and Dogs. *J Vet Pharmacol Ther.* 13(4):415-24.
4. Arciniegas-Ruiz S.M., Gutiérrez-Olvera L., Bernad-Bernad M.J., Caballero-Chacón S.D.C., Vargas-Estrada D. Comparative pharmacokinetics of a new oral long-acting formulation of doxycycline hyclate: A canine clinical trial. *Eur J Pharm Sci [Internet].* 80:9-15. Recuperado de: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejps.2015.09.012>
5. Ole-Mapenay I., Mitema E. Some pharmacokinetics parameters of doxycycline in East African goats after intramuscular administration of a long- acting formulation. *Vet Res Commun.* 19:425-32.
6. Ruz N., Zabala M., Kramer M.G., Campanero M.A., Dios-Viéitez M.C., Blanco J.. Rapid and simple determination of doxycycline in serum by high-performance liquid chromatography application to particulate drug delivery systems. *J Chromatogr A.* 2004;1031:295-301.
7. Axisa B., NaylorR., Bell P.R., Thompson M.M. Simple and reliable method of doxycycline determination in human plasma and biological tissues. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl.* 2000;744(2):359-65.
8. Schnabel L.V., Papich M.G., Watts A.E., Fortier L.A. Orally administered doxycycline accumulates in synovial fluid compared to plasma. *Equine vet J.* 2010;42(3): 208-12.
9. Saivin S., Houin G. Clinical Pharmacokinetics of Doxycycline and Minocycline. *Clin Pharmacokinet.* 1988;15(6):355-66.
10. Fourtillan J., Saux M. Comportement pharmacocinetique des tetracyclines. *Rev Assoc pour le Dev la Pharm Hosp du Sud-Ouest.* 1977;2:23-39.
11. Castro L., Sahagún A., Díez M., Fernández N., Sierra M., García J. Pharmacokinetics of doxycycline in sheep after intravenous and oral administration. *Vet J.* 2009;180:389-95.

12. Eddlestone S.M., Diniz P., Gaunt S., Hosgood G. Doxycycline Clearance of Experimentally Induced Chronic *Ehrlichia canis* Infection in Dogs. *J Vet Intern Med.* 2007;21:1237-1242.
13. Breitschwerdt E., Hegarty B., Hancock S. Doxycycline hyclate treatment of experimental canine ehrlichiosis followed by challenge inoculation with two *Ehrlichia canis* strains. *Antimicrob Agents Chemother.* 1998;42(2):362-368.
14. Hartmann A., Kriebler R., Daube G., Hartmann K. Pharmacokinetics of pradofloxacin and doxycycline in serum, saliva and tear fluid of cats after oral administration. *J vet Pharmacol Ther.* 2008;31:87-94.
15. Raval J.P., Naik D.R., Amin K.A., Patel P.S. Controlled-release and antibacterial studies of doxycycline-loaded poly (ε-caprolactone) microspheres. *J Saudi Chem Soc [Internet].* 2014;18(5):566-73. Recuperado de: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jscs.2011.11.004>
16. Baggot J.D. Clinical pharmacokinetics in veterinary medicine. *Clin Pharmacokinet.* 1992;22(4):254-73.
17. Bocker R. Rapid analysis of doxycycline from biological samples by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr.* 1980;187:439-41.
18. Davis J.L., Salmon J.H., Papich M.G. Pharmacokinetics and tissue distribution of doxycycline after oral administration of single and multiple doses in horses. *AJVR.* 2006;67(2):310-6.
19. Womble A., Lee E.A. Pharmacokinetics of oral doxycycline and concentrations in body fluids and bronchoalveolar cells of foals. *J vet Pharmacol Ther.* 2007;30:187-93.
20. Pérez-Trallero E., Iglesias L. Tetraciclinas, sulfamidas y metronidazol. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2003;21(9):520-9.
21. Maaland M.G., Papich M.G., Turnidge J. Pharmacodynamics of Doxycycline and Tetracycline against *Staphylococcus pseudintermedius*: Proposal of Canine-Specific Breakpoints for Doxycycline. *J Clin Microbiol.* 2013;51(11):3547-54.
22. Kukanich K., Kukanich B. The effect of sucralfate tablets vs. suspension on oral doxycycline absorption in dogs. *J Vet Pharmacol Ther.* 2015;38(2):169-73.
23. Gal A., Loeb E. Detection of *Ehrlichia canis* by PCR in different tissues obtained during necropsy from dogs surveyed for naturally occurring canine monocytic ehrlichiosis. *Vet J.* 2008;175:212-7.
24. Vargas-Estrada D., Gutiérrez L., Juárez-Rodríguez I., Sumano H. Pharmacokinetics of doxycycline and tissue concentrations of an experimental long-acting parenteral formulation of doxycycline in wistar rats. *Arzneimittel-forsch (Drug Res.* 2008;58(6):310-5.

25. Lepper M.H., Zimmerman H.J., Carroll G., Caldwell E.R. Jr., Spies H.W., Wolfe C.K. Effect of large doses of aureomycin, terramycin, and chloramphenicol on livers of mice and dogs. *AMA Arch Intern Med.* 1951;88(3):284-95.
26. Arciniegas-Ruiz S., Gutiérrez-Olvera L., Caballero-Chacón S., Vargas-Estrada D. Pharmacokinetics of an oral extended-release formulation of doxycycline hyclate containing acrylic acid and polymethacrylate in dogs. *AJVR.* 2015;76(4):367-72.
27. Morales M., López G., Gallardo V., Ruiz M. Oral suspensions of morphine hydrochloride for controlled release : rheological properties and drug release. *Mol Pharm.* 2011;8:629-34.
28. Zozaya H., Gutierrez L., Bernad M.J., Sumano H. Pharmacokinetics of a peroral single dose of two long-acting formulations and an aqueous formulation of doxycycline hyclate in horses. *Acta Vet Scand [Internet].* 2013;55(21):1-7. Recuperado de: *Acta Veterinaria Scandinavica.*
29. Gutiérrez L., Velasco Z., Vázquez C., Vargas D., Sumano H. Pharmacokinetics of an injectable long-acting formulation of doxycycline hyclate in dogs. *Acta Vet Scand [Internet].* 2012;54(35):1-7.
30. Baena Y., Dallos L.J., Manzo R.H., León L.F.P.D. 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. *Rev Colomb Cienc Quím Farm.* 2011;40(2):174-88.
31. Shanmuganathan S., Shanumugasundaram N., Adhirajan N., Ramya Lakshmi T., Babu M. Preparation and characterization of chitosan microspheres for doxycycline delivery. *Carbohydr Polym.* 2008;73(2):201-11.
32. Beltrán C. Farmacocinética y farmacodinamia de antimicrobianos : Utilidad práctica. *Rev Chil Infect.* 2004;21(Supl 1):39-44.
33. Armijo J. Absorción, distribución y eliminación de los fármacos. *Farmacol Humana [Internet].* 2003;41-79. Recuperado de: <http://www.pdcorynthia.sld.cu/Documentos/estudiantes/Absorci%F3n%20distribuci%F3n%20y%20eliminaci%F3n%20de%20los%20f%20r%20m%20a%20c%20o%20s%20>
34. Deck D., Winston L. Tetracyclines, Macrolides, Clindamycin, Chloramphenicol, Streptogramins, & Oxazolidinones. In: Katzung B, Masters S, Trevor A, editors. *Basic and clinical pharmacology (LANGE Basic Science).* 12th edit. The McGraw-Hill Companies, Inc; 2012. p. 809-20.
35. Del Castillo, J. Tetracyclines. In: Giguère S, Prescott J, Dowling P, (ed). *Antimicrobial therapy in veterinary medicine.* Fifth Edit. Ames, Iowa: John Wiley & Sons, Inc; 2013. p. 257-68.
36. Lemos M. Antimicrobianos que inhiben la síntesis de proteínas. In: Botana L., Landoni M., Martín-Jiménez T., editores. *Farmacología Veterinaria.* Madrid, España: Mc Graw Hill; 2002. p. 468-83.

37. Agwuh K.N., MacGowan A. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of the tetracyclines including glycylicyclines. *J Antimicrob Chemother.* 2006;58(2):256-65.
38. Chambers H. Principios generales de la antibioticoterapia. In: Brunton L., Lazo J.S., Parker K., (ed). *Las bases farmacológicas de la terapéutica de la terapéutica* [Internet]. Undécima e. McGraw-Hill Interamericana Editores, S.A.; 2007. p. 1173-202. Recuperado de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15003161><http://cid.oxfordjournals.org/lookup/doi/10.1093/cid/cir991><http://www.scielo.cl/pdf/udecada/v15n26/art06.pdf><http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-84861150233&partnerID=tZOtx3y1>
39. Bocker R., Muhlberg W., Platt D., Estler C. Serum level, half-life and apparent volume of distribution of doxycycline in geriatric patients. *Eur J Clin Pharmacol* [Internet]. 1986;30(1):105-8. Recuperado de: <http://link.springer.com/10.1007/BF00614205>
40. Carou V., Font M., Jover H. Nutrición y tratamientos farmacológicos. Interacciones entre alimentos y medicamentos. In: Rodríguez M, Sastre-Gallego A, (ed). *Tratado de nutrición*. Madrid, España: Ediciones Díaz de Santos, S. A.; 1999. p. 545.
41. Saux M., Mosser J., Pontagnier H., Leng B. Pharmacokinetic study of doxycycline polyphosphate after simultaneous ingestion of milk. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet.* 1983;8(1):43-9.
42. Wilson R.C., Kemp D.T., Kitzman J.V., Goetsch D.D. Pharmacokinetics of doxycycline in dogs. *Can J Vet Res.* 1988;52(1):12-4.
43. Vicente D., Pérez-Tallero E. Tetraciclinas, sulfamidas y metronidazol. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2010;28(2):122-30.
44. Whelton A., Schach Von Wittenau M., Twomey T.M., Walker W.G., Bianchine J.R. Doxycycline pharmacokinetics in the absence of renal function. *Kidney Int.* 1974;5(5):365-71.
45. Embers M., Hasenkampf N., Embers D., Doyle L. Pharmacokinetic Analysis of Oral Doxycycline in Rhesus Macaques. *J Med Primatol.* 2013;42(2):57-61.
46. Freeman K., Thomasy S., Stanley S., Van Bonn W., Gulland F., Friedlaender A., et al. Population pharmacokinetics of doxycycline in the tears and plasma of northern elephant seals (*Mirounga angustirostris*) following oral drug administration. *JAVMA.* 2013;15(8):1170-8.
47. Sadek P. *Illustrated Pocket Dictionary of Chromatography*. Interscience UW-, editor. John Wiley & Sons, Inc; 2004.
48. Magnusson L., Risley D.S., Koropchak J.A. Aerosol-based detectors for liquid chromatography. *J Chromatogr A* [Internet]. 2015;1-14. Recuperado de: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2015.07.045>

