



República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial.

(21) **PI0903009-3 A2**



* B R P I 0 9 0 3 0 0 9 A 2 *

(22) Data de Depósito: 31/08/2009
(43) Data da Publicação: 10/05/2011
(RPI 2105)

(51) *Int.Cl.:*
A61K 9/127
A61K 31/7048
A61P 31/10

(54) Título: **VESÍCULAS LIPÍDICAS DE CAROTENOÍDES, COMPOSIÇÃO, PROCESSO DE PREPARAÇÃO DE VESÍCULAS LIPÍDICAS DE CAROTENOÍDES E USO DE VESÍCULAS LIPÍDICAS DE CAROTENOÍDES**

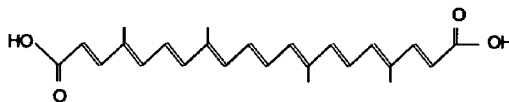
(73) Titular(es): Universidade de São Paulo - USP

(72) Inventor(es): IRENE SATIKO KIKUCHI, MÍRIAM CRISTINA SAKURAGUI MATUO, RAFAEL TERUITI DE OLIVEIRA TAKAMOTO, TELMA MARY KANEKO, TEREZINHA DE JESUS ANDREOLI PINTO

(57) Resumo: VESÍCULAS LIPÍDICAS DE CAROTENOÍDES, COMPOSIÇÃO, PROCESSO DE PREPARAÇÃO DE VESÍCULAS LIPÍDICAS DE CAROTENOÍDES E USO DE VESÍCULAS LIPÍDICAS DE CAROTENOÍDES. A presente invenção aplica-se nas áreas farmacêutica, cosmética, veterinária, biotecnológica, odontológica, médica, oncológica, radiofarmacêutica, agrônômica, de terapia gênica, alimentícia, referindo-se à constituição de vesículas lipídicas de carotenóides em que ditos carotenóides representam a maior proporção molar da constituição da bicamada vesicular, bem como uma composição contendo ditas vesículas lipídicas de carotenóides, processo de preparação de vesículas lipídicas de carotenóides e uso.



A





VESÍCULAS LIPÍDICAS DE CAROTENÓIDES, COMPOSIÇÃO, PROCESSO DE PREPARAÇÃO DE VESÍCULAS LIPÍDICAS DE CAROTENÓIDES E USO DE VESÍCULAS LIPÍDICAS DE CAROTENÓIDES

A presente invenção aplica-se nas áreas farmacêutica, cosmética, veterinária, biotecnológica, odontológica, médica, oncológica, radiofarmacêutica, agrônômica, de terapia gênica, alimentícia, referindo-se à constituição de vesículas lipídicas de carotenóides em que ditos carotenóides representam a maior proporção molar da constituição da bicamada vesicular.

ESTADO DA TÉCNICA

Lipossomos são estruturas esféricas compostas de bicamadas concêntricas simples ou múltiplas, resultantes da auto-associação de moléculas anfifílicas, tais como fosfolipídios, em um meio aquoso. Os grupos da cabeça polar são localizados na superfície das membranas, em contato com o meio, enquanto as cadeias de ácido graxo formam o centro hidrofóbico das membranas, protegido da água. Estas vesículas têm parte da fase aquosa no seu interior e, conseqüentemente podem capturar e segregar moléculas polares; além disso, por causa das propriedades físico-químicas de seus constituintes, podem também dissolver moléculas hidrofóbicas em suas bicamadas. Lipossomos podem ser preparados com muitos tamanhos diferentes, variando de vesículas unilamelares pequenas (SUV – small unilamellar vesicles), cujo menor diâmetro pode ser de cerca de 20 nm, até vesículas unilamelares gigantes (GUV – giant unilamellar vesicles) com diâmetro de dezenas de micrômetros. Pertencendo à primeira geração de lipossomos, estão as vesículas multilamelares (MLV – multilamellar vesicles) com várias centenas de nanômetros em diâmetro (BANGHAM A.D., STANDISH M.M., WATKINS J.C. Diffusion of univalent ions across lamellae of swollen phospholipids. J. Mol. Biol. 13(1): 238, 1965), e as mais recentes vesículas unilamelares grandes (LUV – large unilamellar vesicles), caracterizadas por volumes de captura alta, com diâmetro ajustável (100 ou 200 nm) e tamanho reduzido por extrusão através de membranas específicas (SCHUBER F., KICHLER A., BOECKLER C., FRISCH B. Liposomes: from membrane models to gene therapy. Pure & Appl. Chem. 70 (1): 89-96, 1998.).

Em essência, os lipossomos são estruturas altamente versáteis cujas propriedades podem ser moduladas por mudança nos parâmetros tais como tamanho, lamelaridade, composição das bicamadas, cargas e propriedades de superfície. A química dos (fosfo) lipídios, que são os constituintes de lipossomos, permite planejar análogos com novas propriedades e derivados a serem ligados à superfície das vesículas. Lipossomos têm atraído um enorme interesse:

i) Na pesquisa básica (Química e Biologia) como modelos de membrana, mas também oferecem atraentes possibilidades para confinamento de reações químicas em volumes muito pequenos,

5 ii) Como veículos para transporte de drogas e, recentemente, para transporte de genes,

iii) Em biotecnologia, indústria farmacêutica (desenvolvimento de formulações antitumorais e vacinas baseadas em lipossomo) e em cosméticos (SCHUBER F., KICHLER A., BOECKLER C., FRISCH B. Liposomes: from membrane models to gene therapy. *Pure & Appl. Chem.* 70 (1): 89-96, 1998).

10 Os lipossomos podem ser planejados racionalmente, resultando em lipossomos não reativos (estericamente estabilizados) (SLs), bem como lipossomos polimórficos (catiônicos fusogênicos). Os SLs podem ser planejados para exibir reatividade específica (direcionamento), enquanto lipossomos polimórficos podem exibir alta reatividade a ácidos nucleicos e membranas celulares. Devido a seu reduzido reconhecimento e ataque pelo sistema imunológico, estes lipossomos podem ter
15 utilidade em quimioterapia de câncer. Os lipossomos polimórficos são promissores em terapia gênica devido à possibilidade da transfecção de DNA. Em paralelo, liberação mais eficiente e retenção de drogas dentro de lipossomos (baseado em acúmulo ativo através de gradientes iônicos) têm contribuído para utilização desta nova geração de
20 lipossomos (LASIC D.D., PAPAHAADJOPOULOS D. Liposomes revisited. *Science.* 267: 1275-1276, 1995).

Lipossomos estericamente estabilizados foram criados quando se soube que estabilização mecânica ou eletrostática não poderia formar lipossomos com suficiente estabilidade em um ambiente biológico como a circulação sistêmica. Por isso, em SLs, a
25 bicamada lipídica contém glicolipídios ou mais recentemente, lipídios conjugados com etilenoglicol que forma uma barreira estérica externa à membrana. SLs matem-se no sangue até 100 vezes mais tempo que lipossomos convencionais e podem, por isso, aumentar a eficácia farmacológica dos agentes encapsulados. Além disso, SLs permitem direcionar lipossomos para células específicas através de ligante, porque são
30 muito menos susceptíveis a ataque não específico que os convencionais. SLs ligados a anticorpos ou outros ligantes são acumulados muito mais prontamente em células alvo que os lipossomos convencionais (LASIC D.D., PAPAHAADJOPOULOS D. Liposomes revisited. *Science.* 267: 1275-1276, 1995).

Existem técnicas que provocam profundas mudanças no comportamento
35 farmacocinético das SLs (lipossomos não reativos, mas estericamente estabilizados). A meia vida dos lipossomos convencionais no sangue, após injeção intravenosa, por

exemplo, pode variar entre 2 horas e mais de 40 horas em humanos. Foram descobertos lipossomos de circulação longa que são capturados mais lentamente por fígado e baço, sendo direcionados passivamente para sítios tumorais, aumentando a “biodisponibilidade” de drogas antitumorais. Por exemplo, em certos tumores foram encontrados níveis de lipossomos 25 vezes mais altos mesmo após vários dias da injeção. Outra consequência deste fenômeno é o uso de SL para imagens (SCHUBER F., KICHLER A., BOECKLER C., FRISCH B. Liposomes: from membrane models to gene therapy. *Pure & Appl. Chem.* 70 (1): 89-96, 1998).

O tumor sólido de carcinoma de cólon C26 em camundongos é praticamente insensível a tratamentos com doxorrubicina livre ou incorporada em lipossomos convencionais. Contudo, a administração de SLs contendo doxorrubicina (SL-Dox) resultou em completa remissão de tumores em tratamentos precoces e em melhorias significativas em tratamentos tardios. Em um modelo de tumor de carcinoma mamário em camundongos, SL-Dox foi bem mais eficiente que lipossomos convencionais e reduziu a incidência de metástases. SL-Dox pôde deter o crescimento de células tumorais de pulmão humano em severa imunodeficiência combinada (SCID) de camundongos, enquanto doses equivalentes de doxorrubicina livres ou encapsuladas em lipossomos convencionais, não foram eficazes (LASIC D.D., PAPAHAJIOPOULOS D. Liposomes revisited. *Science.* 267: 1275-1276, 1995).

Lipossomos de bicamada simples são geralmente preparados por um dos dois métodos de sonicação: um probe de alta energia é imerso diretamente numa dispersão aquosa de fosfolipídios ou pela dispersão de fosfolipídio em um frasco de vidro suspenso em um banho ultrassônico de baixa energia. Ambos os procedimentos produzem vesículas de cerca de 25 nm de diâmetro, consistindo de uma concha de bicamada fosfolipídica simples. Contudo, a técnica apresenta várias desvantagens como a sonicação em alta energia causar oxidação e degradação do fosfolipídio, embora possa ser minimizada por controle rigoroso, e também pode danificar moléculas do soluto a ser encapsulado. Outra desvantagem é a dificuldade em preparar grandes quantidades de lipossomos (BATZRI S., KORN E.D. Single bilayer liposomes prepared without sonication. *Biochim. Biophys. Acta.* 298: 1015-1019, 1973).

Devido a estas limitações pelo preparo de lipossomos por sonicação, Batzri e Korn (BATZRI S., KORN E.D. Single bilayer liposomes prepared without sonication. *Biochim. Biophys. Acta.* 298: 1015-1019, 1973) desenvolveram um dos mais simples métodos para obtenção de lipossomos que é o método chamado injeção etanólica. Esta técnica permite obter lipossomos com bicamada simples, não distinguíveis daqueles obtidos por sonicação. A suspensão diluída pode ser facilmente concentrada por

ultrafiltração, não levando à degradação ou oxidação do fosfolípido utilizado (BATZRI S., KORN E.D. Single bilayer liposomes prepared without sonication. *Biochim. Biophys. Acta.* 298: 1015-1019, 1973).

5 Quanto à encapsulação de drogas, compostos dissolvidos no mesmo etanol como o lipídio, são relativamente bem encapsulados, enquanto substâncias hidrofílicas apresentam baixa compartimentalização, como ocorreu com carboxifluoresceína no trabalho de Pons et al (PONS M., FORADADA M., ESTERLRICH J. Liposomes obtained by the ethanol injection method. *Int. J. Pharm.* 95: 51-56, 1993). Porém, estes mesmos autores relataram como vantagem da injeção etanólica, a possibilidade de encapsular
10 tanto substâncias hidrofílicas como lipofílicas.

O peso molecular e raio das vesículas produzidas pelo método de injeção pode depender da velocidade de injeção, concentração de lipídio no tampão e no álcool, e o pH e osmolalidade do tampão. Kremer et al (KREMER J.M.H., VANDER ESKER M.W.J., PATHMAMANO HARAN C., WIERSEMA P.H. Vesicles of variable diameter prepared by
15 a modified injection method. *Biochemistry.* 16: 3032-3935, 1977) mostraram que a velocidade de injeção não influenciou o peso molecular ou o raio das partículas lipídicas.

Pons et al (PONS M., FORADADA M., ESTERLRICH J. Liposomes obtained by the ethanol injection method. *Int. J. Pharm.* 95: 51-56, 1993) detectaram que a concentração de lipídios é o principal fator que influencia o tamanho das vesículas.
20 Hauser (HAUSER H. Methods of preparation vesicles: assessment of their suitability for drug encapsulation. *Trends Pharm. Sci.* 3: 274-277, 1982) havia estabelecido que a injeção de soluções etanólicas de fosfolípidios originava vesículas do tipo SUV (com alguns agregados de SUV), com tamanho variando entre 30 e 60 nm. Porém, Pons et al (PONS M., FORADADA M., ESTERLRICH J. Liposomes obtained by the ethanol
25 injection method. *Int. J. Pharm.* 95: 51-56, 1993) obtiveram não apenas SUVs, mas também vesículas intermediárias e grandes, dependendo da concentração lipídica. Pons et al (PONS M., FORADADA M., ESTERLRICH J. Liposomes obtained by the ethanol injection method. *Int. J. Pharm.* 95: 51-56, 1993) concluíram que, variando a concentração de lipídio, o método oferece a possibilidade de obter vesículas de
30 bicamada simples de diferentes raios de maneira reprodutível e confiável.

Lipossomos foram propostos e demonstrados por Gregoriadis e colaboradores (GREGORIADIS G. Engineering liposomes for drug delivery: progress and problems. *Trends in Biotechnology* 13: 527-537, 1995) na década de 1970 por terem capacidade para carrear drogas e utilizaram enzimas, drogas anticâncer e antimicrobianos para tal.
35 Muitos estudos têm sido desenvolvidos para sistemas de entrega de drogas devido à

considerada natureza inócua dos componentes lipossomais (que são lipídios não tóxicos, não imunogênicos, biodegradáveis), e a versatilidade da estrutura do sistema.

Existem trabalhos que mostram que carotenóides podem ser carregados por sistemas lipossomais tradicionais para melhorar a própria permeabilidade das vesículas
5 carreadoras (SOCACIU C., LAUSCH C., DIEHL H.A. Carotenoids in DPPC vesicles: membrane dynamics. Spectrochimica Acta Part A 55: 2289-2297, 1999) como trabalhos demonstrando a utilização de carotenóides como ingredientes ativos com atividade antioxidante (SILVA C.R., ANTUNES L.M.G., BIANCHI M.L.P. Antioxidant action of bixin
10 against cisplatin-induced chromosome aberrations and lipid peroxidation in rats. Pharmacological Research. 43(6): 561-566, 2001), efeito protetor contra radiação e elementos mutagênicos e indução de sistema citocromo P450 (De-Oliveira A.C.A.X., SILVA I.B., MANHÃES-ROCHA D.A., PAUMGARTEN F.J.R. Induction of liver
monooxygenases by annatto and bixin in female rats. Braz. J. Med. Biol. Res. 36(1): 113-118, 2003).

15 Bixina (cis-bixina, CAS 6983-79-5) é o principal pigmento solúvel em óleo das sementes de *Bixa orellana* L. É um carotenóide desprovido de atividade de pró-vitamina A com dois grupos carboxílicos, um dos quais é o metiléster (**Figura 1 A**). A hidrólise deste grupo metil éster dá um ácido dicarboxílico correspondente, a norbixina (**Figura 1 B**), que é um pigmento do anato solúvel em soluções aquosas alcalinas. Os extratos de
20 anato, bem como seus constituintes carotenóides principais bixina e norbixina, têm sido amplamente empregados como aditivos coloríficos em alimentos, drogas e cosméticos (De-Oliveira A.C.A.X., SILVA I.B., MANHÃES-ROCHA D.A., PAUMGARTEN F.J.R. Induction of liver monooxygenases by annatto and bixin in female rats. Braz. J. Med. Biol. Res. 36(1): 113-118, 2003). No norte e nordeste do Brasil é extensivamente
25 utilizado como um condimento de alimentos, conhecido como 'colorau' ou 'colorífico' (De-Oliveira A.C.A.X., SILVA I.B., MANHÃES-ROCHA D.A., PAUMGARTEN F.J.R. Induction of liver monooxygenases by annatto and bixin in female rats. Braz. J. Med. Biol. Res. 36(1): 113-118, 2003).

30 As sementes de *B. orellana* têm sido utilizadas na medicina popular brasileira para preparar poções afrodisíacas bem como remédios para tratar febres, inflamações, doenças parasíticas e na Jamaica, remédios populares para tratar diabetes mellitus (PAUMGARTEN F.J.R., DE-CARVALHO R.R., ARAUJO I.B., PINTO F.M., BORGES O.O., SOUZA C.A.M., KURIYAMA S.N. Evaluation of the developmental toxicity of annatto in the rat. Food and Chemical Toxicology. 40: 1595-1601, 2002).

35 Sabe-se que as folhas de *B. orellana* exibem um efeito inibitório contra *Neisseria gonorrhoea*, e os extratos de folha, uma significativa atividade antimicrobiana contra

linhagens padrões de bactérias Gram positivas incluindo *Bacillus subtilis*, *Streptococcus faecalis* e *Staphylococcus aureus*. Um recente estudo de extratos voláteis apresentou vários mono e sesquiterpenos (GALINDO-CUSPINERA V., WESTHOFF D.C., RANKIN S.A. Antimicrobial properties of commercial annatto extracts against selected pathogenic, lactic acid, and spoilage microorganisms. J. Food Protection. 66 (6): 1074-1078, 2003), e outros compostos solúveis em água (GALINDO-CUSPINERA V., RANKIN S.A. Bioautography and chemical characterization of antimicrobial compound(s) in commercial water-soluble annatto extracts. J. Agric. Food Chem. 53(7): 2524-2529, 2005) com atividades antimicrobianas. Contudo, não foram encontrados relatos de atividade antimicrobiana por compostos isolados de *B. orellana* devido à dificuldade em separar os componentes dos extratos.

Os corantes obtidos do urucum (*Bixa orellana L.*) têm sido utilizados há muitos anos principalmente nas áreas cosmética e alimentícia. Os corantes são encontrados recobrando a superfície externa das sementes de urucum e são constituídos na sua maioria (cerca de 80%) de α -bixina que é um monometilester do ácido carboxílico da α -norbixina (FERREIRA V.L.P., TEIXEIRA NETO R.O., MOURA S.C.S.R., SILVA M.S. Cinética da degradação da cor de solução hidrossolúvel comercial de urucum, submetida a tratamentos térmicos. Ciênc. Tecnol. Aliment. 19(1):37-42, 1999).

Vários países têm proibido o uso de um número de corantes alimentícios sintéticos e a maioria dos corantes naturais além da questão de aparência, têm importância na melhoria para a saúde, ocorrendo grande demanda por alimentos e suplementos contendo uma dose eficaz destes corantes (REDDY M.K., ALEXANDER-LINDO R.L., NAIR M.G. Relative inhibition of lipid peroxidation, cyclooxygenase enzymes, and human tumor cell proliferation by natural food colors. J. Agric. Food Chem. 53: 9268-9273, 2005). Reddy et al (REDDY M.K., ALEXANDER-LINDO R.L., NAIR M.G. Relative inhibition of lipid peroxidation, cyclooxygenase enzymes, and human tumor cell proliferation by natural food colors. J. Agric. Food Chem. 53: 9268-9273, 2005) demonstraram que bixina em combinação com licopeno e β -caroteno não tiveram impacto esperado na melhoria da saúde, porém, a inibição da peroxidação lipídica, enzimas da ciclooxigenase e proliferação de células tumorais foi significativa.

A presente invenção tem como objetivo elucidar o baixo custo e a facilidade no processo de preparação de vesículas lipídicas de carotenóides que tem como componente principal uma matéria prima de baixa toxicidade, mesmo em dosagens altas, que é bastante abundante no Brasil e de baixo custo. Com isso, o processo torna-se um incentivo para a indústria nacional aprimorar as técnicas de extração, purificação

e preparação do composto como um insumo mais nobre para a indústria farmacêutica, além dos já aplicados para indústria cosmética e de alimentos.

DESCRIÇÃO RESUMIDA

5 A presente invenção trata de vesículas lipídicas de carotenóides em que ditos carotenóides representam a maior proporção da constituição da bicamada vesicular. A invenção trata ainda de composição contendo ditas vesículas lipídicas de carotenóides, processo de preparação de vesículas lipídicas de carotenóides e uso.

DESCRIÇÃO DETALHADA

10 A presente invenção trata de vesículas lipídicas de carotenóides em que ditos carotenóides representam a maior proporção da constituição da bicamada vesicular, sua composição, seu processo de preparação e uso.

De acordo com a invenção, os carotenóides utilizados nas vesículas lipídicas podem ser selecionados entre bixina, zeaxantina, luteína, criptoxantina, alfa-caroteno, beta-caroteno, sendo preferencialmente bixina. Opcionalmente, ditas vesículas lipídicas
15 podem ser constituídas de carotenóides isolados e únicos, misturas de carotenóides, outros lipídios (carotenóides ou não carotenóides), colesterol, sal de colesterol, fosfolipídios, glicolipídios, lipídios conjugados, outros ligantes.

A norbixina é um tipo de carotenóide que pode participar da composição estrutural da vesícula, e também possui uma ação farmacológica sozinha. A norbixina
20 também forma emulsões devido à capacidade tensioativa. A vantagem é que a norbixina é solúvel em água e pode dispersar compostos insolúveis ou pouco solúveis em água quando adicionamos estes compostos diretamente na mistura de norbixina em água.

Não há artigos ou patentes que apresentem vesículas preparadas com mais que 1% de carotenóides em relação à vesícula preparada, pois foram utilizadas como
25 adjuvantes para melhorar estabilidade das vesículas. De acordo com a presente invenção, a vesícula é preparada a partir de carotenóides, opcionalmente, pode conter outro lipídio (carotenóide ou não-carotenóide), com função adjuvante ou para sítio dirigir para algum tecido específico do organismo. A vantagem da vesícula ser preparada a partir de carotenóides é que o custo e os efeitos adversos são muito baixos, e alguns
30 lipídios são caríssimos, principalmente os sintéticos, como o N-(1-(2,3-dioleoiloxi)propil)-N,N,N-trimetilamoniometilsulfato (DOTAP).

As vesículas lipídicas de carotenóides, segundo a presente invenção, apresentam carotenóides na concentração de 0,001 a 100 milimolares (mM), preferencialmente entre 0,01 a 10 mM, mais preferencialmente 0,01 a 1,0mM; e bixina
35 também na concentração de 0,001 a 100 milimolares (mM), preferencialmente entre 0,01 a 10 mM, mais preferencialmente 0,01 a 1,0mM. Essas vesículas caracterizam-se

por apresentarem-se sob a forma de lipossomos, podendo esses serem unilamelar ou multilamelar. Esse mesmo lipossomo é caracterizado por apresentar-se preferencialmente no tamanho entre 100 e 200 nm, mais preferencialmente $151,9 \pm 0,9$ nm, podendo variar desde 20 nm a 1500 nm, conforme as condições de preparação como presença de eletrólitos, outras estruturas moleculares não eletrolíticas, velocidade de agitação, solventes utilizados, temperatura, concentração dos lipídios, etc.

A estrutura molecular do carotenóide bixina (**Figura 1 A**) mostrou-se muito similar a alguns lipídios comumente utilizados para preparação de lipossomos, pois apresentam regiões com caráter polar e cadeia longa apolar, por exemplo, o dioctadecildimetilamônio (DODA), N-(1-(2,3-dioleoiloxi)propil)-N,N,N-trimetilamoniumetilsulfato (DOTAP). O composto não é solúvel em água, sendo muito difundida sua solubilização em solventes orgânicos. Seu caráter hidrofóbico apresenta vantagens para interagir com compostos com o mesmo caráter, sendo uma estrutura interessante para formar vesículas. A utilização de bixina como principal composto para preparar vesículas lipídicas nunca foi demonstrada talvez devido à dificuldade em solubilizar em solventes aquosos.

O carotenóide bixina tem sido estudado sob aspecto toxicológico e não tem mostrado efeitos tóxicos, apresentando ser muito promissor como carreador de drogas também por esta característica. Paumgarten et al (PAUMGARTEN F.J.R., DE-CARVALHO R.R., ARAUJO I.B., PINTO F.M., BORGES O.O., SOUZA C.A.M., KURIYAMA S.N. Evaluation of the developmental toxicity of annatto in the rat. Food and Chemical Toxicology. 40: 1595-1601, 2002) não detectaram nenhuma evidência de toxicidade tanto em ratas como em suas proles quando administraram uma quantidade de 500 mg ou mais de annato (28% de bixina)/ kg de peso/ dia por via oral. Este valor (≥ 140 mg de bixina/kg de peso/dia) determinado em ratos é pelo menos 2153 vezes o consumo diário aceitável preconizado pela Organização Mundial da Saúde (0,065 mg de bixina/kg peso/dia) para humanos. Assim observa-se que o carotenóide, produto natural, compete em eficiência com formulações comerciais.

Porém, outro tipo de inovação encontrado, foi a interação de vesículas aniônicas, pois bixina resulta em vesículas com potencial de carga negativa e ainda tem potencial de interagir com células com membranas de carga negativa. Foi demonstrado que deve existir outro tipo de interação que é mais forte que a simples atração eletrostática, portanto, apesar de casos clássicos como relatado, por exemplo, por Campanhã et al (CAMPANHÃ M.T.N., MAMIZUKA E.M., CARMONA-RIBEIRO A.M. Interactions between cationic liposomes and bacteria: the physical-chemistry of the bactericidal action. J. Lipid Res. 40: 1495-1500, 1999), em que vesículas catiônicas como os de DODAB, que

interagem com membranas de bactérias com carga negativa por atração eletrostática, as vesículas de bixina têm potencial de carga negativa que também interagem com membranas de bactérias por outro tipo de interação, a chamada hidrofóbica e que já foi demonstrado em outros trabalhos (KIKUCHI I.S., CARMONA-RIBEIRO A.M. Interactions between DNA and cationic liposomes. J. Phys. Chem. B. 104: 2829-2835, 2000).

A invenção aqui descrita atribuiu ao carotenóide bixina o papel principal de componente carreador enquanto no máximo, artigos apresentam seu papel como coadjuvantes. Hara et al (HARA M., YAMANO Y., SAKAI Y., KODAMA E., HOSHINO T., ITO M., MIYAKE J. Stabilization of liposomal membranes by carotenoids: zeaxanthin, zeaxanthinglucoside and thermozeaxanthin. Material Science and Engineering C. 28: 274-279, 2008) demonstraram estabilização de membranas lipossomais por outros carotenóides, a zeaxantina e seus derivados numa mistura com lipídios classicamente utilizados como dipalmitoil fostatidilcolina (DPPC), enquanto que na presente invenção, não foi utilizado qualquer tipo de lipídio ou outro componente com suposta função estabilizadora de membrana.

A aplicação de vesículas de bixina ou outros carotenóides está intimamente ligada à incorporação de componentes como os óleos essenciais em seu interior, bem como, à incorporação de outros adjuvantes de difícil dispersão nas formulações, como fármacos insolúveis em água como a anfotericina B e miconazol e outros de difícil manipulação como antineoplásicos, radiofármacos, hormônios, vacinas. Em todos os casos, são observados além do custo, a redução na dosagem aplicada ao paciente, uma vez que a entrega da droga ao sítio de ação deve ser mais eficiente, reduzindo também os possíveis efeitos colaterais inerentes ao fármaco carreado. Os carotenóides prestam-se também ao efeito estético, dando coloração ou efeito de partículas dispersas nas formulações, conforme tamanho e concentrações a serem introduzidas nas formulações. A grande vantagem é que elementos como óleos essenciais podem permanecer mais tempo nas vesículas e ter efeito mais duradouro na formulação devido a este efeito "protetor", de confinamento, dificultando evaporação dos compostos ativos.

As vesículas de bixina também podem ser utilizadas em formulações "antienvhecimento" como incorporar compostos considerados antioxidantes, protetores solares, etc., devido à molécula da bixina poder ser mais ávida por radicais livres e ser "atacada" antes que as substâncias incorporadas em seu interior sejam atingidas também, pois a molécula da presente invenção apresenta características que facilitam sua oxidação (duplas ligações) ou degradação (por radiação ultravioleta). O fato das interações hidrofóbicas serem mais intensas explica também o tipo de interação entre o fármaco anfotericina B, citado como preferencial quando carreado, e as moléculas de

bixina, explicitando que não são apenas partículas positivas que possam interagir com membranas de carga negativa. Portanto, característica que poderia ser desvantajosa pode ser utilizada como uma vantagem em certas formulações.

5 Nas áreas médica e farmacêutica, as formulações de bixina e/ou norbixina (com fármacos incorporados) podem ser mobilizadas nas superfícies de equipos médicos.

10 Dessa forma, de acordo com a presente invenção, as vesículas lipídicas de carotenóides apresentam três funções, uma função carreadora, na qual a vesícula atua como carreadora de componentes em seu interior, como por exemplo, óleos essenciais, corantes, fármacos, ácidos nucléicos, antineoplásicos, radiofármacos, vacinas, anticorpos, preferencialmente o fármaco anfotericina B, produzindo uma atividade de potencializar o efeito seja ele efeito químico, físico, biológico, farmacológico, etc, do componente carreado; uma função de princípio ativo, na qual a vesícula por si tem uma ação que produz uma atividade como atividade antimicrobiana, preferencialmente sobre bactérias Gram negativas e Gram positivas, antitumoral, antibiótica, antilipidêmica, 15 antioxidante, antiinflamatória, antiglicemiante; e uma função carreadora e de princípio ativo concomitantemente. As três funções desempenhadas pelas vesículas são muito importantes, pois artigos citam tais atividades utilizando a bixina solubilizada em solventes apolares e não na forma de vesículas.

20 A presente invenção trata ainda de uma composição farmacêutica que emprega vesículas lipídicas de carotenóides como parte integrante dessa composição. As vesículas lipídicas de carotenóides são constituídas em maior proporção de carotenóides. Esses carotenóides são selecionados entre bixina, zeaxantina, luteína, criptoxantina, alfa-caroteno, beta-caroteno, preferencialmente bixina. A composição emprega ainda conservante, fragrância, umectante, emoliente, espessante, outros 25 ativos. Essa composição compreende a seguinte fórmula farmacêutica e as faixas preferenciais, de acordo com a invenção, que estão descritas abaixo na **Tabela 1**:

Dispersão contendo Bixina lipossomal	60%
Glicerina	5%
Extratos aquosos vegetais	15%
Óleo de oliva	14%
Estearato de glicerila	4%
Carboximetilcelulose	1,5%
Conservante	0,25%
Fragrância	0,25%

TABELA 1

A presente invenção contempla ainda um processo de preparação de vesículas lipídicas de carotenóides em que ditos carotenóides representam a maior proporção molar da constituição da bicamada vesicular. Esses carotenóides podem ser escolhidos entre bixina, zeaxantina, luteína, criptoxantina, alfa-caroteno, beta-caroteno, etc., sendo preferencialmente bixina. As vesículas lipídicas de carotenóides podem se apresentar como estruturas unilamelares ou multilamelares.

Para o processo de preparação de estruturas vesiculares de bixina, foi explorada a sua solubilidade em etanol à temperatura ambiente e posterior adição à água, gota a gota, sob agitação por turbilhonamento ou com auxílio de barras magnéticas também à temperatura ambiente, permitindo estabilização das estruturas pelas interações das moléculas de água com porção polar das moléculas de bixina. A organização em formato de vesículas esféricas é devida também pelas interações hidrofóbicas entre as cadeias longas apolares das moléculas da própria bixina.

O processo emprega também técnicas selecionadas entre sonicação, injeção de solvente orgânico, extrusão, solubilização em solventes apolares com evaporação, dispersão da camada seca com outros solventes hidrossolúveis ou aquosos, mobilização dos carotenóides em superfícies de nano partículas, preferencialmente a técnica de injeção de solvente orgânico, além de outros métodos conhecidos na área de preparação de lipossomos.

O processo básico de preparação das vesículas lipídicas apresenta as seguintes etapas:

- a. solubilização do carotenóide em solvente orgânico;
- b. adição de solução obtida na etapa (a) em água, gota a gota, sob agitação;
- c. obtenção da vesícula lipídica de carotenóide.

Segundo a presente invenção, o processo mencionado acima pode conter ainda etapas intermediárias de acordo com a solubilidade dos componentes a serem carregados. Quando o componente a ser carregado for insolúvel em água, o processo de preparação das vesículas lipídicas apresenta as seguintes etapas:

- a. solubilização do carotenóide em solvente orgânico;
- b. solubilização em solvente orgânico de componentes insolúveis em água a serem carregados;
- c. mistura da solução obtida na etapa (a) com a solução obtida na etapa (b);
- d. adição da solução obtida na etapa (c) em água, gota a gota, sob agitação;
- e. obtenção da vesícula lipídica de carotenóide.

Quando o componente a ser carregado for solúvel em água, o processo de preparação das vesículas lipídicas apresenta as seguintes etapas:

- a. solubilização do carotenóide em solvente orgânico;
- b. solubilização em água ou solvente aquoso de componentes solúveis em água a serem carregados;
- c. mistura da solução obtida na etapa (a), gota a gota, à solução obtida na etapa (b), sob agitação;
- d. obtenção da vesícula lipídica de carotenóide.

Os componentes a serem carregados pela vesícula podem ser óleos essenciais, corantes, fármacos, ácidos nucleicos, anticorpos, antineoplásicos, radiofármacos, vacinas e adjuvantes, preferencialmente o fármaco anfotericina B.

De acordo com os processos de preparação, o solvente orgânico utilizado foi selecionado entre clorofórmio, dimetilsulfóxido, éter, alcoóis como etanol e metanol, preferencialmente o etanol, na concentração preferencial de 20%. O etanol foi o solvente utilizado para o processo, pois além de ser um solvente barato, possui baixa toxicidade, e é facilmente eliminado da preparação por processo diálise ou evaporação.

A preparação de bixina da presente invenção foi baseada na técnica de preparação de lipossomos a partir de injeção em soluções aquosas de preparações prévias de lipídios em solventes orgânicos. Todas as operações mencionadas no processo podem ser realizadas à temperatura ambiente e não necessitam que o carotenóide atinja o seu ponto de fusão, 198 °C, algo que seria necessário em preparações do tipo vortexação com subseqüentes passagens por membranas filtrantes com nanoporos, o que encareceria o custo da preparação. Possíveis resquícios de etanol, utilizado na primeira solubilização de bixina, podem ser eliminados por diálise simples por membranas de celulose, utilizando água como meio coletor.

Os processos de preparação das vesículas lipídicas de carotenóides e a incorporação de drogas podem ser realizados em ambiente com controle de contaminação. Opcionalmente, o produto final pode passar por processo de esterilização por meio de membranas filtrantes esterilizantes de acordo com o tamanho das vesículas formadas e de forma seletiva.

A presente invenção trata também do uso de vesículas lipídicas de carotenóides nas áreas farmacêutica, cosmética, veterinária, biotecnológica, odontológica, oncológica, radiofarmacêutica, agrônômica, de terapia gênica, alimentícia, como carreadora de óleos essenciais, corantes, fármacos, ácidos nucleicos, anticorpos antineoplásicos, radiofármacos, vacinas, e outros adjuvantes e uso "per si" como princípio ativo em composições farmacêuticas, veterinárias, cosméticas,

biotecnológicas, odontológicas, médicas, oncológicas, radiofarmacêuticas, agrônômicas, para terapias gênicas.

A seguir, exemplos para melhor ilustrar a invenção, contudo estes não possuem o intuito de restringir a invenção aqui descrita.

5 **EXEMPLOS**

O corante bixina obtido do urucum (*Bixa orellana* L.) foi utilizado para desenvolvimento de uma preparação lipossomal e a anfotericina B foi o fármaco modelo para incorporação neste sistema. Foram realizados ensaios *in vitro* para demonstrar eficácia deste novo sistema a partir de caroteno de origem natural, enquanto lipossomos tradicionais utilizam lipídios (não carotenóides) ora sintéticos ora naturais. Resultados mostraram eficácia na inibição de *Candida albicans*, bem como, desempenho melhor que produtos comerciais como Ambisome e Amphocil.

1. Materiais e métodos

Matérias-primas de bixina, norbixina e anfotericina B foram obtidas do mercado e ensaios para determinação de pureza e teor também foram realizados. Demais reagentes utilizados foram todos de grau analítico. Ambisome® e Amphocil® foram obtidas do mercado. O microrganismo *Candida albicans* ATCC 10231 foi obtido da coleção do Instituto Adolfo Lutz. Meios de cultura Sabouraud Dextrose Agar e meio nº 19, foram da marca Difco. Todos os materiais foram esterilizados por autoclavação, calor seco ou filtração por membrana esterilizante.

Preparação de lipossomos de bixina

Quantidade suficiente de bixina foi pesada e solubilizada diretamente em etanol para preparar solução a 5 mM (BX-ETOH). Material foi filtrado por papel de filtro e adicionado, com agitação e gota a gota em água na proporção de 1:10 para obtenção de dispersão a 0,5 mM.

Preparação de anfotericina B

Foi preparada solução estoque de anfotericina B pela solubilização direta em dimetilsulfóxido (DMSO), isto é, 10.000 µg de ingrediente ativo/mL (solução ANFO-DMSO) e seguida de diluição de 10 vezes em etanol (solução ANFO-ETOH).

30 i) Preparo de dispersão em solução tampão B10 (fosfato)

Foram preparadas dispersões contendo 10 µg/mL e 20 µg/mL de anfotericina B em solução tampão nº 10, pela diluição da solução ANFO-ETOH diretamente em tampão. A solução tampão nº 10 corresponde à solução de fosfato de potássio 0,2 M, pH 10,5 e constante na *The United States Pharmacopeia* 32. United States Pharmacopeial Convention. Rockville, vol. 1, p. 88, 2009.

35 ii) Preparo de anfotericina lipossomal

Volumes adequados das soluções de ANFO-ETOH e BX-ETOH foram misturados para obtenção de preparações 10 vezes mais concentradas que a desejada. Desta, foram adicionados e sob agitação, gota a gota em água na proporção de 1:10. A partir desta última preparação, pode-se fazer diluições seriadas em água ou outro diluente aquoso sem perdas das características das estruturas obtidas.

Preparação dos produtos comerciais

Tanto Ambisome como Amphocil foram reconstituídos com água e realizadas diluições adequadas com o mesmo diluente para obter concentrações finais de 10 e 20 µg/mL de ingrediente ativo.

Preparação de *Candida albicans*

Uma alçada de cerca de 1 µL do microrganismo foi transferida para superfície de ágar do meio de cultura Sabouraud Dextrose Agar e deixada em incubação a 30 °C por 48 horas. No dia do ensaio, a superfície com microrganismos foi lavada com 5 mL de solução salina a 0,9% e 1 mL da suspensão foi transferida para 99 mL de meio de cultura nº 19. Um volume de 8 mL do meio inoculado foi transferido para placas de Petri e deixadas para solidificar. Templates de aço inox foram transferidos para a superfície de cada uma destas placas de Petri imediatamente antes de aplicar as amostras.

Em cada orifício dos templates, foram aplicados 50 µL de cada amostra e deixados por 2 horas em repouso à temperatura ambiente, antes de submeter à incubação a 30 °C por 24-48 horas e então, fazer leitura dos halos de inibição.

Estatística

Para os ensaios, foram utilizados número de réplicas n=10 e pelo menos 3 testes independentes. Os valores apresentados são valores médios e análise estatística foi aplicada pela análise de variância (ANOVA). Os valores médios foram considerados significativamente diferentes para P<0,05.

2. Avaliação de atividade antimicrobiana de bixina e norbixina

Preparação de lipossomos de bixina

Dispersões de bixina foram preparadas conforme descrito anteriormente nas concentrações de 0,1 a 1,0 mM, sendo que amostras mais diluídas foram preparadas por diluição em água a partir da preparação a 1,0 mM.

Preparação de solução de norbixina

Soluções de Norbixina foram preparadas por simples solubilização em água nas concentrações variando de 0,1 a 1,0 mM, sendo que amostras mais diluídas foram preparadas por diluição em água a partir da preparação a 1,0 mM.

Preparação de inóculos de bactérias

Foram desafiados os microrganismos citados na farmacopéia americana (USP

XXXII): *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Escherichia coli* ATCC 8739, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027.

Uma alçada de cerca de 1 μ L de cada microrganismo foi transferida para superfície de ágar do meio de cultura Tryptic Soy Agar (TSA) e deixada em incubação a 35 °C por 24 horas. No dia do ensaio, a superfície com microrganismos foi lavada com 5 mL de solução salina a 0,9% e 1 mL da suspensão foi transferida para 99 mL de solução salina a 0,9%. Foi feita contagem de cada suspensão por diluições seriadas em tubos contendo 9 mL de salina (diluição até 10⁻⁸). Cada 1 mL das 3 últimas diluições foram plaqueadas em duplicata.

10 Determinação da atividade antimicrobiana

Cada preparação de bixina e norbixina na quantidade de 9 mL foi deixada em interação com 1 mL de cada inóculo por uma hora à temperatura ambiente. Após este período, 1 mL de cada amostra foi transferida para placa de Petri (em triplicata). Um volume de 15 mL de meio Tryptic Soy Agar (TSA) foi adicionado para cada uma das placas e homogeneizado. Após solidificação, cada amostra foi levada à incubação a 35 °C e a contagem realizada após 48 horas.

2. Resultados e discussão

O uso de carotenóides tem sido amplamente explorado nas indústrias alimentícia e cosmética como agentes corantes e em alguns casos, como na Agropecuária e Piscicultura, como suplemento alimentar. Devido à natureza apolar de muitos carotenóides, artigos acadêmicos têm explorado o seu transporte por sistemas de carreamento conhecidos como nanopartículas, entre os quais, lipossomos e outros sistemas coloidais. Não foram encontrados trabalhos utilizando bixina e norbixina, os carotenóides alvos deste trabalho, com a função de carreadores, porém, alguns trabalhos citam como ingrediente ativo para ser carreado por sistemas tradicionais como lipossomos (SOCACIU C., LAUSCH C., DIEHL H.A. Carotenoids in DPPC vesicles: membrane dynamics. *Spectrochimica Acta Part A* 55: 2289-2297, 1999).

Bixina foi solubilizada em etanol e em seguida, adicionada gota a gota em água, produzindo estruturas vesiculares, como pode ser comprovada pelas **Figuras 2 (A e B) e 3 (A e B)**. Na **Figura 2 A** observa-se o interior do microscópio onde foram aplicadas as lâminas de silício com as amostras e na **Figura 2 B** observa-se as vesículas de bixina sobre lâmina de silício. Na **Figura 3** observa-se vesículas de bixina sob microscopia eletrônica de varredura, onde em **A** observa-se as vesículas vazias, e em **B** as vesículas de bixina com o fármaco anfotericina B. Essas são imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura. Uma gota equivalente a um volume de cerca de 100 μ L foi aplicada diretamente sobre a superfície de uma lâmina de silício e levada ao

microscópio e as amostras foram observadas sob vácuo. O tamanho das partículas sem o fármaco foi medido no aparelho *ZetaPlus Zeta_Potential Analyzer* (Brookhaven Instruments Co.), equipado com laser de 570 nm e ângulo luminoso de 90° e apresentou diâmetro médio de $151,9 \pm 0,9$ nm (**Figura 4**) e Potencial Zeta de $-14,30 \pm 0,95$ mV, um potencial negativo conforme esperado devido à natureza aniônica do carotenóide. A **Figura 4** ilustra a distribuição por tamanho das vesículas de bixina em nanômetros.

Anfotericina B foi o fármaco de escolha para avaliar a capacidade de incorporação de drogas não solúveis em água nas vesículas de bixina. A anfotericina B apresenta comportamento anfílico devido às porções apolar e polar do anel lactônico e comportamento anfotérico devido à presença de grupos carboxila e aminas ionizáveis, tornando o composto pouco solúvel em solventes aquosos. A carga negativa da bixina pode interagir com o grupo amino positivo da anfotericina B formando um complexo e a estabilidade sendo reforçada pelas interações hidrofóbicas entre as porções apolares dos compostos.

O espectro óptico (**Figura 5**) foi obtido para caracterizar a agregação da anfotericina B na formulação de bixina. Foi utilizado espectrofotômetro Thermo Electron, modelo Nicolet Evolution 100, na região de 300 a 450 nm. O espectro foi obtido à temperatura ambiente (25 °C) no tempo máximo de até 1 hora após preparação das formulações. Na **Figura 5 A**, o espectro típico de anfotericina B solubilizada no seu melhor solvente, isto é, DMSO e Metanol, enquanto na **Figura 5 B**, um espectro característico do fármaco nas vesículas lipídicas como aqueles obtidos por Fujii et al (FUJII G., CHANG J.AE., COLEY T., STEERE B. The formation of Amphotericin B ion channels in lipid bilayers. *Biochemistry*. 36: 4959-4968, 1997) que utilizaram fosfatidilcolina (HSPC), colesterol (Chol) e diestearoilfosfatidilglicerol (DSPG).

Diferente do artigo de Silva et al (SILVA C.R., ANTUNES L.M.G., BIANCHI M.L.P. Antioxidant action of bixin against cisplatin-induced chromosome aberrations and lipid peroxidation in rats. *Pharmacological Research*. 43(6): 561-566, 2001), não foi possível dissolver bixina em etanol mais água destilada (1:9), mesmo que imediatamente antes dos experimentos. Foi constatado que a norbixina, outro composto da *Bixa orellana*, é que é passível de dissolução em solventes aquosos e na mistura citada, apresentando perfis diferentes de formulações com bixina.

Enquanto que a maioria dos pesquisadores tem dispersado bixina em solventes orgânicos, como DMSO, o que limitaria a aplicação em sistemas biológicos, a presente invenção mostra a possibilidade e vantagens de formulações aquosas, desde que na forma de vesículas. Apesar da prévia utilização de etanol para solubilização da bixina e posterior mistura em água, a quantidade deste álcool (etanol até 20%) não mostrou

interferência sobre o sistema testado, isto é, não inibiu crescimento de *Candida albicans*.

Os teores de bixina e norbixina foram determinados por espectrofotometria e comparação com coeficiente de absorção de 2826 em clorofórmio a 470 nm e 3473 em KOH 0,5% a 453 nm, respectivamente, conforme artigo de Tocchini e Mercadante (TOCCHINI L., MERCADANTE A.Z. Extração e determinação, por CLAE, de bixina e norbixina em coloríficos. *Ciên. Tecnol. Aliment.* 21(3): 310-313, 2001).

Determinação de halo de inibição para *C. albicans* e comparação com formulações comerciais

Foram avaliadas concentrações de 10 a 20 µg/mL de anfotericina B em bixina 0,5 e 1,0 mM. Controles para DMSO e etanol nas proporções utilizadas durante a preparação das formulações foram testadas e não apresentaram formação de halo de inibição. Controles para os carotenóides também foram testadas sem adição de fármaco e também não apresentaram formação de halo de inibição, demonstrando que bixina sozinha não interfere na inibição do halo de inibição. Porém, conforme **Figuras 6 e 7**, bixina potencializa efeito da anfotericina B, uma vez que este fármaco foi testado após diluição em solvente ideal, no caso, DMSO e metanol, seguido de diluição em solução tampão de fosfato, conforme preparação da Farmacopéia Americana (*The United States Pharmacopeia* 32. United States Pharmacopeial Convention. Rockville, vol. 1, p. 88, 2009), onde a **Figura 6** ilustra Placa de Petri contendo amostras com seus halos de inibição, onde **A** é Anfo 20 µg/mL em B-10, **B** é Anfo 10 µg/mL em BX 0,5 mM, **C** é Anfo 20 µg/mL em BX 0,5 mM, **D** é Anfo 10 µg/mL em B-10, **E** é Ambisome 20 µg/mL e **F** é Ambisome 10 µg/mL, e a **Figura 7** ilustra o diâmetro dos halos de inibição em função das amostras de anfotericina B na forma de gráfico. De acordo com essa figura (**Fig. 7**) observa-se uma comparação entre as preparações de anfotericina B em solução tampão de fosfato (Anfo B10), em preparações lipossomais de bixina (BX) e Ambisome (**Figura 7 A**) e Amphocil (**Figura 7 B**).

Foram realizados pelo menos 3 testes independentes e com número de réplicas não menor que 5. Análises, **Tabela 2 (Anexo)**, mostram que a formulação de anfotericina B e bixina é melhor que anfotericina sozinha ($P < 0,05$) e melhor que as formulações comerciais como Ambisome e Amphocil. Ambisome é a formulação comercial lipossomal enquanto Amphocil é um complexo com colesterilsulfato de sódio. Estas duas últimas mostraram eficácia na inibição de crescimento da *C. albicans*, porém, não foram melhores que anfotericina B sozinha em solução tampão. A **Tabela 2 (Anexo)** mostra a comparação entre as preparações de anfotericina e sua significância, segundo análise estatística ANOVA.

Tanto na **Figura 6** como na **Figura 7**, observa-se que a anfotericina na preparação lipossomal de bixina apresenta halo de inibição melhor que os produtos comerciais e a anfotericina B sozinha. Observa-se também que apesar da formação do halo, a coloração típica da bixina (**Figura 6**) não acompanhou o diâmetro do halo. Assim, é notório que a anfotericina B difundiu-se das vesículas para o meio de ágar, enquanto a vesícula permaneceu no local da aplicação. E ainda, o halo correspondente ao tamanho do orifício do *template* (cerca de 8 mm), apresenta-se translúcido como no padrão, demonstrando que não houve crescimento de *Candida albicans* no local, enquanto se fosse positivo para crescimento, haveria turvação no local, como o foi para o local com aplicação apenas da formulação com bixina sem o fármaco (dado não mostrado). Portanto, as vesículas de bixina não se difundiram pelo meio de ágar, mas o fármaco pôde ser liberado, o que é esperado numa formulação com eficiente sistema de entrega de droga.

Campanhã et al (CAMPANHÃ M.T.N., MAMIZUKA E.M., CARMONA-RIBEIRO A.M. Interactions between cationic vesicles and *Candida albicans*. *Journal of Physical Chemistry B*. 105: 8230-8236, 2001) e Lincopan et al (LINCOPAN N., MAMIZUKA E.M., CARMONA-RIBEIRO A.M. In vivo activity of a novel amphotericin B formulation with synthetic cationic bilayer fragments. *J. Antimicrobial Chemotherapy*. 52: 412-418, 2003) têm demonstrado eficácia de formulações de anfotericina B em fragmentos de bicamada catiônica sintética de brometo de dioctadecildimetilamônio (DODAB) e baseado nestas estruturas, a formulação com bixina mostra vantagens por formar vesículas e ser de origem natural.

A **Figura 8** ilustra a Curva de *Candida albicans* viáveis em função do tempo de interação com preparações contendo anfotericina B, onde UFC/ml significa unidades formadoras de colônias por mililitro, (-■-) Anfo_gli que significa anfotericina B em solução de glicose 5%; (-○-) BX_anfo que significa anfotericina B em vesículas de bixina; (-▲-) Ambisome significa dispersão aquosa do produto comercial Ambisome; (-▽-) Amphocil que significa dispersão aquosa do produto comercial Amphocil. As concentrações finais de anfotericina B nas preparações foram às seguintes para os gráficos: (a) 5 µg/mL; (b) 2,5 µg/mL; (c) 1 µg/mL. Nessa figura, observa-se que Anfotericina B quando disperso em solução de glicose a 5% tem a capacidade de diminuir a carga de *C. albicans* em 7 logs, assim como a formulação do fungicida incorporado em vesículas de bixina e num tempo de interação de cerca de 2 horas. As formulações comerciais como Ambisome e Amphocil com concentrações de anfotericina de 1, 2,5 e 5,0 µg/mL não conseguiram debelar totalmente as células da levedura,

ocasionando um aumento crescente de células sobreviventes a partir de 18 horas após início da interação fungo-fungicida.

Tem-se como perspectiva que os lipossomos de bixina tornem as formulações mais baratas hoje comercializadas de vários medicamentos, como a anfotericina B que foi o modelo estudado neste trabalho e cujo custo estimado para o tratamento por dia de um paciente de 70 kg nos Estados Unidos, era de 790 a 1316 dólares com Ambisome (TORRADO J.J., ESPADA R., BALLESTEROS M.P., TORRADO-SANTIGAGO S. Amphotericin B formulations and drug targeting. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 97(7): 2405-2425, 2008).

Foi avaliada atividade antimicrobiana de cada um dos compostos isoladamente: norbixina (**Figura 9 A**) e bixina (**Figura 9 B**), onde cada símbolo representa os microrganismos testados, conforme a seguir: (■) *S. aureus*, (●) *E. coli* e (▲) *P. aeruginosa*. Assim como muitos artigos citam, norbixina que é o composto solúvel em água, apresentou atividade antimicrobiana quando interagiu com *S. aureus*, uma bactéria Gram positiva, enquanto os resultados obtidos com as vesículas de bixina foram os mais surpreendentes. Foi demonstrado que este composto na forma de vesículas dispersas em água apresenta atividade antimicrobiana sobre Gram negativos também, como *E. coli* e *P. aeruginosa*, além de ação sobre o *S. aureus* (Gram positivo), nas concentrações testadas entre 1 e 0,5 mM do composto e de forma melhor ainda, não deixando células viáveis, enquanto norbixina deixou células viáveis residuais, o que deixa possibilidade de proliferação após um tempo maior com depleção dos princípios ativos.

Observa-se que preparações de norbixina em água não conseguem diminuir a carga de bactérias Gram negativas, como ainda contribuem para crescimento de fungos, demonstrando inocuidade sobre células eucarióticas devido à presença de enzimas do sistema citocromo P450 que permitem a biotransformação em metabólitos inócuos. Portanto, bixina age por outro mecanismo que pode ser por interação das vesículas de bixina sobre a membrana das células de bactérias, assim como sugerido por Campanhã et al. (CAMPANHÃ M.T.N., MAMIZUKA E.M., CARMONA-RIBEIRO A.M. Interactions between cationic liposomes and bacteria: the physical-chemistry of the bactericidal action. *J. Lipid Res.* 40: 1495-1500, 1999), podendo ser por oclusão das purinas ou ação sobre as proteínas de transporte das membranas, não permitindo trocas com o meio extracelular para depuração de metabólitos e/ou entrada de nutrientes, porém, havendo formação de uma camada de vesículas sobre a superfície das bactérias.

3. Conclusão

Na presente invenção, bixina mostrou ser capaz de formar vesículas quando utilizada técnica de injeção etanólica em água, possibilitando incorporar drogas, inclusive de caráter apolar como anfotericina B. Quando submetida isolada em teste *in vitro* com *Candida albicans*, a preparação lipossomal não apresentou formação de halo de inibição, porém, em associação com anfotericina B, permitiu sua liberação e interação com a levedura, promovendo halo de inibição maior ($P < 0,05$) que os produtos comerciais, como Ambisome e Amphocil, quando foram testadas nas mesmas concentrações finais do princípio ativo.

As vesículas de bixina apresentaram caráter aniônico, porém, podem se ligar eletrostaticamente em regiões catiônicas de outros compostos. Por apresentarem uma cadeia longa apolar como os lipídios utilizados para preparação de lipossomos, permitem interações hidrofóbicas com regiões apolares de outros compostos, como princípios ativos de caráter apolar.

Portanto, o que se pode esperar como alternativa para preparar vesículas de bixina ou outros carotenóides semelhantes como zeaxantina, luteína, criptoxantina e outros com estruturas próximas, é a utilização de um solvente orgânico adequado (de preferência, não tóxico ou que possa ser eliminado posteriormente por técnicas simples como diálise, evaporação ou bombeamento de gás inerte como nitrogênio), e depois, ser transferido gota a gota para soluções aquosas.

	AnfoB em tampão B10 (10 µg/mL)	AnfoB em tampão B10 (20 µg/mL)	AnfoB em bixina lipossomal (10 µg/mL)	AnfoB em bixina lipossomal (20 µg/mL)	Ambisome (10 µg/mL)	Ambisome (20 µg/mL)	Amphocil (10 µg/mL)	Amphocil (20 µg/mL)	Valor de P**
1	X		X						1,02441 ⁻¹¹
2	X				X				6,26408 ⁻⁷
3			X		X				2,53967 ⁻⁸
4		X		X					1,87961 ⁻¹³
5		X				X			7,20071 ⁻⁶
6				X		X			1,27788 ⁻⁹
7	X	X							0,02874
8			X	X					0,0079
9					X	X			0,63366
10	X						X		6,24943 ⁻¹⁰
11			X				X		3,33067 ⁻¹⁶
12		X						X	2,94839 ⁻⁸
13				X				X	1,11022 ⁻¹⁶
14							X	X	0,04146

(X) AnfoB – anfotericina B.

**Os expoentes representam que os valores devem ser multiplicados pelo fator 10 elevado ao respectivo expoente (Ex.: 1,11⁻⁵ representa 1,11 x 10⁻⁵).

***Significância para P<0,05.

TABELA 2

REIVINDICAÇÕES

1. **Vesículas lipídicas de carotenóides**, caracterizadas por compreender carotenóides em que ditos carotenóides representam a maior proporção molar da constituição da bicamada vesicular.
- 5 2. **Vesículas lipídicas de carotenóides**, segundo reivindicação 1, caracterizadas pelo fato dos carotenóides representarem acima de 10% em proporção molar em relação à constituição da bicamada vesicular.
3. **Vesículas lipídicas de carotenóides**, segundo reivindicação 1, caracterizadas pelo fato dos carotenóides representarem acima de 50% em proporção molar em relação à constituição da bicamada vesicular.
- 10 4. **Vesículas lipídicas de carotenóides**, segundo reivindicação 1, caracterizadas pelo fato dos carotenóides serem selecionados entre bixina, zeaxantina, luteína, criptoxantina, alfa-caroteno, beta-caroteno.
5. **Vesículas lipídicas de carotenóides**, segundo reivindicação 4, caracterizadas por compreender preferencialmente bixina.
- 15 6. **Vesículas lipídicas de carotenóides**, segundo reivindicação 1, caracterizadas por apresentar-se sob a forma de lipossomo.
7. **Vesículas lipídicas de carotenóides**, segundo reivindicação 6, caracterizadas pelo fato do lipossomo ser unilamelar ou multilamelar.
- 20 8. **Vesículas lipídicas de carotenóides**, segundo reivindicações 6 ou 7, caracterizadas pelo fato do lipossomo apresentar-se no tamanho de 20 nm a 1500 nm, preferencialmente entre 100 e 200 nm, mais preferencialmente $151,9 \pm 0,9$ nm.
9. **Vesículas lipídicas de carotenóides**, segundo reivindicação 1, caracterizadas por apresentar o carotenóide na concentração de 0,001 a 100 milimolares (mM), preferencialmente entre 0,01 a 10 mM, mais preferencialmente entre 0,01 a 1,0 mM em relação à formulação lipossomal total.
- 25 10. **Vesículas lipídicas de carotenóides**, segundo reivindicação 5, caracterizadas por apresentar a bixina na concentração de 0,001 a 100 milimolares (mM), preferencialmente entre 0,01 a 10 mM, mais preferencialmente entre 0,01 a 1,0 mM em relação à formulação lipossomal total.
- 30 11. **Vesículas lipídicas de carotenóides**, segundo reivindicação 1, caracterizadas por apresentar função carreadora de componentes em seu interior.
12. **Vesículas lipídicas de carotenóides**, segundo reivindicação 1, caracterizadas por apresentar função de princípio ativo.
- 35 13. **Vesículas lipídicas de carotenóides**, segundo reivindicação 1, caracterizadas por apresentar função carreadora e de princípio ativo concomitantemente.

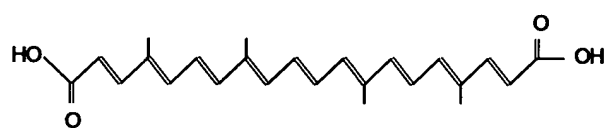
14. **Vesículas lipídicas de carotenóides**, segundo reivindicação 11, caracterizadas por compreender componentes em seu interior como óleos essenciais, corantes, fármacos, ácidos nucleicos, antineoplásicos, radiofármacos, vacinas, anticorpos, adjuvantes, entre outros.
- 5 15. **Vesículas lipídicas de carotenóides**, segundo reivindicação 14, caracterizadas por compreender preferencialmente, fármacos antimicrobianos como a anfotericina B.
16. **Vesículas lipídicas de carotenóides**, segundo reivindicação 11, caracterizadas pelo fato de apresentar atividade potencializadora do efeito biológico, farmacológico, químico, físico do componente carregado.
- 10 17. **Vesículas lipídicas de carotenóides**, segundo reivindicação 12, caracterizadas pelo fato de apresentar atividade como atividade antimicrobiana, antitumoral, antibiótica, antilipidêmica, antioxidante, antiinflamatória, antiglicemiante, entre outros.
18. **Vesículas lipídicas de carotenóides**, segundo reivindicação 17, caracterizadas pelo fato de apresentar preferencialmente atividade antimicrobiana, mais preferencialmente sobre bactérias Gram negativas e Gram positivas.
- 15 19. **Vesículas lipídicas de carotenóides**, segundo reivindicação 13, caracterizadas pelo fato de apresentar atividade potencializadora do efeito biológico, farmacológico, químico, físico do componente carregado e atividade antimicrobiana, antitumoral, antibiótica, antilipidêmica, antioxidante, antiinflamatória, antiglicemiante, entre outros concomitantemente.
- 20 20. **Vesículas lipídicas de carotenóides**, segundo reivindicações 1 a 19, caracterizadas por compreender opcionalmente carotenóides isolados e únicos, misturas de carotenóides, outros lipídios (carotenóides ou não carotenóides), colesterol, sal de colesterol, fosfolipídios, glicolipídios, lipídios conjugados, outros ligantes.
- 25 21. **Composição** caracterizada por compreender vesículas lipídicas de carotenóides, segundo reivindicações 1 a 20.
22. **Composição**, segundo reivindicação 21, caracterizada pelo fato das vesículas lipídicas de carotenóides serem compostas por carotenóides em que ditos carotenóides representam a maior proporção molar em relação à constituição da bicamada vesicular.
- 30 23. **Composição**, segundo reivindicação 22, caracterizada pelo fato dos carotenóides serem selecionados entre bixina, zeaxantina, luteína, criptoxantina, alfa-caroteno, beta-caroteno.
- 35 24. **Composição**, segundo reivindicação 23, caracterizada pelo fato do carotenóide ser preferencialmente bixina.

25. **Composição**, segundo reivindicação 22, caracterizada por compreender ainda glicerina, extratos aquosos vegetais, óleo de oliva, estearato de glicerila, carboximetilcelulose, conservante e fragrância.
- 5 26. **Processo de preparação de vesículas lipídicas de carotenóides**, segundo reivindicações 1 a 20, caracterizado por empregar carotenóides em que ditos carotenóides representam a maior proporção molar em relação à constituição da bicamada vesicular.
- 10 27. **Processo de preparação de vesículas lipídicas de carotenóides**, segundo reivindicação 26, caracterizado pelo fato dos carotenóides serem selecionados entre bixina, zeaxantina, luteína, criptoxantina, alfa-caroteno, beta-caroteno, preferencialmente bixina.
- 15 28. **Processo de preparação de vesículas lipídicas de carotenóides**, segundo reivindicação 26, caracterizado por empregar técnicas escolhidas entre sonicação, injeção de solvente orgânico, extrusão, solubilização em solventes apolares com evaporação, dispersão da camada seca com outros solventes hidrossolúveis ou aquosos, mobilização dos pigmentos lipossolúveis em superfícies de nano partículas, além de outros métodos.
- 20 29. **Processo de preparação de vesículas lipídicas de carotenóides**, segundo reivindicação 28, caracterizado pelo fato de empregar, preferencialmente a técnica de injeção de solvente orgânico.
- 25 30. **Processo de preparação de vesículas lipídicas de carotenóides**, segundo reivindicação 26, caracterizado por compreender as seguintes etapas:
- a. solubilização do carotenóide em solvente orgânico;
 - b. adição de solução obtida na etapa (a) em água, gota a gota, sob agitação;
 - c. obtenção da vesícula lipídica de carotenóide.
- 30 31. **Processo de preparação de vesículas lipídicas de carotenóides**, segundo reivindicação 30, caracterizado por compreender as seguintes etapas quando o componente a ser carregado for insolúvel em água:
- a. solubilização do carotenóide em solvente orgânico;
 - b. solubilização de componentes insolúveis em água a serem carregados em solvente orgânico;
 - c. mistura da solução obtida na etapa (a) com a solução obtida na etapa (b);
 - d. adição da solução obtida na etapa (c) em água, gota a gota, sob agitação;
 - e. obtenção da vesícula lipídica de carotenóide.
- 35

32. **Processo de preparação de vesículas lipídicas de carotenóides**, segundo reivindicação 30, caracterizado por compreender as seguintes etapas quando o componente a ser carregado for solúvel em água:
- a. solubilização do carotenóide em solvente orgânico;
 - 5 b. solubilização de componentes solúveis em água a serem carregados em água ou solvente aquoso;
 - c. mistura da solução obtida na etapa (a), gota a gota à solução obtida na etapa (b), sob agitação;
 - d. obtenção da vesícula lipídica de carotenóide.
- 10 33. **Processo de preparação de vesículas lipídicas de carotenóides**, segundo reivindicações 31 ou 32, caracterizado por compreender componentes a serem carregados como óleos essenciais, corantes, fármacos, ácidos nucleicos, anticorpos, antineoplásicos, radiofármacos, vacinas, e adjuvantes, preferencialmente o fármaco anfotericina B..
- 15 34. **Processo de preparação de vesículas lipídicas de carotenóides**, segundo reivindicações 30 a 32, caracterizado pelo fato do solvente orgânico ser clorofórmio, dimetilsulfóxido, éter, alcoóis como etanol e metanol, preferencialmente o etanol.
- 20 35. **Processo de preparação de vesículas lipídicas de carotenóides**, segundo reivindicação 34, caracterizado por empregar preferencialmente o etanol e na concentração de até 20% da preparação final, sendo recomendável eliminá-lo por processo como diálise ou evaporação destes solventes orgânicos.
- 25 36. **Uso de vesículas lipídicas de carotenóides**, segundo reivindicações de 1 a 35, nas áreas farmacêutica, alimentícia, veterinária, cosmética, de pesquisa básica, de biotecnologia, odontológica, oncológica, radiofarmacêutica, agrônômica, de terapia gênica.
37. **Uso de vesículas lipídicas de carotenóides**, segundo reivindicações de 1 a 35, como carreadora de óleos essenciais, corantes, fármacos, ácidos nucleicos, anticorpos, antineoplásicos, radiofármacos, vacinas e adjuvantes.
- 30 38. **Uso de vesículas lipídicas de carotenóides**, segundo reivindicações de 1 a 35, como princípio ativo em formulações farmacêuticas, veterinárias, cosméticas, biotecnológicas, odontológicas, oncológicas, radiofarmacêuticas, agrônômicas, de terapia gênica.

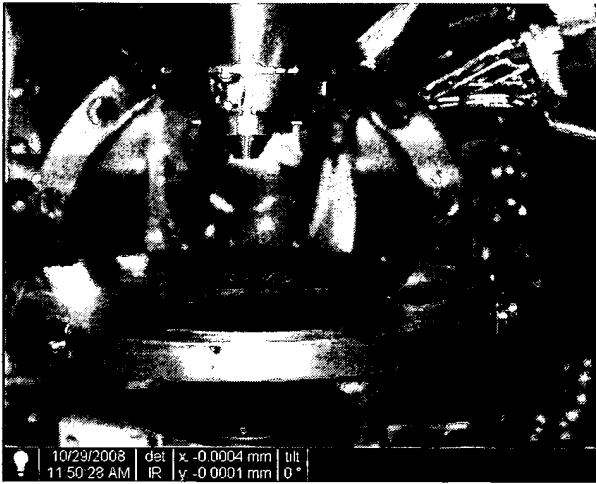


A

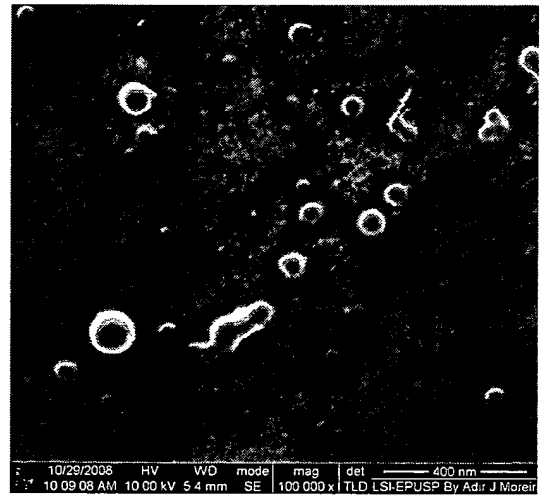


B

FIGURA 1

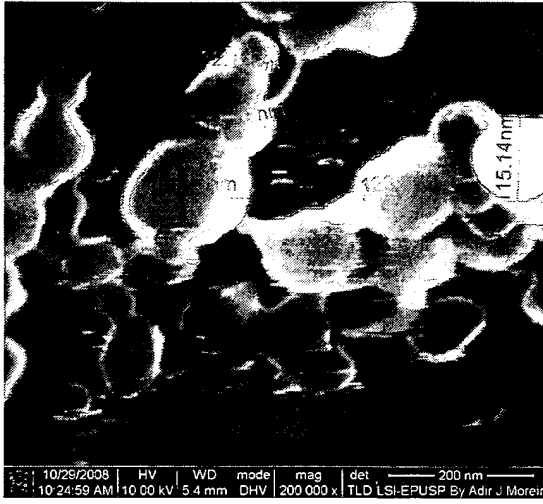


A

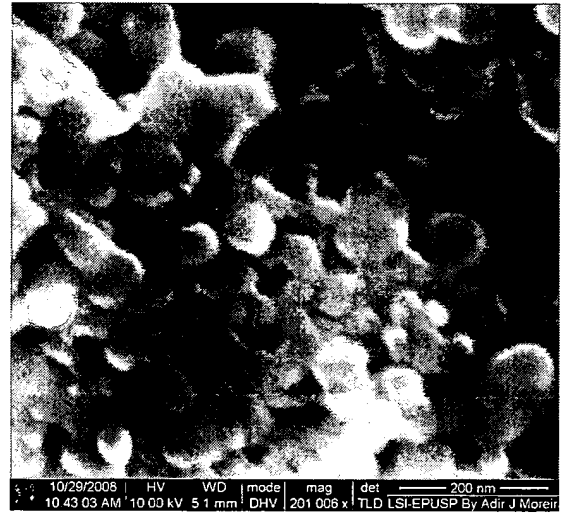


B

FIGURA 2



A



B

FIGURA 3

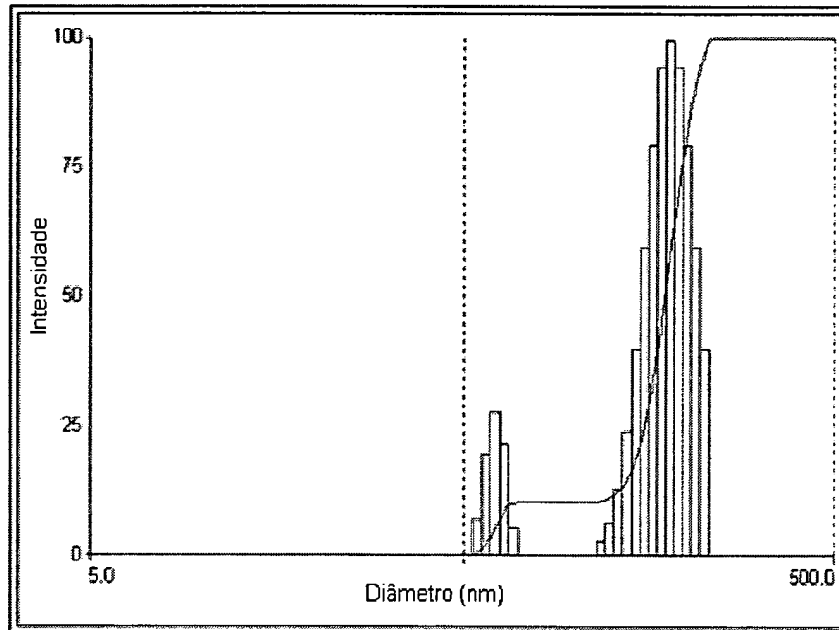
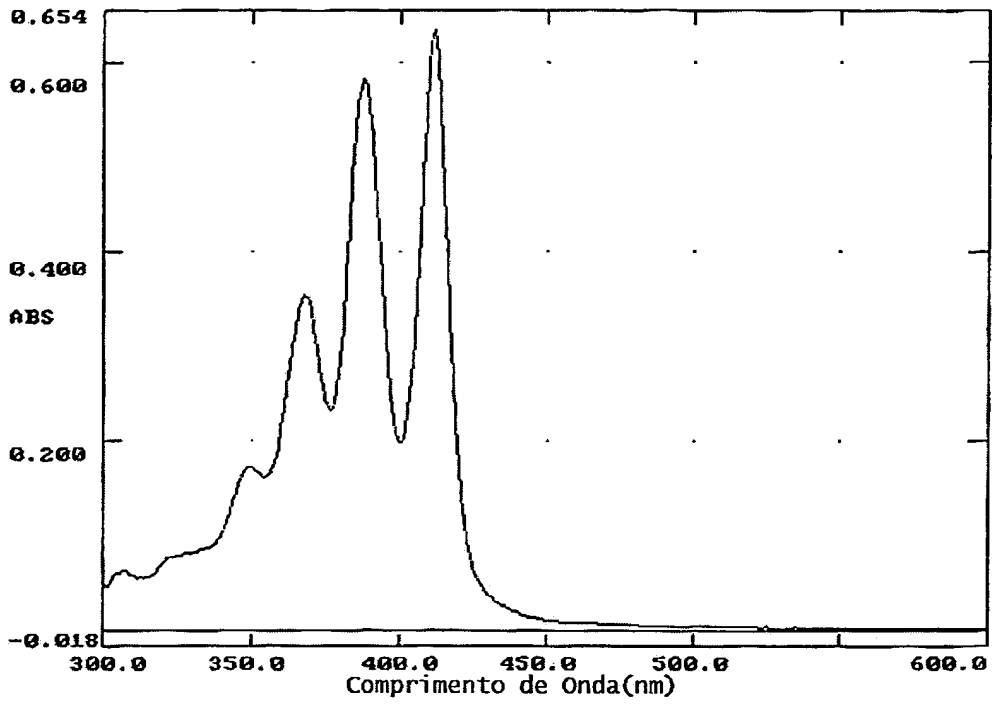
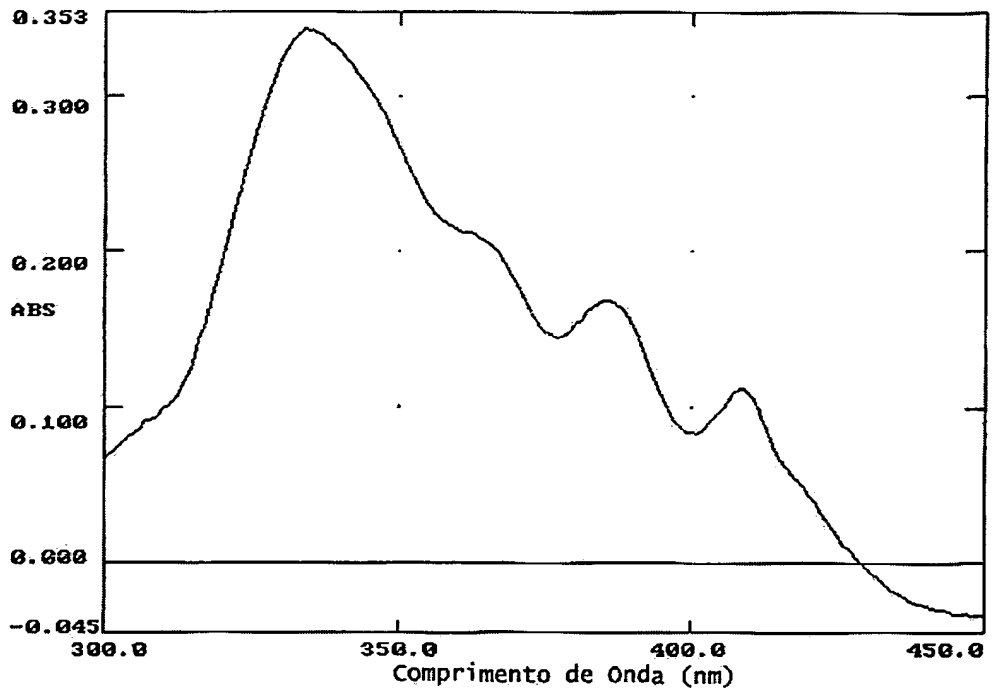


FIGURA 4



A



B

FIGURA 5

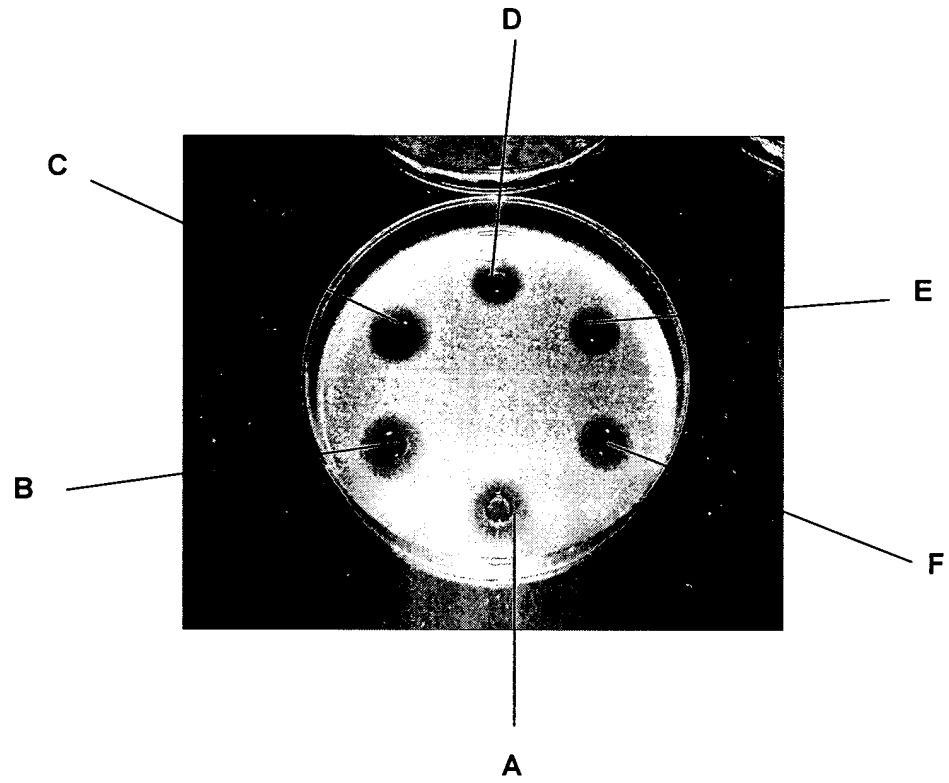
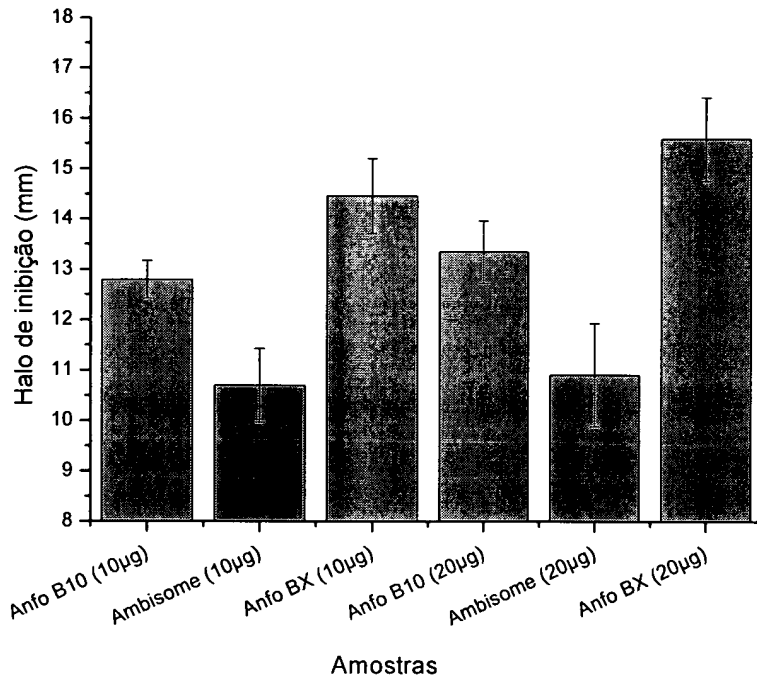
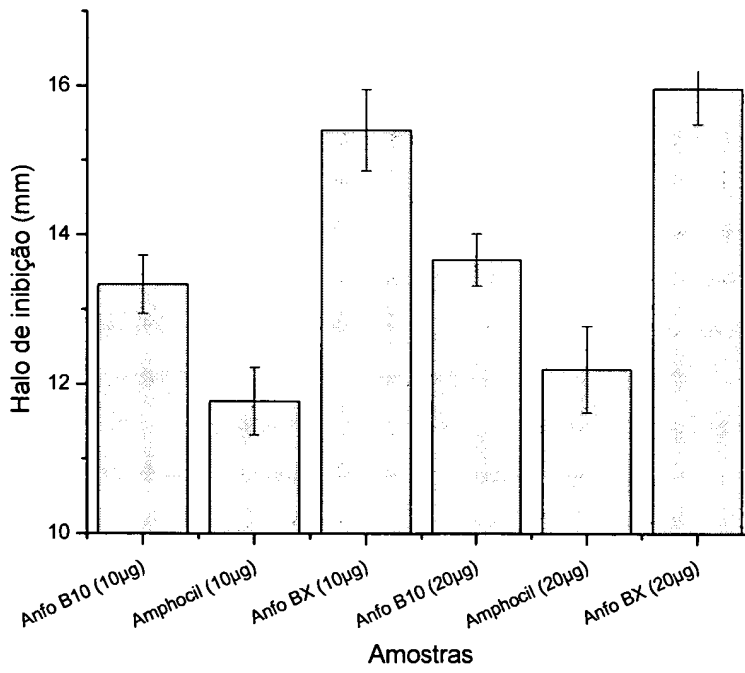


FIGURA 6

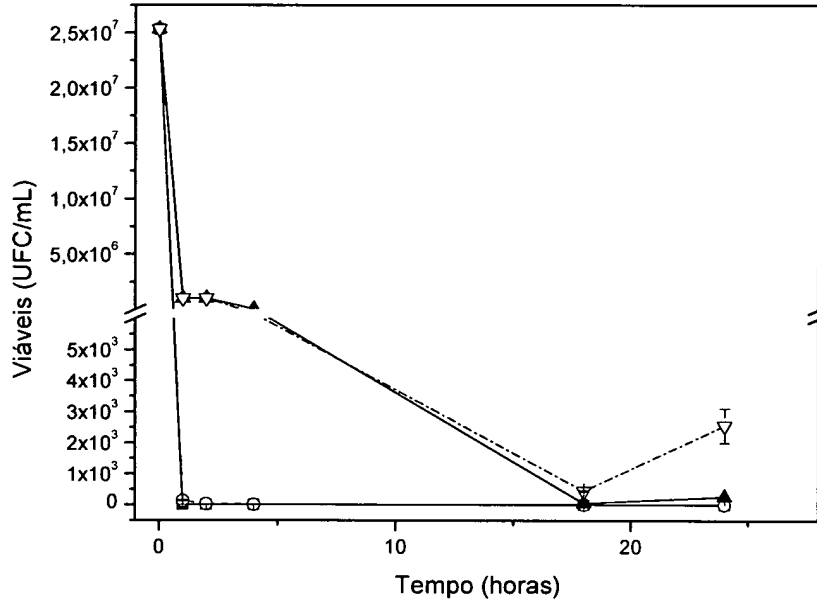


A

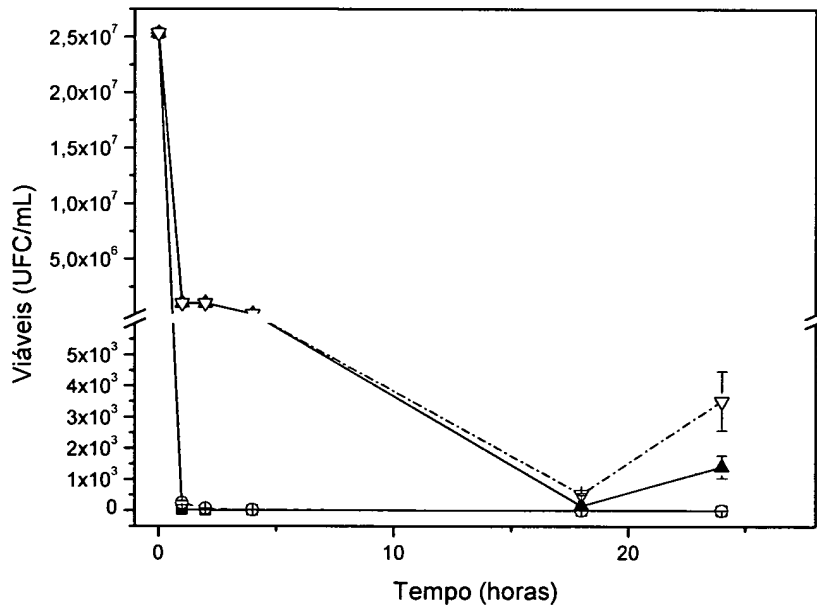


B

FIGURA 7

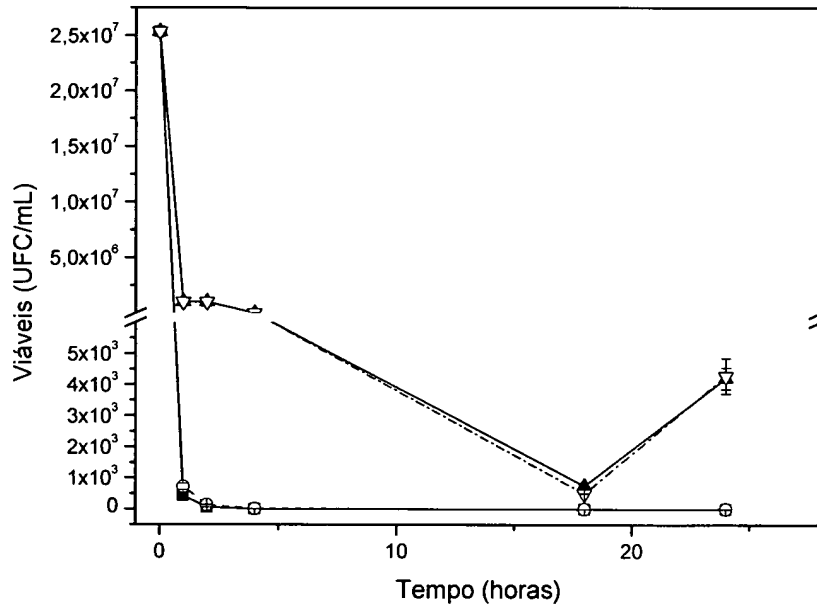


(a)



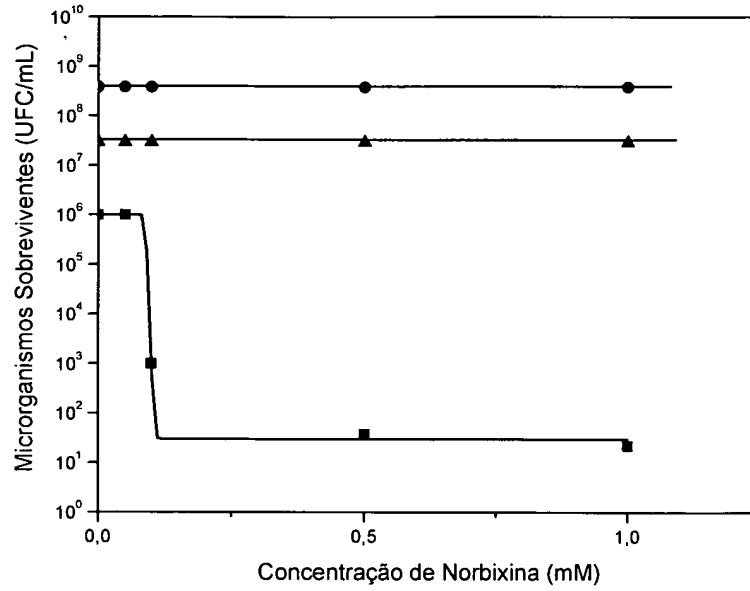
(b)

FIGURA 8

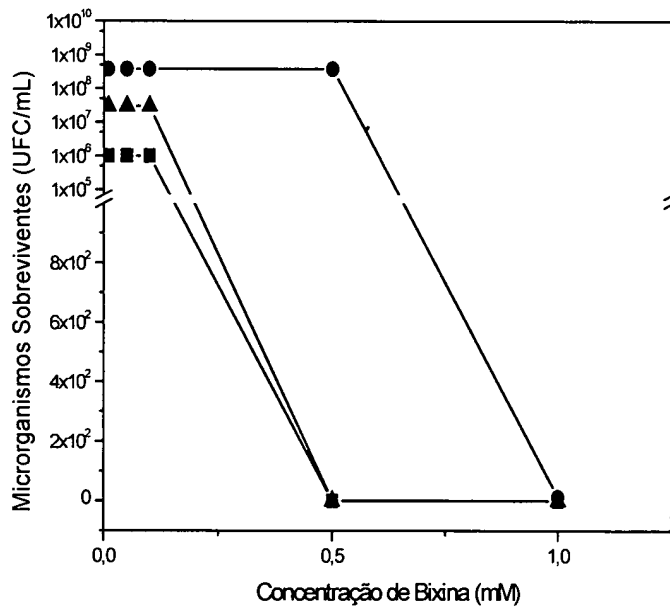


(c)

FIGURA 8



A



B

FIGURA 9

RESUMO**VESÍCULAS LIPÍDICAS DE CAROTENÓIDES, COMPOSIÇÃO, PROCESSO DE PREPARAÇÃO DE VESÍCULAS LIPÍDICAS DE CAROTENÓIDES E USO DE VESÍCULAS LIPÍDICAS DE CAROTENÓIDES**

5 A presente invenção aplica-se nas áreas farmacêutica, cosmética, veterinária, biotecnológica, odontológica, médica, oncológica, radiofarmacêutica, agrônômica, de terapia gênica, alimentícia, referindo-se à constituição de vesículas lipídicas de carotenóides em que ditos carotenóides representam a maior proporção molar da constituição da bicamada vesicular, bem como uma composição contendo

10 ditas vesículas lipídicas de carotenóides, processo de preparação de vesículas lipídicas de carotenóides e uso.