

Photodegradation and phototoxicity of antibacterial agents and the new alternatives for the photo-inactivation of microorganisms

Franklin Vargas, Carlos Rivas, Andreína Fernández, Yecira Flores y Liliana Padrón*

Laboratorio de Fotoquímica, Centro de Química, Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas, Apartado 21827, Caracas 1020-A, Venezuela.

Recibido: 11-05-05 Aceptado: 22-03-06

Abstract

This review on photodegradation and phototoxicity of antibacterial drugs and new alternatives for photoinactivation of microorganisms takes as model substances of the family of compounds known as quinolonas, which exert their pharmacological activity interacting with the bacterial nucleic acids through a mechanism of intercalation on the DNA. They also pose an adverse phototoxic effect as has been conclusively demonstrated through our investigations in the last 14 years. The studies on two generations of these pharmaceuticals, compounds 1-5 and 6-9 respectively have given positive results regarding photochemical mechanisms of decomposition, intermediates, photoproducts, especially those formed in the presence of oxygen, in such a way as to propose a scale of relative phototoxic activity based on photohemolysis and reactions with human serum albumin (HAS) monitored by means of fluorescence and other spectroscopic technique. Nevertheless those phototoxic undesirable effects, suggests us that those same effects can be reverted for the inactivation of the pathogen agents, provided the appropriate photosensitizer and the luminous sources are used with enough reach to attack them in remote places of the organism where they are. We refer here to lasers directed by means of optic fiber as it is being done in different types of photodynamic therapies. Anyway, this topic continues to be a source of much research.

Key words: Anti-bacterial photoactivity; photosensitizer; Quinolone; singlet oxygen.

Fotodegradación y fototoxicidad de agentes antibacteriales y las nuevas alternativas para la foto-inactivación de microorganismos

Resumen

Esta revisión sobre fotodegradación y fototoxicidad de los agentes antibacteriales y las nuevas alternativas para la foto-inactivación de microorganismos, toma como sustancias modelo a la familia de los compuestos conocidos como las "quinolonas", cuya acción farmacológica se fundamenta en su interacción con el ácido nucleico bacterial mediante un mecanismo de intercalación. Ellos poseen también un efecto fototóxico como ha sido demostrado fehacientemente a través de las investigaciones de nuestro laboratorio en los últimos 14 años. El estudio

* Autor para la correspondencia. E-mail: fvargas@ivic.ve

de las dos generaciones de estos fármacos, compuestos 1-5 y 6-9 respectivamente ha dado resultados que abarcan desde los mecanismos de descomposición fotoquímica, formación intermedios y fotoproductos, especialmente en presencia de oxígeno, hasta los de proponerse una escala del grado de fototoxicidad mediante técnicas de fotohemólisis y reacciones con albúmina humana (HSA) monitoreadas por fluorescencia y métodos espectroscópicos. No obstante esos efectos fototóxicos indeseables, nos sugiere que esos mismos efectos se pueden revertir para inactivar a agentes patógenos, siempre y cuando se utilicen los fotosensibilizadores adecuados y las fuentes luminosas con alcance suficiente para atacarlos en lugares apartados del organismo donde se encuentren. Nos referimos aquí a láser dirigidos mediante fibra óptica como se viene haciendo en distintas formas de terapia fotodinámica. Este tópico deja muchas puertas abiertas para más investigación.

Palabras clave: Fotoactividad anti-bacterial; fotosensibilizador; oxígeno singlete; quinolona.

Introducción

Recientes investigaciones desarrolladas en el laboratorio de fotoquímica del centro de química del IVIC se basan en la elucidación de los mecanismos de fototoxicidad de varios productos farmacéuticos. Debido a la importancia de las quinolonas antibacteriales de uso común en práctica médica, consideramos de interés general presentar esta revisión sobre las reacciones fotoquímicas involucradas en la generación de especies tóxicas, como radicales libres, oxígeno singlete y ión superóxido, así como también los fotoproductos y la posibilidades de mediación como metabolitos en daños biológicos. Así, basándonos en los mecanismos postulados para la descomposición fotoquímica de las sustancias investigadas y estudios *in vitro*, es probable elucidar el o los mecanismos involucrados al nivel celular.

En años recientes casi todas las quinolonas usadas como agentes antibacterianos, tanto los de la primera generación (compuestos 1-5) como también de la segunda (compuestos 6-9) (Figura 1), han mostrado un alto índice de fototoxicidad. Se ha estudiado la fotoestabilidad y las actividades biológicas de estos compuestos farmacológicos, especialmente de los análogos flúor-sustituidos (1-3). El máximo de absorbancia correspondiente a la transición n, π^* del grupo carbonilo se encuentra localizado entre 265 y 275 nm. Una segunda banda menos intensa pero significativa se observa entre 320 y 420 nm y to-

dos estos compuestos muestran una moderada banda de fluorescencia entre 370 y 418 nm cuando ellos son excitado a sus máximas absorbancia. Estas características espectroscópicas han sido útiles en los estudios de las cinéticas de fotodegradación.

El ácido nalidíxico (4) es usado extensivamente como compuesto modelo para estudiar la fotólisis de estos compuestos, a saber, ellos siguen un proceso similar de fotodescarboxilación, formación de hidroperóxidos intermedios y generación de oxígeno singlete (5). NMR (CIDNP) y estudios de ESR han demostrado que el proceso de fotólisis induce a la formación de radicales libres intermedios (6). En general las quinolonas sufren pérdida del grupo de carbonilo como paso principal en su fotodegradación.

En el caso de ácido del pipemídico (2), Norfloxacin (6) y Ciprofloxacina (7) la decarboxilación pueden favorecerse por la influencia del par de electrones desapareados en el átomo de nitrógeno proporcionado aromaticidad al anillo piperazínico que crea una extensa resonancia por deslocalización (7).

A continuación se muestra en la Figura 2, un mecanismo postulado general de la fotólisis de las quinolonas antibacteriales estudiadas. Es importante resaltar el papel que juega el oxígeno en este proceso. Este es un factor importante en la formación de productos oxigenados y los inter-

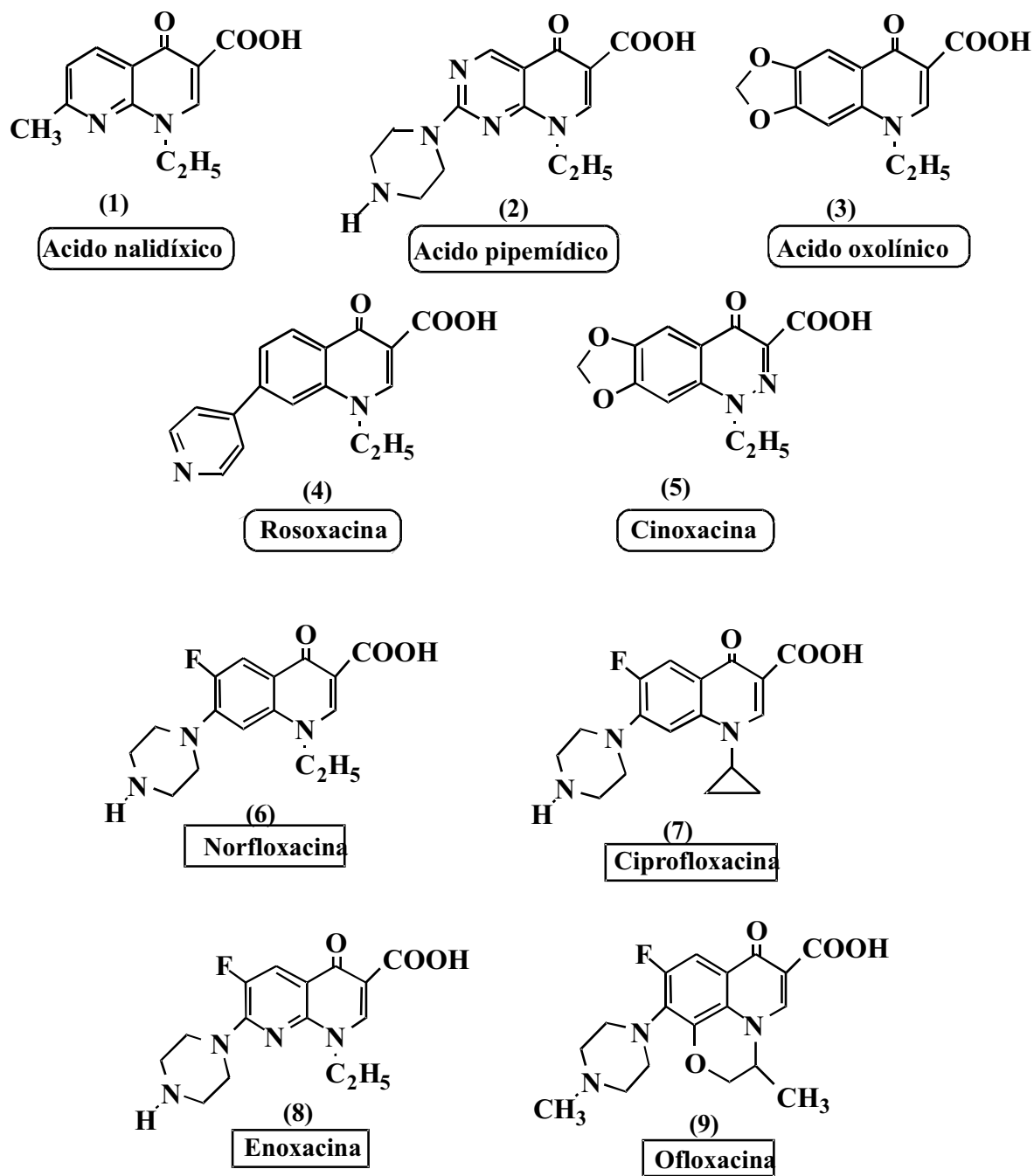


Figura 1. Estructura de las quinolonas antibacteriales estudiadas.

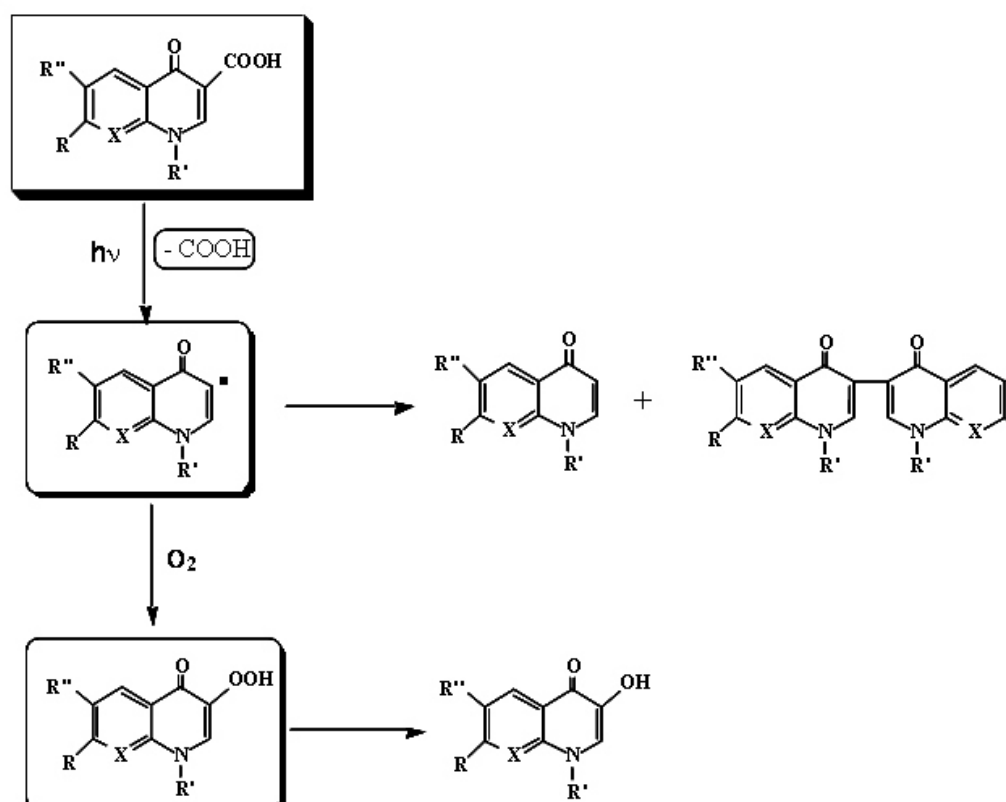


Figura 2. Mecanismo general postulado para la fotólisis de las quinolonas antibacteriales estudiadas.

mediarios peróxidos involucrados en la actividad fototóxica de estos compuestos (8).

El potencial fototóxico de algunas quinolonas usadas como agentes antibacterianos se ha evaluado en estudios *in vivo* con ratones como también *in vitro* sobre eritrocitos humano. En las pruebas *in vivo* se suministraron 200 mg del compuesto por kg / de peso del animal y se irradió con luz UVA (21,6 J / cm²). La eritema y la fotohemólisis inducida fue evaluada y el orden de fototoxicidad relativo expresado como potencial sigue el siguiente orden: Norfloxacin > Enoxacin > Ciprofloxacina > ácido nalidíxico > Cinoxacin > ácido pipemídico > ácido oxolínico > Rosoxacin > Ofloxacina (9). Además de estos estudios de fotosensibilización se han realizados otros como, la erupción subcorneal, y fotoalergia (10-16). Estudios de fotohemólisis *in vitro* (UVA y UV-B, 100 J/cm²) muestran a la Norfloxacin, Enoxacin y Cinoxacin con los efectos hemolíticos más altos (17-18). La Figura 3 muestra una re-

lativa comparación del potencial fototóxico de estas quinolonas. Los valores obtenidos se compararon con blancos (muestras sin quinolonas) y comparadas también son otras sustancias como: clorpromazina, dimetilcloro-tetraciclina o hematoporfirina: (100 % bajo las mismas condiciones experimentales) con un alto potencial de fototoxicidad.

Además de las evidencias halladas por la fotohemólisis, determinándose mecanismos de acción oxígeno-dependientes, se encontró que esta también es producida por los intermediarios y fotoproductos formados en el curso de la fotodegradación de las quinolonas. Hemos determinado por otra parte una correlación entre los resultados obtenidos de los ensayos de fotohemólisis y de peroxidación lipídica. Esta relación no es sorprendente si consideramos que la peroxidación lipídica contribuye a mediar los mecanismos del daño de la membrana celular inducidos fotoquímicamente.

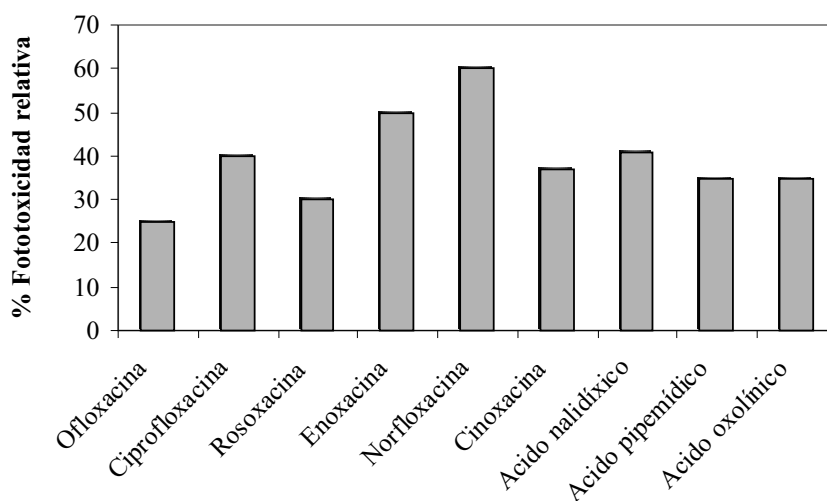


Figura 3. Comparación relativa del potencial fototóxico de las quinolonas estudiadas.

El estudio fotoquímico de muchos agentes farmacológicos fotosensibilizantes abre nuevas perspectivas e importantes vías para establecer los mecanismos de actividad y de fototoxicidad de estos compuestos.

Estudios previos han demostrado que el proceso fotoquímico principal bajo condiciones de pH neutras son la desfluorinación (1). La presencia de un átomo halógeno en la posición 8 en el anillo central de la quinolona refuerza altamente su carácter fototóxico (19). Este hecho acoplado a la formación de intermediarios muy reactivos como el catión aril radical en el proceso de desfluorinación, sugiere que el efecto biológico adverso puede relacionarse a reacciones irreversibles que involucran enlaces covalente de esta especie a algún componente celular.

Desde el punto de vista biológico y farmacéutico, uno de las funciones biológicas más importantes de la albúmina humana es transportar los principios activos farmacológicos, así como otras sustancias endógenas o exógenas a través de las membranas celulares. La capacidad que tienen las quinolonas a enlazarse a la albúmina humana es un estudio importante para elucidar su actividad farmacológica como su capacidad fotoalérgica. Los estudios llevados a caso mediante espectrofotometría de fluorescencia y de absorción de la interacción de Norfloxacina (6), Ciprofloxacina (7), (quinolonas de la tercera ge-

neración), Enoxacina (8) (segunda generación) y Cinoxacina (4) (primera generación) con albúmina humana a pH neutro, como un método simple y fiable para fotoalergenos (20-22), ha revelado resultados innovadores. El método consiste en soluciones de quinolona del orden de 10^{-4} M en los solventes diferentes (alcohólico o buffer fosfato salino (PBS), pH 7,4). Estas soluciones son titulada espectrofotométricamente con alícuotas de una solución de albúmina directamente sobre la celda de fluorescencia o de absorbancia, según el método escogido de investigación, e irradiados continuamente con luz visible mediante un láser o lámparas fluorescentes (UV-A). Los resultados experimentales indicaron que las determinaciones por fluorescencia eran una opción más confiables y sensibles que las de absorbancia. De este grupo sólo tres (fluoroquinolonas), mostraron enlazamiento covalente fotoinducido a la albúmina. Norfloxacina (6) y Ciprofloxacina (7) se enlazan eficazmente a la albúmina mientras que la Enoxacina (8) lo hace de una manera moderada cuando ellos son irradiados con luz visible. Por otro lado, Cinoxacina que es una quinolona de la primera generación no-fluorada, no muestra ninguna interacción con la albúmina. Los resultados se infirieron de supervisar la evolución de los espectros de fluorescencia de las soluciones en función del tiempo. Una relación directa entre la capacidad de desfluorinación fotoinducida produciendo un catión del radical

arilo intermediario y la reacción subsecuente con HSA es predecible.

El intermediario catiónico reactivo que rápidamente se enlaza a los grupos nucleofílicos en la molécula de la proteína es mostrado en la Figura 4.

A pesar de los adelantos hechos por la medicina en los últimos 100 años, las enfermedades microbiológicas continúan siendo unos enormes problemas de salud global. Terapias eficaces, económicas y extensamente aplicables y que no sean susceptibles a la resistencia son necesarias urgentemente. La terapia fotodinámica se hace importante por poseer algunas de estas características. Con la creación y prueba de nuevos fotosensibilizadores pueden desarrollarse todas esas características necesarias. Esta terapia se basa en la combinación de luz y un medicamento o droga (fotosensibilizador). Actualmente sus aplicaciones han llegado a tratamiento de enfermedades causado por las bacterias, levaduras, virus y parásitos, así como también en la esterilización de sangre y otros productos. Actualmente, el uso clínico de fotosensibilizadores en este campo se limita al tratamiento de papiloma laríngeo. Sin embargo, un progreso considerable ha sido realizado en la desinfección fotodinámica de productos de la

sangre. La fotoactivación viral ha estado tradicionalmente enfocada en el ataque sobre el ácido nucleico viral, en muchos casos por vía de un mecanismo de intercalación al ADN del virus.

El uso de agentes bacterianos se hace cada vez mas frecuente en el tratamiento de enfermedades bucales. Las concentraciones terapéuticas de estos agentes son difíciles de mantener en la cavidad bucal, lo que puede ocasionar una resistencia bacteriana del paciente. Esto hace necesario la aplicación de terapias alternativas. Una de ellas es el uso de fotosensibilizadores (azul de toluidina, ftalocianinas y clorinas) e irradiación con luz infrarroja, lo cual ha resultado ser letal sobre una amplia gama de bacterias y otros microbios responsables de caries, enfermedades periodontales e infecciones del canal de la raíz del diente (23). Las ventajas de este tratamiento son que las bacterias pueden erradicarse en períodos de tiempo muy cortos (segundos o minutos), el desarrollo de resistencia bacteriana es improbable y el daño a los tejidos adyacentes y ruptura de la microflora normal puede evitarse.

La terapia de fotodinámica es usada actualmente como una técnica alternativa para los tratamientos de melanomas superficiales de la piel, cancerígenos o no. Pero también para eliminar

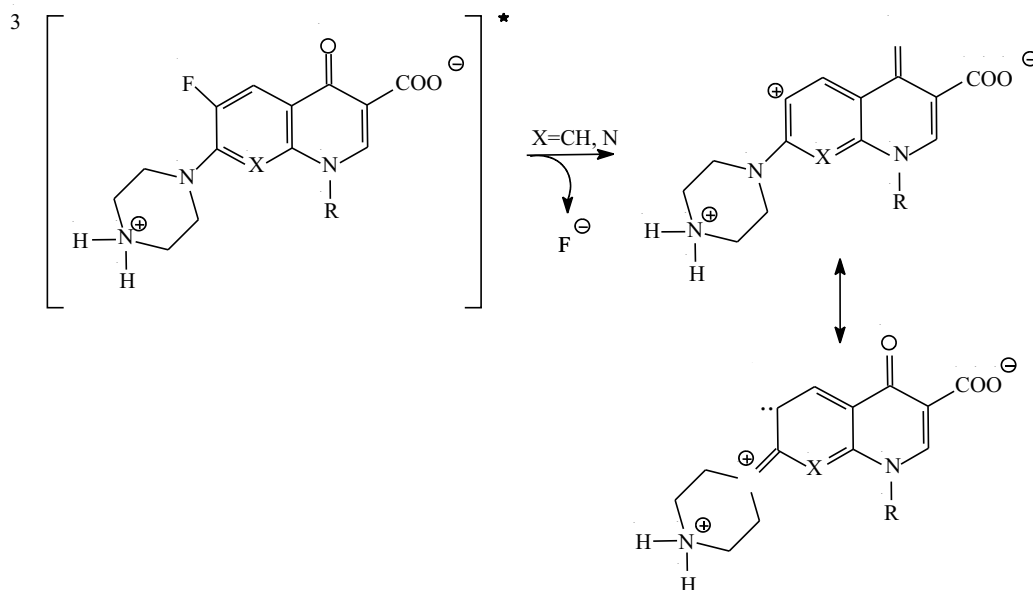


Figura 4. Formación de especies intermediarias durante las fotólisis de compuestos fluorados 6-9.

ciertos microorganismos bacterianos sobre la piel. El ácido 5-aminolevulínico es un buen inductor en la bio-síntesis de porfirinas (un eficiente fotosensibilizador). El tratamiento *in vitro* con ácido 5-aminolevulínico más luz visible y UVA puede matar colonias de *Candida albicans*. Muchos otros estudios han dado fe de que la terapia fotodinámica es un tratamiento potencial para el candidosis (24-26). También se han estudiado el efecto de inactivación de bacterias Gram-negativo, *Escherichia coli* y estafilococos por uroporfirinas, coproporfirinas y protoporfirinas.

El uso de fotosensibilizadores (no tóxicos) en la terapia fotodinámica combinada con irradiación de baja intensidad en longitudes de onda del rango UV-A y visible (320-600 nm) en presencia de oxígeno para producir especies citotóxicas, tiene la ventaja de una selectividad dual. Por una parte el fotosensibilizador puede ser dirigido a la célula destino o tejido específico al tratamiento, y además, la irradiación puede dirigirse espacialmente a la lesión. Por ejemplo, cuando el fotosensibilizador lleva una carga catiónica o el uso de agentes que aumentan la permeabilidad de la membrana exterior aumentarán la eficacia de inactivar bacterias Gram-negativo. La selectividad de irradiación en zonas muy profundas se lleva a cabo mediante Láser por fibra óptica.

Estas posibles aplicaciones clínicas se están desarrollando rápidamente y llevándose a prueba en animales. Entre las mas importantes podemos nombrar a el uso de fototerapia sobre lesiones virales, el acné, infección gástrica por *Helicobacter pylori*, infecciones en heridas y quemaduras e infecciones de la superficie de la córnea y la piel.

Agradecimientos

Le expresamos nuestro agradecimiento al Fondo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas" FONACIT-Venezuela (S1-2502, S1-96001724, G97000593), a la Embajada Alemana en Venezuela y a la Fundación Polar por el soporte económico y técnico prestado para la realización de esta investigación.

Referencias Bibliográficas

1. FASANI E., ALBINI A., MELLA M., RAMPI M., BARBERIS F. *Int J Photoenergy* 1: 7-11, 1999.
2. HIDALGO M.E., PESSOA C., FERNÁNDEZ E., CÁRDENAS A.M. *J Photochem Photobiol A: Chem* 73: 135-138, 1993.
3. MATSUMOTO M., KOJIMA K., NAGANO H., MATSUBARA S., YOKOTA T. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 36: 1715-1719, 1992.
4. VARGAS F., RIVAS C., MACHADO R., MIRANDA M. A. *Photodermatol Photoimmunol Photomed* 8: 218-221, 1991.
5. DETZER N., HUBER B. *Tetrahedron* 31: 1937-1941, 1975.
6. VERMEERSCH G., FILALI A., MARKO A., CATTEAU J.P., COUTURE A. *J Photochem Photobiol B Biol* 4: 85-89, 1989.
7. BIGLEY D., ALBORNO A. *J Chem Soc Perkin Trans* 2:15, 1982.
8. VARGAS F., RIVAS C., MACHADO R. *J Photochem Photobiol B Biol* 11:81-85, 1991.
9. WAGAI N., YAMAGUCHI M., SEKIGUCHI M., TAWARA K. *Toxicol Lett* 54: 299-308, 1990.
10. BARAN R., JUHLIN L. *J Am Acad Dermatol* 17:1012-1016, 1987.
11. CÁRDENAS A.M., VARGAS F., FERNÁNDEZ E., HIDALGO M.E. *J Photochem Photobiol B Biol* 10: 249-255, 1991.
12. FERGUSON J., MCINTOSH J., WALKER E.M. *J Invest Dermatol* 91: 385, 1988.
13. KAWABE Y., MIZUNO N., SAKAKIBARA S. *Photodermatol Photoimmunol Photomed* 6: 58-60, 1989.
14. PETRI H., TRONNIER H. *Infection* 14: 213-216, 1986.
15. SHELLEY E.D., SHELLEY W.B. *Cutis* 42: 24-27, 1988.
16. WAGAI N., TAWARA K. *Toxicol Lett* 52: 215-223, 1991.

17. PRZYBILLA B., GEORGII A., BERGNER T., RING J. *Dermatologica* 181: 98-103, 1990.
18. VARGAS F., RIVAS C., CANUDAS N. *Die Pharmazie* 49: 742-745, 1994.
19. MARUTANI K., MATSUMOTO M., OTABE Y., NAGAMUTA M., TANAKA K., MIYOSHI A., HASEGAWA T., NAGANO H., MATSUBARA S., KAMIDE R., YOKOTA T., MATSUMOTO F., UEDA Y. *Antimicrob Agents and Chemother* 37: 2217-2223, 1993.
20. BARRATT M.D., BROWN K.R. *Toxic Lett* 24:1-6, 1985.
21. GONZÁLEZ-JIMENEZ J., GARCÍA-CANTALEJO J. Interactions of drugs with human serum albumin studied by fluorescent spectroscopy. In: *Advances in biomedical applications of photochemistry and photobiology*. F. Vargas, Editor, Research Signpost, India, pp. 51-78, 2002.
22. VARGAS F., RIVAS C., DÍAZ Y., FERNÁNDEZ A. *Toxicology Mechanisms and Methods* 13: 221-226, 2003.
23. WILSON M. *Photochemical & Photobiological Sciences* 3: 412-418, 2004.
24. JORI G., BROWN, B. S. *Photochemical & Photobiological Sciences* 3: 403-405, 2004.
25. HAMBLIN M.R., HASAN T. *Photochemical & Photobiological Sciences* 3: 436-450, 2004.
26. HENDERSON B.W., DOUGHERTY T.J. *Photochem Photobiol* 55: 145-147, 1992.