

Desenvolvimento e validação de método analítico em CLAE-UV para a quantificação de ácido retinóico em microcápsulas de alginato e quitosana

Fabiana Toledo Velloso^{1,2}, Rafaela Siqueira Ferraz², Ana Amélia Moreira Lira³, Davi Pereira de Santana¹, Nereide Stela Santos-Magalhães^{2*}

¹Núcleo de Desenvolvimento Farmacêutico e Cosmético, Universidade Federal de Pernambuco, ²Laboratório de Imunopatologia Keizo-Asami, Universidade Federal de Pernambuco, ³Laboratório de Desenvolvimento Farmacotécnico, Departamento de Fisiologia, Universidade Federal de Sergipe

O ácido retinóico (AR) tem sido utilizado para o tratamento de acne severa, rugas, estrias e celulite, no entanto, provoca irritação na pele e sofre rápida degradação quando exposto à luz e ao calor. Métodos analíticos rápidos para quantificação do AR são, portanto, necessários para ensaios de cinética de liberação *in vitro*. Nesse contexto, o objetivo deste trabalho foi desenvolver e validar um método rápido e sensível para o doseamento do AR em microcápsulas de alginato/quitosana contendo óleo de babaçu dispersas em gel natrosol[®] por cromatografia líquida de alta eficiência associada à espectroscopia UV e aplicá-lo na avaliação do perfil de liberação *in vitro* dessas formulações. As análises foram realizadas em modo isocrático utilizando coluna C18 de fase reversa 150 x 4,6 mm (5 µm) com detecção a 350 nm. A fase móvel foi constituída de metanol e ácido acético 1% (85:15 v/v) com vazão de 1,8 mL/minuto. A faixa de linearidade do método foi de 0,5 a 60 µg/mL ($r^2 = 0,999$). O método validado mostrou-se sensível, específico, exato, preciso, de baixo custo e o tempo de retenção do AR foi de $5,8 \pm 0,4$ minutos sendo, desta forma, mais rápido do que os relatados na literatura.

Unitermos: Cromatografia líquida de alta eficiência. Espectroscopia/ultra violeta. Ácido retinóico/quantificação. Microcápsulas/análise quantitativa. Formulações farmacêuticas/liberação *in vitro*.

Retinoic acid (RA) has been used in the treatment of severe acne, wrinkles and cellulite. However, it induces skin irritation and rapidly suffers degradation under light and high temperate exposure. Rapid analytical methods to quantify retinoic acid are therefore mandatory for *in vitro* drug release studies. In this framework, the aim of this study was to develop and validate a rapid and responsive method to quantify the RA in microcapsules of chitosan and alginate containing babassu oil dispersed in natrosol[®] hydrogel using high performance liquid chromatography (HPLC). Furthermore this method was used to quantify *in vitro* release kinetics of RA from microcapsules. The analyses have been carried through an isocratic HPLC-UV method using a reversed phase 150 x 4.6 mm C18 (5µm) column, a mobile phase constituted of methanol and 1% acetic acid (85:15) at a flow rate of 1.8 mL/min and detection at 350 nm. The linearity range was 0.5-60 µg/mL ($r^2 = 0.999$). The validated HPLC-UV method was responsive, specific, accurate, precise, and economic and the RA retention time was 5.8 ± 0.4 minutes, being therefore, faster than that previously reported.

Uniterms: High performance liquid chromatography. Spectroscopy/ultra violet. Retinoic acid/quantification. Microcapsules/quantitative analysis. Pharmaceutical formulations/*in vitro* release.

*Correspondência: N. S. S. Magalhães. Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Grupo de Sistemas de Liberação Controlada de Medicamentos (SLC), Laboratório de Imunopatologia Keizo-Asami (LIKA), Av. Prof. Moraes Rego, 1235, Cidade Universitária - 50670-901 - Recife - PE, Brasil.
E-mail: nssm@ufpe.br

INTRODUÇÃO

O ácido retinóico tem como função fisiológica atuar na proliferação e diferenciação celular, na produção de sebo e na síntese de colágeno (Kligman *et al.*, 1986). Ele tem sido utilizado em diferentes níveis farmacológicos para o tratamento de várias disfunções dermatológicas como acne, rugas e distúrbios de queratinização incluindo psoríase. Recentemente, foi descoberto como útil no tratamento de estrias e celulite (Shapiro, Saliou, 2001).

Apesar da comprovada eficácia do ácido retinóico, ele apresenta algumas desvantagens que limitam fortemente a sua utilização, tais como a baixa solubilidade em água, a instabilidade na presença de luz e oxigênio e a ocorrência de reações de irritação local tais como eritema, xerose e discreta descamação (Lehman *et al.*, 1988).

As microcápsulas são sistemas de liberação que têm se destacado por proporcionarem proteção a materiais instáveis, liberação lenta ou sustentada de princípios ativos e ainda a liberação sítio-específica (Benita, 2006). As microcápsulas podem constituir uma alternativa viável para veicular ácido retinóico na pele, a fim de minimizar a irritação produzida quando utilizado topicamente, devido à sua liberação prolongada, além de conferir maior estabilidade à molécula (Dinarvand *et al.*, 2003). Para avaliar se as microcápsulas são capazes de prevenir os efeitos indesejáveis do AR na pele, é preciso fazer um estudo de permeação e retenção cutânea, porém primeiramente é necessário estudar seu perfil de liberação *in vitro*. Na cinética de liberação *in vitro* as condições fisiológicas de temperatura, meio de dissolução e agitação são simuladas, a fim de se determinar a capacidade da formulação liberar o ativo em função do tempo (Berkland *et al.*, 2001).

O grande desafio para a quantificação de fármacos em amostras derivadas de estudo de cinética de liberação *in vitro* consiste em reduzir o tempo de análise, devido à elevada quantidade de amostras a serem avaliadas. No caso específico do ácido retinóico, o armazenamento das amostras e análises de longa duração podem ocasionar perda de estabilidade ou aparecimento de produtos de degradação, sendo necessário o desenvolvimento de métodos rápidos, específicos e que permitam a utilização dos mesmos parâmetros cromatográficos tanto para a análise da forma farmacêutica, quanto para as amostras da cinética de liberação *in vitro*.

Alguns métodos analíticos estão relatados na literatura para a quantificação de ácido retinóico em diversas preparações farmacêuticas (Ezpeleta *et al.*, 1996; Brisaert, Plaizier-Vercammen, 2000; Brisaert *et al.*, 2001; Trotta *et al.*, 2003; Lim *et al.*, 2004; Hwang *et al.*, 2004; Contreras *et al.*, 2005). No entanto, os tempos de retenção

são elevados, variando de 7,95 a 18 minutos, o que não é conveniente para a análise do ácido retinóico, visto que este sofre rapidamente degradação quando exposto à luz ou ao calor, além da grande quantidade de amostras a serem analisadas decorrentes de estudo de cinética de liberação *in vitro*.

Fundamentado na revisão dos métodos de quantificação do ácido retinóico por CLAE-UV em modo isocrático ou gradiente, utilizando na sua grande maioria acetoneitrila como solvente com tempos de retenção iguais ou superiores a 8 minutos, o objetivo deste trabalho foi desenvolver e validar um método analítico por CLAE-UV para quantificar o ácido retinóico de forma rápida e sensível, em microcápsulas de alginato/quitosana contendo óleo de babaçu dispersas em gel Natrosol®. O método foi aplicado para quantificar o ácido retinóico em cinéticas de liberação *in vitro*.

MATERIAL E MÉTODOS

Reagentes e material

Ácido retinóico grau farmacêutico (Purifarma São Paulo, Brasil), alginato, quitosana e polissorbato 80 (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), etanol (Vetec Rio de Janeiro, Brasil), ácido acético (Merck Darmstadt, Alemanha), óleo de babaçu (Volp, São Paulo, Brasil), hexano (Synth, São Paulo, Brasil), metanol grau HPLC (J.T. Baker, USA), fosfato de potássio monobásico, hidróxido de sódio e cloreto de cálcio grau analítico (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil), metilparabeno e EDTA dissódico (DEG, São Paulo, Brasil); Natrosol® e propilenoglicol (Codossal São Paulo, Brasil).

As amostras utilizadas neste trabalho foram microcápsulas de alginato revestidas de quitosana contendo ácido retinóico disperso em óleo de babaçu incorporadas em gel Natrosol®. As microcápsulas de alginato/quitosana, contendo ácido retinóico disperso em óleo de babaçu, foram preparadas pelo método de coacervação complexa em etapa única (Wittaya-Areekul *et al.*, 2006) com diferentes concentrações de quitosana (0,05% e 0,1%). Após preparação, as microcápsulas foram incorporadas em gel Natrosol®.

Condições cromatográficas

As análises cromatográficas de quantificação do ácido retinóico foram efetuadas em cromatógrafo SPD 10 AVP, equipado com detector UV-VIS operando a 350 nm com bomba LC-10 ADVP e programa LC-10 (Shimadzu, Kyoto, Japão). A separação foi realizada em coluna C18

de fase reversa (Gemini[®], Phenomenex) 150 x 4,6 mm (5 µm). A fase móvel foi constituída por metanol e ácido acético glacial a 1% (85:15 v/v) com vazão de 1,8 mL/min e volume de injeção de 20 µL.

Validação do método analítico para o ácido retinóico

A metodologia analítica foi validada de acordo com a RE 899 de 29 de maio de 2003 – ANVISA (Brasil, 2003).

Curva analítica do ácido retinóico

Foi pesado, exatamente, o equivalente a 5 mg de ácido retinóico e dissolvido em 5 mL de metanol (1 mg/mL). Alíquotas desta solução foram diluídas em metanol para obter concentrações correspondentes a 0,5, 2, 5, 10, 20, 40 e 60 µg/mL. As soluções foram analisadas por CLAE-UV e os resultados obtidos foram relacionados em um gráfico da concentração da solução em função da área sob pico. As curvas foram efetuadas em triplicata (n=3) e uma curva média foi obtida.

• **Linearidade**

A avaliação da linearidade do método analítico, ou seja, a proporcionalidade entre a concentração e a resposta, foi efetuada mediante a obtenção de três curvas autênticas, do cálculo do coeficiente de variação (CV%) entre os pontos da curva e do coeficiente de correlação linear (r^2).

• **Seletividade**

A seletividade do método foi verificada pela análise de possíveis interferentes experimentais. Dessa forma, foram analisados todos os componentes da formulação a partir de microcápsulas de alginato/quitosana, contendo ou não fármaco, incorporadas em gel natrosol[®].

Precisão e exatidão

As amostras para avaliação da precisão e exatidão foram preparadas da seguinte forma: microcápsulas brancas (sem AR) foram impregnadas com quantidades conhecidas de ácido retinóico. O fármaco foi recuperado através de extração com *n*-hexano e tampão pH 7,4 com sonicação prévia das amostras. Amostras com concentrações de ácido retinóico de 10, 20 e 30 µg/mL foram injetadas em triplicata (n=3). A exatidão (E %) é expressa pela relação entre a concentração média determinada experimentalmente e a concentração teórica correspondente em termos percentuais. A precisão foi calculada a partir do coeficiente de variação (CV%).

Estudo de liberação *in vitro* das microcápsulas

O estudo de liberação *in vitro* do ácido retinóico a partir das formulações foi realizado em células de liberação do tipo Franz com área difusional de 1,15 cm² e volume de 6 mL, utilizando membranas sintéticas hidrofílicas (ME 25/21 ST, 0,45 ± 0,5 µm). O compartimento receptor foi preenchido com tampão fosfato pH 7,4 e etanol (70:30) em um sistema composto de seis células individuais conectadas a um banho termostatizado a 37 ± 0,5 °C, sob agitação constante de 100 rpm por um período de 48 h. As membranas foram colocadas cuidadosamente entre o compartimento doador e o receptor, de forma que ficassem em contato com a solução receptora. Todas as membranas foram previamente umedecidas (1 hora antes do experimento) com a solução receptora. No compartimento doador uma amostra de microcápsulas incorporadas em gel Natrosol[®] (0,4 g) foi colocada sobre a membrana artificial de cada célula. Em períodos de tempos pré-determinados, todo o líquido do compartimento receptor foi coletado e imediatamente repostado. O ácido retinóico liberado foi quantificado em CLAE-UV através do método analítico desenvolvido e validado previamente.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Validação do método analítico para o ácido retinóico

O desenvolvimento do método analítico envolve a otimização de vários estágios como a preparação da amostra, a separação cromatográfica e a quantificação. Parâmetros como a fase móvel, a vazão, a coluna cromatográfica e o comprimento de onda de detecção devem ser pré-estabelecidos com critério. A validação do método analítico é importante porque garante o sucesso da utilização da metodologia desenvolvida, além de detectar erros de procedimento analítico e oferecer evidências comprovadas da eficiência do método (Causon, 1997).

No presente trabalho, o pico de absorção máxima do ácido retinóico dissolvido em metanol ocorreu em 350 nm, valor similar àqueles relatados na literatura em 350-352 nm (Brisaert, Plaisier-Vercammen, 2000). Valores ligeiramente diferentes decorrentes de dissolução, solvatação, pontes de hidrogênio, interação com o solvente e temperatura podem ocorrer (Berbenni *et al.*, 2001).

Linearidade

Os dados das curvas analíticas estão representados na Tabela I. A linearidade da curva analítica na faixa de 0,5 a 60 µg/mL foi obtida a partir do ajuste de regressão

TABELA I - Dados das curvas analíticas

	Área dos picos para o ácido retinóico em diferentes concentrações (µg/mL)						
	0,5	2	5	10	20	40	60
1	248116	285914	773357	1331295	2669056	5345501	7184232
2	242705	285003	782991	1327976	2644804	5334693	7857837
3	242479	286280	789302	1321824	2641697	5347198	7860449
Média	244433	285732	781883	1327031	2651852	5342464	7634173
DP	3191	658	8030	4806	14980	6783	389662
CV%	1,31	0,23	1,03	0,36	0,56	0,13	5,10

linear ($r^2 = 0,999$). Segundo a ANVISA (Brasil, 2003), o coeficiente de correlação linear deve ser igual ou superior a 0,99. Sendo assim, o valor de r^2 obtido na análise do ácido retinóico pelo método CLAE-UV desenvolvido obedece aos limites estabelecidos.

O cromatograma típico obtido a partir das condições de análise de quantificação do ácido retinóico está representado na Figura 1. O tempo de retenção para o ácido retinóico foi de $5,8 \pm 0,4$ minutos.

O tempo de retenção do ácido retinóico (5,8 min) encontrado no presente trabalho com método CLAE-UV modo isocrático foi menor em relação aos tempos citados na literatura. De fato, analisando trabalhos anteriores, o ácido retinóico foi quantificado por CLAE-UV em nanopartículas de gliadin utilizando fase móvel constituída por metanol e acetato de amônio 10 mM (75:25 v/v) com vazão de 1,8 mL/min em comprimento de onda 350 nm. O tempo de retenção do ácido retinóico foi de 8,34 min (Ezpeleta *et al.*, 1996).

Brisaert e Plaizier-Vercammen (2000) avaliaram a degradação do ácido retinóico em loção utilizando método CLAE-UV modo gradiente com fase móvel constituída de metanol, água e ácido acético (75:12,5:1 v/v) variando para acetonitrila, água e ácido acético (80:20:1 v/v) com a função de separar seus isômeros, sendo a vazão modificada de 1,8 para 1 mL/min. O comprimento de onda variou de 320 a 350 nm e o tempo de retenção obtido para o ácido retinóico foi em torno de 15 minutos em 403 nm.

A estabilidade do ácido retinóico incorporado em lipossomas e sua cinética de liberação *in vitro* foi avaliada por CLAE-UV em 350 nm com fase móvel constituída de acetonitrila e ácido acético a 1% (80:20 v/v) e vazão de 1 mL/min. O tempo de retenção do ácido retinóico não foi especificado (Brisaert *et al.*, 2001).

O método isocrático CLAE-UV utilizado por Trotta *et al.* (2003) teve como fase móvel acetonitrila, metanol, ácido acético e água (45:40:1:14). O tempo de retenção foi de 12,3 minutos.

Lim *et al.* (2004) avaliaram a estabilidade do ácido retinóico em nanopartículas. O método CLAE-UV utili-

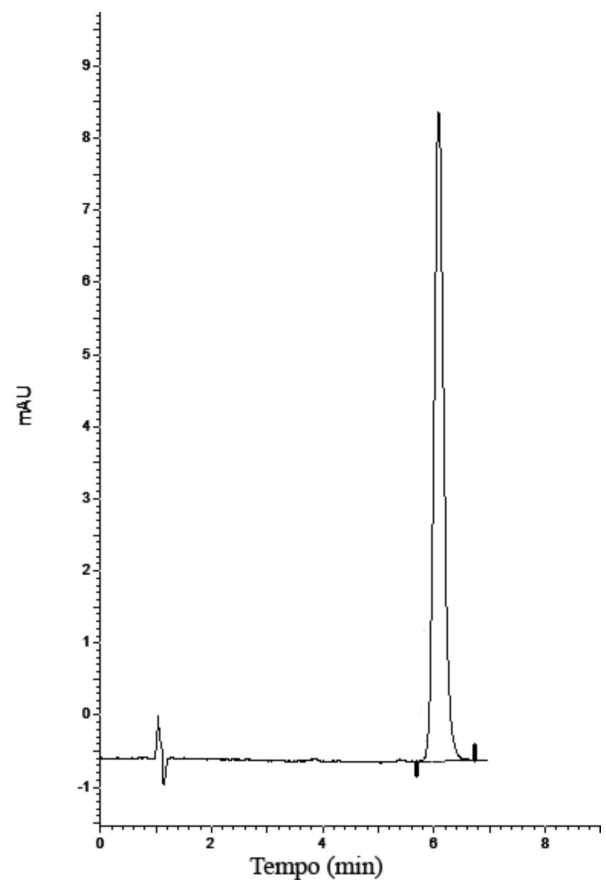


FIGURA 1 - Cromatograma de ácido retinóico obtido por CLAE-UV a 350 nm. As análises foram realizadas em cromatógrafo SPD 10 AVP com detector UV-VIS, bomba LC-10 ADVP e programa LC-10 (Shimadzu, Kyoto, Japão). Coluna C18 de fase reversa (Gemini®, Phenomenex) 150 x 4,6 mm (5µm) e fase móvel constituída de metanol e ácido acético a 1% (85:15 v/v) com vazão de 1,8 mL/min e volume de injeção de 20 µL.

zado teve como fase móvel acetonitrila, metanol e acetato de amônio a 2,5% (50,6:24,4:25,6 v/v). O comprimento de onda utilizado foi 340 nm, vazão de 1 mL/min, e tempo de retenção para o ácido retinóico foi 17,5 minutos. A faixa de linearidade obtida foi entre 0,1 e 5 µg/mL ($r^2 = 0,999$).

TABELA II - Valores obtidos na avaliação da precisão e exatidão intra-ensaio

Concentração teórica de AR (µg/mL)	Concentração obtida de AR (µg/mL)	Precisão (CV%)	Exatidão (%)
10	9,96	0,20	99,64
20	20,10	1,12	100,49
30	29,79	1,52	99,30

TABELA III - Valores obtidos na avaliação da precisão e exatidão inter-ensaio

Concentração teórica de AR (µg/mL)	Concentração obtida de AR (µg/mL)	Precisão (CV%)	Exatidão (%)
10	9,74	3,59	97,43
20	19,66	3,44	98,30
30	28,79	2,59	95,96

A estabilidade do ácido retinóico foi avaliada em microemulsão através de CLAE-UV com coluna C18 de fase reversa (Gemini[®], Phenomenex) 250 x 4,6 mm (5µm). A fase móvel foi composta de acetonitrila, metanol, água com 2,5% de acetato de amônio (50,6:24,4:25,6 v/v), vazão de 1 mL/min, volume de injeção 20 µg/mL. A linearidade foi de 0,1-5 µg/mL ($r^2 = 0,999$) e o tempo de retenção do ácido retinóico foi em torno de 18 minutos (Hwang *et al.*, 2004).

Mais recentemente, Contreras *et al.* (2005) avaliaram a liberação *in vitro* do ácido retinóico a partir de lipossomas incorporados em hidrogel (carbopol[®]) e de sua forma livre em células de Franz, além de ter avaliado sua permeação em pele abdominal de rato. O método de quantificação por CLAE-UV utilizado foi em modo gradiente, com fase móvel composta de uma mistura de ácido acético glacial 1,8% pH=3,9 (A) e metanol (B). O gradiente foi de 85% de B e 15% de A nos 3 primeiros minutos da corrida, variando para 97% de B e 3% de A entre 3 e 8 minutos e retornando para 85% de B e 15% de A entre 8 e 10 minutos. A vazão foi de 1 mL/min e o comprimento de onda utilizado foi 345 nm. O tempo de retenção para o ácido retinóico foi em torno de 7,95 minutos.

Precisão e exatidão

Os resultados referentes à avaliação da precisão e da exatidão inter e intra-ensaio para o ácido retinóico estão apresentados nas Tabelas II e III. A ANVISA (Brasil, 2003) recomenda que o CV% e o E% não excedam 5%. Assim, os valores encontrados atendem aos limites estabelecidos.

Seletividade

A seletividade do método é a capacidade de ava-

liar, de forma inequívoca, as substâncias em exame na presença de componentes que possam interferir com a sua determinação em uma amostra. A seletividade avalia o grau de interferência de espécies como, por exemplo, outros ingredientes ativos, excipientes, impurezas e produtos de degradação, bem como outros compostos de propriedade similares que possam estar presentes (Brasil, 2003).

Com relação à seletividade do método desenvolvido para análise do ácido retinóico, não foram observados interferentes em nenhuma das amostras analisadas (Figura 2), portanto, o método é seletivo para a quantificação do ácido retinóico a partir das microcápsulas de alginato/ quitosana incorporadas em gel Natrosol[®].

Aplicação do método validado na avaliação da cinética de liberação *in vitro* do ácido retinóico a partir de microcápsulas de alginato/ quitosana incorporadas em gel Natrosol[®]

As microcápsulas de alginato/ quitosana contendo ácido retinóico disperso em óleo e babaçu foram preparadas com diferentes concentrações de quitosana (0,05% e 0,1%) e os resultados da cinética de liberação *in vitro* estão apresentados na Figura 3. Aproximadamente 75% do fármaco foi liberado a partir das microcápsulas com quitosana a 0,05% e apenas 45% daquelas com quitosana a 0,1% em 48 h.

CONCLUSÃO

O método CLAE-UV isocrático desenvolvido e validado no presente trabalho foi simples, seletivo, exa-

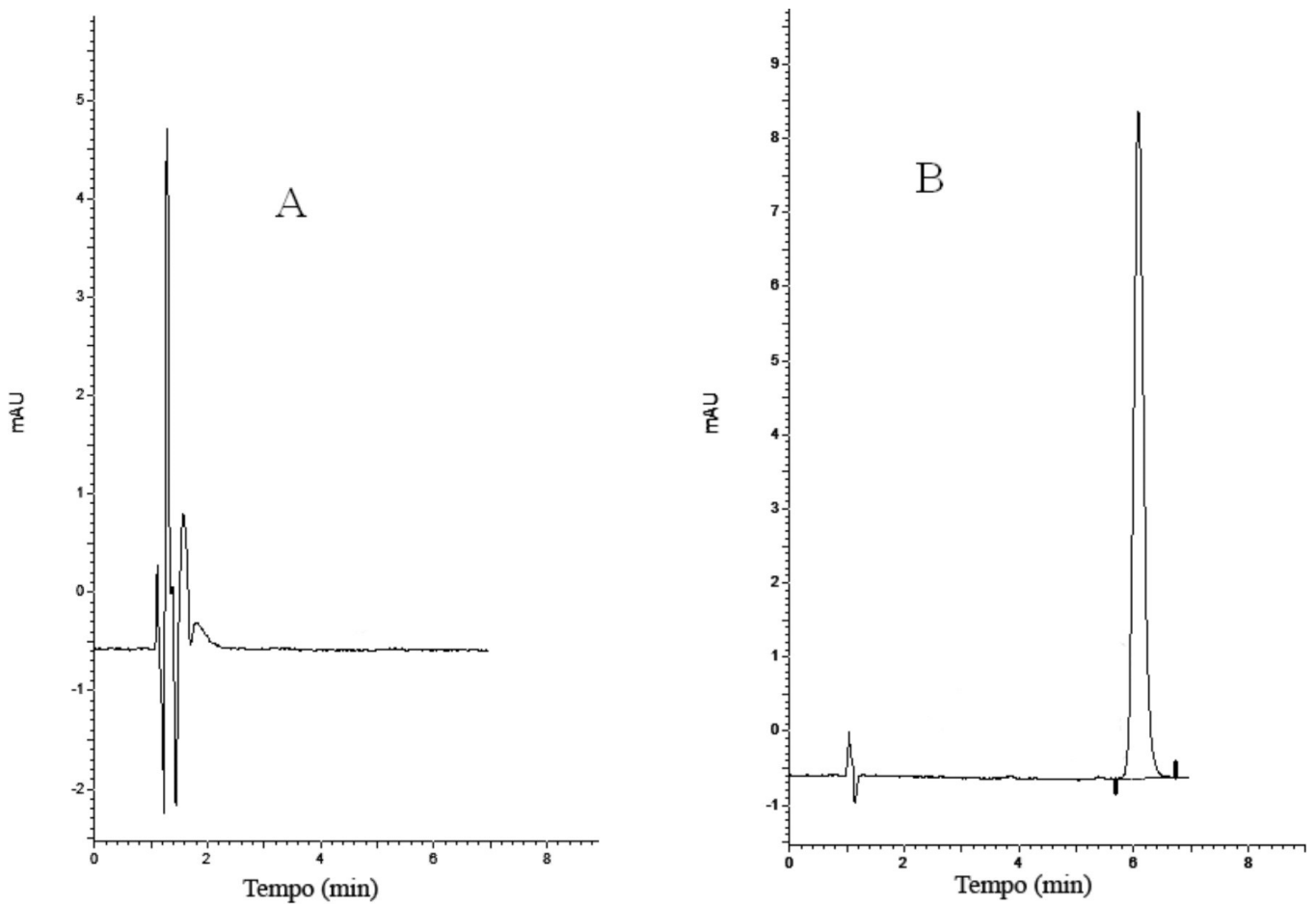


FIGURA 2 - Cromatogramas da análise de microcápsulas de alginato/quitosana incorporadas em gel Natrosol[®] sem fármaco (A) e com ácido retinóico disperso em óleo de babaçu (B). As análises foram realizadas em cromatógrafo SPD 10 AVP com detector UV-VIS a 350 nm, bomba LC-10 ADVP e programa LC-10 (Shimadzu, Kyoto, Japão). Coluna C18 de fase reversa (Gemini[®], Phenomenex) 150 x 4,6 mm (5 μ m) e fase móvel constituída de metanol e ácido acético a 1% (85:15 v/v) com vazão de 1,8 mL/minuto e volume de injeção de 20 μ L.

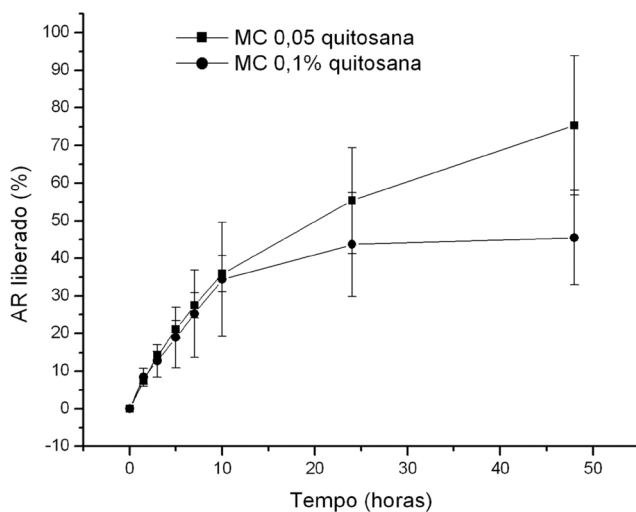


FIGURA 3 - Perfil de liberação *in vitro* do ácido retinóico a partir das microcápsulas de alginato/quitosana contendo óleo de babaçu incorporadas em gel Natrosol[®].

to, preciso, mais rápido e econômico do que os métodos propostos na literatura para a quantificação do ácido retinóico. Além disso, o solvente utilizado na fase móvel (metanol) é menos oneroso que a acetonitrila utilizada na maioria dos trabalhos prévios. Este método foi de grande valia para o doseamento do ácido retinóico a partir de microcápsulas de alginato/quitosana contendo óleo de babaçu dispersas em gel Natrosol[®], além de ser específico para a quantificação de amostras oriundas de estudo de cinética de liberação *in vitro*, sem a necessidade de técnicas adicionais de extração e com tempo de análise inferior aos da literatura. Este método será importante para o desenvolvimento e otimização de formulações de hidrogéis contendo microcápsulas de alginato/quitosana contendo ácido retinóico e óleo de babaçu e para promover a futura elucidação de seu mecanismo de permeação e retenção tópica.

REFERÊNCIAS

- BENITA, S. *Microencapsulation: Methods and industrial applications*. 2.ed. Jerusalem: Culinary and Hospitality Industry Publications Services (C.H.I.P.S.), 2005. p.784.
- BERBENNI, V.; MARINI, A.; BRUNI, G.; CARDINI, A. Thermoanalytical and spectroscopic characterisation of solid-state retinoic acid. *Int. J. Pharm.*, Amsterdam, v.221, n.1-2, p.123-141, 2001.
- BERKLAND, C.; KIM, K.K.; PACK, D.W. Fabrication of PLGA microspheres with precisely controlled and nanodisperse size distribution. *J. Control. Rel.*, Amsterdam, v.73, n.1, p.58-74, 2001.
- BRASIL. Resolução específica nº899 de 29 de Maio de 2003. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. ANVISA. *Diário Oficial da União*. Poder Executivo, Brasília DF, 02 de Junho de 2003. Disponível em: <www.anvisa.gov.br>. Acesso em: 3 fev. 2008.
- BRISAERT, M.; GABRIELS, M.; MATTHJS, V.; PLAIZIER-VERCAMMEN, J. Liposomes with tretinoin: a physical and chemical evaluation. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, Oxford, v.26, n.5, p.909-917, 2001.
- BRISAERT, M.; PLAIZIER-VERCAMMEN, J. Investigation on the photostability of a tretinoin lotion and stabilization with additives. *Int. J. Pharm.*, Amsterdam, v. 199, n.1, p.49-57, 2000.
- CAUSON, R. Validation of chromatographic methods in biomedical analysis; viewpoint and discussion. *J. Chromatogr. B: Biomed. Sci. Appl.*, Amsterdam, v. 689, n.1, p.175-180, 1997.
- CONTRERAS, M.J.F.; SORIANO, M.M.J.; DIÉGUEZ, A.R. In vitro percutaneous absorption of all-trans retinoic acid applied in free form or encapsulated in stratum corneum lipid liposomes. *Int. J. Pharm.*, Amsterdam, v. 297, n.1-2, p. 134-145, 2005.
- DINARVAND, R.; RAHMANI, E.; FARBOD, E. Gelatin microspheres for the controlled release of all-trans-retinoic acid topical formulation and drug delivery evaluation. *Int. J. Pharm. Res.*, Tehran, v.2, n.1, p.47-50, 2003.
- EZPELETA, I.; IRACHE, J.M.; STAINMESSE, S.; CHABENAT, C.; GUEGUEN, J.; POPINEAU, Y.; ORECCHIONI, A.M. Gliadin nanoparticles for the controlled release of all-trans retinoic acid. *Int. J. Pharm.*, Amsterdam, v.131, n.2, p.191-200, 1996.
- HWANG, S.R.; LIM, S.J.; PARK, J.S.; KIM, C.K. Phospholipid-based microemulsion formulation of all-trans-retinoic acid for parenteral administration. *Int. J. Pharm.*, Amsterdam, v.276, n.1-2, p.175-183, 2004.
- KLIGMAN, A.M.; GROVE, G.L.; HIROSE, R.; LEYDEN, J.J. Topical tretinoin for photoaged skin. *J. Am. Acad. Dermatol.*, Worcester, v.15, n.4, p. 836-59, 1986.
- LEHMAN, P.A.; SLATTERY, J.T.; FRANZ, T.J. Percutaneous absorption of retinoids: Influence on vehicle, light exposure and dose. *J. Invest. Dermatol.*, New York, v. 91, n.1, p.56-61, 1988.
- LIM, S.O.; LEE, M.K.; KIM, C.K. Altered chemical and biological activities of all-trans retinoic acid incorporated in solid nanoparticle powders. *J. Control. Rel.*, Amsterdam, v. 100, n.1, p. 53-61, 2004.
- SHAPIRO, S.S.; SALIOU, C. Role of vitamins in skin care. *Nutrition*, New York, v.17, n.10, p.839-844, 2001.
- TROTTA, M.; UGAZIO, E.; PEIRA, E.; PULITANO, C. Influence of ion pairing on topical delivery of retinoic acid from microemulsions. *J. Control. Rel.*, Amsterdam, v.86, n.2-3, p.315-321, 2003.
- WITTAYA-AREEKUL, S.; KRUEENATE, J.; PRAHSARN, C. Preparation and in vitro evaluation of mucoadhesive properties of alginate/chitosan microparticles containing prednisolone. *Int. J. Pharm.*, Amsterdam, v. 312, n.1-2, p.113-118, 2006.

Recebido para publicação em 24 de junho de 2008.
Aceito para publicação em 10 de setembro de 2008.