

## DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS PARA DETERMINAÇÃO DE ÁCIDO GLICIRRÍZICO, ÁCIDO SALICÍLICO E CAFEÍNA EM NANOPARTÍCULAS DE QUITOSANA E ALGINATO

Monika P. Tagliari\*, Andréa Granada, Gislaine Kuminek, Hellen K. Stulzer e Marcos A. S. Silva

Departamento de Ciências Farmacêuticas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Catarina, 88040-900 Florianópolis - SC, Brasil

Recebido em 9/9/11; aceito em 20/12/11; publicado na web em 2/3/12

DEVELOPMENT AND VALIDATION OF ANALYTICAL METHOD FOR DETERMINATION OF GLYCYRRHIZIC ACID, SALICYLIC ACID, AND CAFFEINE IN CHITOSAN-ALGINATE NANOPARTICLES. The present work consists of the development and validation of analytical method for evaluation of glycyrrhizic acid, salicylic acid, and caffeine in chitosan-alginate nanoparticles by high performance liquid chromatography. Method validation investigated parameters such as linearity, precision, accuracy, robustness and specificity, which gave results within the acceptable range. The methods were applied to nanoparticles suspensions containing the drugs and were able to determine the entrapment efficiency successfully. The best entrapment efficiency was achieved with the glycyrrhizic acid (95.4%).

Keywords: method validation; high performance liquid chromatography; nanoparticles.

## INTRODUÇÃO

As nanopartículas podem ser definidas como partículas sólidas coloidais com tamanho inferior a 1,0  $\mu\text{m}$ , que carregam a substância ativa, e podem ser preparadas por meio de vários métodos físico-químicos.<sup>1</sup> Na técnica de coacervação complexa, também chamada de complexação de polieletrólitos, ocorre a interação de dois ou mais polieletrólitos carregados opostamente induzida por modificações no meio.<sup>2</sup> Esta técnica é particularmente interessante, pois polieletrólitos poliméricos são biodegradáveis e degradam lentamente, não alteram a função celular e utilizam água como solvente, o que é uma grande vantagem para produtos farmacêuticos.<sup>3</sup> Na literatura são descritos diversos trabalhos utilizando os polímeros quitosana e alginato de sódio na formação de nanopartículas por meio de polimerização ou interação iônica.<sup>4-8</sup>

A quitosana é um copolímero formado por unidades de 2-desoxi-N-acetil-D-glucosamina e 2-desoxi-D-glucosamina, obtida a partir da desacetilação da quitina em meio alcalino.<sup>9</sup> É um polieletrólito catiônico que possui grupamentos amino ao longo de sua cadeia, os quais têm um pKa entre 6-6,5.<sup>10</sup> O alginato de sódio é um sal de ácido alginico e é um polímero aniônico solúvel em água. O ácido alginico é extraído de algas marinhas pardas, formado de resíduos de ácido  $\beta$ -D-manurônico e ácido  $\alpha$ -L-gulurônico.<sup>11</sup>

O sistema nanoparticulado contendo quitosana e alginato de sódio desenvolvido neste trabalho foi utilizado para encapsulação de três fármacos com características físico-químicas diferentes: ácido glicirrízico, ácido salicílico e cafeína (Figura 1).

O ácido glicirrízico ((3 $\beta$ , 20 $\beta$ )-20-carboxi-11-oxo-30-norlean-12-en-3-il-2- $\alpha$ - $\beta$ -17-glucopiranuronosil- $\alpha$ -D-ácido glucopiranosidurônico) é o principal componente ativo da raiz de alcaçuz (*Glycyrrhiza uralensis*, Fisch).<sup>12</sup> É um ácido fraco solúvel em água com três valores de pKa (pKa1 = 2,7; pKa2 = 2,8; pKa3 = 4,7).<sup>13</sup> Possui massa molar de 822,92 g/mol e fórmula molecular C<sub>42</sub>H<sub>62</sub>O<sub>16</sub>. O extrato de alcaçuz pode conter de 10 a 25% de ácido glicirrízico.<sup>14</sup> O ácido salicílico (ácido 2-hidroxibenzoico) é um beta-hidroxi ácido com valor de pKa de 2,8, o que o torna um ácido fraco, solúvel em água, apresentando atividade anti-inflamatória e antimicrobiana.<sup>15</sup>

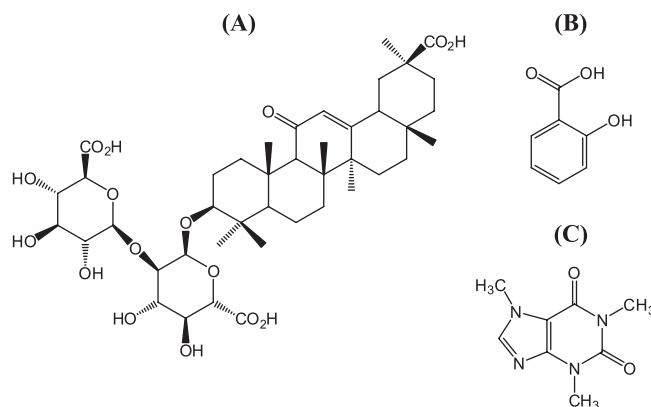


Figura 1. Estrutura química do ácido glicirrízico (A); ácido salicílico (B) e cafeína (C)

Possui massa molar de 138,1 g/mol e fórmula molecular C<sub>7</sub>H<sub>6</sub>O<sub>3</sub>.<sup>16</sup> A cafeína (1,3,7-trimetilxantina) é um estimulante do sistema nervoso central e diurético, sendo também aplicada externamente em formulações tópicas. É uma base fraca, solúvel em água e apresenta pKa de 8,3.<sup>17</sup> Possui massa molar de 194,2 g/mol e fórmula molecular C<sub>8</sub>H<sub>10</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub>.<sup>16</sup>

A quantificação do ácido glicirrízico, do ácido salicílico e da cafeína em diferentes sistemas de liberação já foi realizada com sucesso através de técnicas como espectrofotometria UV-vis, espectrofluorescência e cromatografia líquida de alta eficiência.<sup>18-25</sup> Entretanto, por se tratar de um novo sistema nanoparticulado, diferentes métodos analíticos utilizando cromatografia líquida de alta eficiência foram desenvolvidos para a quantificação dos fármacos. Após o desenvolvimento de um método e antes de sua aplicação na análise de amostras de interesse, o mesmo precisa ser validado, de forma que, nas condições em que será utilizado, gere os resultados esperados.<sup>26,27</sup> Conseqüentemente, o objetivo deste trabalho foi desenvolver e validar métodos analíticos para a determinação dos ácidos glicirrízico e salicílico e da cafeína em nanopartículas de quitosana e alginato de sódio obtidas através da técnica de complexação de polieletrólitos.

\*e-mail: monikatag@gmail.com

## PARTE EXPERIMENTAL

### Materiais

A quitosana (QUI; 122,3 kg/mol, grau de desacetilação: 85%) foi obtida da empresa Purifarma (São Paulo, Brasil). O alginato de sódio (ALG; 200,0 kg/mol) e o tripolifosfato de sódio (TPP) foram obtidos da Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemanha). O ácido glicirrízico (AG) e o ácido salicílico (AS) foram obtidos da DEG (São Paulo, Brasil), e a cafeína (CF) da Valdequímica (São Paulo, Brasil). Os fármacos foram previamente analisados quanto a sua identidade e pureza e foram utilizados como padrões de referência secundários.

A água purificada foi obtida através de sistema Milli-Q (Millipore Corporation®). A acetonitrila e o metanol utilizados foram grau CLAE (Tedia®). Outros solventes e reagentes empregados foram de grau analítico.

### Equipamento

As análises foram realizadas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) utilizando um cromatógrafo Shimadzu LC-10A (Kyoto, Japão), equipado com bombas LC-10AD, detector UV/VIS SPD-10AV<sub>VP</sub>, detector de arranjo de fotodiodos SPD-M10A<sub>VP</sub>, unidade de controle SCL-10A<sub>VP</sub>, autoinjeter Jasco AS-2055 Plus e software Class VP<sup>a</sup> V 6.14.

### Preparação de nanopartículas

Inicialmente foram preparadas soluções estoque de QUI (2,0 mg/mL) em ácido acético 1,0% (v/v) e de ALG (2,0 mg/mL) e TPP (5,0 mg/mL) em água. As soluções foram filtradas a vácuo. O processo de formação das nanopartículas foi realizado a 25 °C, sob agitação magnética, em um único estágio. Para cada fármaco, foi preparada uma solução de 1,0 mg/mL em água. Gotejaram-se 6,0 mL de cada solução de fármaco em 24 mL de solução de QUI (0,9 mg/mL), sob agitação magnética. A esta solução adicionaram-se 6,0 mL de solução contendo ALG (1,2 mg/mL) e TPP (1,0 mg/mL). As suspensões de nanopartículas foram mantidas sob agitação magnética por 1 h e filtradas em papel de filtro. As formulações foram nomeadas conforme o fármaco utilizado: NP<sub>AG</sub> (nanopartículas com ácido glicirrízico), NP<sub>AS</sub> (nanopartículas com ácido salicílico) e NP<sub>CF</sub> (nanopartículas com cafeína).

### Preparação das soluções estoque de fármacos

As soluções estoque (1,0 mg/mL) de AG, AS e CF foram preparadas dissolvendo-se 25,0 mg de cada fármaco em sua respectiva fase móvel, em balão volumétrico de 25 mL. A partir destas soluções foram preparadas as soluções de trabalho através de diluições com a fase móvel correspondente ao fármaco analisado.

### Desenvolvimento do método para quantificação do ácido glicirrízico

Para quantificação do ácido glicirrízico (AG) foi utilizada uma coluna de fase reversa C<sub>18</sub> Phenomenex Luna (250 x 4,6 mm, 5 µm) e o sistema mantido à temperatura de 25 ± 1 °C. Uma pré-coluna (4,0 x 3,0 mm) foi utilizada para proteger a coluna analítica.

A fase móvel consistiu numa mistura de metanol:tampão fosfato de potássio 0,025 M (60:40 v/v) adicionada de 5 mM de cloreto de tetrabutilamônio. As análises foram realizadas em modo isocrático, com fluxo de 1,2 mL/min, detecção UV a 254 nm e volume de injeção de 20 µL.

### Desenvolvimento do método de quantificação do ácido salicílico

Para quantificação do ácido salicílico (AS) foi utilizada uma coluna de fase reversa C<sub>18</sub> Phenomenex Luna (250 x 4,6 mm, 5 µm) e o sistema mantido à temperatura de 25 ± 1 °C. Uma pré-coluna (4,0 x 3,0 mm) foi utilizada para proteger a coluna analítica.

A fase móvel consistiu numa mistura de metanol:água (70:30 v/v) ajustada a pH 2,6. As análises foram realizadas em modo isocrático, com fluxo de 1,0 mL/min, detecção UV a 237 nm e volume de injeção de 20 µL.

### Desenvolvimento do método de quantificação da cafeína

Para quantificação da cafeína (CF) foi utilizada uma coluna de fase reversa C<sub>8</sub> Perkin-Elmer (150 x 4,6 mm, 5 µm) e o sistema mantido à temperatura de 25 ± 1 °C. A fase móvel consistiu numa mistura de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 0,01 M (ajustado a pH 2,8 com trietilamina):acetonitrila (90:10 v/v). As análises foram realizadas em modo isocrático, com fluxo de 1,0 mL/min, detecção UV a 262 nm e volume de injeção de 20 µL.

### Validação dos métodos

O processo de validação foi realizado para cada método analítico desenvolvido através dos seguintes parâmetros, de acordo com a ICH (*International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use*),<sup>28</sup> e resolução da ANVISA RE n° 899:<sup>26</sup> especificidade, linearidade, exatidão, precisão, robustez e limites de quantificação e detecção.

#### Especificidade

Para confirmar a especificidade do método, foi visualizada a ausência de interferências pelos excipientes que fazem parte das nanopartículas (QUI, ALG e TPP). Foram preparadas nanopartículas sem o fármaco (placebo) e analisadas nas mesmas circunstâncias experimentais das amostras na presença do fármaco. Além disso, a pureza do pico cromatográfico de cada fármaco foi obtida com auxílio de um detector de arranjo de fotodiodos.

#### Linearidade e limites de detecção (LD) e quantificação (LQ)

A linearidade foi determinada através da construção de três curvas de calibração para cada fármaco, em 3 dias diferentes. Para a construção de cada curva de calibração 6 concentrações de cada fármaco (5,0; 10,0; 25,0; 50,0; 75,0 e 100,0 µg/mL) foram preparadas nas suas respectivas fases móveis. Foram realizadas 3 injeções de 20 µL de cada solução para verificar a repetibilidade da resposta do detector em cada concentração.

O limite de detecção (LD) corresponde à menor concentração presente na amostra que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada. O limite de quantificação (LQ) corresponde à menor concentração que pode ser determinada quantitativamente com aceitável precisão e exatidão. Os LD e LQ foram calculados a partir da inclinação e do desvio padrão do intercepto da média de três curvas de calibração.

#### Exatidão

A exatidão do método foi avaliada por meio da contaminação de amostras de suspensões de nanopartículas (placebo) com soluções de concentração conhecida de cada fármaco, correspondendo a concentrações finais de 40,0; 50,0 e 60,0 µg/mL. A recuperação foi determinada como sendo a diferença percentual entre a concentração experimental média e a concentração teórica em cada nível.

### Precisão

A precisão foi determinada por meio da repetibilidade (intradia) e precisão intermediária (interdia). A repetibilidade foi avaliada analisando-se 6 amostras de nanopartículas (placebo) contaminadas com soluções de cada fármaco, correspondendo à concentração final de 50,0 µg/mL, no mesmo dia, nas mesmas condições experimentais. Na precisão intermediária as análises foram realizadas em 3 dias diferentes.

### Robustez

A robustez do método foi determinada através da análise de uma mesma amostra de nanopartículas (placebo) contaminada com soluções de cada fármaco (50,0 µg/mL), modificando-se os seguintes parâmetros do método: temperatura do forno, fluxo e composição da fase móvel.

### Determinação da eficiência de encapsulação, teor e recuperação

A determinação da concentração total de ativo associado às nanopartículas foi realizada pela técnica de ultrafiltração/centrifugação, na qual o ativo livre foi determinado no sobrenadante, enquanto o ativo total foi medido após completa dissolução das nanopartículas.<sup>29</sup> Para obter o sobrenadante, 0,5 mL de suspensão de nanopartículas foram centrifugadas a 6.000 rpm, durante 20 min, em unidades de centrifugação Amicon Ultra-0,5 (Ultracel®-100 K 100000 MW; Millipore, Irlanda). Para a determinação da concentração total de fármaco na suspensão de nanopartículas, 1,0 mL de cada suspensão foi mantida em contato com 1,0 mL de metanol durante 24 h para completa dissolução do complexo, seguida da diluição com a fase móvel correspondente para cada fármaco até volume de 10,0 mL (concentração total). A concentração de fármaco no sobrenadante e a concentração total na suspensão foram determinadas por CLAE.

A eficiência de encapsulação (EE %) foi estimada de acordo com a Equação 1.

$$EE (\%) = \frac{C_T - C_S}{C_T} * 100 \quad (1)$$

em que:  $C_T$  = concentração total de fármaco encontrada na suspensão após dissolução das nanopartículas;  $C_S$  = concentração de fármaco encontrada no sobrenadante.

O teor de fármaco nas suspensões foi expresso em µg/mL.

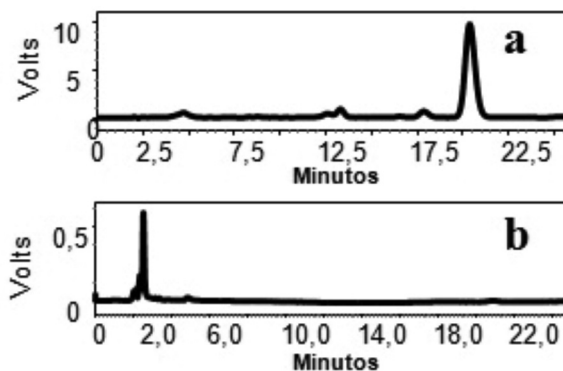
A taxa de recuperação (%) de cada fármaco foi calculada como sendo a diferença percentual entre a quantidade inicialmente adicionada e aquela encontrada nas suspensões.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Desenvolvimento do método para quantificação do ácido glicirrízico

O ácido glicirrízico (AG) é um ácido fraco com três valores de  $pK_a$  ( $pK_{a1} = 2,7$ ;  $pK_{a2} = 2,8$ ;  $pK_{a3} = 4,7$ ).<sup>13</sup> Assim, é um composto altamente ionizável que tende a apresentar caudas pronunciadas no pico cromatográfico, coeluição, e ser pouco retido em fase reversa, pois a forma ionizada tem maior afinidade pela fase móvel (mais polar). Desta forma, várias condições cromatográficas foram propostas para que apenas uma das formas da substância estivesse presente no momento da análise, na tentativa de se obter melhor assimetria e pureza do pico. Isto foi alcançado através da cromatografia com formação de pares de íons, onde o analito foi mantido na forma iônica, e um contraíon (tetrabutilamônio) foi adicionado à fase móvel. A melhor assimetria foi obtida com uma fase móvel contendo metanol, tampão fosfato de potássio 25,0 mM (pH 5,8) e tetrabutilamônio 5,0 mM.

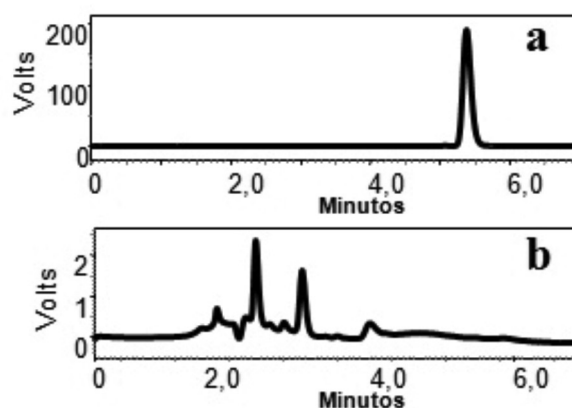
Nas condições otimizadas, o tempo de retenção do AG foi cerca de 20,0 min e um cromatograma típico obtido pelo método pode ser visualizado na Figura 2a.



**Figura 2.** Cromatogramas obtidos utilizando fase móvel constituída por metanol:tampão fosfato de potássio 25,0 mM (60:40 v/v) adicionada de 5,0 mM de tetrabutilamônio sob fluxo de 1,2 mL/min e detecção UV a 254 nm. (a) Suspensão de nanopartículas de ácido glicirrízico e (b) suspensão de nanopartículas de placebo

### Desenvolvimento do método para quantificação do ácido salicílico

O ácido salicílico (AS) é um ácido fraco com valor de  $pK_a$  próximo a 3,0, sendo necessária uma análise cuidadosa das condições cromatográficas de forma que, no momento da análise, esteja em sua forma não ionizada.<sup>15</sup> O ajuste do pH da fase móvel para 2,6 foi suficiente para a obtenção de uma boa assimetria de pico, com um tempo de retenção de cerca de 5,1 min. A Figura 3 apresenta um cromatograma típico obtido pelo método desenvolvido.

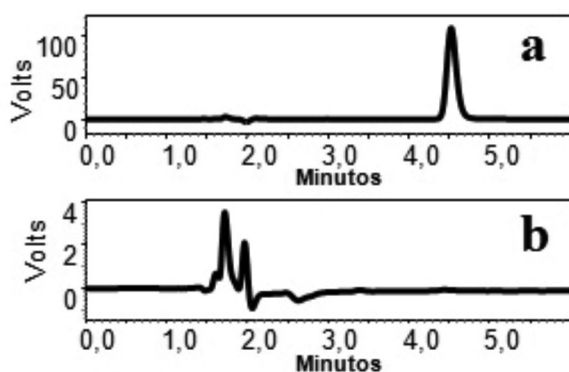


**Figura 3.** Cromatogramas obtidos utilizando fase móvel constituída por metanol:água (70:30 v/v) pH 2,6 sob fluxo de 1,0 mL/min e detecção UV a 237 nm. (a) Suspensão de nanopartículas de ácido salicílico e (b) suspensão de nanopartículas de placebo

### Desenvolvimento do método para quantificação da cafeína

A cafeína (CF) é uma base fraca que apresenta valor de  $pK_a$  próximo de 8,5. Inicialmente o método foi desenvolvido com uma coluna  $C_{18}$  e a fase móvel foi ajustada para vários valores de pH. Entretanto, o pico cromatográfico do fármaco apresentou uma cauda em todas as proporções testadas de solventes e pHs da fase móvel. Por ser uma base fraca, a cafeína pode apresentar uma interação

com os grupamentos silanóis residuais da superfície da sílica da fase estacionária, levando à formação de cauda.<sup>17</sup> Algumas alternativas para evitar que isto ocorra são reduzir a ionização dos grupamentos silanóis utilizando fase móvel com pH < 4,0, ou diminuir a ionização do analito básico através do aumento do pH da fase móvel. Por outro lado, podem ser adicionados à fase móvel os chamados “bloqueadores de silanol” como, por exemplo, a trietilamina. Além disso, o uso de uma coluna de fase reversa C<sub>8</sub> acarreta menor atividade dos grupamentos silanóis. Desta forma, as condições cromatográficas inicialmente propostas foram otimizadas utilizando-se uma coluna C<sub>8</sub> e trietilamina para o ajuste do pH da fase aquosa em 2,8. Nestas condições, a cafeína encontra-se na forma não ionizada e os grupamentos silanóis estão bloqueados, eliminando a cauda do pico cromatográfico. O tempo de retenção obtido para a cafeína foi de 4,4 min. A Figura 4 mostra um cromatograma típico obtido pelo método desenvolvido.



**Figura 4.** Cromatogramas obtidos utilizando fase móvel constituída por H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,01 M (ajustado a pH 2,8 com trietilamina):acetonitrila (90:10 v/v) sob fluxo de 1,0 mL/min e detecção UV a 262 nm. (a) Suspensão de nanopartículas de cafeína e (b) suspensão de nanopartículas de placebo

## Validação dos métodos

### Especificidade

Os cromatogramas das soluções amostra (a) e das soluções placebo (b) obtidos com os métodos desenvolvidos para quantificação do AG, do AS, e da CF estão apresentados nas Figuras 2, 3 e 4, respectivamente. Os resultados demonstram que não houve interferência ou sobreposição dos excipientes com o pico dos fármacos.

Adicionalmente, a especificidade foi confirmada através detector de arranjo de fotodiodos, que demonstrou que os picos dos fármacos não possuem coeluição de nenhum pico adicional, com valores de pureza de pico maiores que 0,9999.

**Tabela 2.** Resultados de exatidão e precisão obtidos com cada método desenvolvido

		AG	AS	CF
Concentração adicionada (µg/mL)		Recuperação <sup>a</sup> (%) ± DPR <sup>c</sup> %	Recuperação <sup>a</sup> (%) ± DPR <sup>c</sup> %	Recuperação <sup>a</sup> (%) ± DPR <sup>c</sup> %
	40,0	101,9 ± 1,2	101,1 ± 0,7	100,5 ± 1,2
	50,0	98,4 ± 0,6	102,0 ± 0,6	101,2 ± 0,9
	60,0	98,2 ± 0,6	101,2 ± 0,6	101,6 ± 0,4
		% Recuperado ± DPR <sup>c</sup> (%)	% Recuperado ± DPR <sup>c</sup> (%)	% Recuperado ± DPR <sup>c</sup> (%)
Precisão interdia <sup>a</sup>	Dia 1	99,8 ± 0,9	98,5 ± 0,9	101,9 ± 1,1
	Dia 2	98,2 ± 0,5	99,3 ± 0,3	99,9 ± 1,1
	Dia 3	98,9 ± 0,6	100,2 ± 0,4	99,4 ± 1,2
Precisão intradia <sup>b</sup>		98,9 ± 1,8	100,1 ± 1,4	101,8 ± 1,9

<sup>a</sup>média de 3 replicatas; <sup>b</sup>média de 6 replicatas; <sup>c</sup>desvio padrão relativo

### Linearidade e limites de detecção (LD) e quantificação (LQ)

A linearidade da resposta do detector foi calculada para várias soluções padrão na faixa de 5,0-100,0 µg/mL. Na Tabela 1 estão descritos a equação da reta, coeficiente de correlação (r) e limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) obtidos para cada método desenvolvido.

**Tabela 1.** Resultados da linearidade obtidos a partir de três curvas dos fármacos avaliados individualmente (ácido glicirrízico, ácido salicílico e cafeína) nas condições dos métodos validados

Fármaco	Equação da reta <sup>a</sup>	r	LD (µg/mL)	LQ (µg/mL)
AG	y = 7511,6x-6284,8	1,0	1,18	0,39
AS	y = 67628x-43533	0,9999	4,03	1,33
CF	y = 37788x+23000	0,9999	0,21	0,07

<sup>a</sup>equação da reta média obtida de três curvas.

A validade dos ensaios foi confirmada através de análise de variância, que demonstrou que a regressão linear foi significativa e o desvio da linearidade não significativo (P < 0,01) nos três métodos avaliados.

### Exatidão e precisão

A exatidão foi calculada a partir da determinação de 3 replicatas de 3 diferentes suspensões de nanopartículas (placebo) contaminadas com cada fármaco. Não foram observadas diferenças entre a quantidade adicionada de fármacos e as quantidades encontradas (P = 0,05), indicando a exatidão dos métodos (Tabela 2).

Os resultados da precisão intradia e interdia estão também descritos na Tabela 2. Os teores dos fármacos encontrados nos 3 diferentes dias foram equivalentes (P = 0,05) e os valores de desvio padrão relativo estão dentro do critério de aceitação de 5%, demonstrando a precisão dos métodos.

### Robustez

A avaliação da robustez dos métodos desenvolvidos foi realizada através de variações na temperatura da coluna, no fluxo e composição da fase móvel. Em todos os métodos as colunas utilizadas foram avaliadas modificando-se a temperatura do forno para 20, 25, e 30 °C.

O efeito do fluxo da fase móvel foi avaliado nas seguintes condições: 1,1; 1,2 e 1,3 mL/min para o AG; 0,8; 1,0, e 1,2 mL/min para o AS e para a CF.

A composição da fase móvel foi modificada de acordo com o método. Para o método do AG a quantidade de metanol testada foi de 58, 60 e 62%, enquanto que para o AS foi de 68, 70 e 72%. Para a CF a % de acetonitrila da fase móvel foi de 8, 10 e 12%.

**Tabela 3.** Resultados de eficiência de encapsulação (EE), teor e recuperação obtidos com as suspensões de nanopartículas contendo ácido glicirrízico (NP<sub>AG</sub>), ácido salicílico (NP<sub>AS</sub>) ou cafeína (NP<sub>CF</sub>)

Formulação	EE <sup>a</sup> (%) ± DPR <sup>b</sup> (%)	Teor <sup>a</sup> (µg/mL) ± DPR <sup>b</sup> (%)	Recuperação <sup>a</sup> (%) ± DPR <sup>b</sup> (%)
NP <sub>AG</sub>	95,4 ± 1,7	113,4 ± 2,9	68,3 ± 2,5
NP <sub>AS</sub>	4,0 ± 5,8	163,9 ± 4,6	98,3 ± 3,1
NP <sub>CF</sub>	3,0 ± 6,3	161,2 ± 5,3	96,6 ± 4,0

<sup>a</sup>média de 3 replicatas; <sup>b</sup>desvio padrão relativo

Não foram verificadas diferenças estatisticamente significativas nos teores de fármaco encontrados nas condições testadas ( $P = 0,05$ ) e os valores de desvio padrão relativo estão dentro do critério de aceitação de 5%, indicando a robustez dos métodos. As variações na fase móvel resultaram em pequenas mudanças no tempo de retenção, sem nenhum efeito na quantificação dos fármacos.

### Aplicação dos métodos para determinação da eficiência de encapsulação e do teor de fármaco

As suspensões de nanopartículas foram submetidas à análise por CLAE utilizando os métodos previamente validados para determinação da eficiência de encapsulação, teor e recuperação de fármaco. Os resultados estão descritos na Tabela 3.

A formulação NP<sub>AG</sub> apresentou maior EE, provavelmente relacionada às características físico-químicas do fármaco, como o alto peso molecular e a presença de três grupamentos carboxílicos em sua estrutura, que permitiram uma maior interação eletrostática com a QUI.

Por outro lado, apesar de possuir grupos carboxílicos disponíveis para interação, o AS não complexou de forma satisfatória com a QUI, apresentando baixa EE.

A CF não possui grupamentos carboxílicos em sua estrutura, entretanto poderia ser encapsulada fisicamente pela rede de aprisionamento formada pelo ALG e TPP. Porém, a formulação NP<sub>CF</sub> também apresentou baixa EE.

Como o AS e a CF apresentam maior solubilidade em meio aquoso do que o AG, uma possível explicação para estes resultados é que o AS e a CF não estão associados às nanopartículas, mas dissolvidos no meio, o que reflete o maior teor e recuperação de fármaco nas formulações NP<sub>AS</sub> e NP<sub>CF</sub>.

### CONCLUSÃO

Os métodos analíticos propostos para detecção e quantificação de ácido glicirrízico, ácido salicílico e cafeína por CLAE mostraram-se específicos, lineares, exatos, precisos e robustos na faixa de concentração entre 5,0 e 100,0 µg/mL, sendo adequados para se determinar a eficiência de encapsulação e o teor dos fármacos em nanopartículas de quitosana e alginato de sódio. Através dos resultados de eficiência de encapsulação pode-se concluir que o ácido glicirrízico possui as características físico-químicas ideais para ser encapsulado neste sistema nanoparticulado.

### REFERÊNCIAS

- Schaffazick, S. R.; Guterres, S. S.; *Quim. Nova* **2003**, *26*, 726.
- Davidenko, N.; Blanco, M. D.; Peniche, C.; Bechera'n, L.; Guerrero, S.; Tejo'n, J. M.; *J. Appl. Polym. Sci.* **2009**, *111*, 2362.
- Delair, T.; *Eur. J. Pharmac. Biopharm.* **2011**, *78*, 10.
- Aelenei, N.; Popa, M. I.; Novac, O.; Lisa, G.; Balaita, L.; *J. Mater. Sci.: Mater. Med.* **2009**, *20*, 1095.
- Cafaggi, S.; Russo, E.; Stefani, R.; Leardi, R.; Caviglioli, G.; Parodi, B.; Bignardi, A.; De Toter, B.; Aiello, C.; Viale, M.; *J. Controlled Release* **2007**, *121*, 110.
- Li, X.; Xie, H.; Lin, J.; Xie, W.; Ma, X.; *Polym. Degrad. Stab.* **2009**, *94*, 1.
- Sankalia, M. G.; Mashru, R. C.; Sankalia, J. M.; Sutariya, V. B.; *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2007**, *65*, 215.
- Sarmiento, B.; Ferreira, D.; Veiga, B.; Ribeiro, A.; *Carbohydr. Polym.* **2006**, *66*, 1.
- Agnihotri, S. A.; Nadagouda, N.; Mallikarjuna, M.; Tejjraj, M.; Aminabhavi, L.; *J. Controlled Release* **2004**, *100*, 5.
- Strand, S. P.; Tommeraas, K.; Varum, K. M.; Ostgaard, K.; *Biomacromolecules* **2001**, *2*, 1310.
- Martins, G. V.; Mano, J. F.; Alves, N. M.; *Carbohydr. Polym.* **2010**, *80*, 570.
- Cirillo, G.; Curcio, M.; Parisi, O. I.; Puoci, F.; Iemma, F.; Spizzirri, U.; Restuccia, D.; Picci, N.; *Food Chem.* **2011**, *125*, 1058.
- Shen, S.; Changa, Z.; Liua, J.; Suna, X.; Hua, X.; Liu, H.; *Sep. Purif. Technol.* **2007**, *53*, 216.
- Schwarz, S.; Csuk, R.; *Bioorg. Med. Chem.* **2010**, *18*, 7458.
- Shou, M.; Galinada, W.; Wei, Y.; Tang, Q.; Markovich, R. J.; Rustum, A. M.; *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2009**, *50*, 356.
- Farmacopeia Brasileira*, 4<sup>a</sup> ed., Atheneu: São Paulo, 2001.
- Barbas, C.; Garcia, A.; Saavedra, L.; Castro, M.; *J. Chromatogr. A* **2000**, *870*, 97.
- Huang, W.; Wang, W.; Wang, P.; Zhang, C.; Tian, Q.; Zhang, Y.; Wang, X.; Cha, R.; Wang, C.; Yuan C.; *J. Mater. Sci.: Mater. Med.* **2011**, *22*, 853.
- Tian, Q.; Wang, W.; He, X. T.; *Chinese Sci. Bull.* **2009**, *54*, 3121.
- Zheng, Y.; Wu, Y.; Yang, W.; Wang, C.; Fu, S.; Shen, X.; *J. Pharm. Sci.* **2006**, *95*, 132.
- Zheng, H.; Zhang, X.; Xiong, F.; Zhu, Z.; Lu, B.; Yin, Y.; Xu, P.; Du, Y.; *Carbohydr. Polym.* **2011**, *83*, 1139.
- Ji, J.; Hao, S.; Wu, D.; Huang, R.; Xu, Y.; *Carbohydr. Polym.* **2011**, *85*, 803.
- Kuznetsova, E. G.; Kuryleva, O. M.; Salomatina, L. A.; Sevast'yanov, V. I.; *Biomed. Engineer.* **2008**, *42*, 141.
- Nicoli, S.; Colombo, P.; Santi, P.; *AAPS J.* **2005**, *7*, 20.
- Boonsongrit, Y.; Mitrevej, A.; Mueller, B.; *Eur. J. Pharmac. Biopharm.* **2006**, *62*, 267.
- Brasil, Agência Nacional de Vigilância Sanitária; *Resolução RE n° 899*, de 23 de maio de 2003.
- Barrios, J. G.; Farias, G. D.; Roggia, I.; Peixoto, S. C.; Pons, F. R.; Bruschi, M.; Raffin, R.; Alves, M. P.; *Quim. Nova* **2011**, *34*, 1464.
- ICH - International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human use; *Q2(R1)-Validation of Analytical procedures: text and methodology*, 2005.
- Sun, C.; Xie, Y.; Tian, Q.; Liu, H.; *Colloids Surf., A* **2007**, *305*, 42.