

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE ANÁLISES CLÍNICAS E BIOMEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCIÊNCIAS APLICADAS À
FARMÁCIA

CLAUDIA TERCENIO AGOSTINHO PIRES

Determinação da atividade antimicobacteriana e citotoxicidade dos extratos
brutos e substâncias puras das folhas de *Calophyllum brasiliense* Cambess
(Clusiaceae)

Maringá
2011

CLAUDIA TERCENIO AGOSTINHO PIRES

Determinação da atividade antimicobacteriana e citotoxicidade dos extratos
brutos e substâncias puras das folhas de *Calophyllum brasiliense* Cambess
(Clusiaceae)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Biociências Aplicadas à Farmácia do Departamento de
Análises Clínicas e Biomedicina, Centro de Ciências da
Saúde da Universidade Estadual de Maringá, como
requisito parcial para obtenção do título de Mestre em
Biociências Aplicadas à Farmácia

Área de concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia
Orientadora: Prof^a Dr^a Rosilene Fressatti Cardoso

Maringá
2011

FOLHA DE APROVAÇÃO

CLAUDIA TERCENIO AGOSTINHO PIRES

Determinação da atividade antimicobacteriana e citotoxicidade dos extratos brutos e substâncias puras das folhas de *Calophyllum brasiliense* Cambess (Clusiaceae)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia do Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina, Centro de Ciências da Saúde da Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biociências Aplicadas à Farmácia pela Comissão Julgadora composta pelos membros:

Profª Drª Rosilene Fressatti Cardoso
Universidade Estadual de Maringá (Presidente)

Profª Drª Jane Marta Graton Mikcha
Universidade Estadual de Maringá (Membro)

Drª. Raissa Bocchi Pedroso
Universidade Estadual de Maringá (Membro)

Dr. Fernando Rogério Pavan
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP (Membro)

Aprovada em: 23 de Dezembro de 2011.
Local de defesa: Bloco 126, Centro de Ciências da Saúde.
Universidade Estadual de Maringá.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais pelo apoio e amor incondicional, por todas as vezes que me encorajaram nas horas difíceis e me aplaudiram nos momentos de glória.

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela vida, pelas oportunidades e por me proporcionar sabedoria nas minhas escolhas;

Aos meus pais, João e Maria, pelo amor e confiança que sempre depositaram em mim, e por sempre me apoiarem a vencer mais esta etapa da minha vida;

À minha irmã Paula, meu irmão Marcos, minha cunhada Fabiana e meu sobrinho Matheus que compreenderam as minhas ausências e me incentivaram a sempre caminhar para realização dos meus sonhos;

À minha orientadora, Prof^a Dr^a Rosilene Fressatti Cardoso, meus sinceros agradecimentos, por todo ensinamento, dedicação, preocupação, carinho na elaboração deste trabalho e pela oportunidade de realizá-lo. Muito obrigada por sempre acreditar em minha capacidade;

Ao professor Dr. Diógenes Aparício Garcia Cortez, meus agradecimentos, não somente pelos ensinamentos, mas também por seu incentivo e confiança em meu trabalho;

À aluna de Pós-graduação Regiane Bertin Scodro, por toda amizade, paciência e incentivo no decorrer dessa dissertação que esteve sempre presente nos momentos fáceis e difíceis do mestrado. Muito obrigada;

À aluna de Pós-graduação Mislaine Adriana Brenzan meu imenso agradecimento pelo fornecimento dos extratos e substâncias puras utilizados na realização deste trabalho. Obrigada pelo carinho, apoio e sugestões dispensados;

Ao professor Dr. Lucio Cardoso Filho e a aluna de Pós-graduação Renata Menoci Gonçalves pelo fornecimento dos extratos utilizados na realização deste trabalho. Obrigada pelo apoio e incentivos dispensados;

À Prof^a Dr^a Maria Valdrinez, as alunas de Pós-graduação e estagiárias, obrigada pelo apoio na realização dos experimentos de citotoxicidade;

Às bioquímicas Rubia, Elisa e Sônia agradeço por todo apoio e compreensão na elaboração desse trabalho;

Às técnicas Maria, Aline, Edilene, Soninha, e ao Marcos, pelo carinho e colaboração durante a realização dos experimentos;

Às professoras Katiany e Vera pelos ensinamentos, apoio e incentivos dispensados;

Às alunas de Pós-graduação Sara, Paula, Luciana, Gabriela, Rosangela, Luzia e Amanda e a estagiária Vanessa pela colaboração e ajuda durante os experimentos;

Aos amigos bioquímicos; Luciano, André, Francisco, Magda e Marcia. Aos técnicos; Cícera, Sônia, Clécio e Iraci e administrativos Rosana, Tatiane, Magna, Batista e Heverton do Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Municipal de Maringá agradeço por todo apoio e compreensão;

Enfim, a todos que direta ou indiretamente contribuíram para realização deste trabalho.

EPÍGRAFE

“O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis.”

(José Saramago)

Determinação da atividade antimicobacteriana e citotoxicidade dos extratos brutos e substâncias puras das folhas de *Calophyllum brasiliense* Cambess (Clusiaceae)

RESUMO

A tuberculose (TB) é uma doença causada por bacilos do complexo *Mycobacterium tuberculosis*. No ano de 2010, aproximadamente 8,8 milhões de casos novos e 1,4 milhões de mortes em todo mundo foi causado por esta doença. Há cerca de 40 anos que não surgem novos medicamentos para seu tratamento, embora os fármacos disponíveis sejam eficazes, o tempo de tratamento é muito longo, no mínimo seis meses, nos quais muitas vezes pela alta toxicidade, acarretam no abandono do tratamento pelo paciente. Rifampicina e isoniazida são os fármacos mais potentes utilizados no tratamento da TB, porém a resistência a esses fármacos tem aumentado. Com a pandemia da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS), o controle insuficiente da TB e o aparecimento de cepas multi-droga resistentes torna-se necessário à busca de novos agentes anti-TB. O Brasil possui uma grande biodiversidade de plantas, fazendo com que haja uma fonte inesgotável de pesquisas na busca de novos fármacos de origem vegetal que tenham ação anti-TB. O gênero *Calophyllum*, pertencente à família Clusiaceae, vem despertando interesse da comunidade científica devido aos promissores resultados químicos e biológicos. *Calophyllum brasiliense* Cambess (Clusiaceae) é uma árvore de grande porte também conhecido como Guanandi, Jacaréuba, a qual é uma rica fonte de compostos bioativos como as cumarinas, xantonas, triterpenos e biflavonóides. Dessa forma, o objetivo do presente estudo foi avaliar a atividade antimicobacteriana *in vitro* em *M. tuberculosis* e a citotoxicidade dos extratos brutos e substâncias puras obtidas do *Calophyllum brasiliense*. O resultado deste trabalho está apresentado no artigo: “Determinação da atividade antimicobacteriana e citotoxicidade dos extratos brutos e substâncias puras das folhas de *Calophyllum brasiliense* Cambess (Clusiaceae)”, nos quais foram avaliadas as concentrações inibitórias mínimas (CIM) em *M. tuberculosis* H₃₇Rv, a citotoxicidade e o índice de seletividade (IS) dos extratos e substâncias puras identificando assim os compostos mais promissores ao desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento da TB.

Palavras-chave: *Mycobacterium tuberculosis*. *Calophyllum brasiliense*. Atividade antimicobacteriana. Citotoxicidade.

Determination of antimycobacterial activity and cytotoxicity of crude extracts and pure compounds from *Calophyllum brasiliense* Cambess (Clusiaceae) leaves

ABSTRACT

Tuberculosis (TB) is a disease caused by the *Mycobacterium tuberculosis* complex. In 2010 approximately 8.8 million new cases and 1.4 million deaths worldwide were due to this disease. It's been more than 40 years that no new anti-TB drugs have been used. The available drugs are very effective, however, the treatment is too long, at least six months. The time and toxicity of the available drugs, results in abandon of treatment by patient. Rifampicin and isoniazid are the most potent drugs used in TB treatment, but resistance to these drugs has increased. With the AIDS pandemic, inadequate control of TB and the emergence of multi-drug resistant strains it is necessary to search for new anti-TB agents. Brazil has a great biodiversity of plants, so that, there is an inexhaustible source of research for new drugs of plant origin, that have an anti-TB activity. The *Calophyllum* genus belongs to the family Clusiaceae and have attracted interest from the scientific community due to its promising chemical and biological results. The *Calophyllum brasiliense* Cambess (Clusiaceae) is a large tree also known as Guanandi, Jacaréuba, which is a rich source of bioactive compounds such as coumarins, xanthones, triterpenes and biflavonoids. Thus, the objective of this study was to evaluate antimycobacterial activity in vitro against *M. tuberculosis* and cytotoxicity of crude extracts and pure compounds obtained from *Calophyllum brasiliense*. The result of this work is in the article: "Determination of antimycobacterial activity and cytotoxicity of crude extracts and pure compounds from *Calophyllum brasiliense* Cambess (Clusiaceae) leaves", in which was assessed the minimum inhibitory concentration (MIC) in *M. tuberculosis* H₃₇Rv, cytotoxicity and selectivity index (SI) of extracts and compounds thus identifying the most promising compounds to develop new drugs to treat TB.

Keywords: *Mycobacterium tuberculosis*. *Calophyllum brasiliense*. Antimicrobial activity. cytotoxicity.

Dissertação elaborada e formatada
conforme as normas das publicações
científicas: *Journal of Antimicrobial
Chemotherapy*. Disponível em:
[http://www.oxfordjournals.org/our_journals
/jac/for_authors/](http://www.oxfordjournals.org/our_journals/jac/for_authors/)

SUMÁRIO

1	CAPÍTULO I.....	12
1.1	Introdução.....	12
1.2	Justificativa.....	16
1.3	Objetivos.....	17
1.4	Referências	18
2	CAPÍTULO II.....	22
2.1	Determinação da atividade antimicobacteriana e citotoxicidade dos extratos brutos e substâncias puras das folhas de <i>Calophyllum brasiliense</i> Cambess (Clusiaceae).....	23
3	CAPÍTULO III.....	42
3.1	Conclusões.....	42
3.2	Perspectivas Futuras.....	42

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO

A tuberculose (TB) é uma doença infecto-contagiosa que afeta principalmente os pulmões, podendo se estender a outros órgãos e tecidos do corpo como ossos, rins e meninges. Apesar de seu principal agente causador, *Mycobacterium tuberculosis*, ter sido descrito em 1882, a TB ainda hoje é um grave problema de saúde pública mundial.¹

Estima-se que ocorreram mundialmente no ano de 2010 de 8,5 a 9,2 milhões de casos novos (128/100.000 habitantes) de TB que levou a aproximadamente 1,4 milhões de óbitos/ano. Desses 1,4 milhões de mortes de pacientes com TB, aproximadamente 350.000 foram de pessoas vivendo com o vírus da imunodeficiência humana (HIV). O risco de uma pessoa com HIV desenvolver tuberculose é cerca de 20 a 37 vezes maior do que uma pessoa sem o HIV.^{2,3}

O Brasil ocupa o 17º lugar na classificação dos 22 países que concentram 80% dos casos em todo o mundo com maior número de casos notificados de TB, com 81.946 notificações e incidência de 38/100.000 habitantes.²

Em 2001, a porcentagem nacional da incidência da co-infecção HIV/TB era de 7,4% e em 2009 foi de 9,2%. Esse percentual mostra-se bem mais elevado nos estados onde a incidência ou o número de casos de pacientes com Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS) e/ou TB é maior.⁴

Atualmente, a TB é a terceira causa de óbitos por doenças infecciosas e a primeira entre pacientes com AIDS no país.⁴ A AIDS e a TB formam juntas uma sindemia que altera a evolução clínica e epidemiológica da TB provocando um aumento da morbidade e mortalidade dos pacientes co-infectados.⁵

O desenvolvimento e evolução da TB são dependentes de fatores como os aglomerados humanos, a desnutrição e a baixa resistência imunológica, estando este último fator intimamente relacionado com casos de infecção provocada pelo HIV.⁶ A pandemia da AIDS modificou não apenas a tendência epidemiológica da TB e infecções causadas por outras micobactérias, mas também sua apresentação clínica, duração do tratamento, resistência às drogas antituberculosas, intolerância medicamentosa e possivelmente a susceptibilidade dos comunicantes.⁶

O aumento dos casos de resistência às drogas utilizadas na terapêutica da TB contribuiu para o agravamento da situação de forma mundial, principalmente em países desenvolvidos, onde foram detectados surtos desta forma grave da doença. Esta resistência apresenta sérias consequências tanto no plano individual quanto no coletivo, pois o controle desta forma grave da doença depende do diagnóstico rápido e tratamento adequado dos casos.^{6,7}

Rifampicina e isoniazida são os fármacos mais potentes utilizados no tratamento da TB, podendo eliminar mais de 99% dos bacilos nos dois primeiros meses de tratamento. Porém, a resistência a esses fármacos tem aumentado significativamente no mundo, devido à intervenção inadequada na mutação espontânea de *M. tuberculosis*. Embora essas mutações sejam eventos quantitativamente raros, quando ocorrem em numerosas populações de micobactérias e sobre pressão seletiva pelo uso de um único fármaco ou abandono do tratamento, podem favorecer o predomínio de cepas resistentes.⁸

A química dos produtos naturais é uma área de investigação com vasto potencial, principalmente nos países com grande biodiversidade, como é o caso do Brasil. A pesquisa de novos fármacos pode ocorrer pela síntese de novas moléculas, pela modificação molecular de substâncias naturais e/ou sintéticas com propriedades farmacológicas definidas, assim como a extração, isolamento e purificações de novos compostos principalmente de origem vegetal, a qual se caracteriza como uma fonte inesgotável de substâncias potencialmente ativas como medicamentos.⁹

Vários estudos mostram atividade antimicobacteriana de plantas. Em revisão realizada por Newton et.al.¹⁰, observou-se moderada a alta atividade antimicobacteriana em 112 metabólitos puros obtidos de extratos de 138 espécies de plantas.

Cantrell et al.¹¹, também encontraram atividade antimicobacteriana de terpenóides presente em plantas. Seidel e Taylor¹² demonstraram a atividade antimicrobiana *in vitro* de extratos e constituintes de *Pelagonium reniforme* e *Pelagonium sidoides* em micobactérias de rápido crescimento.

Foram feitas extensas revisões de literatura de produtos naturais enfatizando a diversidade estrutural de substâncias com propriedades antimicobacterianas, como os alcalóides, terpenóides, cumarinas/cromonas, peptídeos, fenóis, quinolonas e esteróides obtidos de plantas, organismos marinhos e fungos.^{13,14}

Leite et al.¹⁵ avaliaram a atividade antimicobacteriana dos extratos clorofórmicos e metanólico das folhas de *Byrsonima crassa*, sendo que o extrato clorofórmico demonstrou ser mais ativo, podendo estar relacionado pela presença de triterpenos.

Estudos realizados com os extratos da fruta da *Campomanesia adamantium* demonstraram que frações em acetato de etila, assim como os compostos isolados, obtiveram atividades bastante promissoras frente a *M. tuberculosis*.¹⁶

Em um estudo realizado com folhas de *Adhatoda vasica* foram isoladas duas substâncias, acetato de vasicina e 2-acetil benzilamina nas quais demonstraram ter uma elevada atividade antimicobacteriana.¹⁷

Castellar et al.¹⁸ encontraram atividade antimicobacteriana em sete metoxi-flavona e de um triterpeno denominado ácido oleanólico isolados do extrato em diclorometano das folhas da *Lippia lacunosa*.

O gênero *Calophyllum* pertencente à família Clusiaceae vem despertando interesse da comunidade científica devido aos promissores resultados químicos e biológicos, sendo este gênero rico em metabólitos secundários como esteróides, triterpenos, cumarinas, benzopiranos e diversos tipos de xantonas e proantocianidinas.¹⁹ Este gênero é constituído por árvores de grande porte, com aproximadamente 180 a 200 espécies, sendo algumas de ocorrência principalmente no Brasil, como *Calophyllum brasiliense* Camb., onde é distribuída principalmente na Mata Atlântica e no Cerrado.²⁰

Calophyllum brasiliense é conhecido popularmente por Guarandi, Guanandi, Bari ou Jacareúba.²¹ Da casca se obtém o “bálsamo de landim” ou “bálsamo de jacareúba” usado contra úlceras e tumores. Na medicina popular, é utilizado para dor, inflamação, diabetes, hipertensão, herpes, reumatismo.²² O chá das folhas e da entrecasca é usado como anti-inflamatório, contra varizes e hemorróidas, distúrbios gástricos e hepáticos.^{20,21}

Pretto et al.²³ estudaram os extratos metanólico e as frações polares e apolares de partes diferentes de *Calophyllum brasiliense* como as folhas, raízes, caules, flores e frutos demonstrando que todas as partes da planta apresentavam atividades frente a bactérias Gram positivas e não em Gram negativas e leveduras. Desses extratos foram isoladas várias substâncias no qual somente o ácido protocatéquico foi efetivo contra todos os microorganismos testados e a 1,5 diidroxixantona apresentou atividade somente em bactérias Gram positivas.

Um estudo demonstrou que o extrato em acetona das folhas de *Calophyllum brasiliense* apresentou atividade frente à *Staphylococcus aureus* e as substâncias isoladas, mammea A/BA, jacareubina e 1,3,5,6-tetrahidróxi-2-(3,33-dimetilalil) xantona apresentaram importantes atividade inibitórias em isolados sensíveis e resistentes a vários antimicrobianos.²⁴

Reyes-Chilpa et al.²⁵ analisaram a atividade tripanocida *in vitro*, frente às formas epimastigotas e tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi* das cumarinas tipo mammea isoladas das folhas de *Calophyllum brasiliense*, sendo que a mammea B/BA apresentou melhor atividade para formas epimastigota e tripomastigota.

Brezan et al.²⁶ demonstraram a atividade antileishmania do extrato bruto em diclorometano e da cumarina isolada (-) mammea A/BB das folhas do *Calophyllum brasiliense* frente às formas promastigotas de *Leishmania brasiliensis*.

Uma importante atividade biológica que vem sendo estudada é atividade anti-HIV das cumarinas policíclicas isoladas de *Calophyllum lanigerum* var. *austrocoriaceum*, os compostos isolados (+) calanolida-A, 12-acetoxicalanolideo-A e o calanolida-B apresentaram significativa proteção *in vitro* contra os efeitos citopáticos da infecção pelo vírus HIV-1.²⁷ O mecanismo de ação da (+)- calanolida-A se dá por sua capacidade de inibir a enzima transcriptase reversa do HIV-1, essencial para a replicação desse vírus, inclusive em cepas resistente ao AZT, primeiro fármaco inibidor da transcriptase reversa.²⁸

Xu, et al.²⁹ avaliaram a atividade da (+) calanolida-A extraída de *Calophyllum lanigerum* em *M. tuberculosis* no qual apresentou uma importante atividade inclusive em cepas resistentes com a concentração inibitória mínima (CIM) de 3,13 mg/L, indicando uma nova classe de substância que pode ser utilizada para o tratamento de pacientes co-infectados HIV e TB.

A pesquisa de atividade antimicobacteriana de extratos vegetais é realizada preferencialmente pela técnica de microdiluição em placa, empregada para determinar a CIM do extrato.³⁰ A técnica *Microplate Alamar Blue Assay* (MABA) tem sido empregada por pesquisadores para determinar a atividade antimicobacteriana de princípios ativos naturais^{31,32} e de novos fármacos sintéticas.^{11,32,33} Nessa técnica, é determinada a CIM, ou seja, a concentração mínima da substância a ser testada capaz de inibir o crescimento em 90% das células bacterianas e como revelador de viabilidade bacilar na reação vem sendo usado o Alamar Blue.^{34,35,36}

O método *Resazurin Microtiter Assay Plate* (REMA) vem sendo usado em substituição ao MABA para estudos de detecção de resistência em micobactérias e tem demonstrado uma boa correlação dos resultados quando comparado com o método das proporções.^{35,37} Além da facilidade de execução e custo menor quando da utilização da resazurina como agente revelador de atividade biológica, este corante apresenta a vantagem de obter um resultado mais rápido quando comparado ao método das proporções.³⁸

A determinação da citotoxicidade *in vitro* é um procedimento importante na pesquisa de substâncias menos tóxicas e seletivas com atividade antimicobacteriana, sendo fundamental que a substância atue seletivamente contra o *M. tuberculosis*, porém seja inócua ou pouco tóxica ao hospedeiro. Ensaio de viabilidade celular vem se tornando uma alternativa ao uso de animais, sendo útil na triagem de um grande número de produtos químicos.³⁹

Entre os diferentes testes que podem ser utilizados na avaliação da citotoxicidade, destaca-se a redução do MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5- difeniltetrazólio) que se caracteriza por ser um método colorimétrico, rápido, quantitativo, sensível e de baixo custo. O ensaio com MTT é baseado na capacidade da enzima succinato desidrogenase, presente nas mitocôndrias das células vivas, converterem a solução aquosa do substrato amarelo MTT a um produto azul escuro/arroxado, designado formazan, que é insolúvel em água. A capacidade das células em reduzirem o MTT fornece uma indicação da atividade e da integridade mitocondrial, que são interpretadas como medidas da viabilidade celular.⁴⁰⁻⁴³

O Índice de Seletividade (IS) é determinado pela razão da concentração do composto que é capaz de permitir a viabilidade de 50% dos macrófagos (CC₅₀) pela CIM com o objetivo de se estimar uma possibilidade de relação entre o ensaio *in vitro* e a passagem segura para ensaio *in vivo* de compostos sintéticos ou naturais.⁴⁴

Espera-se que os novos agentes possam reduzir a duração total do tratamento de doenças infecciosas, sejam compatíveis com os fármacos já existentes, apresentem uma ação sinérgica e quando possível não interferiram com outros medicamentos.⁴⁵ Em adição a uma atividade bactericida em potencial, as novas substâncias devem ser ativas contra *M. tuberculosis* em fase de latência, evitando assim, reativação em pessoas com TB infecção.⁴⁶

JUSTIFICATIVA

Considerando-se que os fármacos utilizados na terapêutica atual da TB apresentam alta toxicidade e, além disso, algumas cepas de *M. tuberculosis* são resistentes a esses fármacos, torna-se necessário a pesquisa de novos medicamentos menos tóxicos e mais eficazes para o tratamento da TB.

Neste contexto, os extratos brutos e substâncias puras obtidas de *Calophyllum brasiliense* podem ser promissores contra *M. tuberculosis*, desta forma, se fazem necessários a realização de estudos da ação da atividade antimicobacteriana e citotoxicidade, a fim de se encontrar um fármaco ideal para o tratamento desta doença.

OBJETIVOS

Objetivo Geral

Avaliar a atividade antibacteriana *in vitro* em *Mycobacterium tuberculosis* e a citotoxicidade dos extratos brutos e substâncias puras obtidas de *Calophyllum brasiliense*.

Objetivos Específicos

- Determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) de extratos brutos obtidos do *Calophyllum brasiliense* em cepa de referência *M. tuberculosis* H₃₇Rv utilizando a técnica *Resazurin Microtiter Assay Plate* (REMA);
- Determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) de substâncias puras obtidas de *Calophyllum brasiliense* em cepa de referência *M. tuberculosis* H₃₇Rv utilizando a técnica REMA;
- Determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) de substâncias puras obtidas do *Calophyllum brasiliense* em isolados clínicos de *M. tuberculosis* resistentes e sensíveis a isoniazida e outros fármacos utilizando a técnica REMA;
- Realizar testes de citotoxicidade dos extratos brutos e substâncias puras de *Calophyllum brasiliense* utilizando cultura de células de macrófagos de murinos da linhagem J774G8;
- Determinar o Índice de Seletividade (IS) dos extratos brutos e substâncias puras de *Calophyllum brasiliense*.

REFERÊNCIAS

1. Bierrenbach AL, Gomes ABF, Noronha EF *et al.* Incidência de tuberculose e taxa de cura, Brasil, 2000 a 2004. *Rev Saúde Pública* 2007; **41**: 24–33.
2. WHO. Global tuberculosis control: WHO 2011 Report, Geneva, World Health Organization, 2011.WHO/HTM/TB/2011.16.
3. WHO. Guidelines for intensified tuberculosis case-finding and isoniazid preventive therapy for people living with HIV in resource-constrained settings. , World Health Organization, 2011.
4. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Programa Nacional de Controle da Tuberculose Situação da Tuberculose no Brasil, 2011.
5. Kwan CK, Ernst JD. HIV and Tuberculosis: a Deadly Human Syndemic. *Clin Microbiol Rev* 2011; **24**: 351–376.
6. Pinto WP, Tuberculose e resistência a drogas em pacientes atendidos em um centro de referência para síndrome da imunodeficiência adquirida em São Paulo-Brasil. Tese de doutorado. Curso de Pós-Graduação em Doenças Infecciosas e Parasitárias, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1998.
7. Cardoso RF. Análise de mutações nos genes relacionados com resistência a isoniazida (INH) em isolados clínicos de *Mycobacterium tuberculosis* de origem brasileira. Tese Doutorado. Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo. São Paulo, 2003: 135.
8. Barrera, L. Acerca de la resistencia de las micobacterias a los antibióticos, um enfoque microbiológico. *Infect & Microbiol Clin* 1994; **6**: 192–198.
9. Pretto JB. Potencial antimicrobiano de extratos, frações e compostos puros obtidos de algumas plantas da flora catarinense. Itajaí, 2005.05p. Dissertação de mestrado. Programa de mestrado em Ciências Farmacêuticas da Universidade do Vale do Itajaí.
10. Newton SM, Lau C, Wright CW. A review of antimycobacterial natural products. *Phytother Res* 2000; **14**: 303–322.
11. Cantrell CL, Franzblau SG, Fischer NH. Antimycobacterial plant terpenoids. *Planta Med* 2001; **67**: 685–694.
12. Seidel V, Taylor PW. In vitro activity of extracts and constituents of *Pelagonium* against rapidly growing mycobacteria. *Int J Antimicrob Ag* 2004; **23**: 613–619.

13. Okunade AL, Elvin-Lewis MPF, Lewis WH. Natural antimycobacterial metabolites: current status. *Phytochemistry* 2004; **65**:1017–1032.
14. Copp BR, Pearce AN. Natural product growth inhibitors of *Mycobacterium tuberculosis*. *Nat. Prod. Rep.* 2006; **24**: 278–297.
15. Leite CQF, Sato DN, Higuchi CT *et al.* Antimycobacterial activity of *Byrsonima crassa* Nied leaf extracts *Rev. Bras. Pl. Med.* 2008; **10**:63–66.
16. Pavan FR, Leite CQF, Coelho RG *et al.* Evaluation of anti-*Mycobacterium tuberculosis* activity of *Campomanesia adamantium* (Myrtaceae). *Quim Nova* 2009; **32**: 1222–1226.
17. Ignacimuthu S, Shanmugam N. Antimycobacterial activity of two natural alkaloids, vasicine acetate and 2-acetyl benzylamine, isolated from Indian shrub *Adithoda vasica* Ness. leaves. *J Biosci* 2010; **35**: 565–570.
18. Castellar A, Coelho TS, Silva PEA *et al.* The activity of flavones and oleanolic acid from *Lippia lacunosa* against susceptible and resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains. *Rev Bras Farmacogn* 2011; **21**: 835–840.
19. Cronquist A. *An integrated system of classification of flowering plants*. New York, 1981; 1260.
20. Noldin VF, Isaias DB, Cechinel Filho V. Gênero *Calophyllum*: importância química e farmacológica. *Quim. Nova* 2006; **29**(3): 549–554.
21. Corrêa MP. Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas. *Imprensa Nacional Ed.*, Rio de Janeiro, 1978.
22. Reyes-Chilpa R, Baggio CH, Alavez-Solano D *et al.* Inhibition of gastric H⁺,K⁺-ATPase activity by flavonoids, coumarins and xanthenes isolated from Mexican medicinal plants. *J Ethnopharmacol* 2006; **105**: 167–172.
23. Pretto JB, Cechinel filho V, Noldin VF *et al.* Antimicrobial activity of fractions and compounds from *Calophyllum brasiliense* (Clusiaceae/Guttiferar). *Z Naturforsch* 2004; **59**: 657–662.
24. Yasunaka K, Abe F, Nagayama A *et al.* Antibacterial activity of crude extracts from Mexican medicinal plants and purified coumarins and xanthenes. *J Ethnopharmacol* 2005; **97**: 293–299.
25. Reyes-Chilpa R, Estrada-Muñiz E, Vega-Ávila E *et al.* Trypanocidal constituents in plants. 7. Mammee-type coumarins. *Mem.Inst.Osw Cruz* 2008; **103**: 431–436.
26. Brenzan MA, Ferreira ICP, Lonardoni MVC *et al.* Activity of extracts and coumarins from leaves of *Calophyllum brasiliense* on *Leishmania braziliensis*. *Pharm. Biol.* 2008; **46**:1–

27. Kashman Y, Gustafson KR, Fuller RW *et al.* The Calanolides, a novel HIV-inhibitory class of coumarin derivatives from the tropical rainforest tree. *J Med Chem* 1992; **35**: 2735–2743.
28. Currens MJ, Gulskowski RJ, Mariner JM *et al.* Antiviral activity and mechanism of action of Calanolide A against the Human Immunodeficiency Virus Type-1. *J Pharmacol Exp Ther* 1996; **279**: 645–651.
29. Xu ZQ, Barrow WW, Suling WJ *et al.* Anti-HIV natural product (+) calanolide A is active against both drug-susceptible and drug-resistant strains of *Mycobacterium tuberculosis*. *Bioorg. Med. Chem* 2004; **12**: 1199–1207.
30. Leite CQF, Beretta ALRZ, Anno IS *et al.* Standardization of broth microdilution method for *Mycobacterium tuberculosis*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 2000; **95**: 127–129.
31. Pietro RCLR, Kashima S, Sato DN *et al.* *In vitro* antimycobacterial activities of *Physalis angulata* L. *Phytomedicine* 2000; **7**: 335–338.
32. Januário AH, Filho ER, Pietro RCLR *et al.* Antimycobacterial physalins from *Physalis angulata* L. (Solanaceae). *Phytotherapy Research* 2002; **16**: 01–04.
33. Picon PD, Della Giustina ML, Rizzon CFC *et al.* Resultado do tratamento da tuberculose com estreptomicina, isoniazida e etambutol (esquema SHM). *J. Pneumologia* 2002; **28**: 187–192.
34. Collins LA & Franzblau SG. Microplate alamar blue assay versus BACTEC 460 system for high-throughput screening of compounds against *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium avium*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 1997; **41**: 1004–1009.
35. Franzblau SG, Witzig RS, McLaughlin JC *et al.* Rapid, low-technology MIC determination with clinical *Mycobacterium tuberculosis* isolates by using the microplate Alamar Blue assay. *J. Clin. Microbiol* 1998; **36**: 362–366.
36. Cardoso RF, Cooksey RC, Morlock GP *et al.* Screening and characterization of mutations in isoniazid resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates obtained in Brazil. *Antim. Agents. Chemoth* 2004; **48**: 3373–3381.
37. Palomino JC, Portaels F. Simple procedure for drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* using a commercial colorimetric assay. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 1999; **18**: 380–383.
38. Arantes VP, Sato DN, Vilega SW *et al.* Plantas do cerrado brasileiro com atividade contra *Mycobacterium fortuitum*. *Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl.* 2005; **26**: 195–198.
39. Sato DN. Avaliação rápida do perfil de sensibilidade do agente da tuberculose às drogas sintéticas ou extratos vegetais empregando *Mycobacterium tuberculosis* contendo o

gene luciferase. 76 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Instituto de Química, UNESP, Araraquara, 2003.

40. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Meth* 1983; **65**: 55–63.

41. Berridge MV, Tan AS. Characterization of the cellular reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): subcellular localization, substrate dependence, and involvement of mitochondrial electron transport in MTT reduction. *Arch Biochem Biophys* 1993; **303**: 474–482.

42. Berridge MV, Herst PM, Tan AS. Tetrazolium dyes as tools in cell biology: new insights into their cellular reduction. *Biotechnol Annu Rev* 2005; **11**: 127–152.

43. Liu Y, Peterson DA, Kimura H *et al.* Mechanism of cellular 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction. *J Neurochem* 1997; **69**: 581–593.

44. Protopopova M, Hanrahan C, Nikonenko B *et al.* Identification of a new antitubercular drug candidate, SQ 109, from a combinatorial library of 1,2-ethylenediamines. *J. Antimicrob. Chemother* 2005; **56**: 968–974.

45. Zhang Y, Amzel LM. Tuberculosis drug targets. *Curr drug targets* 2002; **3**: 131–54.

46. Tomioka H. Development of new antituberculous agents based on new drug targets and structure-activity relationship. *Expert Opinion on Drug Discovery* 2008; **3**: 21–49.

CAPÍTULO II

Artigo: "DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICOBACTERIANA E CITOTOXICIDADE DOS EXTRATOS BRUTOS E SUBSTÂNCIAS PURAS DAS FOLHAS DE *Calophyllum brasiliense* Cambess (CLUSIACEAE)"

DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICOBACTERIANA E CITOTOXICIDADE DOS EXTRATOS BRUTOS E SUBSTÂNCIAS PURAS DAS FOLHAS DE *Calophyllum brasiliense* Cambess (CLUSIACEAE)

Determination of antimycobacterial activity and cytotoxicity of crude extracts
and pure compounds from *Calophyllum brasiliense* Cambess (Clusiaceae)
leaves

Claudia Terencio Agostinho Pires¹, Mislaine Adriana Brenzan², Regiane Bertin de Lima
Scodro^{2,3}, Diógenes Aparício Garcia Cortez^{2,3}, Renata Menocci Gonçalves⁴, Lúcio Cardozo
Filho^{4,5}, Vera Lucia Dias Siqueira^{2,6}, Clarice Queico Fujimura Leite⁷, Rosilene Fressatti
Cardoso^{1,6}.

¹Programa de Pós-Graduação em Análises Clínicas, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR; ²Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR; ³Departamento de Farmácia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR; ⁴Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR; ⁵Departamento de Engenharia Química, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR; ⁶Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR; ⁷Departamento de Ciências Biológicas, Faculdade de Ciências Farmacêutica, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, SP.

RESUMO

Objetivo: Avaliar a atividade antimicobacteriana *in vitro* em *M. tuberculosis* e a citotoxicidade dos extratos brutos e substâncias puras de *Calophyllum brasiliense*.

Materiais e métodos: Foi avaliada a atividade antimicobacteriana dos extratos e substâncias puras de folhas de *Calophyllum brasiliense* pela técnica *resazurin microtiter assay plate* (REMA). A citotoxicidade foi testada frente a macrófagos J774G8, utilizando o método colorimétrico MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5- difeniltetrazólio) e determinado o índice de seletividade (IS) para as amostras analisadas.

Resultados: Nos extratos testados, a concentração inibitória mínima (CIM) variou entre 15,1 - 62,5 mg/L. Das substâncias puras isoladas (-) mammea A/BB e (-) mammea B/BB ambas apresentaram CIM de 31,2 mg/L em cepa de referência *M. tuberculosis* H₃₇Rv (ATCC 27294) e para isolados clínicos sensíveis e resistentes a CIM variou de 31,2 a 62,5 mg/L. A substância amentoflavona não apresentou atividade em *M. tuberculosis*. Em relação à citotoxicidade, o extrato diclorometano obtido pelo método de soxhlet, foi o mais promissor com um IS de 3,95 e das substâncias puras a (-) mammea A/BB foi a que obteve melhor IS de 1,06.

Conclusão: Nossos estudos concluíram que os diferentes extratos brutos e substâncias puras isoladas (-) mammea A/BB e (-) mammea B/BB das folhas de *Calophyllum brasiliense* apresentaram atividade antimicobacteriana bastante promissora.

Palavras-chave: *Mycobacterium tuberculosis*, *Calophyllum brasiliense*, Atividade antimicobacteriana, Citotoxicidade.

INTRODUÇÃO

A tuberculose (TB) é um grave problema de saúde pública sendo uma das doenças infecciosas com mais altos índices de mortalidade no mundo. Estima-se que ocorreram mundialmente no ano de 2010 de 8,5 a 9,2 milhões de casos novos (128/100.000 habitantes) de TB que levou a aproximadamente 1,4 milhões de óbitos/ano. Desses 1,4 milhões de mortes de pacientes com TB, aproximadamente 350.000 foram de pessoas vivendo com o vírus da imunodeficiência humana (HIV). O risco de uma pessoa com HIV desenvolver tuberculose é cerca de 20 a 37 vezes maior do que uma pessoa sem o HIV.^{1,2}

Tendo em vista o grande número de efeitos colaterais associados aos fármacos mais utilizados no tratamento da TB, a duração de seu tratamento e a seleção de cepas resistentes faz-se necessário a busca de novos fármacos.³

O gênero *Calophyllum* pertencente à família Clusiaceae vem despertando interesse da comunidade científica devido aos promissores resultados químicos e biológicos, sendo este gênero rico em metabólitos secundários como esteróides, triterpenos, cumarinas, benzopiranos e diversos tipos de xantonas e proantocianinas.⁴

Xu, et al.⁵ avaliaram a atividade da (+) calanolida-A extraída da *Calophyllum lanigerum* em *Mycobacterium tuberculosis* no qual apresentou uma importante atividade, inclusive em cepas resistentes a fármacos antituberculosos, com concentração inibitória mínima (CIM) de 3,13 mg/L, indicando uma nova classe de substância que pode ser utilizada para o tratamento de pacientes co-infectados HIV/TB.

Calophyllum brasiliense é conhecido popularmente por Guarandi, Guanandi, Bari ou Jacareúba sendo constituído por árvores de grande porte, com aproximadamente 180 a 200 espécies, sendo algumas de ocorrência no Brasil onde é distribuída principalmente na Mata Atlântica e no Cerrado.^{6,7} Da casca, se obtém o “bálsamo de landim” ou “bálsamo de jacareúba” usado contra úlceras e tumores. Na medicina popular é utilizado para dor, inflamação, diabetes, hipertensão, herpes e reumatismo.⁸ Algumas cumarinas isoladas desta espécie, apresentaram atividade anticancerígena e antimicrobiana.^{9,10}

Nesse sentido, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a atividade antimicobacteriana *in vitro* em *M. tuberculosis* e a citotoxicidade de extratos brutos e substâncias puras obtidas de *Calophyllum brasiliense*.

MATERIAIS E MÉTODOS

Material vegetal

O material vegetal utilizado nesse estudo foram folhas da espécie vegetal *Calophyllum brasiliense* Camb. (Clusiaceae), as quais foram coletadas na Ilha do Cardoso localizada no Estado de São Paulo, Brasil, sendo a exsicata depositada no Herbário do Instituto de Botânica de São Paulo sob o número de registro SP 363818.

Preparo dos extratos brutos

Extração por maceração

As folhas secas (985 g) foram trituradas em moinhos de facas e extraídas utilizando-se como líquido extrator a solução hidroetanólica 90% pelo processo de maceração a frio em temperatura ambiente e protegido da luz até esgotamento. O extrato foi filtrado e concentrado por evaporação a pressão reduzida obtendo-se um extrato aquoso que foi liofilizado sendo denominado extrato liofilizado (149,4 g) e a parte do extrato insolúvel em água foi solubilizado em diclorometano, denominado resíduo solúvel em diclorometano (30,9 g).¹¹

Extração por solvente orgânico

A extração por solvente orgânico foi baseada na metodologia do Instituto Adolfo Lutz¹², na qual as folhas (15 g) previamente seca e moída foram embaladas em forma de cartucho em papel de filtro e acondicionadas no extrator Soxhlet (Satelit), o solvente foi aquecido próximo ao seu ponto de ebulição e o sistema mantido em refluxo por 8 horas. Os solventes orgânicos utilizados nas extrações foram hexano e diclorometano. Em seguida, o solvente foi evaporado a pressão reduzida sendo obtidos os extratos em hexano e em diclorometano.

Extração supercrítica

Os experimentos foram realizados em uma unidade de escala laboratorial, composta de um cilindro de CO₂, dois banhos termostatizados, uma bomba seringa (ISCO, Modelo 500D) e um extrator com volume interno de aproximadamente 170 mL (diâmetro do leito é de 2,85 cm e a altura do leito é de 26,1 cm). Foram empregadas diferentes condições de pressão, temperatura e densidade a uma vazão volumétrica constante para o líquido extrator formando-se assim o extrato 1 (244,1bar; 60°C; 0,78112g/cm³; 3mL/min), extrato 2 (250,0bar; 40°C; 0,88022g/cm³; 3mL/min) e o extrato 3 (109,2bar; 40°C; 0,6813g/cm³; 3mL/min), sendo

utilizado como tempo de extração 280 minutos. O leito foi alimentado com quantidade variada para cada amostra, a fim de que ficasse preenchido ao menos 1/3 do seu volume total, para isto foram usadas aproximadamente 20 g de folhas *Calophyllum brasiliense*. Para a formação do leito, o material vegetal triturado foi acomodado uniformemente na parte inferior do extrator, o restante da célula de extração foi preenchido com esferas de vidro (leito inerte). Dessa maneira, o dióxido de carbono, alimentado na parte superior do extrator, passava inicialmente pelo leito inerte e posteriormente pela matriz vegetal. Na saída do extrator, devido à despressurização, ocorria a separação do extrato do solvente e então a massa extraída era coletada em um recipiente de vidro âmbar.¹³

Fracionamento e purificação do extrato bruto

O resíduo solúvel em diclorometano (30,9 g) foi cromatografado em coluna de sílica-gel sob vácuo (40 × 8,0cm), utilizando-se solventes de polaridade crescente. A fração hexânica (5,0g) obtida desta coluna foi recromatografada em coluna de sílica-gel obtendo-se as cumarinas (-) mammea A/BB ($C_{25}H_{26}O_5$) (65 mg) e (-) mammea B/BB ($C_{22}H_{28}O_5$) (13 mg), conforme descrito por estudo anterior.¹⁴

A fração acetato de etila (2,26 g) também foi recromatografada em coluna de sílica-gel obtendo-se a substância amentoflavona ($C_{30}H_{18}O_{10}$) (276,5 mg).¹⁵

As substâncias foram identificadas por métodos espectroscópicos, espectrométricos e comparadas com dados da literatura^{14,15} (Fig.1).

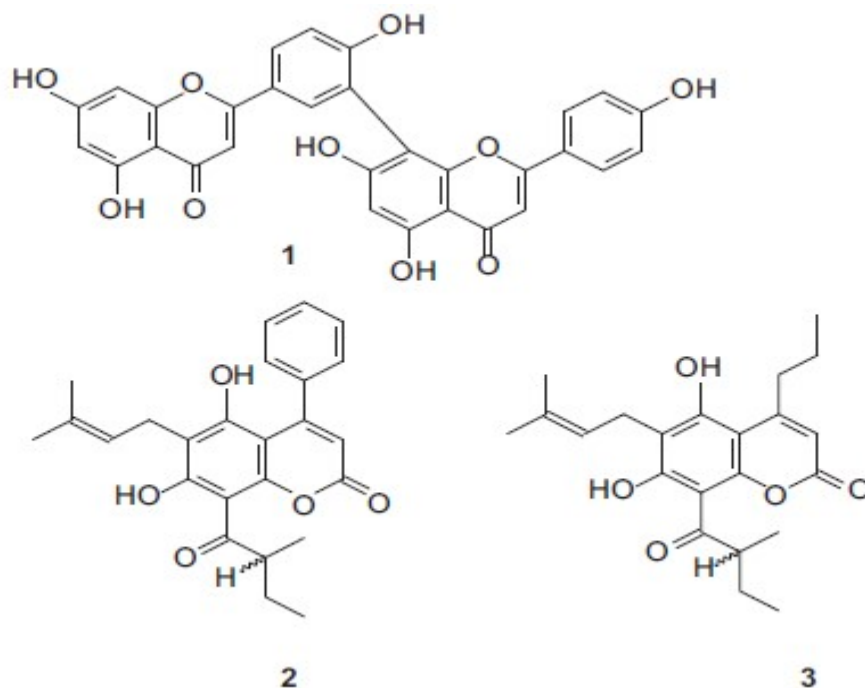


Fig. 1. Substâncias isoladas das folhas da *Calophyllum brasiliense*. amentoflavona(1), (-) mammea A/BB(2) e mammea B/BB(3).

Determinação da atividade antimicobacteriana

Os extratos brutos resíduo solúvel em diclorometano, liofilizado, diclorometano, hexano e extratos 1, 2, 3 obtidos por diferentes métodos de extrações das folhas de *Calophyllum brasiliense* e as substâncias puras (-) mammea A/BB, (-) mammea B/BB e amentoflavona obtidas do extrato resíduo solúvel em diclorometano foram submetidos ao ensaio *in vitro* em triplicata para determinação da CIM em *M. tuberculosis* H₃₇Rv (ATCC 27294). As substâncias puras com atividade foram testadas em seis isolados clínicos sensíveis e sete resistentes à isoniazida e outros fármacos (rifampicina, pirazinamida, etambutol, etionamida e estreptomicina), obtidos da coleção de cultura de micobactérias do Laboratório de Bacteriologia Clínica do Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina da Universidade Estadual de Maringá. Para tal, foi empregada a metodologia REMA preconizada por Palomino et al.¹⁶ e Martin et al.¹⁷ com a introdução de modificações de acordo com Sato.¹⁸ Em uma microplaca estéril de 96 orifícios (Falcon 3072, BECTON DICKINSON), foram depositados 200µL de água destilada estéril em todos os orifícios mais externos da placa para evitar a evaporação durante a incubação a 37°C. Os extratos brutos e as substâncias puras foram dissolvidos em Dimetilsulfóxido (DMSO) (AMRESCO®). Foram adicionados na microplaca os extratos brutos e as substâncias puras com Middlebrook 7H9 broth (Difco

Laboratories, Detroit, MI, USA), suplementado com ácido oléico, albumina, dextrose e catalase (OADC enriquecido; BBL/Becton Dickinson, Sparks, MD, USA) e 0,2% de Glicerina (BIOTEC) obtendo-se concentrações finais no intervalo entre 1000 a 7,8 mg/L para os extratos brutos e 250 a 1,9 mg/L para substâncias puras. A isoniazida (SIGMA) foi usada como fármaco padrão sendo esta diluída em água deionizada estéril, seguida de diluições em Middlebrook 7H9 adicionados de OADC obtendo-se concentrações finais na microplaca entre 0,0078 a 1 mg/L. A cepa de *M. tuberculosis* H₃₇Rv e os seis isolados clínicos sensíveis e sete resistentes foram previamente cultivados em Middlebrook 7H9 com OADC a 37°C e a turvação padronizada até atingir a escala nº 1 McFarland e em seguida diluída 20 vezes e adicionados 100µL em cada cavidade exceto nos controles de esterilidade das substâncias testadas, do meio de cultivo com e sem DMSO que foram usados como controle negativo. As microplacas foram incubadas a 37°C por sete dias. Após este período, foram adicionados 30 µL de solução de Resazurina (ACROS ORGANICS) (0,01% wt/vol) preparada recentemente. As placas foram re-incubadas por 24 horas a 37°C. A CIM foi definida como a menor concentração da droga capaz de impedir a mudança de cor de azul para róseo, ou seja, presença de crescimento bacteriano. As microplacas foram re-incubadas por mais 24 horas e os orifícios que permaneceram com a cor violeta foram considerados como negativos.

Estudo da citotoxicidade

Os testes foram realizados em triplicata utilizando macrófagos da linhagem contínua J774G8 cultivados em frascos de cultura de células de 25 cm² em meio de cultura RPMI-1640 (GIBCO®) pH 7,2 e suplementado com 10% de soro fetal bovino e mantidas em estufa (FISCHER SCIENTIFIC) a 37°C e sob tensão de 5% de CO₂. O experimento foi realizado em microplacas de 96 cavidades, onde foram adicionados 5 x 10⁴ macrófagos/poço e então incubados com RPMI-1640 pH 7,2, suplementado com 10% de soro fetal bovino por 24 horas a 37°C e sob tensão de 5% de CO₂. Em seguida, foi aspirado o meio de cultura dos poços e adicionados diferentes concentrações, em quadruplicata, dos extratos e substâncias puras a serem testadas diluídas em RPMI nas concentrações de 1000, 500, 250, 125, 62,5, 31,25 e 3,12 mg/L). Após 48 horas de incubação a 37°C sob tensão de 5% de CO₂, as células viáveis foram quantificadas pelo método colorimétrico MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5- difeniltetrazólio) (AMBRESCO®).¹⁹ O MTT foi dissolvido em tampão fosfato salina (PBS) na concentração 2mg/mL e em seguida foi adicionado 50µL em todas as cavidades da

microplaca exceto no branco da reação. A microplaca foi incubada na estufa a 37°C e sob tensão de 5% de CO₂, protegida da luz, por quatro horas. Em seguida foi adicionado 150µL de DMSO. A microplaca foi agitada e a leitura procedida com o auxílio de um leitor de Elisa (ASYS EXPERT PLUS), em comprimento de onda de 492 nm. DMSO foi usado como controle negativo. Os dados foram calculados como a porcentagem de inibição, a concentração de 50% de toxicidade celular (CC₅₀) foi definida como a concentração que reduz a densidade óptica das células tratadas em 50% das células não tratadas.

Determinação do índice de seletividade

O índice de seletividade (IS) dos extratos brutos e das substâncias puras foi calculado a partir da razão dos valores da CC₅₀ sobre a CIM. Considera-se que, quanto maior o valor do IS, o agente analisado é mais ativo contra o bacilo da tuberculose e menos citotóxico para o hospedeiro.²⁰

RESULTADOS

Os resultados das CIMs dos extratos das folhas de *Calophyllum brasiliense*, extraídos pelos diferentes métodos, em *M. tuberculosis* e seus respectivos rendimentos são apresentados na Tabela 1. Pelo método de extração por maceração foram obtidos o resíduo solúvel em diclorometano, que apresentou rendimento de 3,1% e CIM de 62,5 mg/L; e o extrato liofilizado com rendimento de 15,2% e CIM de 125 mg/L. A partir da extração por Soxhlet foram obtidos o extrato diclorometano que apresentou rendimento de 4,3% e CIM de 15,1 mg/L e o extrato em hexano com rendimento de 3,9% e CIM 62,5 mg/L. Os extratos 1, 2 3 obtidos por diferentes condições de pressão, temperatura e densidade empregadas na metodologia por fluido supercrítico, apresentaram rendimentos de 2,9%, 2,8% e 1,4%, respectivamente e CIM de 62,5 mg/L.

Ambas as substâncias puras (-) mammea A/BB e (-) mammea B/BB isoladas do resíduo solúvel em diclorometano obtido das folhas de *Calophyllum brasiliense* apresentaram CIM de 31,2 mg/L. A substância amentoflavona apresentou CIM superior a 500 mg/L (Tabela 2).

Para os seis isolados clínicos de *M. tuberculosis* sensíveis e sete resistentes a isoniazida e outros fármacos a CIM das substâncias puras (-)mammea A/BB e (-)mammea B/BB variaram entre 31,2 e 62,5 mg/L (Tabela 3).

A citotoxicidade de 50% em macrófagos J774G8, bem como as CIMs em *M. tuberculosis* H₃₇RV e o IS dos compostos analisados são demonstrados na Tabela 4. O extrato em diclorometano obtido por soxhlet foi o que apresentou melhor valor de IS igual a 3,95. Das substâncias puras estudadas, a (-) mammea A/BB foi a mais promissora, com IS de 1,06.

DISCUSSÃO

Diante do surgimento de *M. tuberculosis* resistentes aos medicamentos convencionais, a pesquisas de novas substâncias puras ou de derivados extraídos de plantas desempenham um papel importante na quimioterapia futura da TB.²¹

No presente estudo avaliamos a atividade de extratos brutos das folhas de *Calophyllum brasiliense* obtidos por diferentes solventes e métodos de extração, e de substâncias puras (-) mammea A/BB, (-)mammea B/BB e amentoflavona isoladas do extrato resíduo solúvel em diclorometano em *M. tuberculosis* H₃₇Rv e em isolados clínicos sensíveis e resistentes a isoniazida e outros fármacos.

Nas determinações da atividade em *M. tuberculosis* são consideradas promissoras as substâncias isoladas com CIM menor ou igual a 64 mg/L e para os extratos brutos devem ser considerados CIM menor ou igual a 128 mg/L.^{22,23}

Pelo método de extração por maceração utilizando-se como líquido extrator a solução hidroetanólica 90% foram obtidos dois extratos, o resíduo solúvel em diclorometano e o extrato liofilizado (aquoso). O resíduo solúvel em diclorometano mostrou-se mais ativo contra *M. tuberculosis* com CIM de 62,5 mg/L em relação ao extrato liofilizado (aquoso) que apresentou CIM de 125 mg/L. Uma das explicações para tal fato pode estar relacionada a solubilidade do extrato obtido uma vez que o resíduo solúvel em diclorometano é mais apolar

do que o extrato aquoso. Estudos mostram que o aumento da lipofilicidade das substâncias torna-se um importante fator para a atividade antimicobacteriana devido à parede celular das micobactérias conterem na sua estrutura grande quantidade de lipídeos, entre estes os ácidos micólicos, fazendo com que compostos mais lipofílicos penetrem com maior facilidade para o interior bacteriano.^{24,25}

Em trabalho prévio realizado por Brezan et al.²⁶ foi realizada uma análise quantitativa e qualitativa de (-)mammea A/BB em extratos das folhas de *Calophyllum brasiliense* por *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC), no qual se verificou que o resíduo solúvel em diclorometano extraído das folhas pelo método de maceração utilizando-se solução hidroetanólica 90% apresentou uma maior concentração da substância (-) mammea A/BB de $20,57\mu\text{g/g} \pm 0,94$ em comparação ao extrato liofilizado (aquoso) que foi de $6,109\mu\text{g/g} \pm 0,27$. A maior atividade em *M. tuberculosis* H₃₇Rv do resíduo solúvel em diclorometano obtido em nosso estudo pode também estar relacionada a essa maior quantidade da substância (-) mammea A/BB ou a um sinergismo entre substâncias presentes neste extrato.

Leite et al.²⁷ avaliaram a atividade antimicobacteriana dos extratos clorofórmico e metanólico extraídos das folhas de *Byrsonima crassa*, sendo que o extrato clorofórmico com CIM de 62,5 mg/L demonstrou ser mais ativo, podendo estar relacionado com a presença de triterpenos.

Um estudo realizado com quarenta e oito plantas pertencentes à América Central e América do Sul avaliou a atividade antimicobacteriana de extratos brutos etanólicos e frações em hexano, diclorometano, acetato de etila e n-butanol em *M. tuberculosis* H₃₇Rv, nos quais evidenciaram uma tendência da maior atividade estar relacionada com os extratos mais lipofílicos como o hexano e o diclorometano.²⁸

Em relação aos extratos das folhas de *Calophyllum brasiliense* obtidos por soxhlet, o extrato utilizando-se diclorometano como líquido extrator apresentou melhor atividade em *M. tuberculosis* H₃₇Rv com CIM de 15,1 mg/L comparado ao obtido com o solvente hexano que apresentou CIM de 62,5 mg/L. Isso pode estar relacionado ao método que utiliza diclorometano ser mais eficiente na extração de cumarinas ou outras substâncias ativas em micobactérias e também ao fato das substâncias presentes nesse extrato poderem estar apresentando sinergismo.

Estudos realizados com os extratos obtidos com acetato de etila da fruta da *Campomanesia adamantium* demonstraram atividade em *M. tuberculosis* com CIM de 62,5 mg/L e suas frações com CIM entre 250 a 39 mg/L. A fração com melhor atividade (CIM de 39 mg/L) em *M. tuberculosis* provavelmente foi devido a presença de grande quantidades das substâncias 5,7-diidroxi-6, 8-di-C-metilflavona e 2', 4'-dihidroxi-3',5'-dimetil-6'-metoxichalcona. Essas substâncias exibiram CIM isoladamente maior que 250 e 62,5 mg/L, respectivamente, enquanto que quando em associação em diferentes proporções obtiveram CIM variando entre 7,8 e 62,5 mg/L, o que sugere o sinergismo entre ambas.²⁹

Na extração por fluido supercrítico a quantidade de gás, o fluxo, a temperatura, a pressão e o número de ciclos de extração são selecionados dependendo do componente que se pretende extrair.³⁰ Em nosso estudo analisamos a ação de três extratos obtidos em diferentes condições de temperatura, pressão e densidade em *M. tuberculosis*. Todos os extratos apresentaram CIM de 62,5 mg/L, o que mostra que diferentes parâmetros utilizados na extração, não alteraram a ação antimicobacteriana dos extratos, possivelmente por nesses extratos estarem presentes as mesmas substâncias com ação anti-TB.

A extração por fluido supercrítico apresenta algumas vantagens e limitações quando comparadas com as técnicas de extração clássicas, tais como a extração líquido-líquido, maceração e extração em equipamento soxhlet.^{31,32} Uma das principais vantagens é decorrente

do uso de dióxido de carbono como agente extrator, em que possui propriedades bastante superiores à maioria dos solventes orgânicos, como em suas características atóxicas, não ser inflamável, de fácil obtenção, custo baixo e ser reciclado. Aliado a essas vantagens este tipo de extração é simples e rápida, uma vez que envolve poucas etapas. A principal desvantagem é o alto custo do equipamento e a limitada capacidade do gás carbônico na extração de substâncias com intermediária e elevada polaridade.³³

As substâncias puras isoladas da fração hexano do resíduo solúvel em diclorometano das folhas de *Calophyllum brasiliense* (-) mammea A/BB e (-) mammea B/BB apresentaram igualmente CIM de 31,2 mg/L em *M. tuberculosis* H₃₇Rv e CIM entre 31,2 e 62,5 mg/L em isolados clínicos sensíveis e resistentes, respectivamente. A amentoflavona isolada da fração acetato de etila do resíduo solúvel em diclorometano das folhas de *Calophyllum brasiliense* não apresentou atividade em *M. tuberculosis* H₃₇Rv (CIM > 500 mg/L) e desta forma não foi avaliada em isolados clínicos em nosso estudo.

Estudos demonstram importantes atividades biológicas da (-) mammea A/BB como em células tumorais,³⁴ atividade moluscicida frente à *Biomphalaria glabrata*³⁵ e atividade antileishmania *in vitro* frente à *Leishmania amazonensis* e *L. braziliensis*.³⁶ Em estudo de estrutura química e atividade antileishmania da (-) mammea A/BB, utilizando cumarinas naturais, derivadas e sintéticas, evidenciou que as substâncias derivadas da (-) mammea A/BB, tais como, (-)7-hidróxi-5-metóxi-8-(2-metilbutanoil)-6-(3-metilbut-3-en-1-il)-4-fenilcumarina; (-) 5,7-dimetóxi-8-(1-metóxi-2-metilbutil)-6-(3-metilbut-2-en-1-il)-4-fenilcumarina e principalmente da substância (-) 5,7-dihidróxi-8-(2-metilbutanoil)-6-(3-metilbutil)-4-fenilcroman-2-ona, apresentaram importante atividade tanto em formas promastigotas como em formas amastigotas intracelulares de *L. amazonensis*.¹⁴

Lin et al.³⁷ realizaram estudos da atividade inibitória de uma série de biflavonóides naturais e sintéticos em *M. tuberculosis* utilizando uma concentração fixa de 12,5 mg/L para

cada composto e obtiveram que a amentoflavona foi inativa em *M. tuberculosis*. Porém, biflavonóides com grupos metoxil e grupos nitro tiveram atividade anti-TB. De acordo com estes autores estas mudanças estruturais nas moléculas podem ter afetado o caráter lipofílico dos compostos o que levou a diferentes atividades inibitórias em *M. tuberculosis*.

A pesquisa de substâncias menos tóxicas e seletivas com atividade antimicobacteriana é determinada pela citotoxicidade *in vitro* a qual é um procedimento importante na pesquisa de fármacos. Em nosso estudo o método da redução do MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5- difeniltetrazólio) foi utilizado para determinar a citotoxicidade dos extratos brutos e substâncias puras e se caracteriza por ser um método colorimétrico, rápido, quantitativo, sensível e de baixo custo.¹⁹ Também foi avaliado o IS no qual é determinado pela razão da CC₅₀ pela CIM, com o objetivo de se estimar uma possibilidade de relação entre o ensaio *in vitro* e a passagem segura para ensaio *in vivo* de compostos sintéticos ou naturais.²⁰

O extrato das folhas de *Calophyllum brasiliense* obtido pelo método de soxhlet utilizando como líquido extrator o diclorometano foi mais ativo para *M. tuberculosis* e obteve o melhor IS. Além disso, esse extrato apresentou maior rendimento o que torna necessário isolar as substâncias presentes a fim de determinar qual ou quais substâncias estão envolvidos na ação anti-TB. Da mesma forma a substância pura (-) mammea A/BB foi a mais promissora como agente anti-TB com um IS de 1,06.

Apesar das substâncias (-) mammea A/BB e (-) mammea B/BB apresentarem a mesma CIM de 31,2 mg/L, que são superiores a da isoniazida, droga padrão no tratamento da TB (CIM = 0,01-0,2 mg/L), estas apresentaram CIM melhor em comparação com outros quimioterápicos utilizados no esquema terapêutico da TB como o da pirazinamida (CIM = 20-100 mg/L em pH=5,5 ou 6,0).³⁸

Nossos resultados mostram que os extratos das folhas de *Calophyllum brasiliense* são bastante promissores para a formulação de novos fármacos anti-TB e devem ser realizados estudos futuros para a identificação e quantificação das substâncias que possam estar atuando em *M. tuberculosis*. Estudos adicionais de estrutura química e atividade biológica com as substâncias isoladas (-) mammea A/BB e (-) mammea B/BB são necessários para obter derivados mais efetivos em *M. tuberculosis* e menos tóxico para o hospedeiro.

REFERÊNCIAS

1. WHO. Global tuberculosis control: WHO 2011 Report, Geneva, World Health Organization, 2011. WHO/HTM/TB/2011.16.
2. WHO. Guidelines for intensified tuberculosis case-finding and isoniazid preventive therapy for people living with HIV in resource-constrained settings. World Health Organization, 2011.
3. Boogaard JVD, Kibiki GS, Kisanga ER *et al* New drugs against tuberculosis: problems, progress, and evaluation of agents in clinical development. *Antimicrob Agents Ch* 2009; **53**: 849-862.
4. Cronquist A. *An integrated system of classification of flowering plants*. New York, 1981; 1260.
5. Xu ZQ, Barrow WW, Suling WJ *et al*. Anti-HIV natural product (+) calanolide A is active against both drug-susceptible and drug-resistant strains of *Mycobacterium tuberculosis*. *Bioorg. Med. Chem* 2004; **12**: 1199–1207.
6. Noldin VF, Isaias DB, Cechinel Filho V. Gênero *Calophyllum*: importância química e farmacológica. *Quim. Nova* 2006; **29**(3): 549–554.
7. Corrêa MP. *Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas*. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional Ed., 1978.
8. Reyes-Chilpa R, Baggio CH, Alavez-Solano D *et al*. Inhibition of gastric H⁺,K⁺-ATPase activity by flavonoids, coumarins and xanthenes isolated from Mexican medicinal plants. *J Ethnopharmacol* 2006; **105**: 167–172.

9. Ito C, Itoigawa M, Mishina Y *et al.* Chemical constituents of *Calophyllum brasiliense*: structure of three new coumarins and cancer chemopreventive activity of 4-substituted coumarins. *J Nat Prod* 2003; **66**: 368–371.
10. Reyes-Chilpa R, Estrada-Muñiz E, Apan TR *et al.* Cytotoxic effects of mammea type coumarins from *Calophyllum brasiliense*. *Life Sci* 2004; **75**: 1635–1647.
11. Brenzan MA, Nakamura CV, Dias-Filho BP *et al.* Antileishmanial activity of crude extract and coumarin from *Calophyllum brasiliense* leaves against *Leishmania amazonensis*. *Parasitol Res* 2007; **101**: 715–722.
12. Instituto Adolfo Lutz. Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz. Métodos químicos e físicos para análise de alimentos. *IMESP* 2004; **1**: 118–119.
13. Valle JM, Rogalinski T, Zetzl C *et al.* Extraction of boldo (*Peumus boldus* M.) leaves with supercritical CO₂ and hot pressurized water. *Food Res Int* 2005; **38**: 203–213.
14. Brenzan MA, Nakamura CV, Dias-Filho BP *et al.* Structure-activity relationship of (-) mammea A/BB derivatives against *Leishmania amazonensis*. *Biomed. Pharmacother* 2008; **62** (6): 651–658.
15. Brenzan MA, Ferreira ICP, Lonardoni MVC. Activity of extracts and coumarins from the leaves of *Calophyllum brasiliense* on *Leishmania braziliensis*. *Pharm Biol* 2008; **46**: 1–7.
16. Palomino JC, Martin A, Camacho M *et al.* Resazurin Microtiter Assay Plate: Simple and Inexpensive Method for Detection of Drug Resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Ch* 2002; **46**: 2720–2722.
17. Martin A, Camacho M, Portaels F *et al.* Resazurin Microtiter Assay Plate Testing of *Mycobacterium tuberculosis* Susceptibilities to Second-Line Drugs: Rapid, Simple, and Inexpensive Method. *Antimicrob. Agents Ch* 2003; **47**: 3616–3619.
18. Sato DN. Avaliação rápida do perfil de sensibilidade do agente da tuberculose às drogas sintéticas ou extratos vegetais empregando *Mycobacterium tuberculosis* contendo o gene luciferase. 76 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Instituto de Química, UNESP, Araraquara, 2003.
19. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Meth* 1983; **65**: 55–63.
20. Protopopova M, Hanrahan C, Nikonenko B *et al.* Identification of a new antitubercular drug candidate, SQ 109, from a combinatorial library of 1,2- ethylenediamines. *J. Antimicrob. Chemother* 2005; **56**: 968–974.
21. Copp BR, Pearce AN. Natural product growth inhibitors of *Mycobacterium tuberculosis*. *Nat. Prod. Rep.* 2006; **24**: 278–297.

22. Cantrell CL, Franzblau SG, Fischer NH. Antimycobacterial plant terpenoids. *Planta Medica* 2001; **67**:1–10.
23. Gu JQ, Wang Y, Franzblau SG *et al.* Antitubercular constituents of *Valeriana laxiflora*. *Planta Med* 2004; **70**: 509–14.
24. Silva PEA, Aínsa JÁ. Drugs and drug interactions. In: Palomino JC, Leão SC, Ritacco V, editors, Tuberculosis. From Basic Science to Patient Care. <http://www.TuberculosisTextbook.com>, accessed 12 nov 2011.
25. Rando DG, Sato DN, Siqueira L *et al.* Potential tuberculostatic agents. Topliss application on benzoic acid [(5-nitro-thiophen-2-yl)-methylene]-hydrazide series. *Bioorg Med Chem* 2002; **10**: 557–60.
26. Brenzan MA, Nakamura CV, Dias-Filho BP *et al.* Quantitative and Qualitative analysis of (-) mammea A/BB coumarin in extracts of *Calophyllum brasiliense* Cambess (Clusiaceae) by HPLC. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies* 2010; **33**: 1–13.
27. Leite CQF, Sato DN, Higuchi CT *et al.* Antimycobacterial activity of *Byrsonima crassa* Nied leaf extracts *Rev. Bras. Pl. Med.* 2008; **10**:63–66.
28. Leitão SG, Castro O, Fonseca EM *et al.* Screening of Central and South American plant extracts for antimycobacterial activity by the alamar blue test. *Rev Bras Farmacogn* 2006; **16**: 6–11.
29. Pavan FR, Leite CQF, Coelho RG *et al.* Evaluation of anti-*Mycobacterium tuberculosis* activity of *Campomanesia adamantium* (Myrtaceae). *Quim.Nova* 2009; **32**: 1222–1226.
30. Trease GE, Evans WC. Pharmacognosy. London, W. B. Saunders, 1996.
31. Assis LM, Lanças FM. HRGC and HRGC/MS Study of the Volatile Fraction Obtained from High-Inertite Brazilian Coal by Supercritical Fluid Extraction. *J. of Microcolumn Separations* 1999; **11**: 501–512.
32. Sargenti SR, Lanças FM. Design and construction of a simple supercritical fluid extraction (SFE) system with preparative and semi-preparative capabilities for application to natural products. *J. Chromatogr.* 1994; **667**: 213–218.
33. Lanças FM, Dórea HS, Muller RA, Facundes CB. Novas Aplicações de sistemas SFE “Home-Made”. IV. Qualidade de alimentos. *Bol. Soc. Bras. Cienc. Tecnol. Alim.* 1997; **17**: 432–436.

34. Ruiz-Marcial C, Reyes-Chilpa R, Estrada E *et al.* Antiproliferative, cytotoxic and antitumour activity of coumarin isolated from *Calophyllum brasiliense*. *Pharm. Pharmacol* 2007; **59**: 719–725.
35. Gasparotto-Júnior A, Brenzan MA, Ferreira ICP *et al.* Estudo fitoquímico e avaliação da atividade moluscicida do *Calophyllum brasiliense* Camb (Clusiaceae). *Quim. Nova* 2005; **28**: 575–578.
36. Brenzan MA, Ferreira ICP, Lonardoni MVC *et al.* Activity of extracts and coumarins from leaves of *Calophyllum brasiliense* on *Leishmania braziliensis*. *Pharm. Biol.* 2008; **46**:1–7.
37. Lin YM, Falvin MT, Cassidy CS *et al.* Biflavonoids as novel antituberculosis agentes. *Bioorg Med Chem Lett* 2001; **11**: 2101–2104.
38. Inderlied CB, Salfinger M. Antimycobacterial agentes and susceptibility tests. In *Manual of Clinical Microbiology* Washington, 1999; 1601–1623.

Tabela 1. Concentração inibitória mínima (CIM) em *Mycobacterium tuberculosis* H₃₇RV e rendimento dos extratos de folhas de *Calophyllum brasiliense* empregando-se diferentes métodos de extração e líquidos extratores.

Extratos	Métodos de Extração	Líquidos Extratores	Rendimento (%)	CIM (mg/L)
RS Diclorometano	Maceração	Hidroetanólico 90%	3,1	62,5
Liofilizado	Maceração	Hidroetanólico 90%	15,2	125
Diclorometano	Soxhlet	Diclorometano	4,3	15,1
Hexano	Soxhlet	Hexano	3,9	62,5
Extrato 1*	Fluido Supercrítico	Gás carbônico	2,9	62,5
Extrato 2*	Fluido Supercrítico	Gás carbônico	2,8	62,5
Extrato 3*	Fluido Supercrítico	Gás carbônico	1,4	62,5

RS=Resíduo solúvel.

*Extratos 1 (244,1bar; 60°C; 0,78112g/cm³; 3mL/min); extrato 2 (250,0bar; 40°C; 0,88022g/cm³; 3mL/min) e extrato 3 (109,2bar; 40°C; 0,6813g/cm³; 3mL/min).

Resultados expressos em média de experimentos realizados em triplicata.

Tabela 2. Concentração inibitória mínima (CIM) das substâncias puras (-) mammea A/BB, (-) mammea B/BB e amentoflavona isoladas do extrato resíduo solúvel em diclorometano das folhas de *Calophyllum brasiliense* em *Mycobacterium tuberculosis* H₃₇RV.

Substâncias puras	CIM (mg/L)
(-) Mammea A/BB	31,2
(-) Mammea B/BB	31,2
Amentoflavona	> 500

Resultados expressos em média de experimentos realizados em triplicata.

Tabela 3. Concentração inibitória mínima (CIM) de substâncias puras (-) mammea A/BB e (-) mammea B/BB obtidas de folhas de *Calophyllum brasiliense* em isolados clínicos de *Mycobacterium tuberculosis* sensíveis e resistentes a isoniazida e outros fármacos.

Isolados Clínicos	Perfil de sensibilidade	(-) Mammea A/BB (mg/L)	(-) Mammea B/BB (mg/L)
1	Sensível	31,2	31,2
3	Sensível	31,2	31,2
13638	Sensível	62,5	62,5
11	Sensível	31,2	31,2
16	Sensível	31,2	31,2
4851	Sensível	62,5	31,2
1193	H, R, E, S	62,5	62,5
91	H, S	62,5	31,2
3614	H, R, E, S, Et	31,2	31,2
4250	H, R	31,2	31,2
73A	H, R, Z	31,2	31,2
17	H	62,5	31,2
40	H, R	62,5	31,2

Resistência a: R= Rifampicina; H=Isoniazida; Z=Pirazinamida; E=Etambutol; ET=Etionamida; S= Estreptomicina.

Resultados expressos em média de experimentos realizados em triplicata.

Tabela 4. Determinação da concentração citotóxica de 50% em macrófagos J774G8 (CC₅₀), a concentração inibitória mínima (CIM) para *Mycobacterium tuberculosis* H₃₇RV(ATCC27294) e o índice de seletividade (IS) dos extratos brutos e substâncias puras extraídas das folhas de *Calophyllum brasiliense*.

Amostras	Métodos de Extração	CC50 (mg/L) Média (desvio padrão)	CIM (mg/L)	IS
Extratos				
RS Diclorometano	Maceração	36,67 (4,71)	62,5	0,59
Diclorometano	Soxhlet	59,67 (5,56)	15,1	3,95
Hexano	Soxhlet	55,00 (5,00)	62,5	0,88
Extrato 1*	Fluido Supercrítico	50,67 (7,36)	62,5	0,81
Extrato 2*	Fluido Supercrítico	43,33 (8,49)	62,5	0,69
Extrato 3*	Fluido Supercrítico	49,00 (2,00)	62,5	0,78
Substâncias puras				
(-) Mamea A/BB		33,30 (13,30)	31,2	1,06
(-) Mamea B/BB		27,50 (2,50)	31,2	0,88

RS=Resíduo solúvel.

*Extratos 1 (244,1bar; 60°C; 0,78112g/cm³; 3mL/min); extrato 2 (250,0bar; 40°C; 0,88022g/cm³; 3mL/min) e extrato 3 (109,2bar; 40°C; 0,6813g/cm³; 3mL/min).

Resultados expressos em média de experimentos realizados em triplicata.

CAPÍTULO III

CONCLUSÕES

Conclui-se que os vários extratos testados das folhas de *Calophyllum brasiliense* foram bastante promissores quanto à ação em *M. tuberculosis* H₃₇Rv (ATCC 27294), no qual, o extrato diclorometano obtido pelo método de soxhlet foi o mais ativo e menos citotóxico. Das substâncias puras isoladas ambas (-) mammea A/BB e (-) mammea B/BB apresentaram ação antimicobacteriana, sendo que o composto (-) mammea A/BB foi o que obteve melhor índice de seletividade.

PERSPECTIVAS FUTURAS

O tratamento atual para TB é bastante longo e traz muitos efeitos colaterais para o paciente fazendo com que ocorra seu abandono, e assim, o surgimento de casos de resistência aos fármacos disponíveis contribuindo para o agravamento da situação da TB de forma mundial. A pesquisa em novos fármacos antimicobacterianos se torna fundamental.

De acordo com os resultados promissores encontrados em nossos estudos com os extratos brutos das folhas de *Calophyllum brasiliense* é necessário que se isolem e quantifiquem as substâncias responsáveis pela ação anti-TB. Ambas as substâncias isoladas (-) mammea A/BB e (-) mammea B/BB apresentaram potencial como agentes antimicobacterianos, mas é necessário que se façam estudos de estrutura química e atividade biológica a fim de se encontrar derivados dessas substâncias mais efetivos frente a *M. tuberculosis* e menos tóxico para o hospedeiro.