

TRABAJOS ORIGINALES ORIGINAL WORKS

Pérdida de la actividad antibacteriana de quinolonas por efecto de la radiación UVA

UVA-induced loss of quinolone antibacterial activity

FERNÁNDEZ E, SÁNCHEZ G, NAVARRETE E, DEL ALCÁZAR F.

Facultad de Farmacia, Casilla 5001-V, Valparaíso, Chile. E-mail ernesto.fernandez@uv.cl

RESUMEN

Se investiga la actividad antibacteriana de soluciones de las quinolonas ácido nalidíxico, ciprofloxacino y levofloxacino irradiadas mediante luz UVA. La fotólisis de las quinolonas produce una disminución de la actividad antibacteriana en cepas de *E.coli* y de *S.aureus*, evidenciándose un aumento de la concentración mínima inhibitoria de un 50% frente a las cepas ensayadas, en relación a las quinolonas no irradiadas. Se postula un mecanismo fotolítico radicalario con la consecuente fotodegradación de la porción γ -piridona- β -carboxílica responsable de la actividad antibacteriana. PALABRAS CLAVE: Quinolonas. Fotólisis. CMI. Fotodegradación.

ABSTRACT

The antibacterial activity of UVA-irradiated solutions of nalidixic acid, ciprofloxacin and levofloxacin was investigated. Photolysis of quinolones produced a decrease in antibacterial activity in strains of E. coli and S. aureus, becoming manifest through an increase of 50% in the minimum inhibitory concentration of the drug as compared to non-irradiated quinolones. In this study, it is suggested that a radical-mediated photolytic mechanism exists, leading to the photodegradation of the γ -pyridone- β -carboxylic group, which is the mediator that is responsible for the drugs antibacterial activity.

KEY WORDS: Quinolones. Photolysis. MIC. Photodegradation.

INTRODUCCION

Las quinolonas son fármacos antibacterianos utilizados ampliamente para el tratamiento de infecciones. La primera quinolona usada en clínica, el ácido nalidíxico fue desarrollada en 1962 por Leshner¹.

La actividad antimicrobiana de las quinolonas se debe a la presencia de la porción γ -piridona- β -carboxílica, la cual es fundamental para su unión a la enzima DNA girasa, enzima responsable del superenrollamiento negativo del DNA bacteriano y por ende de su sobrevivencia^{1,2,3}.

Las quinolonas de segunda generación (fluoroquinolonas) mejoran su espectro de acción y farmacocinética por medio de modificaciones estructurales, como la introducción de un anillo

INTRODUCTION

Quinolones are antibacterial medicines that are widely used in the treatment of infections. The first clinically used quinolone, nalidixic acid, was developed in 1962 by Leshner¹.

The antimicrobial activity of the quinolones is attributable to the presence of the γ -pyridone- β -carboxylic portion, which plays a fundamental role in its union with the DNA gyrase enzyme. This enzyme is responsible for the negative supercoiling of bacterial DNA and consequently its survival^{1,2,3}.

Second generation quinolones (fluoroquinolones) improve their spectrum of action and pharmacokinetic properties through structural modifications, such as the introduction of a piperazinic ring at position 7, which allow greater

piperazínico en posición 7, lo que permite una mayor concentración en el sitio de acción⁴, y una disminución de los efectos fototóxicos en el modelo del glóbulo rojo y en el de *artemia salina*^{3,5}. La sustitución de un hidrógeno por un fluor en posición 6 aumenta de 10 a 100 veces la capacidad de inhibición de la enzima DNA girasa⁶.

Las fluoroquinolonas pueden experimentar reacciones fotoquímicas que conducen a la pérdida de fluor^{7,8,9} y a decarboxilaciones^{10,11}, procesos que involucran la formación de especies radicalarias^{11,12}.

Se ha demostrado que las quinolonas que poseen un anillo piperazínico en sus estructuras (enoxacino, lomefloxacino, fleroxacino, ciprofloxacino) (Fig.1) presentan una mayor fotolabilidad atribuida al efecto electrodonante de este sustituyente, el que favorecería la salida del grupo carboxílico.

Es probable que la fotodegradación de las quinolonas transcurra mediante un mecanismo radicalario¹¹, produciéndose la pérdida del grupo carboxílico en posición orto al carbonilo, mecanismo similar al propuesto por Detzer¹³ para el ácido nalidíxico. En el caso de este ácido, los fotoproductos (ácido nalidíxico decarboxilado y dímero) fueron aislados por técnicas cromatográficas e identificados por sus propiedades espectrales¹¹.

La actividad antimicrobiana de las quinolonas depende de los sustituyentes en posición 3 y 4 (γ -piridona- β -carboxílica), por lo tanto, cualquier modificación de estos conduciría a una pérdida de la actividad antimicrobiana³. En el presente trabajo se evalúa la actividad antibacteriana frente a cepas de *E.coli* y de *S. aureus* - de ácido nalidíxico, ciprofloxacino y levofloxacino irradiadas con luz UVA

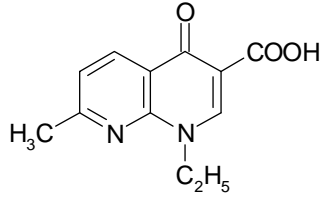
concentrations to accumulate at the site of action⁴, and a decrease in phototoxic effects in red corpuscle models and in those of the *artemia salina*^{3,5}. The substitution of a hydrogen for a fluoride in position 6 increases from between 10 to 100 times the inhibitory capacity of the DNA gyrase enzyme⁶.

The fluoroquinolones may undergo photochemical reactions which lead to the loss of fluoride^{7,8,9} and to decarboxylation processes^{10,11}, involving the formation of radical species^{11,12}.

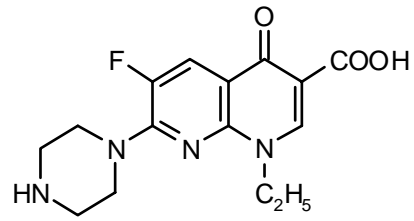
Quinolones have been demonstrated to possess a piperazinic ring within their structures (enoxacin, lomefloxacin, fleroxacin, ciprofloxacin) (Fig.1). These drugs present higher photolability due to the electro-donating effect of this substituent, which would facilitate the exit from the carboxylic group.

It is probable that the photodegradation of quinolones takes place through the radical mechanism¹¹, producing the loss of the carboxylic group in ortho-position to the carbonyl, a similar mechanism to that proposed by Detzer¹³ for nalidixic acid. In the case of this acid, the photo-products (decarboxylated nalidixic acid and dimer) were isolated through chromatographic techniques and identified by their spectral properties¹¹.

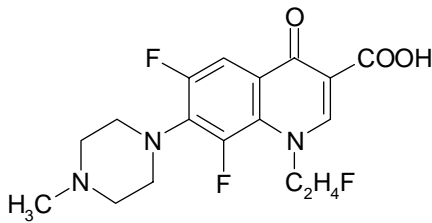
Quinolone antimicrobial activity is dependant on position 3 & 4 substituent (γ -pyridone- β -carboxylic), therefore any modification of these would lead to a loss of antimicrobial activity³. In the present work the antibacterial activity of nalidixic acid, ciprofloxacin and levofloxacin irradiated with UVA light, was assessed against strains of *E. coli* and *S. aureus*.

FIGURA.1 Estructuras de Quinolonas.**FIGURE 1.** Quinolone StructuresNAFTIRIDINAS
NAFTIRIDINES

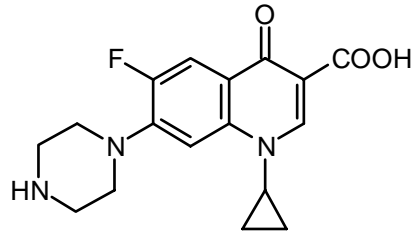
ACIDO NALIDIXICO



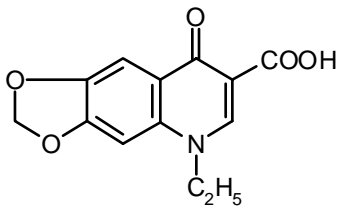
ENOXACINO

QUINOLINAS
QUINOLINES

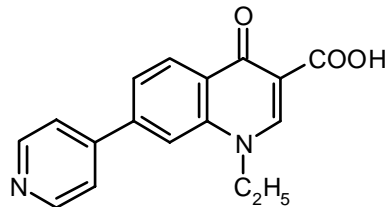
FLEROXACINO



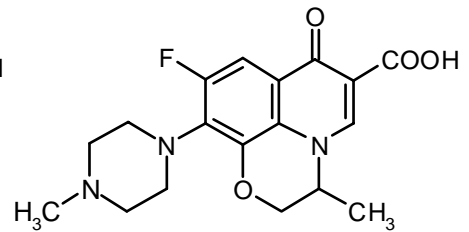
CIPROFLOXACINO



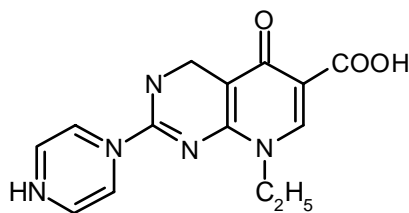
ACIDO OXOLINICO



ROSOXACINO



LEVOFLOXACINO

PIRIDO-PRIMIDINA
PYRID-PYRIMIDIN

ACIDO PIPEMIDICO

MATERIALES Y METODOS

- Cepas estándar ATCC (*E.coli*, *S.aureus*)
- Quinolonas :*Levofloxacino (Tavanic®)*, *Ciprofloxacino Lab Chile*, *Ácido Nalidíxico Lab Chile*.
- Columna Lichrospher ® Rp-18, Merck.
- Placas de agar T.S. (tripticosa soja)
- Caldo de T.S.
- Todos los reactivos utilizados fueron Merck de calidad p.a. o H.P.L.C.
- Equipo de irradiación Aplid Photophysics MLV 18
- Radiómetro UVX S-8954

Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) de quinolonas en cepas de E. coli y S. aureus

El método a utilizar para la determinación de la concentración mínima inhibitoria es el método de dilución en medio líquido¹⁴.

Soluciones de quinolonas en PBS, de concentraciones similares a las plasmáticas, sin irradiar e irradiadas, se incubaron con suspensión de microorganismos (*S. aureus* y *E. coli*).

La irradiación con luz UVA se realizó por tiempos variables de tal modo de producir una fotodegradación aproximada del 50%. Las soluciones de las quinolonas en buffer PBS pH 7,4 se irradiaron en cubetas de cuarzo, mediante un equipo Aplid Photophysics MLV 18, provisto de una lámpara UVA con una irradiancia de 2mW/cm². Las cinéticas de fotodegradación se realizaron mediante HPLC utilizando una columna Lichrospher RP18 Merck Hitachi, y como fase móvil ácido cítrico 04M:acetonitrilo:80:20.

RESULTADOS

1.-Determinación de la dosis de radiación de las quinolonas ensayadas. En la Tabla 1 se presentan los valores de dosis de radiación y sus rendimientos cuánticos de fotoconsumo (Φ_c) (quintuplicado), con sus respectivas desviaciones estándar:

MATERIALS AND METHODS

- Standard ATCC strains (*E.coli*, *S.aureus*)
- Quinolones: Levofloxacin (**Tavanic®**), Ciprofloxacin **LabChile**, Nalidixic Acid **LabChile**.
- Lichrospher ® Rp-18 Column, Merck.
- .T.S. agar plaques (tripticase Soya)
- T.S. medium
- All the reactivs used were Merck at p.a. or HPLC quality.
- Irradiation equipment - Applied Photophysics MLV 18
- UVX S-8954 Radiometer

Determination of the minimum inhibitory concentration (MIC) of quinolone on strains of E. coli & S. aureus

The method used in the determination of minimum inhibitory concentration was the dilution in liquid medium method¹⁴.

Quinolone solutions in PBS, at similar concentrations to plasmatic concentrations, were incubated with both irradiated and non-irradiated microorganism suspensions (*S. aureus* & *E. coli*).

UVA light irradiation was carried out at varying times in such a way as to produce an approximate photo degradation of 50%. The quinolone solutions in PBS buffer pH 7.4 were irradiated in quartz tanks with MLV 18 Applied Photophysics equipment, fitted with an UVA lamp with an irradiancy of 2mW/cm². Photo-degradation kinetics were carried out through HPLC using a Lichrospher RP18 Merck Hitachi, and citric acid 04M:acetonitrile:80:20 was used as mobile phase.

RESULTS

1 Determination of radiation exposure on the quinolones tested. In Table 1, the values for the radiation exposure doses and their quantum Photoconsumption yields (F_c) (quintuplicated), with their respective standard deviations are presented:

TABLA 1. Dosis de radiación de quinolonas

Quinolona(Φ_c)	Dosis radiacion (mJ/cm ²)	%descomposición
Ac Nalidixico 0.028±0,002	960	50
Ciprofloxacino 0.28 ±0,018	360	50
Levofloxacino 0.1 ±0,01	720	50

TABLE 1. Quinolone exposure to radiation.

Quinolone (\ddot{O}_c)	radiation exposure (mJ/cm ²)	%decomposition
Nalidixic Acid 0.028±0.002	960	50
Ciprofloxacin 0.28 ±0,018	360	50
Levofloxacin 0.1 ±0.01	720	50

2.- Pérdida de la actividad antibacteriana de quinolonas por Radiación UVA

En la Tabla 2 y los gráficos ,2,3,y 4 se indican los valores de CMI para las quinolonas en estudio. La determinación de la CMI se realizó en quintuplicado, comparando visualmente la serie de diluciones 1 a 10 con el tubo de CMI en que aparece la turbidez. Se observa que las tres quinolonas irradiadas presentan valores de CMI mayores que las respectivas quinolonas no irradiadas.en ambas cepas bacterianas.

2.- Quinolone antibacterial activity loss through UVA radiation.

In Table 2 and in graphs 2,3, & 4 MIC values for the quinolones under study are shown. The determination of MIC was carried out in quintuplicate, with visual comparisons of the dilution series 1 to 10 conducted with the MIC tube in which the cloudy sample appeared. The three irradiated quinolones presented higher MIC values than the non-irradiated respective quinolones in both bacterial strains.

TABLA 2: CMI DE QUINOLONAS

TABLE 2. MIC OF QUINOLONES.

	Dilución <i>E. coli</i>	CMI <i>E. coli</i>	Dilución <i>S. aureus</i>	CMI <i>S. aureus</i>
Levofloxacino	x10 ⁻⁴	3.45x10 ⁻⁷ M 0.13 mg/L	X10 ⁻³	6.90x10 ⁻⁷ M 0.25 mg/L
Levofloxacino Irradiado	x10 ⁻³	6.90x10 ⁻⁷ M 0.25 mg/L	X10 ⁻²	1.38x10 ⁻⁶ M 0.50 mg/L
Ac. Nalidixico	x10 ⁻²	5.38x10 ⁻⁵ M 12.49 mg/L	-	1.07x10 ⁻⁴ M 24.90 mg/L
Ac. Nalidixico Irradiado	x10 ⁻¹	1.07x10 ⁻⁴ M 24.90 mg/L	-	1.07x10 ⁻⁴ M 24.90 mg/L
Ciprofloxacino	x10 ⁻⁸	6.27x10 ⁻⁸ M 0.02 mg/L	X10 ⁻³	2.01x10 ⁻⁶ M 0.64 mg/L
Ciprofloxacino Irradiado	x10 ⁻⁷	1.25x10 ⁻⁷ M 0.04 mg/L	X10 ⁻²	4.01x10 ⁻⁶ M 1.28 mg/L

(-) No existe dilución. (*S.aureus* resistente frente a ácido nalidixico)
 (-) No dilution existed. (*S.aureus* was resistant against nalidixic acid)

FIGURA 2. CMI (mg/L) de Levofloxacin irradiado versus no irradiado en cepas bacterianas estándar de *E.coli* y *S.aureus*.

FIGURE 2. MIC (mg/L) of Levofloxacin irradiated Vs non-irradiated in standard bacterial strains *E.coli* & *S. aureus*.

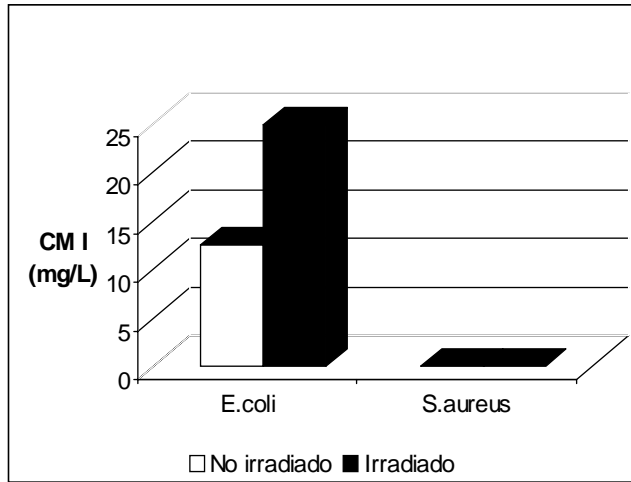


FIGURA 3. CMI (mg/L) de ácido nalidixico irradiado versus no irradiado en cepas bacterianas estándar de *E.coli* y *S.aureus*.

FIGURE 3. MIC (mg/L) of acid irradiated nalidixic Vs non-irradiated in standard bacterial strains *E. coli* & *S.aureus*.

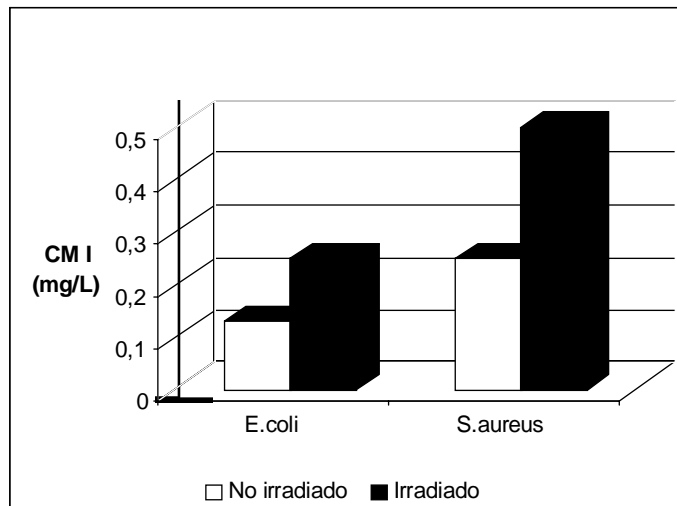
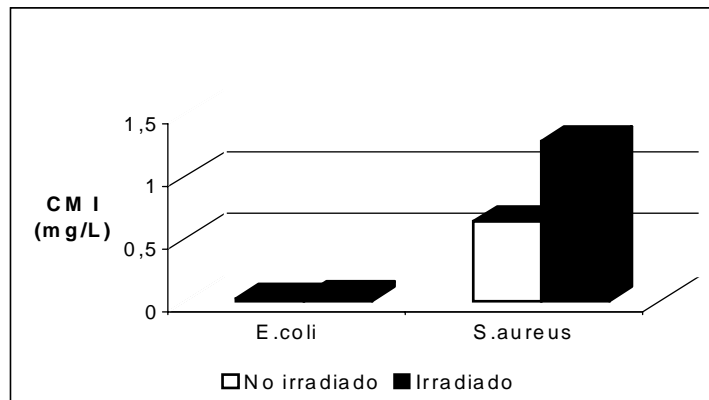


FIGURA 4. CMI (mg/L) de ciprofloxacino irradiado versus no irradiado en cepas bacterianas estándar de *E.coli* y *S.aureus*.

FIGURE 4. MIC (mg/L) of ciprofloxacin irradiated Vs non-irradiated in standard bacterial strains of *E.coli* & *S.aureus*.



DISCUSION

A partir de los valores de Φ_c (tabla 1) podemos observar que la presencia del anillo piperazínico (ciprofloxacino y levofloxacino) aumenta los valores de Φ_c y por ende la fotolabilidad de las quinolonas frente a la radiación UVA.

La menor fotolabilidad de levofloxacino en relación a otras quinolonas fluoradas se debe a la presencia de un anillo oxacino, postulándose un mecanismo para la decarboxilación fotolítica, en el cual el efecto electrón donante del grupo piperazínico competiría con el del anillo oxacino. La presencia de este sustituyente alteraría además de su fotolabilidad la toxicidad inducida por la radiación UVA.

Con el fin de observar una diferencia apreciable en los valores de CMI de las quinolonas en estudio se utilizó una dosis de radiación necesaria para producir una fotodegradación del 50%. En los gráficos de las fig.2,3 y 4 se observa que la fotodegradación de las tres quinolonas en estudio produce un aumento de las CMI de un 50% frente a las cepas de *E.coli* y de *S.aureus*. La actividad antimicrobiana de las quinolonas, es absolutamente dependiente de la presencia de la porción γ -piridona- β -carboxílica, estructura que se une a la enzima DNA girasa de las bacterias susceptibles, por lo que la experiencia descrita nos lleva a postular que la fotólisis de estas quinolonas se llevaría a cabo por un mecanismo radicalario que conduciría a la formación de fotoproductos decarboxilados. La decarboxilación por efecto de la irradiación, ha sido demostrada en derivados arilacéticos¹⁵, en ácidos α -ceto-carboxílicos¹⁶ y en el ácido nalidíxico^{11,15,17}.

En la Figura 5 a, se observa que el levofloxacino en PBS a pH 7.4 sin irradiar, en condiciones atmosféricas, presenta un tiempo de retención (Tr) a 3,029 minutos. A medida que aumenta el tiempo de irradiación (Fig.5b) aparece un segundo pico a 2,547 minutos, que corresponde a un fotoproducto de polaridad inferior al compuesto original. Es probable que este fotoproducto corresponda a levofloxacino decarboxilado, lo que se demuestra por la pérdida de la actividad antimicrobiana de la quinolonas estudiadas.

DISCUSSION

With regard to Φ_c values, it can be seen that the presence of the piperazinic ring (ciprofloxacin and levofloxacin) increases Φ_c values and consequently, the photolability of the quinolones against UVA radiation.

The lower photolability of levofloxacin with regard to other fluoroquinolones is attributable to the presence of an oxacin ring. This may support the premise that a photolytic decarboxylation mechanism exists in which the electron donating effect of the piperazinic group would compete with the oxacin ring. The presence of this substituent would alter not only its photolability, but also induced toxicity through UVA radiation.

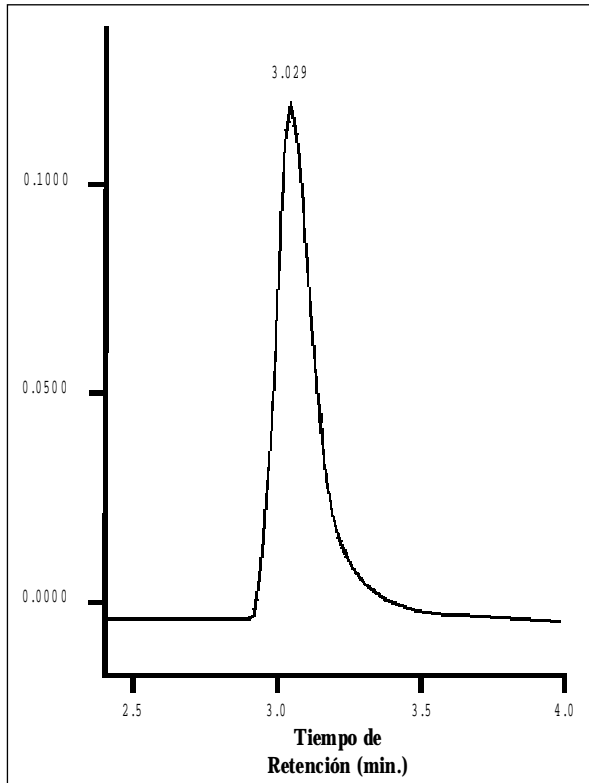
In an attempt to observe an appreciable difference in MIC values of the quinolones under study, the necessary radiation exposure to produce a photodegradation of 50% was used. In the graphs and figures 2,3,& 4, the photodegradation of the three quinolones can be observed to have produced an increase in MIC of 50% against *E.coli* & *S.aureus* strains. Quinolone antimicrobial activity is totally dependent on the presence of the γ -pyridone- β -carboxylic portion. This structure binds to the DNA gyrase of susceptible bacteria. The experiment thus leads us to postulate that photolysis of these quinolones would be carried out by a radical mechanism, which would lead to the formation of decarboxylated photoproducts. Decarboxylation through irradiation, has been demonstrated to take place in arilacetic derivatives¹⁵, in α -keto-carboxylic acids¹⁶ and in nalidixic acids^{11,15,17}.

Figure 5a shows that non-irradiated levofloxacin in PBS, at pH7.4 and under atmospheric conditions, presents a retention time of (Rt) at 3.029 minutes. As irradiation time increases (Fig. 5b) a second peak at 2.547 minutes appears, which corresponds to a photoproduct of lower polarity than the original compound. It is probable that this photoproduct is decarboxylated levofloxacin. This can be demonstrated by the fact that the antimicrobial activity of the quinolones studied has been lost.

FIGURA 5.

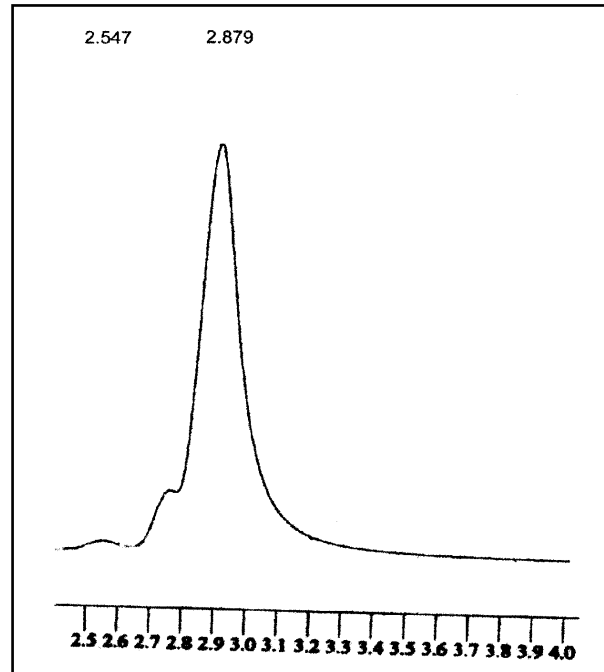
a) Cromatograma del levofloxacino en PBS a pH 7.4 sin irradiar.

a) Chromatogram of non-irradiated levofloxacin in PBS at pH7.4.



b) Idem irradiado después de 120 segundos de irradiación.

b) Idem irradiated after 120 seconds of irradiation.



En el caso del levofloxacino, la dosis de radiación empleada (720 mJ/cm^2) se alcanzó con una irradiancia de 2 mW/cm^2 durante 6 minutos, para ácido nalidíxico de 8 minutos y para ciprofloxacino de 3 minutos. Si estimamos que la radiación solar UVA que penetra a la dermis es aproximadamente de un 20%, podemos especular que un paciente sometido a una terapia con levofloxacino y expuesta a una radiación solar de 6 mW/cm^2 (verano latitud $33^{\circ}03'S$) durante 10 minutos, estaría recibiendo una dosis de radiación equivalente a 720 mJ/cm^2 , lo que produciría un 50% de fotodescomposición de la droga.

De aquí la importancia de conocer los niveles plasmáticos de las drogas inalteradas en condiciones de irradiancia solar y establecer la incidencia de la radiación UV, en la estabilidad de los medicamentos y en la génesis de reacciones adversas (reacciones de fotosensibilidad).

In the case of levofloxacin, the level of radiation exposure used (720 mJ/cm^2) was reached with an irradiance of 2 mW/cm^2 for 6 minutes, for nalidixic acid 8 minutes and for ciprofloxacin 3 minutes. Considering that UVA solar radiation will reach a level of penetration into the dermis of up to 20%, a patient under levofloxacin therapy, exposed to a solar radiation of 6 mW/cm^2 (summer, latitude $33^{\circ}03'S$) for 10 minutes, would receive an equivalent of 720 mJ/cm^2 , which would produce a 50% photodecomposition of the drug.

For this reason, it is important to ascertain plasmatic levels in unaltered drugs under conditions of solar radiation and to establish the degree to which UV radiation may effect the stability of medicines and the genesis of possible adverse reactions (photosensitive reactions).

CONCLUSIONES

La presencia del anillo oxacino otorga una mayor estabilidad al levofloxacin, frente a otras quinolonas que no poseen este anillo.

Al irradiar las diferentes quinolonas con dosis equivalentes al 50% de fotodegradación se produce una disminución apreciable de su capacidad de inhibir a las bacterias, lo cual indicaría un mecanismo de fotodecarboxilación, sin atribuirle al efecto potenciador del flúor en las fluoroquinolonas.

CONCLUSIONS

The presence of the oxacin ring provides greater stability to levofloxacin, in comparison with other quinolones that do not possess such a ring.

On irradiation of the different quinolones, with exposures producing the equivalent of 50% photodegradation, inhibitory capacity against bacteria decreases considerably. This would indicate that a photodecarboxylation mechanism exists, which is not attributed to the enhancing effect of fluoride in the fluoroquinolones.

BIBLIOGRAFIA/BIBLIOGRAPHY

1. Leshner GY, Froelich DE, Gruet MD. 1-8-Naphtyldine derivatives: a new class of chemotherapeutic agents". *J Med Pharm Chem* 1962; 91: 1063-1065.
2. Hooper DC, Wolfson JS. The fluoroquinolones: Pharmacology, Clinical uses, and Toxicities in humans". *Antimicrob Agents Chemoter* 1985; 28: 716-721.
3. Domagala J.M. "Structure-activity and structure-side-effect relationship for the quinolone antibacterials". *J. Antimicrobial chemotherapy* 1994; 33, 685-706.
4. Paton JH, Reeves DS. Fluoroquinolone antibiotics. *Drugs* 1988; 36: 193-228
5. Sánchez, G., "Estudio fotoquímico y fotobiológico de enoxacino" Tesis para optar al grado de Magister en ciencias Farmacéuticas, Universidad de Chile, 1997.
6. Lambert HP, O'Grady FW. Quinolones. En: *Antibiotic and chemotherapy*, 6 ed. Londres: Churchill Livingstone; 1992. p.245-262.
7. Martínez LJ, Li G, Chignell F. Photogeneration of fluoride by the fluoroquinolone antimicrobial agents lomefloxacin and fleroxacin. *Photochem. Photobiol.* 1997; 65: 599-602.
8. Fasani E, Barneris-Negra FF, Mella M, Monti S, Albini A. Photoinduced C-F bond cleavage in some fluorinated 7-amino-4-quinolone-3-carboxylic acids. *J Org Chem* 1999; 64, 5388-5395.
9. Fasani E, Mella M, Monti S, Albini A. Unexpected photoreactions of some 7-amino-6-fluoroquinolones in phosphate buffer. *Eur.J.Org.Chem* 2001;(2): 391-397.
10. Fernández, E, Cárdenas. AM, Martínez, G. Phototoxicity from nalidixic acid. *II fármaco* 1987; 42:681-690.
11. Fernández E, Cárdenas AM. The mechanism of photohaemolysis by photoproducts of nalidixic acid. *Photochem photobiol. B: Biology*, 1990; 4: 329-333.
12. Martínez LJ, Sik RH, Chignell F. Fluoroquinolone antimicrobials: singlet oxygen, superoxide and phototoxicity. *Photochem. Photobiol.* 1998; 67; 399-403.
13. Detzer N, Huber B. Photochemie heterocyclischer Enone I, Photolyse und Thermolyse von Nalidixinsäure. *Tetrahedron* 1975; 31: 1937-1941.
14. Díaz R, Gamazo C, López-Goñi I. *Manual práctico de microbiología*, 2ª Ed. Barcelona: Masson; 1999. p 141-147,
15. Vargas F, Rivas C, Machado R. Decarboxylation and singlet oxygen production in the photolysis of nalidixic acid. *J Photochem Photobiol B* 1991; 11(1): 81-85.
16. Reidd ST. *Photochemistry*, vol 8. Bristol: Stonebridge Press; 1977. p 524.
17. Moore DE, Hemmens VJ, Yip H. Photosensitization by drugs: nalidixic acids and oxolinic acid. *Photochem. Photobiol* 1984; 39(1): 57-61.