

## UNIÓN DE LA AMOXICILINA Y EL ÁCIDO CLAVULÁNICO A LAS PROTEÍNAS PLASMÁTICAS DE LA PALOMA (*COLUMBA LIVIA*) Y LA GALLINA (*GALLUS GALLUS*)

### Protein binding of Amoxycillin and Clavulanic acid in pigeons (*Columba livia*) and chickens (*Gallus gallus*)

Cárceles, C. M.<sup>1</sup>; Sanjuán, M. A.<sup>1</sup>; López, M. C.<sup>1</sup>; Carrizosa, J.<sup>2</sup>; Serrano, J. M.<sup>3</sup>

1 Dpto. Ciencias Sociosanitarias. Universidad de Murcia.

2 Estación de Mejora Ganadera. Murcia.

3 Dpto. Farmacología y Toxicología. Universidad de Córdoba.

Recibido: 21 junio 1989  
Aceptado: 15 noviembre 1989

#### RESUMEN

Se ha estudiado la unión de la amoxicilina y del ácido clavulánico a las proteínas plasmáticas de la gallina y de la paloma utilizando el método de la diálisis en el equilibrio. La determinación de ambos productos en el plasma se realizó mediante el método de FOULSTONE y READING (1982).

La amoxicilina presenta un porcentaje de unión medio a las proteínas plasmáticas de la paloma de 14'64% y de 16'36% a las de la gallina. Estos valores para el ácido clavulánico son de 28'62% y de 31'70% respectivamente.

*Palabras clave:* Ácido clavulánico, amoxicilina, gallina, paloma, unión a proteínas.

#### SUMMARY

The binding of clavulanic acid and amoxycillin to plasmatic proteins in hen and pigeon has been studied by equilibrium dialysis. Both substances were determined according to FOULSTONE and READING (1982).

Amoxycillin has an average percentage of union to plasmatic proteins of pigeon of 14.64% and 16.36% in hen. These values for clavulanic acid are 28.62% and 31.70% respectively.

*Key Words:* Clavulanic acid, amoxycillin, hen, pigeon, protein-binding.

## INTRODUCCIÓN

La amoxicilina es una penicilina semisintética perteneciente al grupo de las aminopenicilinas. Estructuralmente presenta un grupo hidroxilo en posición para (NEU, 1979) que le permite una buena absorción digestiva tras su administración oral (WEBER et al., 1986).

El espectro antibacteriano de la amoxicilina es amplio, incluyendo a numerosos gérmenes Gram - (NEU, 1979; WEBER et al., 1986). Sin embargo presenta el grave inconveniente de ser un antibiótico penicilinas sensible, por lo que resulta inactivado por la acción de las  $\beta$ -lactamasas bacterianas (SYKES y MATTHEW, 1976; GRIECO, 1982; ROLINON, 1986; SUBIRON y TORRELLAS, 1988).

El ácido clavulánico es una sustancia natural, producida por una cepa de *Streptomyces clavuligerus* (ROLINSON, 1982), que posee un anillo  $\beta$ -lactámico. La importancia de esta molécula radica en que se comporta como un inhibidor de numerosas  $\beta$ -lactamasas, como las producidas por *Stafilococcus aureus* y las  $\beta$ -lactamasas de microorganismos Gram - de las clases II a IV de Richmond (FARMER y READING, 1982; READING, 1982; READING et al., 1983).

La inactivación de las  $\beta$ -lactamasas que ocasiona el ácido clavulánico protege a cualquier penicilina presente y permite que ejerza su actividad normal bactericida (BROGDEN et al., 1981; WEBER et al., 1986). En la práctica terapéutica se ha seleccionado a la amoxicilina como antibiótico de elección para combinarse con el ácido clavulánico (MARTÍN y GONZÁLEZ, 1988). En Medicina Veterinaria se está introduciendo la combinación amoxicilina-ácido clavulánico en la proporción 4:1, existiendo algunos trabajos que suministran información favorable sobre su eficacia (COOPER, 1985; SENIOR et al., 1985; BEECHAM ANIMAL HEALTH, 1987).

Los fármacos son transportados en la sangre circulante mediante diversos procedimientos.

Algunos se disuelven en el agua plasmática y otros, la mayoría, se asocian parcialmente con las proteínas plasmáticas. Esta unión es reversible y está en equilibrio con la forma no fijada o fármaco libre.

En el presente trabajo se aborda el estudio de la unión de ambos fármacos a las proteínas plasmáticas de la paloma y de la gallina por separado, con el fin de establecer los porcentajes medios de unión correspondientes, para abordar en trabajos posteriores el estudio de la interacción de ambos productos sobre las proteínas plasmáticas de ambas especies (es decir, en la utilización conjunta de ambos productos a la proporción utilizada en clínica).

## MATERIAL Y MÉTODOS

Se ha empleado la técnica de diálisis en el equilibrio utilizando membrana de celofán Wisking Dyalisis Tubing 8/32, de 6 mm de diámetro y 50  $\mu$ m de anchura de pared, sirve para la elaboración de las bolsas.

La preparación de las mismas se realizó según el método de RUDMAN y KENDALL (1957) modificado por SERRANO et al. (1984). El proceso de diálisis se realizó en oscuridad y a temperatura ambiente durante 24 h. Las concentraciones de amoxicilina y clavulánico (productos cedidos por los laboratorios Antibióticos S.A.) se determinaron en el interior de las bolsas de plasma y en los tampones externos de todas las series mediante cromatografía líquida de alta presión (HPLC) según el método preconizado por FOULSTONE y READING (1982), que tiene una sensibilidad máxima de 0'1  $\mu$ g/ml a 0'1 AUSF, en un sistema HPLC Water compuesto por un controlador programable mod. 721, un módulo de datos mod. 730, un detector Lambda-Max LS 481, dos bombas mod. 510 y un inyector mod. U6K.

Para llevar a cabo el estudio de la unión de la amoxicilina a las proteínas plasmáticas de la paloma y de la gallina, se procedió a realizar 13

series a las siguientes concentraciones: 51'170, 40'205, 29'240, 18'275, 7'310, 5'482, 3'655 y 1'827 mg/l, a un pH de 7'4. A cada serie se le asignó un blanco sin amoxicilina. Tres de dichas series se utilizaron para obtener la recta de calibrado, cinco para realizar el estudio de la unión del antibiótico a las proteínas plasmáticas de la paloma y las cinco restantes se utilizaron para realizar el estudio de la unión de la amoxicilina a las proteínas plasmáticas de la gallina.

Para el mismo estudio con el ácido clavulánico se procedió de idéntica manera pero realizando las 13 series a las siguientes concentraciones: 33'180, 26'070, 18'960, 11'850, 4'470, 3'555, 2'370 y 1'185 mg/l. Los plasmas utilizados fueron una mezcla de los obtenidos de la sangre de 10 palomas y de 2 gallinas procedentes de una explotación comercial. Todos los animales estaban sanos y se sometieron a un ayuno de 12 h. A los plasmas de ambas especies se les determinó la proteinemia por el método descrito por ALLEN et al. (1977) utilizando el reactivo de biuret.

Como pruebas estadísticas se han utilizado métodos no paramétricos para analizar dos gru-

pos mediante valores apareados, concretamente el test de "Mann-Whitney".

## RESULTADOS

En el Cuadro 1 se muestran los resultados referidos al estudio de la unión de la amoxicilina a las proteínas plasmáticas de la paloma. En el Cuadro 2 aparecen los resultados del estudio similar a las proteínas plasmáticas de la gallina.

En los Cuadros 3 y 4 se reflejan los datos correspondientes al estudio de la unión del ácido clavulánico a las proteínas plasmáticas de la paloma y de la gallina respectivamente. En todos los cuadros anteriores se indican los valores medios de concentración de fármaco en el interior de las bolsas de diálisis y en los tampones externos, así como las diferencias entre ambos (concentraciones totales, libres y conjugadas respectivamente) y los porcentajes de unión.

Por último, en el Cuadro 5 se indican los valores de "capacidad de fijación" (n) y de las constantes de asociación aparentes (Ka) para ambos productos y ambos tipos de plasma.

CUADRO I  
VALORES MEDIOS DE CONCENTRACIÓN DE AMOXICILINA (EN MG/L) LIBRE, TOTAL Y UNIDA, Y PORCENTAJES DE UNIÓN A LAS PROTEÍNAS PLASMÁTICAS DE PALOMA

CONCENTRACIÓN			
TOTAL (X ± S.D.)mg/l	LIBRE (X ± S.D.)mg/l	UNIDA mg/l	% unión
54'93 (± 3'50)	48'29 (± 3'52)	6'74	12'27
42'47 (± 3'75)	37'16 (± 2'44)	5'31	12'50
29'96 (± 2'94)	26'07 (± 3'28)	3'89	12'98
18'04 (± 2'01)	15'64 (± 2'78)	2'40	13'33
6'79 (± 1'00)	5'83 (± 2'12)	0'96	14'15
5'21 (± 0'76)	4'35 (± 0'90)	0'86	16'50
3'39 (± 0'67)	2'81 (± 0'49)	0'58	17'01
1'69 (± 0'53)	1'38 (± 0'41)	0'31	18'36

CUADRO 2  
VALORES MEDIOS DE CONCENTRACIÓN DE AMOXICILINA (EN MG/L) LIBRE, TOTAL Y UNIDA, Y PORCENTAJES DE UNIÓN A LAS PROTEÍNAS PLASMÁTICAS DE GALLINA

CONCENTRACIÓN			
TOTAL (X ± S.D.) mg/l	LIBRE (X ± S.D.)mg/l	UNIDA mg/l	% unión
57'03 (± 5'26)	49'09 (± 4'88)	7'86	13'79
44'44 (± 3'83)	38'08 (± 3'34)	6'36	14'30
31'53 (± 6'10)	26'97 (± 3'24)	4'55	14'44
19'12 (± 3'32)	16'25 (± 2'83)	2'87	15'00
7'54 (± 1'17)	6'37 (± 2'12)	1'17	15'47
5'64 (± 1'18)	4'62 (± 1'36)	1'02	18'16
3'74 (± 0'72)	3'00 (± 0'53)	0'73	19'62
1'84 (± 0'61)	1'47 (± 0'33)	0'37	20'09

CUADRO 3  
VALORES MEDIOS DE CONCENTRACIÓN DE ÁCIDO CLAVULÁNICO (EN MG/L) LIBRE, TOTAL Y UNIDO, Y PORCENTAJES DE UNIÓN A LAS PROTEÍNAS PLASMÁTICAS DE PALOMA

CONCENTRACIÓN			
TOTAL (X ± S.D.) mg/l	LIBRE (X ± S.D.)mg/l	UNIDA mg/l	% unión
40'18 (± 4'63)	30'07 (± 2'14)	10'11	25'16
30'52 (± 3'30)	22'98 (± 2'80)	7'54	24'71
21'66 (± 2'40)	16'12 (± 3'14)	5'53	25'54
13'69 (± 2'15)	10'11 (± 1'99)	3'58	26'18
5'43 (± 1'92)	3'89 (± 0'42)	1'54	28'32
4'11 (± 1'73)	2'86 (± 0'50)	1'25	30'48
2'67 (± 0'66)	1'79 (± 0'33)	0'87	32'80
1'35 (± 0'35)	0'87 (± 0'20)	0'48	35'65

CUADRO 4  
VALORES MEDIOS DE CONCENTRACIÓN DE ÁCIDO CLAVULÁNICO (EN MG/L) LIBRE, TOTAL Y UNIDA, Y PORCENTAJES DE UNIÓN A LAS PROTEÍNAS PLASMÁTICAS DE GALLINA

CONCENTRACIÓN			
TOTAL (X ± S.D.)mg/l	LIBRE (X ± S.D.)mg/l	UNIDA mg/l	% unión
41'58 (± 3'86)	30'25 (± 3'07)	11'33	27'26
32'10 (± 4'75)	23'14 (± 2'68)	8'95	27'90
23'43 (± 2'57)	16'72 (± 2'58)	6'71	28'65
14'40 (± 1'82)	10'20 (± 1'92)	4'20	29'15
5'77 (± 1'90)	3'97 (± 0'70)	1'80	31'27
4'31 (± 0'95)	2'85 (± 0'58)	1'46	33'82
2'91 (± 0'22)	1'84 (± 0'43)	1'07	36'76
1'47 (± 0'29)	0'90 (± 0'27)	0'57	38'79

CUADRO 5  
VALORES DE "CAPACIDAD DE FIJACIÓN" (N), EN MG/G, Y DE CONSTANTE APARENTE DE ASOCIACIÓN (KA), EN MG<sup>-1</sup>, OBTENIDOS MEDIANTE LA ECUACIÓN DE KRÜGER-THIEMER PARA LA AMOXICILINA Y EL ÁCIDO CLAVULÁNICO RESPECTO A LAS PROTEÍNAS DE PALOMA Y GALLINA. APARECEN LOS COEFICIENTES DE REGRESIÓN OBTENIDOS (R) Y LOS NIVELES DE SIGNIFICACIÓN (P)

AMOXICILINA				ÁC. CLAVULÁNICO			
Paloma		Gallina		Paloma		Gallina	
n	Ka	n	Ka	n	Ka	n	Ka
0'776	0'012	0'542	0'011	0'913	0'020	0'597	0'022
r = 0'88		0'84		0'84		0'87	
p < 0'01		0'01		0'01		0'01	

## DISCUSIÓN

Los porcentajes de recuperación de amoxicilina obtenidos en los ensayos realizados con plasma de paloma oscilan entre el 78'51% y el 95'99% ( $X \pm S.D. = 86'58\% \pm 6'40$ ), por lo que tan sólo se pierde aproximadamente una media de menos del 14% del producto al interaccionar con las paredes de la bolsa de diálisis. En los ensayos realizados con plasma de gallina los porcentajes de recuperación oscilan entre el 82'41% y el 97'61% ( $X \pm S.D. = 89'72\% \pm 5'48$ ), lo que indica que menos del 11% de amoxicilina se une a las paredes de la bolsa de diálisis. Esto induce a pensar que el plasma de gallina es capaz de fijar mayor cantidad de fármaco que el de paloma; lo que se ve apoyado por las cifras de proteinemia que se han encontrado en este estudio: 4'75 g/ml  $\pm$  0'41 para la gallina y 2'45 g/ml  $\pm$  0'23 para la paloma.

Los porcentajes de recuperación del ácido clavulánico oscilan entre 77'37% y el 93'69% ( $X \pm S.D. = 85'88\% \pm 5'58$ ) para la paloma y entre 80'74% y el 94'57% ( $X \pm S.D. = 87'87\% \pm 5'03$ ) para la gallina; por lo que cabe hacer similar consideración que se hizo para la amoxicilina.

La concentración de fármaco unida a las proteínas es consecuencia de varios parámetros como son la capacidad de fijación y la constante de asociación. Cuando se trabaja con soluciones de una proteína pura, y a concentraciones conocidas, puede calcularse la capacidad de fijación con números de sitios de unión por molécula de proteína y la constante de asociación en moles recíprocos.

Al trabajar con plasma de paloma y de gallina no podemos obtener los parámetros molares de la asociación. El empleo de la ecuación de KRÜGER-THIEMER (1961) permite calcular la capacidad de fijación máxima en mg/g y la constante de asociación media aparente en  $\text{mg}^{-1}$ . En el Cuadro 5 aparecen los valores mencionados referidos a la amoxicilina y al ácido clavulánico en la paloma y en la gallina, junto con

sus coeficientes de correlación ( $r$ ) correspondientes. En general, todos los valores de capacidad de fijación y de constante de asociación son mayores en la paloma que en la gallina para ambos fármacos.

En general, la unión de los fármacos a las proteínas plasmáticas suele expresarse como porcentaje de unión. En los Cuadros 1 y 2 se observa la tendencia al ascenso de los mismos conforme se incrementa la concentración del fármaco, lo que se debe a la progresiva saturación de la capacidad de fijación de la proteína.

Los porcentajes de unión medios de la amoxicilina a las proteínas plasmáticas de paloma y gallina son de 14'63%  $\pm$  2'33 y de 16'36%  $\pm$  2'53 respectivamente. Estos valores son bastante semejantes a los encontrados en la especie bovina (14%; BEECHAM ANIMAL HEALTH, 1987) y en la caprina (15'85%; CÁRCELES et al., 1988a).

Los porcentajes de unión medios del ácido clavulánico a las proteínas plasmáticas de la paloma y de la gallina son de 28'61%  $\pm$  4'21 y de 31'70%  $\pm$  4'32 respectivamente. Igualmente estos valores están próximos a los encontrados en la especie humana (COMBER et al., 1980) y bovina (BEECHAM ANIMAL HEALTH, 1987) de 30% y 22% respectivamente. Sin embargo son superiores al 16'30% encontrado por CÁRCELES et al. (1988b) en la especie caprina.

Como se puede apreciar los porcentajes de unión son ligeramente superiores en la gallina que en la paloma para ambos productos. Ello podría deberse tan sólo al hecho de existir una mayor concentración proteica en el plasma de gallina, ya que como se vio anteriormente tanto la capacidad de fijación como la constante aparente de asociación son menores en esta especie para ambos productos.

Las pruebas estadísticas realizadas (test de "Mann Whitney") muestran que, efectivamente, a pesar de existir unos porcentajes de unión de la amoxicilina a las proteínas plasmáticas de ambas especies parecidos éstos son significativamente diferentes ( $Z = 0'127$ ), e igual ocurre con

el ácido clavulánico ( $Z = 0'128$ ). Mayores diferencias existen entre los porcentajes de unión de ambos productos en la paloma ( $Z = 9'392 \cdot 10^{-4}$ ) y la gallina ( $Z = 9'401 \cdot 10^{-4}$ ).

Igualmente, en el Cuadro 5 podemos observar mayores valores de capacidad de fijación y de la constante aparente de asociación para el ácido clavulánico que para la amoxicilina en ambas especies, lo que sugiere que de la interacción de ambos productos puede haber un desplazamiento de la amoxicilina de las proteínas plasmáticas por el ácido clavulánico. En cualquier caso este posible desplazamiento sería ligero o poco importante ya que los porcentajes de unión de estos productos a las proteínas plasmáticas de ambas especies son bajos. No obstante para verificar todo esto es preciso realizar experiencias similares pero utilizando la asociación antibiótica a la proporción determinada.

## BIBLIOGRAFÍA

- ALLEN, P. C.; HILL, E. A.; STOKES, A. M. 1977. Plasma proteins. Analytical and preparative techniques. Blackwell, Oxford.
- BEECHAM ANIMAL HEALTH RESEARCH CENTRE. 1987. Synulox, nuevo concepto de la antibioterapia. Cuaderno de divulgación, Madrid.
- BROGDEN, R. N.; CARMINE, A.; HEEL, R. C.; MORLEY, P. A.; SPEIGHT, T.M.; AVERY, G.S. 1981. Amoxicillin/clavulanic acid: A review of its antibacterial activity, pharmacokinetics and therapeutic use. *Drugs*, 22: 337-362.
- CÁRCELES, C. M.; SANJUÁN, M. A.; HITA, J.; ORDÓÑEZ, D. 1988a. Farmacocinética del ácido clavulánico intravenoso en cabra a dosis única. *An. Vet. (Murcia)* 4: 47-54.
- CÁRCELES, C. M.; SANJUÁN, M. A.; HITA, J.; ORDÓÑEZ, D. 1988b. Farmacocinética de la amoxicilina tras la administración intravenosa de una dosis única en la cabra. *An. Vet. (Murcia)* 4: 55-62.
- COMBER, K. R.; HORTON, R.; LAYTE, S. J.; WHITE, A. R.; SUTHERLAND, R. 1980. Augmentin: Antibacterial activity in vitro and in vivo. En: Proc. 1st Symp. Augmentin, Amsterdam. *Exc. Med.* 19-38.
- COOPER, J. E. 1985. Safety and efficacy of clavulanate-potenciated amoxycillin in pigeon (*Columba livia*). *Res. Vet. Sci.* 39: 87-89.
- FARMER, T.; READING, C. 1982.  $\beta$ -lactamase of *Bramhamella catarrhalls* and their inhibition by clavulanic acid. *Antimicrob. Agents Chemother.* 21: 506-508.
- FOULSTONE, M.; READING, C. 1982. Assay of amoxycillin and clavulanic acid, the components of Augmentin, in biological fluids with HPLC. *Antimicrob. Ag. Chemother.* 22: 753-762.
- GRIECO, M.H. 1982. Antibiotic resistance. *Med. Clin. N. Amer.* 61: 25-38.
- KRÜGER-THIEMER, E. 1961. Theorie der wirkung bakteriostatischer chemotherapeutika. *Jahresb. Borstel. B.* 5:316-450.
- MARTÍN, F.; GONZÁLEZ, E. 1988. Amoxicilina/ácido clavulánico frente a estafilococos. *Rev. Esp. Microbiol. Clín.* 3: 45-48.
- NEU, H. C. 1979. Amoxycillin. *Ann. Int. Med.* 90: 356-360.
- READING, C.; FARMER, T.; COLE, M. 1983. The  $\beta$ -lactamase stability of amoxycillin with the  $\beta$ -lactamase inhibitor clavulanic acid. *J. Antimicrob. Chemother.* 11: 27-32.
- READING, C. 1982. The biochemistry and mode the action of Augmentin. En: Proc. Int. Symp. Montreux. LEIGH, D. A.; ROBINSON, O. P. eds., *Exc. Med.* 5-21, Amsterdam.
- ROLINSON, G. N. 1982. The history and background of Augmentin. *South Afr. Med. J.* 62: 3A-4A.
- ROLINSON, G.N. 1986. Inhibidores de las  $\beta$ -lactamasas. *Rev. Esp. Microbiol. Clín.* 1: 13-20.
- RUDMAN, D.; KENDALL, F. E. 1957. Bile acid content of human serum II. The binding of cholic acids by human plasma proteins. *J. Clin. Invest.* 36: 538-542.
- SENIOR, D. F.; GASKIN, J. M.; BUERGELT, C. D.; FRANKS, P. P.; KEEFE, T. J. 1985. Amoxycillin and clavulanic acid combination in the treatment of experimentally induced bacterial cystitis in cats. *Res. Vet. Sci.* 39: 42-46.
- SERRANO, J. M.; CABANAS, L. F.; SANTIAGO, D. 1984. Estudio de la unión de silimarina a proteínas plasmáticas. II. Proteínas de cerdo, ovino, caprino, bovino y hombre. *Arch. Zootec.* 125: 89-95.

- SUBIRÓN, J.; TORRELLAS, A. 1988. Historia y mecanismo de acción de amoxicilina/ácido clavulánico. *Rev. Esp. Microbiol. Clín.* 3: 20-30.
- SYKES, R. B.; MATTHEW, M. 1976. The  $\beta$ -lactamase of Gram negative bacteria and their role in resistance to  $\beta$ -lactam antibiotics. *J. Antimicrob. Chemother.* 2: 115-157.
- WEBER, D. J.; TOLKOFF RUBIN, N. E.; RUBIN, R. H. 1986. Amoxicilina y clavulanato potásico: una combinación antibiótica. Mecanismo de acción, farmacocinética, espectro antimicrobiano, eficacia clínica y efectos adversos. *Rev. Esp. Microbiol. Clín.* 1: 214-229.