

Artigo

# Estudo de solubilidade do antimicrobiano norfloxacinó em diferentes meios biorrelevantes

Samantha Nascimento Gomes, Thalita Fátima de Re, Camila Nogueira Pacentchuk, Larissa Sakis Bernardi e Paulo Renato de Oliveira\*

<sup>1</sup> Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Departamento de Farmácia, Universidade Estadual do Centro-Oeste/UNICENTRO, Guarapuava 85040-080, PR, Brasil.

\* Autor Correspondente: [proliveira@unicentro.br](mailto:proliveira@unicentro.br); Tel.: +554236298137

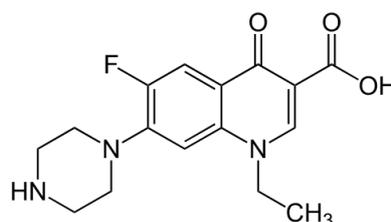
**Resumo:** O norfloxacinó (NFX) é uma fluoroquinolona de segunda geração amplamente utilizada como antibacteriano para tratar infecções do trato urinário. Este estudo investigou sua solubilidade em diferentes fluidos biorrelevantes, incluindo fluido gástrico simulado (FGS) pH 1,2, tampão acetato (TA) pH 4,5, fluido intestinal simulado (FIS) pH 6,8 e água ultrapura. A solubilidade do NFX mostrou-se pH-dependente, com aumento em pHs abaixo de 5, redução em pHs mais elevados. Em FGS a solubilidade foi de  $12,23 \pm 1,18$  mg/mL, em TA de  $6,59 \pm 0,50$  mg/mL, em FIS de  $0,50 \pm 0,09$  mg/mL e em água ultrapura de  $0,32 \pm 0,06$  mg/mL. Confirmou-se o padrão de solubilidade pH-dependente do fármaco, ressaltando a importância deste parâmetro na solubilidade do NFX. A disponibilidade na literatura de dados da solubilidade em meios biorrelevantes é importante para o desenvolvimento seguro de formulações farmacêuticas, especialmente para fármacos sensíveis às variações de pH em ambientes fisiológicos específicos.

**Palavras-chave:** norfloxacinó; solubilidade; meios biorrelevantes

## 1. Introdução

O norfloxacinó (NFX) (Figura 1) é uma molécula sintética de fluoroquinolona de segunda geração que teve sua aprovação pela *Food and Drugs Administration* (FDA) no ano de 1986, destinada para utilização como um fármaco antibacteriano de amplo espectro para infecções do trato urinário, incluindo as cistites e prostatites [1]. Possui registro no *Chemical Abstracts Service* (CAS) com o número 70458-96-7, tendo como nome empírico C<sub>16</sub>H<sub>18</sub>FN<sub>3</sub>O<sub>3</sub> e nome sistemático ácido 1-etil-6-fluoro-1,4-di-hidro-4-oxo-7-(piperazinil)quinolina-3-carboxílico. Sua massa molar é igual a 319,34 g mol<sup>-1</sup> e ele se apresenta como um pó cristalino e inodoro, branco ou amarelo claro [2].

**Figura 1.** Estrutura química do Norfloxacinó.



**Editores:** Carlos Henrique Salvino e João Augusto Oshiro Junior

Recebido: 01/02/2024

Revisado: 10/05/2024

Aceito: 22/07/2024

Publicado: 09/10/2024

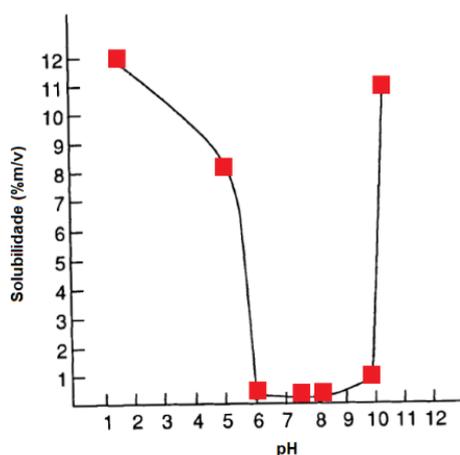
**Copyright:** © 2024 by the authors. Submitted for possible open access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

As quinolonas de forma geral agem inibindo a atividade de duas enzimas bacterianas essenciais, a topoisomerase do tipo IIA (DNA girase) e a topoisomerase IV, que são intimamente envolvidas na modulação do superenrolamento cromossômico necessário para a síntese de DNA bacteriano, transcrição e divisão celular. Esses fármacos aprisionam essas enzimas no estágio de clivagem do DNA e impedem a junção das fitas, ligando-se reversivelmente a interface enzima-DNA bloqueando fisicamente a ligação das fitas de DNA bacteriano. O resultado disso é que o mecanismo de replicação de DNA bacteriano é bloqueado, levando à inibição da síntese de DNA que causa imediatamente um resultado bacteriostático [3, 4].

Inicialmente, as quinolonas eram usadas principalmente no tratamento de infecções Gram-negativas, mas posteriormente foram modificadas para melhorar suas propriedades farmacocinéticas e ampliar seu espectro antibacteriano, tornando-se eficaz contra uma ampla variedade de patógenos Gram-negativos e Gram-positivo [5, 6]. A segunda geração das quinolonas, que incluem fármacos como o NFX e o ciprofloxacino, possui um átomo de flúor na posição 6, que é responsável pela potência nas ligações com as enzimas DNA girase e topoisomerase IV e um volumoso núcleo piperazínico na posição 7, responsável pelo aumento do espectro antimicrobiano também para organismos Gram-positivos e atividade antipseudomonas das fluoroquinolonas [4].

Após avaliar a existência de divergências quanto aos valores de pKa descritos na literatura Mendes e colaboradores (2015) determinaram experimentalmente através de titulações potenciométricas a existência de quatro valores diferentes de pKa para o NFX, sendo eles 3,1; 6,1; 8,6 e 11,3 variando de acordo com pH ao qual o fármaco é exposto [7]. O fato de o NFX apresentar diferentes formas em diferentes pHs o torna um fármaco com solubilidade dita pH-dependente, aumentando acentuadamente tanto com a diminuição do pH abaixo de 5 quanto com um aumento do pH acima de 10, apresentando um perfil de solubilidade de acordo com pH em formato de “U” (Figura 2) [8]. Isso se explica pelo fato de que em pH abaixo de 5 o fármaco estará na sua forma catiônica; em pH acima de 10 na sua forma aniônica e em pH entre 6 e 10 será predominantemente um zwitterion, onde o nitrogênio 4' estará protonado e o grupo carboxílico desprotonado, o que explica a sua solubilidade reduzida entre os pHs 6 e 10. Devido a essa alta solubilidade em meio ácido, a solubilização e absorção do fármaco no estômago ou na parte proximal do intestino delgado influenciam a biodisponibilidade [7, 8].

**Figura 2.** Perfil de solubilidade pH-dependente do NFX a 25 °C.



Adaptada de: (Mazuel, 1991b).

Ao que se refere a permeabilidade do NFX através das membranas Mendes e colaboradores (2018) são referência e foram os primeiros a demonstrar a diferença de permeabilidade entre os segmentos intestinais e também os transportadores de efluxo e de captação envolvidos, através da utilização de câmara de Ussing [9]. Este importante estudo

revelou que a permeabilidade NFX ao longo do intestino, que ocorre através de um transporte ativo, segue uma ordem decrescente de íleo > jejuno > duodeno > cólon, contrariando o anteriormente descrito na literatura, que cita uma maior absorção das fluoroquinolonas no duodeno [9, 10]. Esta diferença entre os segmentos é atribuída aos transportadores que são expressos diferentemente ao longo do trato intestinal, conforme foi descrito por Englund e colaboradores [11]. Ao analisar o transporte abaixo de 4 °C, onde as bombas de efluxo não estão ativas, a permeabilidade aparente chegou a aproximadamente zero, confirmando que a permeabilidade do NFX é dependente dos transportadores [9,12].

Como resultado do estudo, Mendes e colaboradores (2018) demonstraram que os transportadores BCRP e MRP2 são relacionados ao efluxo de NFX enquanto PEPT1, PMAT e OCT1 ao transporte de captação de NFX. Além disso o estudo demonstrou que o NFX possui afinidade por OCTN e OATP, que podem "consumir" NFX e, conseqüentemente, diminuir a quantidade de NFX capaz de permear, além de inibir esses transportadores e influenciar a absorção de outras drogas que os utilizem. A prevalência de PEPT1 na mesma ordem de classificação das regiões intestinais envolvidas revelou a importância deste transportador de captação na permeabilidade de NFX [9].

Diante da complexidade intrínseca do NFX e das implicações diretas de suas características farmacocinéticas na absorção e biodisponibilidade, torna-se essencial destacar a necessidade de conduzir estudos detalhados de solubilidade em fármacos que compartilhem semelhanças estruturais com este composto. O NFX, por sua natureza pH-dependente e capacidade de apresentar diferentes formas em diferentes faixas de pH, exemplifica um desafio significativo na formulação de medicamentos, uma vez que sua solubilidade varia dramaticamente em função do ambiente em que se encontra. Compreender essas nuances é crucial não apenas para otimizar a eficácia terapêutica do NFX, mas também para orientar o desenvolvimento de novos fármacos que possam apresentar perfis de solubilidade semelhantes. A avaliação minuciosa dessas propriedades é fundamental para a inovação na pesquisa farmacêutica, garantindo a entrega consistente e eficiente de princípios ativos, além de minimizar potenciais efeitos adversos e aprimorar a segurança do paciente.

O objetivo deste trabalho foi analisar a solubilidade do antimicrobiano norfloxacino em diferentes fluidos biorrelevantes como o fluido gástrico simulado sem enzimas (pH 1,2), tampão acetato (pH 4,5), fluido intestinal simulado sem enzimas (pH 6,8) e água (pH 7,0) com a finalidade de verificar a sua solubilidade pH dependente e obter valores em meios de dissolução importantes na área biofarmacotécnica.

## 2. Resultados

A Tabela 1 reúne algumas características importantes sobre o fármaco norfloxacino.

**Tabela 1.** Características diversas do Norfloxacino.

| Características                                    | Norfloxacino   |
|--|--|
| Nome empírico                                      | C <sub>16</sub> H <sub>18</sub> FN <sub>3</sub> O <sub>3</sub>                   |
| Nome sistemático                                   | Ácido 1-etil-6-fluoro-1,4-di-hidro-4-oxo-7-(piperazinil) quinolina-3-carboxílico |
| Registro CAS                                       | 70458-96-7   |
| Sigla  | NFX  |
| Apresentação                                       | Pó cristalino e inodoro, branco ou amarelo claro                                 |
| Massa Molecular                                    | 319,34 g mol <sup>-1</sup>   |
| Classe no Sistema de Classificação Biofarmacêutico | IV (baixa solubilidade e baixa permeabilidade)                                   |

|                                  |   |
|----------------------------------|---|
| Solubilidade aquosa              | 0,28 mg/mL (25 °C, pH 7,0)  |
| Solubilidade em outros solventes | Ácido acético glacial (340 mg/mL),<br>Clorofórmio (5,50 mg/mL), Acetona<br>(5,10 mg/mL), Octanol (5,10 mg/mL) |
| PKa                              | 3,1; 6,1; 8,6 e 11,3  |
| Ponto de fusão                   | 221 °C  |

Fonte: [7, 8, 13, 14, 15].

Os pHs dos fluídos biorrelevantes e da água foram verificados por meio de pHmetro Edge (Hanna, Carrollton, Texas, EUA) que confirmou os pHs esperados para cada um dos meios analisados. Os resultados obtidos para o estudo de solubilidade levaram em conta o tempo em que a concentração do fármaco no meio atingiu o seu equilíbrio. Os valores das áreas sob a curva (ASC) fornecidos pelo cromatógrafo líquido de alta eficiência foram convertidos em solubilidade utilizando a equação da reta da curva de calibração do norfloxacinó  $y=128.761,54x+199.300,35$ . A solubilidade nos quatro diferentes meios está apresentada na Tabela 2.

**Tabela 2.** Solubilidade do norfloxacinó em diferentes fluídos biorrelevantes de acordo com os seus pHs.

| Fluído biorrelevante       | pH  | Solubilidade (mg/mL) |
|----------------------------|-----|----------------------|
| Fluído gástrico simulado   | 1,2 | 12,23±1,18           |
| Tampão Acetato             | 4,5 | 6,59±0,50            |
| Fluído intestinal simulado | 6,8 | 0,50±0,09            |
| Água ultra purificada      | 6,9 | 0,32±0,06            |

### 3. Discussão

Mazuel (1991) publicou um estudo demonstrando as propriedades do medicamento norfloxacinó, dentre elas ele relatou o fato de o NFX apresentar uma solubilidade pH dependente, ou seja, apresenta variações na sua solubilidade de acordo com o pH do meio ao qual é exposto. Quando exposto a pHs abaixo de 5, o fármaco se encontra em sua forma catiônica, o que faz com que aumente a sua solubilidade. Quando exposto a pHs acima de 10, o fármaco se encontra em sua forma ânionica, o que também faz com que ocorra um aumento da solubilidade. Quando exposto a pHs entre 6 e 10 o norfloxacinó comporta-se predominantemente como um zwitterion, onde o nitrogênio 4' encontra-se protonado e o grupo carboxílico desprotonado, o que explica a sua solubilidade reduzida [7, 8, 16].

A relevância da avaliação da solubilidade de medicamentos em fluídos biorelevantes é respaldada por compêndios oficiais, como a Farmacopeia Brasileira, a qual referência os seus preparos e seu procedimento experimental, e também pela resolução RDC nº 749/22 na qual tais fluídos são exigidos para avaliação de estudos de perfil de dissolução comparativa, sendo seus resultados defendidos para que os riscos inerentes sejam avaliados para a obtenção da bioequivalência de fármacos [2].

Os meios utilizados nas diversas farmacopeias para representar as condições do trato gastrointestinal foram projetados principalmente para refletir a diferença de pH entre o estômago e o intestino delgado a fim de testar se diferentes formas farmacêuticas orais poderiam liberar o ingrediente farmacêutico ativo conforme o pretendido. Além disso, outro aspecto analisado pode ser a fisiologia dos efeitos da ingestão de refeições na composição dos fluídos, motilidade e tempo de trânsito [17].

Através dos resultados obtidos neste trabalho, no qual utilizamos meios biorrelevantes para verificar a solubilidade do norfloxacinó, torna-se possível reforçar o que temos descrito na literatura a respeito da solubilidade deste fármaco, demonstrando que ele se mostra mais solúvel em pH abaixo de 5 (fluído gástrico e tampão acetato), tendo sua solubilidade reduzida quando exposto a meios com pH entre 6 e 10 (fluído intestinal simulado e água). Não pudemos comprovar o aumento da solubilidade do fármaco em pHs

acima de 10, uma vez que consideramos a utilização de fluidos biorrelevantes e nenhum fluido corporal apresenta um pH tão alcalino que se aproxime destes valores [18].

## 4. Materiais e Métodos

### 4.1. Materiais

O NFX (pureza > 99,8%) foi adquirido comercialmente em uma farmácia de manipulação local, fornecido pela distribuidora Via Farma (São Paulo, Brasil). A acetonitrila utilizada nas análises de HPLC (pureza > 99,5%) foi obtida da Sigma Aldrich (Estocolmo, Suécia) e o ácido fosfórico também presente na fase móvel da análise por HPLC (pureza > 99,5%) foi obtido da empresa Labsynth (São Paulo, Brasil).

### 4.2. Preparo dos fluidos biorrelevantes

#### 4.2.1. Fluido gástrico simulado sem enzima (pH 1,2)

Para o preparo do fluido gástrico simulado sem enzima (pH 1,2) foram pesados em balança analítica Shimadzu AUX220 (Shimadzu, Kyoto, Japão) 2,0 g de cloreto de sódio e dissolvidos em 7,0 mL de ácido clorídrico e transferidos para um balão volumétrico de 1 L, sendo o volume completado com água ultrapurificada.

#### 4.2.2. Tampão Acetato (pH 4,5)

Para o preparo do tampão acetato (pH 4,5) foram pesados 2,99 g de acetato de sódio triidratado e 14,0 mL de ácido acético 2,0 mol/L em um balão volumétrico de 1 L, sendo o volume completado com água ultrapurificada.

#### 4.2.3. Fluido intestinal simulado sem enzimas (pH 6,8)

Para o preparo do fluido intestinal simulado sem enzimas (pH 6,8) foram adicionados 250,0 mL de uma solução de fosfato de potássio monobásico 0,2 mol/L e 112,0 mL de uma solução de hidróxido de sódio 0,2 mol/L em um balão volumétrico de 1 L, sendo o volume completado com água ultrapurificada.

### 4.3. Estudo de solubilidade

O NFX utilizado neste estudo foi o princípio ativo puro, adquirido comercialmente em uma farmácia de manipulação local, cujo fornecedor é a Via Farma (São Paulo). A solubilidade do norfloxacino foi analisada em triplicata de acordo com os parâmetros estabelecidos para o Sistema de Classificação Biofarmacêutico nos pHs 1,2; 4,5; 6,8. A solubilidade foi determinada por meio da adição de um excesso de fármaco em erlenmeyers de 250 mL contendo 100 mL de água e de meios, as quantidades de NFX utilizadas foram de 70 mg em água, 100 mg em fluido intestinal simulado, 1500 mg em tampão acetato e 2500 mg em fluido gástrico simulado, que foram mantidos sob agitação em incubadora Shaker nl-343-01 (New Lab, São Paulo, Brasil) durante 72h à temperatura de  $37,0 \pm 0,2$  °C. Após intervalos de 24, 48 e 72 horas, as alíquotas foram coletadas com um volume de 5 mL e filtradas em filtro de seringa Nylon 0,45 µm (Sterlitech, Washington, EUA). Para o estudo de solubilidade em água ultrapura o mesmo procedimento foi realizado, porém a uma temperatura de  $25,0 \pm 0,2$  °C. As amostras foram diluídas e analisadas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) (Shimadzu, Kyoto, Japão) para determinar a solubilidade do fármaco em cada meio, sendo este resultado obtido utilizando a equação da reta da curva de calibração do norfloxacino.

### 4.4. Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

A metodologia utilizada para execução dos métodos da CLAE para a quantificação do norfloxacino seguiu o descrito por Oliveira e colaboradores [19]. A coluna cromatográfica utilizada foi a coluna Luna® C18 150x4,6 mm, a fase móvel foi composta por acetonitrila:ácido fosfórico 0,04 M pH 3,0 (16:84, v/v), a vazão foi de 1,0 mL min<sup>-1</sup>, o volume de

injeção foi de 20 µL e a temperatura da análise foi de 40 °C. A análise foi realizada no modo isocrático e os resultados analisados em um comprimento de onda de 272 nm.

## 5. Conclusão

Ao utilizar meios biorrelevantes, este estudo reforçou as descobertas anteriores sobre o comportamento pH-dependente do norfloxacin, acrescentando dados específicos para solubilidade em fluidos simulados. A confirmação desses padrões de solubilidade é crucial para o desenvolvimento adequado de formulações farmacêuticas, especialmente para medicamentos que apresentam variações significativas em diferentes condições de pH. Essas informações são fundamentais para garantir a eficácia terapêutica e a segurança dos pacientes ao administrar o norfloxacin ou formulações relacionadas em ambientes específicos do corpo humano.

**Conflito de Interesse:** Os autores declaram não haver conflito de interesses.

## Referências

1. Kamble, R., Sharma, S., & Mehta, P. (2017). Norfloxacin mixed solvency based solid dispersions : An in-vitro and in-vivo investigation. *Integrative Medicine Research*, 11(3), 512–522. <https://doi.org/10.1016/j.jtusci.2016.11.003>
2. Anvisa, A. N. de V. S.-. (2019). Norfloxacin. In *Farmacopéia Brasileira 6aa edição* (pp. IF272-00).
3. Hooper, D. C., & Jacoby, G. A. (2016). Mechanisms of Action and Resistance. 1–21.
4. Jia, Y., & Zhao, L. (2021). The antibacterial activity of fluoroquinolone derivatives: An update (2018-2021). *European Journal of Medicinal Chemistry*, 224, 113741. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2021.113741>
5. Aldred, K. J., Kerns, R. J., & Oshero, N. (2014). Mechanism of Quinolone Action and Resistance.
6. Redgrave, L. S., Sutton, S. B., Webber, M. A., & Piddock, L. J. V. (2014). Fluoroquinolone resistance : mechanisms, impact on bacteria, and role in evolutionary success. *Trends in Microbiology*, Figure 2, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2014.04.007>
7. Mendes, C., Buttchevitz, A., Barison, A., Ocampos, F. M. M., Bernardi, L. S., Oliveira, P. R., & Silva, M. A. S. (2015). Investigation of  $\beta$ -cyclodextrin-norfloxacin inclusion complexes. Part 2. Inclusion mode and stability studies. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, 13(1), 131–140. <https://doi.org/10.1586/14787210.2015.982092>
8. Mazuel, C. (1991). Norfloxacin. *Pharmaceutical Research & Development*, 20, 557–600.
9. Mendes, C., Meirelles, G. C., Silva, M. A. S., & Ponchel, G. (2018). Intestinal permeability determinants of nor fl oxacin in Ussing chamber model. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 121(May), 236–242. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2018.05.030>
10. Nix, E., & Schentag, J. (1988). The Quinolones: Comparative Pharmacokinetics An Overview and Appraisal of Their and Pharmacodynamics and. *J Clin Pharmacol*, 28, 169–178.
11. Englund, G., Rorsman, F., Anders, R., Karlbom, U., Kindmark, A., Artursson, P., Lazorova, L., & Gr, J. (2006). Regional levels of drug transporters along the human intestinal tract : Co-expression of ABC and SLC transporters and comparison with Caco-2 cells. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 29, 269–277. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2006.04.010>
12. Kato, K., Shirasaka, Y., Kuraoka, E., Kikuchi, A., Iguchi, M., Suzuki, H., Shibasaki, S., & Kurosawa, T. (2016). articles Intestinal Absorption Mechanism of Tebipenem Pivoxil , a Novel Oral Carbapenem : Involvement of Human OATP Family in Apical Membrane Transport. *Molecular Pharmaceutics*, 7(5), 1747–1756.
13. Ahumada, A. A., Seek, J., Allemanni, D., & Manzo, R. H. (1993). The pH / solubility profile of norfloxacin. *S.T.P. Pharma Sciences*, 3(3), 250–253.
14. Basavoju, S., Bostro, D., & Velaga, S. P. (2006). Pharmaceutical Cocystal and Salts of Norfloxacin. *Crystal Growth & Design*, 6(12), 2699–2708.
15. Yu, Y., Li, T., Hu, Y., & Yang, W. (2017). Fluid Phase Equilibria Equilibrium study and diversified models of drug Norfloxacin in eight pure organic and binary solvents at T  $\frac{1}{4}$  ( 278 . 15 e 328 . 15 ) K. 435. <https://doi.org/10.1016/j.fluid.2016.12.012>
16. Oliveira, P.R., Bernardi, L. S., Strusi, O. L., Mercuri, S., Segatto Silva, M. A., Colombo, P., & Sonvico, F. (2011). Assembled modules technology for site-specific prolonged delivery of norfloxacin. *International Journal of Pharmaceutics*, 405(1–2), 90–96. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2010.11.050>
17. Dressman, J. (2020). Biorelevant media. In *Solubility in Pharmaceutical Chemistry* (p. 351).
18. Tortora, G. J., & Derrickson, B. (2018). *Principles of Anatomy & Physiology* (16th ed.). Wiley.
19. Oliveira, Paulo R, Bernardi, L. S., Mendes, C., Cardoso, S. G., Sangoi, M. S., & Silva, M. A. S. (2009). Liquid Chromatographic Determination of Norfloxacin in Extended-Release Tablets. *Journal of Chromatographic Science*, 47, 739–744.

**Isenção de Responsabilidade/ Nota do editor:** As declarações, opiniões e dados contidos em todas as publicações são exclusivamente do(s) autor(es) individual(is) e não da BIOFARM e/ou dos editores(es). A BIOFARM e/ou o(s) editor(es) isentam-se de responsabilidade por qualquer dano a pessoas ou propriedades resultante de quaisquer ideias, métodos, instruções ou produtos referidos no conteúdo.