

Determinação do Ácido brasiliênsico: biomarcador da atividade antiúlcera e anti-*Helicobacter pylori* em extratos de *Calophyllum brasiliense* Cambess

Determination of brasilienic acid: biomarker of anti-ulcer and anti-*Helicobacterpylori* activity in extracts of *Calophyllum brasiliense* Cambess

Determinación del ácido brasilénico: biomarcador de la actividad antiulcerosa y anti-*Helicobacterpylori* en extractos de *Calophyllum brasiliense* Cambess

DOI: 10.55905/rdelosv17.n53-033

Originals received: 02/13/2024

Acceptance for publication: 03/15/2024

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

Mestra em Química

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

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

Instituição: Instituto Nacional de Pesquisa do Pantanal (INPP) - campus UFMT

Endereço: Cuiabá - Mato Grosso, Brasil

E-mail: pauloteixeiradesousa@gmail.com

Domingos Tabajara de Oliveira Martins

Doutor em Ciências

Instituição: Departamento de Ciências Básicas em Saúde, Faculdade de Medicina,
Universidade Federal de Mato Grosso (UFMT)

Endereço: Cuiabá - Mato Grosso, Brasil

E-mail: domingos.martins@ufmt.br

RESUMO

O ácido isobrasiliênsico (Iso) é uma cromanona isolada do extrato hexânico das cascas do caule de *Calophyllum brasiliense* Cambess., que exhibe atividade confirmada no tratamento contra úlcera gástrica e infecção por *Helicobacter pylori*. Considerando que estudos anteriores sugerem que o Iso pode ser uma molécula distintiva para atividade antiúlcera, sua presença ou ausência nos extratos pode fornecer informações valiosas sobre a potencial eficácia terapêutica desses extratos contra *H. pylori*. Esse estudo visa quantificar a concentração de Iso em extratos de *C. brasiliense*, preparados a partir das partes aéreas e folhas da planta coletadas em 5 municípios do estado de Mato Grosso, Brasil, para assim compreender sua variabilidade geográfica com relação com as propriedades terapêuticas desses extratos. Para isso, técnicas utilizando a cromatografia líquida de alta eficiência foram performadas para quantificar essa cromanona ácida nos extratos. As separações cromatográficas foram realizadas e a metodologia adaptada utilizada para quantificar o Iso em extratos de *C. brasiliense*, apresentou adequada linearidade e precisão. Dos 5 locais de coleta de *C. brasiliense*, os valores de concentração mais altos do biomarcador Iso foram encontrados para Poconé, região do Pantanal Mato-Grossense. Os resultados indicam ainda, maior acúmulo de Iso nos extratos dos galhos de *C. brasiliense* em comparação aos extratos das folhas da espécie.

Palavras-chave: *Calophyllum brasiliense*, ácido isobrasiliênsico, HPLC-DAD, biomarcador, cromanonas.

ABSTRACT

Isobrasiliensic acid (Iso) is a chromanone isolated from the hexane extract of stem bark of *Calophyllum brasiliense* Cambess., which exhibits confirmed activity in the treatment of gastric ulcers and *Helicobacter pylori* infection. Considering that previous studies suggest that Iso may be a distinctive molecule for antiulcer activity, its presence or absence in the extracts may provide valuable information about the therapeutic potential efficacy of these extracts against *H. pylori*. This study aims to quantify the concentration of Iso in extracts of *C. brasiliense*, prepared from aerial parts and leaves collected in 5 municipalities in the state of Mato Grosso, Brazil, in order to understand its geographic variability and its correlation with the therapeutic properties of these extracts. In this way, techniques using high-performance liquid chromatography were performed to quantify this acidic chromanone in the extracts. Chromatographic separations were performed and the adapted methodology used to quantify Iso in *C. brasiliense* extracts showed adequate linearity and precision. From the 5 *C. brasiliense* collection sites, the highest concentration values obtained of the Iso biomarker were found for Poconé, Pantanal region of Mato Grosso. The results also indicate greater accumulation of Iso in extracts from the aerial parts of *C. brasiliense* compared to the leaves extracts.

Keywords: *Calophyllum brasiliense*, isobrasiliensic acid, HPLC-DAD, biomarker, chromanones.

RESUMEN

El ácido isobrasiliense (Iso) es una cromanona aislada del extracto hexánico de la corteza del tallo de *Calophyllum brasiliense* Cambess., que presenta actividad confirmada en el tratamiento de úlceras gástricas y de la infección por *Helicobacter pylori*. Teniendo en cuenta que estudios previos sugieren que Iso puede ser una molécula distintiva por su actividad antiulcerosa, su presencia o ausencia en los extractos puede proporcionar información valiosa sobre la posible eficacia terapéutica de estos extractos contra *H. pylori*. Este estudio tiene como objetivo cuantificar la concentración de Iso en extractos de *C. brasiliense*, preparados a partir de las partes aéreas y hojas de la planta recolectadas en 5 municipios del estado de Mato Grosso, Brasil, con el fin de comprender su variabilidad geográfica en relación con la Propiedades terapéuticas de estos extractos. Para ello se realizaron técnicas mediante cromatografía líquida de alta resolución para cuantificar esta cromanona ácida en los extractos. Se realizaron separaciones cromatográficas y la metodología adaptada utilizada para cuantificar Iso en extractos de *C. brasiliense* mostró una linealidad y precisión adecuadas. De los 5 sitios de recolección de *C. brasiliense*, los valores más altos de concentración del biomarcador Iso se encontraron en Poconé, región del Pantanal Mato-Grossense. Los resultados también indican una mayor acumulación de Iso en extractos de ramas de *C. brasiliense* en comparación con extractos de hojas de la especie.

Palabras clave: *Calophyllum brasiliense*, ácido isobrasilienseico, HPLC-DAD, biomarcador, cromanonas.

1 INTRODUÇÃO

As cromanonas constituem um grupo heterocíclico de significativa relevância na área química-farmacológica, sendo amplamente encontradas em compostos naturais e conhecidas por exibirem uma diversidade de atividades biológicas (Kamboj & Singh, 2022; Keuler et al., 2022). Essa classe de moléculas é amplamente encontrada em plantas do gênero *Calophyllum* (Calophyllaceae), manifestando-se como metabólitos secundários sob a forma de ácidos cromanônicos, xantonas, cumarinas e flavonoides com diversos efeitos biológicos, como atividades anticancerígenas, antibacterianas e anti-inflamatórias (Cottiglia et al., 2004; Guerreiro et al., 1973; Shen et al., 2004; Wang et al., 2010, 2011).

Calophyllum brasiliense Cambess (*C. brasiliense*) é uma árvore nativa de florestas tropicais que crescem do Brasil ao México (Gupta & Gupta, 2020). No Brasil, a planta é conhecida como guanandi, olandi ou jacareúba, entre outros nomes vernaculares, e é usada para diversas afecções, tais como inflamações, varizes, dor e úlcera crônica (Filho et al., 2009). Pesquisas anteriores destacam que o extrato da casca do caule de *C. brasiliense* e suas frações

ricas em cromanonas apresentam atividade antiúlcera em modelos experimentais de úlcera gástrica (Lemos et al., 2012, 2017).

Algumas cromanonas já foram identificadas em *C. brasiliense*, como os isômeros ácido brasiliênsico e ácido isobrasiliênsico, ácido inofilódico, ácido caloverticílico e brasiliensofílico e isobrasiliensofílico A B e C (Cottiglia et al., 2004; Lemos et al., 2016; Sartori et al., 1999). Lemos et al. (2016) avaliaram que entre os isômeros ácido brasiliênsico (Bras) e ácido isobrasiliênsico (Iso), o segundo apresentou maior atividade contra *Helicobacter pylori* (*H. pylori*), uma bactéria patogênica associada a distúrbios gastrintestinais, incluindo úlceras gástricas. Essas descobertas evidenciam que o Iso pode ser uma molécula distintiva para extratos de *C. brasiliense* com atividade em úlceras pépticas e mesmo em infecções por *H. pylori*.

Recentemente, foi conduzida uma avaliação da concentração inibitória mínima (CIM) de extratos de *C. brasiliense*. Esses extratos foram preparados a partir de partes diferentes (folhas e galhos) da planta e coletados em vários locais do estado de Mato Grosso, Brasil, em um esforço inicial para compreender melhor a variabilidade geográfica e a eficácia potencial da planta contra o *H. pylori* (Leão et al., 2024). Para complementar essa avaliação e elucidar ainda mais os resultados obtidos, este trabalho busca quantificar o Iso presente nesses extratos, visando entender o fator distribuição geográfica com a concentração da molécula e assim, sua relação com a atividade biológica no tratamento da infecção por *H. pylori*.

2 EXPERIMENTAL

2.1 MATERIAL VEGETAL

As folhas e galhos de *C. brasiliense* foram coletados em 5 municípios do estado de Mato Grosso em outubro de 2022 nas seguintes localidades: 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 identificadas e depositadas no Herbário da Universidade Federal de Mato Grosso, Campus Cuiabá, depositário fiduciário do Conselho de Gestão do Patrimônio Genético (CGen), sob os números de registros: 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 REAGENTES E SOLUÇÕES

Os solventes usados para a extração foram etanol e diclorometano, ambos em grau HPLC (LiChrosolv®, Alemanha). Os reagentes de grau HPLC utilizados na análise cromatográfica foram metanol (LiChrosolv®, Alemanha) e ácido fórmico (LiChropur™, Sigma- Aldrich, Merck, Darmstadt, Alemanha) e a água deionizada foi obtida a partir de um sistema de purificação de água Milli-Q (Millipore Corporation®, Watford, Reino Unido). As soluções estoque de Iso e do padrão interno (PI) fenoltaleína foram preparadas em metanol grau HPLC (LiChrosolv®, Alemanha) nas concentrações de 5 mg L⁻¹ e 1,0 mg L⁻¹ respectivamente. Para a curva analítica (Figura S1), as concentrações do Iso foram ajustadas para 0,5, 1,5, 2,5, 3,5 e 4,5 mg L⁻¹. A concentração do PI adicionado nos extratos foi de 0,5 mg mL⁻¹.

2.3 PREPARO DOS EXTRATOS

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 e a outra em diclorometano, 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 (Liofilizador J J Científica®, modelo LJJ02, Brasil) com o objetivo de remover a água do extrato.

2.4 CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS – 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). O método otimizado para a separação utilizou 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 ácidas fórmicas 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⁻¹. O volume de injeção foi de 20 µL e a concentração das amostras (extratos) em 1 mg mL⁻¹. Para aquisição e tratamento de dados foi utilizado o software LabSolutions® (versão 5.3, Japão).

2.5 VALIDAÇÃO

A validação do método foi realizada com base nos parâmetros de linearidade, seletividade, precisão, exatidão, limites de detecção e quantificação (LOD e LOQ). Curvas de calibração com cinco níveis de Iso e PI na faixa de 0,5-4,5 mg L⁻¹ foram preparadas em duplicatas genuínas e injetadas em duplicata. LOD e LOQ foram calculados usando as equações $LOD = (3,3 \times s)/S$ e $LOQ = (10 \times s)/S$, onde s é o desvio padrão do intercepto e S é a inclinação da equação da curva analítica externa. O software utilizado foi o Excel (Microsoft Excel; Microsoft Corporation, USA, 2010) para as análises estatísticas.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A metodologia utilizada para quantificar o Iso em extratos de *C. brasiliense* apresentou adequada linearidade e precisão. Os resultados aqui apresentados sugerem uma variação significativa na concentração desse biomarcador nos extratos da planta, a depender do local de coleta, solvente utilizado na extração e parte da planta utilizada.

Dos 5 locais de coleta de *C. brasiliense*, os valores de concentração mais altos do biomarcador Iso foram encontrados nos extratos de Poconé, região do Pantanal Mato-Grossense (Tabela 1; Figura S2). Essa região possui uma rica biodiversidade, tendo uma vasta flora que apresenta compostos naturais com propriedades funcionais que vão além de suas propriedades intrínsecas (Peixoto et al. 2022). As plantas que crescem nessa localidade são influenciadas por variações climáticas e geográficas se comparados a outros ecossistemas, como condições extremas de temperatura, alta incidência de radiação UV, ciclo de inundações e ocorrência de incêndios. Como resultado, essas plantas apresentam adaptações para sobreviver ao local, como exemplo a alta produção de enzimas antioxidantes e metabólitos com alguma propriedade de defesa (Alho 2008; Junk et al. 2006; Mauro et al. 2023).

Tabela 1. Resultados de quantificação de ácido isobrasilênsico (Iso) em amostras de extratos de *Calophyllum brasiliense* (Cb) coletadas em Chapada dos Guimarães (CH), Nova Brasilândia (NB), Poconé (Po), Rondonópolis (Ro), Sinop (Sp), Mato Grosso, Brasil. Legenda: DCM= Diclorometano; Et= Etanol; Fo=folhas; G= galhos.

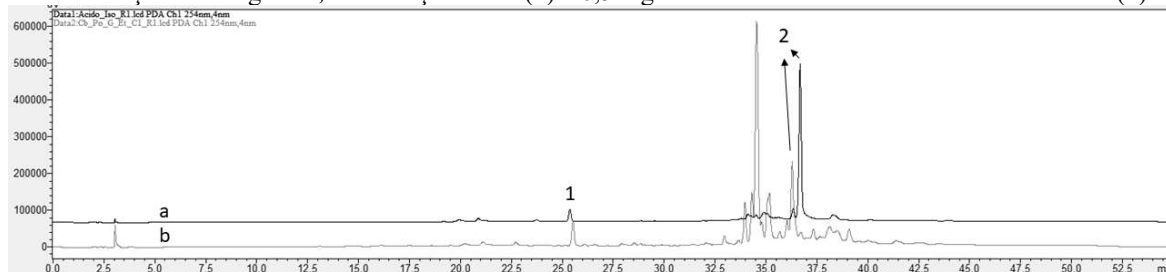
Extrato e parte da planta	Concentração (mg mL ⁻¹)	Desvio Padrão (DP)
Cb CH Fo DCM C1	0,710	0,286
Cb CH Fo Et C1	0,103	0,001
Cb NB Fo DCM C1	0,112	0,005
Cb NB Fo Et C1	0,105	0,002
Cb Po Fo DCM C1	4,472	1,293
Cb Po Fo Et C1	1,156	0,284
Cb Ro Fo DCM C1	0,121	0,014
Cb Ro Fo Et C1	0,104	0,003
Cb Sp Fo DCM C1	0,107	0,009
Cb Sp Fo Et C1	0,101	0,003
Cb CH G DCM C1	1,445	0,085
Cb CH G Et C1	0,479	0,087
Cb NB G DCM C1	1,510	1,295
Cb NB G Et C1	0,257	0,048
Cb Po G DCM C1	3,228	0,599
Cb Po G Et C1	0,463	0,037
Cb Ro G DCM C1	0,323	0,016
Cb Ro G Et C1	0,243	0,041
Cb Sp G DCM C1	0,383	0,204
Cb Sp G Et C1	0,134	0,018

Fonte: Elaborada pelos Autores

Essa distinção foi caracterizada por bandas cromatográficas únicas que não foram observadas em extratos de outras regiões, ou seja, houve diferenças significativas na quantidade de substâncias/picos analisadas em relação a outros locais de coleta (Leão et al., 2024).

As diferenças de concentração do Iso de acordo com as localidades podem estar associadas às diferenças de altitude entre as regiões, que resulta em variações na exposição à radiação solar, temperatura e pressão atmosférica. Outros fatores como competição por recursos, presença de herbívoros e patógenos, e interações com outras espécies vegetais também podem influenciar na concentração do biomarcador. Pode-se observar uma diferença no tempo de retenção para o Iso isolado e o identificado como Iso no extrato (Figura 1), porém os picos foram confirmados por análise dos seus respectivos espectros de UV. Tal diferença também pode ocorrer pela quantidade de constituintes no extrato, inclusive seus isômeros, como Bras entre outros, como cromanonas já relatadas para a espécie, que podem interagir quimicamente com o Iso ou sobrecarregar a região de retenção, de maneira que a ação combinada entre moléculas torne o tempo de retenção do biomarcador aqui estudado, um pouco adiantado e aglomerado com outros constituintes, comparado ao biomarcador isolado injetado (Neto, 2009).

Figura 1. Cromatogramas da injeção de: (a) fenoltaleína como padrão interno (PI) na concentração de $0,5 \text{ mg mL}^{-1}$ (1) e de (b) extratos etanólicos dos galhos de *Calophyllum brasiliense* da coleta referente à Poconé, na concentração de 1 mg mL^{-1} , com adição de PI (1) a $0,5 \text{ mg mL}^{-1}$ e biomarcador ácido isobrasiliênsico (2).



Fonte: Elaborada pelos Autores

O solvente também demonstrou ser um fator que pode alterar a concentração do biomarcador. No estudo em questão, foram utilizados dois solventes com propriedades distintas: diclorometano (DCM) e etanol. Devido à sua natureza de baixa polaridade, o DCM é eficaz na extração de compostos lipofílicos, como ácidos graxos, terpenos e algumas cromanonas ácidas. O biomarcador Iso, por exemplo, possui características lipofílicas que o tornam mais solúvel em solventes apolares como o DCM (Nawaz et al., 2020). Assim, a escolha do solvente pode afetar significativamente a eficiência da extração do biomarcador, influenciando diretamente na concentração final dos extratos e, consequentemente, nos resultados do estudo. A compreensão dessas propriedades dos solventes é fundamental para otimizar os protocolos de extração e garantir a obtenção de extratos de alta qualidade e abundantes em compostos bioativos (Saw et al., 2021).

Os resultados aqui dispostos, demonstram uma variação na quantificação do Iso, sugerindo uma alta variabilidade intrapopulacional na espécie *C. brasiliense*, que pode ser atribuída a uma maior produção de metabólitos secundários como resposta à adaptação da planta nos diferentes complexos ecossistêmicos (Verçosa et al., 2020).

O método otimizado aplicado para quantificar Iso nos extratos, apresentados na Tabela 1 (Figura S2) trazem uma análise de perspectiva biossintética considerável, pois, os valores referentes aos extratos dos galhos demonstram maior acúmulo de Iso na espécie de *C. brasiliense*, comparado aos extratos das folhas da espécie. As concentrações referentes aos galhos apresentam maiores concentrações, em geral o dobro, quando comparados às concentrações referentes às folhas em diferentes locais de coleta. Algumas pesquisas reiteram que essa característica, possivelmente, se refere a um mecanismo de defesa dessas espécies, em resposta ou repelência a ataques de herbívoros, uma vez que estas espécies possuem galhos e caules longos.

3.1 PARÂMETROS DE MÉRITOS

Para a validação do método desenvolvido para quantificação de Iso em extratos de *C. brasiliense*, foram verificados os parâmetros de seletividade, linearidade, exatidão, LOD, LOQ e precisão em termos de repetibilidade (instrumentais), e esses resultados de figuras de mérito estão apresentados na Tabela 2. A curva de calibração apresentou um coeficiente de regressão superior a 0,98.

Tabela 2. Parâmetros que foram analisados para validação do método LC-UV desenvolvido para quantificação de ácido isobrasiliênsico.

Parâmetro	Iso
Equação da curva de calibração	$y = 0,5664x - 0,0554$
Linearidade, faixa linear ¹ (mg L ⁻¹)	0,5-4,5
Linearidade, inclinação	0,0554
Desvio padrão da inclinação, DPR	0,134
Linearidade, coeficiente de determinação (R ²)	0,98
LOD (mg L ⁻¹)	0,711 - 0,646
LOQ (mg L ⁻¹)	2,371 - 2,154

¹ Curvas de calibração com 5 níveis de concentração, onde cada ponto foi preparado em duplicata. Iso: ácido isobrasiliênsico; LOD: limite de detecção; LOQ: limite de quantificação; DPR: desvio padrão relativo.

Fonte: Elaborada pelos Autores

4 CONCLUSÃO

O método desenvolvido e otimizado para quantificação do biomarcador Iso em amostras de *C. brasiliense*, por meio da técnica de cromatografia líquida de alta eficiência com detecção UV-DAD, permitiu assumir informações relevantes sobre a abundância desse metabólito nessa espécie com importantes usos medicinais e comprovadas propriedades farmacológicas. O método permitiu a quantificação do metabólito com baixos limites de detecção e quantificação e curto tempo para preparo de amostra, evitando a necessidade de isolar um metabólito que já possui interesse farmacológico, colaborando significativamente na triagem de compostos bioativos em espécies de plantas medicinais como *C. brasiliense*. Foi possível identificar e destacar a alta concentração de Iso nos extratos da planta referente aos galhos da maioria dos extratos, especificamente valores mais elevados para os locais referente à região pantaneira de Poconé. Tal quantificação permitiu avaliar o potencial fitoquímico e fitofarmacêutico dessa espécie.

Os resultados alcançados mostraram-se relevantes, pois orientam investigações posteriores no intuito de identificar outros compostos potenciais bioativos. Além disso, salienta-

se que este trabalho abre novas perspectivas para pesquisas que possam explorar a relação entre as condições climáticas, características do solo e a composição química das plantas, proporcionando uma compreensão mais abrangente dos elementos que influenciam um maior acúmulo de metabólitos em determinadas partes da planta e em determinadas regiões.

AGRADECIMENTOS

Gostaríamos de expressar nossos agradecimentos ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq, pelo apoio financeiro concedido por meio das bolsas de desenvolvimento tecnológico e industrial (DTI-B) (proc. nº. 384028/2023-3), do programa de capacitação institucional (PCI/MCTI) (proc. nº. 300956/2024-0) e da bolsa de produtividade em pesquisa (PQ 1B) (Proc. nº 314936/2021-1), destinadas ao segundo, terceiro e sexto autor, respectivamente.

Também expressamos agradecimento ao Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Áreas Úmidas (INCT-INAU II/CNPq, Proc. nº 421733/2017-9) e ao Instituto Nacional de Pesquisa do Pantanal (INPP, Portaria MCTI nº 6.988, de 08 de maio de 2023) pelo suporte financeiro ao projeto de pesquisa e pelo financiamento parcial deste artigo.

REFERÊNCIAS

- Cottiglia, F., Dhanapal, B., Sticher, O., & Heilmann, J. (2004). New Chromanone Acids with Antibacterial Activity from *Calophyllum brasiliense*. *Journal of Natural Products*, 67(4), 537–541. <https://doi.org/10.1021/NP030438N>
- Filho, V. C., Meyre-Silva, C., & Niero, R. (2009). Chemical and pharmacological aspects of the genus *Calophyllum*. *Chemistry & Biodiversity*, 6(3), 313–327. <https://doi.org/10.1002/CBDV.200800082>
- Guerreiro, E., Kunesch, G., & Polonsky, J. (1973). Chromanones de l'écorce de *Calophyllum recedens*. *Phytochemistry*, 12(1), 185–189. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)84644-0](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)84644-0)
- Gupta, S., & Gupta, P. (2020). The Genus *Calophyllum*: Review of Ethnomedicinal Uses, Phytochemistry and Pharmacology. *Bioactive Natural Products in Drug Discovery*, 215. https://doi.org/10.1007/978-981-15-1394-7_5
- Kamboj, S., & Singh, R. (2022). Chromanone-A Prerogative Therapeutic Scaffold: An Overview. *Arabian Journal for Science and Engineering*, 47(1), 75. <https://doi.org/10.1007/S13369-021-05858-3>
- Keuler, T., Lemke, C., Elsinghorst, P. W., Iriepa, I., Chioua, M., Martínez-Grau, M. A., Beadle, C. D., Vetman, T., López-Muñoz, F., Wille, T., Bartz, U., Deuther-Conrad, W., Marco-Contelles, J., & Gütschow, M. (2022). The Chemotype of Chromanones as a Privileged Scaffold for Multineurotarget Anti-Alzheimer Agents. *ACS Pharmacology and Translational Science*, 5(11), 1097–1108. <https://doi.org/10.1021/ACSPTSCI.2C00097>
- Leão, R. C. de S., Moura, M. de S., Lopes, K. H. da S., De Vasconcelos, I. P., De Sousa Junior, P. T., & Martins, D. T. de O. (2024). Influência do local de coleta e diferentes partes da planta no perfil químico e atividade anti-*Helicobacter pylori* de *Calophyllum brasiliense* Cambess. *DELOS: Desarrollo Local Sostenible*, 17(53), e1302. <https://doi.org/10.55905/rdelosv17.n53-007>
- Lemos, L. M. S., Martins, T. B., Tanajura, G. H., Gazoni, V. F., Bonaldo, J., Strada, C. L., Silva, M. G. Da, Dall'Oglio, E. L., De Sousa Júnior, P. T., & Martins, D. T. D. O. (2012). Evaluation of antiulcer activity of chromanone fraction from *Calophyllum brasiliense* Camb. *Journal of Ethnopharmacology*, 141(1), 432–439. <https://doi.org/10.1016/J.JEP.2012.03.006>
- 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), 92. <https://doi.org/10.3389/FPHAR.2017.00092/BIBTEX>
- 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>

Nawaz, H., Shad, M. A., Rehman, N., Andaleeb, H., & Ullah, N. (2020). Effect of solvent polarity on extraction yield and antioxidant properties of phytochemicals from bean (*Phaseolus vulgaris*) seeds. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 56. <https://doi.org/10.1590/s2175-97902019000417129>

Neto, A. J. dos S. (2009). Problemas com o formato dos picos em cromatografia líquida. *Scentia Chromatographica*, 1(4).

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/10.1016/S0378-8741\(98\)00244-X](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(98)00244-X)

Saw, N. M. M. T., Suwanchaikasem, P., Zuniga-Montanez, R., Qiu, G., Marzinelli, E. M., Wuertz, S., & Williams, R. B. H. (2021). Influence of Extraction Solvent on Nontargeted Metabolomics Analysis of Enrichment Reactor Cultures Performing Enhanced Biological Phosphorus Removal (EBPR). *Metabolites*, 11(5), 269. <https://doi.org/10.3390/metabo11050269>
Shen, Y. C., Wang, L. T., Khalil, A. T., & Kuo, Y. H. (2004). Chromanones and dihydrocoumarins from *Calophyllum blancoi*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 52(4), 402–405. <https://doi.org/10.1248/CPB.52.402>

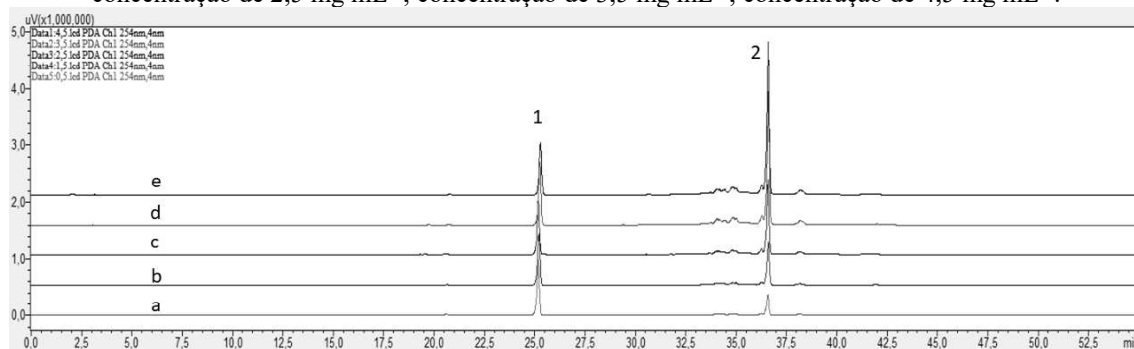
Verçosa, D., Zanuncio, V. S. S., Albrez, E. do A., Lima, D. P. de, Filho, A. C. P., Marques, M. R., & Carollo, C. A. (2020). Seasonal and spatial variation of the iridoid specioside in monodominant formation of *Tabebuia aurea* in the Brazilian Pantanal wetland/ Variação sazonal e espacial do especiosídeo iridóide em formação monodominante de *Tabebuia aurea* na zona húmida do Pantanal brasileiro. *Brazilian Journal of Development*, 6(9), 68771–68786. <https://doi.org/10.34117/BJDV6N9-355>

Wang, H., Sun, Q. Y., Yang, F. M., Long, C. L., Wang, Y. H., Tang, G. H., Zhao, F. W., Niu, H. M., Huang, Q. Q., Xu, J. J., Wataya, Y., & Ma, L. J. (2010). Chromanone Derivatives from the Pericarps of *Calophyllum polyanthum*. *Helvetica Chimica Acta*, 93(11), 2183–2188. <https://doi.org/10.1002/HLCA.201000066>

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

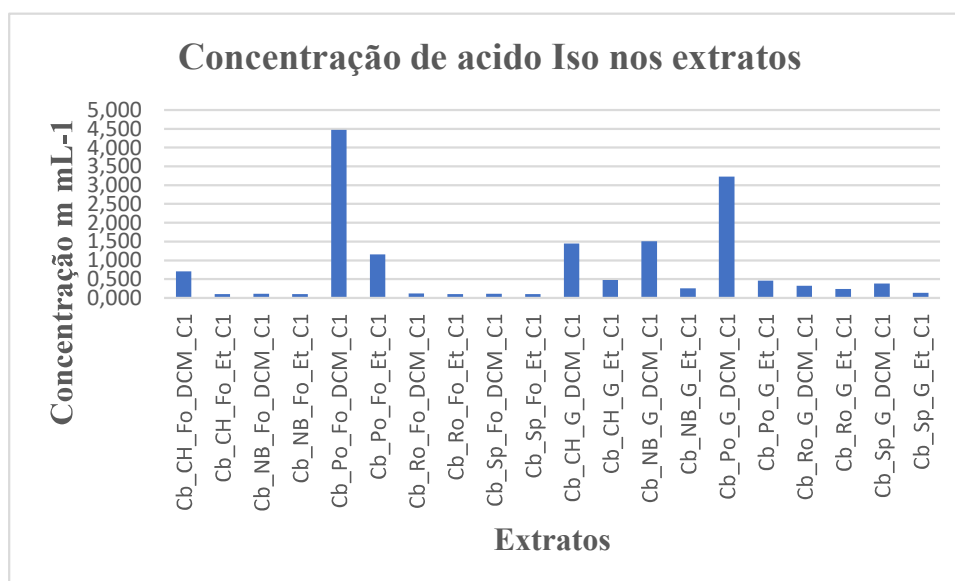
APÊNDICES

Figura S1. Cromatogramas da injeção da curva analítica para quantificação do biomarcador ácido isobrasilênsico em extratos de *C. brasiliense*, sendo adicionado em todas as injeções a fenolftaleína como padrão interno na concentração de 0,5 mg mL⁻¹ (1): (a) concentração de 0,5 mg mL⁻¹; (b) concentração de 1,5 mg mL⁻¹; (c) concentração de 2,5 mg mL⁻¹; (d) concentração de 3,5 mg mL⁻¹; (e) concentração de 4,5 mg mL⁻¹.



Elaborada pelos Autores

Figura S2. Gráfico de barras obtido através dos dados de regressão linear da curva de calibração externa para quantificação do biomarcador ácido brasilênsico em extratos de *C. brasiliense*.



Elaborada pelos Autores