

EFECTO DEL pH SOBRE LA ABSORCIÓN INTESTINAL DE ANTIBIÓTICOS AMINO- β -LACTÁMICOS

Por L. Santos (1)
J. G. Prieto (1)
J. P. Barrio (1)
A. Justel (1)

INTRODUCCIÓN

Los antibióticos β -lactámicos incluyen a las penicilinas y a las cefalosporinas ampliamente utilizadas en enfermedades producidas por microorganismos. Poseen baja toxicidad frente a animales superiores debido a que actúan específicamente inhibiendo la síntesis de la pared celular bacteriana de forma competitiva¹.

Existe una tendencia general a suministrar los antibióticos por vía oral. Los β -lactámicos soportan las condiciones gastrointestinales gracias a su estructura peculiar de anillos condensados o núcleo responsables de la actividad bactericida de la molécula, y cadenas laterales unidas a éstos donde residen las propiedades farmacocinéticas, como son: ácido-estabilidad, absorción oral, etc.

Si bien la absorción de un antibiótico se considera como el paso del mismo desde el lumen intestinal hasta la sangre venosa mesentérica, dependiendo esta absorción de la solubilidad lipídica y del grado de ionización del antibiótico, términos que se hallan, a su vez, en función de los pK_a de los antibióticos y del pH de la solución de recirculación³, en nuestro trabajo hemos obtenido la velocidad de absorción aparente en base a la cantidad de antibiótico remanente en cada momento a lo largo del tiempo de recirculación.

Sjöwall y cols.¹⁴ proponen como proceso de absorción de antibióticos una forma conjunta de difusión pasiva y difusión facilitada. Otros como Nikaido⁵, hacen referencia a unos canales acuosos o poros por donde se absorben sustancias de muy bajo peso molecular.

El mecanismo de transporte de diversos antibióticos β -lactámicos depende de las concentraciones iniciales de antibióticos perfundidas en el intestino¹⁷, y se observa un progresivo acercamiento de la cinética de absorción a una cinética de orden cero¹⁵.

Nos hemos planteado cuantificar la contribución de las distintas formas del antibió-

(1) Departamento de Bioquímica, Biología Molecular, Fisiología y Farmacología

tico presentes en el perfusado al proceso de absorción intestinal, teniendo en cuenta que las posibles formas iónicas dependen del pH de la disolución que contenga el antibiótico.

MATERIAL Y METODOS

Los productos empleados fueron:

D(-)- α -amino-para-hidroxi-bencil penicilina trihidrato o Amoxicilina (AMOX).

-Acido 7- (D- α -fenilacetamido)- 3-metil- 3-cefem-4- carboxílico o Cefalexina (CFX).

Cedidos ambos antibióticos gentilmente por el Departamento de Investigación de Antibióticos S.A..

Se prepararon disoluciones reguladoras de fosfatos para las perfusiones, con una concentración total de 0,05 M y pH's ajustados a valores prefijados y disoluciones reguladoras hidroalcohólicas⁸ (disolución reguladora de fosfatos 0.05 M pH = 6.0 + 40% de Metanol v/v) para el análisis cromatográfico en fase reversa, empleando una columna μ -bondapak c-18, un detector modelo LDC de longitud de onda fija a 254 nm y un inyector Rheodyne equipado con un lazo de 20 μ l.

Como animales de experimentación se emplearon ratas adultas Wistar de ambos sexos, cuyos pesos fueron controlados en el momento de su utilización, resultando comprendidos entre 225 y 325 gramos.

Ni el peso ni el sexo de los animales serán problema en la interpretación de los resultados ya que, las velocidades de absorción determinadas las hemos referido a unidad de peso metabólico siguiendo a diferentes autores^{2,9,12}.

Dichos animales de experimentación se mantuvieron en ayuno durante aproximadamente 20 horas con acceso libre al agua de bebida.

Se realizó la técnica de recirculación intestinal «in vivo», desarrollada por Ponz y cols.⁶, sobre una porción de aproximadamente 15 cm del duodeno, por tener éste mayor capacidad de absorción en comparación con el resto del intestino delgado. La velocidad de recirculación se mantuvo constante a 5 ml/min. A lo largo del tiempo de recirculación se extraían a intervalos fijos de tiempo (15 min) muestras del perfusado que se analizaban por cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC), obteniéndose unos valores en el ultravioleta (UV) para cada muestra que posteriormente se transformaban en valores de concentración con ayuda de las correspondientes curvas patrón.

Para cada disolución recirculada de ambos antibióticos amino- β -lactámicos estudiados se ha obtenido la constante de velocidad de absorción aparente (K_{ap}) como la pendiente resultante de un ajuste por mínimos cuadrados de los pares de datos experimentales, tiempo de recirculación frente a porcentaje de absorción, a una ecuación lineal, siendo estas velocidades de absorción posteriormente referidas a unidad de peso/metabólico (V_{ap} , siendo $V_{ap} = K_{ap}$ peso vivo elevado a 0,75).

La influencia del pH de la disolución de antibiótico recirculada sobre la velocidad de absorción aparente se ha obtenido ajustando los pares experimentales V_{ap} y pH a la ecuación 1 obtenida por Prieto y cols.⁷:

Ecuación 1:

$$V'_{ap} = \frac{V'_0 + V'_{-1} (K_{a2}/H) + V'_{+1} (H/K_{a1})}{1 + (K_{a2}/H) + (H/K_{a1})}$$

donde:

V'_{ap} es el valor inverso de la velocidad de absorción aparente por unidad de peso metabólico.

V'_0 es la inversa de la contribución a la velocidad de absorción total de la forma zwitteriónica del antibiótico utilizado.

V'_{-1} es la inversa de la contribución de la forma aniónica a la velocidad de absorción total.

V'_{+1} representa la inversa de la contribución a la velocidad de absorción aparente total de la forma catiónica.

K_{a1} y K_{a2} son valores obtenidos a partir de los correspondientes valores de pk_1 y pk_2 respectivamente, que según Tsuji y Yamana¹⁶ serán para la AMOX, $pk_1 = 2.67$ y $pk_2 = 7.11$; y para la CFX, $pk_1 = 2.67$ y $pk_2 = 6.96$.

H representa la concentración de protones obtenida a partir del pH recirculado en cada caso.

Si bien no hemos dispuesto de un pH-stat para el mantenimiento constante del pH de la disolución reguladora empleada como vehículo del fármaco en cada recirculación, sí hemos comprobado la práctica inexistencia de variaciones en el mismo por medición del pH de cada una de las muestras obtenidas a lo largo de la recirculación. Ello se ha visto confirmado además por la no variación, a lo largo del análisis de las alícuotas de cada recirculación, del *capacity factor* característico de cada antibiótico al pH en que se encuentre disuelto.^{10,11}

RESULTADOS

Se realizaron los correspondientes ajustes por mínimos cuadrados de las representaciones de absorbancia frente a concentración obteniéndose los parámetros de las curvas patrón que figuran en la Tabla I.

Del mismo modo, pero representando tiempo de recirculación frente a valores de absorción aparente, se obtienen los correspondientes valores de k_{ap} .

En las Tablas II y III se recogen los valores experimentales de los parámetros estudiados para ambos antibióticos amino- β -lactámicos (AMOX y CFX), como son: los porcentajes de absorción del antibiótico en cada tiempo, la media de los valores de las constantes de velocidad de absorción aparente (k_{ap}), la media de los pesos vivos de los animales empleados dada en gramos (P), y la media de los valores de la velocidad de absorción aparente por unidad de peso metabólico (V_{ap}) utilizada para el ajuste teórico a la ecuación 1.

A partir de este ajuste se han obtenido las inversas de las respectivas contribuciones a dicha velocidad de absorción de las distintas formas iónicas del antibiótico, una simple inversión nos da los parámetros directos de dicha contribución cuyos valores se recogen en la Tabla IV.

Este tratamiento teórico nos ha permitido la obtención de unas curvas teóricas que nos posibilitan prever cuál será el comportamiento absorbivo a pH's extremos y por lo tanto fuera de nuestros límites experimentales. Dichas curvas se representan en la Figura I.

DISCUSION

La observación de las curvas teóricas de la Figura I, así como el análisis de los valores de V_0 para las formas zwitteriónicas, V_{-1} para las formas aniónicas y V_{+1} para las formas catiónicas de la Tabla IV, nos permite afirmar que la CFX se absorbe con

mayor facilidad que la AMOX, lo que está en concordancia con lo señalado por Ume-
niwa y cols.¹⁷ de que la velocidad de desaparición del lumen intestinal de las amino-
cefalosporinas es mayor que la de las aminopenicilinas.

Tales resultados manifiestan asimismo, como los de otros autores^{4, 13}, que los β -
lactámicos aminoderivados son eficazmente absorbidos del intestino delgado aunque
estén siempre ionizados en todo el rango de pH, siendo las formas zwitteriónicas las
especies iónicas predominantes al pH fisiológico del intestino delgado, y por tanto, es
lógica una mayor contribución de las mismas al proceso absorptivo total (mayor valor
de V_0 que de V_{-1} y V_{+1}).

Estas formas dipolares son mejor absorbidas probablemente debido a que en con-
junto se comportarían como moléculas neutras, presentando una respuesta a la absor-
ción como si su liposolubilidad fuera superior a la que verdaderamente poseen.

Puede observarse en la Figura I, de igual modo que Tsuji y Yamana¹⁶, que para va-
lores de pH mayores de 6,5 la velocidad de absorción de aminopenicilinas y aminoce-
falosporinas es independiente del pH de la disolución de antibiótico presente en el lu-
men intestinal.

RESUMEN

Se ha estudiado el efecto del pH de determinadas disoluciones de antibióticos ami-
no- β -lactámicos en la absorción intestinal, cuantificando la contribución de las dis-
tintas formas iónicas presentes al proceso absorptivo total.

Se llevó a cabo una recirculación «in vivo» en duodeno de ratas adultas Wistar de
ambos sexos con disoluciones reguladoras a distintos pH's, y analizando las muestras
extraídas por cromatografía líquida de alta eficacia.

Se llegó a la conclusión de que las formas dipolares o zwitteriónicas de los antibióti-
cos estudiados son las que más contribuyen a la velocidad de absorción aparente total
y que al pH fisiológico intestinal se observa una mayor velocidad de absorción apa-
rente.

EFFECT OF pH ON THE INTESTINAL ABSORPTION OF AMINO- β -LACTAM ANTIBIOTICS

SUMMARY

The effect of the pH of several dissolutions of amino- β -lactam antibiotics on intes-
tinal absorption, by quantifying the contribution of the different ionic forms to the
whole absorptive process, has been studied.

«In vivo» duodenal recirculation on both sexes adult wistar rats was carried out
using buffer solutions at different pH's and analyzing samples from the corresponding
perfusions by means of High Performance Liquid Chromatography.

A conclusion was reached that the dipolar or zwitterionic forms of the antibiotics
studied are the most contributing to the whole apparent absorption, and at the physio-
logical pH they show higher apparent absorption rate.

TABLA I
Parámetros de las curvas patrón.

	Pendiente	Ordenada	C. correlación
AMOX	0.236	-3.02×10^{-2}	0.999
CFX	1.115	6.02×10^{-4}	0.999

AMOX: amoxicilina
CFX: cefalexina

TABLA II.
Parámetros medios de los valores experimentales para amoxicilina.

pH		4.9	5.2	5.6	6.1	6.6	7.1
t (min)	0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	15	1.04	2.97	5.72	1.34	5.95	2.69
	30	1.78	4.01	6.63	3.82	7.32	4.51
	45	2.31	4.39	8.51	6.90	8.71	5.13
	60	2.81	5.25	10.47	11.14	9.97	8.56
	75	3.67	6.73	13.28	13.59	11.53	10.55
	90	4.81	7.82	14.74	14.76	14.61	11.65
	105	5.79	8.54	16.91	16.23	15.46	13.17
	120	7.93	9.18	17.52	19.18	17.19	14.73
AMOX	$K_{ap} \pm SD$ (min^{-1})	0.059 0.005	0.070 0.005	0.138 0.010	0.167 0.009	0.127 0.011	0.122 0.005
	$P \pm SD$ (g)	217 4	237 4	272 7	307 9	265 17	292 13
	$10^3 V_{ap} \pm SD$ ($\text{min}^{-1} \text{g}^{-1}$)	0.947 0.024	1.159 0.027	2.060 0.004	2.278 0.057	1.936 0.163	1.726 0.056

nº de réplicas = 3

K_{ap} : constante de velocidad de absorción aparente media
 P : peso medio de los animales empleados
 V_{ap} : velocidad de absorción aparente media por unidad de peso
metabólico ($\text{min}^{-1} \text{g}^{-1}$).
AMOX: amoxicilina

TABLA III.
Parámetros medios de los valores experimentales para cefalexina.

pH		4.9	5.2	5.6	6.1	6.6	7.1
t (min)	0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	15	6.51	3.41	3.17	11.23	6.44	7.52
	30	8.19	5.65	5.21	13.07	8.97	9.88
	45	10.41	7.38	6.76	16.79	11.83	13.46
	60	11.26	8.46	8.91	20.13	13.68	14.35
	75	11.93	11.54	9.83	21.45	16.82	15.71
	90	12.92	12.84	11.74	24.47	19.51	16.32
	105	13.74	13.49	13.53	27.75	21.32	17.22
	120	14.87	15.13	17.35	29.63	24.05	18.75
CFX	$k_{ap} \pm SD$ (min^{-1})	0.120 0.016	0.121 0.007	0.130 0.006	0.217 0.022	0.185 0.011	0.132 0.021
	$P \pm SD$ (g)	289 12	274 18	244 2	301 15	312 6	245 12
	$10^3 v_{ap} \pm SD$ ($\text{min}^{-1} \text{g}^{-1}$)	1.455 0.0242	1.799 0.067	2.106 0.163	3.000 0.060	2.491 0.017	2.131 0.063

nº de réplicas = 3

k_{ap} : constante de velocidad de absorción aparente media

P : peso medio de los animales empleados

v_{ap} : velocidad de absorción aparente media por unidad de peso metabólico ($\text{min}^{-1} \text{g}^{-1}$).

CFX: cefalexina

TABLA IV.

Valores de las contribuciones teóricas a la absorción de las distintas formas iónicas de los antibióticos.

	$v_0 \times 10^3$	$v_{-1} \times 10^2$	$v_{+1} \times 10^5$
AMOX	1.900	1.777	1.522
CFX	2.851	1.884	1.631

v_0 : contribución de la forma zwitteriónica a la absorción total

v_{-1} : contribución de la forma aniónica a la absorción total

v_{+1} : contribución de la forma catiónica a la absorción total

($\text{g}^{-1} \text{min}^{-1}$).

AMOX: amoxicilina

CFX: cefalexina

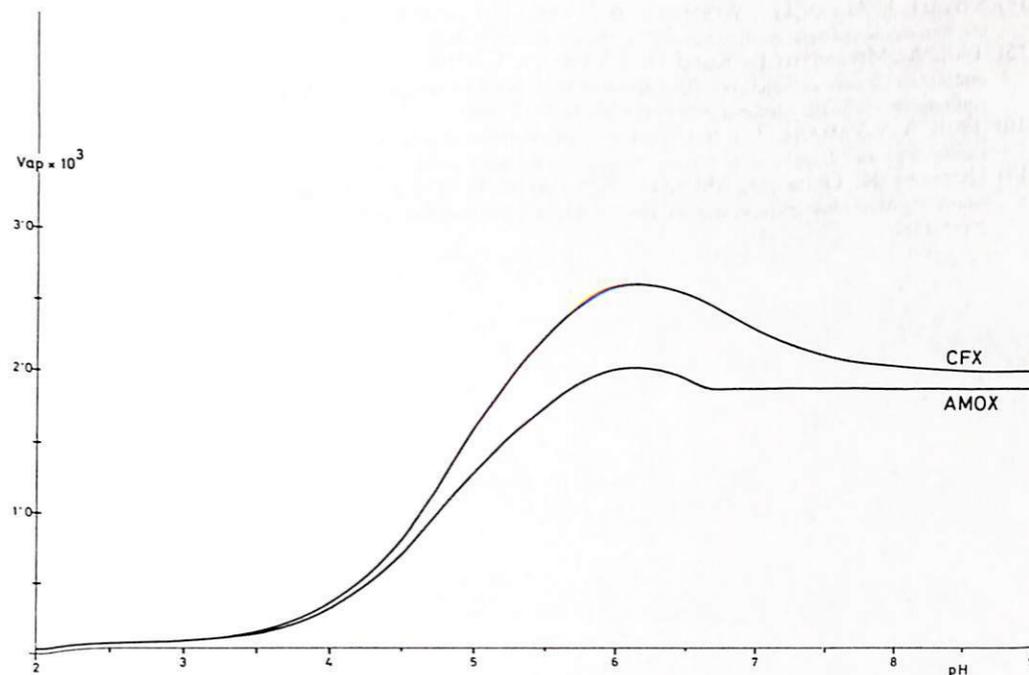


Fig. 1.- Representación teórica de la velocidad de absorción aparente (v_{ap}) de los dos amino-B-lactámicos estudiados, obtenida a partir del ajuste de los datos experimentales a la Ecuación 1.

BIBLIOGRAFIA

- BOYD, D. B. (1981). Theoretical studies of B-lactam antibiotics. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 367: 531-534.
- GOMEZ APARICIO, G. (1986). Absorción intestinal de Ofloxacina. *Memoria de licenciatura. Facultad de Biología Universidad de León.*
- JOLLOW, D. J. y BRODIE, B. B. (1972). Mechanisms of drugs absorption and of drug solution. *Pharmacology* 8: 21-32.
- MIYAZAKI, K., OGINO, O., NAKANO, M. y ARITA, T. (1977). Intestinal absorption mechanisms of Ampicillin Derivatives in rats. I. Intestinal absorption of Ampicillin derivatives. *Chem. Pharm. Bull.* 25 (2): 246-252.
- NICAIDO, H. (1985). Role of permeability barriers in resistance to B-lactam antibiotics. *Pharmac. Ther.* 27: 197-231.
- PONZ, F., ILUNDAIN, A. y LLUCH, M. (1980). Method for successive absorption with intestinal perfusion «in vivo». *Rev. Esp. Fisiol.* 35: 97-104.
- PRIETO, J. G., BARRIO, J. P. y ZAPICO, J. (1984). Computer programs to obtain HPLC parameters of B-lactam antibiotics. *Comput. Biol. Med.* 14 (4): 457-462.
- PRIETO, J. G., SALTO, F. y ALEMANY, M. T. (1978). Influencia del pH, contenido en metanol y fuerza iónica de la fase móvil sobre al cromatografía en fase invertida de penicilinas y cefalosporinas. *An. Fac. Vet. León* 24: 17-31.
- SAADEH, G. M., MURR, M. y NASSAR, C. F. (1986). Effect of enzymatic treatment on calcium absorption by small intestine: a comparative study between rat and rabbit transport mechanisms. *Comp. Biochem. Physiol.* 83A (3): 539-541.
- SALTO, F., PRIETO, J. G. (1981). Interactions of cephalosporins and penicillins with nonpolar macroporous styrenedivinylbenzene copolymers. *J. Pharm. Sci.* 70 (9): 994-998.
- SALTO, F., PRIETO, J. G., ALEMANY, T. (1980). Interactions of cephalosporins and penicillins with nonpolar octadecylsilyl stationary phase. *J. Pharm. Sci.* 69 (5): 501-506.
- SEERS, R. y MICHELS, H. (1982). Metabolic body size: A biological and/or a mathematical concept?. En EKERN, A. y SUNDSTOL, F.: *Energy Metabolism of Farm Animals*. Norway, EAAP 29: 135-137.
- SEZAKI, H. y KIMURA, T. (1983). Carrier-mediated transport in drug absorption. En BREIMER, D. D. y SPEISER, P.: *Topics in Pharmaceutical Sciences 1983*. Proc. 43rd Int. Congress Pharm. Sci. F.P.I., Montreux, Switzerland. 133-142.

- 14) SJOVALL, J., ALVAN, G. y WESTERLUND, D. (1985). Oral cyclacillin interacts with the absorption of oral Ampicillin, Amoxicillin and Bacampicillin. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 29: 495-502.
- 15) TSUJI, A., MIYAMOTO, E., KUBO, O., y YAMANA, T. (1979). GI absorption of β -lactam antibiotics III: kinetic evidence for «in situ» absorption of ionized species of monobasic Penicillins and Cefazolin from the rat small intestine and structure-absorption rate relationships. *J. Pharm. Sci.* 68 (7): 812-816.
- 16) TSUJI, A. y YAMANA, T. (1981). Gastrointestinal absorption of β -lactam antibiotics. En MITSUHASHI, S.: *β -Lactam Antibiotics*, Japan Scientific Societies Press, Tokio. Springer-Verlag, New York, 235-257.
- 17) UMENIWA, K., OGINO, O., MIYAZAKI, K. y ARITA, T. (1979). Intestinal absorption of several β -lactam antibiotics II. Absorption characteristics of amino-penicillins and amino-cephalosporins. *Chem. Pharm. Bull.* 27 (9): 2.177-2.182.

RELACION ESTRUCTURA QUIMICA-ACTIVIDAD ANALGESICA DE ALGUNOS DERIVADOS DEL ACIDO N-PIRROLIL ACETICO

Por J. M. Serrano (1)
H. J. Miguélez (1)
A. Negro (2)
M. T. Terán (2)
D. Santiago (1)

INTRODUCCION

La introducción de nuevos agentes en el arsenal terapéutico presupone y requiere un amplio estudio de sus propiedades químicas y biológicas. Hoy día, casi todos los productos de síntesis se obtienen a través de líneas de analogía estructural, en las que existe un cabeza de serie sobre el que se van realizando modificaciones químicas hasta obtener un grupo de derivados con características biológicas similares.

Por ello, continuando los estudios realizados en trabajos anteriores sobre la actividad analgésica de algunos derivados N-pirrolil sustituidos de ácidos orgánicos^{2,3}, en el presente trabajo se investiga la relación entre el coeficiente de reparto octanol/agua (como factor dependiente de la estructura química) y la actividad analgésica de cinco productos cuya estructura base es el ácido N-pirrolil acético y cuyas fórmulas desarrolladas se muestran en la Figura I. Se trata de una primera aportación que se completará posteriormente con el estudio de la inhibición del sistema de la prostaglandín sintetasa.

MATERIAL Y METODOS

1.-Determinación del coeficiente de reparto

Para ello se han preparado cinco disoluciones tampón de fosfatos a pH 7,0, 6,5, 6,0, 5,5 y 5,0 con una fuerza iónica constante de 0,1 y una concentración 0,04M de fosfatos.

En cada uno de estos tampones se ha realizado la disolución de los productos utilizados a las concentraciones que se indican en la Tabla I.

(1) Departamento de Farmacología y Toxicología. Universidad de Córdoba.

(2) Dpto. de Bioquímica y Biología Molecular, Fisiología y Farmacología. Universidad de León.