

Disposición plasmática de danofloxacin al 2.5% en cabras

PLASMA DISPOSITION OF DANOFLOXACIN 2.5% IN GOATS

Carlos A. Errecalde^{1,3}, Guillermo F. Prieto¹, Carlos F. Lüders²

RESUMEN

Se determinaron parámetros farmacocinéticos de danofloxacin al 2.5% tras su aplicación endovenosa e intramuscular en hembras caprinas adultas. Los niveles plasmáticos se cuantificaron por HPLC con detector de fluorescencia establecido a 295 nm de excitación y 490 nm de emisión utilizando fase móvil compuesta por agua, acetonitrilo y trietilamina (79:19:1 v/v/v) ajustada a pH 3.0. En cada vía de aplicación, utilizando los datos de concentraciones plasmáticas versus tiempo en cada animal se determinaron parámetros farmacocinéticos con el software PK Solution 2.0. El límite de cuantificación del ensayo fue de 0.0048 µg/ml. El perfil cinético exhibido por danofloxacin en caprinos es similar al conjunto de fluoroquinolonas en animales domésticos. La aplicación intramuscular provee rápida absorción, genera una $C_{máx}$ de 0.36 ± 0.13 µg/ml a los 55.1 ± 13.8 minutos y exhibe amplia distribución en el organismo y biodisponibilidad (F) del $109.7 \pm 19.8\%$. Danofloxacin mostró discreta permanencia en el organismo, según expresan los valores conseguidos en el $t_{1/2\beta}$ = 4.35 horas (EV), 4.32 horas (IM) y en el TMR = 5.9 horas (EV), 6.7 horas (IM). La aplicación intramuscular es equiparable para la vía endovenosa, pero el uso racional requiere el ajuste posológico para asegurar el éxito clínico-terapéutico debido que las relaciones plasmáticas de $C_{máx}$ y ABC respecto a CIM_{90} de *M. haemolytica* de 9 y 41, respectivamente, son insuficientes para asegurar eficacia clínica-microbiológica.

Palabras clave: caprinos; farmacocinética; fluoroquinolonas

ABSTRACT

Pharmacokinetic parameters of danofloxacin at 2.5% were determined after intravenous and intramuscular application in adult goat females. Plasma levels were quantified by HPLC with fluorescence detector set at 295 nm excitation and 490 nm emission using

¹ Cátedra de Farmacología, Departamento de Clínica Animal, Facultad de Agronomía y Veterinaria, Universidad Nacional de Río Cuarto, Argentina

² Cátedra de Farmacología, Escuela de Medicina Veterinaria, Facultad de Recursos Naturales, Universidad Católica de Temuco, Chile

³ E-mail: cerrecalde@ayv.unrc.edu.ar

Recibido: 13 de septiembre de 2017

Aceptado para publicación: 18 de enero de 2018

mobile phase composed of water, acetonitrile and triethylamine (79:19:1 v/v/v) adjusted to pH 3.0. In each route of application, using plasma concentrations versus time data in each animal, pharmacokinetic parameters were determined with PK Solution 2.0 software. Quantification limit of the assay was 0.0048 µg/ml. The kinetic profile exhibited by danofloxacin in goats was similar to that of fluoroquinolones in domestic animals. The intramuscular application provides rapid absorption, produces a C_{max} of 0.36 ± 0.13 µg/ml at 55.1 ± 13.8 minutes, and exhibits wide distribution in the organism and bioavailability (F) of $109.7 \pm 19.8\%$. Danofloxacin showed a slight permanence in the organism, according to the values obtained in $t_{1/2\beta} = 4.35$ hours (EV), 4.32 hours (IM) and in the TMR = 5.9 hours (EV), 6.7 hours (IM). Intramuscular and intravenous application are comparable, but rational use requires dosage adjustment to ensure clinical and therapeutic success, because plasma C_{max}/MIC_{90} and ABC/MIC_{90} ratios of 9 and 41, respectively in relation to MIC_{90} of *M. haemolytica*, are insufficient to ensure clinical-microbiological efficacy.

Key words: fluoroquinolones; goat; pharmacokinetic

INTRODUCCIÓN

Las fluoroquinolonas son antimicrobianos sintéticos provistos de notables propiedades farmacocinéticas relacionadas con su uso terapéutico, entre las cuales se destacan la moderada permanencia en el organismo y la amplia difusión tisular, consecuencia del carácter liposoluble y la escasa unión a las proteínas plasmáticas (Čonková *et al.*, 2009; Papich y Riviere, 2009). Estas sustancias desarrollan acciones bactericidas rápidas mediante el bloqueo de la enzima ADN girasa, cuya cinética de muerte celular es concentración dependiente.

Diversos ensayos clínicos realizados con fluoroquinolonas demuestran la importancia terapéutica de las relaciones establecidas entre parámetros dosis dependiente tales como la concentración máxima ($C_{máx}$) y el área bajo la curva (ABC), frente la concentración inhibitoria mínima (CIM_{90}) de microorganismos susceptibles, como índices predictores de eficacia antimicrobiana y clínica (Čonková *et al.*, 2009; Baggot y Giguère, 2013; Giguère y Dowling, 2013). El cociente $C_{máx}/CIM_{90} > 8$ redujo la expresión de resistencia bacteriana mientras la relación $ABC/CIM_{90} > 125$ fue requisito para lograr la erradicación bacteriana y prevenir el cre-

cimiento de microorganismos (Lees *et al.*, 2008; Baggot y Giguère, 2013; Giguère y Dowling, 2013).

Danofloxacin es una fluoroquinolona de tercera generación que solo se aplica en animales domésticos sobre gérmenes Gram negativos, algunos Gram positivos y ciertos micoplasmas (Ayling *et al.*, 2000; Čonková *et al.*, 2009; Papich y Riviere, 2009). En presencia de *Mannheimia haemolytica* se estableció la CIM_{90} en ≥ 0.04 µg/ml (Shojaee Aliabadi y Lees, 2003; Grobbel *et al.*, 2007).

Los antecedentes cinéticos disponibles de danofloxacin revelan pronta absorción por administración intramuscular (Shojaee Aliabadi y Lees, 2003; Čonková *et al.*, 2009; Karademir *et al.*, 2015). En rumiantes, la $C_{máx}$ fue de 0.3 µg/ml (McKellar *et al.*, 1998; Atef *et al.*, 2001) antes de una hora de la aplicación (Karademir *et al.*, 2015).

Se encontró en diversas especies animales que la biodisponibilidad (F) por aplicación parenteral fue superior al 65% (McKellar *et al.*, 1998; Shem-Tov *et al.*, 1998) y pronta distribución desde el compartimento central (Shem-Tov *et al.*, 1998; Atef *et al.*, 2001; Sappal *et al.*, 2009). Esto es como consecuencia de la incorporación de un anillo piperazínico que promueve el ingreso a los

tejidos y, simultáneamente, reduce los efectos indeseables (Brown, 1996) y el extenso volumen de distribución (Vd), cuyos valores son de 1.4 l/kg en caprinos (Atef *et al.*, 2001) y entre 3.4 y 4.3 l/kg en bovinos (Apley y Upson, 1993). Estos resultados insinúan notable disposición tisular, primordialmente en el árbol respiratorio (Apley y Upson, 1993; McKellar *et al.*, 1998), donde se encontraron niveles superiores a la CIM₉₀ de patógenos respiratorios que subsisten entre 4 y 12 horas (Apley y Upson, 1993).

Danofloxacin experimenta moderada permanencia en el organismo (McKellar *et al.*, 1998; Sappal *et al.*, 2009), según expresa la vida media de eliminación ($t_{1/2\beta}$) hallada de 1.3 horas en caprinos (Atef *et al.*, 2001), entre 2.9 a 7.4 horas en bovinos (Apley y Upson, 1993; Friis, 1993; Shojaee Aliabadi y Lees, 2003), de 2.08 horas (Shem-Tov *et al.*, 1998) a 3.3 horas en ovinos (McKellar *et al.*, 1998; Karademir *et al.*, 2015) y de 5.4 y 6.9 horas en porcinos, para las aplicaciones endovenosa e intramuscular, respectivamente (Richez *et al.*, 1996).

Las propiedades farmacocinéticas, el amplio espectro de acción y la potencia demostrada, sugieren el empleo de danofloxacin en enfermedades respiratorias producidas por gérmenes susceptibles en ruminantes, porcinos y aves (Brown, 1996; Čonková *et al.*, 2009), sin embargo, son limitados los informes farmacocinéticos en caprinos, circunstancia que motivó el presente estudio con el propósito de establecer parámetros farmacocinéticos plasmáticos, luego de la aplicación de una dosis única por las vías intravenosa e intramuscular.

MATERIALES Y MÉTODOS

En un diseño cruzado de tratamiento se utilizaron seis cabras criollas adultas no gestantes, clínicamente sanas y de 30.5 ± 8.3 kg de peso, seleccionadas al azar de una población de 80 animales. Las cabras se en-

contraban en pastoreo libre durante el día y suplementación con grano de maíz molido durante el encierro nocturno. Tres animales recibieron una dosis única de 1.25 mg/kg de mesilato de danofloxacin al 2.5% (Advocin®, Pfizer) en forma de *bolus* en la vena yugular derecha y tres animales idéntica dosis, pero aplicada en el músculo semitendinoso izquierdo. Luego de dos semanas se intercambiaron los tratamientos.

Posterior a la administración se obtuvieron muestras de sangre de la vena yugular izquierda (3-4 ml) en tubos heparinizados a los 5, 10, 15, 20, 30 min y 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10, 12 y 24 h. Las muestras fueron centrifugadas de inmediato durante 15 min a 1000 g y conservadas a -20 °C hasta su análisis.

El ensayo preparativo consistió en la extracción líquido-líquido del analito utilizando 200 µl de muestra, 200 µl de agua deionizada, 800 µl de metanol y 20 µl de balofloxacin como estándar interno.

El conjunto se sometió a agitación por vórtex durante 30 s y luego de 30 min se centrifugó a 1220 g durante 25 minutos a 4 °C. La separación y cuantificación se realizó por HPLC utilizando un equipo Hewlett-Packard serie 1050, provisto de bomba isocrática, inyector manual Rheodyne 7125, loop de 100 µl, columna Luna C-18 y guardacolumnas Phenomenex C-18, asociado a un fluorómetro Hewlett-Packard, serie 1046-A de longitud de onda regulable e integrador de la misma marca, serie 3395, mediante una elusión isocrática en fase reversa con flujo de 0.8 ml/min, 50 µl de volumen de inyección de muestra y lectura en detector de fluorescencia establecido a 295 nm de excitación y 490 nm de emisión, utilizando fase móvil compuesta por agua, acetonitrilo y trietilamina (79:19:1 v/v) ajustada a pH 3 con ácido ortofosfórico, según Bottcher *et al.* (2001).

De los cromatogramas correspondientes a las corridas de las muestras del ensayo cinético y los patrones de concentración co-

nocidos, se tomaron los valores del área de pico provistos por danofloxacin y el estándar interno, balofloxacin. De ambos se obtuvo un cociente utilizado para la confección de la curva de calibración y establecer las concentraciones plasmáticas de danofloxacin por regresión lineal simple ($r^2= 0.99$), según Nouws y Ziv (1976). Los datos individuales de concentración de danofloxacin en función del tiempo para cada vía de administración se analizaron mediante el modelo farmacocinético no compartimental utilizando el software PK Solution v. 2.0 (Farrier, 1999) con el propósito de calcular parámetros farmacocinéticos robustos como el ABC y la constante de velocidad de eliminación (β).

Juntamente con el dato de dosis administrada, se calcularon otros parámetros como el volumen de distribución (Vd), *clearance* total (Cl_T) y la vida media de eliminación ($t_{1/2\beta}$). Para evaluar la normalidad de estas variables se realizó la prueba de Shapiro-Wilk. Posteriormente y de acuerdo con dichos resultados, las diferencias entre las variables se analizaron mediante la Prueba de T y el Test de Wilcoxon para muestras relacionadas. La biodisponibilidad (F) intramuscular se determinó mediante la ecuación: $F = \frac{ABC_{IM}}{ABC_{EV}}$. El límite de cuantificación del ensayo fue de 0.0048 $\mu\text{g/ml}$.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El método empleado permitió establecer el antimicrobiano a los 10 min pos-aplicación, similar a otras experiencias (Mann y Frame, 1992) y hasta 12 h después de la aplicación, excediendo al método microbiológico (Ateff *et al.*, 2001). La Figura 1 representa las curvas de disposición plasmáticas generadas por aplicación la aplicación endovenosa e intramuscular de 1.25 mg/kg de danofloxacin en cabras. El Cuadro 1 indica el valor promedio (\pm DE) de los parámetros cinéticos por ambas vías de administración.

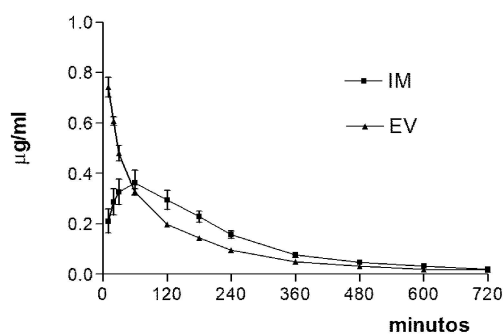


Figura 1. Curvas de disposición plasmática de danofloxacin al 2.5% por aplicación endovenosa e intramuscular de 1.25 mg/kg en caprinos

Las variables farmacocinéticas analizadas no arrojaron diferencias significativas. La aplicación intramuscular provee rápida absorción, similar a lo informado en bovinos (Apley y Upson, 1993; Shojaee Aliabadi y Lees, 2003), porcinos (Mann y Frame, 1992), caprinos (Ateff *et al.*, 2001), ovinos (McKellar *et al.*, 1998), generando una $C_{m\acute{a}x}$ ligeramente menor al informado en ovinos (McKellar *et al.*, 1998) con idéntica dosis. Así mismo, el $T_{m\acute{a}x}$ es próximo al observado en bovinos y porcinos (Mann y Frame, 2001) y ovinos (McKellar *et al.*, 1998).

Danofloxacin exhibe pronta distribución en concordancia con experiencias en otras especies domésticas (Ateff *et al.*, 2001; Giles *et al.*, 1991; Mann y Frame, 1992). Los extensos valores de Vd obtenidos insinúan excelente capacidad para difundirse hacia territorios extravasculares conforme lo comunicado en ovinos (McKellar *et al.*, 1998) y bovinos (Apley y Upson, 1993).

La permanencia de danofloxacin en el organismo resultó discreta, según expresan los parámetros TMR y la vida media de eliminación. Este valor fue similar al informado en bovinos (Mann y Frame, 2001), ligeramente menor al logrado en ovinos (McKellar *et*

Cuadro 1. Parámetros farmacocinéticos obtenidos por la aplicación endovenosa e intramuscular de 1.25 mg/kg de danofloxacin al 2.5% en caprinos

Parámetro	Endovenosa	Intramuscular
A	0.672 ± 0.202	-0.422 ± -0.358
α	0.035 ± 0.014	0.052 ± 0.023
B	0.294 ± 0.029	0.485 ± 0.167
β	0.004 ± .0034	0.005 ± 0.001
ABCárea ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}/\text{h}$)	1.49 ± 0.14	1.64 ± 0.34
C _{máx} ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	-	0.36 ± 0.13
T _{máx} (minutos)	-	55.1 ± 13.8
T _{1/2} α (minutos)	22.52 ± 8.27	15.04 ± 5.16
T _{1/2} β (hs)	2.67 ± 0.22	2.58 ± 0.25
V _d (L/kg)	3.23 ± 0.22	3.12 ± 0.46
Cl _t (ml/min/kg)	14.02 ± 1.31	13.98 ± 1.31
TMR (horas)	3.08 ± 0.41	3.92 ± 0.43
F (%)		109.7 ± 19.8

A: intercepto de la curva de distribución, α : pendiente de la curva de distribución, B: intercepto de la curva de eliminación, β : pendiente de la curva de eliminación, $t_{1/2}$ abs: vida media de absorción, $t_{1/2}\alpha$: tiempo medio de distribución, $t_{1/2}\beta$: vida media de eliminación, C_{máx}: concentración máxima, T_{máx}: tiempo en que se alcanza la C_{máx}, V_d: volumen de distribución, Cl_t: eliminación total, ABC: área bajo la curva, TMR: tiempo medio de residencia, F: biodisponibilidad

al., 1998; Karademir *et al.*, 2015) y muy inferior al obtenido en cerdos (Mann y Frame, 2001).

La fracción plasmática disponible (F) luego de la aplicación intramuscular fue óptima (109.7 ± 19.8%), semejante a la reportada en búfalos (Sappal *et al.*, 2009), ovinos (McKellar *et al.*, 1998) y porcinos (Richez *et al.*, 1996). Pese a estas diferencias, los resultados obtenidos son similares a los informados en experiencias similares desarrolladas en porcinos (Mann y Frame, 1992; Richez *et al.*, 1996), ovinos (McKellar *et al.*, 1998; Karademir *et al.*, 2015) y bovinos (Mann y Frame, 1992) y se corresponden con el perfil farmacocinético exhibido por el conjunto de fluoroquinolonas en animales domésticos (Čonková *et al.*, 2009; Papich y Riviere, 2009; Giguère y Dowling, 2013).

Según la máxima sensibilidad de *M. haemolytica* reportada frente a danofloxacin (Shojaee Aliabadi y Lees, 2003; Grobbel *et al.*, 2007), en este estudio se lograron relaciones plasmáticas por aplicación intramuscular de C_{máx}/CIM₉₀ y de ABC/CIM₉₀ de 9 y 41, respectivamente; valores próximos a los informados en terneros con idéntica dosis (Shojaee Aliabadi y Lees, 2003), pero distantes de los cocientes requeridos para avalar la eficacia clínica-microbiológica (Čonková *et al.*, 2009; Baggot y Giguère, 2013; Giguère y Dowling, 2013), aunque estos refieren solo a niveles plasmáticos.

En consecuencia, similar a lo informado en terneros (Errecalde *et al.*, 2005), en los caprinos resulta indispensable adecuar la posología y el ritmo de administración según la sensibilidad del microorganismo patógeno

involucrado. No obstante, el éxito terapéutico reportado en presencia de patologías respiratorias aplicando dosis similares a la empleada en este estudio (Brown, 1996; Čonková *et al.*, 2009), se correspondería con los elevados niveles de danofloxacin obtenidos en esos tejidos (Apley y Upson, 1993; McKellar *et al.*, 1998).

CONCLUSIONES

- El método de determinación utilizado es útil para cuantificar danofloxacin en plasma caprino.
- El análisis de las curvas de disposición plasmática del antimicrobiano y la inexistencia de diferencias significativas en los parámetros cinéticos más relevantes entre ambas vías estudiadas permite afirmar que la aplicación intramuscular de danofloxacin es equiparable a la intravenosa.
- El perfil cinético exhibido por danofloxacin en caprinos es similar al obtenido por el conjunto de fluoroquinolonas, pero el uso racional requiere el ajuste posológico para asegurar el éxito clínico-microbiológico en esta especie.

LITERATURA CITADA

1. **Apley M, Upson D. 1993.** Lung tissue concentrations and plasma pharmacokinetics of danofloxacin in calves with acute pneumonia. *Am J Vet Res* 54: 937-943.
2. **Atef M, El-Gendi A, Amer M, Abb El-Aty A. 2001.** Some pharmacokinetic data for danofloxacin in healthy goats. *Vet Res Commun* 25: 367-377.
3. **Ayling RD, Baker SE, Peek ML, Simon AJ, Nicholas RA. 2000.** Comparison of *in vitro* activity of danofloxacin, florfenicol, oxytetracycline, spectinomycin and tilmicosin against recent field isolates of *Mycoplasma bovis*. *Vet Rec* 146: 745-747.
4. **Baggot J, Giguère S. 2013.** Principles of antimicrobial drug bioavailability and disposition. In: Giguère, J, Prescott JF, Dowling P (eds). *Antimicrobial therapy in veterinary medicine*. 5th ed. USA: John Wiley. p 41-77.
5. **Böttcher S, Baum H, Hoppe-Tychy T, Benz C, Sonntag H. 2001.** An HPLC assay and a microbiological assay to determine levofloxacin in soft tissue, bone, bile and serum. *J Pharm Biomed Anal* 25: 197-203.
6. **Brown SA. 1996.** Fluoroquinolones in animal health. *J Vet Pharm Ther* 19: 1-14. doi: 10.1111/j.1365-2885.1996.tb00001.x
7. **Čonková E, Èellárov A, Váczi E, Sabová L. 2009.** Quinolones from the point of view of pharmacology and veterinary indications (a review). *Folia Vet* 53: 175-185.
8. **Errecalde CA, Prieto GF, Lüders CF, García Ovando H. 2005.** Farmacocinética plasmática de danofloxacin en terneros. *Rev Univ Nacional de Río Cuarto* 25: 143-149.
9. **Farrier D. 1999.** PK Solution 2.0 Noncompartmental pharmacokinetics data analysis. Summit Research Services. Ashland, USA.
10. **Giguère S, Dowling P. 2013.** Fluoroquinolones. In: Giguère, J, Prescott JF, Dowling P (eds). *Antimicrobial therapy in veterinary medicine*. 5th ed. USA: John Wiley. p 295-314.
11. **Grobbel M, Lübke-Becker A, Wieler LH, Froyman R, Friederichs S, Filios S. 2007.** Comparative quantification of the *in vitro* activity of veterinary fluoroquinolones. *Vet Microbiol* 124: 73-81. doi: 10.1016/j.vetmic.2007.03.017
12. **Karademir U, Boyacioglu M, Kum C, Sekkin S. 2015.** Comparative pharmacokinetics of enrofloxacin, danofloxacin and marbofloxacin following intramuscular administration in sheep. *Small Ruminant Res* 133: 108-111. doi: 10.1016/j.smallrumres.2015.09.007

13. **Lees P, Svendsen O, Wiuff C. 2008.** Strategies to minimize the impact of antimicrobial treatment on the selection of resistant bacteria. In: Guardabassi L, Jensen L, Kruse H (eds). Guide to antimicrobial use in animals. UK: Blackwell Publishing. p 77-101.
14. **Mann D, Frame G 1992.** Pharmacokinetics study of danofloxacin in cattle and swine. *Am J Res* 53: 1022-1026.
15. **Nouws JMF, Ziv G 1976.** The effect of storage at 4 °C on antibiotic residues in kidney and meat tissues of dairy cows. *Tijdschr Diergeneesk* 101: 1141-1153.
16. **McKellar Q, Gibson I, Mc Cormack R. 1998.** Pharmacokinetics and tissue disposition of danofloxacin in sheep. *Biopharm Drug Dispos* 19: 123-129. doi: 10.1002/(SICI)1099-081X(199803)19:2<123::AID-BDD89>3.0.CO;2-G
17. **Papich MG, Riviere JE. 2009.** Fluoroquinolone antimicrobial drugs. In: Giguère, J, Prescott JF, Dowling P (eds). *Antimicrobial therapy in veterinary medicine*. 5th ed. USA: John Wiley. p 983-1011.
18. **Richez P, Pedersen Mörner A, De Jong A, Monlouis J. 1996.** Plasma pharmacokinetics of parenterally administered danofloxacin and enrofloxacin in pigs. *J Vet Pharm Ther* 20: 41-42.
19. **Sappal R, Chaudhary RK, Sandhu HS, Pritam Kaur Sidhu PK. 2009.** Pharmacokinetics, urinary excretion and plasma protein binding of danofloxacin following intravenous administration in buffalo calves (*Bubalus bubalis*). *Vet Res Commun* 33: 659-667. doi: 10.1007/s11259-009-9215-6
20. **Shem-Tov M, Ziv G, Glickman A, Saran A. 1997.** Pharmacokinetic and penetration of danofloxacin from the blood into the milk of ewes. *Vet Res* 28: 571-579. doi: 10.1046/j.1365-2885.1998.00137.x
21. **Shojaee Aliabadi F, Lees P. 2003.** Pharmacokinetic-pharmacodynamic integration of danofloxacin in the calf. *Res Vet Sci* 74: 247-259. doi: 10.1016/S0034-5288(03)00005-5