

**Valutazione della biodisponibilità di ossitetraciclina
microincapsulata a seguito di somministrazione orale
singola e protratta nella trota fario (*Salmo trutta trutta*)
e nel branzino (*Dicentrarchus labrax*)**

*Bioavailability of microencapsulated oxytetracycline in the
brown trout (*Salmo trutta trutta*) and seabass (*Dicentrarchus
labrax*) after single and multiple oral administration*

Giorgia della Rocca*, Alessandra Di Salvo, José Malvisi

Dipartimento di Tecnologie e Biotecnologie delle Produzioni Animali, Sezione di Farmacologia
e Tossicologia Veterinaria, Università di Perugia. Via S. Costanzo 4, 06126 Perugia, Italy.

RIASSUNTO - Nell'ottica di migliorare l'assorbimento orale dell'ossitetraciclina (OTC) nelle specie ittiche, e nell'ambito di una ricerca durante la quale sono già stati saggiati vari tipi di microincapsulazione del farmaco (acidi grassi saturi e insaturi, polimeri dell'amido, della pectina e dell'alginato), una nuova formulazione a base di OTC incapsulata in polisaccaridi naturali (OTC test) è stata saggiata nella trota fario (*Salmo trutta trutta*) e nel branzino (*Dicentrarchus labrax*) sia a seguito di somministrazione singola che protratta per 5 giorni, in comparazione con la formulazione a base di OTC presente in commercio (OTC di riferimento). Un mangime medicato contenente 4,5 e 7,5 g/kg di OTC, rispettivamente per la formulazione test e per quella di riferimento, è stato somministrato a 260 trote e altrettanti branzini in ragione dell'1% della biomassa. Campioni di sangue sono stati prelevati a scadenze sperimentali prefissate e i sieri ottenuti sono stati stoccati a -20° C fino al momento dell'analisi quantitativa, eseguita con metodica HPLC dopo purificazione SPE. Nella trota fario, dopo somministrazione singola il valore di AUC della formulazione di riferimento è risultato inferiore a quello della formulazione test: 11,84 contro 13,40 (µg/ml)h; viceversa, dopo somministrazione protratta l'AUC del formulato test è risultata inferiore a quella ottenuta con il formulato di riferimento: 75,28 contro 79,50 (µg/ml)h. Nel branzino la formulazione di riferimento ha presentato valori di AUC maggiori di quelli ottenuti con OTC test sia dopo somministrazione singola, 34,11 contro 25,95 (µg/ml)h, che dopo somministrazione protratta, 57,53 contro 41,59 (µg/ml)h. Tenendo conto che la formulazione test presentava un titolo inferiore di OTC rispetto a quella di riferimento, il calcolo delle biodisponibilità relative nelle due prove è risultato pari rispettivamente a 187 e 156% nella trota fario e a 126 e 122% nel branzino, evidenziando un notevole miglioramento nell'assorbimento orale di OTC con il nuovo microincapsulato saggiato.

SUMMARY - To improve the oral absorption of oxytetracycline (OTC) in fish, some researches was already undertaken including the drug in several matrices (saturated and unsaturated fatty acids, starch, pectine and alginate) without satisfying results. The aim of this research was to assess a new formulation encapsulated in etheroglycosides (OTC test) in brown trout (*Salmo trutta trutta*) and seabass (*Dicentrarchus labrax*) after single and repeated administrations, compared with the commercial formulation (OTC reference). Two hundred and sixty brown trout and seabass were used both in single and repeated administration. Medicated feed containing 4.5 g/kg of OTC test or 7.5 g/kg of OTC reference product were given to fish at the rate of 1% biomass. Blood samples were collected at scheduled times and serum was stored at -20° C until analysis performed by HPLC after solid-phase extraction. In brown trout after single administration the value of AUC of the reference formulation was lower than the corresponding one of the test product: 11.84 vs 13.40 (µg/ml)h; the opposite occurred after repeated administrations: 75.28 and 79.50 (µg/ml)h respectively for OTC test and OTC reference. In seabass the reference oxytetracycline showed the greatest AUCs values both after single and repeated administration: 34.11 and 57.53 (µg/ml)h vs 25.95 and 41.59 (µg/ml)h. The relative bioavailabilities, rectified by the concentrations in the diet were 187 and 156 % in brown trout and 126 and 122 % in seabass, attesting for a better absorption of the test product.

Key words: Oxytetracycline; Brown trout; Seabass; Bioavailabilities; Microencapsulation.

* Corresponding Author: c/o Dipartimento di Tecnologie e Biotecnologie delle Produzioni Animali, Sezione di Farmacologia e Tossicologia Veterinaria, Università di Perugia. Via S. Costanzo, 4 - 06126 Perugia, Italy. Tel.: 075-5857605; Fax: 075-5857611; E-mail gdr@unipg.it.

INTRODUZIONE

La terapia antibatterica nelle patologie dell'allevamento ittico è legalmente consentita solo attraverso l'impiego di mangimi medicati. Rispetto agli omeotermi gli animali eterotermi sono notoriamente caratterizzati da scarso assorbimento dei farmaci somministrati per via orale con il mangime e da una rilevante variabilità soggettiva nell'assunzione dell'alimento riconducibile a ciò che appare come una "organizzazione gerarchica" all'interno delle vasche d'allevamento. Tutto ciò comporta la necessità di impiegare dosaggi elevati che esitano in una maggiore dispersione nell'ambiente con conseguenti possibili ripercussioni sull'ecosistema e nell'instaurarsi di fenomeni di farmacoresistenza (Cravedi *et al.*, 1987; Björklund & Bylund, 1991; Rogstad *et al.*, 1991; Nouws *et al.*, 1992; Elema *et al.*, 1996).

La biodisponibilità orale di un farmaco può essere migliorata con approcci differenti che coinvolgono la formulazione del medicamento. Il tipo di salificazione, ad esempio, può rendere un farmaco più assorbibile, come dimostrato dal sale sodico della sulfadimetossina che nella trota, alla dose univoca di 20 mg/kg p.c., presenta una biodisponibilità pressoché doppia rispetto alla forma base (63% vs. 34%; Kleinov & Lech, 1988). Il processo di micronizzazione dell'acido ossolinico, che ha consentito di ottenere particelle di 1 µm di diametro rispetto ai 6,4 µm del formulato standard, ne ha comportato una biodisponibilità 1,7 volte superiore a quella iniziale (Endo, 1992).

Anche l'inclusione del farmaco in matrici diverse rientra fra le metodologie applicabili per ottenere un miglioramento della biodisponibilità. In precedenti ricerche (della Rocca *et al.*, 1999) volte a migliorare la biodisponibilità orale dell'ossitetraciclina (OTC) e condotte con matrici quali acidi grassi saturi, polimeri dell'amido, della pectina, dell'alginato e polisaccaridi naturali ionici e neutri, si era evidenziata una certa potenzialità delle matrici polisaccaridiche rispetto alle altre matrici.

Per questo motivo si è voluto proseguire su questa linea saggiando una nuova formulazione di OTC microincapsulata in eteroglicosidi naturali (OTC test), comparandola con quella presente in commercio (OTC di riferimento).

MATERIALI E METODI

Per la microincapsulazione dell'ossitetraciclina sono state saggiate diverse matrici, valutando di ciascuna l'entità di cessione del farmaco in soluzione acquosa a pH 6,8 e prelevando a intervalli di tempo regolari aliquote di soluzione per quantificare il rilascio di OTC. Al termine delle prove è stata scelta una matrice a base di eteroglicosidi, che assicurava la cessione ottimale, le microcapsule sono state preparate con il metodo della dispersione ed estrusione/gelificazione e aventi un contenuto di OTC pari al 31% (w/w).

Le prove sulla trota fario sono state condotte nell'allevamento dell'Ente Tutela Pesca (Flambro, UD); quelle sul branzino hanno avuto luogo presso l'Azienda Valle Zoppas (Carlino, UD).

L'allestimento del mangime medicato è stato effettuato dalla Ditta Hendrix S.p.A. (Mozzecane, VR) utilizzando il classico mangime non medicato per trote e branzini (51% farina di pesce, 15% farina di soia e per il rimanente da farina di frumento, lecitine e olio di pesce) somministrato sia nella fase precedente che in quella successiva al trattamento. Il mangime medicato con ossitetraciclina microincapsulata è stato realizzato con la tecnica del "coating" mentre per il formulato non microincapsulato è stato impiegato un medicato del commercio fornito dalla Ditta stessa. L'analisi quantitativa del contenuto di farmaco nel mangime, effettuata con metodica HPLC, ha fornito i seguenti valori: 4,5 g/kg per la forma microincapsulata (OTC test) e 7,5 g/kg per il farmaco tal quale (OTC riferimento);

considerando che il mangime era dispensato in ragione dell'1% della biomassa, le dosi nominali assunte erano pari a 45 e 75 mg/kg, rispettivamente.

Cinquecentoventi trote fario ed altrettanti branzini sono stati divisi in gruppi e stabulati in vasche separate, alle condizioni sperimentali descritte in Tabella 1. Dopo un periodo di una settimana di acclimatazione e tre giorni di digiuno gli animali sono stati sottoposti a trattamento secondo lo schema indicato in Tabella 2.

	Trote fario	Branzini
N° animali	520	520
Peso medio g.	240	200
Temperatura (° C)	12±1	20±2
O₂ disciolto (ppm)	9±0,5	8-10
Salinità (‰)	---	30±1

Tabella 1 - Condizioni sperimentali.
Table 1 - Experimental conditions.

Molecola	Specie	Gruppo I	Gruppo II	Gruppo III	Gruppo IV
OTC	Trota fario	OTC T singola	OTC R singola	OTC T ripetuta (5gg)	OTC R ripetuta (5gg)
	N° animali	130	130	130	130
	Branzino	OTC T singola	OTC R singola	OTC T ripetuta (5gg)	OTC R ripetuta (5gg)
	N° animali	130	130	130	130

Legenda: OTC: ossitetraciclina; T: formulazione test; R: formulazione di riferimento; n.: numero di animali

Tabella 2 - Gruppi sperimentali.
Table 2 - Experimental groups.

A ciascuna delle scadenze sperimentali riportate in tabella 3, da 10 soggetti preventivamente sedati con tricainametansulfonato (MS-222) sono stati prelevati campioni di sangue dalla vena caudale mediante inserzione dell'ago della siringa dietro la pinna caudale fino a raggiungere la vena stessa. Previa rimozione dell'ago dalla siringa, i campioni di sangue sono stati introdotti per decantazione in provette non eparinizzate, lasciati sierare a temperatura ambiente e centrifugati a 1.500 g. I campioni di siero raccolti sono stati conservati a -20° C fino al momento dell'analisi.

Somministrazione singola: 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 24, 36, 48, 60, 84 e 108 h dopo il trattamento
Somministrazione protratta: 12, 24, 36, 48, 60, 72, 84, 96, 108, 120, 132, 144 e 156 h dall'inizio del trattamento

Tabella 3 - Tempi di prelievo.
Table 3 - Sample times.

Le concentrazioni sieriche di OTC sono state determinate con metodica HPLC previa diluizione ed estrazione in fase solida dei campioni (della Rocca *et al.*, 1999). Il limite di quantificazione (LOQ) e di determinazione (LOD), l'accuratezza, il coefficiente di variazione "interday" e di regressione lineare della metodica analitica sono riportati in tabella 4.

CAMPIONE	LOD	LOQ	Concentrazioni	Accuratezza (%)	Interday c.v. (%)	R ²
SIERO TROTA FARIO	0,025 (µg/ml)	0,05 (µg/mL)	0,05 (µg/mL)(n=4)	108,68	7,985	0,9992
			0,1 (µg/mL) (n=4)	103,09	8,242	
			0,5 (µg/mL) (n=5)	95,85	3,999	
			1 (µg/mL) (n=5)	100,52	4,335	
SIERO BRANZINO	0,025 (µg/ml)	0,05 (µg/mg)	0,05 (µg/mL) (n=3)	115,57	7,592	0,9986
			0,1 (µg/mL) (n=3)	106,25	6,547	
			0,5 (µg/mL) (n=4)	95,07	6,289	
			1 (µg/mL) (n=4)	101,04	1,332	

Tabella 4 - Limiti di quantificazione (LOQ), determinazione (LOD), accuratezza, coefficiente di variazione "interday" e coefficiente di correlazione della metodica analitica.

Table 4 - Limits of quantification (LOQ) and of determination (LOD), accuracy, inter-day coefficients of variation and square of the correlation coefficient (R²) of the analytical method.

Il calcolo dell'area sotto la curva (AUC) è stato effettuato applicando la regola dei trapezoidi (Trapezoidal & Simson's Rules - Pharmacologic Calculation System – Version 4.0 – 1999), mentre la biodisponibilità relativa (F_{rel}) è stata calcolata secondo la seguente formula:

$$F_{rel} = 100 * AUC_{test} * dose_{reference} / AUC_{reference} * dose_{test}$$

RISULTATI

L'andamento delle concentrazioni sieriche medie nella trota fario e le AUC relative a OTC test e OTC di riferimento dopo trattamento singolo e protratto sono visualizzate rispettivamente nelle Figure 1 e 2. La discussione dei risultati è limitata in un primo tempo agli aspetti cinetici visualizzati nei grafici senza tener conto della variazione di concentrazioni nei mangimi medicati.

La rappresentazione grafica dei livelli di OTC nel siero in funzione del tempo, ottenute per somministrazione singola nella trota fario mostra un più rapido raggiungimento della concentrazione picco dalla formulazione microincapsulata (8 ore contro le 10 ore necessarie al prodotto di riferimento). Le ipotesi che si possono formulare per tentare di interpretare questi risultati si basano sulla: 1) diversa modalità di preparazione del mangime medicato: mentre il farmaco tal quale, incluso nel pellet necessita di disgregazione, il formulato microincapsulato, adeso sulla superficie, è più disponibile per l'assorbimento, come viene confermato anche dal trattamento ripetuto; 2) maggiore palatabilità che ne consente un'assunzione maggiore.

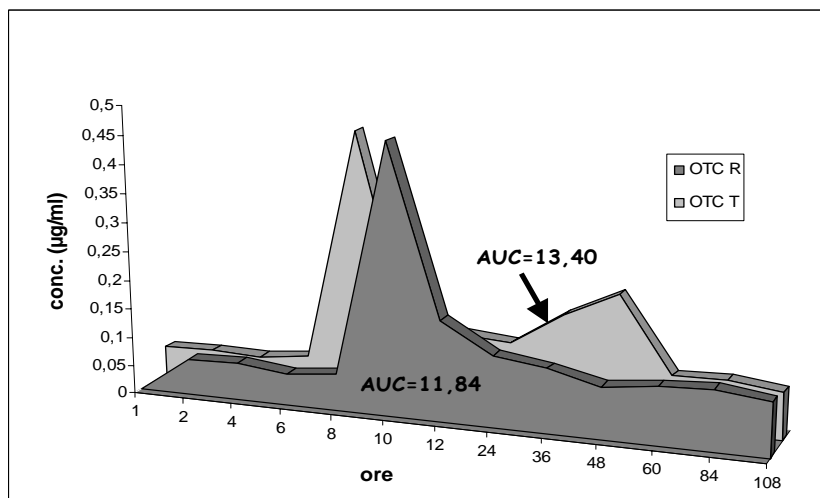


Figura 1 - Andamento delle concentrazioni sieriche medie e AUC relative a OTC test (OTC T) e di riferimento (OTC R) nella trota fario dopo somministrazione singola.

Figure 1 - Plot of serum concentrations and AUC of test (OTC T) and reference (OTC R) OTC in brown trout after single administration.

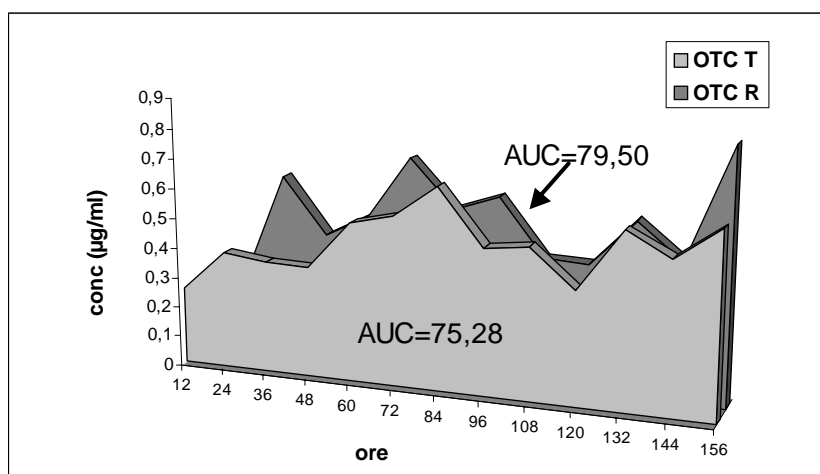


Figura 2 - Andamento delle concentrazioni sieriche e AUC relative a OTC test (OTC T) e di riferimento (OTC R) nella trota fario dopo somministrazione protratta.

Figure 2 - Plot of serum concentrations and AUC of test (OTC T) and reference (OTC R) OTC in brown trout after multiple administration.

Il calcolo dell'area sotto la curva concentrazione-tempo (AUC) ha fornito un valore più elevato per la formulazione test rispetto a quella di riferimento (13,40 contro 11,84 µg/ml/h) nella somministrazione singola risultando, viceversa, inferiore a quella ottenuta con il

formulato di riferimento (75,28 µg/ml/h contro 79,50 µg/ml/h) nella somministrazione ripetuta.

L'andamento delle concentrazioni sieriche e le AUC relative ad OTC test ed OTC di riferimento nel branzino dopo trattamento singolo e trattamento protratto sono visualizzate rispettivamente nelle Figure 3 e 4.

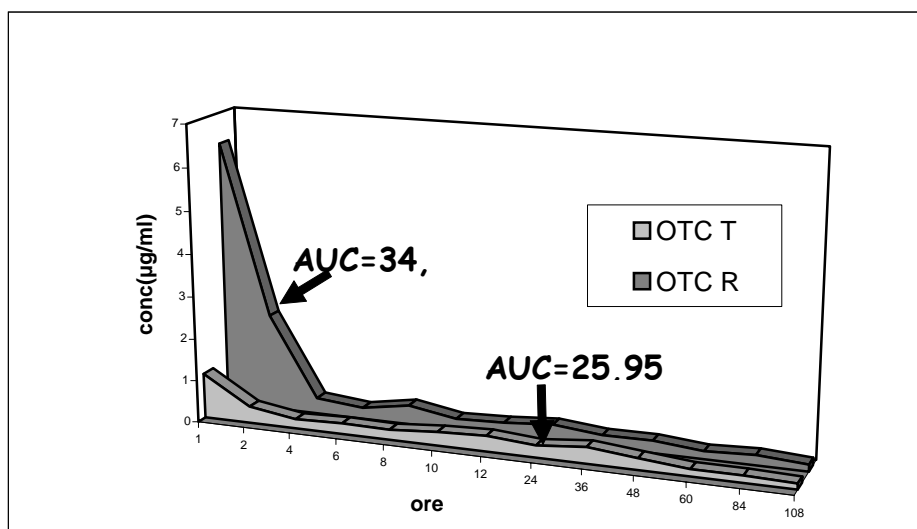


Figura 3 - Andamento delle concentrazioni sieriche e AUC relative a OTC test (OTC T) e di riferimento (OTC R) nel branzino dopo somministrazione singola.

Figure 3 - Plot of serum concentrations and AUC of test (OTC T) and reference (OTC R) OTC in seabass after single administration.

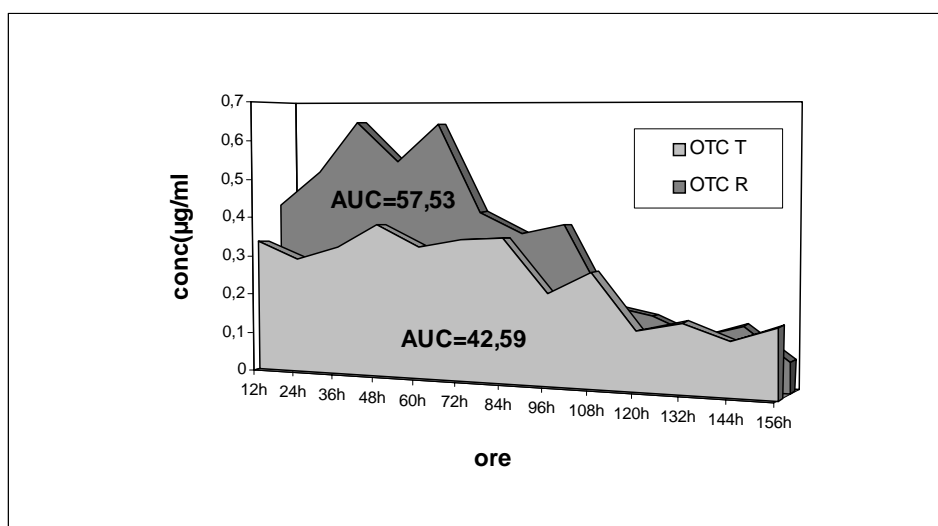


Figura 4 - Andamento delle concentrazioni sieriche e AUC relative a OTC test (OTC T) e di riferimento (OTC R) nel branzino dopo somministrazione protratta.

Figure 4 - Plot of serum concentrations and AUC of test (OTC T) and reference (OTC R) OTC in seabass after multiple administration.

Il comportamento cinetico dell'ossitetraciclina nel branzino mette in evidenza, in contrapposizione con la trota fario, un maggiore assorbimento dal mangime medicato commerciale in entrambe le prove.

Dalla somministrazione singola non emergono differenze sostanziali sotto il profilo temporale nella cinetica dei due prodotti ottenendo la massima concentrazione da entrambe le formulazioni entro un'ora dalla somministrazione, molto prima di quanto è avvenuto nella trota fario, probabilmente a causa della maggior voracità del branzino. Tuttavia, sotto il profilo quantitativo si configura una rapida e rilevante eliminazione del farmaco dal mangime del commercio per portarsi a concentrazioni di poco superiori a quelle ottenute con l'impiego del farmaco microincapsulato.

La somministrazione protratta delinea un andamento più costante e uniforme delle concentrazioni sieriche dell'OTC microincapsulata, rispetto all'OTC di riferimento, in particolare nelle prime 84 ore di trattamento.

Nel branzino la formulazione di riferimento ha fornito valori di AUC superiori a quelli ottenuti con OTC microincapsulata sia per somministrazione singola (34,11 contro 25,95 ($\mu\text{g/ml}$)h) che protratta (57,53 contro 42,59 ($\mu\text{g/ml}$)h).

Ad una prima osservazione dei dati rappresentati graficamente non è facile apprezzare se la microincapsulazione abbia raggiunto lo scopo proposto. Anche l'analisi della varianza (ANOVA) in cui è stato fatto il confronto simultaneo tra le medie dei due gruppi sottoposti a trattamento con il formulato test e di riferimento, non ha evidenziato differenze significative tranne che tra i trattamenti singoli del branzino; tuttavia, tenendo conto che la formulazione test presentava un titolo inferiore in OTC rispetto a quella di riferimento (4,5 g/kg contro 7,5 g/kg), dal calcolo delle biodisponibilità relative ottenute nelle due prove si apprezza un miglioramento nell'assorbimento della formulazione microincapsulata. Nella trota fario infatti la biodisponibilità relativa del formulato test è 187% (somministrazione singola) e 156% (somministrazione protratta), e nel branzino 126% (somministrazione singola) e 122% (somministrazione protratta).

Relativamente alla biodisponibilità specie-specifica, assume particolare significato il volume di distribuzione, calcolato sulle concentrazioni ottenute dopo somministrazione protratta del farmaco microincapsulato nel branzino

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

La presente ricerca rappresenta il quarto tentativo effettuato nell'ottica di migliorare la biodisponibilità dell'ossitetraciclina nelle specie ittiche. In una prima prova era stata saggiata OTC microincapsulata in acidi grassi saturi e insaturi, in una seconda prova erano state utilizzate tre nuove formulazioni a base rispettivamente di polimeri dell'amido, della pectina e dell'alginato e in una terza prova erano stati introdotti due nuovi tipi di incapsulazione (in polisaccaridi e in acidi grassi saturi e insaturi). In tutte e tre le prove, condotte nell'orata (*Sparus aurata*), il confronto era stato effettuato con l'antibiotico non incapsulato (mangime medicato del commercio). I risultati relativi alle prime due prove avevano consentito di delineare che soltanto l'OTC microincapsulata in acidi grassi e quella inclusa in polimeri dell'amido presentavano un assorbimento apprezzabile dal tratto G.I. delle orate; tuttavia, in entrambi i casi la biodisponibilità del farmaco microincapsulato risultava essere nettamente inferiore a quella dell'ossitetraciclina non microincapsulata. Circa la terza prova nonostante non si sia giunti ad un netto miglioramento della biodisponibilità, la concentrazione reale del farmaco microincapsulato in polisaccaridi titolata nel mangime, di un 22% inferiore a quella del commercio, ha fornito un valore di biodisponibilità del tutto sovrapponibile (91%). Sulla

base di questo risultato si è ritenuto pertanto interessante proseguire la ricerca (della Rocca *et al.*, 1999).

La presente ricerca ha invece fornito risultati decisamente incoraggianti: la nuova formulazione ha infatti determinato un aumento della biodisponibilità sia dopo somministrazione singola che dopo trattamento protratto per cinque giorni, ancorché nel branzino tale incremento sia risultato inferiore a quello ottenuto nella trota fario.

Relativamente alla biodisponibilità specie-specifica, assume particolare significato il volume di distribuzione calcolato sulle concentrazioni ottenute dopo somministrazione protratta del farmaco microincapsulato nel branzino. E' noto infatti che la caratteristica dell'ossitetraciclina di chelare ioni bivalenti si rende responsabile di un assorbimento assai minore nei pesci di acqua salata rispetto a quelli di acqua dolce. Sotto questo punto di vista, la somministrazione protratta nel branzino dimostra che la microincapsulazione, oltre a rendere più appetibile il mangime medicato in quanto maschera il sapore amaro del farmaco, consente una minore chelazione e, di conseguenza, un maggiore assorbimento.

Ulteriori studi si rendono tuttavia necessari al fine di migliorare ulteriormente i sistemi di rilascio e di valutare l'efficacia in campo di OTC microincapsulata. Migliorando l'assorbimento dell'OTC, ne conseguirebbe infatti una riduzione delle dosi necessarie, con indubbi vantaggi economici e ambientali.

BIBLIOGRAFIA

Björklund H.V. & Bylund G. (1991). Comparative pharmacokinetics and bioavailability of oxolinic acid and oxytetracycline in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Xenobiotica*, 21: 1511-1520.

Cravedi J.P., Chaubert G. & Delous G. (1987). Digestibility of chloramphenicol, oxolinic acid and oxytetracycline in rainbow trout and influence of these antibiotics on lipid digestibility. *Aquaculture*, 60: 133-141.

della Rocca G., Di Salvo A., Zaghi M., Magni A., Zanchetta S. & Malvisi J. (1999). Prove di biodisponibilità di diverse formulazioni microincapsulate di ossitetraciclina nell'orata (*Sparus aurata*). *Boll. Soc. It. Patol. Ittica*, 27: 35-44.

Elema M., Hoff K.A. & Kristensen H.G. (1996). Bioavailability of oxytetracycline from medicated feed administered to Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) in seawater. *Aquaculture*, 143: 7-14.

Endo T. (1992). Pharmacokinetics of chemotherapeutants in fish and shellfish. In: "Chemotherapy in Aquaculture: from theory to reality". Michel C.M. & Alderman D.J. Eds., *Symposium O.I.E., Paris, 12-15 march 1991*: 404-418.

Kleinov K.M. & Lech J.J. (1988). A review of the pharmacokinetics and metabolism of sulfadimetoxine in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Vet. Hum. Toxicol.*, 30: 25-30.

Nouws J.F.M., Grondel J.L., Boon J.H. & van Ginneken V.J.T. (1992). Pharmacokinetics of antimicrobials in some fresh water fish species. In: "Chemotherapy in Aquaculture: from theory to reality". Michel C.M. & Alderman D.J. Eds., *Symposium O.I.E., Paris, 12-15 march 1991*: 437-447.

Rogstad A., Hormazabal V., Ellingsen O.F. & Rasmussen K.E. (1991). Pharmacokinetics of oxytetracycline in fish: 1. Absorption, distribution and accumulation in rainbow trout in freshwater. *Aquaculture*, 96: 219-226.