

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS

Ana Paula Christ

**DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO BIOFARMACÊUTICA DE
SUPOSITÓRIOS DE DOXICICLINA HICLATO PARA USO
VETERINÁRIO**

Santa Maria, RS
2018

Ana Paula Christ

**DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO BIOFARMACÊUTICA DE SUPOSITÓRIOS
DE DOXICICLINA HICLATO PARA USO VETERINÁRIO**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM/RS), Área de Desenvolvimento e Avaliação de Produtos Farmacêuticos como requisito parcial para obtenção do título de **Doutor em Ciências Farmacêuticas**

Orientadora: Prof^ª Dra. Andréa Inês Horn Adams
Coorientador: Dr. Estevan Sonogo Zimmermann

Santa Maria, RS
2018

Christ, Ana Paula
Desenvolvimento e avaliação biofarmacêutica de
supositórios de doxiciclina hclato para uso veterinário
/ Ana Paula Christ.- 2018.
133 p.; 30 cm

Orientadora: Andréa Inês Horn Adams
Coorientador: Estevan Sonego Zimmermann
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós
Graduação em Ciências Farmacêuticas, RS, 2018

1. Supositórios 2. Tetraciclínas 3. Farmacocinética
4. Tratamento veterinário I. Adams, Andréa Inês Horn II.
Zimmermann, Estevan Sonego III. Título.

Ana Paula Christ

**DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO BIOFARMACÊUTICA DE SUPOSITÓRIOS
DE DOXICICLINA HICLATO PARA USO VETERINÁRIO**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM/RS), Área de Desenvolvimento e Avaliação de Produtos Farmacêuticos como requisito parcial para obtenção do título de **Doutor em Ciências Farmacêuticas**

Aprovado em 17 de agosto de 2018:



Andréa Inês Horn Adams, Dra. (UFSM)
(Presidente/Orientador)



Fabiana Ernestina Barcellos da Silva, Dra. (UNIPAMPA)



Pedro Eduardo Fröhlich, Dr. (UFRGS)



Cristiane de Bona da Silva, Dra. (UFSM)



Leticia Cruz, Dra. (UFSM)

Santa Maria, RS
2018

AGRADECIMENTOS

Durante os mais de quatro anos em que estive envolvida com este trabalho, contei com o apoio e incentivo de muitas pessoas, às quais gostaria de agradecer profundamente.

Primeiramente agradeço infinitamente a Deus.

Agradeço aos meus pais Ivana e Darci pelo amor, incentivo e compreensão. Sou muito grata pelas palavras de apoio, pelo colo nos momentos difíceis e por me fazerem acreditar na minha capacidade e não me permitirem desistir. Obrigada por entenderem minhas ausências e mesmo assim incentivarem minha busca pelo crescimento profissional.

Aos meus irmãos Anderson e Daiana agradeço pelo incentivo, companheirismo e carinho de todas as horas. Obrigada pelas risadas e confidências, vocês deixam minha vida mais leve e são parte fundamental na minha jornada. Crescer com vocês, em todos os aspectos da vida, é uma bênção.

A minha orientadora Andréa Adams agradeço por acreditar em mim, me orientar e incentivar sempre. Agradeço por sua atenção com meu trabalho, pela paciência, pelo carinho nos momentos difíceis. Sou grata pelos mais de seis anos de parceria e amizade, devo muito da minha formação profissional a você e levarei seu exemplo profissional por toda minha jornada.

Ao meu co-orientador Estevan Sonogo Zimmermann agradeço por toda a paciência, orientação, divisão de conhecimento e incentivo com os experimentos *in vivo*. Sem seus ensinamentos meu trabalho não teria acontecido.

Ao Vinícius agradeço pelo carinho, amor, paciência, companheirismo e por não me permitir desistir. A sua presença e companhia foram fundamentais para a conclusão do trabalho. Sou grata por entender minhas ausências, acreditar em mim e incentivar meu crescimento.

Agradeço às minhas “ICs” Suelen, Alieni e Rebeca. Agradeço a paciência, o auxílio nos experimentos e por permitirem dividir os conhecimentos adquiridos. Agradeço em especial a Alieni e Rebeca pelo cuidado incansável e carinho com os animais utilizados nos experimentos.

Agradeço a Pauline pela disponibilidade em me auxiliar nos estudos de farmacocinética mesmo em meio à redação da sua dissertação. A sua participação, personalidade e humor ímpar foram fundamentais para a conclusão do trabalho.

Agradeço aos demais colegas de laboratório de todos esses anos Priscila, Ana Isa, Laís, Pauline, Suelen, Juliana, Letícia, Daniele, Mariane, Josiele, Joana, Franciele, Matheus, Leila e Litiane pela convivência diária, pela troca de conhecimentos e pelos momentos divertidos no laboratório. Agradeço também o carinho de todos nos momentos difíceis e pela amizade construída, vocês sempre estarão em minhas lembranças e melhores pensamentos.

Agradeço aos amigos que de perto ou de longe me incentivaram e compreenderam minhas ausências. O crescimento profissional me distanciou fisicamente de quem amo, mas os amigos e família seguem sempre em meus melhores pensamentos.

Agradeço a minha amiga de quatro patas Maria Rita, que esteve ao meu lado em todos os momentos do doutorado, principalmente na escrita, e também foi inspiração para o trabalho. O desejo de realizar esse trabalho tem muito da minha vontade de cuidar dos pequenos seres como você, que são especiais para muitas pessoas.

Agradeço ao professor Jânio Morais Santurio e suas alunas, em especial Aline e Carla, pelo auxílio com os experimentos animais.

Ao farmacêutico Roberto Carlos Debom Pereira pelo fornecimento da matéria-prima.

Aos funcionários do Departamento de Farmácia Industrial e aos terceirizados pelo carinho e auxílio ao longo desses anos.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências farmacêuticas agradeço o empenho e dedicação na formação dos seus alunos.

Agradeço a CAPES pelo apoio financeiro.

Agradeço a todos que de alguma forma me apoiaram ao longo desses anos e que não foram diretamente citados.

RESUMO

DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO BIOFARMACÊUTICA DE SUPOSITÓRIOS DE DOXICICLINA HICLATO PARA USO VETERINÁRIO

AUTORA: Ana Paula Christ

ORIENTADORA: Andréa Inês Horn Adams

A terapia medicamentosa veterinária pode ser bastante trabalhosa principalmente quando realizada no ambiente doméstico. Normalmente o tratamento medicamentoso animal é feito pela via oral ou injetável, porém a via retal pode ser uma alternativa. O objetivo desse estudo foi desenvolver, caracterizar e avaliar a farmacocinética de supositórios contendo doxiciclina hiclato (DOXH) para uso veterinário, visando contornar as dificuldades de administração e a diminuição de efeitos adversos decorrentes da administração por outras vias. Foram desenvolvidos supositórios com base hidrofílica (S-PEG e S-PEG-MET) e lipofílica (S-MTG e S-MTG-BHT) contendo o equivalente a 25 mg de doxiciclina e a caracterização destas formulações foi realizada pelos ensaios de peso médio, uniformidade de conteúdo, ponto de fusão, aspectos organolépticos e teor. O peso médio e uniformidade de conteúdo (método UV, 350 nm) foram avaliados de acordo com os critérios estabelecidos pela Farmacopeia Brasileira. Para a determinação do teor foi desenvolvido e validado método por eletroforese capilar (EC) empregando eletrólito de trabalho formado pela mistura das soluções A (tampão carbonato de sódio 25 mM + EDTA 5 mM pH 10,6) e B (acetonitrila) na proporção 80:20, temperatura de 24°C, voltagem 25 kV, capilar com 40 cm de comprimento efetivo e detecção em 260 nm. O método apresentou linearidade na faixa de 20 a 160 µg/mL, precisão (DPR < 2%), exatidão (recuperação de 98 a 102%) e robustez avaliada através de ensaio fatorial 2³. A especificidade do método foi confirmada pela ausência de interferência de produtos de degradação oriundos do estudo de degradação forçada, assim como da metaciclina, impureza comum do processo de síntese da doxiciclina. A estabilidade das formulações foi avaliada por um período de 30 dias com as formulações lipofílicas com e sem antioxidantes mantidas em geladeira (5 ± 2 °C) e as hidrofílicas com e sem antioxidantes mantidas em temperatura ambiente (25 ± 2°C). Verificou-se que as formulações S-MTG e S-PEG apresentaram menor redução no teor durante a estabilidade (aproximadamente 1 e 12%, respectivamente) e estas formulações foram escolhidas para o estudo farmacocinético. Para este estudo, foram utilizados coelhos com peso entre 3 e 4 kg e a dose dos supositórios foi ajustada para 10 mg/kg. O comportamento *in vivo* da doxiciclina foi avaliado através da via IV e retal, utilizando grupos com três animais para o estudo piloto e mais dois animais para determinação do modelo farmacocinético (n=5) para cada formulação. A farmacocinética foi avaliada por um período de 24 horas, através de método por CLAE adaptado da literatura, e foram obtidos valores de meia-vida próximos a 8 horas, C_{max} entre 1,5 e 2 µg/mL para os supositórios, concentrações acima da CIM por até 4 horas e biodisponibilidade de 48 e 50% para S-PEG e S-MTG, respectivamente, através da análise não compartimental (NCA). Através do estudo popPK foi possível concluir que o modelo que melhor descreve o comportamento do fármaco é o de dois compartimentos. Os resultados obtidos fornecem dados inéditos a respeito da absorção retal de doxiciclina e sugerem que as formulações desenvolvidas são promissoras para uso na clínica veterinária.

Palavras chave: Supositórios. Tetraciclina. Farmacocinética. Tratamento veterinário.

ABSTRACT

DEVELOPMENT AND BIOPHARMACEUTICAL EVALUATION OF DOXYCYCLINE HYCLATE SUPPOSITORIES FOR VETERINARY USE

AUTHOR: Ana Paula Christ
ADVISOR: Andréa Inês Horn Adams

Veterinary drug therapy can be quite laborious especially when performed in the home environment. Usually the animal drug treatment is done by the oral or injectable route, but the rectal route can be an alternative. The objective of this study was to develop, characterize and evaluate the pharmacokinetics of suppositories containing doxycycline hyclate (DOXH) for veterinary use, aiming to overcome the difficulties of administration and the decrease of adverse effects resulting from administration by other routes. Hydrophilic (S-PEG and S-PEG-MET) and lipophilic (S-CBT and S-CBT-BHT) suppositories containing the equivalent of 25 mg doxycycline were developed and the characterization of these formulations was performed by the tests of mean weight, content uniformity, melting point, organoleptic aspects and content. The mean weight and content uniformity (UV method, 350 nm) were evaluated according to the criteria established by the Brazilian Pharmacopoeia. For the determination of the content, a working electrolyte formed by the mixture of solutions A (25 mM sodium carbonate buffer + 5 mM EDTA pH 10.6) and B (acetonitrile) in the ratio 80 : 20, temperature of 24°C, voltage 25 kV, capillary with 40 cm of effective length and detection at 260 nm. The method presented linearity in the range of 20 to 160 µg / mL, accuracy (DPR <2%), accuracy (recovery of 98 to 102%) and robustness assessed by factorial assay 2³. The specificity of the method was confirmed by absence of interference of degradation products from the forced degradation study, as well as methacycline, a common impurity of the doxycycline synthesis process. The stability of the formulations was evaluated over a period of 30 days with the lipophilic formulations with and without antioxidants kept in the refrigerator (5 ± 2 ° C) and the hydrophilic with and without antioxidants kept at room temperature (25 ± 2 ° C). The S-CBT and S-PEG formulations were found to have decreased content during stability (approximately 1 and 12%, respectively) and these formulations were chosen for the pharmacokinetic study. For this study, rabbits weighing 3 to 4 kg were used and the dose of the suppositories was adjusted to 10 mg / kg. The in vivo behavior of doxycycline was evaluated via the IV and rectal routes, using groups with three animals for the pilot study and two other animals for determination of the pharmacokinetic model (n = 5) for each formulation. The pharmacokinetics were evaluated for a 24-hour period by an HPLC method adapted from the literature, and values of half-life close to 8 hours were obtained, C_{max} between 1.5 and 2 µg / mL for suppositories, concentrations above MIC for up to 4 hours and 48 and 50% bioavailability for S-PEG and S-MTG, respectively, through non-compartmental analysis (NCA). Through the popPK study it was possible to conclude that the model that best describes the behavior of the drug is that of two compartments. The results obtained provide unpublished data on the rectal absorption of doxycycline and suggest that the formulations developed are promising for use in the veterinary clinic.

Keywords: Suppositories. Tetracyclines. Pharmacokinetics. Veterinary treatment.

LISTA DE FIGURAS

Figura 3.1-	Estrutura química doxiciclina hiclato.....	34
Figura 3.2 -	Estrutura da doxiciclina e substâncias relacionadas.....	36
Figura 3.3 -	Anatomia anorretal de cães.....	41
Figura 3.4-	Esquema da eletroforese capilar.....	47

CAPÍTULO I

Figure 1 -	Chemical structure of doxycycline hyclate.....	56
Figure 2 -	CE electropherogram obtained for standard solution. EOF: electroosmotic flow; IS: internal standard, at $100\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ and DOX: doxycycline, at $100\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	64
Figure 3 -	Specificity of S-PEG. IS: internal standard; MTC: methacycline; DOX: doxycycline and DP: degradation product.....	65
Figure 4 -	Specificity of S-CBT. IS: internal standard; MTC: methacycline; DOX: doxycycline and DP: degradation product.....	66
Figure 5 -	Pareto chart obtained in the S-PEG robustness evaluation.....	69
Figure 6 -	Pareto chart obtained in the S-CBT robustness evaluation.....	70
Figure 7 -	Electropherogram of doxycycline tablet. IS: internal standard; MTC: methacycline; DOX: doxycycline.....	71

CAPÍTULO II

Figure 1 -	(a), (b) and (c) – Doxycycline plasma concentrations after IV (5mg/kg) S-CBT, S-PEG administration (10mg/kg) and MIC ($0.5\mu\text{g mL}^{-1}$) concentrations.....	93
------------	---	----

CAPÍTULO III

Figura 6.1-	(a), (b) e (c) – Concentrações plasmáticas de doxiciclina após administração IV (5 mg/kg) e supositórios S-PEG e S-MTG (10 mg/kg) MIC ($0,5\ \mu\text{g}/\text{mL}$)(n=5).....	105
Figura 6.2-	Figura 6.2 – Predições populacionais e individuais para (a) IV, (b) S-PEG, (c) S-MTG (n=6). A linha de regressão linear é a contínua e a pontilhada representa a linha identidade.....	109
Figura 6.3-	<i>Visual predictive check</i> (VPC) do modelo final para (a) IV; (b) S-MTG e (c) S-PEG. <i>Os pontos</i> representam as observações, as linhas sólidas representam os percentis 10th, 50th e 90th dos dados observados; as linhas pontilhadas representam os percentis 10th, 50th e 90th dos dados simulados; as áreas cinza sombreadas representam o intervalo de predição de 90%.....	110

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

Table 1 -	Results obtained on specificity assay.....	65
Table 2 -	Results obtained in repeatability and intermediary precision for suppositories formulations.....	67
Table 3 -	Recovery of doxycycline standard added to placebo suppositories (S-PEG and S-CBT formulations).....	67
Table 4 -	Full factorial design 2 ³ for robustness evaluation.....	68

CAPÍTULO II

Table 1 -	Composition of suppositories formulations.....	82
Table 2 -	Melting point and average weight determinations of different DOX suppositories	88
Table 3 -	Melting point and DOX content in 15 and 30 days of stability study.....	89
Table 4 -	Comparative pharmacokinetic parameters of DOX after intravenous and rectal administration (n=3).....	91

CAPÍTULO III

Tabela 6.1 -	Parâmetros farmacocinéticos da DOX obtidos em diferentes estudos.....	101
Tabela 6.2 -	Parâmetros farmacocinéticos populacionais após administração de 5 mg/kg de DOX por via IV e 10 mg/kg por via retal (n=6)...	107
Tabela 6.3 -	Parâmetros estimados para o popPK final.....	108

LISTA DE QUADROS

Quadro 1- Principais características da doxiciclina hiclato (DOXH).....	35
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABINPET	Associação Brasileira da Indústria de Produtos para Animais de Estimação
ACN	Acetonitrila
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BHT	Hidroxitolueno butilado
CAS	Chemical abstracts
CIVIV	Correlação <i>in vitro in vivo</i>
CIM	Concentração Inibitória Mínima
Cl	<i>Clearance</i>
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
C _{max}	Concentração máxima
CPV	Coordenação de Fiscalização de Produtos Veterinários
DOXH	Doxiciclina hiclato
EC	Eletroforese capilar
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra acético
EOF	Fluxo eletrosmótico
FB	Farmacopeia Brasileira
FDA	Food and Drug Administration
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IV	Intravenosa
Ka	Constante de absorção
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MIC	Minimum inhibitory concentration
MTC	Metacycline
PEG	Polietilenoglicol

PD	Farmacodinâmica
PI	Padrão interno
PK	Farmacocinética
PopPK	Modelagem Farmacocinética Populacional
SCB	Sistema de Classificação Biofarmacêutica
S-PEG	Supositório de polietilenoglicol
S-PEG-MET	Supositório de polietilenoglicol com metabissulfito de sódio
S-MTG (S-CBT)	Supositório de manteiga de cacau
S-MTG-BHT (S-CBT-BHT)	Supositório de manteiga de cacau com hidroxitolueno butilado
$t_{1/2}$	Meia-vida do fármaco
T_{max}	Tempo para obter a concentração máxima
USP	Farmacopeia Americana
UV	Ultravioleta
VICH	Veterinary International Conference on Harmonisation
Vd	Volume de distribuição

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	21
2	OBJETIVOS	27
2.1	OBJETIVO GERAL	29
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	29
3	REVISÃO DA LITERATURA	31
3.1	DOXICICLINA	33
3.1.1	Aspectos gerais	33
3.1.2	Descrição	34
3.1.3	Impurezas e processos de degradação	36
3.1.4	Mecanismo de ação	37
3.1.5	Reações adversas	37
3.1.6	Farmacocinética	38
3.1.7	Formas farmacêuticas	38
3.2	TERAPIA MEDICAMENTOSA VETERINÁRIA	39
3.3	FISIOLOGIA E ABSORÇÃO DE MEDICAMENTOS PELA VIA RETAL	41
3.4	SUPOSITÓRIOS	42
3.4.1	Aspectos gerais	42
3.4.2	Controle de qualidade de supositórios	44
3.5	ELETROFORESE CAPILAR	46
3.6	FARMACOCINÉTICA E BIOFARMÁCIA	48
4	CAPÍTULO I	51
5	CAPÍTULO II	75
6	CAPÍTULO III	97
7	DISCUSSÃO GERAL	115
8	CONCLUSÕES	121
	REFERÊNCIAS.....	125

Os antimicrobianos foram introduzidos na clínica médica a partir da década de 40 após a descoberta de Alexander Fleming e desde então proporcionam tratamento frente a infecções bacterianas em humanos e animais. Na medicina veterinária são amplamente utilizados no tratamento de uma infinidade de doenças, compreendendo grande parte da produção de medicamentos destinados a animais (CAPANEMA et al., 2007; SUN et al., 2004).

Há uma série de antimicrobianos disponíveis no mercado e aprovados para uso veterinário, dentre eles pode-se destacar o norfloxacino, a amoxicilina, o enrofloxacino e a doxiciclina (BRASIL,2013), sendo o último um dos antimicrobianos mais empregados no tratamento de infecções em animais de pequeno porte (MAALAND et al., 2013). A doxiciclina é representante da segunda geração da classe das tetraciclina, sintetizada em 1967 e aprovada tanto para uso humano quanto veterinário. No Brasil, as formas farmacêuticas contendo doxiciclina aprovadas e disponíveis para uso em animais são comprimidos, solução para alimentação, solução injetável e suspensão (BRASIL, 2013; RINALDI, 2014).

A administração de produtos veterinários deve considerar diferentes características dos pacientes, tais como espécie, o contato dos mesmos com seres humanos, o temperamento, as condições patológicas, o tipo de alimentação, fatores econômicos, entre outros, a fim de escolher o medicamento e a via de administração mais adequadas (AHMED; KASRAIAN, 2002; SUN et al., 2004).

A terapia antimicrobiana animal é feita normalmente pela via oral ou parenteral, sendo a via retal raramente empregada para este fim (BERGOGNE-BÉRÉZIN; BRYSKIER, 1999). Devido à falta de cooperação durante a administração de fármacos pela via oral e pela complexidade da administração intravenosa, a medicação de animais de estimação em ambiente doméstico é geralmente trabalhosa (SUN et al., 2004). Além da falta de cooperação, os animais possuem paladar muito particular e olfato apurado e, desta forma, percebem o medicamento misturado ao alimento, podendo rejeitá-lo (AHMED; KASRAIAN, 2002). Em geral, o tratamento medicamentoso inicia-se no consultório veterinário, mas dependendo da infecção pode estender-se por semanas, sendo necessária a participação ativa do dono do animal para cumprir o esquema terapêutico proposto (SUN et al., 2004).

Nesse contexto, a administração de fármacos pela via retal pode ser uma alternativa em algumas situações como: dificuldade de acesso pela via intravenosa, falta de cooperação ou quando o paciente está inconsciente; situações de emergência ou ainda quando a administração oral resulta em intolerância produzindo náuseas, vômitos ou problemas gastrintestinais (BERGOGNE-BÉRÉZIN; BRYSKIER, 1999; KAUSS et al., 2013). As

formas farmacêuticas normalmente administradas pela via retal são os enemas, unguentos e supositórios (AULTON, 2005).

A administração de antibióticos pela via retal raramente é mencionada em estudos farmacocinéticos clínicos e as características da administração de antibióticos por esta via não são muito documentadas. Entretanto, os mecanismos de absorção retal de fármacos não são diferentes daqueles encontrados na porção superior do trato gastrointestinal (BAVISKAR et al., 2013).

Apesar das diferenças entre países em termos de aceitabilidade no uso de supositórios (BERGOGNE-BÉRÉZIN; BRYSKIER, 1999), é possível encontrar uma série de fármacos veiculados a esta forma farmacêutica, disponíveis para uso humano. Segundo a USP 39 (2016) 16 fármacos estão disponíveis na forma de supositórios, voltados ao uso retal ou vaginal. Além das formulações registradas, há diversos estudos na literatura envolvendo o desenvolvimento de supositórios contendo fármacos de diferentes classes terapêuticas, inclusive antibióticos.

Nishihata e colaboradores (1984) avaliaram o aumento da absorção retal de antibióticos solúveis em água, como a penicilina G e a gentamicina, após a adição de agentes promotores de absorção. Alguns anos mais tarde, Bergogne-Bérézin & Bryskier (1999) realizaram uma revisão da literatura abordando a administração retal de antibióticos de diversas classes como sulfonamidas e macrolídeos. Taki e colaboradores (2008) avaliaram a biodisponibilidade de supositórios contendo rifampicina em voluntários sadios e os resultados foram bastante satisfatórios. Kauss e colaboradores (2013) desenvolveram supositórios contendo azitromicina para uso pediátrico e avaliaram a biodisponibilidade em coelhos. Verificou-se que a biodisponibilidade obtida para a via retal em coelhos (43%) foi semelhante àquela obtida pela via oral em humanos (38%).

O setor de produtos voltados ao tratamento de pequenos animais, também conhecidos como pets, vem crescendo a cada ano (ABINPET, 2018). Esse crescimento está relacionado à necessidade de garantir um tratamento seguro e facilitado tanto aos animais quanto aos seus tutores (AHMED; KASRAIAN, 2002). Neste sentido, na literatura também é possível encontrar, com menor frequência, estudos voltados ao desenvolvimento de supositórios destinados ao uso animal. Peters e colaboradores (2014) avaliaram a viabilidade de administrar supositórios contendo levetiracetam para o controle de crises epiléticas em cães. Para o mesmo fim, Brewer e colaboradores (2015) desenvolveram supositórios contendo zonisamida. Também é possível encontrar relatos do uso de supositórios com diferentes fármacos para tratamento de animais de grande porte, como cavalos (KING, 1994).

Face ao exposto, nesse trabalho são propostos o desenvolvimento e a caracterização de supositórios contendo doxiciclina hiclato voltados ao tratamento de animais de pequeno porte, como cães e gatos, seguido de estudo farmacocinético com as formulações mais promissoras. Estas preparações visam facilitar o tratamento de animais de pequeno porte em ambiente hospitalar e/ou doméstico, proporcionando uma alternativa às apresentações já disponíveis do antibiótico. O trabalho está estruturado na forma de capítulos, sendo que no Capítulo I, apresentado no formato de artigo já aceito, é descrito o desenvolvimento do método analítico. No Capítulo II, apresentado no formato de artigo a ser submetido, é descrito o desenvolvimento, estudo de estabilidade e farmacocinética das formulações. Por fim, no Capítulo III é realizada a modelagem farmacocinética das formulações.

2.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver supositórios de doxiciclina hiclato para uso veterinário e avaliar as formulações obtidas.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Preparar supositórios contendo doxiciclina hiclato veiculada em bases hidrofílica e lipofílica;
- Avaliar as formulações desenvolvidas de acordo com suas características organolépticas e físico-químicas: aspecto, ponto de fusão, peso médio, uniformidade de conteúdo e teor;
- Desenvolver e validar método por eletroforese capilar (EC) para o doseamento dos supositórios de doxiciclina hiclato;
- Realizar estudo de estabilidade das formulações desenvolvidas em condições usuais de armazenamento inerentes à base utilizada, sendo temperatura ambiente (25 ± 2 °C) para as formulações hidrofílicas e sob refrigeração (2-8 °C) para as lipofílicas;
- Avaliar a farmacocinética das formulações que apresentarem resultados mais promissores para uso veterinário, empregando método por CLAE, otimizado a partir de método de literatura;
- Estabelecer o modelo farmacocinético para caracterizar o perfil plasmático de concentração *versus* tempo e modelar os dados plasmáticos utilizando o Software Monolix[®].

3.1 DOXICICLINA

3.1.1 Aspectos gerais

A doxiciclina é um antibiótico com ação tempo-dependente pertencente à classe das tetraciclinas, amplamente utilizado na clínica humana e veterinária (GUTIÉRREZ et al., 2012; RINALDI, 2014). É um derivado semi-sintético da oxitetraciclina, mas difere desta por ser de 5 a 10 vezes mais lipofílica (RINALDI, 2014). Graças a essa característica, possui maior penetração nos tecidos, maior volume de distribuição e melhores propriedades antimicrobianas. Além disso, é menos hepatotóxica, tem meia-vida prolongada e maior taxa de ligação às proteínas plasmáticas (GUTIÉRREZ et al., 2014; HARTMANN et al., 2008).

Os primeiros representantes da classe das tetraciclinas foram isolados de espécies do gênero *Streptomyces* nos anos de 1949 e 1950. Desde então, várias tetraciclinas foram desenvolvidas, tanto de origem natural, como a clortetraciclina, quanto semi-sintética, como a doxiciclina, obtida em 1967 (RINALDI, 2014).

Possui atividade bacteriostática de amplo espectro, podendo ser empregada no tratamento de infecções causadas por micro-organismos gram-positivos e gram-negativos. É indicada para o tratamento de infecções sexualmente transmissíveis causadas pelo gênero *Chlamydia* e *Mycoplasma*, infecções do trato urinário, respiratório e gastrintestinal (JANTRATID et al., 2010; SUNARIĆ et al., 2013). Além disso, possui ação frente a protozoários e pode ser administrada em conjunto com a quinina para tratamento de *Plasmodium falciparum* resistente à cloroquina (KOGAWA; SALGADO, 2013).

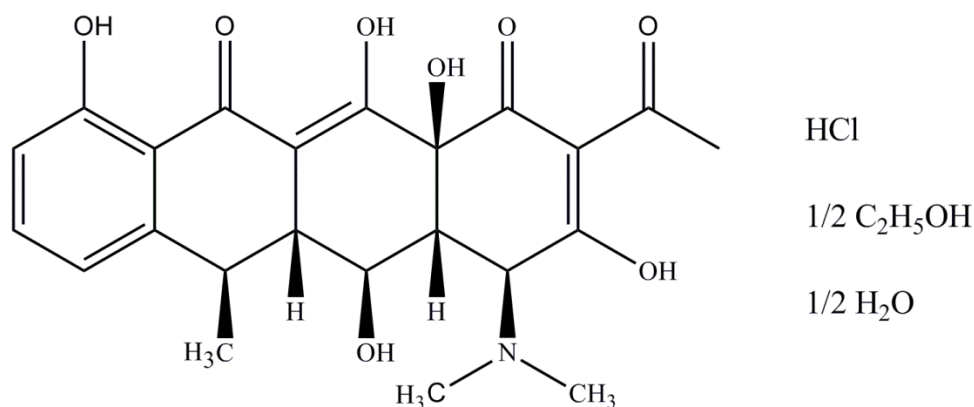
Na veterinária é indicada para tratamento de doenças causadas por micro-organismos como *Chlamydophila felis* (HARTMANN et al., 2008) *Staphylococcus spp.* (MAALAND et al., 2013), *Streptococcus suis*, *Haemophilus parasuis*, *Bordetella bronchiseptica*, *Pasteurella multocida*, *Mycoplasma spp.*, *Leptospira spp.*, *Salmonella suis*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, entre outros (GUTIÉRREZ et al., 2014). A dose recomendada para animais de pequeno porte, para o tratamento da maioria das infecções bacterianas, é de 5mg/kg, duas vezes ao dia ou 10mg/kg em dose única (GUNN-MOORE, 2014; PAPICH, 2013).

A doxiciclina também é frequentemente empregada como aditivo alimentar animal para prevenção de doenças, podendo ser adicionada à ração ou água dos mesmos. Há relatos da sua utilização no tratamento e prevenção de doenças em animais de diversas classes como pássaros, anfíbios, mamíferos e répteis (KOGAWA; SALGADO, 2013; RINALDI, 2014).

3.1.2 Descrição geral

A doxiciclina é disponibilizada como doxiciclina anidra, monoidratada, cloridrato e hiclato, sendo esta última obtida a partir de um processo de solvatação em meio alcoólico da forma cloridrato (CRUZ, 2016). A forma anidra tem massa molecular de 444,44, corresponde à molécula $C_{22}H_{24}N_2O_8$, registrada pelo CAS 564-25-0 e não é utilizada na formulação de medicamentos. A forma monoidratada, segundo as farmacopeias consultadas, é usada em comprimidos dispersíveis, cápsulas e suspensão oral (USP 39, 2016). É muito pouco solúvel em água e etanol, apresenta massa molecular 462,5, fórmula molecular $C_{22}H_{24}N_2O_8.H_2O$ e é registrada no CAS sob número 17086-28-1. Por sua vez, a doxiciclina hiclato (DOXH, Figura 3.1), objeto desse estudo, é usada no preparo de cápsulas, cápsulas de liberação prolongada, comprimidos, drágeas e injetáveis (USP 39, 2016). No Brasil, grande parte das formulações comercialmente disponíveis contém a forma hiclato. No quadro 1 encontram-se as principais características desse fármaco.

Figura 3.1 - Estrutura química doxiciclina hiclato



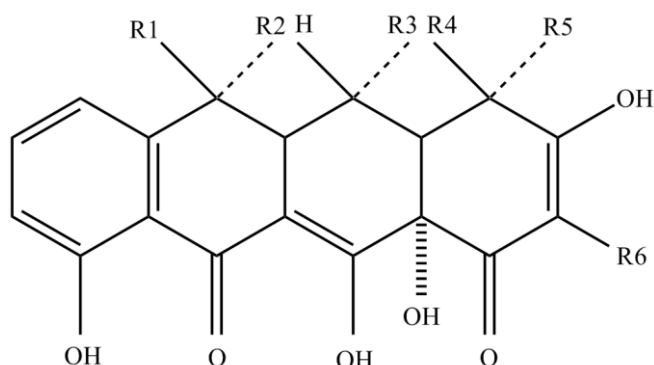
Quadro 1 – Principais características da doxiciclina hclato (DOXH)

Característica	Descrição
Aspecto	Pó amarelo cristalino e higroscópico
Solubilidade	Muito solúvel em água e metanol. Praticamente insolúvel em éter e clorofórmio
Fórmula molecular	(C ₂₂ H ₂₄ N ₂ O ₈ .HCl) ₂ .C ₂ H ₆ O.H ₂ O, massa molecular 1025,89 (USP 30, 2007) ou C ₂₂ H ₂₄ N ₂ O ₈ .HCl.½ C ₂ H ₆ O.½ H ₂ O, massa molecular 512,9 (BP, 2007)
Denominação química	Cloridrato hemietanol hemihidrato de (4S,4aR,5S,5aR,6R,12aS)-4-(dimetilamino)-3,5,10,12,12a-pentahidroxi-6-metil-1,11-dioxo-1,4,4a,5,5a,6,11,12a-octahidrotetraceno-2-carboxamida (JANTRATID et al., 2010)
Sinônimos	doxiciclina cloridrato; cloridrato de doxiciclina hidrato
CAS	24390-14-5
pKa	3,02 (pKa 1, ácido); 7,97 (pKa 2, ácido); 9,15 (pKa 3, básico) (KOGAWA; SALGADO, 2013; www.chemicalize.org) e 11,99 (pKa 4, ácido) (www.chemicalize.org)
Ponto de fusão	Carboniza sem fundir em 201°C (O'NEIL, 2006)
log P	- 3,66 (JANTRATID et al., 2010); -3,29 (CHEMICALIZE, 2016)
Armazenamento	deve ser mantida em recipientes fechados, ao abrigo da luz (BP, 2007)
Sistema de Classificação Biofarmacêutica (SCB)	Classe I – alta solubilidade e alta permeabilidade
Formas polimórficas	Não há relatos na literatura (JANTRATID et al., 2010)

3.1.3 Impurezas e processos de degradação

A doxiciclina é obtida por semi-síntese a partir da oxitetraciclina. Algumas impurezas podem estar presentes no fármaco em questão, derivadas principalmente do processo de síntese. Dentre as impurezas mais frequentes destacam-se a oxitetraciclina (OTC), metaciclina (MTC), 2-acetil-2-carboxamidociclina (ADDOX), 6-epidoxiciclina (6-EDOX), 4-epidoxiciclina (4-EDOX) e 4,6-epidoxiciclina (4,6-EDOX) (GIL et al., 2000). A MTC é um intermediário da síntese da doxiciclina e, durante a transformação de MTC em doxiciclina, a 6-EDOX pode ser formada. Pela epimerização da 6-EDOX, pode formar-se a 4,6-EDOX. A 4-EDOX origina-se da epimerização da doxiciclina, e por sua vez, a ADDOX é resíduo da síntese (GIL et al., 2000; SCHEPDAEL et al., 1995). As estruturas destas substâncias são apresentadas na Figura 3.2. Cabe ressaltar que o perfil de impurezas e de produtos de degradação da doxiciclina e da doxiciclina hclato são idênticos (BP, 2007)

Figura 3.2 - Estrutura da doxiciclina e substâncias relacionadas



	R1	R2	R3	R4	R5	R6
DOX	H	CH ₃	OH	H	N(CH ₃) ₂	CONH ₂
OTC	OH	CH ₃	OH	H	N(CH ₃) ₂	CONH ₂
MTC	-CH ₂	-CH ₂	OH	H	N(CH ₃) ₂	CONH ₂
6-EDOX	CH ₃	H	OH	H	N(CH ₃) ₂	CONH ₂
4-EDOX	H	CH ₃	OH	N(CH ₃) ₂	H	CONH ₂
4,6-EDOX	CH ₃	H	OH	N(CH ₃) ₂	H	CONH ₂
ADDOX	H	CH ₃	OH	H	N(CH ₃) ₂	CONH ₃

FONTE: GIL et al., 2000; SCHEPDAEL et al., 1995

De acordo com a USP, não mais do que 2% de MTC e 6-EDOX deve estar presente na matéria-prima de doxiciclina. Além dessas, o total de outras impurezas, se presentes, não deve ultrapassar o limite de 1% de acordo com o método farmacopeico (USP 39, 2016).

Sob condições anormais (calor, umidade e pH), as tetraciclinas, incluindo a doxiciclina, podem sofrer um processo de epimerização nas posições C-4 e C-6 formando uma mistura de produtos de degradação. Estes produtos de degradação têm baixa atividade antimicrobiana e alguns deles podem ser tóxicos (INJAC; DJORDJEVIC-MILIC; SRDJENOVIC, 2007). Ainda de acordo com a literatura (KOGAWA et al., 2014), a DOXH é fotoinstável e após algumas horas de exposição à luz já pode haver redução em seu teor.

3.1.4 Mecanismo de ação

As tetraciclinas são caracterizadas pela presença de uma estrutura central contendo quatro anéis e as suas diferentes propriedades farmacológicas se devem à substituição de vários subgrupos ligados a essa estrutura. A atividade antimicrobiana de todos os representantes desta classe é atribuída à inibição específica do ribossomo bacteriano, impedindo a síntese de proteínas e replicação da célula bacteriana (RINALDI, 2014). A doxiciclina apresenta essencialmente atividade bacteriostática, porém, em altas concentrações, pode ser bactericida (HAERDI-LANDERER et al., 2010).

3.1.5 Reações adversas

Durante o tratamento com a doxiciclina, os efeitos adversos que se manifestam com mais frequência em cães e gatos são no trato gastrointestinal, como vômitos, náusea e diarreia (SMITH; LEYDEN, 2005). Reações adversas envolvendo lesão renal ou lesões hepáticas são bastante incomuns (PAPICH, 2013), no entanto, a administração de sobredose de doxiciclina pode causar lesão renal ou quadros de pancreatite (JANTRATID et al., 2010).

Uma reação adversa associada à administração oral da DOXH é o aparecimento de lesões esofágicas, provavelmente resultantes do contato da molécula de cloridrato com a mucosa do esôfago (SMITH; LEYDEN, 2005; PAPICH, 2013). Esta reação adversa está comumente associada a cães e gatos domésticos e, para contorná-la é recomendado administrar água aos animais após a medicação (RINALDI, 2014). Em animais jovens, há relatos de amarelamento dos dentes e retardamento do desenvolvimento ósseo. Há também

evidências de problemas cardíacos relacionados à administração intravenosa do fármaco, que podem ser potencialmente fatais principalmente em eqüinos (SMITH; LEYDEN, 2005; RINALDI, 2014).

3.1.6 Farmacocinética

Estudos comparando a bioequivalência entre a doxiciclina monoidrato e a hiclato sugerem bioequivalência entre preparações, sendo que, dentre os representantes da classe das tetraciclinas, a doxiciclina possui a melhor absorção (JANTRATID et al., 2010; KITZES-COHEN et al., 1998). A biodisponibilidade do fármaco quando administrado por via oral na dose de 100 a 200 mg é de 90-100% e a fração percentual média do fármaco absorvida em humanos é de 95%. A absorção ocorre primeiramente no duodeno e de forma bastante rápida, sendo que em 15 minutos após a administração oral já é detectada na corrente sanguínea. A concentração plasmática máxima (C_{max}) é atingida de 2-3,5 horas após a administração de uma dose de 200 mg, sendo atingidas concentrações de 2,6 $\mu\text{g/mL}$ (JANTRATID et al., 2010).

Além dos estudos abordando a farmacocinética da doxiciclina em humanos também é possível encontrar estudos acerca do comportamento do fármaco em outros modelos animais. Em estudo com peixes da espécie tilapia, Yang e colaboradores (2014) obtiveram C_{max} próxima a 2 $\mu\text{g/mL}$ após a administração oral de dose de 20 mg/kg. Já estudos com porcos resultaram em valor máximo de 35 $\mu\text{g/mL}$ após administração IV de 10 mg/kg (GUTIÉRREZ et al., 2014) e próximo a 2 $\mu\text{g/mL}$ após administração pela mesma via a ovelhas, na dose de 20 mg/kg (CASTRO et al., 2009).

Cerca de 30 a 40% da excreção ocorre pelos rins, sendo o restante eliminado pelo trato gastrointestinal e excretado pelas fezes. A meia-vida do fármaco após dose única varia entre 12 a 25 horas e após dose múltipla entre 17 e 24 horas em humanos (JANTRATID et al., 2010). Em estudos com peixes a meia-vida após administração IV foi de 39 horas e de 77 horas após administração oral (YANG et al., 2014) enquanto para modelo canino a meia-vida foi de 7 horas após administração IV (RIOND et al., 1989).

Embora o leite e produtos lácteos possam influenciar na absorção de vários antibióticos da classe das tetraciclinas, para a DOX essa influência é menor. No entanto, é recomendado administrar a DOX separadamente de produtos que contenham cátions bi ou trivalentes, como os antiácidos, pois a absorção do fármaco pode ser prejudicada (JANTRATID et al., 2010).

3.1.7 Formas farmacêuticas

No Brasil, a doxiciclina está disponível para comercialização em formulações destinadas a uso humano e também uso específico em animais. Para uso humano está disponível na forma de comprimidos ou drágeas contendo 100 mg de doxiciclina hiclato/cloridrato e comprimidos solúveis contendo 100 mg de doxiciclina monoidratada.

Já na clínica veterinária é possível encontrar a doxiciclina na forma de comprimidos de 50, 80, 100, 200 e 400 mg (doxiciclina hiclato), suspensão oral (monoidratada), solução injetável (0,04 mg/mL) e solução a 10 e 20% (cloridrato) para administração oral ou para uso como suplemento junto à água ou alimento (BRASIL, 2014a).

3.2 TERAPIA MEDICAMENTOSA VETERINÁRIA

Segundo a Associação Brasileira da Indústria de Produtos para Animais de Estimação (ABINPET) os produtos desenvolvidos pela indústria voltados ao uso de animais de companhia podem ser divididos entre aqueles voltados à alimentação (Pet Food), ao cuidado com os mesmos (Pet Care) e aqueles voltados à saúde (Pet Vet), onde estão incluídos os produtos farmacêuticos (ABINPET, 2018). Segundo a Associação, o faturamento com esses produtos teve um aumento de 5% no ano de 2016 quando em comparação com o ano anterior. O crescimento de produtos e serviços voltados aos pets incentiva a busca por novos sistemas de liberação de fármacos visando obter tratamentos mais convenientes e seguros ao animal e ao tutor, desenvolver formas farmacêuticas diferenciadas e proporcionar tratamento adequado (AHMED; KASRAIAN, 2002).

No que diz respeito à produção de medicamentos existem semelhanças entre as indústrias de produtos humanos e veterinários, inclusive muitas indústrias farmacêuticas trabalham com a produção de medicamentos nos dois segmentos (CAPANEMA et al., 2007). Porém, existem diferenças relevantes na etapa que antecede a produção: na pesquisa e desenvolvimento de medicamentos para uso veterinário é importante observar as diferenças entre espécies e raças, variações sazonais, diferenças de metabolismo, aspectos relacionados à criação dos mesmos, entre outros (AHMED; KASRAIAN, 2002).

Quanto à administração de medicamentos, os animais podem ser classificados em três grandes grupos: animais de companhia (pets ou animais domésticos), animais destinados à alimentação e animais de grande porte. O período de tratamento varia de acordo com essa classificação: enquanto para animais destinados à alimentação o tratamento normalmente não é superior a 10 dias, para animais de companhia o mesmo pode se estender por meses. Essa classificação é importante quando se considera os objetivos e a expectativa do dono do animal durante o tratamento (SUN et al., 2004).

Normalmente existe dificuldade no tratamento dos animais domésticos devido à falta de habilidade para administração por via oral e à falta de conhecimentos e habilidade para aplicação da medicação via parenteral, principalmente no caso de doses múltiplas. A administração de formulações destinadas à via oral, como cápsulas e comprimidos, para cães e gatos requer mais habilidades que a administração a outros animais de companhia. Um estudo com 95 proprietários de cães demonstrou que apenas 44 dos mesmos foram bem sucedidos na administração de antibióticos, em tratamentos de 10 dias (SUN et al., 2004).

Desse modo, a via retal pode ser uma alternativa para a administração de medicamentos veterinários. Esta via apresenta algumas vantagens já discutidas anteriormente como alternativa para pacientes que não cooperam e também possibilidade de diminuição de efeitos colaterais relacionados ao trato gastrointestinal (EL SAYEH et al., 2014). Porém, esta via de administração pode ter alguns inconvenientes como baixa absorção de fármacos (o que também pode acontecer no tratamento humano) e falta de controle do paciente em manter a formulação no reto (BAVISKAR et al., 2013).

Na literatura há poucos estudos a respeito da administração de medicamentos pela via retal em animais, sendo que a grande parte deles consiste em estudos pré-clínicos de medicamentos para uso humano. Alguns deles trazem a via retal como alternativa para o uso veterinário, como o trabalho de KING (1994) que trata da administração retal de medicamentos em equinos. PETERS e colaboradores (2014) avaliaram a viabilidade da administração retal de levetiracetam em cães, com o objetivo de tratar crises epiléticas. Até o momento, não há dados sobre comportamento da doxiciclina administrada por via retal para tratamento humano ou animal.

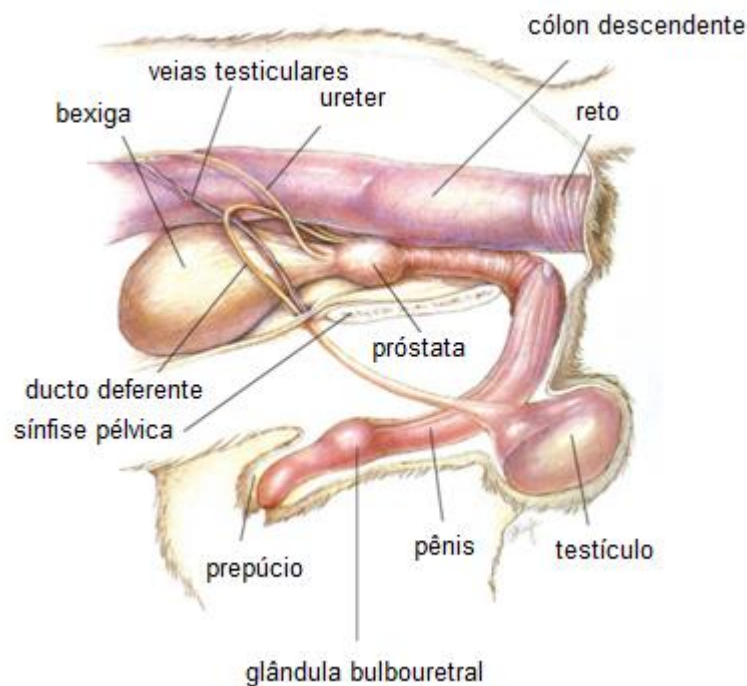
No que tange à legislação, a fiscalização da indústria, do comércio e do emprego de produtos de uso veterinário em território nacional é realizada pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) através da Coordenação de Fiscalização de Produtos Veterinários (CPV). Dentre algumas das Instruções Normativas vigentes pode-se destacar a nº13/2003, que aprova o Regulamento de Boas Práticas para Fabricação de Produtos

Veterinários, a nº 15/2005, que traz informações sobre estudos de estabilidade para fins de registro e a mais recente, nº 35/2017, que estabelece o procedimento para comercialização de produtos de controle especial. A ANVISA é responsável pelo controle e a fiscalização de resíduos de medicamentos veterinários em produtos de origem animal (BRASIL, 2018). No exterior o International Cooperation on Harmonisation of Technical Requirements of Veterinary Medicinal Product (VICH) é o órgão responsável pela regulamentação da fabricação e registro de produtos veterinários(VICH, 1998).

3.3 FISIOLOGIA E ABSORÇÃO DE MEDICAMENTOS PELA VIA RETAL

O reto é o segmento terminal do tubo digestivo e apresenta-se dilatado, na forma de ampola (FERREIRA, 2011) (Figura 3.3). A área de absorção do reto é menor em comparação ao intestino delgado, entretanto os epitélios do reto e da porção superior do intestino são histologicamente similares, o que resulta em habilidades comparáveis para absorção de fármacos (BERGOGNE-BÉRÉZIN; BRYSKIER, 1999; SLATTER, 2007).

Figura 3.3 - Anatomia anorretal de cães



FONTE: https://www.vetcheck.it/dog_anatomy (adaptado)

A mucosa retal é altamente vascularizada. Possui irrigação através das veias inferiores e médias, que estão diretamente ligadas à circulação sistêmica, e a veia retal superior, que está ligada ao sistema porta. Os fármacos absorvidos pela via retal, a partir das veias hemorroidais inferiores, ao contrário do que ocorre após a administração oral, evitam a circulação portal durante sua primeira passagem pela circulação geral, permitindo assim que fármacos que seriam destruídos pelo fígado exerçam efeitos sistêmicos. A circulação linfática também pode participar na absorção de fármacos por essa via (ANSEL; POPOVICH; ALLEN 2000; BERGOGNE-BÉRÉZIN; BRYSKIER, 1999).

Os mecanismos de absorção retal de fármacos não são diferentes daqueles apresentados pela porção superior do trato digestivo. Desse modo, características como peso molecular, lipofilicidade e grau de ionização das moléculas podem influenciar fortemente na absorção (BERGOGNE-BÉRÉZIN; BRYSKIER, 1999). Além destes fatores, também podem influenciar na absorção de fármacos pela via retal: quantidade de fármaco administrado, área de absorção, fluxo sanguíneo, tempo de permanência da formulação na cavidade retal, idade do paciente, características da base, entre outros (GENNARO, 2004; KING, 1994).

Além das vantagens já apresentadas, o reto apresenta outros aspectos positivos para a administração de medicamentos como o pH neutro e a baixa atividade enzimática, fatores que diminuem a possibilidade da degradação de medicamentos administrados por esta via (BAVISKAR et al., 2013).

3.4 SUPOSITÓRIOS

3.4.1 Aspectos gerais

Os supositórios são formas farmacêuticas sólidas de vários pesos e formas, usados principalmente para inserção de fármacos no reto, mas também podem ser administrados em outros locais como a vagina e a uretra (GENNARO, 2004). O objetivo do seu uso pode ser obtenção de efeitos locais, por exemplo, para alívio de dor e ardência causadas por hemorroidas, ou ainda efeito sistêmico, para analgesia, alívio de náuseas e vômitos, como tranquilizante, entre outros. A dose do fármaco administrada por via retal pode ser maior ou menor do que a dose administrada pela via oral, já que há alguns fatores que influenciam a absorção de fármacos por esta via, como conteúdo do cólon, rota circulatória, pH e características físico-químicas do fármaco e da base (ANSEL; POPOVICH; ALLEN, 2013).

Estas formas farmacêuticas apresentam uma série de vantagens frente a outras formulações, como alternativa para administração de medicamentos quando a via oral não está disponível em função de náusea, vômito, intolerância gástrica, entre outros. Também podem ser empregadas em pacientes que não cooperam com o tratamento pela via oral ou dificuldade com o acesso venoso (EL SAYEH et al., 2014).

Além das monografias de supositórios presentes em compêndios oficiais como a USP e a Farmacopeia Britânica, a literatura traz uma série de estudos envolvendo a incorporação de fármacos de diversas classes em supositórios. Há estudos a respeito da incorporação de antibióticos (BERGOGNE-BÉRÉZIN; BRYSKIER, 1999; KAUSS et al., 2013; NISHIHATA et al., 1984), antieméticos (MOHAMED et al., 2013), hipoglicemiantes (NAIR; CHIK; NOORDIN, 2015), anti-inflamatórios (JANICKI et al., 2001; ORLOVA et al., 2010; UZUNKAYA; BERGIŞADI, 2003), opiáceos (REANMONGKOL; KAEWNOPPARAT; RATANAJAMIT, 2011) e antiespasmódicos (HOSNY; ABDEL-HADY; EL-TAHIR, 1996), em formulações a serem administradas pela via retal. A natureza das bases empregadas e demais aspectos das formulações levam em consideração características dos fármacos empregados, dos pacientes-alvo e dos efeitos desejados.

A base empregada no preparo dos supositórios tem grande influência sobre a liberação das substâncias ativas. Uma base adequada deve ser capaz de se fundir, amolecer ou dissolver para liberar os fármacos para a absorção e também não deve interagir com o fármaco de modo que impeça a sua liberação. A escolha da base mais adequada está relacionada com a análise de dados da substância a ser incorporada, características do paciente, entre outros. É importante destacar que a mesma deve ser estável, não apresentar incompatibilidades com o fármaco e deve permitir a sua liberação (AULTON; TAYLOR, 2016).

As bases empregadas na obtenção de supositórios podem ser oleosas ou hidrossolúveis. Em geral, fármacos solúveis em óleo tendem a liberar mais lentamente quando formuladas em bases oleosas, uma vez que após a fusão da base o fármaco tende a permanecer no óleo e tem pouca tendência de migrar nos líquidos fisiológicos aquosos. Para fármacos hidrossolúveis incorporados em bases lipofílicas, em geral, o inverso é verdadeiro, resultado em boa liberação do fármaco (ANSEL; POPOVICH; ALLEN, 2000).

Dentre as bases oleosas mais utilizadas está a manteiga de cacau, um triglicerídeo de ocorrência natural que possui ponto de fusão entre 30-36°C, ou seja, abaixo da temperatura corporal (ANSEL; POPOVICH; ALLEN 2000). Embora funda rapidamente quando inserida no reto, ela é imiscível com os fluidos corporais, o que pode inibir a difusão de fármacos

lipossolúveis (GENNARO, 2004). A manteiga de cacau normalmente possui como uma das principais vantagens o baixo potencial em causar irritação local, graças às suas propriedades emolientes e difusoras. Porém, uma das suas principais desvantagens é a ocorrência de polimorfismo durante o preparo dos supositórios, o que pode ser controlado através da fusão lenta da base, na faixa de 30 – 36°C (ANSEL; POPOVICH; ALLEN, 2000).

As bases solúveis em água possuem a vantagem de não dependerem da temperatura corporal para a dissolução, uma vez que a mesma ocorre de forma lenta, assim como a mistura do fármaco com os fluidos retais, permitindo uma liberação prolongada da substância ativa (GENNARO, 2004). Porém, um dos problemas relacionados ao uso de bases hidrofílicas é o ressecamento e irritação das mucosas onde são administrados. Como bases frequentemente usadas podem ser citadas mistura de polietilenoglicóis de diferentes pesos moleculares ou de gelatina glicerinada (ANSEL; POPOVICH; ALLEN, 2013; GENNARO, 2004).

Os supositórios podem ser preparados de diferentes formas, mas as mais empregadas são a moldagem a partir de um material fundido ou o preparo por compressão. No primeiro caso, a base é fundida à temperatura adequada e o fármaco é disperso ou dissolvido na mesma. Em seguida, a mistura é derramada em um molde para supositórios, resfriada, e os supositórios são removidos através da abertura do molde (GENNARO, 2004).

O preparo de supositórios por compressão é normalmente indicado para fármacos ou produtos termolábeis, uma vez que não é necessário empregar calor. A massa de supositórios é colocada dentro de um molde que sofre pressão em uma das extremidades e o supositório é liberado, já moldado, pela outra extremidade. Como principal desvantagem deste processo está a necessidade de uma máquina especial para o preparo destas formulações (ANSEL; POPOVICH; ALLEN, 2013).

3.4.2 Controle de qualidade de supositórios

A USP 39 (2016) determina alguns ensaios, mencionados abaixo, para a avaliação da qualidade de supositórios. Nem todos os testes são obrigatórios para todas as formulações.

✓ *Identificação*: testes usados para confirmar a identidade da substância ativa declarada pelo fabricante.

✓ *Características físico-químicas*: são avaliadas características como cor, tamanho, peso, odor, forma, faixa de fusão, entre outros.

✓ *Teor:* avaliação da conformidade com o padrão exigido pela Farmacopeia. Normalmente são empregados métodos cromatográficos, porém outros métodos validados podem ser empregados nesta determinação.

✓ *Dissolução:* é uma das ferramentas mais importantes para a avaliação *in vitro* destas formulações. Através deste ensaio é possível verificar a dureza e a transição polimórfica de componentes ativos ou das próprias bases. O ensaio de dissolução pode ajudar nas fases iniciais do desenvolvimento de novos supositórios, no controle de qualidade e também pode fornecer informações a respeito da estabilidade das formulações (JANICKI et al., 2001). No entanto, ao contrário de comprimidos e cápsulas, não há muitos métodos de dissolução disponíveis para supositórios (ALLEN, 2007). Levantamento bibliográfico realizado na USP indicou que, das 16 monografias oficiais para supositórios, apenas uma apresenta o teste de dissolução (USP 39, 2016).

✓ *Água:* este ensaio pode ser importante na avaliação de supositórios contendo fármacos na forma de hidratos. Três métodos são comumente empregados para este fim: titulação, método azeotrópico e gravimétrico.

✓ *Uniformidade de conteúdo:* devem ser avaliadas unidades individuais dos supositórios a fim de avaliar se estão de acordo com a determinação dos compêndios oficiais. A uniformidade desta forma farmacêutica não é importante só entre unidades, mas também dentro de cada supositório, no caso de um supositório reduzido pela metade para a administração (ALLEN, 2007). Na USP 39 (2016) este ensaio é necessário para supositórios de indometacina, sulfato de morfina, progesterona e sulfato de tietilperazina.

✓ *Determinação de solventes residuais:* necessária apenas quando solventes orgânicos foram empregados na obtenção do fármaco ou matérias-primas presentes nos supositórios.

Além destes ensaios descritos pela USP, a literatura traz alguns outros ensaios que também podem ser empregados no controle de qualidade destas formulações:

✓ *Tempo para liquefação:* fornece informações a respeito do comportamento da formulação quando submetida a temperaturas de no máximo 37°C. O método mais empregado é o de Krowczynski, que mede o tempo necessário para o supositório liquefazer sob uma pressão semelhante aquela encontrada no reto (30g), na presença de água a 37°C. Em geral o tempo de liquefação deve ser menor de 30 minutos (ALLEN, 2007).

✓ *Teste de penetração do supositório:* este ensaio avalia o tempo necessário para que o supositório se torne suficientemente suave para a penetração. A temperatura

normalmente é ajustada para 37°C e o tempo para esse “amolecimento” do supositório é cronometrado (ALLEN, 2007).

✓ *Resistência mecânica*: os supositórios podem ser classificados como “frágeis” ou “elásticos”, através de um ensaio que mede a massa que o supositório pode suportar sem quebrar (ALLEN, 2007).

✓ *Tempo para desintegração*: a Farmacopeia Brasileira sugere o ensaio de desintegração para supositórios, realizado de forma semelhante à desintegração de comprimidos e cápsulas. Os supositórios devem desintegrar em até 30 minutos (base hidrofílica) ou em até 60 minutos (base hidrofóbica) (FB 5, 2010).

A maioria dos equipamentos empregados nesses ensaios é específica para análise de supositórios ou óvulos. Na maioria das vezes são apenas ensaios informativos, importantes no desenvolvimento de formulações. Portanto, as monografias individuais de cada produto devem ser consultadas para confirmar quais testes devem ser empregados.

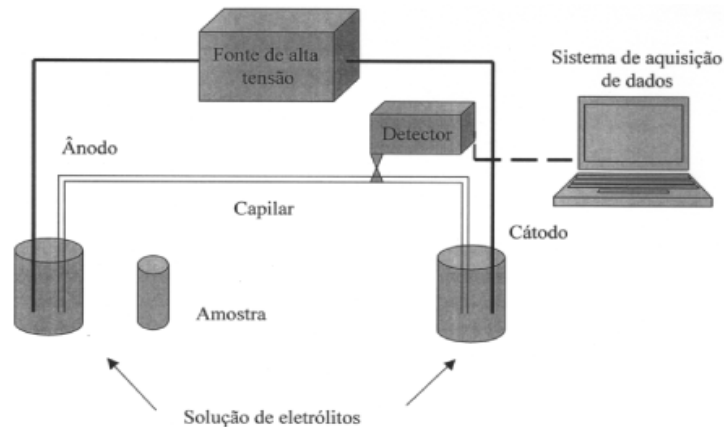
3.5 ELETROFORESE CAPILAR

A eletroforese capilar (EC) é um método de análise baseado na migração de solutos carregados, dissolvidos em uma solução eletrolítica, sob a influência de uma corrente elétrica (FB 5, 2010). Este método pode ser empregado para análises farmacêuticas e também de outros compostos, sendo uma alternativa aos métodos de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) (ALTRIA; KELLY; CLARK, 1998). A EC compreende uma família de técnicas de separação eletrocinéticas que separam compostos baseada em: diferença de mobilidade eletroforética, partição entre fases, ponto isoelétrico, tamanho molecular ou ainda a combinação de uma ou mais propriedades (FB 5, 2010).

A instrumentação da EC consiste em uma fonte de alta tensão, capilares (normalmente de sílica fundida), eletrodos (geralmente de platina) e um detector apropriado (Figura 3.4) (TAVARES, 1996). A separação é governada por dois fatores: movimento dos solutos no capilar devido ao campo elétrico, também denominado de velocidade eletroforética. O segundo ocorre em função do fluxo do eletrólito devido à superfície carregada na parede do capilar, conhecida como fluxo eletrosmótico (EOF) (FB 5, 2010). O EOF é caracterizado por um perfil radial constante de velocidade, não contribuindo para o alargamento de bandas. Esta peculiaridade distingue eletroforese capilar de métodos cromatográficos em fase líquida, que

apresentam uma variação parabólica para o perfil radial de velocidade dentro da coluna, característico do fluxo induzido por pressão (TAVARES, 1997).

Figura 3.4 – Esquema da eletroforese capilar



FONTE: (BONATO; JABOR; GAITANI, 2005)

Esta técnica se tornou popular na década de 80 e desde então vêm sendo cada vez mais empregada em análises de diferentes substâncias inclusive na indústria farmacêutica (MORZUNOVA, 2006; TAMIZI; JOUYBAN, 2015). A popularidade da EC pode ser demonstrada pela sua presença em Farmacopeias, pelo uso de técnicas convencionais pelo FDA e também pelo uso em diagnósticos e na medicina clínica (MORZUNOVA, 2006). Esta técnica pode ser empregada na determinação de diversas classes de fármacos, inclusive antibióticos (PÉREZ-FERNÁNDEZ et al., 2012).

A EC apresenta diferentes mecanismos de separação quando comparada à CLAE e apresenta algumas vantagens frente a esta técnica como alta eficiência, alta resolução, baixo consumo de amostras, consumo negligenciável de solventes, baixo custo dos capilares quando comparado às colunas cromatográficas e tempo rápido de análise, principalmente para amostras complexas (BARDEN et al., 2013; TAMIZI; JOUYBAN, 2015; WATSON, 1999).

A eletroforese capilar de zona livre (CZE) é um dos modos de separação eletroforética mais usados, conhecida como método tradicional de eletroforese (HARSTAD et al., 2016). Nesta técnica, o mecanismo de separação está baseado nas diferenças apresentadas pela razão carga/massa das espécies analisadas que migram com bandas e velocidades diferentes (FB 5, 2010).

Na eletroforese capilar de zona livre alguns parâmetros devem ser avaliados para o desenvolvimento e validação de métodos. A voltagem aplicada normalmente é proporcional ao tempo de análise, mas deve ser avaliada em conjunto com outros fatores a fim de diminuir o efeito *Joule* e o alargamento de bandas. A temperatura influencia normalmente na viscosidade e condutividade elétrica dos tampões utilizados e o tamanho do capilar interfere no tempo de análise (FB 5, 2010).

Quanto à polaridade do eletrodo, normalmente a separação se dá do ânodo em direção ao cátodo, ocasionando a migração do EOF em direção ao cátodo. Caso a polaridade seja invertida a direção do EOF é contrária à saída, e apenas solutos carregados com mobilidade eletroforética superior ao do EOF migram em direção ao cátodo (FB 5, 2010).

Além destes parâmetros, a composição e o pH do eletrólito de trabalho também devem ser avaliados. Em geral, a faixa de pH adequada para esta técnica varia entre 2 e 11 e a concentração dos tampões pode variar de 5 a 200 mM, dependendo da natureza dos mesmos. Diversos aditivos podem ser adicionados aos sistemas tamponantes a fim de melhorar a separação, dentre eles pode-se destacar solventes orgânicos, tensoativos e ciclodextrinas. A influência de cada um desses aditivos pode ser variável para cada composto e deve ser avaliada experimentalmente (MORZUNOVA, 2006; WATSON, 1999).

Os métodos oficiais voltados ao doseamento da DOXH são realizados por CLAE (BP, 2007; FB, 2010; USP 39, 2016) e empregam uma complexa mistura de reagentes para a fase móvel. Na literatura há relato de diversos métodos por CLAE voltados ao doseamento da DOXH tanto em fluídos biológicos (CROUBELS et al., 1998; SANTOS et al., 1996b; SHARIATI; YAMINI; ESRAFILI, 2009) quanto matéria-prima e forma farmacêutica (KOGAWA; SALGADO, 2013; SKÚLASON; INGÓLFSSON; KRISTMUNDSDÓTTIR, 2003).

Na literatura também existem métodos desenvolvidos e validados por EC para o doseamento da doxiciclina como forma farmacêutica (GIL et al., 2000; INJAC et al., 2007a) e fluídos biológicos (INJAC et al., 2007b). Uma vez que não existem relatos na literatura de supositórios contendo doxiciclina, também não há métodos descritos para seu doseamento.

3.6 FARMACOCINÉTICA E BIOFARMÁCIA

Farmacocinética (PK) pode ser descrita como o movimento de fármacos dentro do organismo após a sua administração, enquanto a farmacodinâmica (PD) é o estudo da relação entre a concentração de um fármaco em seu local de ação (FAN; DE LANNOY, 2014). A

farmacocinética é influenciada por quatro processos fundamentais: absorção, distribuição, metabolismo e excreção (ADME) (STORPIRTIS et al., 2009). Apesar de distintos, em muitos aspectos estes processos estão relacionados entre si (FAN; DE LANNOY, 2014).

O conhecimento da farmacocinética é fundamental para o desenvolvimento de fármacos e formulações, seja para entender a toxicidade e farmacologia animal ou para decidir sobre o esquema posológico apropriado (RANG et al., 2011). As agências responsáveis pela regulação do uso de fármacos precisam das informações detalhadas sobre a farmacocinética e devem entender os princípios de biodisponibilidade e bioequivalência para tomar decisões sobre licença de produtos. Além disso, um entendimento sobre os princípios gerais da farmacocinética é importante para os clínicos que precisam entender as recomendações de dosagens para fármacos licenciados garantindo assim seu uso correto (RANG et al., 2011).

São quatro os parâmetros farmacocinéticos usualmente determinados para a caracterização *in vivo* de uma substância: (1) depuração (expresso em L/min) que é a medida da habilidade do organismo em eliminar um composto, (2) volume de distribuição (V ou Vd, expresso em L), (3) meia-vida ($t_{1/2}$ expresso em minutos) que expressa o tempo necessário para que um fármaco decaia para metade da sua concentração no organismo e (4) biodisponibilidade (F, expressa em %), que indica a fração da dose que atinge a circulação sistêmica após uma administração não parenteral. A estimativa destes parâmetros em um ensaio *in vivo* geralmente envolve a determinação da concentração do fármaco no sangue ou plasma ao longo do tempo após a sua administração. Em geral é utilizada a dosagem no plasma, uma vez que o preparo para esta amostra é mais simples em relação ao sangue (FAN; DE LANNOY, 2014).

De forma geral, os principais fatores que podem alterar a biodisponibilidade de medicamentos estão relacionados às características do medicamento (formulação e processo de fabricação) e fatores fisiológicos do indivíduo (idade, sexo, peso corporal e fatores patológicos). Neste sentido, considera-se indispensável a realização de estudos de pré-formulação visando obter uma formulação estável a ser administrada por uma via adequada ao objetivo terapêutico (STORPIRTIS et al., 2009).

No passado era comum relacionar a eficácia clínica de um medicamento apenas à atividade farmacológica do fármaco, porém, esta relação vem se desfazendo uma vez que as técnicas e os adjuvantes de produção podem gerar formulações ineficazes ou mesmo tóxicas. As evidências de que técnicas e adjuvantes de produção podem gerar formulações ineficazes

incentivaram a criação de uma área que estuda a influência de fatores físicos e físico-químicos ligados ao fármaco e à forma farmacêutica sobre os efeitos do medicamento no organismo: a biofarmácia ou a biofarmacotécnica (STORPIRTIS et al., 2009).

O conhecimento obtido a partir dos estudos farmacêuticos vem comprovando que a qualidade da formulação vai além de aspectos técnicos como a identidade, potência, teor, pureza, entre outros, sendo indispensável que a mesma libere o fármaco na quantidade e velocidade adequadas ao objetivo terapêutico almejado (STORPIRTIS et al., 2009). Desta forma, além de desenvolver as formulações e os métodos adequados à caracterização e ao controle de qualidade das mesmas, fez-se necessário conhecer seu comportamento no organismo e assim avaliar sua viabilidade de uso.

Na literatura é possível encontrar informações a respeito da farmacocinética da doxiciclina em humanos e também em diversos modelos animais como cães e gatos (RIOND et al., 1989), peixes (YANG et al., 2014), cabras (JHA et al., 1989), ovelhas (CASTRO et al., 2009), patos (BRATOEV et al., 2016) entre outros. Porém não foram encontrados estudos trazendo dados a respeito da farmacocinética da doxiciclina em coelhos. Além dos estudos trazendo informações sobre o comportamento de formulações já disponíveis no mercado, também há estudos sobre o comportamento *in vivo* de novas formulações, principalmente aqueles que abordam o uso de formulações de ação prolongada (GUTIÉRREZ et al., 2012, 2014; VARGAS-ESTRADA; GRACIA-MORA; SUMANO, 2008). Entretanto, como citado anteriormente, ainda não existem estudos disponíveis abordando o comportamento da doxiciclina após administração retal.

4 CAPÍTULO I - A friendly environmental CE method to determine doxycycline hyclate in suppositories and application to tablet assay

Artigo aceito no periódico *Current Analytical Chemistry*, em 29/01/2018.

DOI: 10.2174/1573411014666180131162033)

4.1 APRESENTAÇÃO

O primeiro capítulo da tese descreve o desenvolvimento do método analítico por eletroforese capilar empregado no doseamento dos supositórios. A escolha desta técnica analítica se deu em função das suas vantagens frente à cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) como pouca geração de resíduos, baixo consumo de amostras e custo reduzido dos capilares utilizados nas análises. O método foi validado de acordo com a USP e ICH, avaliando os seguintes parâmetros: linearidade, exatidão, precisão, especificidade e robustez. Após a validação do método, também foi avaliada a aplicabilidade do método para o doseamento do fármaco em formulação comercial. Para este artigo foram preparados supositórios lipofílicos e hidrofílicos contendo o equivalente a 50 mg de doxiciclina.

A friendly environmental CE method to determine doxycycline hyclate in suppositories and application to tablet assay

Ana Paula Christ¹, Suelen Letícia Burin¹, Andréa Inês Horn Adams²

¹Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil.

²Departamento de Farmácia Industrial, Universidade Federal de Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil.

ABSTRACT

BACKGROUND: The demand for green analytical methods is rising, mainly due its impact on the reduction of waste generation. The official method to assay doxycycline hyclate (DOXH) is HPLC, using an unusual column and a multi-component mobile phase.

OBJECTIVE: To develop a capillary electrophoresis method (CE) to assay DOXH in suppositories and tablets.

METHOD: Doxycycline was analyzed in a CE system using a fused silica capillary silica (effective length 40 cm), voltage 25kV, temperature 24°C, detection at 260 nm and hydrodynamic injection of 50mBar/5s. The electrolyte was a mixture of acetonitrile and aqueous solution composed of 25 mM sodium carbonate and 5mM EDTA, pH 10.6.

RESULTS: The method was validated according to ICH requirements and DOXH detection was achieved at around 5 min. A linear relationship was observed in the range of 20 to 160 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, the method was precise, showing values of relative standard deviation below 2%. Accuracy was demonstrated by DOXH recovery values ranging from 98.0 to 102.0%, for all the formulations. The specificity was studied by the peak purity evaluation and by the good resolution between peaks of DOXH, degradation products and a related substance intentionally added to the sample solution. Robustness was evaluated by 2^3 full factorial design, and no effect on DOXH assay was observed under simultaneous variation in significant analytical parameters.

CONCLUSION: This simple and inexpensive method may be used to determine DOXH in suppositories as well tablets, under identical analytical conditions and can be a green alternative to the HPLC official method.

1. INTRODUCTION

Usually animals are treated by oral or parenteral route, however, rectal administration can be an alternative when patients are uncooperative, in cases where the oral route results in intolerance or the parenteral access is difficult [1]. The rectal route is usually related to human use, but recent studies suggested the use of this route in veterinary patients: Peters et al. (2014) developed suppositories containing levetiracetam [2], and Brewer et al. (2014), studied the pharmacokinetic of rectal forms of zonisamide, both of them aiming to the treatment of epileptic dogs [3].

Doxycycline hyclate (Figure 1, CAS 24390-14-5) is a semisynthetic tetracycline with broad-spectrum activity, which is used in human and veterinary medicine [4,5] to treat a great number of bacterial diseases [6]. With the molecular formula of $C_{22}H_{24}N_2O_8 \cdot HCl \cdot \frac{1}{2}C_2H_6O \cdot \frac{1}{2}H_2O$, doxycycline hyclate is freely soluble in water and methanol and sparingly soluble in ethanol [7]. In pharmaceuticals for human treatment, this drug is used to prepare injections, capsules, delayed-release capsules and tablets, as indicated by the compendia monographs. In veterinary medicine, doxycycline hyclate is available as tablets, injectable solution and oral solution [8] and it is one of the most widely used antibiotics to treat pets [9].

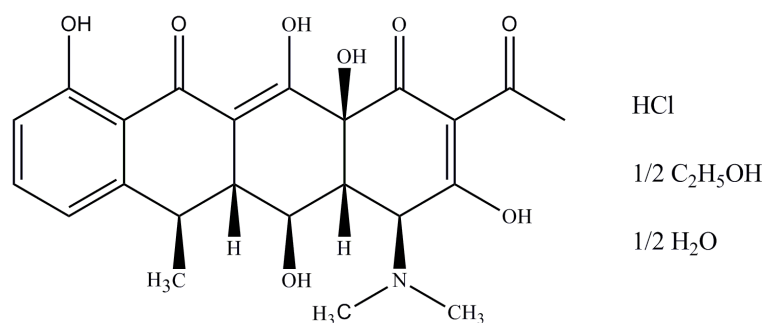


Figure 1- Chemical structure of doxycycline hyclate

Considering the relevance of doxycycline in the therapy of animals and aiming to minimize side effects like esophageal lesions [10-12] and cardiac problems [5,10] hydrophilic and lipophilic suppositories of doxycycline hyclate have been developed by our research group, for administration in pets. To our best knowledge, this is the first study that developed

a rectal formulation containing this drug and then, no analytical method is available to assay it.

Concerning the compendia methods, HPLC is the official method in BP 2007 and USP Pharmacopoeia to determine doxycycline hyclate in bulk and pharmaceutical products [7,13]. In both of them, the chromatographic assay employs a specific column (packed with styrene-divinylbenzene co-polymer, at 60°C) and a multi-component mobile phase (mixture of monobasic potassium phosphate, sodium hydroxide, tetrabutylammonium hydrogen sulfate, edetate disodium, water, and tertiary butyl alcohol). In the literature there are some HPLC methods to determine this antibiotic in pharmaceutical conventional pharmaceutical forms [14–16] and biological samples [17–22]; there are also some electrophoretic methods to determine the drug in bulk [23, 24] and human urine and solid pharmaceutical forms [25], but most of them are time-consuming and valid for specific pharmaceutical dosage forms or biological fluids.

In this context, it is relevant to develop a simple and fast analytical method for the determination of doxycycline hyclate in the suppositories produced. The capillary electrophoresis (CE) technique was chosen because of its high efficiency and resolution, negligible consumption of solvents and low cost of capillaries when compared to chromatographic columns [26,27]. Due to the advantages described for CE, in this study we also verified the applicability of the proposed method for determination of doxycycline in commercial tablets, aiming to propose an alternative to the official HPLC method. The method was validated according to the current international official guidelines.

2. EXPERIMENTAL

2.1. Materials

The doxycycline hyclate standard (purity of 99.1%) was obtained from Hovione (Loures, Portugal) and tetracycline hydrochloride (purity of 98.1%, used as internal standard) was obtained from Gemini (São Paulo, Brazil). Polyethylene glycol (PEG) 400 and 4000 and cocoa butter were acquired from Delaware (Porto Alegre, Brazil). Ethyl ether used in cocoa butter suppository extraction was purchased from Neon (São Paulo, Brazil) and acetonitrile from LiChrosolv[®] (Darmstadt, Germany). Methacycline (MTC) was obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, EUA). Sodium carbonate was obtained from Vetec (St. Louis, Missouri, EUA) and ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) from Proquímios (Rio de

Janeiro, Brazil). The doxycycline hyclate tablets (generic Ranbaxy®, batch 2699927) were purchased from a local pharmacy.

2.2. CE instrumentation and procedure

The method was developed on an Agilent 7100^{3D} CE System (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) equipped with a photodiode array (PDA) detector set at 260 nm and a temperature control device maintained at 24°C. The CE ChemStation[®] Software 1.04 was used for instrument control, data acquisition and data handling. Fused silica capillaries obtained from Polymicro Technologies. (Phoenix, USA) with 50 µm i.d. and 40 cm of effective length (48.5 total length) were used in all analyses. The hydrodynamic mode was used to inject all samples (50 mBar/5 seg) and an electrophoretic system was operated under normal polarity with voltage fixed at 25 kV.

New capillaries were conditioned with 1.0 M NaOH, ultrapure water and the background electrolyte (BGE) for 15 min of each one. On every working day, before running the first sample, the capillary was conditioned by the same procedure, replacing 1.0 M NaOH by 0.1 M NaOH. In between runs, the capillaries were flushed with 0.1 M NaOH (3 min), ultrapure water (3 min) and BGE (4 min).

After the method optimization, the instrument was evaluated through the system suitability test, by the analysis of five injections of standard solution at usual concentration on the same day. The observed parameter was the relative standard deviation between peak area, peak asymmetry, theoretical plates and migration time, for the purpose of evaluate the reproducibility of the CE system.

2.3. Suppository preparation

Two formulations with different characteristics were obtained: hydrophilic, prepared with polyethylene glycol and lipophilic, prepared with cocoa butter. They were prepared by the molding method, according to the following steps: fusion of the base, addition of the drug and solidification of the obtained formulation. For hydrophilic formulation, equal amounts of PEG 400 and 4000 were measured, kept in a water bath at 60°C and just after melting, doxycycline hyclate was added. The formulation was homogenized for two minutes and then transferred to plastic moulds with a capacity of 1g. After solidification, the units were stored at room temperature (20-25°C).

Lipophilic suppositories were prepared by a similar procedure, except that the cocoa butter was fused in a water bath at a temperature of 36°C, and the suppositories obtained were kept under refrigeration (2-8°C) in plastic moulds, until use.

As established in the compendial monographs of pharmaceutical forms of doxycycline hyclate, the quantity of active ingredient is stated in terms of the equivalent amount of doxycycline, as well as the solutions prepared to assay the drug products [7,13]. Thus, both formulations were prepared using a correction factor of 1.15, weighing 57.5 mg of doxycycline hyclate/suppository, which is equivalent to 50 mg of doxycycline. PEG suppository was named S-PEG and cocoa butter suppository named as S-CBT.

2.4 Solutions

2.4.1 Doxycycline standard solution and internal standard (IS) solution

A standard stock solution of doxycycline hyclate equivalent to 200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ of doxycycline, and a tetracycline hydrochloride stock solution (equivalent to 400 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, used as IS) were prepared in ultrapure water, stored at 2-8°C and used in a period of ten days. On the day of the analyses, 1.0 mL of standard stock solution, 0.5 mL of IS stock solution and 0.5 mL of ultrapure water were mixed in a 2 mL eppendorf, to obtain 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ for doxycycline and IS.

2.4.2 Sample solutions

To prepare the S-PEG sample solutions, three units of suppositories were crushed and mixed to obtain a homogenous sample. An aliquot equivalent to 20 mg of doxycycline was weighed and dissolved with 50 mL of water. This solution was maintained at 60°C and kept under stirring during ten minutes. Then, the solution was transferred to a volumetric flask and the volume was adjusted to 100 mL with water, to obtain a theoretical concentration of 200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

S-CBT sample solutions were also prepared by crushing three formulation units. An aliquot equivalent to 20 mg of doxycycline was dissolved in 50 mL of ethyl ether and this solution was transferred to a separator. The drug extraction was performed with one portion of 50 mL and three portions of 15 mL of water. The aqueous fractions were transferred to a 100 mL volumetric flask and the volume was adjusted with water, to obtain a theoretical concentration of 200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

In order to prepare the tablet solution, ten tablets were weighed to obtain the mean weight, and ground. A quantity of the powdered tablets equivalent to 20 mg of doxycycline was weighed, transferred to a 100 mL volumetric flask, mixed with 80 mL of water and shaken for 10 minutes. The final volume was adjusted to 100 mL with water, obtaining a concentration of $200 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Before the assay, 1 mL of each solution at $200 \mu\text{g mL}^{-1}$ was mixed with 0.5 mL of IS stock solution and 0.5 ultrapure water in a 2 mL eppendorf, to obtain $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ for doxycycline and internal standard. All analytical solutions and BGE were filtered through a $0.45 \mu\text{m}$ nylon membrane filter (Sartorius Stedim Biotech, Germany) before analysis.

2.4.3. BGE solutions

The BGE solution was a mixture of acetonitrile and a solution of 25 mM sodium carbonate and 5mM EDTA, pH 10.6. To prepare the salt solution, 0.256 g of sodium carbonate and 0.186 g of EDTA were dissolved in 50 mL of water, the pH was adjusted to 10.6 with NaOH 1M (pHmeter Denver, UB-10) and the volume was completed to 100 mL. This solution was stored at $2-8^{\circ}\text{C}$ for a week and on the day of the analyses, acetonitrile and the salt solution were mixed in an 80:20 proportion, respectively.

2.5 Validation of CE procedure

The proposed method was validated according to the United States Pharmacopoeia [13] requirements and International Conference on Harmonization (ICH) guidelines [28]. Tetracycline hydrochloride was used as internal standard (IS) at a constant level ($100 \mu\text{g mL}^{-1}$) in all validation experiments, and the area ratio (doxycycline peak area/IS peak area) was the analytical response.

2.5.1 Specificity

Method specificity was studied by forced degradation of sample solutions in alkaline, acidic and oxidative media, temperature of 40°C and radiation exposure (UVC). The photodiode detector (PDA) was used to verify doxycycline peak purity and to reinforce the method specificity. The samples were prepared according to section 2.4.2, however for alkaline, acidic and oxidative degradation they were prepared at $400 \mu\text{g mL}^{-1}$ and for the thermal and radiation condition they were prepared at $200 \mu\text{g mL}^{-1}$. For acidic and alkaline

hydrolysis, 10 mL of suppository sample solutions were mixed with 10 mL of 0.1 M HCl or 0.01M NaOH and remained at room temperature, under light protection, for 26 hours or 16 hours, respectively. At the end of degradation treatment, the mixtures were neutralized as necessary with 0.1M NaOH or 0.1M and the final theoretical concentration obtained was $200\mu\text{g.mL}^{-1}$. For the oxidative degradation, 10 mL of sample solution were mixed with 10 mL of 3% hydrogen peroxide, and stayed for 5 hours, protected from light and at room temperature. After the reaction time, the solutions were diluted to $200\mu\text{g.mL}^{-1}$. To study the effect of temperature and radiation, sample solutions at $200\mu\text{g.mL}^{-1}$ were exposed to 40°C , for 72 hours, or to UVC radiation, for 15 hours. Before the analysis, all the solutions were mixed with the IS stock solution, to obtain a theoretical concentration of $100\mu\text{g.mL}^{-1}$ for each component.

In addition to the stress testing, specificity was also evaluated through the addition of metacycline (MTC), a known impurity of the doxycycline synthesis process. The MTC solution was prepared in methanol ($500\mu\text{g.mL}^{-1}$) and was added aiming to obtain a final concentration of $62.5\mu\text{g.mL}^{-1}$.

2.5.2 Linearity

The linearity was investigated in the range of $20\text{-}160\mu\text{g.mL}^{-1}$ through three analytical independent curves with seven concentrations each (20, 40, 60, 80, 100, 120 and $160\mu\text{g.mL}^{-1}$). The analytical curves were obtained by plotting the area ratio (doxycycline peak area/IS peak area) *versus* concentration and the linearity was evaluated by linear regression and ANOVA ($\alpha=0.05$).

2.5.3 Precision

Precision was assessed by the assay of six homogeneous samples of each developed suppository, prepared as described in section 2.4.2. Repeatability was determined by six independent samples of S-PEG and S-MTG assayed under the same experimental condition (day and analyst). Intermediate precision was examined by the analysis of six other samples on another day (intermediary precision). The doxycycline content was calculated comparing it to a standard response, which was prepared as described in section 2.4.1. The relative standard deviation (RSD) was calculated and values $<2.0\%$ were considered acceptable [29].

2.5.4 Accuracy

Accuracy was determined by the addition of known amounts of doxycycline standard solution to the mixture of excipients, according to the following procedure: placebo suppositories were prepared according to section 2.2, without the addition of doxycycline. After this, three units of each suppository were crushed and quantities were transferred to a vessel with water (S-PEG) or to a vessel containing ether (S-MTG). Each sample was treated according to the same procedure described for the sample solutions (section 2.4.2), and during the extraction step, doxycycline standard was added in order to obtain final concentrations of 80, 100 and 120 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, which correspond to 80, 100 and 120 % of the work concentration. This assay was performed in triplicate and recovery in the range of 98-102% was considered acceptable.

2.5.5 Robustness

Robustness was evaluated through a factorial design for S-PEG and S-CBT formulations, to evaluate the effect of simultaneous variation of analytical factors in the assay. Three quantitative electrophoretic factors were investigated, at low and high levels: voltage (24 and 26 kV, optimum 25 kV), temperature (23 and 25°C, optimal 24°C) and sodium carbonate concentration (23 and 27 mM, optimal 25 mM). Thus, we performed a full factorial design 2^3 with three trials at the center (optimal condition), totaling 11 experiments in random order. The standard and sample solutions were prepared as mentioned in sections 2.4.1 and 2.4.2. Minitab[®] v.17 software (Minitab Inc., State College, PA, USA) was used to plan this assay and evaluate the results.

2.6 Method application

Because of the advantages of the CE method, mainly low solvent consumption and minimum waste generation, its ability to assay doxycycline in tablets was also evaluated. For this propose, specificity, accuracy and precision parameters were studied, using as sample tablets of 100 mg, which were prepared as described at section 2.4.2.

The specificity was verified by peak purity index, through PDA detector and by checking on the interference of metacycline in the assay. Accuracy was studied by the recovery test, by adding known amounts of doxycycline standard solution to sample solutions

at three levels: 80, 100 and 120% of the usual concentration test. Precision was evaluated at two levels: intermediate and reproducibility, in the same way described in section 2.5.3.

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1 Method development and optimization

In capillary electrophoresis many variables can influence the separation efficiency, such as pH and BGE composition, voltage and temperature. The pH value of BGE is very important in method development because it affects the charge of the compounds under investigation [30]. Doxycycline hyclate ionization is highly pH-value-dependent, therefore some buffers with different compositions like potassium phosphate, ammonium carbonate and sodium carbonate at high pH values (9.0-11.0) [23] were tested. Sodium carbonate was chosen to compose BGE because it resulted in peaks with good symmetry and appropriate migration time. The effect of the sodium carbonate concentration in the range of 10-30 mM and of the pH around 10 was analyzed. Good sensitivity and peak shape were obtained with 25 mM sodium carbonate buffer, at pH 10.6; to this solution, 5mM EDTA was added to prevent interaction of doxycycline with metals through complexation [23,24]. In general organic solvents added to BGE can cause changes in electrophoretic parameters, such as migration time and peak shape [30,31]. With the addition of 20% acetonitrile to buffer solution we observed lower current values and improved peak shape.

Once the BGE composition had been defined, the effect of different values of voltage (20-30Kv) and temperature (20-35°C) were evaluated, and the best results were observed with 25kV and 24°C. The detection was done in 260 nm, the wavelength of maximum doxycycline absorbance in this analytical condition. Among the drugs tested to be used as internal standard, tetracycline was selected, because it showed appropriate peak symmetry, a short migration time (around 4.8 min) with good resolution of doxycycline peak (around 5.1 min) and good absorbance in the wavelength selected. Additionally, because of the structural similarity, it reinforces the specificity of the method. A typical electropherogram obtained for the standard solution is shown in Figure 2. After optimization, the performance of the CE system was checked, and the RSD values calculated for migration time (5.13 ± 0.14), peak asymmetry (0.81 ± 0.01) and theoretical plates (36131.9 ± 831.5) were within the acceptable range (RSD <3%) [13].

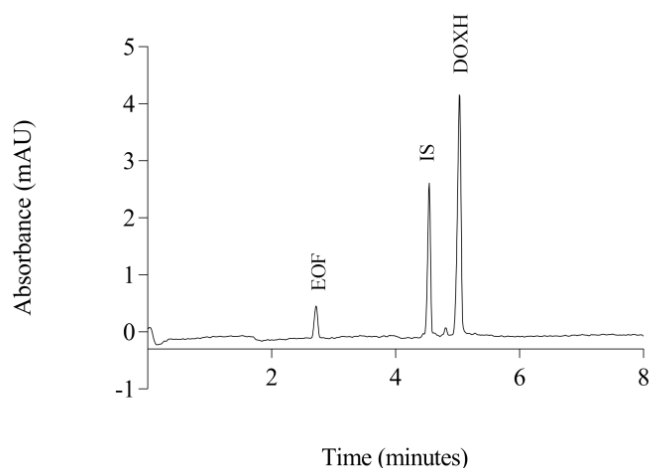


Figure 2 - CE electropherogram obtained for standard solution. EOF: electroosmotic flow; IS: internal standard, at $100\mu\text{g.mL}^{-1}$ and DOX: doxycycline, at $100\mu\text{g.mL}^{-1}$.

3.2 Method validation

3.2.1 Specificity

Specificity was evaluated by stress testing applied to the sample solutions, to verify the ability of the method to quantify doxycycline in the mixture of excipients and degradation products. Besides the new substances formed in the forced degradation conditions, we added to solutions the impurity methacycline (MTC), which is structurally related to the analyte. The peak purity was verified by the PDA detector using a total peak purity technique and under all conditions and for all samples the purity index was > 0.999 . Results obtained are shown in Table 1.

Despite the decrease in doxycycline residual content under all the stress conditions, no extra peaks were observed under acidic and oxidative media, temperature and radiation treatments (electropherograms not shown). Conversely, in alkaline conditions it was possible to observe an extra peak, at about 5.6 min, which can be assigned as a doxycycline degradation product, because it was not observed in the placebo solution. MTC at $62.5\mu\text{g.mL}^{-1}$ was added to S-PEG (Figure 3) and S-CBT (Figure 4) alkaline stressed sample solution, and a good resolution between the peaks of IS, MTC, doxycycline and degradation product (DP) was observed, corroborating the method specificity.

Table 1 - Results obtained on specificity assay

	Degradation Condition	Exposition time (h)	Degradation obtained (%) ^a	Extra peaks (min)
S-PEG	NaOH 0.01 M	16	24.04 ± 1.05	About 5.6
	HCl 0.1 M	26	8.14 ± 1.22	ND ^b
	H ₂ O ₂ 3%	5	27.81 ± 2.15	ND
	40°C	72	10.39 ± 1.42	ND
	UVC radiation	15	9.31 ± 1.93	ND
S-MTG	NaOH 0.01 M	16	25.32 ± 2.21	About 5.6
	HCl 0.1 M	26	4.58 ± 0.68	ND
	H ₂ O ₂ 3%	5	24.17 ± 0.39	ND
	40°C	72	6.41 ± 0.66	ND
	UVC radiation	15	14.59 ± 2.97	ND

^an=2; ^bND= not detected

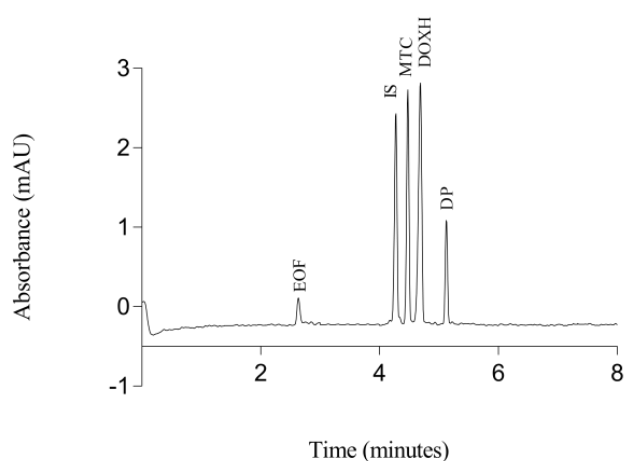


Figure 3 - Specificity of S-PEG. IS: internal standard; MTC: methacycline; DOX: doxycycline and DP: degradation product

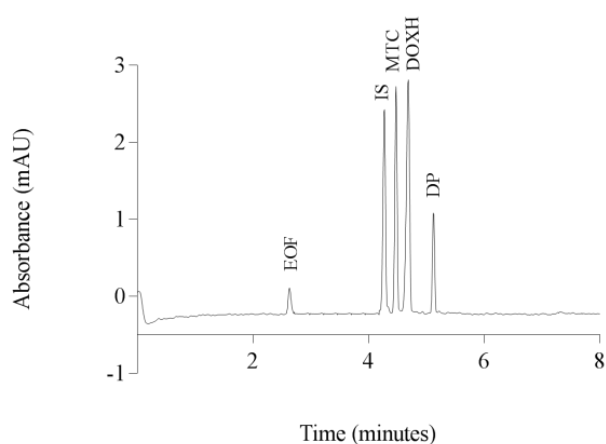


Figure 4 - Specificity of S-CBT. IS: internal standard; MTC: methacycline; DOX: doxycycline and DP: degradation product

3.2.2 Linearity

The final analytical curve obtained was linear in the range of 20-160 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ with a correlation coefficient (r) 0.999 and equation $y=0.022x+0.040$, where x is concentration and y is the absolute area ratio (doxycycline/IS). The analytical data were analyzed by ANOVA demonstrating a significant linear regression ($p<0.05$) and no significant deviation from linearity ($p>0.05$). These results confirmed the linearity of this proposed method.

3.2.3 Precision

The precision was evaluated at two levels for both suppository formulations: repeatability and intermediary precision. Repeatability is also known as intra-assay precision and expresses the method precision under the same condition during a short time. The intermediary precision evaluate variations between different analysts, days, equipment, etc [28]. For both precision levels RSD values were lower than the accepted value of 2% (Table 2), indicating the method precision [29].

Table 2 - Results obtained in repeatability and intermediary precision for suppositories formulations

Formulation	Intra-day		Inter-day
	% \pm SD (RSD)		% \pm SD (RSD)
	Day 1 (n=6)	Day 2 (n=6)	(n=12)
S-PEG	99.58 \pm 1.35 (1.35)	99.44 \pm 0.85 (0.85)	99.61 \pm 1.07 (1.08)
S-MTG	98.40 \pm 1.46 (1.48)	99.21 \pm 1.05 (1.06)	98.80 \pm 1.28 (1.30)

3.2.4 Accuracy

The accuracy was evaluated by spiking the placebo suppositories with the doxycycline standard, during the extraction step at three different concentrations, in triplicate (80, 100 and 120% of usual concentration). The accuracy was expressed as the percentage of doxycycline recovered from the placebo suppositories, which were treated by the same procedure used in the sample preparation (Table 3). All the recovery values of each formulation were within the recommended value of 98-102%, corroborating with method accuracy.

Table 3 - Recovery of doxycycline standard added to placebo suppositories (S-PEG and S-CBT formulations)

Formulation	Added ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	Found ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	Recovery* (%)	RSD (%)
S-PEG	80	79.35 \pm 1.16	100.28	1.78
	100	99.67 \pm 0.93	99.12	0.72
	120	119.36 \pm 1.91	98.93	1.14
S-PEG mean recovery** and RSD			99.44	1.29
S-CBT	80	77.85 \pm 2.23	98.03	0.75
	100	95.49 \pm 2.02	98.21	0.76
	120	118.66 \pm 2.74	99.97	1.77
S-CBT mean recovery ** and RSD			98.74	1.40

*mean (n=3); ** mean (n=9)

3.2.5 Robustness

A multivariate approach was used in robustness testing to evaluate the effect of simultaneous variation of the analytical factors in the analytical response (assay %), in order to determine which sources of variation must be more tightly controlled during the execution of the method. Factorial design is a tool used in the evaluation of the robustness in several studies already published [32–35]. The advantage of using factorial analysis to verify the analytical method robustness is the possibility of evaluating all experimental variables of interest individually and the possible effect of the interaction on desired response [36]. For this evaluation, a full factorial design, with two levels in three factors was chosen. The factors commonly studied in capillary electrophoresis include pH and composition of BGE, applied voltage, capillary length, temperature and others [37]. We evaluated the effect of voltage, temperature and sodium carbonate concentration because during preliminary tests of the method development they demonstrated great influence on the final results.

The experimental design, conditions and the results obtained in the assay of sample solutions of both formulations, injected in a randomized sequence, are summarized in Table 4.

Table 4 - Full factorial design 2³ for robustness evaluation

Sample	Factors			DOXH assay (%)	
	x1	x2	x3	S-PEG	S-CBT
1	1	1	1	99.68	100.71
2	1	-1	-1	98.55	101.61
3	-1	-1	1	103.23	101.29
4	-1	1	1	99.49	98.73
5	-1	1	-1	102.27	100.64
6	-1	-1	-1	99.88	101.80
7	1	-1	1	99.90	102.62
8	1	1	-1	100.60	98.81
9	0	0	0	100.55	98.34
10	0	0	0	101.13	102.20
11	0	0	0	99.51	98.43

x1: voltage; x2:temperature; x3: sodium carbonate concentration

The significance of the factors was evaluated using Pareto chart (Figures 5 and 6). This graphic consists of bars whose length is proportional to the absolute value of the effect estimated by the pseudo standard error defined by Lenth [38]. Codes A, B and C correspond respectively to the factors voltage, temperature and sodium carbonate concentration and combination between codes corresponds to factor combinations. This chart also has a vertical line on t critical value ($\alpha=0.05$). The bars that cross this vertical line indicate the factor or the factor combination which produces responses outside the acceptable limits for the method. The results obtained on factorial study suggest that no single factor or their combination resulted in significant influence on suppository content, confirming the method robustness.

As part of the robustness evaluation, the stability of solutions was studied at room temperature ($25 \pm 2^\circ\text{C}$) and at refrigeration temperature ($2-8^\circ\text{C}$). The work solutions were considered stable during 8h at room temperature and stock solutions 7 days at $2-8^\circ\text{C}$ (RSD $>2\%$).

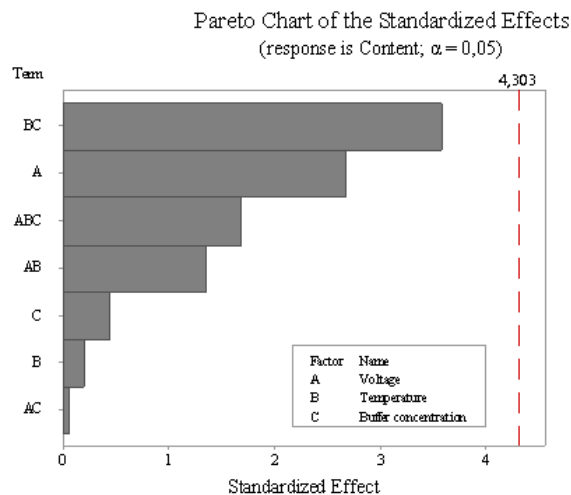


Figure 5 - Pareto chart obtained in the S-PEG robustness evaluation

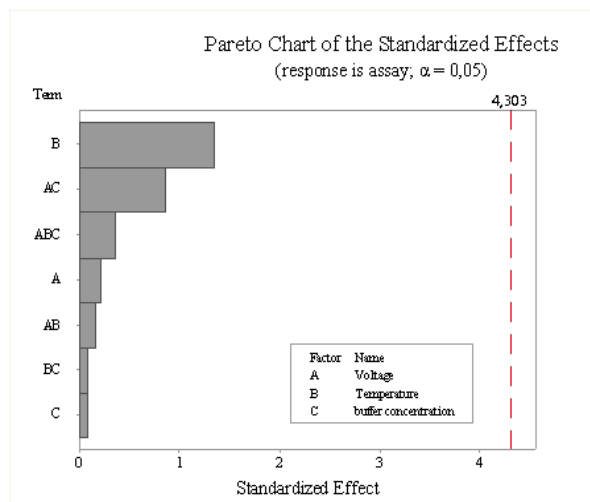


Figure 6 - Pareto chart obtained in the S-CBT robustness evaluation

3.3 Method application

The objective of this study was to develop a method to assay doxycycline in a new pharmaceutical form, which also could provide an alternative to the previously reported methods, in terms of time consumed and solvents saved. It is important to emphasize that as opposed to the HPLC method, this CE method generates less than 10 mL of waste in a day of analysis, being mostly aqueous. In this scenario, the applicability of this CE method was also evaluated in the assay of doxycycline tablets. Thus, the same analytical conditions were applied, and the method was partially revalidated, in terms of specificity, accuracy and precision parameters [39]. Figure 7 presents a typical electropherogram of doxycycline tablets, whose profile resembles those observed in the suppository analysis. The sample solutions were diluted to the same theoretical concentration of the suppositories, to cover the linearity range of the assay.

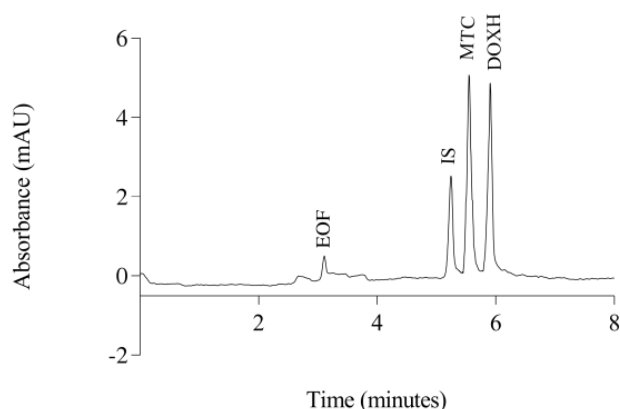


Figure 7 - Electropherogram of doxycycline tablet. IS: internal standard; MTC: methacycline; DOX: doxycycline

The specificity was indicated by suitable peak purity indexes, which were >0.999 in the entire analyzed samples, even in the presence of the structurally related substances used in the assay, i.e., tetracycline and methacycline.

Repeatability was determined by calculating the relative standard deviation (RSD) between six independent analyses of the tablets, at the usual concentration ($100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) on the same day and under the same experimental conditions; the intermediate precision was accessed by six other independent samples, analyzed on a second day. For repeatability the value of RSD was 0.97% ($96.12\% \pm 0.94$) and in the intermediate precision the RSD was 0.79% (96.07 ± 0.76). The lower values of RSD ($< 2.0\%$) indicate precision of this method for doxycycline tablets [29]. A recovery test was applied to verify the method accuracy, and the mean recovery was $100.89\% \pm 2.00$ (RSD 1.98%), $98.72\% \pm 0.68$ (RSD 0.69%) and 100.09 ± 1.74 (RSD 1.74%) for 80, 100 and 120% of usual concentration respectively (mean recovery = 99.9%). The recovery values are between 98-102% and RSD <2.0 , indicating accuracy of this method for doxycycline tablets. This set of results indicate that the method developed for dosing doxycycline in suppositories can also be applied for the assay of this drug in tablets.

4. Conclusion

The method validated in this study met the specificity, linearity, accuracy, precision, and robustness parameters for analytical studies. Furthermore, the method developed can be considered a green method, due to the negligible solvent waste combined with low cost of

consumable items of the technique and the short analysis time, which also reduces the cost of analysis. No interferences were observed from the excipients, degradation products or from the related substances used in the assay. These results suggest that this CE method is suitable for the assay of doxycycline hyclate in classical dosage forms, as tablets, as well as in the innovative pharmaceutical product here developed, under the same electrophoretic conditions.

CONFLICT OF INTEREST

The authors have no conflict of interest to disclose.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors wish to thank CAPES (Brazil) for the financial support.

REFERENCES

- [1] Bergogne-Bérézin, E.; Bryskier, a. The suppository form of antibiotic administration: Pharmacokinetics and clinical application. *J. Antimicrob. Chemother.* **1999**, *43* (2), 177–185.
- [2] Peters, R. K.; Schubert, T.; Clemmons, R.; Vickroy, T. Levetiracetam rectal administration in healthy dogs. *J. Vet. Intern. Med.* **2014**, *28* (2), 504–509.
- [3] Brewer, D. M.; Cerda-Gonzalez, S.; Dewey, C. W.; Boothe, D.; Van Horne, K. Pharmacokinetics of single-dose rectal zonisamide administration in normal dogs. *J. Vet. Intern. Med.* **2015**, *29* (2), 603–606.
- [4] Griffin, M. O.; Fricovsky, E.; Ceballos, G.; Villarreal, F. Tetracyclines : a pleiotropic family of compounds with promising therapeutic properties . Review of the literature. *Am J Physiol Cell Physiol* **2010**, *299*, 539–548.
- [5] Rinaldi, M. L. Therapeutic Review: Doxycycline. *J. Exot. Pet Med.* **2014**, *23* (4), 415–417.
- [6] Jantratid, E.; Strauch, S.; Becker, C.; Dressman, J. B.; Amidon, G. L.; Junginger, H. E.; Kopp, S. Biowaiver monographs for immediate release solid oral dosage forms : doxycycline hyclate. *J. Pharm. Sci.* **2010**, *99* (4), 1639–1653.
- [7] BP. *British Pharmacopoeia*; The Stationery Office, Ed.; London, 2007.
- [8] Brasil. Ministério da Agricultura e Pecuária - Coordenação de Fiscalização de Produtos Veterinários. **2014**, 1–200.
- [9] Maaland, M. G.; Papich, M. G.; Turnidge, J.; Guardabassi, L. Pharmacodynamics of doxycycline and tetracycline against staphylococcus pseudintermedius: Proposal of canine-specific breakpoints for doxycycline. *J. Clin. Microbiol.* **2013**, *51* (11), 3547–3554.
- [10] Smith, K.; Leyden, J. J. Safety of doxycycline and minocycline: A systematic review. *Clin. Ther.* **2005**, *27* (9), 1329–1342.
- [11] Gunn-Moore, D. a. Feline mycobacterial infections. *Vet. J.* **2014**, *201* (2), 230–238.

- [12] Papich, M. G. Antibiotic treatment of resistant infections in small animals. *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.* **2013**, *43* (5), 1091–1107.
- [13] USP 39. *The United States Pharmacopeia*, 39th ed.; Convention, T. U. S. P., Ed.; Rockville, 2016.
- [14] Skúlason, S.; Ingólfsson, E.; Kristmundsdóttir, T. Development of a simple HPLC method for separation of doxycycline and its degradation products. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2003**, *33* (4), 667–672.
- [15] Kogawa, A. C.; Salgado, H. R. N. Quantification of doxycycline hyclate in tablets by HPLC-UV method. *J. Chromatogr. Sci.* **2013**, *51* (10), 919–925.
- [16] Brum, L.; Uchoa, F. D.; Guterres, S. S.; Costa, T. D. Development and validation of LC-MS/MS method for the simultaneous determination of quinine and doxycycline in pharmaceutical formulations. *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* **2009**, *32* (18), 2699–2711.
- [17] Sunarić, S. M.; Denić, M. S.; Bojanić, Z. Ž.; Bojanić, V. V. HPLC method development for determination of doxycycline in human seminal fluid. *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **2013**, *939*, 17–22.
- [18] Santos, M. D. F.; Vermeersch, H.; Remon, J. P.; Schelkens, M.; De Backer, P.; Ducatelle, R.; Haesebrouck, F. Validation of a high-performance liquid chromatographic method for the determination of doxycycline in turkey plasma. *J. Chromatogr. B Biomed. Appl.* **1996**, *682* (2), 301–308.
- [19] Krishna, A. C.; Sathiyaraj, M.; Saravanan, R. S.; Chelladurai, R.; Vignesh, R. A novel and rapid method to determine doxycycline in human plasma by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Indian J Pharm Sci* **2012**, *74* (6), 541–548.
- [20] Gutiérrez, L.; Ocampo, L.; Espinosa, F.; Sumano, H. Pharmacokinetics of an injectable long-acting parenteral formulation of doxycycline hyclate in pigs. *J. Vet. Pharmacol. Ther.* **2014**, *37* (1), 83–89.
- [21] Riond, J.-L.; Hedeem, K. M.; Tyczkowska, K.; Riviere, J. E. Determination of doxycycline in bovine tissues and body fluids by high performance liquid chromatography using photodiode array ultraviolet visible detection. *J. Pharm. Sci.* **1989**, *78* (1), 44–47.
- [22] Brum, L.; Leal, M. G.; Uchoa, F. D.; Kaiser, M.; Guterres, S. S.; Dalla Costa, T. Determination of quinine and doxycycline in rat plasma by LC-MS-MS: Application to a pharmacokinetic study. *Chromatographia* **2011**, *73* (11–12), 1081–1088.
- [23] Schepdael, A. V.; Kibaya, R.; Roets, E.; Hoogmartens, J. Analysis of Doxycycline by Capillary Electrophoresis. *Chromatographia* **1995**, *41* (5/6), 367–369.
- [24] Gil, E. C.; Van Schepdael, A.; Roets, E.; Hoogmartens, J. Analysis of doxycycline by capillary electrophoresis. Method development and validation. *J. Chromatogr. A* **2000**, *895* (1–2), 43–49.
- [25] Injac, R.; Kac, J.; Kreft, S.; Strukelj, B. Determination of doxycycline in pharmaceuticals and human urine by micellar electrokinetic capillary chromatography. *Anal. Bioanal. Chem.* **2007**, *387* (2), 695–701.
- [26] Altria, K. D.; Kelly, M. a.; Clark, B. J. Current applications in the analysis of pharmaceuticals by capillary electrophoresis. I. *Trends Anal. Chem.* **1998**, *17* (4), 204–214.
- [27] Watson, D. G. *Pharmaceutical analysis: A textbook for pharmacy students and pharmaceutical chemists*, 2nd ed.; Churchill Livingstone: Edinburgh, 1999.

- [28] ICH. Validation of analytical procedures: text and methodology Q2(R1). In *International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Humans Use*; 2005; p 41.
- [29] Shabir, G. A. Validation of high-performance liquid chromatography methods for pharmaceutical analysis. Understanding the differences and similarities between validation requirements of the US Food and Drug Administration, the US Pharmacopeia and the International Conf. *J Chromatogr A* **2003**, *987* (1–2), 57–66.
- [30] Nemutlu, E.; Çelebier, M.; Uyar, B.; Altinöz, S. Validation of a rapid micellar electrokinetic capillary chromatographic method for the simultaneous determination of isoniazid and pyridoxine hydrochloride in pharmaceutical formulation. *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **2007**, *854* (1–2), 35–42.
- [31] Mamani, M. C. V.; Farfán, J. A.; Reyes, F. G. R.; Rath, S. Simultaneous determination of tetracyclines in pharmaceuticals by CZE using experimental design. *Talanta* **2006**, *70* (2), 236–243.
- [32] De Almeida, P. A.; Bhering, C. A. P.; Alves, M. C.; De Oliveira, M. A. L.; Raposo, N. R. B.; Ferreira, A. O.; Brandão, M. A. F. Development, optimization and validation of an HPLC-PDA method for quantification of taxifolin in the bark extract of *Pinus pinaster*. *J. Braz. Chem. Soc.* **2016**, *27* (9), 1648–1656.
- [33] Barden, A. T.; Piccoli, B. L.; Volpato, N. M.; Steppe, M. A simultaneous assay method using capillary zone electrophoresis for a fixed dose combination of vildagliptin and metformin hydrochloride in coated tablets. *Anal. Methods* **2013**, *5* (20), 5701–5708.
- [34] Marcolino, A. I. P.; Sangoi, M. S.; Steppe, M.; Horn Adams, A. I.; Bueno Rolim, C. M. Determination of dronedarone in the pharmaceutical dosage form by a stability-indicating micellar electrokinetic chromatography method. *Anal. Methods* **2013**, *5* (12), 3106–3113.
- [35] Kazsoki, A.; Fejos, I.; Sohajda, T.; Zhou, W.; Hu, W.; Szente, L.; Béni, S. Development and validation of a cyclodextrin-modified capillary electrophoresis method for the enantiomeric separation of vildagliptin enantiomers. *Electrophoresis* **2016**, *37* (10), 1318–1325.
- [36] Teófilo, R. F.; Ferreira, M. M. C. Quimiometria II: Planilhas eletrônicas para cálculos de planejamentos experimentais, um tutorial. *Quim. Nova* **2006**, *29* (2), 338–350.
- [37] Heyden, Y. Vander; Nijhuis, A.; Smeyers-verbeke, J.; Vandeginste, B. G. ; Massart, D. L. Guidance for robustness / ruggedness tests in method validation. *J. ou Pharm. Biomed. Anal.* **2001**, *24*, 723–753.
- [38] Lenth, R. V. Quick and easy analysis for unreplicated factorials. *Technometrics* **1989**, *31*, 469–473.
- [39] Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, RDC nº 166, de 24 de julho de 2017. **2017**.

**5 CAPÍTULO II - Development and pharmacokinetic study in rabbits of
doxycycline hyclate suppositories**

Manuscrito a ser submetido ao periódico AAPS PharmSciTech

5.1 APRESENTAÇÃO

Este capítulo descreve a preparação, caracterização e estudo de estabilidade de quatro formulações de supositórios contendo o equivalente a 25 mg de doxiciclina. Foram preparados dois supositórios hidrofílicos denominados S-PEG e S-PEG-MET e dois lipofílicos denominados S-CBT e SCBT-BHT. Para a caracterização foram avaliadas características visuais, ponto de fusão, peso médio, uniformidade de conteúdo e teor. Os supositórios desenvolvidos foram mantidos sob refrigeração (S-CBT e S-CBT-BHT) e sob temperatura ambiente (S-PEG e S-PEG-MET) por 30 dias e as formulações S-PEG e S-MTG, que apresentaram os melhores resultados durante a estabilidade, foram avaliadas no estudo farmacocinético. No estudo farmacocinético foram empregados três coelhos machos para cada formulação, com peso entre 2-3 kg e, além dos supositórios, também foi avaliado o comportamento de uma formulação comercial intravenosa. Os supositórios empregados na avaliação da farmacocinética foram preparados de acordo com o peso dos animais, sendo preparados na dose de 10 mg/kg. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal da UFSM e o coelho foi escolhido como modelo animal por ser de fácil obtenção e porte semelhante aos animais alvo do estudo.

Development and pharmacokinetic study in rabbits of doxycycline hyclate suppositories

Ana Paula Christ¹, Pauline Trindade Biscaino¹, Alieni Bitencourt de Souza², Rebeca Lino Lourenço², Estevan Sonogo Zimmermann¹, Andréa Inês Horn Adams²

¹ Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Santa Maria. Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil.

² Departamento de Farmácia Industrial, Universidade Federal de Santa Maria. Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil.

Abstract

Doxycycline hyclate is a broad spectrum antibiotic widely used in human and veterinary medicine. The inability to perform the parenteral administration of drugs and the lack of oral preparations can be mentioned as difficulties to the treatment of animals in the domestic environment. In this scenario, the aim of this study was to investigate the bioavailability of the drug by the rectal route, to propose a potential suppository formulation containing 25 mg of doxycycline as an alternative to the available injectable formulations. Hydrophilic and lipophilic suppositories were prepared, in polyethylene glycol (S-PEG) or cocoa butter (S-CBT), respectively. The suppositories were prepared and evaluated concerning visual characteristics, content, average weight, melting range and content uniformity. A stability study was performed and the two most stable formulations were submitted to a pharmacokinetic study in rabbits. The bioavailability of the suppositories was compared to the data of the IV formulation. PEG suppository showed 47.43% bioavailability and CBT 48.47% with C_{\max} equal to $3.11 \pm 3.65 \mu\text{g mL}^{-1}$ and $1.63 \pm 0.19 \mu\text{g mL}^{-1}$, respectively. These formulations are promising candidates to be used to the treatment of bacterial infections in pets.

Keywords: Rectal route, doxycycline pharmacokinetic, quality control, biopharmaceutical evaluation, doxycycline hyclate, veterinary treatment, bioavailability

1. INTRODUCTION

Doxycycline hyclate (DOXH), also known as doxycycline hydrochloride hemihydrate, is a tetracycline antibiotic widely used in human and veterinary medicine due its relative broad spectrum [1,2]. It is more lipophilic than other tetracyclines like methacycline and oxytetracycline, and as consequence it shows more tissue penetration and better antimicrobial properties [3,4]. It is bacteriostatic against a variety of gram-positive and negative microorganisms and is mainly used for the treatment of respiratory, urinary and gastrointestinal tract infections [5]. Doxycycline is the most used tetracycline to treat small-animals, having a good safety profile [6]. Vomiting, diarrhea and esophageal stricture are reported as gastrointestinal side effect related to oral administration [2].

In veterinary practice doxycycline is usually administered by oral or parenteral route, as tablets or injectable form [7]. The usual dose recommended for small animals is 5mg/kg twice or 10mg/kg once a day [8–10]. There are some difficulties inherent to the treatment of domestic animals, as owner's inaptitude to administer parenteral formulations, principally multiple injections, and the lack of effective oral preparations. A study made with pet owners (n=95) showed that only 44% achieved 100% of compliance in administer oral antibiotics to their pets in 10 day-treatment [11].

Besides the possibility of administration to vomiting, unable to swallow or uncooperative patients [12], the administration by rectal route could reduce adverse effects, the first-pass metabolism and the drug degradation, because of the neutral pH and low enzymatic activity of the rectum [13,14].

Suppositories are solid formulations with various shapes and weights adapted to rectal, vaginal or urethral administration. They usually dissolve, melt or soften at body temperature and they can be formulated to obtain systemic or local action. The bases usually employed are cocoa butter, glycerinated gelatin hydrogenated vegetal oils and mixture of polyethylene glycols of various molecular weights [15].

The development of new products for animal health is driven by factors as the enhancement of consumer convenience and compliance, the improvement of drugs pharmacokinetic and the safety of the consumer and of the target animal [16]. In this scenario, we developed suppositories containing doxycycline hyclate, in lipophilic and hydrophilic base, aimed to small-animal use. There is on literature some works that studied administration of some drugs like levetiracetam and zonisamide by rectal route to seizure animals treatment [17,18] but there is not studies with doxycycline for rectal administration. In this work, four doxycycline suppositories were developed and characterized, their stability was evaluated

over a 30-day period and the ones with the best stability data were submitted to a pharmacokinetic study in rabbits.

2. MATERIAL AND METHODS

2.1 Materials

Polyethylene glycols (PEGs) with molecular weights 400 and 4000, cocoa butter (CBT) and butylated hydroxytoluene (BHT) were purchased from Delaware (Porto Alegre, Brasil). Sodium carbonate and polysorbate 80 were bought from Vetec (Rio de Janeiro, Brasil). Potassium phosphate monobasic was acquired from Dinamica (Diadema, Brasil). Doxycycline hyclate (DOXH) (purity 97.99%), furosemide and sodium metabisulfite were obtained from Fagron (São Paulo, Brasil). Tetracycline hydrochloride (purity of 98.1%) was obtained from Gemini (São Paulo, Brazil). Ethyl ether and sodium phosphate dibasic were purchased from Neon (São Paulo, Brazil). Methacycline (MTC) and acetonitrile were acquired from Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, EUA). Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) was purchased from Proquímios (Rio de Janeiro, Brazil). Commercial injectable doxycycline solution (Vetnil[®]) was obtained from local veterinary clinic.

2.2 Preparation of suppositories

The marketed formulations and the pharmacopeial monographs of DOXH state the dosage of active ingredient in terms of the equivalent amount of doxycycline. Thus, the suppositories were prepared using a correction factor of 1.15, weighing 28.75 mg of doxycycline hyclate/suppository, which is equivalent to 25 mg of doxycycline. Four formulations were prepared, by the molding method (Table 1), and they were named S-PEG (PEG suppositories) or S-CBT (cocoa butter suppositories). Antioxidants compatible with each base were added to the formulations, originating S-PEG-MET (with sodium metabisulfite) and S-CBT-BHT (with butylated hydroxytoluene). BHT, polysorbate 80 and sodium metabisulfite concentrations were used according literature. Water and ethanol concentrations were determined experimentally. The loss during manufacturing process was determined and an excess of each compound was added. The final composition of formulations is described in Table 1.

Table 1 - Composition of suppositories formulations

Formula name	Suppository composition (w/w)^a
S-PEG	PEG 400 (50%), PEG 4000 (50%)
S-PEG-MET	PEG 400 (31%), PEG 4000 (58%), sodium metabisulfite (1%), water (10%)
S-CBT	cocoa butter (100%)
S-CBT-BHT	polysorbate 80 (2%), BHT (0.02%), ethanol (5%), water (10%), cocoa butter (82.98%)

^a DOXH was fixed at 28.75 mg for each formulation, which is equivalent to 25 mg of doxycycline.

To prepare S-PEG suppositories, the established amounts of PEG 400 and PEG 4000 were melted at 60°C and then DOXH was dispersed under manual stirring for two minutes. To obtain S-PEG-MET, solutions of DOXH and sodium metabisulfite were prepared in a minimum volume of water, which corresponded to 10% in the formulation. These solutions were added to the base after its melting, followed by stirring for two minutes.

For CBT suppositories, the base was kept at 36°C in a water bath and just after the melting, DOXH was added, followed by softly mixture during two minutes, to obtain S-CBT suppositories. To prepare S-CBT-BHT suppositories, aqueous solutions of polysorbate 80 and DOXH were prepared, while BHT was dissolved in ethanol. After the CBT melting, the solutions of BHT, polysorbate 80 and DOXH were added and the preparation was stirred during two minutes.

For all suppositories, after final mixing, the blends were poured in 1g suppository mould. After solidification, PEG suppositories were stored at room temperature (20-25°C) and cocoa butter suppositories at 2-8°C.

2.3 Suppositories characterization

2.3.1 Physical evaluation and melting range

The organoleptic characteristics, as well as the external and internal visual aspect of the formulations were inspected. Presence of bubbles or cracks, color and odor were reported. The mean weight of each preparation was verified, weighing individually ten units.

To determine suppositories melting range, portions of approximately 1 mm were analyzed by a Kofler system-type, under a heating rate of 1°C/min (melting point equipment, Microquímica, MQAPF 302). This analysis was made in duplicate for each formulation.

2.3.2 Uniformity of dosage units

The uniformity of dosage in the suppositories was measured by the content uniformity evaluation, using an UV-spectrophotometry method developed and validated for this purpose. The method was found to be specific, since no interference from the placebo analyses (n=3/formulation) was verified (interference <2%). Linearity was studied in the range of 5 to 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ and the analytical data were analyzed by ANOVA demonstrating a significant linear regression ($p<0.05$) and no significant deviation from linearity ($p>0.05$). The whole analytical procedure was applied to the four formulations aiming to verify the precision, by intra and interday analyses (n=12/sample, 6 sample/day). The precision was indicated by the low interday RSD values, as following: 1.14%, 1.92%, 1.79% and 1.54% for S-PEG, S-PEG-MET, S-CBT and S-CBT-BHT, respectively.

For the content uniformity analysis, 10 units of each formulation were randomly selected and assayed individually by the procedure described at section *Preparation of suppositories sample solutions*. After extraction, solutions at 250 $\mu\text{g mL}^{-1}$ were obtained and subsequently diluted with water, to the final concentration of 25 $\mu\text{g mL}^{-1}$. The absorbance of these solutions was determined at 350 nm and compared with a doxycycline standard solution, at the same theoretical concentration, prepared in water.

2.4 Assay of suppositories by capillary electrophoresis (CE) method

2.4.1 Capillary electrophoresis system

To determine the DOXH content in the prepared suppositories, a capillary electrophoresis method previously validated was used (19). The analyses were carried out in an Agilent 71003D CE System (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) equipped with a photodiode array (PDA) and ChemStation® Software 1.04 was used for instrument control, data acquisition and data handling. Detection was made at 260 nm and the separation was achieved in a silica capillary (Polymicro®) with 50 μm i.d. and 48.5 cm (40 cm of effective length), maintained at 24°C. The hydrodynamic mode was used to inject all samples (5 seg/50 mBar) and the positive polarity was used with +25 kV. The buffer used as electrolyte background was a mixture of acetonitrile and a solution of 25 mM sodium carbonate and 5 mM EDTA (2:8), pH 10.6 [19].

The method specificity was evaluated by forced degradation study, where no interference from degradation products was observed. Besides, the interference of placebo and

methacycline (MTC), which is an organic impurity of DOXH, was assessed. Suitable peak purity indexes in all the mentioned assays, through PDA detector, demonstrated the method suitability for the intended use.

2.4.2 Preparation of DOXH standard solution and internal standard solution (IS)

DOXH standard stock solution, equivalent to $200 \mu\text{g mL}^{-1}$ of doxycycline, and tetracycline hydrochloride (IS) stock solution at $400 \mu\text{g mL}^{-1}$, were prepared in ultrapure water. They were stored at $2-8^{\circ}\text{C}$ and used in a period of seven days. Before the analyses, 1.0 mL of DOXH and 0.5 mL of IS stock solutions were mixed with 0.5 mL of ultrapure water, to obtain $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ of each substance. All solutions were filtered through a $0.45 \mu\text{m}$ nylon membrane filter (Sartorius Stedim Biotech, Germany).

2.4.3 Preparation of suppositories sample solutions

To prepare the S-PEG and S-PEG-MET samples solutions, three units of each formulation were crushed and mixed to obtain a homogenous sample. An amount equivalent to 20 mg of doxycycline was weighed, 50 mL of water was added and stirred during ten minutes, at 60°C . The final volume was adjusted with water into a 100 mL volumetric flask, obtaining a theoretical concentration of $200 \mu\text{g mL}^{-1}$ of doxycycline.

To obtain S-CBT and S-CBT-BHT sample solutions, after crushing three units, an amount equivalent to 20 mg of doxycycline of each formulation was weighed and transferred to a separator. Fifty milliliters of ethyl ether were added and the drug was extracted with water (one portion of 50 mL and three portions of 15 mL). The aqueous fractions were collected into a 100 mL volumetric flask and the volume was adjusted with water, to obtain a theoretical concentration of $200 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Before analyses, 1.0 mL of each sample solution, 0.5 mL of IS stock solution and 0.5 mL of ultrapure water were mixed, obtaining $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ for IS and doxycycline. All solutions were filtered through a $0.45 \mu\text{m}$ nylon membrane filter.

2.5 Stability study

For the stability evaluation two batches of each formulation were prepared and kept on their plastic molds. All units were accurately numbered, weighted, involved in aluminum foil and stored at different conditions: S-CBT formulations under refrigeration ($5\pm 2^{\circ}\text{C}$) and S-PEG at room temperature ($25\pm 2^{\circ}\text{C}$), during 30 days. The doxycycline content, the melting

range and macroscopic characteristics were evaluated on 0, 15 and 30 days. The products were defined as stable if more than 90% of the initial concentration was maintained [20].

2.6 Pharmacokinetic study in rabbits

2.6.1 Animal experimentation

The animal study was carried out according to National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA) standards and approved by Ethical Committee on Animal Use of Federal University of Santa Maria (authorization n° 6044260117/2017). Three New Zealand white male rabbits with 3-4 kg were kept into individual cages, in controlled temperature (18-22°C), received food once a day and water *ad libitum*. To avoid evacuation, during the pharmacokinetic study, the animals were fastened 24h before assay and a tape was kindly fixed in anal portion during one hour after suppositories insertion; water was maintained *ad libitum*.

The same three animals were used for pharmacokinetic screening of doxycycline suppositories (S-PEG and S-CBT) and the IV formulation. The IV administration was made by IV bolus in the lateral ear vein and the blood samples were collected from the opposite ear using a catheter (0.7 x 19mm, Insyte[®], BD[®]). S-PEG suppositories were wet in water before they were inserted into anal cavity, to prevent painful sensation and water withdrawal [12], while no additional procedure was used for S-CBT. The blood samples were also collected on a lateral ear vein, by means of a catheter.

The IV dose was fixed in 5 mg/kg (which corresponds to approximately 0.4 mL of commercial formulation) and the suppositories dose was fixed at 10 mg/kg. The dosage in the suppositories was adapted to the rabbit body weights.

For IV assay, the blood samples (0.5mL) were collected in heparinized conic tubes after 0.083, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 6, 8, 12 and 24h of the drug administration. The same volume was collected for suppository assay and the sampling scheme was adjusted to 0.083, 0.025, 0.5, 0.75, 1, 2, 4, 6, 8, 12 and 24h. After samples collection the conic tubes were centrifuged at 10,000 rpm during 10 minutes for plasma separation.

Pharmacokinetic parameters, namely C_{max} , T_{max} , $t_{1/2}$, bioavailability and AUC of the assayed sample were obtained from the individual plasma profile and then mean and standard deviation (SD) were calculated. AUC was calculated using trapezoid rule.

Noncompartmental analysis (NCA) of the individual profiles was performed using Excel® 2010 software (Microsoft Corporation, Redmond, USA). The pharmacokinetic parameters included the elimination rate constant (λ), the terminal half-life ($t_{1/2}$), the extrapolated concentration $t = 0$ (C_0), the area under the concentration-time curve (AUC) calculated by the linear trapezoidal rule, the total clearance (CL), the mean residence time (MRT), the apparent volume of distribution during the terminal phase (Vd), the bioavailability (F) [21].

2.6.2 Analysis of plasma samples

The doxycycline concentration on plasma samples was accessed by HPLC assay, using a method adapted from literature [22]. The HPLC system (Shimadzu LC System, Kyoto, Japan) was equipped with CBM-20A system controller, SIL-20A auto injector, LC-20AT pump, DGU-20AT degasser and SPD-M20A PDA. Analyses were made using Agilent C18 column (4.6 x 250 mm, 5 μ m). The mobile phase was a mixture of acidic water pH 2.5 (adjusted with trifluoroacetic acid) and acetonitrile (28:72 v/v, at 0-6 min; 45:55 v/v, at 6.1-13 min and 28:72 v/v, at 13.1-15 min). The flow rate was set at 1.0 mL/min and detection was made at 350 nm.

Furosemide was used as internal standard and it was prepared by dilution of 10 mg in 20 mL of methanol, obtaining concentration of 500 μ g mL⁻¹, followed by a dilution to 40 μ g mL⁻¹, in water.

For the sample preparation, 90 μ L of plasma were mixed in a conical tube with 10 μ L of furosemide solution (40 μ g mL⁻¹) by vortex agitation during 30 seconds. Ice-cold methanol containing 0.5% formic acid was then added and samples were mixed by vortex agitation during 5 minutes. The samples were then centrifuged during 10 minutes at 10000 rpm. The supernatants were transferred to insert vials and analyzed by HPLC method.

2.7 Statistical analyses

The Student's bilateral paired test ("t" test) was used to evaluate the stability and the pharmacokinetic data. The difference was considered significant for $p < 0.05$.

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1 Development and optimization of doxycycline suppositories

The first suppositories prepared in this study contained just DOXH and the chosen bases, PEG and CBT. During a preliminary stability evaluation, with formulations stored just in plastic moulds, changes in color and odor were observed, mainly in PEG suppositories. The DOXH content was 89.89 ± 3.01 in S-CBT suppositories ($5 \pm 2^\circ\text{C}$, after 60 days of storage) and 77.88 ± 2.37 in S-PEG suppositories ($25 \pm 2^\circ\text{C}/ 60 \pm 5\%$ HR, after 45 days of storage).

The oxidation of doxycycline was reported in previous studies [19,23], therefore these color changes were attributed to oxidative process. Then, new formulations were prepared, to which antioxidants were added. After experimental trials, BHT and sodium metabisulfite were chosen for cocoa butter and for PEG suppositories, respectively. In the cocoa butter suppositories, other excipients were added: ethanol was used to solubilize BHT (0.02%), polysorbate 80 at 2% was added aiming to improve the drug dissolution [24] and the drug was solubilized in 5% of water before the addition into the melted base. This formulation was identified as S-CBT-BHT.

For the new S-PEG formulation (named S-PEG-MET) 1% sodium metabisulfite and DOXH were dissolved in water before addition to the melted base. This caused softening of suppository making rectal administration impossible. Thus, the proportion of PEG was adjusted to 31:58 (%/%) of PEG 400 and 4000, respectively. In new stability evaluations all formulations were stored in plastic moulds and wrapped with aluminum foil.

3.2 Physicochemical characterization of suppositories

Two batches of each formulation were used to characterize them. After preparation, the appearance, melting range, weight variation, content uniformity and assay were evaluated. These formulations were also used for stability study and over 30 days appearance, assay and melting range were accessed.

The suppositories developed were torpedo shaped with approximately 1 g and 34 mm of length. All formulations were yellowish due the doxycycline color and presented characteristic odor, according to the base used. The formulations did not shown fissures or air bubbles even externally or after slicing longitudinally.

About the weight evaluation, the results presented in Table 2 shown that all formulations are within the official compendia limits since no formulation showed variation greater than $\pm 5\%$ of individual weight [25].

The S-PEG formulations showed higher melting range ($> 50^{\circ}\text{C}$) than S-CBT formulations ($\pm 35^{\circ}\text{C}$) (Table 2). Both values are in agreement with the bases used [12,26].

The uniformity of doses was determined by content uniformity method, following the USP general chapters. After individual content determination, the acceptance value of each formulation was determined, being the established value <15 . This value was met by all the batches evaluated, confirming the reproducibility of the suppositories preparation process. The results of these evaluations are summarized in Table 2.

Table 2 - In vitro evaluation of DOXH suppositories on zero time (n=2 batches)

	DOXH suppository			
	S-CBT	S-CBT-BHT	S-PEG	S-PEG-MET
Mean weight (g \pm SD)	0.948 \pm 0.02	0.974 \pm 0.03	1.280 \pm 0.04	1.269 \pm 0.03
Melting range ($^{\circ}\text{C}$ \pm SD)	35.9 \pm 0.65	35.7 \pm 0.86	56.0 \pm 1.52	51.3 \pm 0.48
Assay	101.14 \pm 0.24	98.53 \pm 2.49	100.15 \pm 3.37	101.89 \pm 0.53
Content uniformity (% \pm SD)	98.83 \pm 4.32	105.26 \pm 3.59	98.99 \pm 3.63	102.92 \pm 2.70

3.3 Stability study

The stability of the four formulations developed was evaluated over 30 days, being the PEG suppositories stored at $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ and the CBT suppositories at $5 \pm 2^{\circ}\text{C}$, because of the low stability of cocoa butter at higher temperatures [12]. All formulations were kept on plastic molds and involved in aluminum, aiming to seal the packages and to reduce the adsorption and/or absorption of humidity.

The formulations were analyzed on zero, 15 and 30 days in respect to doxycycline content and possible alterations in formulation, such as changes in macroscopic characteristics, weight and melting range. The initial concentrations (day 0) were defined as 100% and subsequent concentrations were expressed as percentages of the initial concentration (Table 3).

Table 3- Results obtained for stability

Product	Time (days)	Aspect	Melting range (°C)	Assay (%)
S-CBT	0	yellowish (+), opaque surface	35.9 ± 0.65	100.00 ± 0.24
	15	NC	35.3 ± 0.14	99.53 ± 0.52
	30	NC	35.0 ± 1.01	99.40 ± 0.80
S-CBT-BHT	0	yellowish (+), opaque surface	35.7 ± 0.86	100.00 ± 2.50
	15	NC	35.3 ± 0.41	99.23 ± 0.89
	30	NC	36.1 ± 0.25	93.62 ± 0.91
S-PEG	0	yellowish (+), bright surface	56.0 ± 1.52	100.00 ± 3.37
	15	yellowish (++), bright surface	57.6 ± 1.59	93.34 ± 3.23
	30	yellowish (++), head) brownish (tail) bright surface	57.7 ± 0.30	88.55 ± 3.44
S-PEG-MET	0	yellowish (+), opaque surface	51.3 ± 0.48	100.00 ± 0.53
	15	yellowish (++), opaque surface	51.7 ± 1.48	89.83 ± 3.67
	30	yellowish (++), head) yellowish (+++), tail) opaque surface	52.5 ± 1.24	80.76 ± 2.89

NC: not changed; (+), (++) and (+++) are referent to the color intensity.

For both cocoa butter suppositories, changes were not observed on appearance and in the melting range over the period of the study. Also, the weight of both formulations was similar to the ones of zero time showing reduction of $0.1 \pm 0.03\%$ and $0.64 \pm 0.28\%$ for S-CBT and S-CBT-BHT, respectively. About the doxycycline content, over the 30 day-period no relevant changes were observed for S-CBT, while in S-CBT-BHT the doxycycline content fall to 93.6%. Although this content was within the usual accepted value for pharmaceutical products, S-CBT showed best results, with the advantage of easy preparation.

For PEG suppositories, higher changes on appearance and doxycycline assay were observed over the study and color change was already visible in the first 15 days. On the external surface, moisture was observed, which can be dueto the PEG hygroscopicity [26]. The increase in the suppositories weight during stability study (0.95% on 15-day and 1.3% on 30-day) corroborates this possibility.

S-PEG-MET presented higher decrease on doxycycline assay, however, the darkening was lower in comparison to S-PEG formulations. This suppository was opaque, without evidence of humidity on the external surface and a decrease of approximately 1.0% on the mean weight was observed at the end of the study.

Placebos of the four formulations were visually analyzed during 30 days and changes in color and odor were not observed during the period, suggesting that they could be related to the degradation of doxycycline and not to the bases.

. The lower DOXH assay in both suppositories containing antioxidants could be related to the presence of water, which was used to dissolve the drug before the addition to the bases. To verify this hypothesis, a similar product to S-PEG-MET was prepared, without water. In this formulation, the DOXH residual content was $97.23\% \pm 2.0$, at 30-day, while in S-PEG-MET was $80.76\% \pm 2.89$. This result suggests that water could be responsible for the DOXH content reduction in both suppositories with antioxidants. Considering the superior stability data of the both simplest formulations, they were chosen to perform the pharmacokinetic study.

3.4 Pharmacokinetic study in rabbits

DOXH pharmacokinetic have been studied in several animal species [4,27–33] but no data were found about the pharmacokinetic on rabbits or with rectal route. In this study, S-PEG and S-CBT pharmacokinetic data were compared to the IV injectable formulation.

The doses and sampling scheme of suppositories were adjusted according our IV study and this dose was adjusted to 5mg/kg, according producer determination. The blood sampling was adjusted as described in section 2.6.1. According to the results (Table 4), they were adequate to characterize drug elimination since they express three times of elimination half-life.

The suppositories doses were adjusted to 10mg/kg of rabbits, aiming to maintain the doxycycline plasma concentration within the determined analytical curve (0.05 to $15 \mu\text{g mL}^{-1}$) [17,26]. The results obtained for IV and rectal pharmacokinetic parameters are shown in Table 4.

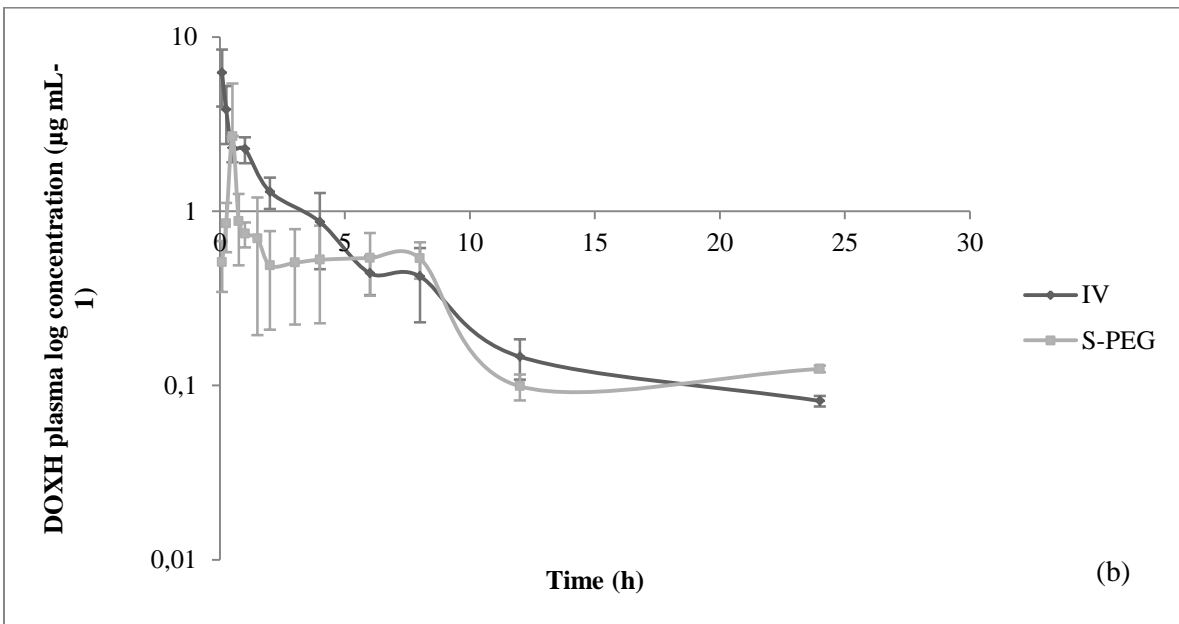
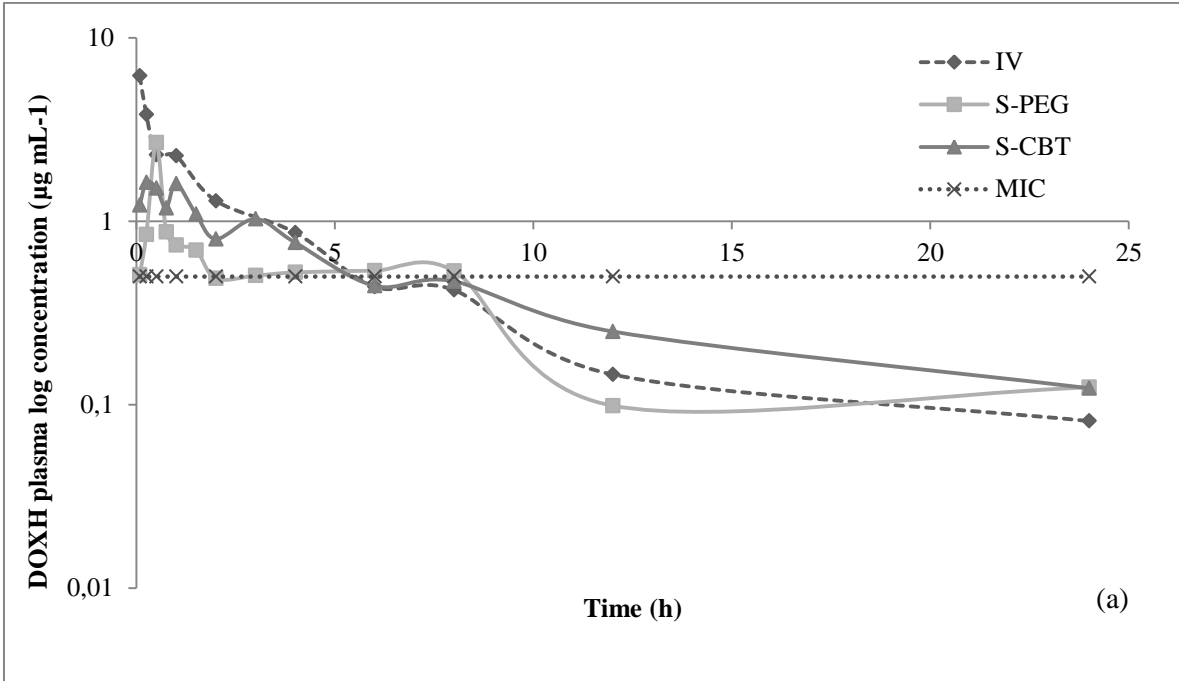
Table 4 – Comparative pharmacokinetic parameters of DOX after intravenous and rectal administration (n=3/treatment)

Pharmacokinetic parameters	Intravenous DOX	S-CBT	S-PEG
C_{\max} ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	6.22 ± 2.24	1.63 ± 0.19	2.68 ± 2.73
T_{\max} (h)	-	0.43 ± 0.49	0.83 ± 0.58
$t_{1/2}$ (h^{-1})	7.73 ± 1.93	7.47 ± 2.98	8.54 ± 2.16
Cl (L/h)	0.41 ± 0.09	0.40 ± 0.05	0.39 ± 0.05
Vd (L)	11.05 ± 5.60	18.70 ± 9.15	19.6 ± 4.42
ASC0-inf ($\mu\text{g mL}^{-1} \text{ h}$)	12.69 ± 3.21	12.30 ± 1.71	12.04 ± 1.65
F_{absolute} (%)	-	48.47 ± 6.72	47.43 ± 6.49

C_{\max} , maximum concentration; T_{\max} , maximum time; $t_{1/2}$, half life; Cl, clearance, Vd, distribution volume; ASC0-inf, area under the curve; F, bioavailability.

For all formulations evaluated the DOXH concentration was detectable during 24h of assay. The C_{\max} obtained for S-CBT was $1.63 \pm 0.19 \mu\text{g mL}^{-1}$ reached at $0.43 \pm 0.49\text{h}$. For S-PEG formulation, the maximum concentration was $2.68 \pm 2.73 \mu\text{g mL}^{-1}$ at $0.83 \pm 0.58\text{h}$.

There is no difference between the $t_{1/2}$ values of both suppositories, and they do not differ from the $t_{1/2}$ of IV product. The $t_{1/2}$ values obtained in this study are similar to the data obtained in works with dogs (6.99h) [4] and sheep (7.03h) [28]. With other animals models different elimination half-life after IV administration were found, such as 16.68h in goats [32] and 39.0h in tilapia [22]. The bioavailability obtained for both formulations was near of 50%, ($48.47 \pm 6.72\%$ for S-CBT and $47.43 \pm 6.49\%$ for S-PEG), without significant difference between them ($p>0.05$). Finally, as the bioavailability and ASC0-inf was near for CBT and PEG formulations, the drug exposure was the same for S-PEG and S-MTG, despite the difference in C_{\max} parameter.



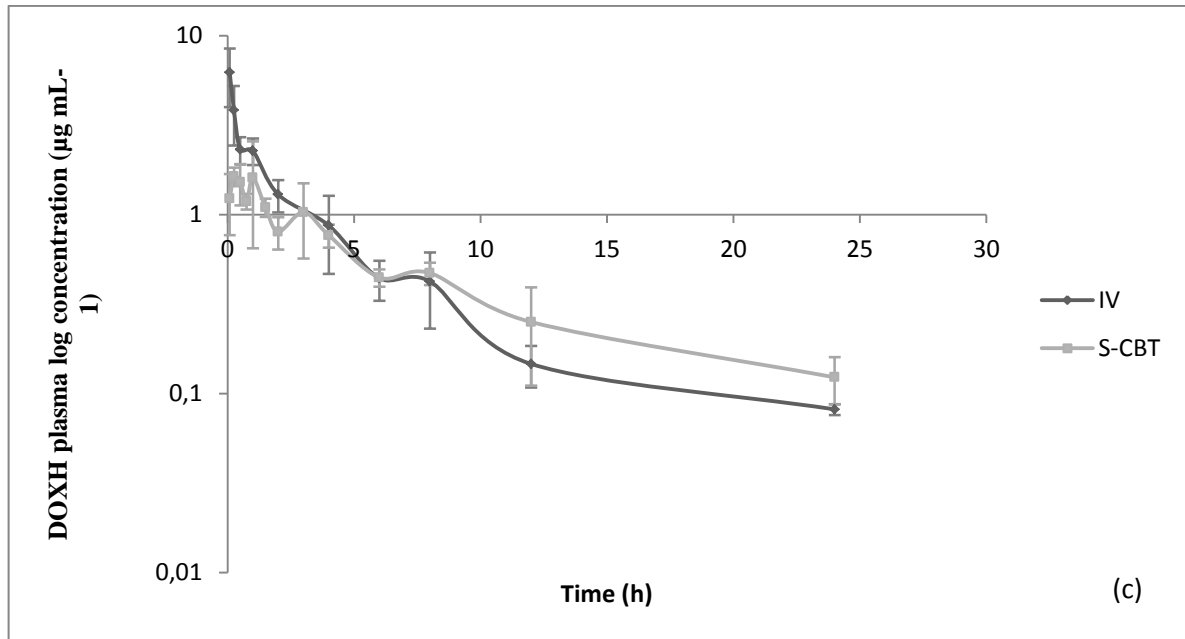


Figure 1(a), (b) and (c) – Doxycycline hyclate plasma concentrations after IV (5mg/kg) S-CBT, S-PEG administration (10mg/kg) and MIC ($0.5\mu\text{g mL}^{-1}$) concentrations

In literature there are reports of some values of minimal inhibitory concentration (MIC) of doxycycline to many pathogens. For *Pasteurella haemolytica* were found values of $0.2\text{--}0.5\mu\text{g mL}^{-1}$ [34], $0.064\mu\text{g mL}^{-1}$ for *Chlamydia psittaci* [35], $0.5\mu\text{g mL}^{-1}$ for *Mycoplasma pneumoniae* [36]. Even, some studies suggest that $0.5\mu\text{g mL}^{-1}$ (dashed line on figure 1) as a therapeutic concentration for this antibiotic [22,37]. Doxycycline is considered a time-dependent antibacterial drug. Thus, to achieve maximum clinic efficacy, the plasma concentration should be above the MIC of involved pathogen [30]. In our study, for both suppositories evaluated and for IV formulation this concentration was obtained until four hours. The IV dose (5 mg/kg) represents the suggest value for twice-daily dosing while the suppositories dose was 10 mg/kg, however the rectal administration was more easy and secure for pet tutors and offers the same time with concentrations above MIC recommendations.

4. Conclusions

Hydrophilic and lipophilic-type doxycycline suppositories were successfully prepared and characterized. Cocoa butter suppository (S-CBT) presented superior stability, while with PEG suppositories relevant doxycycline content reduction was verified. For both, the simplest formulations showed the best results in stability study and were submitted to a pharmacokinetic study, with rabbit model. The doxycycline bioavailability values obtained

were $48.47 \pm 6.72\%$ and $47.43 \pm 6.49\%$ for S-CBT and S-PEG formulations respectively, and the plasmatic concentrations remained above the MIC over four hours for the two suppositories. Finally, the evaluated pharmacokinetic parameters were coherent with literature and with the characteristic of the bases used.

This study provided inedited results about doxycycline and the data obtained shows that the S-CBT is a promising candidate to use in veterinary therapy, to facilitate the domestic treatment of small animals and to provide more safety to pets and tutors.

References

1. Riond J-L, Hedeem KM, Tyczkowska K, Riviere JE. Determination of doxycycline in bovine tissues and body fluids by high performance liquid chromatography using photodiode array ultraviolet visible detection. *J Pharm Sci.* 1989;78:44–7.
2. Rinaldi ML. Therapeutic Review: Doxycycline. *J Exot Pet Med [Internet].* 2014;23:415–7. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1557506314001554>
3. Gutiérrez L, Velasco ZH, Velázquez C, Vargas D, Sumano H. Pharmacokinetics of an injectable long-acting formulation of doxycycline hyclate in dogs. *Acta Vet Scand.* 2012;54:39–47.
4. Riond JL, Vaden SL, Riviere JE. Comparative pharmacokinetics of doxycycline in cats and dogs. *J Vet Pharmacol Ther.* 1990;13:415–24.
5. Jantravid E, Strauch S, Becker C, Dressman JB, Amidon GL, Junginger HE, et al. Biowaiver monographs for immediate release solid oral dosage forms : doxycycline hyclate. *J Pharm Sci.* 2010;99:1639–53.
6. Maaland MG, Papich MG, Turnidge J, Guardabassi L. Pharmacodynamics of doxycycline and tetracycline against staphylococcus pseudintermedius: Proposal of canine-specific breakpoints for doxycycline. *J Clin Microbiol.* 2013;51:3547–54.
7. Brasil. Ministério da Agricultura e Pecuária - Coordenação de Fiscalização de Produtos Veterinários. 2014;1–200.
8. Sainz Á, Roura X, Miró G, Estrada-Peña A, Kohn B, Harrus S, et al. Guideline for veterinary practitioners on canine ehrlichiosis and anaplasmosis in Europe. *Parasit Vectors [Internet].* 2015;8:75. Available from: <http://www.parasitesandvectors.com/content/8/1/75>
9. Gunn-Moore D a. Feline mycobacterial infections. *Vet J [Internet].* Elsevier Ltd; 2014;201:230–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tvjl.2014.02.014>
10. Papich MG. Antibiotic treatment of resistant infections in small animals. *Vet Clin North Am Small Anim Pract [Internet].* Elsevier Inc; 2013;43:1091–107. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0195561613001113%5Cnpapers2://publication/doi/10.1016/j.cvsm.2013.04.006>
11. Sun Y, Scruggs DW, Peng Y, Johnson JR, Shukla AJ. Issues and challenges in developing long-acting veterinary antibiotic formulations. *Adv Drug Deliv Rev.* 2004;56:1481–96.
12. Ansel HC, Popovich NG., Allen LVJ. *Formas Farmacêuticas e Sistemas de Liberação de Fármacos.* 9 ed. Porto Alegre: Artmed; 2013.

13. Baviskar P, Bedse A, Sadique S, Kunde V, Jaiswal S. Drug delivery on rectal absorption: Suppositories. *Int J Pharm Sci Rev Res*. 2013;21:70–6.
14. Bergogne-Bérézin E, Bryskier a. The suppository form of antibiotic administration: Pharmacokinetics and clinical application. *J Antimicrob Chemother*. 1999;43:177–85.
15. USP 39. The United States Pharmacopeia. 39th ed. Convention TUSP, editor. Rockville; 2016.
16. Ahmed I, Kasraian K. Pharmaceutical challenges in veterinary product development. *Adv Drug Deliv Rev*. 2002;54:871–82.
17. Brewer DM, Cerda-Gonzalez S, Dewey CW, Boothe D, Van Horne K. Pharmacokinetics of single-dose rectal zonisamide administration in normal dogs. *J Vet Intern Med*. 2015;29:603–6.
18. Peters RK, Schubert T, Clemmons R, Vickroy T. Levetiracetam rectal administration in healthy dogs. *J Vet Intern Med* [Internet]. 2014;28:504–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24417468>
19. Christ AP, Burin SL, Adams AIH. A friendly environmental CZE method to determine doxycycline hyclate in suppositories and its application to tablet assay. *Curr Anal Chem*. 2018;1:1–8.
20. YOSHIOKA S, STELLA V. Stability of Drugs and dosage forms. New York: Kluwer Academic / Plenum Publishers; 2000.
21. SHARGEL, L.; WU-PONG S. YA. Applied biopharmaceutics and pharmacokinetics. 6th ed. New York: McGraw-Hill Book Co; 2012.
22. Yang F, Li ZL, Shan Q, Zeng ZL. Pharmacokinetics of doxycycline in tilapia (*Oreochromis aureus* x *Oreochromis niloticus*) after intravenous and oral administration. *J Vet Pharmacol Ther*. 2014;37:388–93.
23. Kogawa AC, Salgado HRN. Quantification of doxycycline hyclate in tablets by HPLC-UV method. *J Chromatogr Sci*. 2013;51:919–25.
24. Hosny E a., Abdel-Hady SS, El-Tahir KEH. Formulation, in-vitro release and ex-vivo spasmolytic effects of mebeverine hydrochloride suppositories containing polycarbophil or polysorbate 80. *Int J Pharm*. 1996;142:163–8.
25. FB. Farmacopeia Brasileira. 2010;5:546.
26. Kauss T, Gaubert A, Boyer C, Ba BB, Manse M, Massip S, et al. Pharmaceutical development and optimization of azithromycin suppository for paediatric use. *Int J Pharm* [Internet]. Elsevier B.V.; 2013;441:218–26. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2012.11.040>
27. Wilson RC, Kemp DT, Kitzman J V., Goetsch DD. Pharmacokinetics of doxycycline in dogs. *Can J Vet Res*. 1988;52:12–4.
28. Castro LJ, Sahagún AM, Diez MJ, Fernández N, Sierra M, García JJ. Pharmacokinetics of doxycycline in sheep after intravenous and oral administration. *Vet J*. 2009;180:389–95.
29. Bratoev N, Milanova A, Pavlova I, Lashev L. Pharmacokinetics of doxycycline in ducks with steatosis due to force-feeding. *Maced Vet Rev*. 2016;39:219–24.
30. Gutiérrez L, Ocampo L, Espinosa F, Sumano H. Pharmacokinetics of an injectable long-acting parenteral formulation of doxycycline hyclate in pigs. *J Vet Pharmacol Ther*. 2014;37:83–9.
31. Brum L, Leal MG, Uchoa FD, Kaiser M, Guterres SS, Dalla Costa T. Determination of quinine and doxycycline in rat plasma by LC-MS-MS: Application to a pharmacokinetic study.

Chromatographia. 2011;73:1081–8.

32. Jha VK, Jayachandran C, Singh MK, Singh SD. Pharmacokinetic data on doxycycline and its distribution in different biological fluids in female goats. *Vet Res Commun.* 1989;13:11–6.
33. Santos MD., Vermeersch H, Remon JP, Schelkens M, De Backer P, Van Bree HJJ, et al. Pharmacokinetics and bioavailability of doxycycline in tukeys. *J Vet Ther [Internet].* 1996;19:274–80. Available from: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-0022996724&partnerID=40&md5=be6ed310c726f55b65129e8b4d32cdfa>
34. Ole-Mapenay IM, Mitema ES. Some pharmacokinetic parameters of doxycycline in East African goats after intramuscular administration of a long-acting formulation. *Vet Res Commun.* 1995;19:425–32.
35. Suchland RJ, Geisler WM, Stamm WE. Methodologies and cell lines used for antimicrobial susceptibility testing of *Chlamydia* spp. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003;47:636–42.
36. Waites KB, Crabb DM, Duffy LB. Inhibitory and bactericidal activities of gemifloxacin and other antimicrobials against *Mycoplasma pneumoniae*. *Int J Antimicrob Agents.* 2003;21:574–7.
37. Vargas-Estrada D, Gracia-Mora J, Sumano H. Pharmacokinetics after administration of an injectable experimental long-acting parenteral formulation of doxycycline hyclate in goats. *Res Vet Sci.* 2008;84:477–82.

6 CAPÍTULO III Modelagem farmacocinética de concentrações plasmáticas após administração de supositórios de doxiciclina em coelhos

6.1 APRESENTAÇÃO

No capítulo anterior foi avaliada a farmacocinética das formulações retais e IV utilizando três animais para cada formulação. Neste capítulo são descritos os resultados oriundos do estudo com cinco animais, adicionando dois novos animais aos resultados do capítulo anterior, com as formulações S-PEG, S-MTG e IV. Além da avaliação não compartimental também foi avaliado o modelo farmacocinético mais adequado para descrever o comportamento do fármaco em modelo animal. Os supositórios foram preparados de acordo com o peso dos animais sendo preparadas formulações contendo o equivalente a 10 mg/kg animal.

1. Introdução

A doxiciclina é um antibiótico pertencente à classe das tetraciclinas amplamente utilizada na clínica veterinária, conhecida por sua grande eficácia frente um largo espectro de micro-organismos especialmente os intracelulares (HARTMANN et al., 2008; RINALDI, 2014). Na clínica veterinária o fármaco em questão está disponível na forma de comprimidos, solução para uso oral e solução injetável (BRASIL, 2014a). Visando facilitar a administração da doxiciclina a pequenos animais, nesse trabalho foram desenvolvidos supositórios de manteiga de cacau e polietilenoglicol.

Na etapa que antecedeu essa parte do trabalho (Capítulo II) as formulações foram preparadas, caracterizadas e avaliadas quanto à sua estabilidade. Além destes dados, a farmacocinética das mesmas foi avaliada de forma preliminar através da análise não-compartimental. Assim como não existem na literatura relatos do uso de doxiciclina nesta forma farmacêutica, não existem dados a respeito da farmacocinética da doxiciclina por esta via. Também não foram encontrados na literatura dados de farmacocinética do antimicrobiano empregando coelhos como modelo animal, porém existem estudos que fornecem dados do fármaco em outros modelos animais (Tabela 6.1).

Tabela 6.1 – Parâmetros farmacocinéticos da doxiciclina obtidos em diferentes estudos e modelos animais

Modelo animal	Dose e Via de administração	Vd (L/kg)	Cl (L/h/kg)	T_{1/2} (h⁻¹)	Referência
Pato	15 mg/kg, IV	2,80 ± 0,85	0,40 ± 0,05	5,82 ± 1,85	BRATOEV et al., 2016
Cães	5 mg/kg, IV	0,93 ± 0,14	1,10 ± 0,17	6,99 ± 1,09	RIOND et al., 1989
Cabra	5 mg/kg, IV	9,78 ± 0,86	0,42 ± 0,43	16,63 ± 1,58	JHA et al., 1989
Ovelha	20 mg/kg, IV	1,76 ± 0,31	0,18 ± 0,53	7,03 ± 1,13	CASTRO et al., 2009
Cães	5 mg/kg, IV	1,47 ± 0,24	0,10 ± 0,44	10,36	WILSON et al., 1988

O conhecimento da farmacocinética é fundamental para o desenvolvimento de fármacos e formulações, seja para entender a toxicidade e farmacologia animal ou para decidir sobre o esquema posológico apropriado (RANG et al., 2011). A modelagem farmacocinética populacional (popPK) é uma ferramenta usada para identificar e descrever as relações entre as características fisiológicas do indivíduo e a resposta do fármaco. Inicialmente essas determinações eram utilizadas apenas no monitoramento

farmacoterapêutico, porém, a modelagem farmacocinética também vem se tornando uma importante ferramenta no desenvolvimento de fármacos (MOULD; UPTON, 2012).

Em virtude do exposto, este trabalho visa fornecer dados inexistentes a respeito da popPK da doxiciclina administrada pelas vias IV (5 mg/kg) e retal (10 mg/kg) a partir de uma forma farmacêutica inédita, utilizando coelhos como modelo animal.

2. Material e Métodos

2.1 Materiais

Os supositórios utilizados no ensaio *in vivo* foram preparados pelo método de moldagem, cuja dose foi individualizada, de acordo com o peso dos animais, de modo a obter a concentração final de 10 mg/kg. A amostra comercial de doxiciclina empregada para administração IV (Vetnil[®]) foi adquirida no comércio local. A doxiciclina hclato (DOXH) utilizada como SQR (pureza 97,99%) foi adquirida da Fagron (São Paulo, Brasil), assim como a furosemida, empregada como padrão interno (PI). Todos os demais solventes e matérias-primas empregadas eram de grau analítico.

2.2 Experimento animal

Este estudo foi conduzido seguindo as normas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal da Universidade Federal de Santa Maria (autorização nº 6044260117/2017). Foram empregados seis coelhos machos da raça Nova Zelândia, pesando de 3 a 4 kg, mantidos sob temperatura de 18-22°C, em gaiolas individuais, recebendo alimentação diariamente e água *ad libitum*. No dia anterior aos ensaios os animais foram pesados, a fim de preparar os supositórios de acordo com o seu peso corporal, e a alimentação retirada a fim de evitar a evacuação durante os ensaios.

Para o ensaio IV, as amostras (0,5 mL) foram coletadas em tubos heparinizados após 0,083; 0,25; 0,5; 1; 2; 4; 6; 8; 12 e 24 horas de administração do fármaco. O mesmo volume de sangue foi coletado para os ensaios dos supositórios nos tempos 0,083; 0,25; 0,5; 1; 2; 3; 4; 6; 8; 12 e 24 horas após a administração das formulações. Após a coleta das amostras os tubos contendo o sangue foram centrifugados a 10.000 RPM por 10 min para a separação do plasma.

2.3 Preparação das amostras, solução padrão, padrão interno e curva analítica

A solução estoque de DOXH empregada como padrão analítico (equivalente a 200 µg/mL de doxiciclina) foi preparada pela diluição do fármaco em água ultrapura e mantida sob refrigeração (2-8°C) por até uma semana. No dia do ensaio a solução estoque foi diluída novamente em água ultrapura a fim de obter concentrações na faixa de 1.000 a 150.000 ng/mL de doxiciclina. A solução estoque de furosemida foi preparada pela diluição de 5 mg do fármaco em 10 mL de metanol, obtendo concentração de 500 µg/mL, mantida sob refrigeração por até uma semana. No dia do ensaio, 0,4 mL da solução estoque foi diluída em 5 mL de água ultrapura obtendo concentração de 40 µg/mL. As soluções estoque de furosemida foram mantidas sob refrigeração por até sete dias.

As curvas analíticas (50 a 15000 ng/mL de doxiciclina) foram preparadas no dia do ensaio pela mistura de 10 µL da solução do PI e 90 µL da solução padrão. A solução resultante foi mantida sob agitação por 30 segundos/1300 RPM e na sequência 200 µL de metanol gelado contendo 0,5% de ácido fórmico foram adicionados. Agitou-se por mais 5 minutos a 1300 RPM. Após esse processo as amostras foram levadas à centrifugação por 10 minutos a 10000 RPM e o sobrenadante foi analisado por CLAE.

Para o preparo das amostras de DOXH em plasma, o sangue retirado dos coelhos foi centrifugado por 10 minutos a 10000 RPM a fim de promover a separação do plasma. Em seguida 90 µL do plasma foram adicionados a 10 µL da solução do PI e o restante do preparo segue o descrito anteriormente para a curva analítica.

2.4 Doseamento da doxiciclina

O método analítico empregado para o doseamento da doxiciclina foi adaptado a partir de método por CLAE descrito na literatura (YANG et al., 2014). O sistema cromatográfico empregado (Shimadzu LC System, Kyoto, Japan) consistiu-se de controlador CBM-20A, SIL-20A auto injector, bomba LC-20AT, degasser DGU-20AT e detector PDA SPD-M20A. Foi empregada coluna Agilent (4,6 x 250 mm, 5 µm), mantida a 25°C em vazão de 1,0 mL/min. A fase móvel utilizada consistiu em mistura de acetonitrila e água acidificada com ácido trifluoracético (pH 2,5) na proporção inicial de 28:72 (v/v) passando a 45:55 (v/v) após 6 minutos de análise. A detecção do fármaco ocorreu em aproximadamente 5,5 min e do PI em 13,5 min.

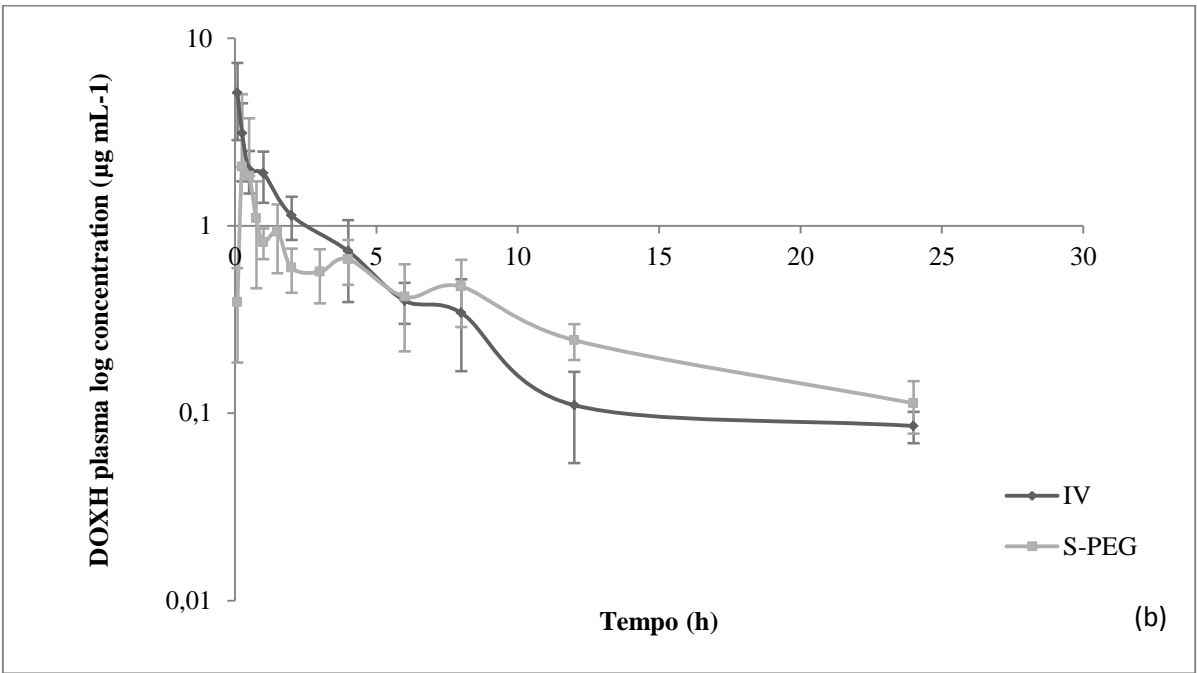
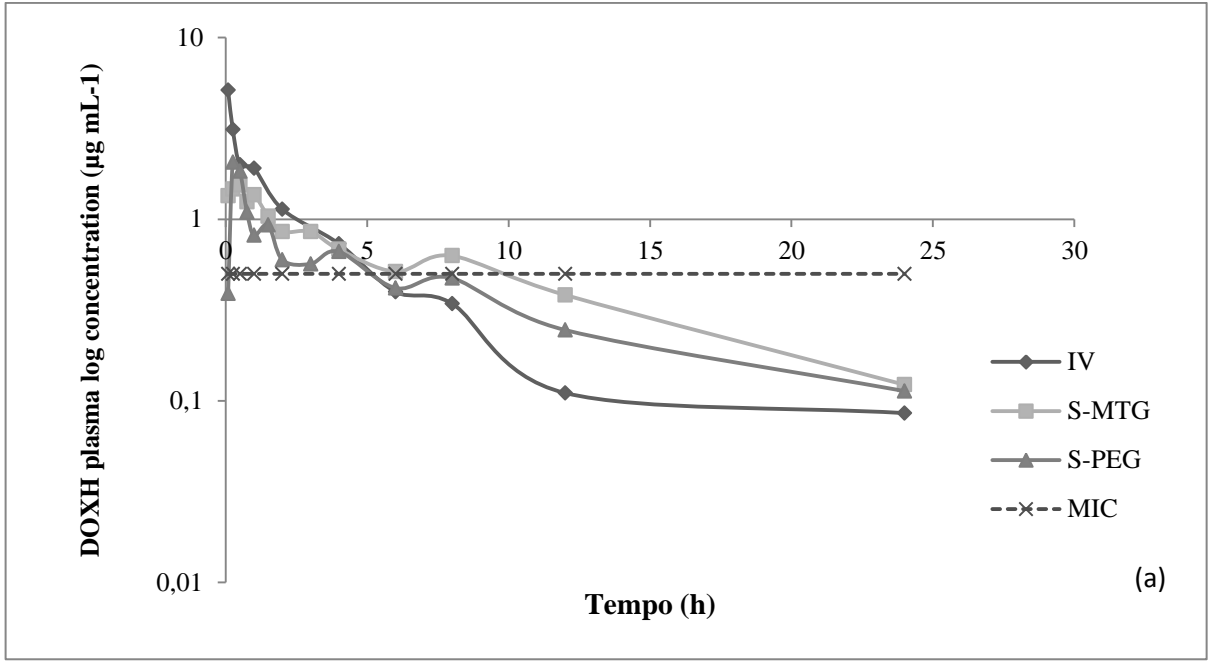
2.5 Análise dos dados

A análise farmacocinética não-compartimental foi realizada através do Excel[®] e a modelagem farmacocinética populacional através do software Monolix[®] (LIXOFT, Paris, França). O teste *t*-Student foi utilizado para comparação dos dados obtidos.

3. Resultados e discussão

De acordo com a literatura, a dose recomendada de doxiciclina para tratamento de pequenos animais é de 5 mg/kg para administração duas vezes ao dia ou 10 mg/kg para administração única (GUNN-MOORE, 2014; PAPICH, 2013; SAINZ et al., 2015). Em um primeiro momento realizou-se um estudo piloto empregando três animais e administrando a dose IV de 5 mg/kg a fim de determinar os pontos de coleta e o tempo total de ensaio. Neste estudo ficou estabelecido que o ensaio seria realizado por 24 horas, uma vez que a meia-vida estimada ficou em torno de 8 horas e assim, o período estipulado seria suficiente para coletar amostras por três vezes a meia-vida .

Após estabelecer o tempo de ensaio, também foram realizados estudos piloto com os supositórios. A dose estabelecida para o ensaio piloto com essas formulações foi de 10 mg/kg, adequando os possíveis valores obtidos à curva analítica estabelecida (50-15000 ng/mL). Assim como no ensaio IV, o tempo de 24 horas foi suficiente para proporcionar um tempo de coleta de três vezes a meia-vida. O preparo e a caracterização das formulações bem como os dados obtidos para os ensaios piloto foi avaliado por análise não-compartimental (NCA), conforme apresentado no capítulo 5. Após realizar ensaios piloto com as três formulações (S-PEG, S-MTG e IV), o ensaio foi repetido com dois novos animais para todas as formulações. O tempo de *washout* entre cada ensaio foi de pelo menos sete dias. As curvas *concentração x tempo* são apresentadas na Figura 6.1 e os valores obtidos para os parâmetros $T_{1/2}$, Vd, Cl e F, após NCA estão apresentado na Tabela 6.2.



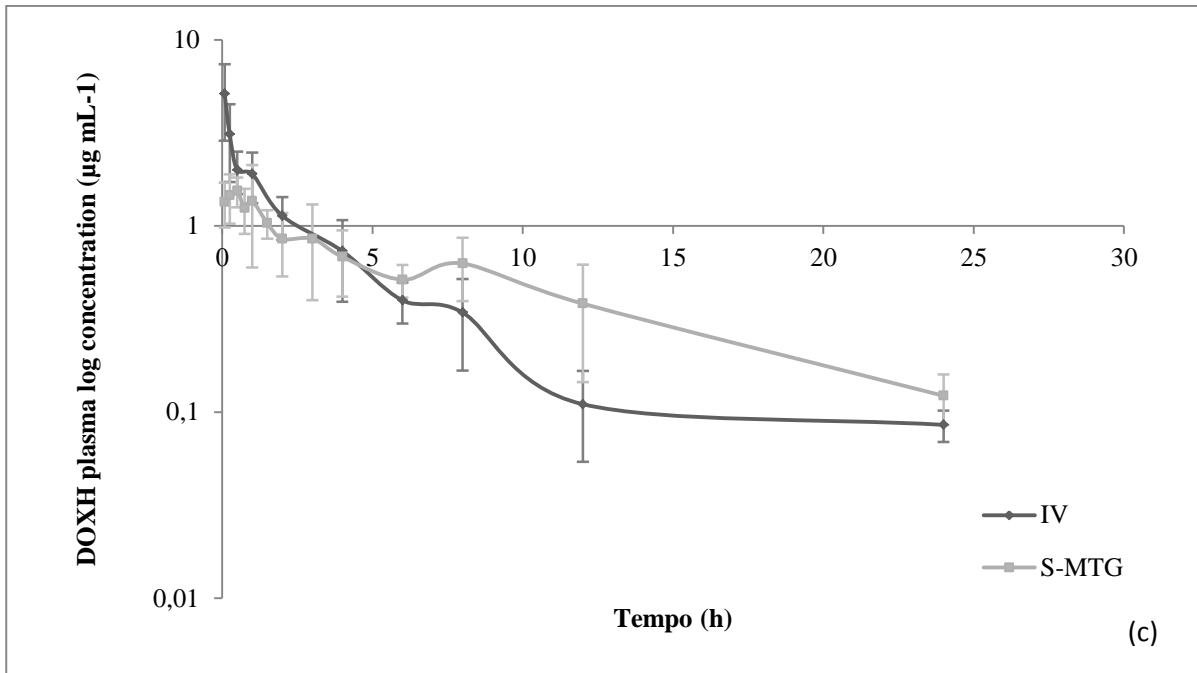


Figura 6.1(a), (b) e (c) – Concentrações plasmáticas de doxiciclina após administração IV (5 mg/kg) e supositórios S-PEG e S-MTG (10 mg/kg) MIC (0,5 µg/mL)(n=5)

Pode-se observar que as concentrações plasmáticas das três formulações avaliadas foram superiores a 0,5 µg/mL por até cinco horas. Esta informação é importante uma vez que de acordo com a literatura esta é considerada a concentração inibitória mínima (MIC) para grande parte dos micro-organismos sensíveis ao fármaco (VARGAS-ESTRADA; GRACIA-MORA; SUMANO, 2008).

Tabela 6.2 – Parâmetros farmacocinéticos para análise não compartimental após de 5 mg/kg de DOX por via IV e 10 mg/kg por via retal (n=5)

Parâmetros farmacocinéticos	DOX IV (média ± DP)	S-MTG (média ± DP)	S-PEG (média ± DP)
C_{max} (µg mL⁻¹)	6,61 ± 2,93	1,54 ± 0,32	2,06 ± 2,95
T_{max} (h)	-	0,55 ± 0,33	0,70 ± 0,48
t_{1/2} (h)	8,83 ± 2,10	7,72 ± 3,82	8,24 ± 1,30
Cl (L/h)	0,46 ± 0,10	0,44 ± 0,05	0,48 ± 0,09
Vd (L)	8,46 ± 4,61	14,88 ± 11,33	24,38 ± 7,29
ASC0-inf (µg mL⁻¹ h)	11,47 ± 2,91	11,57 ± 1,17	11,12 ± 2,47
F_{abs}	-	50,46 ± 4,58	48,64 ± 14,90

t_{1/2}: meia-vida do fármaco; Vd: volume de distribuição; Cl: *clearance* do fármaco; F: biodisponibilidade; C_{max}: concentração máxima obtida pelo fármaco e t_{max} o tempo para atingir a concentração; ASC0-inf: área sobre a curva do zero ao infinito; S-MTG: supositório de manteiga de cacau; S-PEG: supositório de polietilenoglicol; IV: intravenosa

Os dados experimentais foram tratados pelo Software Monolix[®] para determinação do popPK, e foram observados os resultados obtidos para modelos estruturais de um, dois e três compartimentos. A escolha do modelo levou em consideração os menores valores do Critério de Informação de Akaike (AIC), precisão das estimativas de parâmetros e melhor ajuste de dados através da análise dos gráficos (Figuras 6.2 e 6.3) (FABRICIO, 2016). Para a modelagem de dados da administração IV foi escolhido o modelo estrutural de dois compartimentos com administração *bolus*, já para as formulações retais foi escolhido o modelo oral, uma vez que se trata de uma administração extravascular e a constante de absorção (K_a) deve estar presente no modelo (FAN; DE LANNOY, 2014) (Tabela 6.3).

Tabela 6.3 – Parâmetros estimados para o popPK final

Parâmetro	IV (% EPR)	S-MTG (% EPR)	S-PEG (% EPR)
Ka (kg/L)	-	1,67 (53)	0,52 (65)
CL (L/h)	0,58 (15)	0,91 (18)	0,73 (100)
Q (L/h)	9,79 (24)	30,2 (45)	8,61 (47)
V1 (L)	2,38 (18)	1,96 (70)	2,44 (75)
V2 (L)	4,03 (12)	28,7 (24)	47,2 (94)
AIC	33,06	56,35	141,25

EPR: erro padrão relativo; Ka: constante de absorção; Cl: *clearance*; Q: clearance intercompartimental; V1: volume de distribuição no compartimento central; V2: volume de distribuição ; AIC: critério de informação de Akaike.

Após avaliação dos resultados o modelo farmacocinético estrutural de dois compartimentos mostrou-se mais adequado para descrever os perfis plasmáticos de concentração-tempo da doxiciclina após administração IV de 5 mg/kg e retal de 10 mg/kg. Esse modelo mostrou bom ajuste de dados e as previsões populacionais e individuais foram adequadamente descritas, além disso, não foi observado nenhum tipo de tendência nos gráficos (Figura 6.2).

A constante de absorção (k_a) determinada para as duas formulações administradas pela via retal apresentou valores de 1,67 L/kg para S-MTG e 0,52 L/kg para S-PEG. O maior valor de k_a obtido para a formulação lipofílica pode estar relacionado a menor afinidade do fármaco (hidrossolúvel) pela base lipofílica (S-MTG) em relação a base hidrofílica (S-PEG), fazendo com que o fármaco tenha maior tendência em liberar-se da base e maior facilidade em ser absorvido pelo organismo (AULTON; TAYLOR, 2016).

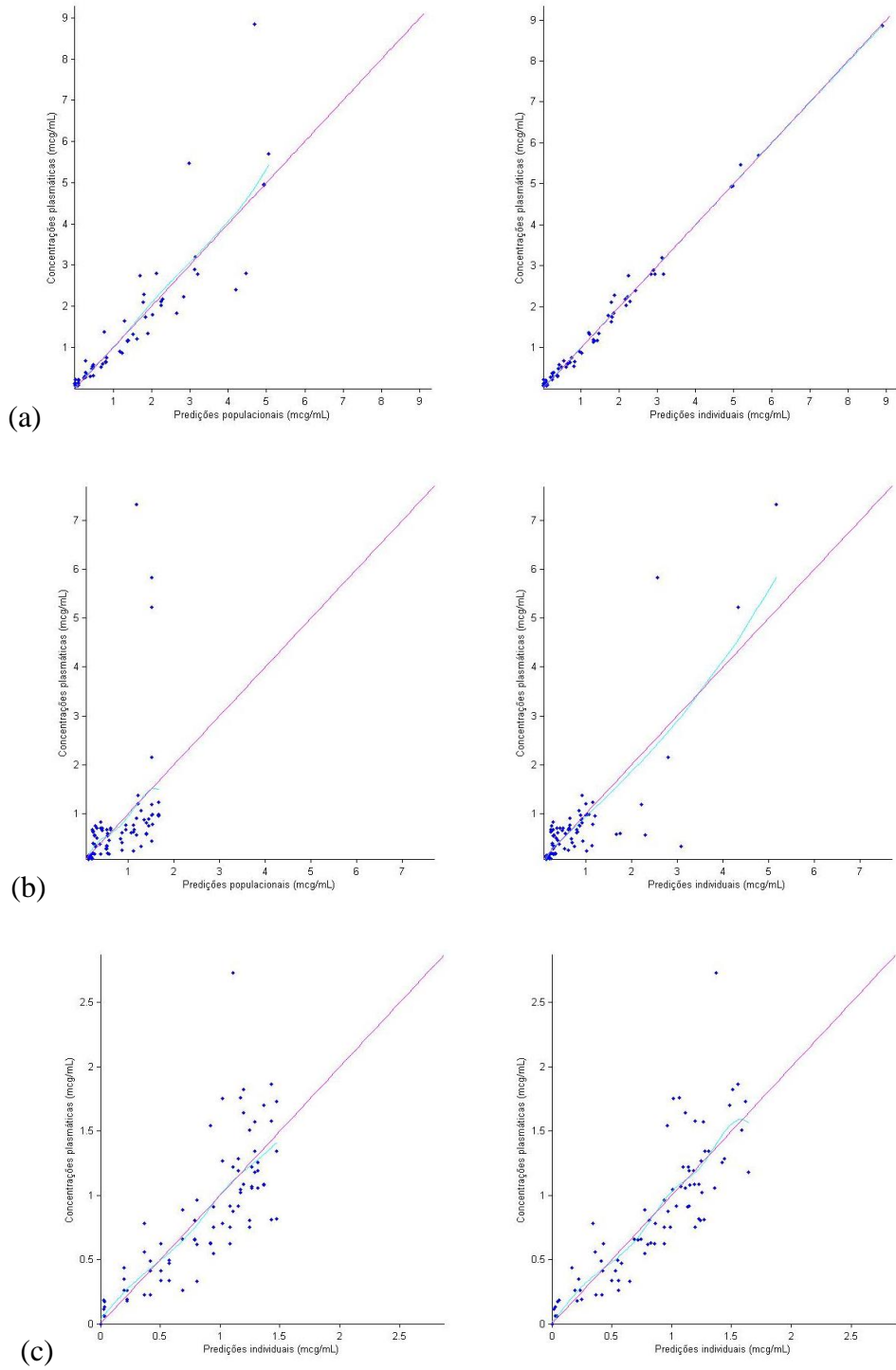


Figura 6.2 – Predições populacionais e individuais para (a) IV, (b) S-PEG, (c) S-MTG (n=5).
 A linha de regressão linear é a contínua e a pontilhada representa a linha identidade.

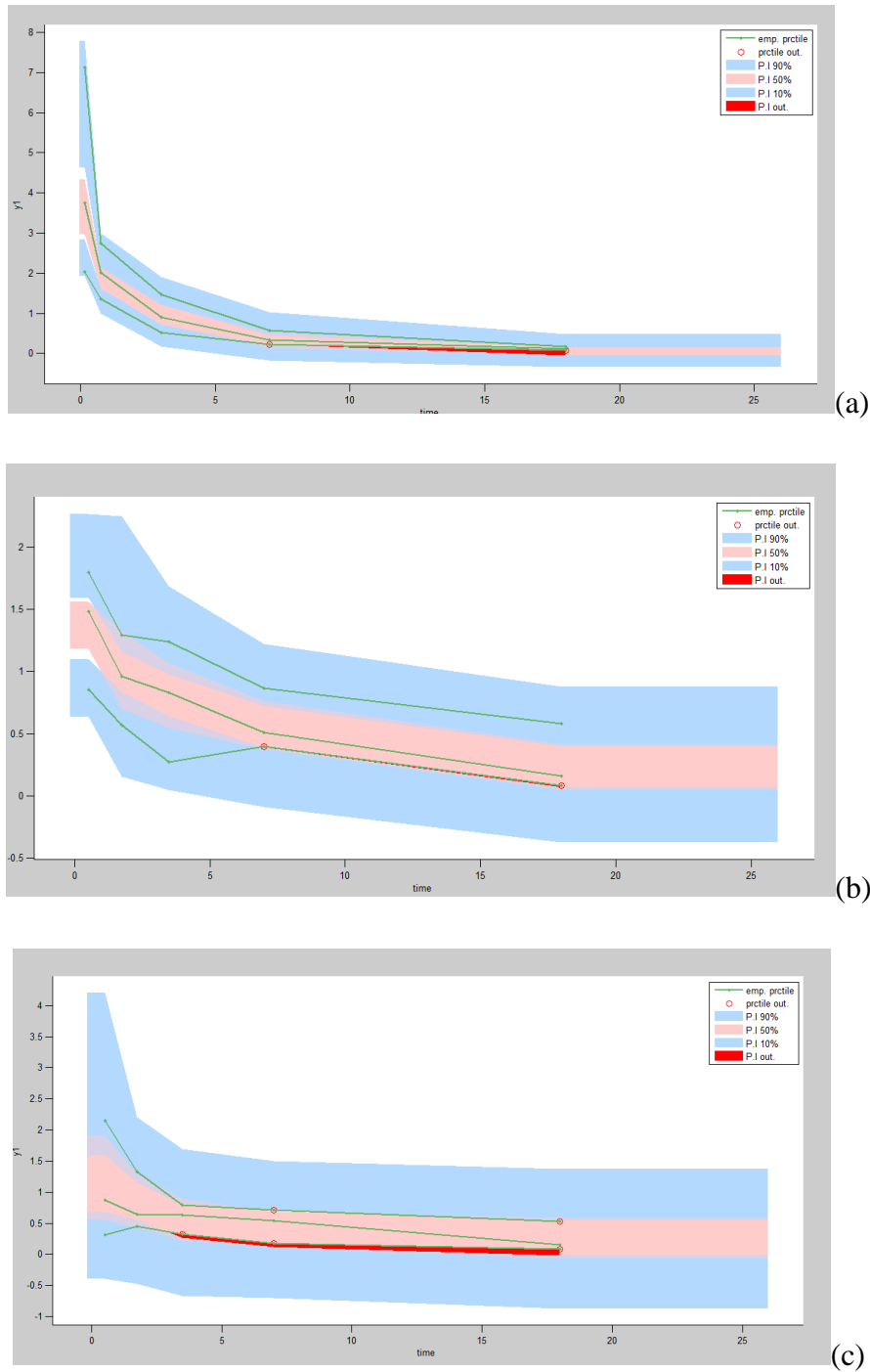


Figura 6.3 – *Visual predictive check* (VPC) do modelo final para (a) IV; (b) S-MTG e (c) S-PEG. Os pontos representam as observações, as linhas sólidas representam os percentis 10th, 50th e 90th dos dados observados; as linhas pontilhadas representam os percentis 10th, 50th e 90th dos dados simulados; as áreas cinza sombreadas representam o intervalo de predição de 90%.

Observando os gráficos VPC obtidos para as duas formulações retais avaliadas é possível observar que grande parte das observações estão dentro dos 90% do intervalo de

predição e as medianas estão entre o percentil 50th, o que demonstra a escolha correta do modelo e boas correlações entre os dados experimentais e os previstos pelo modelo.

Os valores obtidos para o *clearance* e volume de distribuição (V1) estão bastante próximos para as avaliações NCA e popPK, tanto para administração IV quanto retal (Tabelas 6.2 e 6.3) com valores de *clearance* variando entre 0,44 e 0,91 L/h, valores condizentes com estudo realizado utilizando outros modelos animais (BRATOEV et al., 2016; JHA et al., 1989). No que diz respeito à biodisponibilidade, os valores obtidos pela NCA foram de 50,46 ± 4,58% para S-MTG e 48,64 ± 14,90% para S-PEG.

Neste estudo a modelagem farmacocinética proporcionou a quantificação do fármaco no plasma do modelo animal utilizado, permitindo estabelecer a posologia das formulações desenvolvidas. Pelos dados obtidos é possível determinar que os supositórios contendo 25 mg do fármaco em questão não poderiam ser administrados em dose única, uma vez que a CIM recomendada na literatura se manteve por apenas cinco horas. Assim, pode-se sugerir que um aumento da dose do fármaco ou administração repetida do longo do dia proporcionariam um tratamento veterinário mais adequado, no que diz respeito às concentrações do fármaco necessárias.

Neste estudo o popPK de dos compartimentos foi o que melhor caracterizou o comportamento do fármaco. Este modelo também já foi relatado como o mais adequado para descrever o comportamento da doxiciclina em outros trabalhos encontrados na literatura empregando porcos (GUTIÉRREZ et al., 2014) e patos (BRATOEV et al., 2016) como modelo animal.

4. Conclusão

Após a análise dos resultados obtidos foi possível concluir que o modelo que melhor descreveu o comportamento plasmático da doxiciclina pelas vias IV e retal foi o de dois compartimentos. As formulações apresentaram valores de *clearance* e volume de distribuição próximos entre a avaliação NCA e a popPK. Apesar da diferença entre alguns dados, o estudo pode servir como base para estudos futuros e auxilia na compreensão do comportamento plasmático do fármaco após administração retal, além de auxiliar na determinação da posologia das novas formulações propostas. Finalmente, a modelagem farmacocinética pode auxiliar na compreensão dos processos de absorção, distribuição e eliminação da doxiciclina.

Referências

- AULTON, M. E.; TAYLOR, K. M. G. **Delineamento de Formas Farmacêuticas**. 4 ed ed. Rio de Janeiro: Alsevier, 2016.
- BRASIL. **Coordenação de fiscalização de produtos veterinários Relatório de Produtos com Licença Vigente**, 2014.
- BRATOEV, N. et al. Pharmacokinetics of doxycycline in ducks with steatosis due to force-feeding. **Macedonian Veterinary Review**, v. 39, n. 2, p. 219–224, 2016.
- CASTRO, L. J. et al. Pharmacokinetics of doxycycline in sheep after intravenous and oral administration. **Veterinary Journal**, v. 180, n. 3, p. 389–395, 2009.
- FABRICIO, J. S. I. **Modelagem farmacocinética populacional da glimepirida em ratos saudáveis e diabéticos**. [s.l.] Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2016.
- FAN, J.; DE LANNOY, I. A. M. Pharmacokinetics. **Biochemical Pharmacology**, v. 87, n. 1, p. 93–120, 2014.
- GUNN-MOORE, D. A. Feline mycobacterial infections. **Veterinary Journal**, v. 201, n. 2, p. 230–238, 2014.
- GUTIÉRREZ, L. et al. Pharmacokinetics of an injectable long-acting parenteral formulation of doxycycline hyclate in pigs. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, v. 37, n. 1, p. 83–89, 2014.
- HARTMANN, A. et al. Pharmacokinetics of pradofloxacin and doxycycline in serum, saliva, and tear fluid of cats after oral administration. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, v. 31, n. 2, p. 87–94, 2008.
- JHA, V. K. et al. Pharmacokinetic data on doxycycline and its distribution in different biological fluids in female goats. **Veterinary Research Communications**, v. 13, n. 1, p. 11–16, 1989.
- MOULD, D. R.; UPTON, R. N. Basic Concepts in Population Modeling, Simulation, and Model-Based Drug Development. **CPT: Pharmacometrics & Systems Pharmacology**, v. 1, n. 9, p. e6, 2012.
- PAPICH, M. G. Antibiotic treatment of resistant infections in small animals. **Veterinary Clinics of North America :Small Animal Practice**, v. 43, n. 5, p. 1091–1107, 2013.
- RANG, H. P. et al. **Farmacologia**. 7^a ed. [s.l.: s.n.].
- RINALDI, M. L. Therapeutic Review: Doxycycline. **Journal of Exotic Pet Medicine**, v. 23, n. 4, p. 415–417, 2014.
- RIOND, J.-L. et al. Determination of doxycycline in bovine tissues and body fluids by high performance liquid chromatography using photodiode array ultraviolet visible detection. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 78, n. 1, p. 44–47, 1989.
- SAINZ, Á. et al. Guideline for veterinary practitioners on canine ehrlichiosis and anaplasmosis in Europe. **Parasites & Vectors**, v. 8, n. 1, p. 75, 2015.
- VARGAS-ESTRADA, D.; GRACIA-MORA, J.; SUMANO, H. Pharmacokinetics after administration of an injectable experimental long-acting parenteral formulation of doxycycline hyclate in goats. **Research in Veterinary Science**, v. 84, p. 477–482, 2008.
- WILSON, R. C. et al. Pharmacokinetics of doxycycline in dogs. **Canadian Journal of Veterinary**

Research, v. 52, n. 1, p. 12–14, 1988.

YANG, F. et al. Pharmacokinetics of doxycycline in tilapia (*Oreochromis aureus* x *Oreochromis niloticus*) after intravenous and oral administration. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, v. 37, p. 388–393, 2014.

Os produtos farmacêuticos veterinários podem ser subdivididos em classes farmacêuticas (biológicos, fármacos e suplementos nutricionais) e direcionados a diferentes segmentos de animais, divididos em grandes e pequenos animais. Os grandes animais compreendem os ruminantes, espécies equídeas, suínos e aves de produção. Já cães, gatos, aves ornamentais e roedores são classificados como pequenos animais (CAPANEMA et al., 2007). A procura por produtos voltados aos cuidados com animais de estimação vem crescendo a cada ano e atualmente o Brasil é o terceiro maior mercado em faturamento do setor pet no mundo ficando atrás apenas dos Estados Unidos e Reino Unido (ABINPET, 2018).

Segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), em 2014 o Brasil possuía mais de 50 milhões de cães e 22 milhões de gatos vivendo em lares do nosso país. O faturamento total deste segmento foi de 18,9 bilhões em 2016 sendo quase 5% maior do que o registrado em 2015. Dentre os segmentos da indústria para animais de estimação podem ser destacados os produtos voltados à alimentação animal (Pet Food) e os voltados à saúde animal (Pet Vet) (ABINPET, 2018). O aumento constante na busca por produtos voltados ao mercado animal se soma à necessidade de promover um tratamento cada vez mais seguro aos animais e seus tutores e, nesse contexto, propôs-se o desenvolvimento de uma nova forma farmacêutica contendo doxiciclina hiclato, antibiótico amplamente usado na clínica veterinária.

A ausência de dados na literatura a respeito de formulações contendo doxiciclina visando a administração retal incentivou o preparo de supositórios em base hidrofílica e lipofílica. Foram preparados supositórios com características diferentes, uma vez que os mecanismos de liberação de fármacos a partir de supositórios são influenciados por características da base em que são formulados e podem ocorrer por erosão ou fusão da mesma, dependendo da sua solubilidade ou capacidade de dispersão nos meios fisiológicos ou ainda se a mesma se funde à temperatura corporal (BROWN et al., 2011).

Optou-se por utilizar as bases mais frequentemente empregadas, sendo escolhidas manteiga de cacau como base lipofílica e misturas de polietilenoglicóis com diferentes pesos moleculares como base hidrofílica (ANSEL; POPOVICH; ALLEN, 2013; FERREIRA, 2011).

Os primeiros supositórios desenvolvidos foram S-PEG, formulados com polietilenoglicol 400/4000 50:50 (p/p), e S-MTG, contendo apenas o fármaco e manteiga de cacau. Estas formulações foram avaliadas quanto ao aspecto, características organolépticas e

físico-químicas (ponto de fusão, peso médio, uniformidade de conteúdo e teor). Para avaliação do teor de doxiciclina optou-se por desenvolver e validar um método por eletroforese capilar de zona livre. A escolha dessa técnica deu-se em virtude do baixo custo operacional (ALTRIA; BRYANT; HADGETT, 1997), alta eficiência de separação e baixo consumo de amostras e solventes (MORZUNOVA, 2006). O método desenvolvido foi validado de acordo com as guias vigentes, e o resultado dessa etapa foi descrito no Capítulo I (ICH, 2005; USP 39, 2016).

A avaliação do ponto de fusão foi realizada em aparelho de ponto de fusão convencional, através de rampa de aquecimento usando pequenas porções das formulações. As especificações dos ensaios de peso médio e uniformidade de conteúdo seguiram as recomendações da Farmacopeia Brasileira, sendo empregado método espectrofotométrico para determinação da uniformidade de conteúdo, especialmente desenvolvido para esse fim.

Após a definição dos métodos empregados na caracterização dos supositórios, prepararam-se lotes piloto das formulações S-MTG e S-PEG, os quais foram submetidos a um estudo de estabilidade preliminar. Foram evidenciados queda no teor após 30 dias de armazenamento e mudanças na coloração.

Após essa etapa, buscaram-se alternativas para contornar os problemas evidenciados nas formulações. Atribuiu-se o escurecimento das formulações a processo oxidativo, com base em estudos de degradação forçada que apontavam essa rota de degradação para o fármaco (CHRIST; BURIN; ADAMS, 2018; KOGAWA; SALGADO, 2013) e por isso, buscou-se adicionar agentes antioxidantes às formulações. Após alguns estudos teóricos e experimentais, os antioxidantes escolhidos foram o metabissulfito de sódio e o BHT, para serem incorporados às formulações hidrofílica e lipofílica, respectivamente. Além disso, nas novas formulações optou-se por dissolver o fármaco em água antes da mistura com a base, e um tensoativo (polissorbato 80) foi adicionado na nova formulação lipofílica com o objetivo de aumentar a liberação de doxiciclina (HARGOLI et al., 2013; HOSNY; ABDEL-HADY; EL-TAHIR, 1996). As novas formulações desenvolvidas foram denominadas S-PEG-MET e S-MTG-BHT.

Após o desenvolvimento das formulações contendo antioxidantes, procedeu-se um novo estudo de estabilidade. As formulações S-PEG e S-PEG-MET foram mantidas em temperatura ambiente ($22 \pm 2^\circ\text{C}$) e os S-MTG e S-MTG-BHT a $5 \pm 3^\circ\text{C}$, temperatura recomendada pela literatura (ANSEL; POPOVICH; ALLEN, 2013). Foram preparados dois lotes de cada formulação, contendo o equivalente a 25 mg cada unidade, mantidas na embalagem primária (moldes plásticos) e envoltas em papel alumínio, a fim de diminuir a

adsorção/absorção de água das formulações S-PEG, como sugerido na literatura (KAUSS et al., 2013), e conferir maior proteção à luz.

Os resultados obtidos para a caracterização e estabilidade destas formulações estão descritas e amplamente discutidas no Capítulo II. As formulações S-PEG-MET e S-MGT-BHT foram preparadas com o fármaco dissolvido em água, como discutido anteriormente. Para verificar a influência da água nos supositórios contendo os antioxidantes, foi preparado um lote do supositório S-PEG-MET sem a dissolução prévia do fármaco em água. Para essa formulação foi obtido um teor de DOXH de $97,3 \pm 2,0\%$ em 30 dias de estudo de estabilidade. Este resultado sugere que a presença de água na formulação pode estar relacionada à redução do teor do fármaco, uma vez que o mesmo efeito foi observado tanto no S-PEG-MET quanto S-MTG-BHT. Esta formulação foi avaliada de forma concomitante com os estudos de farmacocinética e, em decorrência do pouco tempo para conclusão da tese, não foi possível avaliar estes resultados *in vivo*.

A partir dos resultados obtidos no estudo de estabilidade, as formulações S-PEG e S-MTG foram preparadas para uso nos ensaios *in vivo* empregando coelho como modelo animal. O método para doseamento da doxiciclina em plasma por CLAE, através de detecção UV, foi adaptado a partir da literatura (YANG et al., 2014). Além de estabelecer o método de análise, também foi necessário estabelecer o método de coleta, a fim de minimizar o sofrimento animal. Após tentativas experimentais, ficou estabelecido que os coelhos ficariam em caixa de contenção individual, mantendo a cabeça imóvel, e a coleta das primeiras 8 horas seria realizada através de gotejamento a partir um cateter infantil posicionado no início do experimento em uma das orelhas. Após as primeiras oito horas de ensaio os animais eram transferidos para gaiolas individuais e recebiam alimentação normalmente.

Em um primeiro momento foi avaliado o comportamento da formulação IV (n=3), com o objetivo de determinar os tempos de coleta e a dose a ser empregada, neste caso 5 mg/kg. As concentrações plasmáticas obtidas ficaram dentro da faixa estabelecida para o método, porém optou-se por preparar supositório contendo 10 mg/kg do fármaco para garantir que todos os doseamentos ficassem dentro da linearidade estabelecida para o método. Após este ensaio, foram estabelecidos os intervalos de coleta e foram avaliadas as formulações S-MTG e S-PEG (n=3) preparados na concentração de 10 mg/kg. Foi respeitado um intervalo de pelo menos sete dias entre dois ensaios farmacocinéticos, tempo conhecido como *washout*.

Os dados obtidos nestes ensaios foram avaliados através de um modelo não-compartimental, a fim de determinar parâmetros farmacocinéticos como C_{max} , T_{max} , $t_{1/2}$ e a

biodisponibilidade das formulações. A meia-vida obtida para as três formulações avaliadas foi em torno de 8 horas, semelhante a valores encontrados na literatura para cães após administração IV (GUTIÉRREZ et al., 2012; RIOND; VADEN; RIVIERE, 1990). Quanto à biodisponibilidade das formulações, foram obtidos valores próximos a 50% para as duas formulações, sendo 48,47% para S-MTG e 47,43% para S-PEG (n=3).

Após a avaliação preliminar da farmacocinética, procedeu-se uma nova avaliação com mais dois animais em cada grupo (n=5/tratamento), a fim de descrever o popPK do fármaco após a administração retal. Como já citado anteriormente, há estudos na literatura a respeito do comportamento do fármaco em diferentes modelos animais e em alguns deles é descrito como melhor modelo o de dois compartimentos (JHA et al., 1989; VARGAS-ESTRADA; GRACIA-MORA; SUMANO, 2008). Em nosso estudo, o modelo que melhor descreveu o comportamento do fármaco após administração retal e IV também foi o de dois compartimentos, com constante de absorção (K_a) iguais a 1,67 e 0,52 para S-MTG e S-PEG, respectivamente. Os demais valores obtidos na análise pelo software Monolix foram bastante semelhantes àqueles obtidos após NCA, corroborando a escolha do modelo de dois compartimentos. Os dados obtidos neste estudo podem ajudar a compreender o comportamento do fármaco após administração retal e também podem auxiliar na determinação da posologia dessas novas formulações propostas.

- O trabalho mostrou a viabilidade da preparação de supositórios hidrofílicos e lipofílicos contendo doxiciclina hclato;
- Para a avaliação do teor das formulações foi desenvolvido e validado método por eletroforese capilar indicativo de estabilidade, sendo o mesmo considerado específico, linear, exato, preciso e robusto;
- A estabilidade das formulações foi avaliada por um período de 30 dias e, a partir deste estudo, foi possível concluir que as formulações S-MTG e S-MTG-BHT apresentaram redução de teor inferior a 10% no tempo avaliado bem como ausência de alterações macroscópicas. As duas formulações hidrofílicas (S-PEG e S-PEG-MET) apresentaram alterações macroscópicas e redução relevante no período avaliado, sendo que a formulação S-PEG apresentou teor residual superior a 90% aos 15 dias do estudo;
- A avaliação da farmacocinética foi realizada através de estudo utilizando coelho como modelo animal, empregando as formulações S-MTG e S-PEG e comparando os resultados obtidos com uma formulação comercial IV. Através deste estudo foi possível obter biodisponibilidade próxima a 50% para as duas formulações avaliadas;
- Após a modelagem farmacocinética realizada através do software Monolix[®] foi possível concluir que o modelo que melhor descreveu o comportamento do fármaco nesse estudo foi o modelo de dois compartimentos;
- A biodisponibilidade obtida para as duas formulações avaliadas foi próxima a 50% e as duas formulações apresentam preparação simples e estabilidade por um período de pelo menos 15 dias.
- Considerando que a concentração plasmática da formulação S-MTG manteve-se acima da CIM por tempo superior que a formulação S-PEG e que a primeira apresenta menor potencial de irritação em relação à segunda, pode-se sugerir a superioridade dos supositórios de manteiga de cacau e sua viabilidade no tratamento de animais de pequeno porte.

- ABINPET. **Associação Brasileira da Indústria de Produtos para Animais de Estimação**. Disponível em: <www.abinpet.org.br>. Acesso em: 20 ago. 2004.
- AHMED, I.; KASRAIAN, K. Pharmaceutical challenges in veterinary product development. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 54, n. 6, p. 871–882, 2002.
- ALLEN, L. V. Quality control of suppositories. In: **Suppositories**. First edit ed. [s.l.] Pharmaceutical Press, 2007. p. 139–158.
- ALTRIA, K. D.; BRYANT, S. M.; HADGETT, T. A. Validated capillary electrophoresis method for the analysis of a range of acidic drugs and excipients. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 15, n. 8, p. 1091–1101, 1997.
- ALTRIA, K. D.; KELLY, M. A.; CLARK, B. J. Current applications in the analysis of pharmaceuticals by capillary electrophoresis. I. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 17, n. 4, p. 204–214, 1998.
- ANSEL, H. C.; POPOVICH, N. G. .; ALLEN, L. V. J. . **Formas Farmacêuticas e Sistemas de Liberação de Fármacos**. 9 ed ed. Porto Alegre: Artmed, 2013.
- AULTON, M. E.; TAYLOR, K. M. G. **Delineamento de Formas Farmacêuticas**. 4 ed ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2016.
- BARDEN, A. T. et al. A simultaneous assay method using capillary zone electrophoresis for a fixed dose combination of vildagliptin and metformin hydrochloride in coated tablets. **Analytical Methods**, v. 5, n. 20, p. 5701–5708, 2013.
- BAVISKAR, P. et al. Drug delivery on rectal absorption: Suppositories. **International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research**, v. 21, n. 1, p. 70–76, 2013.
- BERGOGNE-BÉRÉZIN, E.; BRYSKIER, A. The suppository form of antibiotic administration: Pharmacokinetics and clinical application. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 43, n. 2, p. 177–185, 1999.
- BONATO, P. S.; JABOR, V. A. P.; GAITANI, C. M. DE. Análise enantiosseletiva de fármacos: Contribuições da cromatografia líquida de alta eficiência e eletroforese capilar. **Química Nova**, v. 28, n. 4, p. 683–691, 2005.
- BP. **British Pharmacopoeia**. London: [s.n.].
- BRASIL. **Coordenação de fiscalização de produtos veterinários Relatório de Produtos com Licença Vigente**, 2014a.
- BRASIL. Ministério da Agricultura e Pecuária - Coordenação de Fiscalização de Produtos Veterinários. p. 1–200, 2014b.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, RDC nº 166, de 24 de julho de 2017. 2017.
- BRASIL. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**. Disponível em: <www.agricultura.gov.br>. Acesso em: 20 ago. 2004.
- BRATOEV, N. et al. Pharmacokinetics of doxycycline in ducks with steatosis due to force-feeding. **Macedonian Veterinary Review**, v. 39, n. 2, p. 219–224, 2016.

- BREWER, D. M. et al. Pharmacokinetics of single-dose rectal zonisamide administration in normal dogs. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 29, n. 2, p. 603–606, 2015.
- BROWN, C. K. et al. Meeting Report : FIP / AAPS Joint Workshop Report : Dissolution / In Vitro Release Testing of Novel / Special Dosage Forms. **AAPS PharmSciTech**, v. 12, n. 2, p. 51–64, 2011.
- BRUM, L. et al. Development and validation of LC-MS/MS method for the simultaneous determination of quinine and doxycycline in pharmaceutical formulations. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v. 32, n. 18, p. 2699–2711, 2009.
- BRUM, L. et al. Determination of quinine and doxycycline in rat plasma by LC-MS-MS: Application to a pharmacokinetic study. **Chromatographia**, v. 73, n. 11–12, p. 1081–1088, 2011.
- CAPANEMA, L. X. DE L. et al. Panorama da indústria farmacêutica veterinária. **Bndes**, 2007.
- CASTRO, L. J. et al. Pharmacokinetics of doxycycline in sheep after intravenous and oral administration. **Veterinary Journal**, v. 180, n. 3, p. 389–395, 2009.
- CHRIST, A. P.; BURIN, S. L.; ADAMS, A. I. H. A friendly environmental CZE method to determine doxycycline hyclate in suppositories and its application to tablet assay. **Current Analytical Chemistry**, v. 1, p. 1–8, 2018.
- CROUBELS, S. et al. Liquid chromatographic separation of doxycycline and 4-epidoxycycline in a tissue depletion study of doxycycline in turkeys. **Journal of Chromatography B: Biomedical Applications**, v. 708, n. 1–2, p. 145–152, 1998.
- CRUZ, M. S. **Degradação da doxiciclina por processos oxidativos avançados**. [s.l.] Universidade Estadual de Campinas, 2016.
- DE ALMEIDA, P. A. et al. Development, optimization and validation of an HPLC-PDA method for quantification of taxifolin in the bark extract of *Pinus pinaster*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 27, n. 9, p. 1648–1656, 2016.
- EL SAYEH, A. et al. Pharmacokinetics and anti-hypertensive effect of metoprolol tartrate rectal delivery system. **Drug Delivery**, v. 7544, p. 1–10, 2014.
- FABRICIO, J. S. I. **Modelagem farmacocinética populacional da glimepirida em ratos saudáveis e diabéticos**. [s.l.] Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2016.
- FAN, J.; DE LANNOY, I. A. M. Pharmacokinetics. **Biochemical Pharmacology**, v. 87, n. 1, p. 93–120, 2014.
- FB. Farmacopeia Brasileira. v. 5, p. 546, 2010.
- FERREIRA, A. DE O. **Guia prático de farmácia magistral**. 4^a ed. [s.l.] Pharmabooks, 2011.
- GENNARO, A. R. **Remington a Ciência e a Prática da Farmácia**. 20 ed ed. Rio de Janeiro: GUanabara Koogan, 2004.
- GIL, E. C. et al. Analysis of doxycycline by capillary electrophoresis. Method development and validation. **Journal of chromatography. A**, v. 895, n. 1–2, p. 43–49, 2000.

- GRIFFIN, M. O. et al. Tetracyclines : a pleiotropic family of compounds with promising therapeutic properties . Review of the literature. **Am J Physiol Cell Physiol**, v. 299, p. 539–548, 2010.
- GUNN-MOORE, D. A. Feline mycobacterial infections. **Veterinary Journal**, v. 201, n. 2, p. 230–238, 2014.
- GUTIÉRREZ, L. et al. Pharmacokinetics of an injectable long-acting formulation of doxycycline hyclate in dogs. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 54, n. 1, p. 39–47, 2012.
- GUTIÉRREZ, L. et al. Pharmacokinetics of an injectable long-acting parenteral formulation of doxycycline hyclate in pigs. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, v. 37, n. 1, p. 83–89, 2014.
- HAERDI-LANDERER, M. C. et al. Slow release antibiotics for treatment of septic arthritis in large animals. **Veterinary journal (London, England : 1997)**, v. 184, n. 1, p. 14–20, 2010.
- HARGOLI, S. et al. Preparation and in vitro evaluation of naproxen suppositories. **Indian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 75, n. 2, p. 143–148, 2013.
- HARSTAD, R. K. et al. Capillary Electrophoresis. 2016.
- HARTMANN, A. et al. Pharmacokinetics of pradofloxacin and doxycycline in serum, saliva, and tear fluid of cats after oral administration. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, v. 31, n. 2, p. 87–94, 2008.
- HEYDEN, Y. VANDER et al. Guidance for robustness / ruggedness tests in method validation. **Journal ou Pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 24, p. 723–753, 2001.
- HOSNY, E. A.; ABDEL-HADY, S. S.; EL-TAHIR, K. E. H. Formulation, in-vitro release and ex-vivo spasmolytic effects of mebeverine hydrochloride suppositories containing polycarbophil or polysorbate 80. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 142, n. 2, p. 163–168, 1996.
- ICH. **Validation of analytical procedures: text and methodology Q2(R1)**. International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Humans Use. **Anais...2005**
- INJAC, R. et al. Determination of doxycycline in pharmaceuticals and human urine by micellar electrokinetic capillary chromatography. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 387, n. 2, p. 695–701, 2007.
- INJAC, R.; DJORDJEVIC-MILIC, V.; SRDJENOVIC, B. Thermostability testing and degradation profiles of doxycycline in bulk, tablets, and capsules by HPLC. **Journal of chromatographic science**, v. 45, n. 9, p. 623–628, 2007.
- JANICKI, S. et al. Evaluation of paracetamol suppositories by a pharmacopoeial dissolution test--comments on methodology. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 52, n. 2, p. 249–54, 2001.
- JANTRATID, E. et al. Biowaiver monographs for immediate release solid oral dosage forms : doxycycline hyclate. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 99, n. 4, p. 1639–1653, 2010.
- JHA, V. K. et al. Pharmacokinetic data on doxycycline and its distribution in different

biological fluids in female goats. **Veterinary Research Communications**, v. 13, n. 1, p. 11–16, 1989.

KAUSS, T. et al. Pharmaceutical development and optimization of azithromycin suppository for paediatric use. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 441, n. 1–2, p. 218–226, 2013.

KAZSOKI, A. et al. Development and validation of a cyclodextrin-modified capillary electrophoresis method for the enantiomeric separation of vildagliptin enantiomers. **Electrophoresis**, v. 37, n. 10, p. 1318–1325, 2016.

KING, C. Rectal Drug Administration. **Journal of equine veterinary science**, v. 14, n. 10, p. 521–526, 1994.

KITZES-COHEN, R. et al. Bioequivalence study of two formulations of doxycycline. **Current Therapeutic Research - Clinical and Experimental**, v. 59, n. 5, p. 315–323, 1998.

KOGAWA, A. C. et al. Increasing Doxycycline Hyclate Photostability by Complexation with β -Cyclodextrin. **AAPS PharmSciTech**, v. 15, n. 5, p. 1209–1217, 2014.

KOGAWA, A. C.; SALGADO, H. R. N. Quantification of doxycycline hyclate in tablets by HPLC-UV method. **Journal of Chromatographic Science**, v. 51, n. 10, p. 919–925, 2013.

KRISHNA, A. C. et al. A novel and rapid method to determine doxycycline in human plasma by liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Indian J Pharm Sci**, v. 74, n. 6, p. 541–548, 2012.

LENTH, R. V. Quick and easy analysis for unreplicated factorials. **Technometrics**, v. 31, p. 469–473, 1989.

MAALAND, M. G. et al. Pharmacodynamics of doxycycline and tetracycline against staphylococcus pseudintermedius: Proposal of canine-specific breakpoints for doxycycline. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 51, n. 11, p. 3547–3554, 2013.

MAMANI, M. C. V. et al. Simultaneous determination of tetracyclines in pharmaceuticals by CZE using experimental design. **Talanta**, v. 70, n. 2, p. 236–43, 2006.

MARCOLINO, A. I. P. et al. Determination of dronedarone in the pharmaceutical dosage form by a stability-indicating micellar electrokinetic chromatography method. **Analytical Methods**, v. 5, n. 12, p. 3106–3113, 2013.

MOHAMED, R. A. et al. Formulation and evaluation of metoclopramide solid lipid nanoparticles for rectal suppository. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 65, n. 11, p. 1607–1621, 2013.

MORZUNOVA, T. G. Structure of Chemical Compounds, Methods of Analysis and Process Control Capillary Electrophoresis in Pharmaceutical. **Pharmaceutical Chemistry Journal**, v. 40, n. 3, p. 158–170, 2006.

MOULD, D. R.; UPTON, R. N. Basic Concepts in Population Modeling, Simulation, and Model-Based Drug Development. **CPT: Pharmacometrics & Systems Pharmacology**, v. 1, n. 9, p. e6, 2012.

NAIR, S.; CHIK, Z.; NOORDIN, M. I. *In vitro* characteristics of an insulin suppository

developed using palm oil base (HAMIN[®]) and its hypoglycaemic effect on rabbits. **Frontiers in Life Science**, v. 8, n. 3, p. 256–263, 2015.

NEMUTLU, E. et al. Validation of a rapid micellar electrokinetic capillary chromatographic method for the simultaneous determination of isoniazid and pyridoxine hydrochloride in pharmaceutical formulation. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 854, n. 1–2, p. 35–42, 2007.

NISHIHATA, T. et al. Enhancement of rectal absorption of water-soluble antibiotics in dogs. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 21, n. 2, p. 239–248, 1984.

O'NEIL, M. (ED.). **The Merck Index**. 14th. ed. New Jersey: Merck Research Laboratories Publication, 2006.

OLE-MAPENAY, I. M.; MITEMA, E. S. Some pharmacokinetic parameters of doxycycline in East African goats after intramuscular administration of a long-acting formulation. **Veterinary Research Communications**, v. 19, n. 5, p. 425–432, 1995.

ORLOVA, T. V. et al. Biopharmaceutical study of suppositories containing nonsteroidal anti-inflammatory drugs. **Pharmaceutical Chemistry Journal**, v. 44, n. 5, p. 265–267, 2010.

PAPICH, M. G. Antibiotic treatment of resistant infections in small animals. **Veterinary Clinics of North America :Small Animal Practice**, v. 43, n. 5, p. 1091–1107, 2013.

PÉREZ-FERNÁNDEZ, V. et al. Recent advances in the analysis of antibiotics by CE and CEC. **Electrophoresis**, v. 33, n. 1, p. 127–146, 2012.

PETERS, R. K. et al. Levetiracetam rectal administration in healthy dogs. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 28, n. 2, p. 504–509, 2014.

RANG, H. P. et al. **Farmacologia**. 7^a ed. [s.l.: s.n.].

REANMONGKOL, W.; KAEWNOPPARAT, N.; RATANAJAMIT, C. Physicochemical properties, in vitro release and in vivo evaluation of tramadol hydrochloride rectal suppository and rectal gel. **Asian Biomedicine**, v. 5, n. 2, p. 269–275, 2011.

RINALDI, M. L. Therapeutic Review: Doxycycline. **Journal of Exotic Pet Medicine**, v. 23, n. 4, p. 415–417, 2014.

RIOND, J.-L. et al. Determination of doxycycline in bovine tissues and body fluids by high performance liquid chromatography using photodiode array ultraviolet visible detection. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 78, n. 1, p. 44–47, 1989.

RIOND, J. L.; VADEN, S. L.; RIVIERE, J. E. Comparative pharmacokinetics of doxycycline in cats and dogs. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, v. 13, n. 4, p. 415–424, 1990.

SAINZ, Á. et al. Guideline for veterinary practitioners on canine ehrlichiosis and anaplasmosis in Europe. **Parasites & Vectors**, v. 8, n. 1, p. 75, 2015.

SANTOS, M. D. . et al. Pharmacokinetics and bioavailability of doxycycline in tukeys. **Journal Veterinary Therapeutic**, v. 19, p. 274–280, 1996a.

SANTOS, M. D. F. et al. Validation of a high-performance liquid chromatographic method

for the determination of doxycycline in turkey plasma. **Journal of Chromatography B: Biomedical Applications**, v. 682, n. 2, p. 301–308, 1996b.

SCHEPDAEL, A. V. et al. Analysis of Doxycycline by Capillary Electrophoresis. **Chromatographia**, v. 41, n. 5/6, p. 367–369, 1995.

SHABIR, G. A. Validation of high-performance liquid chromatography methods for pharmaceutical analysis. Understanding the differences and similarities between validation requirements of the US Food and Drug Administration, the US Pharmacopeia and the International Conf. **J Chromatogr A**, v. 987, n. 1–2, p. 57–66, 2003.

SHARGEL, L.; WU-PONG, S. . Y. A. **Applied biopharmaceutics and pharmacokinetics**. 6th. ed. New York: McGraw-Hill Book Co, 2012.

SHARIATI, S.; YAMINI, Y.; ESRAFILI, A. Carrier mediated hollow fiber liquid phase microextraction combined with HPLC-UV for preconcentration and determination of some tetracycline antibiotics. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 877, n. 4, p. 393–400, 2009.

SKÚLASON, S.; INGÓLFSSON, E.; KRISTMUNDSDÓTTIR, T. Development of a simple HPLC method for separation of doxycycline and its degradation products. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 33, n. 4, p. 667–672, 2003.

SLATTER, D. **Manual de cirurgia de pequenos animais**. 2 ed ed. São Paulo: [s.n.].

SMITH, K.; LEYDEN, J. J. Safety of doxycycline and minocycline: A systematic review. **Clinical Therapeutics**, v. 27, n. 9, p. 1329–1342, 2005.

STORPIRTIS, S. et al. **Biofarmacotécnica**. [s.l.] Guanabara Koogan, 2009.

SUCHLAND, R. J.; GEISLER, W. M.; STAMM, W. E. Methodologies and cell lines used for antimicrobial susceptibility testing of Chlamydia spp. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 47, n. 2, p. 636–642, 2003.

SUN, Y. et al. Issues and challenges in developing long-acting veterinary antibiotic formulations. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 56, n. 10, p. 1481–1496, 2004.

SUNARIĆ, S. M. et al. HPLC method development for determination of doxycycline in human seminal fluid. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 939, p. 17–22, 2013.

TAMIZI, E.; JOUYBAN, A. The potential of the capillary electrophoresis techniques for quality control of biopharmaceuticals-A review. **Electrophoresis**, p. n/a-n/a, 2015.

TAVARES, M. Eletroforese capilar: conceitos básicos. **Química Nova**, v. 19, n. 2, p. 173–181, 1996.

TAVARES, M. F. M. Mecanismos de separação em eletroforese capilar. **Química Nova**, v. 20, n. 5, p. 493–511, 1997.

TEÓFILO, R. F.; FERREIRA, M. M. C. Quimiometria II: Planilhas eletrônicas para cálculos de planejamentos experimentais, um tutorial. **Química Nova**, v. 29, n. 2, p. 338–350, 2006.

USP 39. **The United States Pharmacopeia**. 39. ed. Rockville: [s.n.].

UZUNKAYA, G.; BERGIŞADI, N. In vitro drug liberation and kinetics of sustained release indomethacin suppository. **Il Farmaco**, v. 58, n. 7, p. 509–512, 2003.

VARGAS-ESTRADA, D.; GRACIA-MORA, J.; SUMANO, H. Pharmacokinetics after administration of an injectable experimental long-acting parenteral formulation of doxycycline hyclate in goats. **Research in Veterinary Science**, v. 84, p. 477–482, 2008.

VICH. Varidation of analytical procedures: Methotology. **International Cooperation on Harmonisation of Techinal Requirements for Registration of Veterinary Medicinal Products**, v. VICH GL2, p. 1–10, 1998.

WAITES, K. B.; CRABB, D. M.; DUFFY, L. B. Inhibitory and bactericidal activities of gemifloxacin and other antimicrobials against *Mycoplasma pneumoniae*. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 21, n. 6, p. 574–577, 2003.

WATSON, D. G. **Pharmaceutical analysis: A textbook for pharmacy students and pharmaceutical chemists**. 2nd. ed. Edinburgh: Churchill Livingstone, 1999.

WILSON, R. C. et al. Pharmacokinetics of doxycycline in dogs. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 52, n. 1, p. 12–14, 1988.

YANG, F. et al. Pharmacokinetics of doxycycline in tilapia (*Oreochromis aureus* x *Oreochromis niloticus*) after intravenous and oral administration. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, v. 37, p. 388–393, 2014.

YOSHIOKA, S.; STELLA, V. **Stability of Drugs and dosage forms**. New York: Kluwer Academic / Plenum Publishers, 2000.