

ANÁLISE CITOTÓXICA DE ESPARFLOXACINO E SEUS PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO EM CÉLULAS MONONUCLEARES HUMANAS*

Hériida Regina Nunes MARONA**

Elfrides Eva Scherman SCHAPOVAL***

Nance Beyer NARDI****

- RESUMO: O esparfloxacino (SPAX) é uma fluoroquinolona antibacteriana de amplo espectro e apresenta potente atividade contra bactérias gram-positivas, incluindo *Streptococcus pneumoniae* e *Staphylococcus aureus* inclusive cepas meticilina resistentes (MRSA), bactérias gram-negativas, não fermentadoras de glicose, anaeróbios, *Legionella* spp; *Mycoplasma* spp; *Chlamydia* spp e *Mycobacterium* spp. Uma importante característica desta classe de antimicrobianos é a fototoxicidade. Esparfloxacino tem sido estudado quanto às suas atividades terapêuticas, entretanto poucos métodos de análise são descritos na literatura. Este trabalho objetivou a determinação dos efeitos citotóxicos de esparfloxacino substância de referência (SPAX-SR), esparfloxacino comprimidos (SPAX-COMP), esparfloxacino comprimidos submetidos à luz por 36 horas (SPAX-COMP.36), e dois produtos (7 e 9) isolados após a fotodegradação de esparfloxacino sob luz UV-C nas concentrações de 31,25; 62,5; 125 e 250 µg/mL, sobre o cultivo *in vitro* de células mononucleares humanas. Os resultados, analisados estatisticamente pelo Teste de Tukey,

**** Trabalho realizado com auxílio financeiro da Capes-PIDCT.

**** Departamento de Fármacos e Medicamentos – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP – 14801-902 – Araraquara – SP – Brasil.

**** Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas – Universidade Federal do Rio Grande do Sul – 90610-000 – Porto Alegre – RS – Brasil.

**** Departamento de Genética – Universidade Federal do Rio Grande do Sul – 90610-000 – Porto Alegre – RS – Brasil.

demonstraram que as soluções de esparfloxacino (SPAX-SR), SPAX-COMP e SPAX-COMP.36 em concentração de 250 µg/mL reduziram significativamente o número de células viáveis nestas condições. Este resultado não foi observado para as soluções das substâncias 7 e 9, o que sugere que estes produtos sejam menos citotóxicos do que o SPAX-SR, nas condições empregadas.

- PALAVRAS-CHAVE: Antibacterianos; atividade citotóxica; esparfloxacino; fluoroquinolonas; quinolonas.

Introdução

O esparfloxacino (SPAX), pertencente à classe das fluoroquinolonas, é um agente antibacteriano de amplo espectro e apresenta potente atividade contra bactérias gram-positivas, incluindo *Streptococcus pneumoniae* e *Staphylococcus aureus* inclusive cepas meticilina resistentes (MRSA), bactérias gram-negativas, não fermentadoras de glicose, anaeróbios, *Legionella* spp, *Mycoplasma* spp, *Chlamydia* spp e *Mycobacterium* spp.^{2,5,9,11}

O SPAX (Figura 1) está sendo utilizado como antimicrobiano, devido a seu amplo espectro de atividade, à facilidade de esquema posológico e, também, por sua baixa toxicidade. Embora ainda não faça parte do arsenal terapêutico no Brasil, o SPAX é comercializado, desde agosto de 1993, no Japão pela Daiinippon Pharmaceutical Company Ltd. (Suita, Osaka, Japão) sob o nome de Spara[®] em comprimidos de 100 e 150 mg.¹² A Daiinippon garantiu à Rhône-Poulenc Rorer (RPR) direitos exclusivos de comercializar o SPAX nos Estados Unidos e Canadá sob o nome registrado Zagam[®]. Na França, o produto está sendo desenvolvido através de acordo entre as duas indústrias e pode ser encontrado, também, com este nome comercial em comprimidos de 200 mg,^{11,13,14} assim como na Suíça.⁷ Nos Estados Unidos, é desenvolvido também pela RPR, que comercializa o produto na África do Sul e no sudeste asiático.

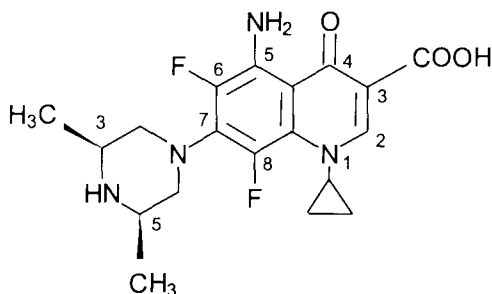


FIGURA 1 – Estrutura química de esparfloxacino.

Finalmente, o SPAX foi licenciado em alguns países, como Bélgica, Finlândia e Reino Unido, além de Luxemburgo, Dinamarca, Alemanha e Irlanda, todavia ainda não está sendo comercializado até o momento nestes países.¹⁸

Há diversas publicações descrevendo as fluoroquinolonas como substâncias capazes de causar fototoxicidade.^{4,8,16,17,21,22,23,24}

Uma vez que não existem dados na literatura sobre a citotoxicidade do esparfloxacino, este trabalho teve por objetivo a determinação deste efeito, utilizando esparfloxacino substância de referência, esparfloxacino comprimidos e comprimidos submetidos à luz por 36 horas, bem como dois produtos isolados (7 e 9) após a fotodegradação de esparfloxacino sob luz UV-C, sobre o cultivo *in vitro* de células mononucleares humanas de voluntários sadios.

Material e métodos

Material

Foram utilizadas as seguintes amostras:

- esparfloxacino substância de referência (SPAX-SR);
- esparfloxacino comprimidos (SPAX-COMP) revestidos contendo 200 mg de esparfloxacino;
- substância 7 (a separação deste produto de fotodegradação do esparfloxacino foi conduzida em cromatógrafo líquido de alta eficiência em escala semipreparativa);
- substância 9 (a separação deste produto de fotodegradação do esparfloxacino foi conduzida em cromatógrafo líquido de alta eficiência em escala semipreparativa);
- células mononucleares de sangue venoso humano e plasma autólogo de voluntários sadios.

Foram utilizados os seguintes materiais:

- histopaque 1077 (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA);
- meio RPMI 1640 (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA);
- solução Hanks' (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA);
- placas de cultura com 24 poços (Corning, St. Louis, MO, EUA);
- estufa de CO₂ (Forma Scientific – modelo 119);
- centrífuga refrigerada (Sorvall RT6000B, DuPont);
- heparina (Liquemine[®], Roche).

Obtenção das soluções-amostra

Esparfloxacino substância de referência (SPAX-SR): Dez miligramas de esparfloxacino substância de referência foram exatamente pesados em balão volumétrico de 10 mL para a preparação de solução estoque padrão 1.000. Primeiro, adicionou-se uma quantidade suficiente em NaOH 0,1 M para solubilizar o fármaco, e então o volume foi completado com solução tampão fosfato pH 7,0. A partir da solução 1.000, foram preparadas as concentrações 250, 125, 62,50 e 31,25 µg/mL, utilizando solução tampão fosfato pH 7,0.

Esparfloxacino comprimidos (SPAX-COMP): Vinte comprimidos foram pesados individualmente e triturados; uma quantidade equivalente a cinco vezes o peso médio foi exatamente pesada para a preparação de solução metanólica com concentração de 1.000 µg/mL. Vinte mililitros desta suspensão foram distribuídos por placas de Petri, colocadas na câmara com a lâmpada UV durante um período de 24 horas. Após este período, a solução foi levada à secura em evaporador rotatório em temperatura inferior a 60°C. Uma amostra equivalente a 31,5 mg de comprimidos (1/10 do peso médio) foi exatamente pesada e diluída em balão volumétrico de 10 mL para a obtenção de solução com concentração de 2.000 µg/mL, que originou as soluções 250, 125, 62,50 e 31,25 µg/mL.

SPAX-COMP.36: A solução metanólica de esparfloxacino comprimidos (1.000 µg/mL) foi submetida à luz UV, durante 36 horas em câmara (16 x 16 x 100 cm) equipada com lâmpada UV 292 nµ (*Philips*). Após este período, as soluções foram levadas à secura em evaporador rotatório em temperatura inferior a 60°C. Oitenta miligramas da substância de referência submetida a 36 horas de fotodegradação foram pesados e preparados como descrito para a substância de referência, para a obtenção de soluções com concentrações de 250, 125, 62,50 e 31,25 µg/mL.

Substâncias 7 e 9: A fotodegradação de esparfloxacino foi conduzida em vidro de relógio à distância de 10 cm da lâmpada germicida *Philips TUV lamp* (254 µµ) de 30 W, 96 V, (0,36 A) com 400 µW/cm², determinados através de medidor de UV *short meter Blak-Ray® meter J225 model*. A reação foi realizada em câmara com 100 x 16 x 16 cm, internamente espelhada e com temperatura de 26°C ± 1°C. O acompanhamento da degradação foi realizado em dois sistemas cromatográficos, quais sejam, clorofórmio : metanol : ácido fórmico (18 : 07 : 01) e diclorometano : metanol : hidróxido de amônio : acetona (4 : 4 : 2 : 1). A separação dos produtos de fotodegradação de esparfloxacino foi

conduzida em cromatógrafo líquido de alta eficiência (CLAE) em escala semipreparativa, utilizando coluna Interchrom Nucleosyl C₁₈ 250 x 10; 5 mm (N5C18.25F52760); Bomba: Spectra System P1500; ChromJet integrator; Detector: Varian 9050; Star Chromatography Software Version 4.01. A fase móvel utilizada foi ácido acético 5% : metanol : acetonitrila (75 : 12,5 : 12,5). As frações coletadas por CLAE semipreparativa, visualizadas através de cromatografia em camada delgada (CCD), permitiram o isolamento e a caracterização de duas substâncias⁶ codificadas por 7 e 9.

Separação de células mononucleares dos voluntários

Foram coletados 20 µL de sangue venoso periférico de oito indivíduos sadios em seringas contendo 20 µL de heparina (1:3). Em capela de fluxo laminar, o sangue foi transferido para tubos estéreis de 50 mL e centrifugado durante 5 minutos a 1.000 rpm em temperatura de 10 °C. Após centrifugação das células, 5 mL de plasma foram transferidos para tubos estéreis com tampa. Adicionaram-se 3 mL de solução Hanks' ao sangue, que foi diluído na proporção 4 : 3 com esta solução. Foram pipetados 2 mL de Histopaque em cada um dos quatro tubos utilizados por indivíduo. Sobre o Histopaque, adicionaram-se, cuidadosamente, 7 mL do sangue diluído. Os tubos foram centrifugados durante 25 minutos a 1.000 rpm à temperatura de 10°C. Após a centrifugação, foi possível observar, nos tubos, a "nuvem" de células mononucleares, localizada entre o Histopaque e a solução Hank's. As células mononucleares foram coletadas, cuidadosamente, por meio de movimentos circulares, com auxílio de pipeta de Pasteur, e transferidas para tubos com tampa; o volume foi completado para 10 mL com solução Hanks' e centrifugado a 1.000 rpm durante 5 minutos. Após a centrifugação, o sobrenadante foi desprezado, e foram adicionados 10 mL de solução Hanks' no "pellet" para lavagem. Realizou-se a contagem das células, a fim de determinar o volume de meio e de plasma a ser adicionado para a obtenção de $1,6 \times 10^6$ células/mL.

O plasma foi centrifugado a 7.000 rpm durante 5 minutos a 10°C.

Contagem de células

Foram adicionados 50 µL de solução de azul de tripan 0,3% (p/v) a uma alíquota de 50 µL da suspensão de células. A contagem das células mononucleares foi realizada em câmara de Neubauer e a viabilidade

de das células foi determinada pela contagem de células coradas (mortas) ou não (vivas) pelo azul de tripan. As células viáveis são observadas no microscópio em aumento 40X, como arredondadas e brilhantes, enquanto as células mortas são coradas em azul e o resíduo de Histo-paque e corante são vistos como pontos escuros. A contagem é realizada em 16 campos com objetiva 10, utilizando a seguinte equação:

$$\text{n}^\circ \text{ total células} = n \times P \times A \times C$$

onde:

n = n^o total de células em 16 campos

P = volume da suspensão celular (10 mL)

A = diluição com o corante azul de tripan (2)

C = câmara de Neubauer (10⁴)

Após a contagem das células viáveis, feita para cada indivíduo, foi calculado o volume de meio RPMI, a ser adicionado para a obtenção de concentração final das células de $1,6 \times 10^6$ células/mL.

Culturas de células mononucleares

As culturas foram preparadas em placas de fundo plano com 24 poços, em fluxo laminar e protegidas da luz. Foram realizadas diluições seriadas das soluções-amostra, a fim de obter as seguintes concentrações: 250 µg/mL, 125 µg/mL, 62,5 µg/mL e 31,25 µg/mL, num volume de 250 µL. Finalmente, foram adicionados 250 µL de suspensão celular em todos os poços. Desta forma, o volume final de cada poço na placa foi de 500 µL. Na cultura controle, foram adicionados 250 µL de suspensão celular e 250 µL de meio RPMI. As placas, após serem observadas no microscópio, foram cobertas com papel alumínio e incubadas a 37°C em atmosfera úmida com 5% de CO₂, por um período de 24 horas. Após o término da incubação, foram coletados 50 µL de células e adicionados 50 µL de solução de azul de tripan 0,3%, para que fosse realizada a contagem de células em câmara de Neubauer.

Análise estatística

O número de células viáveis foi estatisticamente avaliado pela análise de variância (ANOVA) seguida do Teste de Tukey.¹⁰

Resultados

A porcentagem de células viáveis obtidas após o tratamento das culturas de células com soluções de SPAX e seus derivados em concentrações de 250 µg/mL, 125 µg/mL, 62,50 µg/mL e 31,25 µg/mL, contado após 24 horas, está apresentada na Figura 2.

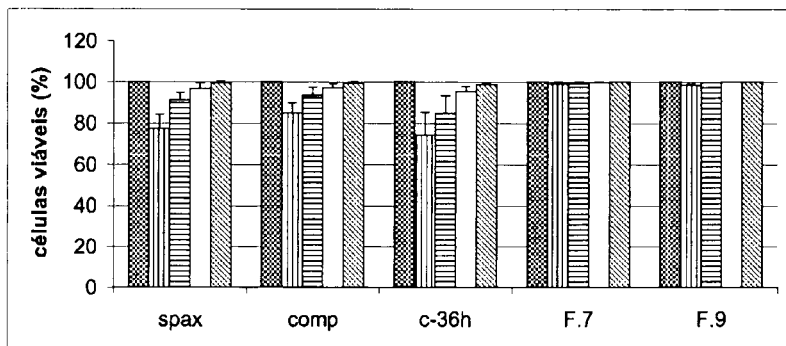


FIGURA 2 - Porcentagem média de células mononucleares viáveis após cultivo com SPAX, SPAX-comprimidos, comprimidos submetidos à degradação por 36 horas e dos produtos 7 e 9 no teste de citotoxicidade.

■ controle; ▨ 250 µg/mL; ▤ 125 µg/mL; ▧ 62,50 µg/mL; ▩ 31,25 µg/mL

O número de células viáveis após tratamento das culturas de células com soluções em concentrações de 250 e 125 µg/mL foi avaliado estatisticamente pela análise de variância (ANOVA), que apresentou diferença significativa (Tabelas 1 e 2). Este resultado foi confirmado pela análise estatística pelo Teste de Tukey para $p < 0,05$, cuja amostra de comprimidos submetida à luz durante 36 horas (COMP-36) reduziu significativamente o número de células viáveis quando comparado às outras amostras analisadas (Tabelas 3 e 4).

Tabela 1 - Análise da variância (ANOVA) dos valores do número de células viáveis após tratamento das culturas de células com soluções na concentração de 250 µg/mL

Fontes de variação	GL	SQ	Variância	F _{calc}
Entre	4	3338,93	834,73	21,58
Dentro (resíduo)	29	1121,33	38,67
Total	33	4460,26

• significativo para $p < 0,05$

• $F \cong 2,70$

Tabela 2 – Análise da variância (ANOVA) dos valores do número de células viáveis após tratamento das culturas de células com soluções na concentração de 125 µg/mL

Fontes de variação	GL	SQ	Variância	F _{calc}
Entre	4	910,99	227,75	11,61*
Dentro (resíduo)	29	569,01	19,62
Total	33	1480,00

- significativo para $p < 0,05$
- $F \cong 2,70$

Tabela 3 – Teste de Tukey dos valores do número de células viáveis após tratamento das culturas de células com soluções na concentração de 250 µg/mL

A	número de células viáveis (%)	COMP.36	SPAX	COMP	F9
		74,50	77,25	85,00	98,50
F7	98,83	24,33*	21,58	13,83*	0,33
F9	98,50	24,00*	21,25	13,50*	-
COMP	85,00	10,50*	7,75	-	-
SPAX	77,25	2,75	-	-	-
COMP.36	74,50	-	-	-	-

- * = significativo para $p < 0,05$
- $S_x = (38,67/10)^{1/2} = 1,966$
- $Q \cong 4,12$
- $D = 4,12 \times 1,966 = 8,10$

Tabela 4 – Teste de Tukey dos valores do número de células viáveis após tratamento das culturas de células com soluções na concentração de 125 µg/mL

A	número de células viáveis (%)	COMP.36	SPAX	COMP	F9
		85,00	91,13	93,75	99,33
F7	99,67	14,67*	8,54*	5,92*	0,34
F9	99,33	14,33*	8,20*	5,58	-
COMP	93,75	8,75*	2,62	-	-
SPAX	91,13	6,13*	-	-	-
COMP.36	85,00	-	-	-	-

- * = significativo para $p < 0,05$
- $S_x = (19,62/10)^{1/2} = 1,4$
- $Q \cong 4,12$
- $D = 4,12 \times 1,4 = 5,77$

Discussão

Vários autores descrevem as fluoroquinolonas como substâncias capazes de causar fototoxicidade. Trabalhos recentes descrevem o lomefloxacino, fluoroquinolona comercializada no Brasil e em outros países, como substância fotogenotóxica, fotomutagênica e fototumorigênica, capaz de induzir a formação de tumores dermatológicos em camundongos.^{19,20} Traynor et al.^{19,20} sugerem que o ciprofloxacino e o lomefloxacino são quinolonas tumorigênicas que danificam o DNA nos queratinócitos causando a iniciação dos tumores.

Em razão de a fototoxicidade ser uma das principais reações adversas relatadas para os compostos quinolônicos, este estudo investigou a capacidade de esparfloxacino e seus produtos de fotodegradação induzirem efeitos citotóxicos.

A escolha da lâmpada utilizada para fotodecomposição do esparfloxacino fundamentou-se nas duas leis básicas da fotoquímica, nas quais somente a luz absorvida é capaz de iniciar um processo fotoquímico. A caracterização dos principais produtos de fotodegradação, realizada em cromatografia em camada delgada e cromatografia líquida de alta eficiência, permitiu observar a degradação da amostra em um curto espaço de tempo.

Segundo STITES,¹⁵ a proliferação de linfócitos *in vitro*, que verifica a viabilidade celular, pode servir de modelo para a avaliação da atividade imunológica de indivíduos, como também para a avaliação de efeitos imunomoduladores de diversas substâncias. Os linfócitos são constituintes importantíssimos do sistema imunológico, sendo responsáveis pelo reconhecimento do antígeno, entrando em intensa atividade metabólica e desencadeando uma série de reações até atingirem a proliferação das células T e a multiplicação e transformação das células B em plasmócitos secretores de imunoglobulinas.¹

Os ensaios de citotoxicidade foram realizados com soluções de esparfloxacino (SPAX), esparfloxacino comprimidos (SPAX-COMP), comprimidos submetidos à degradação durante 36 horas (SPAX-COMP.36) e com as substâncias isoladas, codificadas como 7 e 9, em concentrações de 250; 125; 62,5 e 31,25 µg/mL. As soluções SPAX, SPAX-COMP e SPAX-COMP.36 em concentrações de 250 e 125 µg/mL reduziram significativamente o número de células viáveis nestas condições, demonstrando a possível citotoxicidade de tais amostras. Entretanto, este resultado não foi observado para as soluções das substâncias 7 e 9, o que sugere que estes produtos sejam menos citotóxicos

do que o esparfloxacino substância de referência e esparfloxacino comprimidos, nas condições empregadas. O isolamento de tais produtos foi realizado por cromatografia líquida de alta eficiência semipreparativa⁶ e a identificação estrutural destes fotoprodutos está sendo analisada por espectrometria de ressonância magnética nuclear de ¹H e ¹³C e espectrometria na região de infravermelho.

Agradecimentos

Agradecemos à Dainippon Pharmaceutical Company Ltd. do Japão, e ao Dr. Michel Pease da Rhône-Poulenc Rorer, dos Estados Unidos, pela doação da amostra de esparfloxacino substância de referência; e à Capes-PICDT, de Brasília.

MARONA, H. R. N.; SCHAPOVAL, E. E. S.; NARDI, N. B. Cytotoxic activity of sparfloxacin and its degradation products in mononuclear human blood cells. *Rev. Ciênc. Farm.*, São Paulo, v.23, n. 2, p.227-238, 2002.

- **ABSTRACT:** Sparfloxacin, a difluorquinolone derivative, is a potent antibacterial agent active against a wide range of gram-positive and gram-negative organisms including *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, methicillin resistant *S. aureus*, *Legionella spp.*, *Mycoplasma spp.*, *Chlamydia spp.* and *Mycobacteria*. A drawback of fluorquinolones is their photoreactivity. Sparfloxacin has been studied in terms of therapeutic activities. However, few reports about analytical methods of sparfloxacin are available in the literature. The aim of this study was to determine cytotoxic effects, using sparfloxacin reference substance (SPAX-SR), sparfloxacin tablets (SPAX-COMP) and sparfloxacin tablets submitted UV light during 36 hours (SPAX-COMP.36) solution, and two isolated products (7 and 9) of SPAX-SR submitted UV-C light, in concentrations of 31.25, 62.5, 125 and 250 µg/mL by in vitro mononuclear humane culture cells. The results, statistically analyzed by Teste de Tukey, showed SPAX, SPAX-COMP and SPAX-COMP.36 solutions could reduce the cells number in these conditions. These results could not be observed for products 7 or 9. These results can suggest that isolated product can be less cytotoxic than SPAX-SR, is method can also be used to identified products degradation of sparfloxacin in stability study. However, the low activity achieved with sparfloxacin submitted to UV-light is a source of concern and requires further investigation about its photodegradation mechanism.

- **KEYWORDS:** *Antibacterial substances; cytotoxic activity; sparfloxacin fluorquinolones; quinolones.*

Referências bibliográficas

- 1 ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; POBER, J. S. *Cellular and molecular immunology*. 4.ed. Philadelphia: W. B. Saunders, 2000. 553p.
- 2 AUBIER, M. et al. Sparfloxacin for the treatment of community-acquired pneumonia: a pooled data analysis of two studies. *J. Antimicrob. Chemother.*, v.37, suppl. A, p.73-82, 1996.
- 3 COOPER, M. A. et al. *In vitro* activity of sparfloxacin, a new quinolone antimicrobial agent. *J. Antimicrob. Chemother.*, v.26, n.5, p.667-676, 1990.
- 4 FERGUSON, J.; DAWE, R. Phototoxicity in quinolones: comparison of ciprofloxacin and grepafloxacin. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v.40, Suppl. A, p.93-98, 1997.
- 5 GOA, K. L.; BRYSON, H. M.; MARKHAM, A. Sparfloxacin: A review of its antibacterial activity, pharmacokinetic properties, clinical efficacy and tolerability in lower respiratory tract infections. *Drugs*, v.53, n.4, p.700-725, 1997.
- 6 MARONA, H. R. N. et al. Photodegradation of sparfloxacin and its degradation products isolation using preparative HPLC. *Acta Pharm. Turcica*, v.44, suppl., p.99, 2002.
- 7 MARTINDALE: the complete drug reference. 32.ed. London: Pharmaceutical Press, 1999.
- 8 ROBERTSON, D. G. et al. Mechanistic studies of the phototoxic potential of PD 117596, a quinolone antibacterial compound. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, v.111, n.2, p.221-232, 1991.
- 9 SHIMADA, J.; NOGITA, T.; ISHIBASHI, Y. Clinical pharmacokinetics of sparfloxacin. *Clin. Pharmacokinet.*, v.25, n.5, p.358-369, 1993.
- 10 SNEDECOR, G. W. *Statistical methods*. 5th.ed. Ames: The Iowa State University Press, 1956.
- 11 SPARFLOXACIN: focus on clinical performance. *J. Antimicrob. Chemother.*, v.37, suppl.A, p.1-160, 1996.
- 12 SPARFLOXACIN SPARA® ZAGAM®. *Drugs Future*, v.19, n.5, p.524-526, 1994.
- 13 SPARFLOXACIN SPARA® ZAGAM®. *Drugs Future*, v.22, n.5, p.575-577, 1997.
- 14 SPARFLOXACIN SPARA® ZAGAM®. *Drugs Future*, v.24, n.5, p.581, 1999.
- 15 STITES, D. P. Laboratory evaluation of immune competence. In: STITES, D. P.; TERR, A. I.; PARSLow, T. G. *Basic and clinical immunology*. 8.ed. Norwalk: Appleton & Langes, 1994.
- 16 THOMA, K.; KÜBLER, N. Photoinstabilität von Arzneistoffen und ihre analytischen Nachweismöglichkeiten. *Die Pharmazie*, v.51, n.9, p.919-923, 1996.

- 17 THOMA, K.; KÜBLER, N. Untersuchungen zur Photostabilität von Gyrasehemmern. *Die Pharmazie*, v.52, n.7, p.519-529, 1997.
- 18 TILLOTSON, G. S. Quinolones: structure-activity relationships and future predictions. *J. Med. Microbiol.*, v.44, n.5, p.320-324, 1996.
- 19 TRAYNOR, N. J. et al. Fluorquinolone photogenotoxicity in human keratinocytes: involvement of photoproducts and H₂O₂. *Br. J. Dermatol.*, v.140, p.784, 1999.
- 20 TRAYNOR, N. J.; GIBBS, N. K. The phototumorigenic fluorquinolone lomefloxacin photosensitizes pyrimidine dimer formation in human keratinocytes *in vitro*. *Photochem. Photobiol.*, v.70, n.6, 2000. (In press).
- 21 VERMEERSCH, G. et al. Evaluation photophysique du pouvoir photosensibilisant de diverses quinolones. *J. Pharm. Belg.*, v.45, n.5, p.299-305, 1990.
- 22 WAGAI, N.; TAWARA, K. Important role of oxygen metabolites in quinolone antibacterial agent induced cutaneous phototoxicity in mice. *Arch. Toxicol.*, v.65, p.495-499, 1991.
- 23 WAGAI, N.; TAWARA, K. Possible direct role of reactive oxygens in the cause of cutaneous phototoxicity induced by five quinolones in mice. *Arch. Toxicol.*, v.66, n.6, p.392-397, 1992.
- 24 WAGAI, N.; YOSHIDA, M.; TAKAYAMA, S. Phototoxic potential of the new quinolone antibacterial agent levofloxacin in mice. *Arzneim. Forsch. Drug Res.*, v.42, n.3a, p.404-405, 1992.

Recebido em 5.2.2002.