



Influência do local de coleta e diferentes partes da planta no perfil químico e atividade anti-*Helicobacter pylori* de *Calophyllum brasiliense* Cambess

Influence of collection site and different plant parts on the chemical profile and anti-*Helicobacter pylori* activity of *Calophyllum brasiliense* Cambess

Influencia del lugar de recolección y de las diferentes partes de la planta sobre el perfil químico y la actividad anti-*Helicobacter pylori* de *Calophyllum brasiliense* Cambess

DOI: 10.55905/rdelosv17.n53-007

Originals received: 01/02/2024

Acceptance for publication: 02/16/2024

Regiane Carla de Souza Leão

Doutoranda em Biotecnologia pelo Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia (REDE BIONORTE)

Instituição: Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Mato Grosso (UFMT)

Endereço: Cuiabá - Mato Grosso, Brasil

E-mail: regianecarlaleao@gmail.com

Mariana de Souza Moura

Mestranda em Química pelo Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Áreas Úmidas (INCT- Áreas Úmidas)

Instituição: Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Áreas Úmidas (INCT- Áreas Úmidas)

Endereço: Cuiabá - Mato Grosso, Brasil

E-mail: marianadesouzamoura@hotmail.com

Kheytianny Hellen da Silva Lopes

Doutora em Química pelo Instituto Nacional de Pesquisa do Pantanal (INPP)

Instituição: Instituto Nacional de Pesquisa do Pantanal (INPP)

Endereço: Cuiabá - Mato Grosso, Brasil

E-mail: kheyti.lopes@gmail.com

Ilmara Pereira de Vasconcelos

Doutoranda pelo Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde

Instituição: Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Mato Grosso (UFMT)

Endereço: Cuiabá - Mato Grosso, Brasil

E-mail: ilmara.pv@hotmail.com



Paulo Teixeira de Sousa Junior

Doutor em Química Orgânica pelo Instituto Nacional de Pesquisa do Pantanal (INPP), Campus da Universidade Federal de Mato Grosso (UFMT)
Endereço: Cuiabá - Mato Grosso, Brasil
E-mail: pauloteixeiradesousa@gmail.com

Domingos Tabajara de Oliveira Martins

Doutor em Ciências Biológicas pelo Departamento de Ciências Básicas em Saúde da Faculdade de Medicina
Instituição: Universidade Federal de Mato Grosso (UFMT)
Endereço: Cuiabá - Mato Grosso, Brasil
E-mail: domingos.martins@ufmt.br

RESUMO

Calophyllum brasiliense (*C. brasiliense*) é uma planta tradicionalmente utilizada na medicina popular para tratar diversas doenças, por tal, tem sido extensamente estudada e documentada devido aos seus constituintes químicos e bioatividade. O extrato hexânico da entrecasca do caule de *C. brasiliense* e sua fração em diclorometano são ricos em cromonas que possuem propriedades gastroprotetora e cicatrizante de úlceras gástricas em roedores, bem como atividade anti-*Helicobacter pylori*, principal agente etiológico da úlcera péptica humana. No entanto, até o momento, nenhum estudo abordou o impacto da origem do local de coleta das folhas e galhos de *C. brasiliense* em relação a sua atividade anti-*H. pylori* biomonitorada com o perfil químico dos respectivos extratos. Nesse sentido, coletou-se partes da planta em cinco regiões do estado de Mato Grosso, e após técnicas extrativas e cromatográficas, testou-se a atividade *in vitro* anti-*H. pylori* dos extratos etanólicos e em diclorometano, empregando o ensaio de microdiluição em caldo para determinar os valores da concentração inibitória mínima (CIM). Além disso, o estudo avaliou o perfil fitoquímico utilizando o monitoramento do biomarcador ácido isobrasiliênsico nos extratos através de análise por HPLC. Os resultados permitiram observar diferenças na composição química dos extratos de diferentes localidades, principalmente aqueles cujas partes da planta foram coletadas em Poconé, pois constatou-se maiores concentrações desse biomarcador e maiores atividades antibacterianas nestes. Os resultados deste estudo indicam que o local de coleta e a parte da planta utilizada interferem na composição química dos extratos e consequentemente nas propriedades anti-*H. pylori* de *C. brasiliense*.

Palavras-chave: planta medicinal, *helicobacter pylori*, fitoquímica, quimiotaxonomia, perfil químico.

ABSTRACT

Calophyllum brasiliense (*C. brasiliense*) is traditionally used in folk medicine to treat various diseases, and as such, it has been extensively studied and documented for its chemical constituents and bioactivity. The dichloromethane extract of *C. brasiliense* inner stem bark and its fractions rich in chromones exhibit gastroprotective and ulcer-healing properties in rodent gastric ulcers, as well as anti-*Helicobacter pylori* activity, the main etiological agent of human peptic ulcers. However, to date, no study has addressed the impact of the origin of the collection site of *C. brasiliense* leaves and branches regarding its anti-*H. pylori* activity, monitored by the chemical profile of the respective extracts. In this regard, plant parts were collected from five municipalities in the state of Mato Grosso, and after extraction and chromatographic techniques,



the in vitro anti-*H. pylori* activity of ethanol and dichloromethane extracts was tested using the broth microdilution assay to determine the minimum inhibitory concentration (MIC) values. Additionally, the study evaluated the phytochemical profile by monitoring the biomarker isobrasilenic acid in the extracts through HPLC analysis. The results revealed differences in the chemical composition of extracts from different locations, particularly those whose plant parts were collected in Poconé, as higher concentrations of this biomarker and greater antibacterial activities were observed in these extracts. The results of this study indicate that the collection site and the plant part used interfere with the chemical composition of the extracts and consequently with the anti-*H. pylori* properties of *C. brasiliense*.

Keywords: medicinal plant, helicobacter pylori, phytochemistry, chemotaxonomy, chemical profile.

RESUMEN

Calophyllum brasiliense (*C. brasiliense*) es una planta utilizada tradicionalmente en la medicina popular para tratar diversas enfermedades, por lo que ha sido ampliamente estudiada y documentada debido a sus constituyentes químicos y bioactividad. El extracto hexánico de la corteza del tallo de *C. brasiliense* y su fracción de diclorometano son ricos en cromononas que tienen propiedades gastroprotectoras y cicatrizantes de las úlceras gástricas en roedores, así como actividad anti-*Helicobacter pylori*, principal agente etiológico de las úlceras pépticas humanas. Sin embargo, hasta la fecha, ningún estudio ha abordado el impacto del origen del sitio de recolección de hojas y ramitas de *C. brasiliense* en relación con sus propiedades anti-*H. pylori* biomonitoreados con el perfil químico de los respectivos extractos. En este sentido, se recolectaron partes de la planta en cinco regiones del estado de Mato Grosso, y luego de técnicas extractivas y cromatográficas, se identificaron in vitro anti-*H. pylori* a partir de extractos etanólicos y diclorometánicos, utilizando el ensayo de microdilución en caldo para determinar los valores de concentración mínima inhibidora (CIM). Además, el estudio evaluó el perfil fitoquímico mediante el seguimiento del biomarcador ácido isobrasilienseico en los extractos mediante análisis HPLC. Los resultados permitieron observar diferencias en la composición química de extractos de diferentes localidades, especialmente aquellos cuyas partes de plantas fueron recolectadas en Poconé, ya que en ellos se encontraron mayores concentraciones de este biomarcador y mayor actividad antibacteriana. Los resultados de este estudio indican que el sitio de recolección y la parte de la planta utilizada afectan la composición química de los extractos y consecuentemente el efecto anti-*H. pylori* de *C. brasiliense*.

Palabras clave: planta medicinal, helicobacter pylori, fitoquímica, quimiotaxonomía, perfil químico.

1 INTRODUÇÃO

A úlcera péptica é uma doença de evolução crônica, caracterizada pela presença de inflamação e lesões mucosas de origem multifatorial e complexa. *Helicobacter pylori* (*H. pylori*), uma bactéria gram-negativa que infecta mais de 50% da população mundial, embora 80% permanecerão assintomáticos, é o principal agente etiológico da úlcera péptica humana e



responde por cerca de 90% dos casos de câncer gástrico - adenocarcinoma gástrico e linfoma de MALT (Delchier, 2008; Malfertheiner et al., 2023).

O tratamento padrão da úlcera péptica consiste na terapia tríplice, composta por um inibidor de bomba de prótons (ex. omeprazol) e dois antibióticos (claritromicina e amoxicilina) ou alternativamente metronidazol como substituto de um dos antibióticos. Apesar da grande eficácia, reações adversas e principalmente, o aparecimento de cepas de *H. pylori* resistentes à antibioticoterapia têm exigido a pesquisa por novos fármacos anti-*H. pylori* (Malfertheiner et al., 2007, 2023). As plantas medicinais constituem a fonte mais antiga de medicamentos, incluindo aquelas usadas para o tratamento de transtornos gastrintestinais, como úlcera péptica e infecções (De Jesus et al., 2009; Neto, 2006).

Entre as diversas plantas nativas do Brasil utilizadas na medicina tradicional para o tratamento de úlcera gástrica, destaca-se a *Calophyllum brasiliense* Cambess. (*C. brasiliense*). Pertencente à família Calophyllaceae, esta árvore frondosa pode atingir até 43 m de altura e 1-3 m de diâmetro, sendo encontrada em florestas tropicais que se estendem do Brasil até o México. No Brasil, é popularmente conhecida como guanandi, olandi ou jacareúba, entre outros nomes vernaculares, e está presente em diferentes domínios fitogeográficos, incluindo a Amazônia, Caatinga, Cerrado e Mata Atlântica (Cabral, [s.d.]).

A infusão da casca do caule de *C. brasiliense* é utilizada para inflamações e também no tratamento de reumatismo, varizes, hemorroidas e úlceras crônicas (Gasparotto Jr. et al., 2005; Guarim-Neto, 2006; Jesus et al., 2009). O látex exsudado da casca tem uso no tratamento da dor, inflamação, diabetes, hipertensão, herpes e reumatismo (Reyes-Chilpa et al., 2006). No México, a infusão do cerne é usada para limpeza do útero após o parto, e o óleo das sementes é usado para o clareamento e cicatrização da pele. Na Colômbia, o látex exsudado do caule é aplicado topicamente para a cicatrização do umbigo de recém-nascidos (Gomez-Verjan et al., 2014).

No gênero *Calophyllum*, a presença de cromononas é considerada uma característica distintiva (Wang et al., 2011). Algumas cromononas já foram identificadas em *C. brasiliense*, como os isômeros ácidos isobrasilênsico e brasilênsico, ácido inofilóidico e ácido caloverticílico (Lemos et al., 2017; Sartori et al., 1999).

Para o ácido brasilênsico são descritas as atividades anticâncer (Yimdjo et al., 2004), antibacteriana *in vitro* (Pretto et al., 2004) e anti-*H. pylori in vitro* e reparadora do epitélio gástrico (Lemos et al., 2017) e antinociceptiva e anti-inflamatória (Klein-Júnior et al., 2017).



Mais recentemente, foi mostrado que essa cromanona ácida apresenta baixíssima citotoxicidade, sem aparente genotoxicidade ou parada do ciclo celular *in vitro*, bem como a ausência de toxicidade aguda *in vivo*. Em estudo *in silico* de modelagem molecular foi mostrado que o ácido brasiliênsico interage melhor com o fator de virulência CagA do *H. pylori*, que a interação com a bomba de Na^+, K^+ - ATPase se dá por ligações fracas, no câncer gástrico as interações ocorreram nos bolsos de ligação dos alvos proteicos e a energia de ligação mais negativa foi observada com o VEGFR-2 (Lemos et al., [s.d.]).

Como visto, esta espécie é altamente estudada e bastante reportada em artigos científicos, porém, até agora, poucos trabalhos demonstram a influência do local de coleta no perfil químico das folhas e caules de *C. brasiliense*. Este ramo de estudo é importante, pois pode demonstrar quantitativamente a variação nas proporções de compostos da planta, já que a origem geográfica e as condições ambientais (como clima, solo, infecção por patógenos e infestação por pragas) são fatores notáveis que afetam a composição química, pois as plantas adaptam-se às diferentes condições por meio de alterações genótípicas e fenotípicas, alterando então as vias biossintéticas (Bayona et al., 2020; Raskar et al., 2022; T. Wang et al., 2018; Xu et al., 2022).

Um dos trabalhos usando essa temática foi publicado em 2017, onde Mancera e cols. demonstraram o estudo da anatomia foliar de *C. brasiliense* de duas localidades no México, pois observaram que duas populações de *C. brasiliense* de diferentes locais diferem no perfil químico de suas folhas, onde em uma população contém cumarinas do tipo mammea, enquanto a outra população produz cromanonas e calanolídeos, sendo que apenas a segunda foi ativa contra HIV-1 (Huerta-Reyes et al., 2004; Reyes Chilpa & Huerta Reyes, 2009; Zavaleta-Mancera et al., 2011). As diferenças químicas encontradas neste trabalho podem estar relacionadas a um processo de adaptação da rota biossintética da planta de acordo com a localidade, como disponibilidade de água ou luz solar para a espécie.

Partindo desse pressuposto, o objetivo desse trabalho é utilizar uma abordagem exploratória com relação a variação química de *C. brasiliense*, através da realização da coleta em diferentes locais do estado de Mato Grosso, e da aplicação de técnicas de extração, separação e análise de metabólitos, buscando identificar padrões de variação química específicos associados aos diferentes habitats e condições climáticas. Nesse sentido, rastrear como a variação da localização geográfica influencia na composição química das partes da planta dessa importante espécie, monitorado pela ação anti-*H. pylori* dos diferentes extratos. O entendimento resultante



desse estudo fornece informações valiosas para a pesquisa de novos produtos naturais e suas respectivas propriedades farmacológicas, contribuindo para o desenvolvimento de terapias alternativas e mais sustentáveis.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 COLETA DO MATERIAL BOTÂNICO

Para avaliar a variação do perfil químico de *C. brasiliense*, suas folhas e galhos foram coletados em 5 municípios do estado de Mato Grosso em outubro de 2022. As regiões de amostragem foram selecionadas a fim de capturar uma variedade de diferentes tipos de habitat, sendo escolhidas as seguintes localidades no estado: Pirizal (-16.2753540, -56.4903710), Rondonópolis (-16.3803670, -54.7217800), Nova Brasilândia (-15.0130810, -55.0666370), Chapada dos Guimarães- Rio da Casca (-15.5013890, -55.4043890) e Sinop (-11.8555550, -55.4970230). No local de coleta, as amostras frescas foram congeladas em N₂ líquido e transportadas para o Campus UFMT, em Cuiabá, onde foram armazenadas no laboratório em biofreezer -86 °C. As exsiccatas foram autenticadas por um parobotânico e estão depositadas no Herbário da Universidade Federal de Mato Grosso, sob os números de registro UFMT 45509, 45508, 45507, 45506 e 45505. O acesso ao patrimônio genético e ao conhecimento tradicional associado foi cadastrado (nº AC45263) no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen), sistema eletrônico auxiliar do CGen/MMA.

2.2 PREPARO DOS EXTRATOS VEGETAIS

Para extração do material vegetal, as amostras congeladas foram divididas em duas porções de 20 g, logo uma porção foi triturada e extraída com etanol grau HPLC LiChrosolv® e a outra em diclorometano grau HPLC LiChrosolv® (Alemanha), ambas empregando um dispersor/homogeneizador Ultra Turrax (IKA® - T25 Digital, Alemanha) com 18.000 rpm/min. Então, as amostras foram filtradas com auxílio de uma bomba a vácuo (BUCHI®- V850, Suíça) e concentradas em rotaevaporador (BUCHI®-R210, Suíça) a 40 °C. Após concentração, as amostras foram liofilizadas em um liofilizador (J J Científica ®, modelo LJJ02, Brasil) com objetivo de remover a água do extrato.



2.3 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-*HELICOBACTER PYLORI*

A concentração inibitória mínima (CIM) dos extratos de *C. brasiliense* frente ao *H. pylori* foi determinada utilizando-se da técnica de microdiluição em caldo, de acordo com as especificações da CLSI (M7-A6, 2003), com modificações. Para o ensaio foi usada uma cepa de *H. pylori* (ATCC 43504), cedida pela Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz), Rio de Janeiro, mantida a -70 °C em criotubos de 2 mL, com meio skim Milk. A reativação foi feita através da semeadura em placas com meio ágar Mueller Hinton, suplementado de sangue de carneiro desfibrinado estéril (New Prov®, Brasil). Em sequência, as placas foram incubadas a 37 °C, em condições de microaerobiose (12% de CO₂) e 95% de umidade relativa, por 72 h. Após o tempo de incubação, as bactérias foram inoculadas em caldo *Brain Heart Infusion* (BHI) (Sigma-Aldrich, Merck®, Alemanha) por suspensão de culturas e ajustados a 0,5 na escala MacFarland (1x10⁶ UFC/mL) (Malfertheiner et al., 2023).

Para realizar o teste, utilizou-se placas estéreis, descartáveis e com 96 poços. A cada poço da microplaca adicionou-se 100 µL do meio de cultura líquido (BHI) suplementado com 10% de soro fetal bovino com diversas concentrações dos extratos obtidos por diluição seriada (7,81 - 1000 µg/mL), e da claritromicina (Sigma-Aldrich, Merck®, Alemanha) (0,125 - 16 µg/mL). A suspensão com o inóculo foi adicionada no volume de 100 µL/poço em triplicatas nas colunas teste. O antibiótico claritromicina serviu de controle positivo enquanto o DMSO 2%, de controle negativo. A microplaca foi incubada em temperatura de 37 °C, em jarra de microaerobiose. Os testes foram em triplicata e comparados a um grupo controle de crescimento. A CIM foi definida como a menor concentração do extrato ou claritromicina nas quais não houve crescimento bacteriano, conforme observado visualmente e pela leitura da absorbância (620 nm) em leitor de microplaca Thermo Scientific Multiskan Ex (Thermo Fisher Scientific®, Estados Unidos da América) (Lemos et al., 2016). Para avaliar o grau de atividade antibacteriana utilizou-se a classificação de (Wang, 2014): atividade forte (CIM < 10 µg/mL), atividade forte-moderada (10 ≤ CIM < 100 µg/mL), atividade fraca-moderada 100 ≤ CIM ≤ 1000 µg/mL e atividade fraca (CIM > 1000 µg/mL).

2.4 PERFIL FITOQUÍMICO DOS EXTRATOS POR HPLC-DAD

Os extratos de *C. brasiliense* foram analisados empregando um sistema de HPLC (LC-20A Prominence, Shimadzu®, Japão) equipado com duas bombas quaternárias (LC-20AD),



degaseificador (DGU-20A3), autoamostrador (SIL-20A), forno (CTO-20A), detector de arranjo de diodos (SPD-M20A) e um módulo de comunicação (CBM-20A). Para a separação foi utilizado uma coluna de fase reversa (Shim-pack VP-ODS, Shimadzu®, Japão), com 250 mm x 4,6 mm de diâmetro interno, com tamanho de partícula de 4,6 µm e porosidade de 12 nm. As fases móveis foram ácido fórmico 0,1% (v/v) em água ultrapura (A) e metanol (B). A condição de eluição aplicada foi de 0-30 min, gradiente linear de 5-95% B, 30-45 min em modo isocrático com 95% B seguido de recondicionamento da coluna em 45-55 min de 95-5% B, com fluxo de 1 mL/min. O volume de injeção foi de 20 µL e a concentração das amostras em 1 mg/mL. Todos os reagentes utilizados na análise foram em grau HPLC e a água deionizada foi obtida a partir de um sistema de purificação de água Milli-Q (Millipore Corporation®, Watford, Reino Unido). Para aquisição e tratamento de dados foi utilizado o software LabSolutions® (versão 5.3, Japão).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A compreensão da influência do ambiente na composição química das plantas é essencial para revelar as complexas adaptações bioquímicas que ocorrem em resposta às condições ambientais específicas. Nesse contexto, este estudo buscou avaliar a variação do perfil químico da espécie *C. brasiliense*, uma árvore comum na região tropical do Brasil, em resposta a diferentes habitats, bem como correlacionar com atividade farmacológica.

Para alcançar esse objetivo, as regiões de amostragem foram estrategicamente selecionadas para abranger ao menos uma coleta em cada complexo de ecossistema presente no estado de Mato Grosso, em formações fisionômicas do Cerrado, Pantanal e Amazônia, buscando assim representar uma ampla gama de tipos de habitat, tendo desde áreas ribeirinhas até locais mais secos e de elevada altitude.

A fim de minimizar os efeitos causados pela variação temporal entre as amostras, seguiu-se uma padronização da ordem de municípios para a coleta e os 5 locais foram realizados em 5 dias sequenciados. A Tabela 1 resume os dados das massas coletadas em cada habitat de coleta.



Tabela 1: Massa fresca das folhas e galhos de *Calophyllum brasiliense* coletados em outubro/2022, em 5 municípios do estado de Mato Grosso.

Município	Massa fresca das folhas (g)	Massa fresca dos galhos (g)
Sinop	560	500
Rondonópolis	220	380
Nova Brasilândia	380	320
Poconé	520	380
Chapada dos Guimarães	300	320

Fonte: Do Autor

Para cada parte da planta foram separadas porções de 20 g de material vegetal para seguir com a extração. Os solventes escolhidos para extração (etanol e diclorometano) foram pensados buscando analisar o efeito dos solventes além dos efeitos geográficos sobre as atividades farmacológicas anti- *H. pylori*. Na literatura, extratos apolares quanto polares da planta demonstraram bioatividades (García Zebadúa & Reyes Chilpa, 2014).

3.1 EFEITO ANTI-*HELICOBACTER PYLORI*

Os valores de CIM das amostras de extratos de diferentes partes da planta e locais de coleta estão mostrados na Tabela 2.

Tabela 2: Valores de concentrações inibitórias mínimas (CIM) dos extratos etanólicos e diclorometano (DCM) das folhas e galhos de *Calophyllum brasiliense* frente ao *Helicobacter pylori* em ensaio de microdiluição em caldo.

	Município	CIM extrato EtOH (µg/mL)	Grau de atividade	CIM extrato DCM (µg/mL)	Grau de atividade
Folhas	Sinop	250	fraca-moderada	7,81	forte
	Rondonópolis	31,25	forte-moderada	7,81	forte
	Nova Brasilândia	250	fraca-moderada	15,62	forte
	Poconé	31,25	forte-moderada	7,81	forte
	Chapada dos Guimarães	31,25	forte-moderada	250	fraca-moderada
Galhos	Sinop	31,25	forte-moderada	7,81	forte
	Rondonópolis	>1000	fraca	15,62	forte
	Nova Brasilândia	>1000	fraca	7,81	forte
	Poconé	15,62	forte	15,62	forte
	Chapada dos Guimarães	500	fraca-moderada	7,81	forte

Fonte: Do Autor

Os extratos etanólicos de folhas das diferentes localidades apresentaram uma variação notável na atividade antibacteriana. Os extratos das folhas coletadas em Rondonópolis, Poconé e Chapada dos Guimarães mostraram-se os mais ativos, com CIM de 31,25 µg/mL, apresentando



atividade forte-moderada. Por outro lado, os extratos das folhas coletadas em Nova Brasilândia e Sinop apresentaram CIM de 250 $\mu\text{g/mL}$, classificando-os com atividade fraca-moderada. Esses resultados com diferenças na atividade antibacteriana inferem assim, uma diferença considerável na constituição química desses extratos de diferentes localidades.

Os resultados observados para os extratos etanólicos obtidos dos galhos também apresentaram notável variação. Sendo que, o extrato de Poconé se destacou, com o menor valor de CIM (15,62 $\mu\text{g/mL}$), apresentando a maior atividade anti-*H. pylori* dentre os extratos etanólicos. O extrato referente à Sinop também apresentou forte atividade antibacteriana com CIM de 31,25 $\mu\text{g/mL}$, enquanto o de Chapada dos Guimarães apresentou uma atividade fraca-moderada com CIM de 500 $\mu\text{g/mL}$. Embora esses resultados permitam inferir considerações promissoras, os extratos referentes a Rondonópolis e Nova Brasilândia não demonstraram atividade com CIM acima de 1000 $\mu\text{g/mL}$,

É importante ressaltar que, os extratos preparados em diclorometano apresentaram valores de CIM ainda mais baixos em algumas localidades, indicando uma maior atividade antibacteriana com relação aos extratos etanólicos, especificamente de Sinop, Rondonópolis e Poconé, que apresentaram CIM de 7,81 $\mu\text{g/mL}$ nas folhas, enquanto Sinop, Nova Brasilândia e Chapada dos Guimarães apresentaram valores de CIM de 7,81 $\mu\text{g/mL}$ nos galhos. A claritromicina (controle positivo) apresentou valores de CIM de 0,125 ou 0,25 $\mu\text{g/mL}$, em todos os testes, destacando a sensibilidade da cepa de *H. pylori* utilizada.

Diante do exposto, constata-se que os resultados obtidos a partir da avaliação dos extratos de folhas e galhos de *C. brasiliense* revelam variações relevantes na atividade anti-*H. pylori* dependendo do local de coleta. Essas variações podem estar associadas a fatores geográficos, edáficos, climáticos e genéticos que influenciam a composição química das plantas, como já relatado na literatura (Karimi et al., 2020). Além disso, a escolha do solvente de extração pôde desempenhar um papel importante na obtenção de diferentes compostos dos extratos, o que também interferiu nos resultados da atividade antibacteriana.

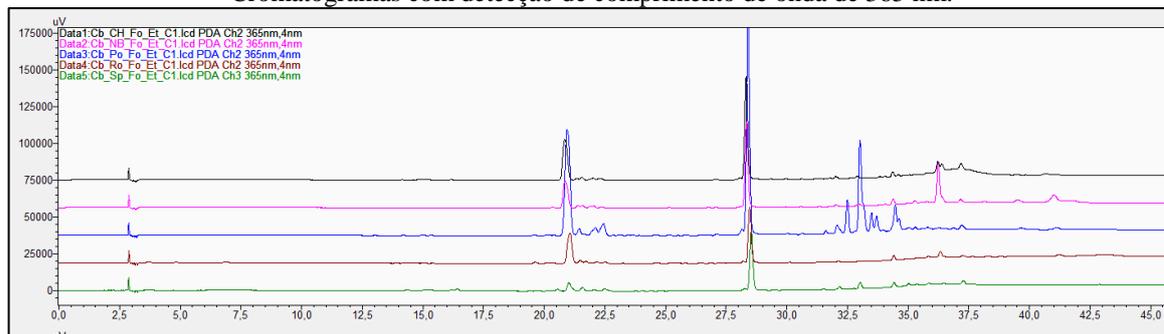
Comparando esses resultados com o controle positivo, a claritromicina, pode-se concluir que, embora os extratos de *C. brasiliense* tenham mostrado atividade contra *H. pylori*, sua potência ainda é bem menor em comparação com o antibiótico de referência. Isso ressalta a necessidade de estudos adicionais para isolar e identificar os compostos responsáveis por essa atividade e avaliar sua eficácia em modelos animais. Além disso, a variação na atividade entre

diferentes regiões destaca a importância da escolha criteriosa das fontes de coleta de plantas medicinais para garantir a eficácia terapêutica consistente.

3.2. AVALIAÇÃO DO PERFIL FITOQUÍMICO DOS EXTRATOS POR HPLC-UV

Na busca por respostas mais robustas que corroborem com os resultados de atividade obtidos, foi realizada a análise do perfil químico dos extratos utilizando técnicas cromatográficas de separação com HPLC. A análise da variação química em *C. brasiliense* em resposta a fatores geográficos fora realizada em duas etapas, a primeira (Figura 1), de forma qualitativa, realizando injeções dos diferentes extratos e localidades numa mesma condição cromatográfica, apenas para análise do perfil químico, sem inserção de um padrão interno e amostra padrão conhecida que esteja presente naturalmente no extrato.

Figura. 1. Cromatogramas referentes aos extratos etanólicos das folhas de *Calophyllum brasiliense* de Sinop (verde), Rondonópolis (marrom), Poconé (azul), Nova Brasilândia (rosa) e Chapada dos Guimarães (preto). Cromatogramas com detecção de comprimento de onda de 365 nm.



Fonte: Do Autor

A análise qualitativa inicial revelou uma diferença notável na assinatura cromatográfica do extrato de Poconé em relação aos outros extratos etanólicos das folhas no comprimento de onda de 365 nm (Figura. 1). Esta distinção foi caracterizada por bandas cromatográficas únicas que não foram observadas nos extratos de outras regiões, isto é, houve diferenças significativas na quantidade de substâncias/picos analisados com relação aos outros locais de coleta. As variações no perfil cromatográfico podem sugerir diferenças nas condições ambientais únicas do local de coleta das amostras, como características de solo, clima ou outros fatores que moldam a bioquímica da planta.

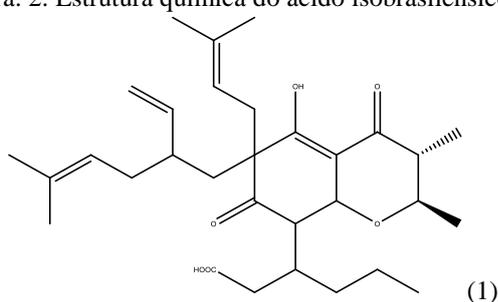
A distinção, na composição química do extrato referente a Poconé, em comparação aos demais extratos, também se apresenta com relação à sua atividade antibacteriana. Os valores de



CIM demonstraram que o extrato de Poconé exibiu uma CIM muito menor em comparação com os outros extratos, indicando uma maior eficácia contra *H. pylori*, bem como foi o único que demonstrou atividade tanto para as folhas e galhos da planta, com valores de CIM de 31,25 µg/mL e 15,62 µg/mL respectivamente, evidenciando inferências de ser um local propício para favorecer a produção de metabólitos com atividade mais pronunciada.

No entanto, os resultados não permitiram uma análise assertiva do perfil químico, necessitando de análises adicionais, e para tal, foi realizada uma estratégia de otimizar a metodologia de injeção juntamente com um marcador químico nos extratos, o que possibilitou uma melhor compreensão e complementação dos dados. Nesse sentido, realizou-se um planejamento experimental utilizando um composto que representa um dos possíveis marcadores químicos dessa espécie, o ácido isobrasilênsico (Figura. 2). Essa molécula é uma das cromanonas que já foram isoladas das cascas do caule de *C. brasiliense*, inclusive parte da planta com atividade potencial confirmada contra úlcera gástrica e infecção por *H. pylori*.

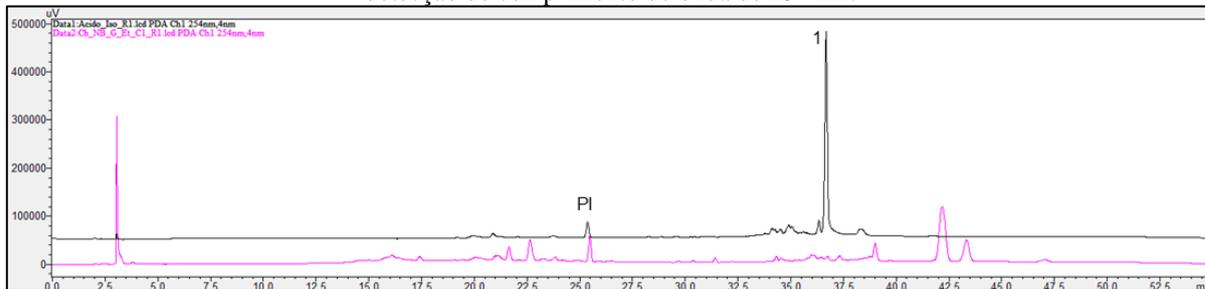
Figura. 2. Estrutura química do ácido isobrasilênsico (1).



Fonte: Do Autor

O ácido isobrasilênsico (1) foi injetado no mesmo método para análise e determinação do seu perfil cromatográfico e tempo de retenção (Figura. 3).

Figura. 3. Cromatogramas referentes a injeção de 1 mg/mL do ácido isobrasiliênsico (preto) e do extrato etanólico de Nova Brasilândia (rosa). Padrão interno fenolftaleína (PI), ácido isobrasiliênsico (1). Cromatogramas com detecção de comprimento de onda de 254 nm.



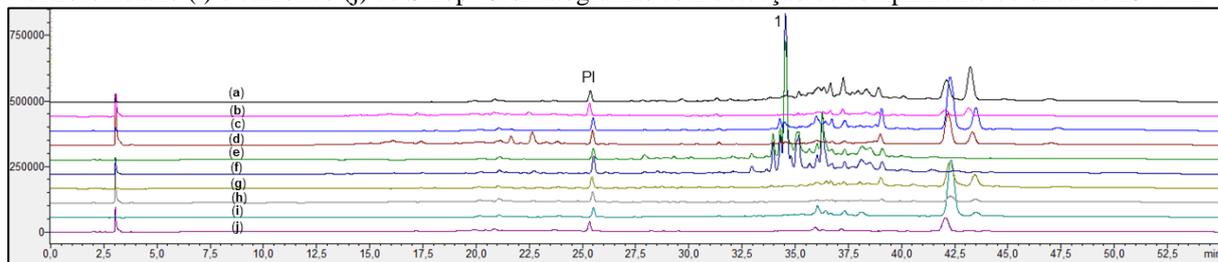
Fonte: Do Autor

Para a corrida cromatográfica das 40 amostras dos extratos foi adicionado padrão interno na concentração de 1 mg/mL, com o propósito de padronizar a metodologia para uma análise qualitativa da substância 1 nos extratos (Figura. 4). Além do mais, os espectros de UV referente a cada pico cromatográfico no tempo de retenção (t_r) tanto do padrão interno quanto do ácido isobrasiliênsico foram devidamente identificados e analiticamente comparados para comprovação da identidade do sinal.

Após injeções dos extratos marcados com padrão interno escolhido, fenolftaleína, um composto sintético, foi possível analisar os perfis metabólicos em diferentes locais e identificar variações significativas na composição química da planta com relação ao biomarcador 1 observado (Figura. 4). Essas descobertas revelam que tais compostos são influenciados pela localização geográfica e condições ambientais, destacando regiões e momentos propícios para a plantação, cultivo, coleta e obtenção de compostos de interesse farmacológico.



Figura. 4. Cromatogramas da injeção de extratos dos galhos de *Calophyllum brasiliense* oriundos de coletas em cinco municípios de Mato Grosso, na concentração de 1 mg/mL, com adição de Padrão interno fenolftaleína (PI) a 1 mg/mL. Biomarcador ácido isobrasilênsico (1); extrato em diclorometano (a) e etanólico (b) de Chapada dos Guimarães; extrato em diclorometano (c) e etanólico (d) de Nova Brasilândia; extrato em diclorometano (e) e etanólico (f) de Poconé; extrato em diclorometano (g) e etanólico (h) de Rondonópolis; e, por último, extrato em diclorometano (i) e etanólico (j) de Sinop. Cromatogramas com detecção de comprimento de onda de 254 nm.

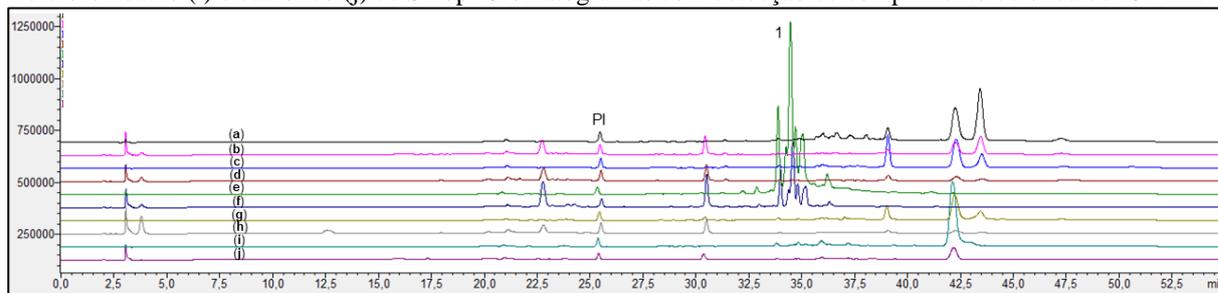


Fonte: Do Autor

Além disso, observou-se que os picos com maior intensidade e área integrada, indicam maiores concentrações desse biomarcador na região do Pantanal, em Poconé (Figura. 4), o que corrobora com os dados de atividade farmacológica identificada nos extratos. Essa relação proporciona informações relevantes de compostos que majoritariamente possam contribuir para a atividade da ação anti-*H. pylori*. Os cromatogramas dos extratos referentes às folhas (Figura. 5), tiveram um perfil parecido com o dos galhos (Figura. 4), embora, observa-se algumas bandas adicionais ao longo da corrida cromatográfica, demonstrando o que é esperado no quesito abundância de compostos em extratos de folhas comparado a extratos de galhos (Lombardo et al., 2010).



Figura. 5. Cromatogramas da injeção de extratos das folhas de *Calophyllum brasiliense* oriundos de coletas em cinco municípios de Mato Grosso, na concentração de 1 mg/mL, com adição de Padrão interno fenolftaleína (PI) a 1 mg/mL. Biomarcador ácido isobrasilênsico (1); extrato em diclorometano (a) e etanólico (b) de Chapada dos Guimarães; extrato em diclorometano (c) e etanólico (d) de Nova Brasilândia; extrato em diclorometano (e) e etanólico (f) de Poconé; extrato em diclorometano (g) e etanólico (h) de Rondonópolis; e, por último, extrato em diclorometano (i) e etanólico (j) de Sinop. Cromatogramas com detecção de comprimento de onda de 254 nm.



Fonte: Do Autor

Essas análises não apenas aumentam a compreensão das propriedades farmacológicas da planta coletada nessas localidades, como também revelam potenciais candidatos a compostos bioativos que podem ser isolados e explorados para aplicações terapêuticas futuras. Em suma, esse trabalho conseguiu expandir, não apenas o conhecimento e entendimento sobre *C. brasiliense*, mas também pôde abrir novas direções nos campos de pesquisa química, metabolômica e farmacológica na busca por potenciais candidatos a fármacos ou fitoterápicos.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos são de grande relevância, pois direcionam futuras investigações no sentido de anotar outros possíveis compostos bioativos responsáveis pela atividade anti-*H. pylori* observada em determinadas regiões. Além disso, este estudo destaca a importância da preservação e valorização da biodiversidade regional, uma vez que diferentes populações da mesma espécie vegetal apresentam potenciais terapêuticos distintos.

Por fim, ressalta-se que este trabalho abre portas para investigações mais aprofundadas, a fim de elucidar os mecanismos subjacentes à atividade anti-*H. pylori* de extratos de *C. brasiliense* e anotar demais possíveis compostos responsáveis por essa ação. Além disso, futuros estudos podem explorar a relação entre as características climáticas, edáficas e a composição química das plantas, proporcionando uma compreensão mais completa dos fatores que influenciam a atividade farmacológica dos extratos.



AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq pela concessão das bolsas: desenvolvimento tecnológico e industrial (DTI-B) (proc. n°. 384028/2023-3), programa de capacitação institucional (PCI/MCTI) (proc. n°. 300956/2024-0) e bolsa de produtividade em pesquisa (PQ 1B) (Proc. n° 314936/2021-1) correspondentes ao segundo, terceiro e sexto autor respectivamente.

Ao Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Áreas Úmidas (INCT-INAU II/CNPq, Proc. n° 421733/2017-9) e ao Instituto Nacional de Pesquisa do Pantanal (INPP, Portaria MCTI n° 6.988, de 08 de maio de 2023) pelo suporte financeiro ao projeto de pesquisa e financiamento parcial para este artigo.



REFERÊNCIAS

- Bayona, L. M., van Leeuwen, G., Erol, Ö., Swierts, T., Swierts, T., van der Ent, E., van der Ent, E., de Voogd, N. J., de Voogd, N. J., & Choi, Y. H. (2020). Influence of Geographical Location on the Metabolic Production of Giant Barrel Sponges (*Xestospongia* spp.) Revealed by Metabolomics Tools. *ACS Omega*, 5(21), 12398–12408. https://doi.org/10.1021/ACSOMEGA.0C01151/SUPPL_FILE/AO0C01151_SI_001.PDF
- Cabral, F. N. ([s.d.]). *Calophyllum in Flora e Funga do Brasil*. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Recuperado 16 de fevereiro de 2024, de <https://floradobrasil.jbrj.gov.br/FB6827>
- De Jesus, N. Z. T., Lima, J. C. D. S., Da Silva, R. M., Espinosa, M. M., & Martins, D. T. D. O. (2009). Levantamento etnobotânico de plantas popularmente utilizadas como antiúlcera e antiinflamatórias pela comunidade de Pirizal, Nossa Senhora do Livramento-MT, Brasil. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 19(1 A), 130–139. <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2009000100023>
- Delchier, J. C. (2008). Gastrointestinal manifestations of *Helicobacter pylori* infection in adults: from gastritis to gastric cancer. *Presse Medicale*, 37(3 PART 2), 519–524. <https://doi.org/10.1016/j.lpm.2007.07.031>
- García Zebadúa, J. C., & Reyes Chilpa, R. (2014). El árbol tropical *Calophyllum brasiliense*: una revisión botánica, química y farmacológica. *Vitae (Medellín)*, 126–145. <https://aprendeonline.udea.edu.co/revistas/index.php/vitae/article/view/15477/16959>
- Gasparotto Jr., A., Brenzan, M. A., Piloto, I. C., Cortez, D. A. G., Nakamura, C. V., Dias Filho, B. P., Rodrigues Filho, E., & Ferreira, A. G. (2005). Estudo fitoquímico e avaliação da atividade moluscicida do *Calophyllum brasiliense* Camb (Clusiaceae). Em *Química Nova* (Vol. 28). 9
- Gomez-Verjan, J. C., Estrella-Parra, E. A., González-Sánchez, I., Vázquez-Martínez, E. R., Vergara-Castañeda, E., Cerbón, M. A., & Reyes-Chilpa, R. (2014). Molecular mechanisms involved in the cytotoxicity induced by coumarins from *Calophyllum brasiliense* in K562 leukaemia cells. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 66(8), 1189–1195. <https://doi.org/10.1111/jphp.12245>
- Guarim-Neto, G. (2006). O saber tradicional pantaneiro: as plantas medicinais e a educação ambiental. *Rev. eletrônica Mestr. Educ. Ambient.*, 17, 71–89.
- Huerta-Reyes, M., Basualdo, M. D. C., Abe, F., Jimenez-Estrada, M., Soler, C., & Reyes-Chilpa, R. (2004). HIV-1 Inhibitory Compounds from *Calophyllum brasiliense* Leaves. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 27(9), 1471–1475. <https://doi.org/10.1248/BPB.27.1471>
- Jesus, N. Z. T. de, Lima, J. C. da S., Silva, R. M. da, Espinosa, M. M., & Martins, D. T. de O. (2009). Levantamento etnobotânico de plantas popularmente utilizadas como antiúlcera e antiinflamatórias pela comunidade de Pirizal, Nossa Senhora do Livramento-MT, Brasil. Em *Revista Brasileira de Farmacognosia* (Vol. 19). scielo .



Karimi, A., Krämer, A., Herwig, N., Schulz, H., Hadian, J., & Meiners, T. (2020). Variation of Secondary Metabolite Profile of *Zataria multiflora* Boiss. Populations Linked to Geographic, Climatic, and Edaphic Factors. *Frontiers in Plant Science*, *11*, 508548. <https://doi.org/10.3389/FPLS.2020.00969/TEXT>

Klein-Júnior, L. C., Zambiasi, D., Salgado, G. R., Delle Monache, F., Filho, V. C., & de Campos Buzzi, F. (2017). The validation of *Calophyllum brasiliense* (“guanandi”) uses in Brazilian traditional medicine as analgesic by in vivo antinociceptive evaluation and its chemical analysis. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, *390*(7), 733–739. <https://doi.org/10.1007/s00210-017-1366-3>

Lemos, L. M. S., Miyajima, F., Castilho, G. R. C., Martins, D. T. O., Pritchard, D. M., & Burkitt, M. D. (2017). Hexane extracts of *Calophyllum brasiliense* inhibit the development of gastric preneoplasia in helicobacter felis infected INS-gas mice. *Frontiers in Pharmacology*, *8*(FEB), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fphar.2017.00092>

Lemos, L. M. S., Oliveira, R. B., Sampaio, B. L., Ccana-Ccapatinta, G. V., Da Costa, F. B., & Martins, D. T. O. (2016). Brasiliensic and isobrasiliensic acids: isolation from *Calophyllum brasiliense* Cambess. and anti-*Helicobacter pylori* activity. *Natural product research*, *30*(23), 2720–2725. <https://doi.org/10.1080/14786419.2015.1137568>

Lemos, L. M. S., Olóba-Whènù, O. A., Olasupo, I. A., Balogun, S. O., Macho, A., Pavan, E., & de Oliveira Martins, D. T. ([s.d.]). Brasiliensic acid: in vitro cytotoxic and genotoxic, in vivo acute toxicity and in silico pharmacological prediction of a new promising molecule. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 1–14. <https://doi.org/10.1080/07391102.2023.2280713>

Lombardo, S., Pandino, G., Mauromicale, G., Knödler, M., Carle, R., & Schieber, A. (2010). Influence of genotype, harvest time and plant part on polyphenolic composition of globe artichoke [*Cynara cardunculus* L. var. *scolymus* (L.) Fiori]. *Food Chemistry*, *119*(3), 1175–1181. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.08.033>

Malfertheiner, P., Camargo, M. C., El-Omar, E., Liou, J. M., Peek, R., Schulz, C., Smith, S. I., & Suerbaum, S. (2023). *Helicobacter pylori* infection. *Nature reviews. Disease primers*, *9*(1). <https://doi.org/10.1038/S41572-023-00431-8>

Malfertheiner, P., Megraud, F., O'Morain, C., Bazzoli, F., El-Omar, E., Graham, D., Hunt, R., Rokkas, T., Vakil, N., Kuipers, E. J., Andersen, L., Atherton, J., Asaka, M., Bazzoli, F., Bytzer, P., Chan, F., Coelho, L. G. V., De Wit, N., Delchier, J. C., ... Xiao, S. (2007). Current concepts in the management of *helicobacter pylori* infection: The maastricht III consensus report. *Gut*, *56*(6), 772–781. <https://doi.org/10.1136/gut.2006.101634>

Neto, G. G. (2006). O SABER TRADICIONAL PANTANEIRO: AS PLANTAS MEDICINAIS E A EDUCAÇÃO AMBIENTAL. *REMEA - Revista Eletrônica do Mestrado em Educação Ambiental*, *17*. <https://doi.org/10.14295/REMEA.V17I0.3025>



Pretto, J. B., Cechinel-Filho, V., Noldin, V. F., Sartori, M. R. K., Isaias, D. E. B., & Bella Cruz, A. (2004). *Antimicrobial Activity of Fractions and Compounds from Calophyllum brasiliense (Clusiaceae/Guttiferae)*. 59(9–10), 657–662. <https://doi.org/doi:10.1515/znc-2004-9-1009>

Raskar, S., Purkar, V., Sardesai, M., & Mitra, S. (2022). Assessing the Impact of Geographical Distribution and Genetic Diversity on Metabolic Profiles of a Medicinal Plant, *Embelia ribes* Burm. f. *Plants*, 11(21), 2861. <https://doi.org/10.3390/PLANTS11212861/S1>

Reyes Chilpa, R., & Huerta Reyes, M. (2009). Compuestos naturales de plantas de la familia clusiaceae: Inhibidores del virus de inmunodeficiencia humana tipo 1. *Interciencia*, 34(6), 385–392. http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0378-18442009000600005&lng=es&nrm=iso&tlng=es

Reyes-Chilpa, R., Baggio, C. H., Alavez-Solano, D., Estrada-Muñiz, E., Kauffman, F. C., Sanchez, R. I., & Mesia-Vela, S. (2006). Inhibition of gastric H⁺,K⁺-ATPase activity by flavonoids, coumarins and xanthenes isolated from Mexican medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*, 105(1), 167–172. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jep.2005.10.014>

Sartori, N. T., Canepelle, D., de Sousa, P. T., & Martins, D. T. O. (1999). Gastroprotective effect from *Calophyllum brasiliense* Camb. bark on experimental gastric lesions in rats and mice. *Journal of Ethnopharmacology*, 67(2), 149–156. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(98\)00244-X](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0378-8741(98)00244-X)

Wang, H., Wang, Y., & Chen, L. (2011). Research progress of chromanone derivatives from *Calophyllum*. *China Journal of Chinese Materia Medica.*, 36(9).

Wang, T., Li, X., Yang, H., Wang, F., Kong, J., Qiu, D., & Li, Z. (2018). Mass spectrometry-based metabolomics and chemometric analysis of Pu-erh teas of various origins. *Food Chemistry*, 268, 271–278. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2018.06.041>

Wang, Y. C. (2014). Medicinal plant activity on *Helicobacter pylori* related diseases. <http://www.wjgnet.com/>, 20(30), 10368–10382. <https://doi.org/10.3748/WJG.V20.I30.10368>

Xu, W., Cheng, Y., Guo, Y., Yao, W., & Qian, H. (2022). Effects of geographical location and environmental factors on metabolite content and immune activity of *Echinacea purpurea* in China based on metabolomics analysis. *Industrial Crops and Products*, 189, 115782. <https://doi.org/10.1016/J.INDCROP.2022.115782>

Yimdjo, M. C., Azebaze, A. G., Nkengfack, A. E., Meyer, A. M., Bodo, B., & Fomum, Z. T. (2004). Antimicrobial and cytotoxic agents from *Calophyllum inophyllum*. *Phytochemistry*, 65(20), 2789–2795. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2004.08.024>

Zavaleta-Mancera, H., Reyes-Chilpa, R., & García-Zebadua, J. (2011). Leaf Structure of Two Chemotypes of *Calophyllum brasiliense* from Mexico. *Microscopy and Microanalysis*, 17(S2), 340–341. <https://doi.org/10.1017/S1431927611002571>