



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS ANTIOXIDANTE, ANTIMICROBIANO E
ANTIBIOFILME DE EXTRATOS DE *Hymenaea courbaril* (JATOBÁ) E
CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA POR UPLC-ESI-QTOF-MS/MS**

Aluno: Jhonatas Emílio Ribeiro da Cruz

Orientador: Dra. Enyara Rezende Moraes

Co-orientador: Dr. Guilherme Ramos Oliveira e Freitas

UBERLÂNDIA – MG

2024



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS ANTIOXIDANTE, ANTIMICROBIANO E
ANTIBIOFILME DE EXTRATOS DE *Hymenaea courbaril* (JATOBÁ) E
CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA POR UPLC-ESI-QTOF-MS/MS**

**Tese apresentada à Universidade
Federal de Uberlândia como
parte dos requisitos para
obtenção do Título de Doutor em
Genética e Bioquímica.**

Aluno: Jhonatas Emílio Ribeiro da Cruz

Orientador: Dra. Enyara Rezende Moraes

Co-orientador: Dr. Guilherme Ramos Oliveira e Freitas

UBERLÂNDIA – MG

2024

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

C957a
2024

Cruz, Jhonatas Emílio Ribeiro da, 1985-

Avaliação dos efeitos antioxidante, antimicrobiano e antibiofilme de extratos de *Hymenaea courbaril* (Jatobá) e caracterização química por UPLC-ESI-QTOF-MS/MS [recurso eletrônico] / Jhonatas Emílio Ribeiro da Cruz. - 2024.

Orientadora: Enyara Rezende Moraes.

Coorientador: Guilherme Ramos Oliveira e Freitas.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica.

Modo de acesso: Internet.

Disponível em: <http://doi.org/10.14393/ufu.te.2023.8080>

Inclui bibliografia.

Inclui ilustrações.

1. Bioquímica. I. Moraes, Enyara Rezende, 1983-, (Orient.). II. Freitas, Guilherme Ramos Oliveira e, 1985-, (Coorient.). III. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica. IV. Título.

CDU: 577.1

André Carlos Francisco
Bibliotecário - CRB-6/3408



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Genética e
Bioquímica

Av. Pará 1720, Bloco 2E, Sala 244 - Bairro Umuarama, Uberlândia-MG, CEP 38400-902
Telefone: +55 (34) 3225-8438 - www.ppggb.ibtec.ufu.br - ppggb@ufu.br



ATA DE DEFESA - PÓS-GRADUAÇÃO

Programa de Pós-Graduação em:	Genética e Bioquímica				
Defesa de:	Doutorado Acadêmico - PPGGB				
Data:	Dezoito de janeiro de dois mil e vinte e quatro	Hora de início:	13:30h	Hora de encerramento:	17:31h
Matrícula do Discente:	11923GBI006				
Nome do Discente:	Jhonatas Emílio Ribeiro da Cruz				
Título do Trabalho:	Avaliação dos efeitos antioxidante, antimicrobiano e antibiofilme de extratos de <i>Hymenaea courbaril</i> (Jatobá) e caracterização química por UPLC-ESI-QTOFMS/MS.				
Área de concentração:	Bioquímica				
Linha de pesquisa:	Estrutura, função, caracterização de biomoléculas e compostos bioativos e suas aplicações				
Projeto de Pesquisa de vinculação:	Avaliação da ação antimicrobiana de plantas medicinais de ocorrência no Cerrado contra bactérias resistentes a múltiplas drogas.				

Aos dezoito dias do mês de janeiro de dois mil e vinte e quatro, às 13:30 horas, reuniu-se via web conferência pela Plataforma *Microsoft Teams*, em conformidade com a Portaria nº 36, de 19 de março de 2020 da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, Resolução de nº 06/2020 e Resolução nº 19/2022 do Conselho de Pesquisa e Pós-graduação pela Universidade Federal de Uberlândia, a Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós graduação em Genética e Bioquímica, assim composta: Dr^a. Carla Monteiro Leal, Dr^a. Daiane Silva Resende, Dr. Marcos de Souza Gomes, Dr^a. Terezinha Aparecida Teixeira e Dr^a. Enyara Rezende Moraes, orientadora do candidato e demais convidados presentes conforme lista de presença. Iniciando os trabalhos a presidente da mesa, Dr^a. Enyara Rezende Moraes apresentou a Comissão Examinadora e o candidato, agradeceu a presença do público, e

concedeu ao discente a palavra para a exposição do seu trabalho. A duração da apresentação do discente e o tempo de arguição e resposta foram conforme as normas do Programa de Pós-graduação em Genética e Bioquímica. A seguir a senhora presidente concedeu a palavra, pela ordem sucessivamente, aos examinadores, que passaram a arguir o candidato. Ultimada a arguição, que se desenvolveu dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu os conceitos finais. Em face do resultado obtido, a Banca Examinadora considerou o candidato:

APROVADO.

Esta defesa de Tese de Doutorado é parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor. O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos, conforme as normas do Programa, a legislação pertinente e a regulamentação interna da UFU. Nada mais havendo a tratar foram encerrados os trabalhos. Foi lavrada a presente ata que após lida e achada conforme foi assinada pela Banca Examinadora.



Documento assinado eletronicamente por **Enyara Rezende Moraes, Presidente**, em 18/01/2024, às 17:35, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Marcos de Souza Gomes, Professor(a) do Magistério Superior**, em 18/01/2024, às 17:35, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Terezinha Aparecida Teixeira, Professor(a) do Magistério Superior**, em 18/01/2024, às 17:35, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Daiane Silva Resende, Usuário Externo**, em 18/01/2024, às 17:36, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Carla Monteiro Leal, Usuário Externo**, em 18/01/2024, às 17:40, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://www.sei.ufu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **4985730** e o código CRC **F80AF419**.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS ANTIOXIDANTE, ANTIMICROBIANO E
ANTIBIOFILME DE EXTRATOS DE *Hymenaea courbaril* (JATOBÁ) E
CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA POR UPLC-ESI-QTOF-MS/MS**

ALUNO: Jhonatas Emílio Ribeiro da Cruz

COMISSÃO EXAMINADORA

Presidente: Prof.^a Dra. Enyara Rezende Moraes (Orientadora)

Examinadores: Prof. Dr. Marcos de Souza Gomes
Prof.^a Dra. Terezinha Aparecida Teixeira
Prof.^a Dra. Carla Monteiro Leal
Prof.^a Dra. Daiane Silva Resende

Data da Defesa: 18 / 01 / 2024

As sugestões da Comissão Examinadora e as Normas PGGB para o formato da Tese foram contempladas.

Enyara Rezende Moraes

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à Deus, a meus pais, Donizetti e Marlene, que sempre estiveram ao meu lado me incentivando e ensinando o verdadeiro significado da integridade. E a minha esposa, Carla, pelo companheirismo e amor incondicional.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a **Deus**, fonte inesgotável de esperança, por me fazer forte e perseverante. Pela presença constante em cada segundo da minha vida e caminhada. Por toda compaixão que me doa e pela oportunidade de existir e de evoluir neste universo maravilhoso.

Aos meus pais, **Donizetti e Marlene**, meu infinito agradecimento. Obrigado pela dedicação e amor com que me criaram. Meus maiores incentivadores, nos quais espelhei a construção do meu caráter.

Valorizo também o incentivo e afeto dos meus irmãos **Washington e Maicon**, por sempre acreditarem nas minhas escolhas e serem meus cúmplices nas aventuras da vida, vocês sempre foram a minha razão de continuar.

A minha esposa **Carla**, pelo apoio incondicional, por entender as minhas faltas, pelo companheirismo e horas de incentivo. Obrigado por todo amor e carinho e por sempre ter me motivado a seguir em frente quando tudo se tornava difícil. Por ser minha companheira em etapas importantes da minha vida, dividindo comigo cada momento com muito amor e carinho.

Ao meu filho **Lorenzo**, a quem dedico em especial este trabalho, que embora pequeno em idade foi grande em pensamento, sabendo apoiar e compreender as minhas dificuldades e ausências. Possa eu sempre ser motivo do seu orgulho.

À minha orientadora, Prof.^a Dra. **Enyara Rezende Moraes**, meu profundo agradecimento pelo incentivo e apoio que recebi durante toda a trajetória. Por ter

acreditado em mim e caminhado comigo passo a passo. Agradeço por me acompanhar por tantos anos, desde o Mestrado, sendo um exemplo de dedicação e doação à pesquisa científica e à docência. Meu respeito e admiração.

Ao meu co-orientador, Prof. Dr. **Guilherme Ramos Oliveira e Freitas**, pelo exemplo de dedicação. Muito obrigado por confiar em meu trabalho, sem os seus ensinamentos, eu não teria conseguido! Obrigado pelo seu otimismo, boa vontade e força nas horas difíceis.

Ao Prof. Dr. **Marcos de Souza Gomes**, por ter me incentivado na busca do conhecimento, por ter me auxiliado durante o desenvolvimento deste trabalho e pela amizade que criamos.

Ao Prof. Dr. **Ademar Alves da Silva Filho** da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Juiz de Fora por ter me auxiliado em etapas fundamentais durante a execução deste estudo, através da caracterização das frações ativas e identificação dos compostos isolados, uma vez que possui ampla experiência no estudo de produtos naturais.

A Prof.^a Dra. **Carla Monteiro Leal** e Me. **Everton Allan Ferreira** pela profícua colaboração e incansável prestabilidade durante o grandioso trabalho desenvolvido em conjunto e os preciosos ensinamentos sobre a análise química de UPLC-HRMS/MS dos extratos ativos.

Aos meus colegas e auxiliares de laboratório que muito contribuíram para o desenvolvimento desse trabalho.

Aos membros da banca, por aceitarem participar da minha defesa e pelo muito que vão acrescentar ao meu trabalho e colaborar com o meu desenvolvimento.

A todos aqueles que, porventura, não foram aqui citados, mas que fizeram parte, direta ou indiretamente, dessa enorme conquista pessoal e profissional.

Muito obrigado!!!

“Alguns homens veem as coisas como são, e dizem ‘Por quê?’ Eu sonho com as coisas que nunca foram e digo ‘Por que não?’”

Geroge Bernard Shaw

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Considerações gerais	1
1.2 Bactérias patogênicas ao homem	3
1.3 <i>Staphylococcus aureus</i> produtor de biofilme	5
1.4 Plantas medicinais	6
1.5 Antioxidantes.....	9
1.6 O bioma Cerrado.....	11
1.7 O gênero <i>Hymenaea</i>	12
1.8 Planta medicinal <i>Hymenaea courbaril</i>	13
2 OBJETIVOS	15
2.1 Objetivo geral.....	15
2.2 Objetivos específicos	16
3. MATERIAL E MÉTODOS	16
3.1 Coleta e identificação do material vegetal.....	16
3.2 Preparação de material vegetal em pó	17
3.3 Preparação de extratos de <i>H. courbaril</i>	17
3.3.1 Extratos obtidos por extração por banho ultrassônico	17
3.3.2 Extratos obtidos por agitação magnética	17
3.3.3 Extratos obtidos por maceração estática	18
3.4 Determinação do teor de compostos fenólicos totais (CFT)	19
3.5 Análise da atividade antioxidante.....	19
3.5.1 Método de redução do complexo de fosfomolibdênio.....	19
3.5.2 Teste de poder redutor férrico (Fe ⁺³)	20
3.6 Avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos por difusão em disco em ágar-ágar	20
3.7 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) por micro diluição em caldo	21
3.8 Ensaio de inibição do biofilme pré-formado <i>in vitro</i>	22
3.9 Análise UPLC-HRMS/MS.....	24
3.10 Análise estatística	25
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	26
4.1 Determinação quantitativa do conteúdo de compostos fenólicos totais	26
4.2 Determinação da atividade antioxidante	27

4.2.1 Método de redução de complexo fosfomolibdênio	27
4.2.2 Ensaio de poder antioxidante de redução férrica.....	30
4.3 Teste de suscetibilidade à ação antimicrobiana de extratos vegetais.....	34
4.3.1 Método de difusão em disco	34
4.3.2 Análise pelo método de micro diluição em caldo	37
4.3.3 Atividade antibiofilme contra <i>S. aureus</i>	40
4.4 Análise UPLC-HRMS/MS dos extratos de <i>H. courbaril</i>	42
5. CONCLUSÕES	49
6. REFERÊNCIAS.....	50
Apêndice I	68
Anexo I.....	89

RESUMO

As bactérias formadoras de biofilme são difíceis de tratar em virtude da resistência a antibioticoterapia convencional e, portanto, se tornaram um problema clínico e epidemiológico em todo o mundo. Além disso, evidências substanciais indicam papel vital das espécies reativas de oxigênio (ERO) e outros oxidantes no metabolismo celular, como responsáveis por vários distúrbios e condições patológicas. Neste cenário, os antioxidantes naturais, na forma de extratos brutos ou seus constituintes químicos, são muito eficazes na prevenção dos processos deletérios causados por estresse oxidativo. Por sua vez, as plantas medicinais têm sido identificadas como possíveis alternativas de tratamento devido aos seus efeitos antioxidantes, antimicrobianos e antibiofilme. Nesse contexto, o presente estudo teve como objetivo determinar o teor de compostos fenólicos totais, capacidade antioxidante, potencial antimicrobiano e antibiofilme de nove extratos da planta *Hymenaea courbaril*, conhecida popularmente como Jatobá. Além disso, extratos que exibiram resultados promissores ($p < 0,001$ semelhante ao cloranfenicol) de atividade inibitória de biofilme contra *Staphylococcus aureus* (ATCC25923) foram selecionados para análise química UPLC-HRMS/MS. As folhas, casca do fruto (exocarpo) e sementes da planta foram extraídas com etanol 96% através de três métodos de extração, a maceração estática (ES), banho ultrassônico (US) e agitação magnética (AM). O extrato da casca do fruto (exocarpo) de Jatobá USJC revelou maior quantidade de compostos fenólicos totais (736,1 mg EAG g⁻¹) pelo teste de Folin-Ciocalteu e o extrato das folhas de Jatobá ESJF demonstrou maior potencial antioxidante através do ensaio de fosfomolibdênio com o valor de (1195,5 mg EBHT g⁻¹). O teste qualitativo de triagem da atividade antimicrobiana mostrou efeito para os nove extratos testados a 500 mg/mL contra a bactéria patogênica *S. aureus* (ATCC25923) com halos de inibição variando de 14-17 mm. O extrato das folhas de Jatobá ESJF apresentou a menor concentração inibitória mínima (CIM) de 1,56 mg/mL e também se destacou com a melhor inibição do biofilme, com o percentual de inibição 78,29%, estatisticamente semelhante ao padrão cloranfenicol (efeito inibitório de 78,85 %) ($p < 0,001$). A análise UPLC-HRMS/MS

dos extratos das folhas (ESJF, USJF e AMJF) de *H. courbaril* mostrou a presença de compostos que não haviam sido relatados anteriormente nesta espécie, incluindo crisoeriol-7-O-neohesperidosídeo, isoramnetina-glicosídeo, luteolina, rutina, 3,7-di-O-metilquercetina e miricetina. Portanto, esses resultados são promissores, indicam o uso de *H. courbaril* como antioxidante e apontam para seu uso na terapia antimicrobiana com possível efeito antibiofilme.

Palavras-chave: *Staphylococcus aureus*. *Hymenaea courbaril*. Atividade Antioxidante. Ação antibacteriana. Inibição de biofilme.

ABSTRACT

Biofilm-forming bacteria are difficult to treat due to resistance to conventional antibiotic therapy and, therefore, have become a clinical and epidemiological problem worldwide. Furthermore, substantial evidence indicates a vital role for reactive oxygen species (ROS) and other oxidants in cellular metabolism, as responsible for various disorders and pathological conditions. Natural antioxidants, in the form of crude extracts or their chemical constituents, are very effective in preventing harmful processes caused by oxidative stress. Medicinal plants have been identified as possible treatment alternatives due to their antioxidant, antimicrobial and antibiofilm effects. In this context, the present study aimed to determine the content of total phenolic compounds, antioxidant capacity, antimicrobial and antibiofilm potential of nine extracts of the *Hymenaea courbaril* plant, popularly known as Jatobá. Furthermore, extracts that exhibited promising results ($p < 0.001$ compared to chloramphenicol) of biofilm inhibitory activity against *Staphylococcus aureus* (ATCC25923) were selected for UPLC-HRMS/MS chemical analysis. The leaves, fruit peel (exocarp) and seeds of the plant were extracted with 96% ethanol using three extraction methods, static maceration (ES), ultrasonic bath (US) and magnetic stirring (AM). The extract from the fruit peel (exocarp) of Jatobá USJC revealed a higher amount of total phenolic compounds (736.1 mg EAG g⁻¹) by the Folin-Ciocalteu test and the extract from the leaves of Jatobá ESJF demonstrated greater antioxidant potential through the test of phosphomolybdenum with a value of (1195.5 mg EBHT g⁻¹). The qualitative antimicrobial activity screening test showed an effect for the nine extracts tested at 500 mg/mL against the pathogenic bacteria *S. aureus* (ATCC25923) with inhibition halos ranging from 14-17 mm. The Jatobá ESJF leaf extract presented the lowest minimum inhibitory concentration (MIC) of 1.56 mg/mL and also stood out with the best biofilm inhibition, with an inhibition percentage of 78.29%, statistically similar to the chloramphenicol standard (inhibitory effect of 78.85%) ($p < 0.001$). UPLC-HRMS/MS analysis of leaf extracts (ESJF, USJF and AMJF) of *H. courbaril* showed the presence of compounds that had not been previously reported in this species, including chrysoeriol-7-O-neohesperidoside, isoramnetin-glucoside, luteolin, rutin, 3,7-di-O-methylquercetin and myricetin. Therefore, these results are

promising, indicating the use of *H. courbaril* as an antioxidant and pointing to its use in antimicrobial therapy with a possible antibiofilm effect.

Keywords: *Staphylococcus aureus*. *Hymenaea courbaril*. Antioxidant activity. Antibacterial action. Biofilm inhibition.

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1.** Partes da planta medicinal *H. courbaril* (Jatobá), (A) Folhas; (B) Casca do fruto (exocarpo) e (C) Sementes.....12
- FIGURA 2.** Teor de compostos fenólicos totais dos extratos de *H. courbaril* em miligramas de equivalente de ácido gálico (mg EAG) por grama de peso seco de material vegetal23
- FIGURA 3.** Poder redutor do complexo fosfomolibdênio dos extratos de *H. courbaril* selecionados 26
- FIGURA 4.** Poder antioxidante redutor férrico (Fe^{+3}) dos extratos de *H. courbaril* selecionados28
- FIGURA 5.** Atividade de diferentes concentrações dos extratos de *H. courbaril* contra o biofilme de *S. aureus* (ATCC25923).....36
- FIGURA 6.** Compostos anotados nos extratos de *H. courbaril*41

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Valores das atividades antioxidantes totais dos extratos de <i>H. courbaril</i> pelo método do fosfomolibdênio	24
TABELA 2. Valores das atividades antioxidantes totais dos extratos de <i>H. courbaril</i> pelo método do poder redutor	27
TABELA 3. Valores das zonas de inibição do crescimento bacteriano (mm) de extratos de <i>H. courbaril</i> e antibióticos correspondentes contra a cepa de <i>S. aureus</i> (25923ATCC)	30
TABELA 4. Valores de concentração inibitória mínima (CIM) dos extratos de <i>H. courbaril</i> e antibióticos correspondentes contra a cepa de <i>S. aureus</i> (25923ATCC).	32
TABELA 5. Dados de UPLC-HRMS/MS de compostos anotados em extratos de <i>H. courbaril</i>	38

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AM	Agitação magnética
AA (%)	Atividade antibiofilme em porcentagem
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BHT	Butil hidroxitolueno
CFT	Compostos fenólicos totais
DNA	Ácido desoxiribonucléico
DO _b	Densidade óptica média branco
DO _{ct}	Densidade óptica média do controle de tratamento
DO _{ext}	Densidade óptica média dos extratos
EAG	Equivalente de ácido gálico
EBHT	Equivalente de Butil hidroxitolueno
EROS	Espécies reativas de oxigênio
ES	Maceração estática
eV	Eletrón volt
µg	Micrograma
µL	Microlitro
µm	Micrometro
°C	Graus Celsius
C	Caule
CBM	Concentração bactericida mínima
CIM	Concentração inibitória mínima
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
DIC	Delineamento inteiramente casualizado
DMSO	Dimetilsufóxido
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EHE	Extrato hidroetanólico
FRAP	Teste do poder antioxidante de redução do ferro
g	grama
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
I	Intermediário
IRAS	Infecções relacionadas à assistência à saúde

Kv	Quilovolt
L.h	Litro por hora
µL	Microlitro
Km ²	Quilometro quadrado
M	Molar
mg	Miligrama
mL	Mililitro
mm	Milímetro
min	Minuto
<i>m/z</i>	massa/carga
nm	Nanômetro
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol- 2-yl)-2,5-difeniltetrazolium
·OH	Radical hidroxila
OMS	Organização Mundial de Saúde
O ₂	Oxigênio singlete
O ₂ ⁻	Ânion superóxido
pH	Potencial hidrogeniônico
pg·mL	Picograma por mililitro
%	Porcentagem
QS	<i>Quorum sensing</i>
R	Resistente
rpm	rotação por minuto
S	Sensível
S/A	Sem atividade
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
TSA	Triptona de Soja
UFC/mL	Unidades formadoras de colônias
UPLC	<i>Ultra Performance Liquid Chromatography</i>
US	Banho Ultrassônico
UTI	Unidade de Terapia Intensiva

1. INTRODUÇÃO

1.1 Considerações gerais

Segundo dados da Organização Mundial da Saúde (OMS), cerca de 700.000 pessoas morrem anualmente por infecção por bactérias resistentes, e esse número está projetado para aumentar para 10 milhões de mortes por ano em 2050 (SHANKAR; PALAIAN, 2016). Por sua vez, as infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS) aumentam significativamente os custos no cuidado aos pacientes, o tempo de internação, a morbidade e a mortalidade nos serviços de saúde (MESQUITA et al., 2023). Pacientes em ambiente hospitalar estão expostos a diversos microrganismos patogênicos, incluindo *Staphylococcus aureus* produtor de biofilme, especialmente na Unidade de Terapia Intensiva (UTI). As IRAS são importantes fatores associados à sepse em UTIs, especialmente pelos procedimentos invasivos realizados (AGUIAR et al., 2020). Tendo em vista a dificuldade no tratamento de infecções causadas por *S. aureus*, que produz biofilmes, a necessidade de terapias novas e eficazes é urgente (JARA et al., 2021, SCHILCHER; HORSWILL 2020).

Biofilme compreende uma comunidade de microrganismos fixados a uma superfície e no interior do biofilme, as bactérias são envolvidas em uma matriz extracelular autoproduzida. A matriz protege as bactérias da exposição às defesas imunológicas e aos tratamentos com antibióticos. Como resultado, os patógenos formadores de biofilme persistem, estabelecendo infecções crônicas. As infecções por patógenos formadores de biofilme podem ser devastadoras, levando a sintomas graves e, em muitos casos, à morte (UC-CACHÓN et al., 2021).

As bactérias que provocam infecções relacionadas a biofilmes são um grande problema de saúde pública, além de ser a principal causa de morbidade e mortalidade de pacientes hospitalizados (KATRIN SCHILCHER, 2020). Por isso, o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas, como o uso de plantas medicinais com atividade antimicrobiana com foco em inibição ou erradicação do biofilme, é de grande interesse.

Por sua vez, algumas espécies de plantas e seus fitoconstituintes são fontes promissoras de agentes antimicrobianos (BEN ABDALLAH et al., 2020). Assim, estudos sobre a atividade anti-infecciosa de plantas medicinais tornaram-se uma tendência progressiva. Entre os 162 novos antibióticos aprovados no período de 1981 a 2019, 94 deles são originários de produtos naturais (NEWMAN; CRAGG 2020).

Considerando os seus importantes efeitos para a saúde, atenção especial é dada aos produtos vegetais com função antioxidante, ou seja, que combatem o estresse oxidativo. Os compostos antioxidantes são essenciais para a manutenção do equilíbrio do organismo, pois atuam no sequestro de radicais livres produzidos em excesso durante o processo metabólico e, conseqüentemente, previne várias doenças relacionadas ao estresse oxidativo (ZAFAR et al., 2023).

Neste sentido, é crescente o interesse pela investigação de antioxidantes provenientes de fontes naturais, os quais, podem atrasar ou impedir o início ou a propagação de uma reação oxidativa em cadeia e, então, prevenir ou reparar os danos causados pelas espécies reativas de oxigênio às células do organismo, causando um impacto benéfico na saúde humana (ZIYATDINOVA; KALMYKOVA, 2023).

Para este estudo selecionou-se a espécie *Hymenaea courbaril* (Fabaceae), conhecida popularmente no Brasil como Jatobá, com longa história de uso como planta medicinal por tribos indígenas da bacia amazônica, incluindo comunidades da Caatinga e do Cerrado (COSTA et al., 2014).

Plantas do gênero *Hymenaea* (Fabaceae) são usadas na medicina tradicional sul-americana e asiática para tratar uma infinidade de distúrbios, como tosse, diarreia, disenteria, cólicas intestinais, fraqueza pulmonar, asma, anemia e dor de garganta, bem como para o tratamento de doenças renais e doenças relacionadas a vírus e bronquite (BONIFACE et al. 2017).

Estudos sobre as propriedades medicinais do *H. courbaril* revelaram atividade antimicrobiana contra bactérias gram-positivas (BRITO et al., 2016), gram-negativas (ALEIXO, 2015) e vírus da dengue tipo 2 (ZANDI et al., 2011). Contudo, ainda não há registro na literatura até o momento de investigações sobre a atividade antibiofilme dessa planta medicinal contra *S. aureus*,

especialmente, da casca do fruto (exocarpo), sementes e folhas de *H. courbaril* (BONIFACE et al., 2017).

1.2 Bactérias patogênicas ao homem

Desde tempos imemoriáveis os microrganismos tiveram efeitos devastadores e tem provocado diversas doenças no homem. No século XIX, com os trabalhos de Pasteur e Koch e seus contemporâneos, iniciou-se a compreensão de várias enfermidades de origem infecciosa e foi possível comprovar a associação direta entre bactérias e doenças. A presença das bactérias seria a causa provável de muitas das patologias que afetam o ser humano (TAVARES, 2001).

Atualmente, muitos estudos sobre atividades de produtos naturais têm sido enfatizados e eles buscam principalmente a atividade destes sobre bactérias. Isto acontece porque, a cada dia, os fármacos existentes se tornam menos eficazes diante dos microrganismos, devido aos mecanismos de resistência desenvolvidos pelos germes. Uma bactéria é considerada resistente quando consegue crescer em concentrações mais altas do que a maior concentração do fármaco no sítio da infecção (SALAM; QUAVE, 2018).

Os antimicrobianos são fármacos amplamente utilizados na clínica que revolucionaram a terapêutica de doenças infecciosas causadas por bactérias e reduziram mundialmente as taxas de morbidade e mortalidade associadas a infecções bacterianas. Porém, o mau uso desses fármacos, em muitos casos de forma não criteriosa, é o principal motivo apontado para o aumento de cepas resistentes, favorecendo a seleção de patógenos que podem causar doenças de difícil tratamento (KATSUURA et al., 2018; OTTO, 2018).

As infecções causadas por microrganismos resistentes a antibioticoterapia convencional tanto no meio hospitalar, as chamadas infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS) como no comunitário, principalmente nos casos em que ocorrem em pacientes críticos, fazem com que a terapêutica não obtenha êxito, prolongando as internações hospitalares e aumentando a mortalidade (STROMMINGER et al., 2014).

As IRAS se caracteriza como uma condição local ou sistêmica decorrente de uma reação adversa à existência de um microrganismo infeccioso ou sua toxina, podendo surgir em até 48 horas após a internação (SENA et al., 2022).

O risco aumentado de mortalidade relacionado à IRAS está intimamente relacionado a fatores, como a gravidade da doença de base que afeta o paciente, procedimentos invasivos diagnósticos e terapêuticos, sítio de infecção, adequação da terapia e sensibilidade dos microrganismos aos antimicrobianos. No Brasil, as IRAS estão entre as seis principais causas de mortes, ao lado das doenças respiratórias, neoplasias e doenças cardiovasculares (MIRANDA; CAMPOS; VIEIRA et al., 2020).

As IRAS na UTI estão relacionadas, principalmente, aos procedimentos invasivos (sondas vesicais de demora, cateteres venosos centrais, ventilação mecânica, entre outros), período de internação prolongado, imunossupressores, colonização por microrganismos resistentes, uso indiscriminado de antimicrobianos, além do próprio ambiente que colabora com a seleção natural de microrganismos. Soma-se ainda a isto, o perfil de gravidade dos pacientes internados na UTI. A gravidade clínica desses pacientes está associada à patologia de base, além das condições clínicas em que são admitidos (MESQUITA et al., 2023).

O aumento de bactérias difíceis de erradicar pelas terapias antimicrobianas convencionais é uma das questões mais urgentes da medicina. As infecções causadas por bactérias sobretudo resistentes a drogas estão associadas a uma alta mortalidade em todo o mundo (DAVID et al., 2017; IRENJI; PILLAI; WEST-JONES, 2018; KATSUURA et al., 2018). De acordo com os dados da Organização Mundial de Saúde (OMS), cerca de 700.000 pessoas morrem anualmente infectadas por bactérias resistentes e este número é projetado para aumentar para 10 milhões de mortes por ano em 2050 (SHANKAR, 2016). Em face da crescente morbimortalidade por infecções causadas por bactérias, a necessidade de terapias novas e eficazes é urgente (VAN DER MEER et al., 2014; WHO, 2017).

Atualmente, a maior ameaça são bactérias como *S. aureus* produtoras de biofilmes. O aparecimento dessas cepas resistentes juntamente com a dificuldade

em encontrar novos agentes antimicrobianos representa agora uma grande ameaça à saúde humana (KATRIN SCHILCHER, 2020).

Biofilmes são comunidade bacterianas nas quais as células se aderem umas às outras e a uma superfície viva e inerte. Estas células estão envolvidas em uma matriz e polímeros extracelulares composta principalmente por polissacarídeos, ácidos nucleicos e proteínas (OTTO, 2018). Esta estrutura fornece uma vantagem para a comunidade microbiana, demonstrando um aumento de 10 a 1000 vezes na resistência a antibióticos (CRUZ; SHAH; TAMMELA, 2018). O biofilme tem sido apontado como a causa de infecções graves em humanos, pois sua ocorrência torna difícil o tratamento de infecções comuns e a possibilidade de infecções recorrentes é alta.

1.3 *Staphylococcus aureus* produtor de biofilme

O *S. aureus* é uma bactéria esférica do grupo dos cocos Gram positivo, catalase-positivo, com aproximadamente 0,5 a 1,5 µm de diâmetro, imóveis, não-esporulados e geralmente não-encapsulados. Frequentemente encontrada na pele e nas fossas nasais de pessoas saudáveis. É considerado o patógeno gram-positivo clinicamente mais importante nos hospitais, excepcionalmente bem-sucedido, que atualmente tem preocupado pesquisadores no âmbito da saúde pública (POPOVICH et al., 2023).

As infecções por *S. aureus* são uma das principais causas de morbidade e mortalidade em ambientes hospitalares e comunitários em todo o mundo (MILLER et al., 2019). As patologias causadas por *S. aureus* podem ser leves a potencialmente fatais, localizadas ou disseminadas e afetar qualquer órgão do corpo. Assim, os sintomas e patologias causadas por *S. aureus* são múltiplos. As apresentações mais comuns de infecção por *S. aureus* são infecções de pele e tecidos moles, no entanto, pode ocorrer formas graves e potencialmente fatais como bacteremia, endocardite, pneumonia, infecções relacionadas a dispositivos ou próteses e infecções osteoarticulares (RUNGELRATH; DELEO, 2021). Essas infecções se caracterizam pela dificuldade de tratamento, que pode incluir intervenções cirúrgicas e longos períodos de antibioticoterapia (TONG et al., 2015).

S. aureus com fenótipo produtor de biofilme tornou um problema clínico e epidemiológico em todo o mundo, aumentando a duração e o custo da internação hospitalar. Biofilme, favorece a cronicidade das infecções por *S. aureus*, além disso, é responsável por mais de 80% das infecções microbianas (RÖMLING; BALSALOBRE, 2012). O biofilme está relacionado a várias doenças estafilocócicas, como infecções de pele e tecidos moles, colonização nasal, endocardite e infecções do trato urinário (PAHARIK; HORSWILL, 2016). Além disso, o biofilme se torna uma séria ameaça no campo da urologia devido à sua responsabilidade pela longa persistência de bactérias no trato genitourinário (BEN ABDALLAH; LAGHA; GABER, 2020).

A formação de biofilme por micróbios patogênicos tornou-se uma séria ameaça para a humanidade, uma vez que é um dos principais fatores que contribuem para a resistência aos medicamentos (GRACE, 2020). A bactéria *S. aureus* pode formar biofilmes em diferentes superfícies e dispositivos médicos, como instrumentos cirúrgicos, implantes e ponta de cateter (NATHAN et al., 2011). Eles têm sido apontados como um fator de virulência responsável por mais de 65% das infecções relacionadas em assistência à saúde (RÖMLING; BALSALOBRE, 2012).

O biofilme especialmente em pacientes graves em uso de dispositivos médicos tem sido associado a tratamento cada vez mais difícil devido à resistência aos antibióticos e ao sistema imunológico, além da disseminação da infecção (KATRIN SCHILCHER, 2020). Desse modo, o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas, como extratos de plantas medicinais, para inibir ou erradicar o biofilme é de grande interesse.

1.4 Plantas medicinais

O uso de plantas para a melhoria da qualidade de vida é tão antigo quanto o surgimento da civilização humana. Diferentes culturas dos mais distintos lugares, conhecem e utilizam o potencial terapêutico dos vegetais no tratamento de doenças, práticas estas que acompanham o homem desde a pré-história e que evoluíram com ele ao longo dos anos. Tal atitude foi fundamental para a

descoberta de novos medicamentos e importantes fitoterápicos (CHAVASCO et al., 2014; MENEZES et al., 2016; SARMENTO et al., 2013).

A fitoterapia, como ciência, é a área do conhecimento que busca o tratamento das doenças através das plantas medicinais, repousa sobre uma tradição secular, sendo amplamente difundida através de raizeiros e curandeiros. Na medicina tradicional, muitas plantas são utilizadas na forma de chás, infusões, banhos, extrato bruto, tinturas ou emplastos, para o tratamento de enfermidades comuns, que muitas vezes, possui uma constatação científica, permitindo a extensão formal desses usos à população como um todo. Dentre os principais produtos de origem vegetal com atividade antimicrobiana, podem ser citados os extratos, as frações, o látex e os óleos essenciais (BITUA et. al., 2009).

As plantas usadas na medicina tradicional são uma fonte potencial de novos compostos antimicrobianos (RAHMAN et al., 2018; SALAM; QUAVE, 2018). Neste contexto, compostos flavonoides com propriedades antimicrobianas efetivas contra *S. aureus* resistentes a meticilina (MRSA) foram isolados, como a primina, miconidina, lapachol, plumbagina, filantimida, luteolina e mirecetina (XU; LEE, 2001). Por sua vez, a planta medicinal *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) (Barbatimão) é tradicionalmente utilizado na cicatrização de feridas, e a empresa farmacêutica Apsen Farmacêutica desenvolveu o medicamento Fitoscar®, uma pomada à base de Barbatimão, que contém uma mistura de compostos fenólicos derivados, principalmente taninos condensados. Dessa forma a pomada diminui o processo inflamatório e o inchaço do ferimento, estimula a formação da pele, além de exercer ação antisséptica e antimicrobiana (VALLI; BOLZANI, 2019).

No mundo em desenvolvimento, a grande maioria das pessoas (75%) dependem de plantas para necessidades médicas primárias, incluindo para cicatrização de feridas e agentes antibacterianos (SARKER; LATIF; GRAY, 2007).

Alguns requisitos colaboram para um elevado consumo de plantas medicinais que são: o baixo custo, fácil obtenção e formulações caseiras de fácil preparo (MOTA et al., 2015). Baseados no conhecimento empírico sobre as propriedades de algumas plantas, desenvolveram-se alguns dos mais valiosos medicamentos utilizados na medicina científica, como aspirina, digitálicos, morfina, pilocarpina, colchicina, quinina, entre outros. Tais substâncias foram fundamentais para o desenvolvimento das ciências da saúde como temos hoje e

são usadas até a presente data na farmacoterapia (FÜRST; ZÜNDORF, 2014; SIMÕES; BENNETT; ROSA, 2009).

A quantidade de plantas existentes no planeta, reconhecida sob o ponto de vista científico, situa-se entre 250 a 500 mil espécies, sendo que somente cerca de 5% tem sido estudada fitoquimicamente e uma porcentagem menor avaliadas sob os aspectos biológicos (MELÉNDEZ; CAPRILES, 2006).

O Brasil possui a maior biodiversidade de plantas do mundo, contando com um número estimado acima de 20% do número total de espécies do planeta. Com mais de 55 mil espécies descritas, essa rica biodiversidade é acompanhada por uma longa utilização de plantas medicinais e conhecimento tradicional associado. Estima-se que aproximadamente 48% dos medicamentos empregados na terapêutica advêm direta ou indiretamente, de produtos naturais, especialmente de plantas medicinais (MELÉNDEZ; CAPRILES, 2006).

Os metabólitos oriundos das plantas medicinais como os compostos fenólicos são capazes de inibir o crescimento de patógenos ou matá-los, aqueles que apresentam baixa toxicidade para as células humanas são considerados candidatos para o desenvolvimento de novos antimicrobianos (ASKARI et al., 2012).

Esses compostos são metabólitos secundários, grupo de substâncias produzidas em pequenas quantidades com características químicas variadas e as vezes complexas, que possuem atividades biológicas envolvidas nos mecanismos de defesa e adaptação da planta a seu meio e não apresentam funções diretamente relacionadas ao desenvolvimento da planta, como é visto nos metabolitos primários. Entretanto, na maioria das vezes, apresentam ação farmacológica de interesse ao ser humano (MENDES et al., 2012).

Plantas ricas em compostos bioativos como os compostos fenólicos, têm sido descritas com ótimo desempenho na atividade antimicrobiana. A maioria dos estudos tem atribuído essa ação aos compostos fenólicos. Entretanto, outros metabólitos como os flavonoides, certos aminoácidos ou peptídeos também já foram descritos como antimicrobianos de fontes naturais (COSTA et al., 2014; CRUZ et al., 2019; PINAZO et al., 2016).

O mecanismo de ação de agentes antimicrobianos de fontes vegetais inclui, danos à membrana citoplasmática provocando extravasamento do

conteúdo das células bacterianas (NEGI; DAVE; AGARWAL, 2012; SILVA et al., 2014). Além disso, os extratos vegetais tem a habilidade de complexar com a parede celular de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, causando o declínio do pH interno da célula bacteriana, bem como pela hiperpolarização da membrana celular (FARAJA et al., 2018).

Várias plantas da flora brasileira, são utilizadas na medicina popular com atividade antisséptica ou no tratamento de doenças infecciosas, e seus estudos tem demonstrado que, inúmeras vezes ocorre a confirmação da atividade antimicrobiana (GUIMARÃES; DA SILVA MOMESSO; PUPO, 2010). Nos últimos anos tem-se observado o crescente interesse pelo uso das plantas medicinais como método terapêutico. Isso se deve pela comprovação científica da sua eficácia e segurança (CARVALHO; PEREIRA; ARAÚJO, 2015; CORREIA et al., 2016).

Nesse sentido, os produtos naturais têm atraído a atenção especial de pesquisadores de diversas áreas, em virtude do grande número de micromoléculas biologicamente ativas que podem ser extraídas de plantas medicinais da flora brasileira e que possam ser utilizadas como protótipos para o desenvolvimento de novos fármacos (NEWMAN; CRAGG, 2012). Nesse contexto, atualmente, atenção especial é dada aos produtos naturais com função antioxidante, devido aos seus efeitos benéficos à saúde humana (MENDONÇA et al., 2022).

Uma série de doenças pode ter seu risco reduzido pela ingestão de vários produtos à base de planta (ARASU et al., 2014). Em uma grande parte desses casos esses benefícios são atribuídos a alguns metabólitos secundários presentes nessas plantas que apresentam atividade antioxidante (KIM et al., 2014).

1.5 Antioxidantes

Antioxidantes são compostos naturais ou sintéticos que inibem ou atrasam o processo de oxidação em concentrações relativamente baixas. Antioxidantes podem interagir com radicais livres antes de danificar as células hospedeiras. O mecanismo de ação antioxidante se deve a diversos mecanismos, como a

inibição de radicais livres que iniciam e propagam a peroxidação, transferência de átomos de hidrogênio, quelação de metais de transição, mitigação dos íons (O_2^-) para evitar a formação de radical hidroxila quebrando a reação em cadeia de auto oxidação. Antioxidantes são considerados produtos seguros para adicionar a qualquer produto alimentício a nível industrial (DEWAGE et al., 2022; ZEB, 2020).

Os polifenóis são os principais antioxidantes vegetais com várias características estruturais, funcionais e propriedades biológicas. Podem variar de compostos simples a substâncias complexas conjugadas. Eles podem ser categorizados em ácidos fenólicos, flavonoides, estilbenes e lignanas. São encontrados em alimentos vegetais, como frutas, cereais, sementes, frutos e produtos à base de plantas, como vinho, chá e óleos vegetais (DEWAGE et al., 2022; ZEB, 2020).

As espécies reativas de oxigênio (EROs) e radicais livres podem ser altamente prejudiciais e desempenham papéis importantes no envelhecimento e na patogênese de distúrbios relacionados à idade, como reumatismo, doenças inflamatórias intestinais, doença cardíaca coronariana, câncer, diabetes e doenças degenerativas (MENDONÇA et al., 2022).

Estilos de vida e hábitos alimentares pouco saudáveis podem aumentar intensamente a produção de EROs no corpo humano, o que pode criar um distúrbio entre a geração dessas espécies e as defesas antioxidantes do corpo, esse desequilíbrio é chamado de estresse oxidativo (EL-GUEZZANE et al., 2021).

As EROs, como o oxigênio singlete (O_2), o ânion superóxido (O_2^-), o radical hidroxila ($\cdot OH$) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) são frequentemente gerados como subprodutos de reações biológicas ou de fatores exógenos. Essas espécies reativas causam danos oxidativos em reações com quase todas as moléculas encontradas nas células vivas, incluindo, lipídeos de membrana, proteínas e o DNA. Assim, o excesso de EROs deve ser eliminado por um sistema antioxidante (VARGAS et al., 2016).

Alguns antioxidantes naturais como a vitamina C e E são importantes por fazer a proteção contra essas espécies reativas de oxigênio (ARASU et al., 2015). A maioria dos metabólitos secundários com potencial antioxidante são compostos fenólicos, como os flavonoides e taninos (VARGAS et al., 2016).

Nesse contexto, as plantas medicinais têm sido amplamente utilizadas ao longo do tempo para tratar diferentes doenças, pois possuem metabólitos naturais que podem estar presentes em folhas, caules, frutas, flores, raízes e cascas que representam uma importante fonte de compostos antioxidantes como flavonoides, ácidos fenólicos, taninos, antocianinas, que podem tratar ou prevenir efeitos de oxidação, assim, as plantas medicinais despertam grande interesse na indústria alimentícia e farmacêutica (MENDONÇA et al., 2022).

As plantas medicinais oferecem um repertório atraente de antioxidantes com novo potencial microbiano de controle de doenças, devido ao espectro de metabólitos secundários presentes nos extratos, que incluem fenólicos, quinonas e flavonoides. Recentemente, eles receberam atenção considerável como uma nova fonte de substâncias inibidoras do *quorum sensing* (QS) seguras e eficazes (ASFOUR, 2018).

QS é um mecanismo de comunicação intercelular bacteriana, que controla a patogênese de muitos organismos, regulando a expressão gênica, incluindo determinantes de virulência. O QS tornou-se um alvo atraente para o desenvolvimento de novos agentes anti-infecciosos que não dependam do uso de antibióticos. Sabe-se que os compostos anti-QS têm a capacidade de inibir a patogenicidade bacteriana (ASFOUR, 2018).

1.6 O bioma Cerrado

Considerado o país com a maior biodiversidade do mundo, o Brasil possui seis biomas ricos em espécies medicinais: Amazônia, Cerrado, Caatinga, Mata Atlântica, Pantanal e Pampa (EMBRAPA, 2020).

O Cerrado é a savana com maior número de espécies endêmicas do planeta. Diferentes condições de solo ao longo de sua extensão, bem como a heterogeneidade da vegetação e da fauna são fatores que o levam ser considerado com grande riqueza biológica. Entretanto, ressalta-se que é a vegetação menos protegida no Brasil e constantemente sofre impactos negativos ocasionados pelas modificações humanas, como a pecuária extensiva e a prática da monocultura (SOUZA-MOREIRA; QUEIROZ-FERNANDES; PIETRO, 2018).

Com uma flora bastante diversificada, muitas plantas de ocorrência no Cerrado possuem potencial valor de exploração em diversos setores, inclusive medicinal (CRUZ et al., 2019). A cultura popular tradicionalmente utiliza produtos naturais como métodos terapêuticos na cura, prevenção e minimização de efeitos de doenças. O uso de plantas do Cerrado com propriedades anti-inflamatória, hepatoprotetora, laxativa e antimicrobiana destacam na medicina popular. O interesse na busca de compostos originários de plantas, com propriedades antibacterianas, tem aumentado, inclusive pela necessidade de se encontrar novas alternativas contra a resistência dos microrganismos (FERREIRA et al., 2013; LUIZ-FERREIRA et al., 2010).

No Cerrado (savana neotropical), aproximadamente 40% da sua flora é endêmica, ou seja, nativa e restrita a apenas a esse bioma. O número de plantas vasculares é superior aquele encontrado na maioria das regiões do mundo; plantas herbáceas, arbustivas e arbóreas. É o bioma com uma das maiores estruturas vegetais, com mais de 6.600 espécies nativas de plantas, e uma área de 2 milhões de km², correspondendo a 23% do território nacional, superado em área apenas pela Amazônia, compondo um cenário de exuberante diversidade biológica. Apesar de sua rica biodiversidade, geralmente é menosprezada e ainda pouco conhecida e estudada, quando comparada ao que se dispõe sobre a Amazônia e a Mata Atlântica. É bastante rico em espécies utilizadas na medicina popular, o que torna as plantas de ocorrência nesse bioma uma fonte promissora para a descoberta de novos compostos antioxidantes e antimicrobianos (ALBERNAZ et al., 2010; KLINK; MACHADO, 2005; VIEIRA et al., 2010, EMBRAPA, 2020).

1.7 O gênero *Hymenaea*

O gênero *Hymenaea* (Fabaceae) é composto atualmente por 14 espécies distribuídas desde o México até a América do Sul podendo ser encontrada também na costa leste da África. No Brasil ocorrem 12 espécies. Esse gênero é caracterizado entre as leguminosas como um fruto indeiscente, volumoso, cilíndrico ou achatado e apresenta arilo farináceo (BONIFACE; BAPTISTA FERREIRA; ROLAND KAISER, 2017).

Plantas do gênero *Hymenaea* são utilizadas na medicina tradicional sul-americana e asiática para tratar uma infinidade de distúrbios, como tosse, diarreia, cólica intestinal, anemia, dor de garganta e doenças renais. Além de distúrbios relacionados a vírus e bronquite (BEZERRA et al., 2013; BONIFACE; BAPTISTA FERREIRA; ROLAND KAISER, 2017). As diferentes partes das plantas são utilizadas também para o tratamento de várias enfermidades sob a forma de chá, xarope, lambedor, maceração e suco sendo as cascas, frutos e raízes as partes vegetais mais utilizadas (CLEMENTINO-NETO et al., 2015).

A polpa farinácea do fruto é empregada na produção de farinhas, doces, bebidas e biscoitos, pois apresenta elevada capacidade de absorção de água além de alto teor de fibras ricas em substâncias antioxidantes (BEZERRA et al., 2013).

No Brasil, as plantas desse gênero são usadas na medicina tradicional para tratamento de feridas, inflamações, infecções bacterianas, reumatismo, distúrbios respiratórios, estomacais e doenças da próstata. Possuem compostos terpênicos e fenólicos que agem como antifúngicos, antibacterianos e moluscicida (OLIVEIRA et al., 2018; TIAGO et al., 2020).

1.8 Planta medicinal *Hymenaea courbaril*

O jatobá (*Hymenaea courbaril*) (figura 1), apresenta porte arbóreo de cerca de 15 m a 20 m de altura, possui tronco cilíndrico e reto com aproximadamente 2m de diâmetro; casca lisa, dura e cinzenta; folhas alternadas e pecioladas, flores em panículas e frutos indeiscentes, medindo de 10 a 20 cm de comprimento (JAYAPRAKASAM et al., 2007).

Figura 1 – Partes da planta medicinal *H. courbaril* (Jatobá), (A) Folhas; (B) Casca do fruto (exocarpo) e (C) Sementes.



Fonte: o autor.

Quanto à distribuição geográfica, a *H. courbaril* ocorre desde o sul do México até grande parte da América do Sul, incluindo o Brasil, Guiana Francesa, Suriname, Guiana, Venezuela, Colômbia, Peru e Bolívia. Especificamente no Brasil, pode ser encontrada desde a floresta amazônica até as florestas sazonais do Sudeste, principalmente no Cerrado e na Caatinga, especialmente nos estados da Bahia, Minas Gerais, Piauí, Goiás, Mato Grosso do Sul e São Paulo. É encontrada em altitudes de até 900 metros acima do nível do mar, em solos arenosos e argilosos bem drenados de terra firme e em várzeas altas, mas raramente em campos abertos. Além disso, a espécie cresce bem em zonas úmidas com precipitação anual entre 1500 e 3000 milímetros (BANDEIRA et al., 2015; BONIFACE; BAPTISTA FERREIRA; ROLAND KAISER, 2017).

O jatobá, espécie relatada no bioma Cerrado, pertencente à família Fabaceae, é uma planta arbórea que possui potencial medicinal. No que diz respeito ao uso medicinal, o chá preparado a partir da casca da planta é utilizado para dar energia e resistência, além de tônico para o trato respiratório e para o tratamento do sistema urinário (HUSSAIN et al., 2012).

As sementes são usadas para o tratamento de problemas no pulmão, rim, próstata e estômago. A infusão das folhas é usada para o tratamento de bronquite, especialmente em crianças, provavelmente em função de suas propriedades antimicrobianas. Ainda, as folhas são usadas para tratar fraturas, feridas e problemas pulmonares e, no tratamento de diabetes. O jatobá também é usado popularmente para cistite, hepatite, prostatite e também para tratar micoses de unhas (BONIFACE; BAPTISTA FERREIRA; ROLAND KAISER, 2017).

As atividades antioxidantes dos extratos etanólico (70% v/v) e metanólico (250 µg/ml) de folhas, cascas de frutos, polpa e sementes de *H. courbaril* foram avaliadas pelos ensaios 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH), poder redutor férrico e sequestro do radical peroxil (ORAC). Exceto os extratos de polpa, todos os demais extratos vegetais apresentaram atividade antioxidante eficaz. Para o teste DPPH, o ácido gálico foi utilizado como controle positivo, enquanto o trolox foi utilizado para os testes poder redutor férrico e ORAC (FIGUEIREDO, 2014).

Estudos sobre as propriedades medicinais de *H. courbaril* revelaram atividades biológicas da seiva do xilema de *H. courbaril* contra dermatófitos e *Cryptococcus neoformans* (COSTA et al., 2014). No entanto, estudos sobre a atividade antibiofilme da casca do fruto (exocarpo) de *H. courbaril* ainda não foram publicados. Assim, a hipótese desta tese é de que a casca do fruto (exocarpo), folhas e sementes de *H. courbaril* possuem compostos com atividade antioxidante e substâncias capazes de combater *in vitro* a bactéria patogênica *S. aureus* produtora de biofilme.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O presente trabalho teve como objetivo geral analisar o potencial antioxidante, realizar a triagem da atividade antimicrobiana e determinar a ação antibiofilme de extratos da planta medicinal (*H. courbaril*) contra a cepa da bactéria patogênica *S. aureus* (ATCC 25923) produtora de biofilme.

Além disso, realizar a caracterização química dos extratos ativos objetivando futuramente o desenvolvimento de novos antioxidantes e antibacterianos, com a perspectiva de descobrir agentes terapêuticos ou protótipo para o desenvolvimento de novos fármacos indispensáveis ao tratamento de pacientes com infecções graves.

2.2 Objetivos específicos

- I. Realizar a prospecção fitoquímica;
- II. Verificar o teor de compostos fenólicos totais;
- III. Determinar a atividade antioxidante;
- IV. Realizar uma triagem inicial para determinar os extratos vegetais potencialmente ativos sobre o a bactéria *S. aureus* (ATCC 25923) por disco difusão;
- V. Determinar a concentração inibitória mínima (CIM) dos extratos da casca do fruto (exocarpo), folha e semente frente a *S. aureus* (ATCC 25923) por micro diluição em caldo;
- VI. Avaliar a atividade antibiofilme dos extratos ativos de *H. courbaril* (jatobá) contra cepa de *S. aureus* (ATCC 25923) produtora de biofilme;
- VII. Analisar os extratos com atividade antibiofilme promissora por espectrometria de massas (UPLC-HRMS/MS);
- VIII. Anotar as substâncias químicas dos extratos com atividade antimicrobiana frente à cepa da bactéria patogênica *S. aureus* (ATCC 25923) produtora de biofilme.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Coleta e identificação do material vegetal

As folhas (18,6 g), cascas do fruto (exocarpo) (17,1 g) e sementes (20,5 g) da planta *H. courbaril* foram coletados no dia 14 de dezembro de 2020 na Rua Feliciano Donato de Macedo - Maravilha, Uberlândia - MG, 38401-844, Brasil (18°53'11,9" sul 48°18'20,1" oeste). Os materiais foram identificados pela agrônoma Prof.^a Dra. Terezinha Aparecida Teixeira. O espécime foi registrado e depositado no Herbário da Universidade Federal de Uberlândia (UFU) sob o número HUFU 81526.

3.2 Preparação de material vegetal em pó

Folhas, cascas do fruto (exocarpo) e sementes de *H. courbaril* foram primeiramente lavadas em água para retirada de impurezas e, em seguida, todos os materiais foram armazenados separadamente em ultra congelador (Coldilab®, Piracicaba, SP, Brasil) à temperatura de - 80 °C. Para obtenção dos extratos brutos, os materiais vegetais foram retirados do ultra congelador e rapidamente colocados para secar em um liofilizador (Liotop® L101, São Carlos, SP, Brasil) pelo período de 72 horas, seguido pela trituração em um moinho com facas (Willey® Star FT50, Piracicaba, SP, Brasil) em pó fino.

3.3 Preparação de extratos de *H. courbaril*

3.3.1 Extratos obtidos por extração por banho ultrassônico

Os pós da casca do fruto (exocarpo) (4,95 g), folhas (4,86 g) e sementes (4,91 g) de Jatobá (*H. courbaril*) foram submetidas separadamente à extração em banho ultrassônico (Sanders Medical® - SoniClean 6, Santa Rita do Sapucaí, MG, Brasil), utilizando como solvente 100 mL de etanol 96% (Sigma®, St. Louis, MO, USA) (SÁ et al. 2011), em temperatura fixa de 40 °C, por 15 min, realizado em três ciclos. Após a filtração, o solvente foi removido por evaporação rotativa (Fisatom®, Perdizes, SP, Brasil) a 50 °C para produzir extratos brutos de casca do fruto (exocarpo) (USJC, 3,36 g / rendimento de 67,8%), folhas (USJF, 3,59 g / rendimento de 73,9%) e sementes (USJS, 2,97 g / rendimento de 60,5%) de Jatobá. Por fim, os extratos brutos UBBB, UBJL e UBJS foram liofilizados, colocados em tubos Falcon de 50 mL e armazenados em geladeira (4 °C).

3.3.2 Extratos obtidos por agitação magnética

Os pós da casca do fruto (exocarpo) (4,80 g), folhas (4,92 g) e sementes (4,87 g) de Jatobá (*H. courbaril*) foram colocados separadamente em frascos

âmbar de 500 - mL e 100 mL de etanol 96% (Sigma®, St. Louis , MO, USA), seguido de agitação constante em agitador magnético (Marconi® MA – 085L, Piracicaba, SP, Brasil) a 1.200 rpm, protegido da luz, à temperatura ambiente (25 °C), por 24 h. Imediatamente depois, os extratos foram filtrados separadamente a vácuo e secos em rotaevaporador (Fisatom®, Perdizes, SP, Brasil) a 50 °C. Ao final da rotaevaporação, para retirar a água residual, extraíram-se os extratos de casca do fruto (exocarpo) (AMJC, 2,95 g / rendimento de 61,4%), folha (AMJF, 3,75 g / rendimento de 76,2%) e semente (AMJS, 3,24 g / rendimento de 66,5%) de Jatobá obtidos por agitação magnética foram colocados em liofilizador (Liotop® L101, São Carlos, SP, Brasil) por 24 h. As preparações finais foram colocadas em tubos Falcon de 50 mL e armazenadas em geladeira (4 °C).

3.3.3 Extratos obtidos por maceração estática

Os pós da casca do fruto (exocarpo) (4,95 g), folhas (4,93 g) e sementes (4,90 g) de Jatobá (*H. courbaril*) foram colocadas separadamente em frascos âmbar de 500 mL e, a seguir, 100 mL de etanol 96% (Sigma®, St. Louis, MO, USA) e os frascos deixados em repouso, protegidos da luz, em temperatura ambiente (25°C), por 24 horas. Este procedimento foi repetido três vezes para extração máxima de todos os compostos pelo solvente. Em seguida, os extratos foram filtrados a vácuo e secos em rotaevaporador (Fisatom®, Perdizes, SP, Brasil) a 50 °C. Ao final da rotaevaporação, para retirar a água remanescente, foram extraídos os extratos de casca do fruto (exocarpo) de Jatobá (ESJC, 3,01 g / rendimento de 76,2%), folha (ESJF, 3,62 g / rendimento de 73,24%) e semente (ESJS, 3,40 g / rendimento de 69,4%) obtidos por maceração estática foram liofilizados (Liotop ® L101, São Carlos, SP, Brasil) por 24 h. As preparações finais foram colocadas em tubos Falcon de 50 mL e armazenadas em geladeira (4 °C).

3.4 Determinação do teor de compostos fenólicos totais (CFT)

Uma alíquota de 0,5 mL da amostra diluída (50 g L^{-1}) de cada extrato de casca do fruto (exocarpo) (USJC, AMJC, ESJC), folhas (USJF, AMJF, ESJF) e sementes (USJS, AMJS, ESJS) de Jatobá foi misturada com 2,5 mL de reagente Folin-Ciocalteu (Sigma; $0,2 \text{ mol L}^{-1}$) (SINGLETON; ROSSI, 1965). Posteriormente, 2 mL de solução saturada de carbonato de sódio (Sigma; 75 g L^{-1}) foram adicionados à mistura reacional. As leituras de absorvância foram feitas a 760 nm após incubação à temperatura ambiente por 2 h. O ácido gálico (Neon[®], Suzano, SP, Brasil) foi utilizado como padrão de referência e os resultados foram expressos em miligramas de equivalente de ácido gálico (mg EAG) por grama de peso seco do material vegetal. Todos os testes foram realizados em triplicata.

3.5 Análise da atividade antioxidante

3.5.1 Método de redução do complexo de fosfomolibdênio

Para preparar o meio reacional, uma alíquota de 100 μL de cada extrato de casca do fruto (exocarpo) (USJC, AMJC, ESJC), folhas (USJF, AMJF, ESJF) e sementes (USJS, AMJS, ESJS) de Jatobá na concentração de $100 \mu\text{L mL}^{-1}$ foi acondicionado em tubos de ensaio e, em seguida, 1 mL do reagente (0,6 M de ácido sulfúrico; 28 mM de fosfato de sódio e 4 mM de molibdato de amônio; Sigma) foi adicionado aos mesmos tubos (PRIETO et al., 1999). Os tubos foram tampados e incubados em banho-maria (Cientec[®], Belo Horizonte, MG, Brasil) a $95 \text{ }^\circ\text{C}$ por 60 min. Após o resfriamento dos tubos de ensaio, as leituras foram realizadas em espectrofotômetro (Gehaka[®] UV-340G, São Paulo, SP, Brasil) a 695 nm. Os valores foram comparados com uma curva padrão de várias concentrações do antioxidante sintético BHT (butil-hidroxitolueno; Sigma) (1000; 500; 250; 125; e $62,5 \mu\text{g mL}^{-1}$). Os resultados foram expressos em miligramas de BHT equivalente por grama de peso seco do material vegetal (mg EBHT g^{-1}).

3.5.2 Teste de poder redutor férrico (Fe⁺³)

A atividade antioxidante foi avaliada através do método do poder redutor segundo a metodologia de Oyaizu (1986). Uma alíquota de 100 µL de cada extrato de casca do fruto (exocarpo) (USJC, AMJC, ESJC), folhas (USJF, AMJF, ESJF) e sementes (USJS, AMJS, ESJS) de Jatobá na concentração de 100 µL mL⁻¹ foi acondicionada em teste tubos e, em seguida, 1 mL de cada 0,2 M de tampão fosfato pH 6,0 e 1% de solução aquosa de ferrocianeto de potássio foi adicionado aos mesmos tubos. Após 20 minutos de incubação em banho-maria a 50 °C (Cientec®), 1 mL de ácido tricloroacético 10% foi adicionado à mistura. Em seguida, foram adicionados 3 mL de água destilada e 600 µL de cloreto férrico 0,1%. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro (Gehaka®) a 700 nm. Os valores foram comparados com uma curva de várias concentrações do antioxidante sintético BHT (Sigma®) (1000; 500; 250; 125; e 62,5 µg mL⁻¹). Os resultados foram expressos em miligramas equivalentes de BHT por grama de extrato (mg EBHT g⁻¹).

3.6 Avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos por difusão em disco em ágar-ágar

O microrganismo usado para rastrear para sensibilidade a extratos vegetais foi *S. aureus* (ATCC 25923). O método de difusão em disco em ágar foi utilizado de acordo com a padrões descritos pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2023). As bactérias foram mantidas sobre Triptona Soja ágar (TSA; Kasvi®, São Paulo, SP, Brasil), incubadas por 24 horas a 37 °C, ressuspensas em solução salina 0,85% estéril e ajustado conforme o padrão 0,5 da escala de McFarland (10⁸ CFU/ml).

A suspensão contendo as bactérias foi inoculada na superfície do meio de cultura ágar Mueller-Hinton (MHA; bioMérieux®, Jacarepaguá, RJ, Brasil) com auxílio de swab estéril para uma cobertura uniforme do inóculo. Após 15 minutos, discos de papel de filtro estéreis (6 mm de diâmetro) contendo 10 µL de frações diluídas para 500 mg/mL foram depositados na superfície do meio de cultura, com

distância mínima de 24 mm entre eles, e as placas foram então incubadas a 37°C por 24h. Os testes foram realizados em triplicata para se obter uma maior acurácia dos resultados, uma vez que há dificuldade de os compostos vegetais difundirem no meio MHA. Para o experimento, o antibiótico Eritromicina 15 µg (Cecon®, São Paulo, SP, Brasil) foi utilizado como controle positivo para *S. aureus* e o compostos Etanol 96% (Sigma) e DMSO 5% (Sigma) como controles negativos.

O extrato de *H. courbaril* que apresentou halo de inibição > 12 mm foi considerado sensível (S), de acordo com os parâmetros descritos por Almeida Alves et al., (2000). Portanto, foram considerados promissores em termos de atividade inibitória pelo método qualitativo de disco-difusão em ágar contra *S. aureus* (ATCC 25923), e posteriormente, foram selecionados para análise de concentração inibitória mínima (CIM).

3.7 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) por micro diluição em caldo

Os extratos de casca do fruto (exocarpo) (USJC, AMJC, ESJC), folhas (USJF, AMJF, ESJF) e sementes (USJS, AMJS, ESJS) de Jatobá que apresentaram atividade antibacteriana na avaliação preliminar foram submetidos à determinação da CIM pelo caldo técnica de micro diluição (LIMA et al., 2006, CLSI, 2023). Os testes foram realizados em meio Mueller-Hinton (MHB; bioMérieux) em uma placa estéril de 96 poços. Uma alíquota de 10 µL de cada extrato vegetal de casca do fruto (exocarpo) (USJC, AMJC, ESJC) e folhas (USJF, AMJF, ESJF) de Jatobá nas concentrações de 1,562; 3,125; 6,25; 12,5; 25; e 50 mg/mL foram depositados em cada poço contendo MHB e suspensão de microrganismos para um volume final de 200 µL por poço. Para o experimento, DMSO 5% (Sigma) foi adicionado como controle negativo e cloranfenicol 30 mg/mL⁻¹ (Cecon) como controle positivo.

O inóculo bacteriano foi dissolvido em solução salina até uma concentração equivalente ao padrão de McFarland 0,5 (10⁸ UFC mL⁻¹), diluído 1/10 para obter uma concentração de 10⁷ UFC mL⁻¹, e inoculado em cada poço contendo as diluições. Todas as placas foram incubadas a 37°C por 24h. Para

indicar crescimento bacteriano, 10 µl de brometo de 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazólio (MTT; Sigma) a 0,2 mg/mL foi adicionado a cada poço e incubado por 4 h. Utilizou-se o MTT para se definir a CIM, pois, a forte coloração dos extratos de *H. courbaril* dificulta a visualização de turbidez pelo crescimento microbiano. A CIM foi definida como a menor concentração fracionária capaz de inibir o crescimento microbiano.

Com os resultados do teste quantitativo de CIM, os extratos mais promissores de *H. courbaril* que apresentaram atividade antimicrobiana com CIM igual ou inferior a 3,12 mg/mL frente a *S. aureus* (ATCC 25923) foram submetidos à determinação da atividade antibiofilme.

3.8 Ensaio de inibição do biofilme pré-formado *in vitro*

Para a preparação do biofilme de *S. aureus* foi utilizado o protocolo proposto por Batistão et al. (2014), com modificações. Para a preparação do inóculo em meio sólido uma colônia isolada da bactéria *S. aureus* (ATCC25923) foi repicada em uma placa com TSA e incubada a 37°C, *overnight* (18 a 24h). Em seguida, para a preparação do pré-inóculo em meio líquido três colônias isoladas obtidas a partir do inóculo em meio sólido, preparado no dia anterior, foram inoculadas em 20 mL de TSB e incubadas durante 18 horas a 37°C com agitação de 120 rpm para a obtenção de um crescimento microbiano com aproximadamente 10⁹ unidades formadoras de colônia (UFC) por mL.

Em seguida, essa suspensão bacteriana foi lavada duas vezes em 20 mL de solução salina estéril (NaCl 0,9%), a 78000 rpm, por 15 minutos. A suspensão bacteriana foi então diluída para 10⁸ UFC/mL em um tubo contendo meio TSB e, 100 µL dessa suspensão foram inoculadas, em microplacas de poliestireno de 96 poços, incubadas por 24 h, a 37 °C, a 75 rpm para os ensaios com os extratos. Em paralelo, a suspensão bacteriana foi diluída seriadamente (1:10) e, 10 µL de cada diluição foram inoculados, em quadruplicata, em placas de TSA, pela técnica de gota e incubadas a 37 °C por 24 h, para posterior contagem das colônias e controle da concentração bacteriana inoculada.

Os extratos das folhas de *H. courbaril* (USJF, AMJF, ESJF) foram esterilizados utilizando filtros com porosidade de 22 µm, posteriormente, os

extratos foram então seriamente diluídos em concentrações de 50; 25; 12,5; 6,25; 3,12; e 1,56 mg/mL, e utilizados nos ensaios posteriores.

Para os ensaios de avaliação do efeito dos extratos vegetais sobre o biofilme de *S. aureus* foi utilizado o protocolo descrito por Brambilla et al. (2017), com modificações, que utiliza o (MTT; Sigma). Este ensaio avalia a capacidade de células metabolicamente ativas presentes no biofilme, de reduzir o MTT, convertendo os sais de amarelo de tetrazólio em cristais de formazana púrpura, e assim obter um valor de absorbância diretamente proporcional à viabilidade celular.

Primeiramente, poços das placas contendo o biofilme de *S. aureus* cultivado por 24h, foram lavados duas vezes com solução salina (0,9%). Em seguida, 200 µL das concentrações mencionadas anteriormente dos extratos vegetais foram inoculados, em triplicata, aos poços das placas, seguida de uma nova incubação (24 h, a 37 °C e 75 rpm). Foi realizado o controle positivo da formação do biofilme (cloranfenicol em concentrações de 640, 320, 160 e 80 µg/ml; Sigma), o controle negativo DMSO 5% (Sigma), o controle de tratamento (meio TSB; Kasvi®) e o controle de esterilidade (meio TSB em poços sem inóculo bacteriano; Kasvi). Os poços foram então lavados e, a cada um, adicionados 200 µL de MTT (0,5 mg/mL) seguido de uma nova incubação por 2 h, a 37 °C.

Posteriormente, o sobrenadante de cada poço foi descartado, foram adicionados 200 µL de DMSO (5%), e a placa foi incubada por 10 minutos, à 37°C para a dissolução dos sais de formazana. Por fim, 100 µL da solução de cada poço, foram transferidos para uma nova placa e foi realizada a leitura a 560 nm usando um leitor de microplacas (Multiskan™ FC, Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA). Os ensaios foram realizados em triplicata.

A absorbância obtida foi diretamente proporcional a viabilidade celular das células do biofilme, a qual foi calculada utilizando-se os valores dos poços tratados com as diferentes concentrações dos extratos, e os valores dos poços aos quais foi adicionado apenas o meio TSB (controle de tratamento), utilizando a seguinte fórmula:

$$AA (\%) = \left(1 - \frac{DO_{ext} - DO_b}{DO_{ct} - DO_b} \right) \times 100$$

Onde:

AA (%) = Atividade do antibiofilme em porcentagem;

DOext = Densidade óptica média de tratamento com extratos em diferentes concentrações;

DOb = Densidade óptica mediana de poços sem adição de reagentes (branco);

DOC = Densidade óptica média do controle com tratamento.

Neste estudo, os extratos que exibiram resultados de atividade inibitória de biofilme contra *S. aureus*, estatisticamente semelhantes ao do antibiótico padrão cloranfenicol (78,85%; $p < 0,001$), foram selecionados para análise do perfil químico por meio da análise UPLC-HRMS/MS.

3.9 Análise UPLC-HRMS/MS

Os extratos das folhas de Jatobá obtidos pelos métodos de maceração estática (ESJF), banho ultrassônico (USJF) e agitação magnética (AMJF) foram analisados por Cromatografia Líquida de Ultra Performance (UPLC) usando um *Acquity UPLC system* (Waters Corporation, Milford, MA, EUA) equipado com uma bomba binária, degaseificador em linha e amostrador automático acoplado a um espectrômetro de massas com fonte de ionização por electrospray e analisador QTOF (Waters Corporation, Milford, MA, EUA). As amostras foram dissolvidas em metanol (10 mg/mL), centrifugadas a 10.000 rpm e filtradas com filtro de 0,22 μm e 5 μL , foram injetados a uma vazão de 0,4 mL/min.

A análise cromatográfica foi realizada em uma coluna BEH C₁₈ (100 mm \times 2,1 mm, 1,7 μm , Milford, MA, EUA), e a fase móvel consistia em ácido fórmico a 0,1% (A) e acetonitrila de grau LC (B) com os seguintes perfis de gradiente: 0–2 min, 5% B; 2–14 min, 5%–98% B; 14–16 min, 98% B; e 16–20 min, 98–5% B. A análise por espectrometria de massa foi realizada com um espectrômetro de massa XEVO G2S QTOF (Waters Corporation, Milford, MA, EUA) equipado com uma fonte de ionização ESI, operado em modo negativo e positivo. A tensão capilar foi de 3,0 kV, a menor energia de colisão foi de 6 eV e a maior energia de colisão foi de 15 a 30 eV. A temperatura da fonte de íons foi de 120 °C e a

temperatura de dessolvatação foi de 450 °C. O nitrogênio foi utilizado como fonte de gás de dessolvatação (800 L·h⁻¹) e gás de cone (50 L·h⁻¹).

Para medições precisas de massa, os dados foram centralizados durante a aquisição e 200 pg·mL⁻¹ de leucina-encefalina (m/z 565,2771) (Sigma–Aldrich, Steinheim, Alemanha), dissolvido em acetonitrila/0,1% de ácido fórmico (50:50, v/v), foi infundido continuamente como uma referência externa (LockSpray™) na fonte ESI com correção automática de massa habilitada.

A aquisição de varredura completa estava na faixa de massa *m/z* 100–1000, e os dados adquiridos foram processados usando o gerenciador de aplicativos ChromaLynx™ com o software MassLynx™ 4.1 (Waters Corporation, Milford, MA, EUA). O MS² dos espectros foi comparado com a literatura e bancos de dados online como PubChem, ChemSpider e MassBank.

3.10 Análise estatística

Para a avaliação do teor de fenólicos totais e atividade antioxidante, o experimento foi arranjado em delineamento inteiramente casualizado para os nove tipos de extratos: casca do fruto (exocarpo) (USJC, AMJC, ESJC), folhas (USJF, AMJF, ESJF) e sementes (USJS, AMJS, ESJS) de Jatobá, em três repetições. O programa estatístico utilizado foi o Sistema de Análise de Variância para Dados Balanceados (Sisvar), e os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

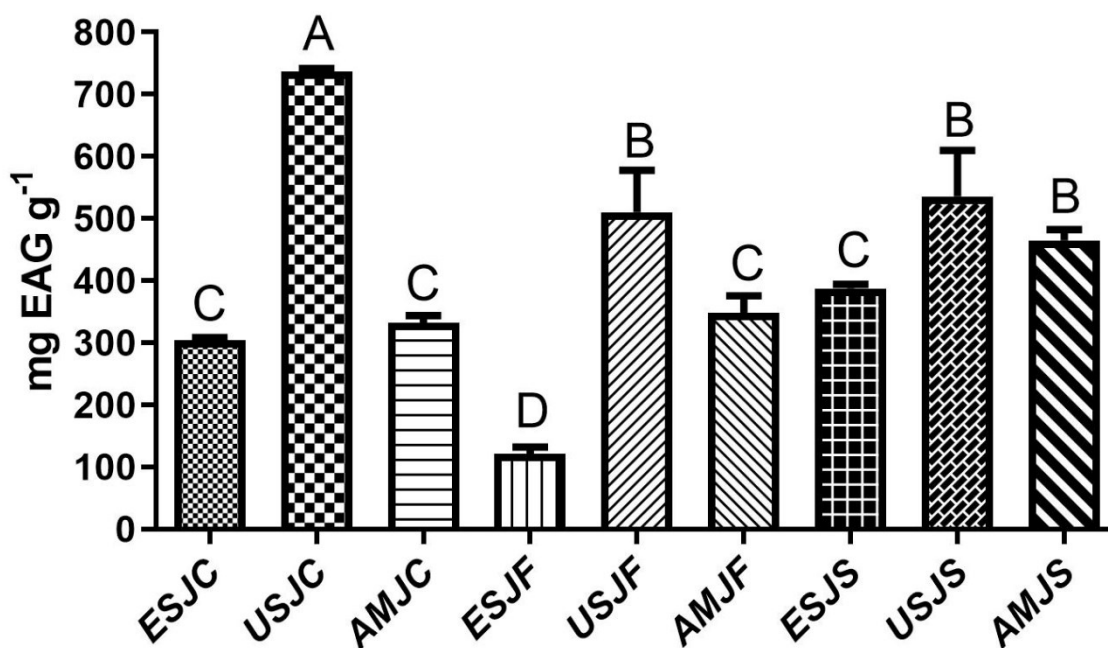
O software GraphPad Prism (v.5) foi usado para analisar os resultados do teste de antibiofilme. Médias e desvios padrão foram calculados para cada um dos tratamentos e comparados com os resultados encontrados para o grupo tratado com DMSO 5% (controle negativo; Sigma). A distribuição dos dados foi avaliada, e a comparação entre os grupos atendeu aos pressupostos da ANOVA e do teste post hoc de Tukey para comparações múltiplas. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando $p < 0,05$.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Determinação quantitativa do conteúdo de compostos fenólicos totais

Os resultados oferecem novos dados quantitativos sobre CFT da espécie *H. courbaril*, planta popularmente utilizada na região do Cerrado, uma das áreas de maior biodiversidade do mundo (Figura 2).

Figura 2 - Teor de compostos fenólicos totais dos extratos de *H. courbaril* em miligramas de equivalente de ácido gálico (mg EAG) por grama de peso seco de material vegetal.



Nota: Médias seguidas pela mesma letra, na coluna, não diferem significativamente a 5% de probabilidade pelo teste de Scott-Knott. A letra A possui maior valor estatístico, seguido pelas letras B, C e D. Os resultados são expressos como média \pm desvio padrão ($n = 3$). ESJC = Maceração Estática Casca do Fruto (Exocarpo) de Jatobá; USJC = Banho Ultrassônico Casca do Fruto (Exocarpo) de Jatobá; AMJC = Agitação Magnética Casca do Fruto (Exocarpo) de Jatobá; ESJF = Maceração Estática Folha de Jatobá; USJF = Banho Ultrassônico Folha de Jatobá; AMJF = Agitação Magnética Folha de Jatobá; ESJS = Maceração Estática Semente de Jatobá; USJS = Banho Ultrassônico Semente de Jatobá; AMJS = Agitação Magnética Semente de Jatobá.

Extratos da casca do fruto (exocarpo) de Jatobá preparados por banho de ultrassom (USJC; 736,1 mg GAE g⁻¹) apresentaram os maiores teores de CFT (Figura 2) ($p < 0,05$). Comparando esse resultado com os da literatura, Silva et al., (2019) reportaram o valor de 33,2 mg GAE g⁻¹ para CFT na casca do fruto (exocarpo) de *H. courbaril*. No trabalho de Filho; Castro. (2019), foi relatado para a casca do fruto (exocarpo) de *Hymenaea stigonocarpa* o valor de 14,1 mg EAG g⁻¹ utilizando o solvente etanol 80%. Esses menores valores de CFT obtidos nos estudos anteriores pode ser devido a diferença no local da coleta da planta, dos solventes utilizados ou do próprio método de extração.

No presente estudo uma relevante quantidade de CFT foi detectada nos extratos de Jatobá (Figura 2). Os compostos fenólicos podem ter importantes atividades terapêuticas, como considerável ação antitumoral, podendo também atuar na prevenção de doenças como doença cardiovascular, Alzheimer, Parkinson, catarata e diabetes (ROCHA et al., 2016, BARROQUEIRO et al., 2016, CAVALCANTE et al., 2016). Os compostos fenólicos demonstraram ser sequestradores altamente eficazes da maioria das moléculas oxidantes, incluindo oxigênio singlete e vários radicais livres implicados em diversas doenças (CRUZ et al., 2019, ALEXANDRE et al., 2022). Assim, os compostos fenólicos são uma importante classe de produtos naturais com possível ação antioxidante.

Atualmente, é crescente o interesse por produtos naturais com função antioxidante, ou seja, aqueles que combatem o estresse oxidativo e auxiliam no tratamento de doenças infecciosas e/ou inflamatórias. Nesse contexto, os extratos de Jatobá podem ser eficazes no combate aos radicais livres em humanos, que estariam envolvidos na gênese ou desenvolvimento de diversas doenças via estresse oxidativo (LEMOS et al., 2022).

4.2 Determinação da atividade antioxidante

4.2.1 Método de redução de complexo fosfomolibdênio

Os dados da atividade antioxidante total dos nove extratos de Jatobá determinados pelo método do fosfomolibdênio, expressos em mg EBHT g⁻¹, são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 - Valores das atividades antioxidantes totais dos extratos de *H. courbaril* pelo método do fosfomolibdênio.

Partes da Planta Medicinal Jatobá	Extratos	Complexo fosfomolibdênio mg EBHT g⁻¹	Um valor de $p < 0,05$ foi considerado significativo
Casca do Fruto	ESJC	1086,7	(B)
	USJC	1231,0	(A)
	AMJC	1218,2	(A)
Folhas	ESJF	1195,5	(A)
	USJF	1213,4	(A)
	AMJF	1135,5	(A)
Sementes	ESJS	1030,0	(B)
	USJS	1190,3	(A)
	AMJS	1218,2	(A)

Nota: Os valores médios seguidos pela mesma letra na coluna não diferem significativamente a 5% de probabilidade pelo teste de Scott-Knott. A letra A possui maior valor estatístico que a letra B. Os resultados são expressos como média \pm desvio padrão (n = 3). ESJC = Maceração Estática Casca do Fruto (Exocarpo) de Jatobá; USJC = Banho Ultrassônico Casca do Fruto (Exocarpo) de Jatobá; AMJC = Agitação Magnética Casca do Fruto (Exocarpo) de Jatobá; ESJF = Maceração Estática Folha de Jatobá; USJF = Banho Ultrassônico Folha de Jatobá; AMJF = Agitação Magnética Folha de Jatobá; ESJS = Maceração Estática Semente de Jatobá; USJS = Banho Ultrassônico Semente de Jatobá; AMJS = Agitação Magnética Semente de Jatobá.

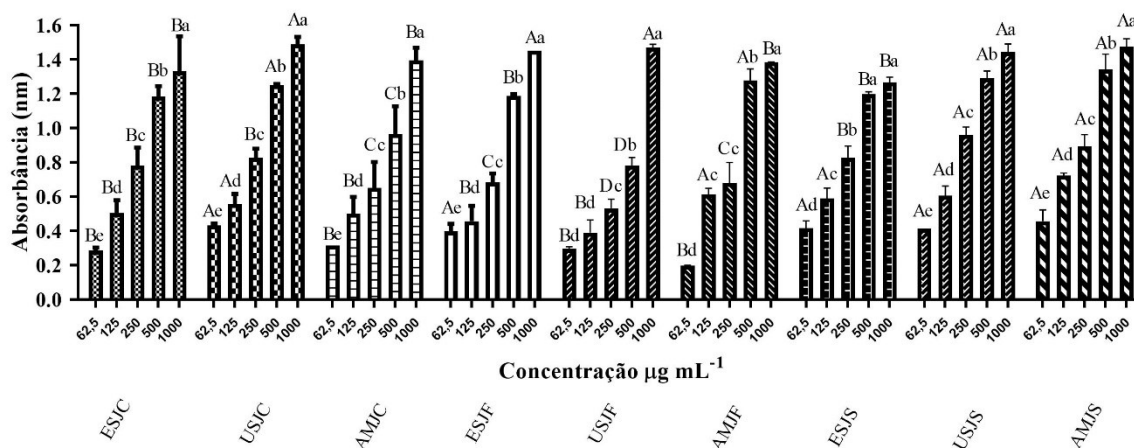
Pode-se afirmar que os extratos das folhas de Jatobá apresentaram relevante capacidade antioxidante total, obtendo valores de 1213,0, 1195,5 e 1135,5 mg EBHT g⁻¹, nos três processos de extração, todos estatisticamente semelhantes (A). Por outro lado, os extratos da semente ESJS (1030,0 mg EBHT g⁻¹) e da casca do fruto ESJC (1086,7 mg EBHT g⁻¹) apresentaram valores estatisticamente (B) inferiores. Isso indica que as folhas dessa espécie podem ser consideradas uma importante fonte de compostos com ação antioxidante, o que as torna potencialmente úteis na nutrição e para fins farmacêuticos.

Estudos realizados com outras espécies vegetais mostraram uma correlação positiva entre o conteúdo de compostos fenólicos da planta e as propriedades antioxidantes (ALEXANDRE et al., 2022; CRUZ et al., 2019). Esta é

a mesma classe química presente nos extratos avaliados em nosso estudo, o que sugere que a ação antioxidante pode estar relacionada ao teor de fenólicos nesta espécie. Os compostos fenólicos atuam como antioxidantes não apenas por causa de sua capacidade de doar hidrogênio ou elétrons, assim quelando metais, mas também por causa de seus radicais intermediários estáveis, que evitar oxidação (CRUZ et al., 2019).

Nota-se na Figura 3 que os extratos testados possuem atividade antioxidante e que a porcentagem foi dose-dependente, ou seja, conforme aumentava a concentração, obtinha-se maior atividade antioxidante. Semelhante ao que foi encontrado neste estudo, outros estudos mostraram que plantas do gênero *Hymenaea* possuem capacidade antioxidante interessante. Maranhão e colaboradores (2013) mostraram que o flavonol quercetina previamente identificado no extrato do cerne de *H. stignocarpa* revelou efeitos antioxidantes promissores pelo método do DPPH com (IC_{50} : 9,95 μ /ml), comparado ao ácido ascórbico (IC_{50} : 7,38 μ g/ml) como controle positivo.

Figura 3 - Poder redutor do complexo fosfomolibdênio dos extratos de Jatobá selecionados.



Nota: Resultados expressos como média \pm desvio padrão (n = 3) nas concentrações de 62,5–1000 μ g/mL⁻¹. Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente a 5% de probabilidade pelo método de Scott-Knott. Letras maiúsculas são usadas para comparar a concentração entre os extratos e minúsculas para comparar a concentração dentro de cada extrato. ESJC = Maceração Estática Casca do Fruto (Exocarpo) de Jatobá; USJC = Banho Ultrassônico Casca do Fruto (Exocarpo) de Jatobá; AMJC = Agitação Magnética Casca do Fruto (Exocarpo) de Jatobá; ESJF = Maceração Estática Folha de Jatobá; USJF = Banho Ultrassônico Folha de Jatobá; AMJF = Agitação Magnética Folha de Jatobá; ESJS = Maceração Estática Semente de Jatobá; USJS = Banho Ultrassônico Semente de Jatobá; AMJS = Agitação Magnética Semente de Jatobá.

As farmacoterapias ideais são aquelas que são eficazes na menor dose possível (PICCOLO et al., 2015). Os achados do presente estudo demonstraram que na menor concentração testada de 62,5 $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$, todos os extratos da semente de Jatobá (ESJS, USJS e AMJS) possuem metabólitos com atividade sequestradora de radicais livres e antioxidante, com valores de absorvância estatisticamente semelhantes (nm) (A) ($p < 0,05$) (Figura 3). Corroborando com esses resultados, Linsbinski, Simões; Fernandes et al. (2020) avaliaram a atividade antioxidante do extrato metanólico de sementes de *H. courbaril* pelo método DPPH (capacidade de eliminação de radicais livres). O extrato mostrou-se promissor com valores de CE_{50} de 72,1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, comparado ao padrão ácido ascórbico (CE_{50} de 36,2 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Além disso, foi demonstrado alta porcentagem de atividade antioxidante (96,1%AA) comparado ao padrão ácido ascórbico (93,5%AA) e relevante quantidade de compostos fenólicos totais (552,3 mg EAG g^{-1}), mesma classe química presente em abundância nos extratos avaliados em nosso estudo, que possui grande capacidade de doar elétrons para o complexo fosfomolibdênio e estabilizá-lo.

4.2.2 Ensaio de poder antioxidante de redução férrica

A Tabela 2 apresenta os dados da atividade antioxidante total dos nove extratos de Jatobá determinada pelo método do poder redutor, expressa em mg EBHT g^{-1} .

Tabela 2 - Valores das atividades antioxidantes totais dos extratos de *H. courbaril* pelo método do poder redutor.

Partes da Planta Medicinal Jatobá	Extratos	Potência Redutora mg EBHT g⁻¹	Um valor de $p < 0,05$ foi considerado significativo
Casca do Fruto	ESJC	636,7	(B)
	USJC	708,1	(B)
	AMJC	617,2	(B)
Folhas	ESJF	418,1	(B)
	USJF	620,0	(B)
	AMJF	834,3	(A)
Sementes	ESJS	721,0	(B)
	USJS	802,0	(A)
	AMJS	659,6	(B)

Nota: Os valores médios seguidos pela mesma letra na coluna não diferem significativamente a 5% de probabilidade pelo teste de Scott-Knott. A letra A possui maior valor estatístico que a letra B. Os resultados são expressos como média \pm desvio padrão ($n = 3$). ESJC = Maceração Estática Casca do Fruto (Exocarpo) de Jatobá; USJC = Banho Ultrassônico Casca do Fruto (Exocarpo) de Jatobá; AMJC = Agitação Magnética Casca do Fruto (Exocarpo) de Jatobá; ESJF = Maceração Estática Folha de Jatobá; USJF = Banho Ultrassônico Folha de Jatobá; AMJF = Agitação Magnética Folha de Jatobá; ESJS = Maceração Estática Semente de Jatobá; USJS = Banho Ultrassônico Semente de Jatobá; AMJS = Agitação Magnética Semente de Jatobá.

Com base nos dados acima, observou-se que os extratos AMJF e USJS destacaram-se com relevante potencial redutor de Fe^{3+} , respectivamente, com valores de 834,3 e 802,0 mg EBHT g⁻¹, ambos estatisticamente semelhante (A) ($p < 0,05$). Os valores encontrados mostraram que as folhas e sementes de *H. courbaril* são órgãos vegetais importantes para o armazenamento de metabólitos secundários com potencial antioxidante. As folhas de jatobá são conhecidas por seus constituintes químicos significativos, incluindo flavonoides como astilbina, epicatequina e compostos fenólicos (BONIFACE et al., 2017). Em estudo de Simões et al. (2009), as biscumarinas ipomopsina e himenaína isoladas das sementes de *H. courbaril* mostraram alta atividade antioxidante pelo método

DPPH. Os valores de CE_{50} foram de 100 e 300 μM para ipomopsina e himenafina, respectivamente em comparação com catequina (7 μM) e quercetina (6 μM).

Observa-se na Tabela 2 que a agitação magnética foi mais eficiente na extração dos antioxidantes presentes nas folhas de Jatobá AMJF (834,3 mg EBHT g^{-1}) com valor estatisticamente superior ($p < 0,05$) (A). Isso pode ser devido a agitação magnética promover uma mistura homogênea e extração mais rápida (SARKER et al., 2007). O uso da temperatura ambiente também é uma vantagem da agitação magnética, pois a degradação de metabólitos termolábeis é menos provável à temperatura ambiente.

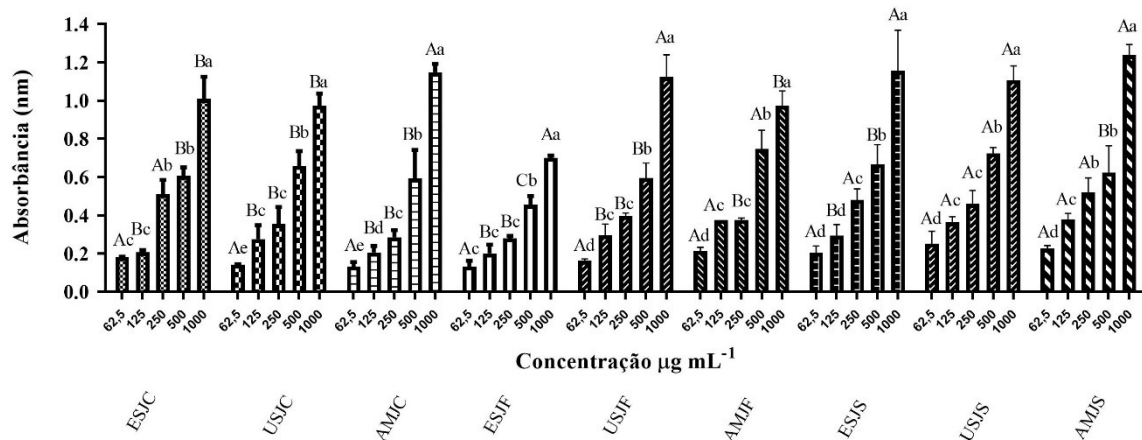
No entanto, o banho ultrassônico foi mais eficiente para a extração de compostos bioativos com função antioxidante no extrato das sementes USJS (802,0 mg EBHT g^{-1}) com valor estatisticamente superior ($p < 0,05$) (A), o que pode ser explicado pela maior indução de estresse na semente, que sabidamente possuem maior resistência mecânica. Foi demonstrado que o banho ultrassônico causa cavitações e estresse mecânico nas células, aumentando a capacidade de transferência de massa e ruptura celular (SARKER et al., 2007), o que permite um melhor resultado de extração devido à passagem de compostos para o solvente.

Por outro lado, os extratos da casca do fruto (exocarpo) ESJC, USJC e AMJC, com os valores, respectivamente, 636,7, 708,1 e 617,2 mg EBHT g^{-1} apresentaram valores estatisticamente semelhantes (B) ($p < 0,05$), nos três processos de extração. Ou seja, a eficiência na extração dos antioxidantes presentes na casca do fruto (exocarpo) de *H. courbaril* é a mesma se for utilizado maceração estática, agitação magnética ou banho ultrassônico.

Portanto, a eficiência do método de extração utilizado para obtenção de compostos antioxidantes é relativa, ou seja, depende de qual amostra foi utilizada; se forem utilizadas folhas, a agitação magnética é mais eficiente, se forem sementes, o banho ultrassônico garante melhor extração, e se forem casca do fruto (exocarpo) não há diferença quanto ao método utilizado.

Os achados mostraram que os valores de absorvância (nm) aumentaram ligeiramente para concentrações variando de 62,5 a 500 $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$ e depois aumentaram bruscamente na concentração de 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$ (Figura 4).

Figura 4 - Poder antioxidante redutor férrico (Fe^{+3}) dos extratos de *H. courbaril* selecionados.



Nota: Resultados expressos como média \pm desvio padrão ($n = 3$) nas concentrações de 62,5–1000 $\mu\text{g/mL}^{-1}$. Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente a 5% de probabilidade pelo método de Scott-Knott. Letras maiúsculas são usadas para comparar a concentração entre os extratos e minúsculas para comparar a concentração dentro de cada extrato. ESJC = Maceração Estática Casca do Fruto (Exocarpo) de Jatobá; USJC = Banho Ultrassônico Casca do Fruto (Exocarpo) de Jatobá; AMJC = Agitação Magnética Casca do Fruto (Exocarpo) de Jatobá; ESJF = Maceração Estática Folha de Jatobá; USJF = Banho Ultrassônico Folha de Jatobá; AMJF = Agitação Magnética Folha de Jatobá; ESJS = Maceração Estática Semente de Jatobá; USJS = Banho Ultrassônico Semente de Jatobá; AMJS = Agitação Magnética Semente de Jatobá.

As farmacoterapias ideais são aquelas que são eficazes na menor dose possível (PICCOLO et al., 2015). Os achados do presente estudo demonstraram que na menor concentração testada de 62,5 $\mu\text{g/mL}^{-1}$, todos os extratos de Jatobá possuem atividade sequestradora de radicais livres e antioxidante, com valores de absorvância estatisticamente semelhantes (nm) (A) ($p < 0,05$) (Figura 3). Esses resultados podem ser explicados pela considerável concentração de compostos fenólicos totais nos extratos de Jatobá, mesma classe química presente em abundância nos extratos avaliados em nosso estudo, que possui grande capacidade de doar elétrons para o radical Fe^{+3} e estabilizá-lo.

A atividade antioxidante dos extratos vegetais nos dois testes realizados, fosfomolibdênio e poder redutor Fe^{+3} , não foi estatisticamente semelhante, o coeficiente de correlação de Pearson apresentou baixa correlação ($\rho = -0,24$), o que era esperado, pois o teste do fosfomolibdênio pode estar relacionado com a determinação de uma mistura complexa de componentes químicos com sinergismo entre eles (PRIOR et al., 2005). A técnica de poder redutor Fe^{+3}

envolve a transferência de elétrons, que é um importante mecanismo de ação dos antioxidantes fenólicos (DORMAN et al., 2003).

Assim, a descoberta de novas plantas medicinais que possam ser utilizadas como antioxidantes é de grande importância, uma vez que há um interesse crescente na substituição de antioxidantes sintéticos por naturais devido às suas implicações para a saúde e funcionalidade (OLIVEIRA, 2010). Portanto, os extratos de Jatobá analisados em nosso estudo podem ser considerados uma fonte potencial de novos compostos terapêuticos que podem ter potencial antioxidante e combater processos patológicos causados por bactérias.

4.3 Teste de suscetibilidade à ação antimicrobiana de extratos vegetais

4.3.1 Método de difusão em disco

Na determinação da atividade antibacteriana, os nove extratos vegetais brutos de Jatobá foram testados em uma concentração de 500 mg/mL contra a cepa gram-positiva *S. aureus* (ATCC 25923).

Para determinar se os extratos possuem ou não atividade antimicrobiana, utilizou-se os critérios recomendados nos experimentos realizados por Almeida Alves et al., (2000), os resultados foram expressos em termos do diâmetro da zona de inibição: <9 mm é resistente (R); de 9 mm a 12 mm é intermediário (I); e >12 mm é sensível (S) (Tabela 3).

Tabela 3 - Valores das zonas de inibição do crescimento bacteriano (mm) de extratos de Jatobá e antibióticos correspondentes contra a cepa de *S. aureus* (ATCC25923)

Partes da Planta Medicinal Jatobá	Extratos	Microrganismo
	500 mg/ml	<i>S. aureus</i> (ATCC 25923)
		Resultado da atividade antimicrobiana (mm)
Casca do Fruto	ESJC ^A	(S) 16 ± 0,6
	USJC ^B	(S) 16 ± 3,6
	AMJC ^C	(S) 13 ± 0,6
Folhas	ESJF ^D	(S) 15 ± 2,5
	USJF ^E	(S) 17 ± 2,0
	AMJF ^F	(S) 16 ± 1,2
Sementes	ESJS ^G	(S) 14 ± 1,0
	USJS ^H	(S) 15 ± 1,5
	AMJS ^I	(S) 15 ± 2,5
	Eritromicina µg ^J	(S) 27 ± 0,4
	DMSO 5% ^K	R
	H ₂ O ^L	R

Nota: Médias das zonas de inibição obtidas em milímetros do teste de disco difusão. S = Sensível, R = Resistente. Os dados são apresentados como média ± desvio padrão das análises em triplicata. ESJC (**A**) = Maceração Estática Casca do Fruto (Exocarpo) de Jatobá; USJC (**B**) = Banho Ultrassônico Casca do Fruto (Exocarpo) de Jatobá; AMJC (**C**) = Agitação Magnética Casca do Fruto (Exocarpo) de Jatobá; ESJF (**D**) = Maceração Estática Folha de Jatobá; USJF (**E**) = Banho Ultrassônico Folha de Jatobá; AMJF (**F**) = Agitação Magnética Folha de Jatobá; ESJS (**G**) = Maceração Estática Semente de Jatobá; USJS (**H**) = Banho Ultrassônico Semente de Jatobá; AMJS (**I**) = Agitação Magnética Semente de Jatobá; (**J**) = Controle positivo para *S. aureus*; (**K,L**) = controles negativos.

De acordo com os parâmetros descritos em trabalho anterior de Almeida Alves et al., (2000), dentre os extratos ativos, aquele que apresentou o maior halo de inibição foi USJF (17 mm). Tal atividade foi observada contra a cepa bacteriana gram-positiva *S. aureus* (ATCC 25923), um achado significativo quando se considera que esse é um dos principais patógenos humanos e muitas

vezes resistente a uma variedade de antibióticos conhecidos. Além disso, essa bactéria causa um amplo espectro de infecções, variando de simples infecções cutâneas até infecções graves como endocardite, pneumonia e sepse (ASKARINIA et al., 2019, TURNER et al., 2019).

Neste estudo, os extratos da casca do fruto (exocarpo) de Jatobá (*H. courbaril*), apresentaram ação antibiótica contra a cepa *S. aureus* (ATCC 25923), com halo de inibição variando de 13-16 mm. Esses resultados estão de acordo com os revelados em um estudo anterior (FERNANDES et al., 2007) que relataram a ação antibacteriana do extrato hidroetanólico (EHE) 70% da casca interna de *H. courbaril* contra o microrganismo *S. aureus* (ATCC 10495), com halo de inibição de 15 milímetros, e nenhuma atividade antibiótica contra *Escherichia coli* (ATCC 8973), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) e *Enterobacter cloacae* (FT 502), que, segundo os autores, podem ser relacionado a menor suscetibilidade de bactérias gram-negativas a extratos vegetais.

O método de disco-difusão em ágar é amplamente utilizado, pela facilidade de aplicação, custo-benefício, simplicidade e rapidez na interpretação dos resultados. Porém, não é indicado para determinação da CIM, devido a fatores que interferem na difusão dos compostos no meio de cultura, como espessura do ágar, volume aplicado e propriedades físico-químicas das amostras analisadas (KLANCNIK et al., 2010; BALOUIRI; SADIKI; IBNSOUDA, 2016). Dessa forma, permite apenas uma triagem da atividade de produtos naturais, direcionando as análises para determinação da CIM.

Na espécie *H. courbaril*, existe uma grande variedade de agentes antimicrobianos, incluindo fenólico e compostos flavonoides. Catequina e diidrocaempferol-glicosídeo foram reportados na casca desta planta, enquanto astilbina e epicatequina foram encontrados nas folhas (BONIFACE et al., 2017). Flavonoides (compostos fenólicos) são responsáveis pela pigmentação em plantas e possuem atividade antimicrobiana, cujo mecanismo de ação se deve à capacidade do composto de formar complexos com a parede celular bacteriana (TSUCHIYA et al., 1996).

Espécies do gênero *Hymenaea* são utilizadas na fitoterapia popular e se mostraram recursos valiosos, como fontes de diversos metabólitos secundários biologicamente ativos. Os resultados do nosso estudo confirmam a proposta de

uso etnomedicinal desta planta, justificando seu uso medicinal empírico em indicações para o tratamento de infecções causado por *S. aureus*. Assim, considerando que os extratos de Jatobá apresentaram atividades biológicas promissoras no teste de difusão em ágar, é importante conhecer a menor concentração capaz de inibir o crescimento bacteriano.

4.3.2 Análise pelo método de micro diluição em caldo

De acordo com os parâmetros descritos em estudo anterior (CHAVASCO et al., 2014), produtos vegetais com atividade antimicrobiana em concentrações inibitórias mínimas (CIM) inferiores a 100 mg/mL são considerados relevantes para a pesquisa de substâncias com aplicações terapêuticas. Assim, os resultados obtidos em nosso estudo (Tabela 4) para os extratos da casca do fruto (exocarpo) e folhas de Jatobá (1,56–12,5 mg/mL) demonstram atividade contra *S. aureus* em concentrações inferiores a 100 mg/mL. Portanto, há potencial para obtenção de antimicrobianos utilizando extratos dessa planta como matéria-prima.

Tabela 4 - Valores de concentração inibitória mínima (CIM) dos extratos de *H. courbaril* e antibióticos correspondentes contra a cepa de *S. aureus* (ATCC25923).

Partes da Planta Medicinal Jatobá	Extratos	Microrganismo
		<i>S. aureus</i> (ATCC 25923) Concentração Inibitória Mínima (mg/mL)
Casca do Fruto	ESJC ^A	12,5
	USJC ^B	12,5
	AMJC ^C	12,5
Folhas	ESJF ^D	1,56
	USJF ^E	1,56
	AMJF ^F	3,12
Sementes	ESJS ^G	S/A ^M
	USJS ^H	S/A
	AMJS ^I	S/A
	Cloranfenicol ^J	32,0 ± 0,4 µg/mL
	DMSO 5% ^K	S/A
	H ₂ O ^L	S/A

Nota: ESJC (**A**) = Maceração Estática Casca do Fruto (Exocarpo) de Jatobá; USJC (**B**) = Banho Ultrassônico Casca do Fruto (Exocarpo) de Jatobá; AMJC (**C**) = Agitação Magnética Casca do Fruto (Exocarpo) de Jatobá; ESJF (**D**) = Maceração Estática Folha de Jatobá; USJF (**E**) = Banho Ultrassônico Folha de Jatobá; AMJF (**F**) = Agitação Magnética Folha de Jatobá; ESJS (**G**) = Maceração Estática Semente de Jatobá; USJS (**H**) = Banho Ultrassônico Semente de Jatobá; AMJS (**I**) = Agitação Magnética Semente de Jatobá; (**J**) = Controle positivo para *S. aureus*; (**K,L**) = controles negativos; S/A (**M**) = não houve atividade.

Os resultados apresentados nesta técnica mostraram que os extratos das folhas são melhores inibidores do que os extratos da casca do fruto (exocarpo), com CIM de 1,56 mg/mL e 12,5 mg/mL, respectivamente. Isso indica o potencial das folhas de *H. courbaril* como um potente agente antibacteriano. Portanto, o conhecimento tradicional pode ser um passo útil para o desenvolvimento de novos medicamentos que sejam eficazes contra patógenos clinicamente relevantes, como o *S. aureus*. Na medicinal tradicional, a infusão das folhas de

Jatobá é usada como tratamento para bronquite (especialmente em crianças), fraturas, feridas e problemas pulmonares (BONIFACE et al. 2017). A atividade antibacteriana das folhas de jatobá apresentada neste estudo e indicada na literatura sugere que o uso popular e as recomendações medicinais empíricas dessa planta para o tratamento de infecções são justificados.

A atividade antimicrobiana contra bactérias gram-positivas é mais comumente verificada porque esses organismos são mais sensíveis aos metabólitos vegetais. A estrutura da parede celular da espécie gram-positiva *S. aureus* é menos complexa do que a dos microrganismos gram-negativos, o que significa que muitos antibióticos, desinfetantes e antissépticos podem penetrá-la (LAMBERT, 2005).

A atividade antibacteriana de *H. courbaril* verificada contra a cepa de *S. aureus* ATCC 25923 pode ser correlacionada com a composição química do extrato quanto aos grupos funcionais e estrutura química dos componentes. Em um estudo previamente conduzido (COSTA et al., 2014), os metabólitos desta planta mostraram a presença do flavonoide fisetina como o composto majoritário que mostrou reconhecidas propriedades antimicrobianas.

Em um estudo anterior, os extratos de seis plantas medicinais que ocorrem no Cerrado, Boldo (*Peumus boldus*), Goiaba (*Psidium guajava*), Assa-Peixe (*Vernonia polysphaera*), Abacate (*Persia americana*), Bálsamo (*Jatrofa multifida*), e Eucalipto (*Eucalipto citriodora*), apresentaram inibição contra *S. aureus* com CIM variando de 3,12 a 12,5 mg/mL (CRUZ et al., 2019). Os autores atribuíram esse efeito aos compostos fenólicos presentes nos extratos vegetais. A mesma classe de metabólitos secundários presentes em abundância nos extratos avaliado em nosso estudo.

Por outro lado, os extratos das sementes de Jatobá não apresentaram atividade antimicrobiana contra *S. aureus* (ATCC 25923). Isso pode ser explicado pelo fato do solvente utilizado (etanol 96%) não ter sido capaz de extrair adequadamente os compostos bioativos das sementes de Jatobá, ou porque os fitoconstituintes das sementes desta planta são incapazes de penetrar a barreira natural da parede celular da bactéria *S. aureus*.

Estudos etnofarmacológicos são de grande valor na busca por novas substâncias com potencial terapêutico (RAZA, 2006). O estudo da atividade

antimicrobiana *in vitro* dos extratos vegetais testados está de acordo com seu uso etnomedicinal, que tem sido uma importante ferramenta na descoberta de novos medicamentos. Os resultados apresentados são significativos, pois a bactéria *S. aureus* está entre os principais agentes causadores de infecções relacionadas a assistência à saúde, como infecções de sítio cirúrgico, pneumonia e bacteremia (TONG et al., 2015).

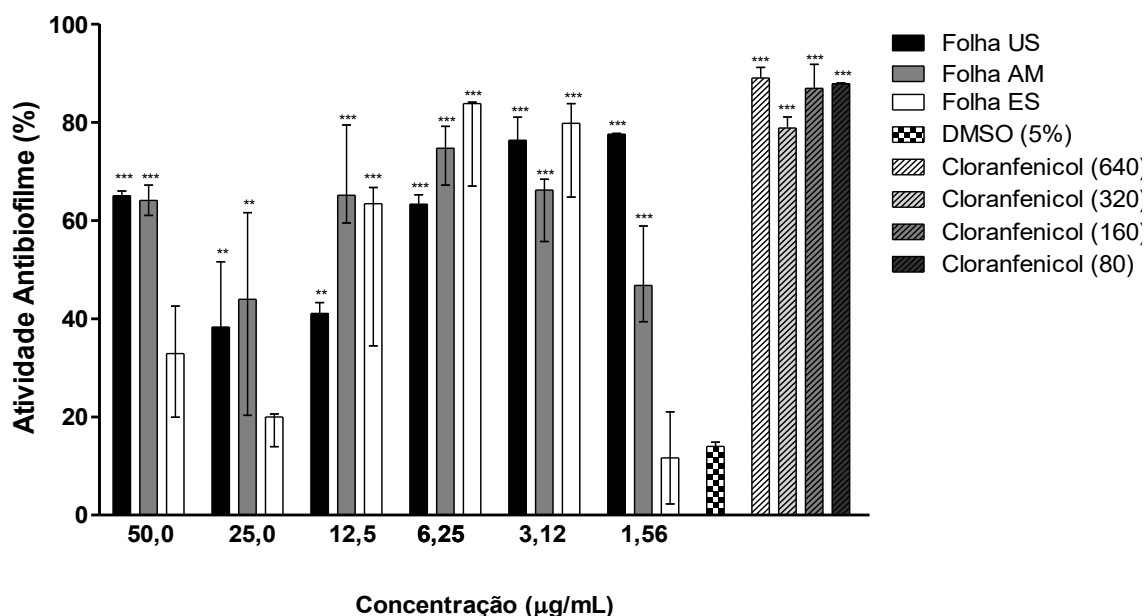
Assim, considerando que os extratos das folhas de Jatobá apresentaram atividades biológicas promissoras no teste de CIM, é importante conhecer a capacidade antibiofilme desses extratos contra *S. aureus*. As infecções causadas por *S. aureus* produtor de biofilme são difíceis de tratar pelos antibióticos convencionais e atualmente há uma necessidade urgente de terapias novas e eficazes (JARA et al., 2021, SCHILCHER; HORSWILL, 2020).

4.3.3 Atividade antibiofilme contra *S. aureus*

Com os resultados do teste de CIM, os extratos mais promissores que apresentaram atividade antibacteriana com CIM igual ou inferior a 3,12 mg/mL para *S. aureus* (ATCC 25923) foram submetidos à determinação da atividade antibiofilme (Figura 5). Concentrações de extratos etanólicos preparados a partir das folhas, variando de 50 mg/mL a 1,56 mg/mL, foram inoculadas em biofilmes de *S. aureus*, e sua atividade foi avaliada pelo ensaio colorimétrico MTT.

Dentre os extratos testados, o extrato da folha de Jatobá ES na concentração de 6,25 mg/mL apresentou a maior atividade antibiofilme (78,29%) contra *S. aureus*. O resultado do antibiofilme demonstrado *in vitro* foi estatisticamente semelhante ao do antimicrobiano padrão cloranfenicol (efeito inibitório de 78,85%) ($p < 0,001$). Além disso, deve-se notar que a revisão de literatura não revelou estudos anteriores sobre as atividades antibiofilme dos extratos de folhas de *H. courbaril* (Jatobá) contra *S. aureus*. Assim, os achados do presente estudo são os primeiros desse tipo a serem relatados na literatura.

Figura 5 - Atividade de diferentes concentrações dos extratos de Jatobá contra o biofilme de *S. aureus* (ATCC25923).



Nota: A atividade do antibiofilme foi calculada em porcentagem, comparando os resultados absorbância (A560) de células tratadas com células não tratadas. Os valores médios para cada um dos tratamentos foram comparados aos valores médios do tratamento com DMSO 5% (controle negativo). Os asteriscos significam diferença estatísticas (**p<0,01; ***p<0,001). (US) Banho Ultrassônico; (AM) Agitação Magnética; (ES) Maceração Estática.

A investigação fitoquímica revelou que compostos fenólicos estavam presentes em altas concentrações no extrato de USJF (510,6 mg GAE g⁻¹) de *H. courbaril*. Esta observação pode explicar a atividade antibiofilme encontrada contra a cepa de *S. aureus*, uma vez que os fenóis são um dos principais grupos de fitoconstituintes naturalmente presentes em plantas que possuem boas propriedades antimicrobianas (LEMOS et al., 2022). Os mecanismos responsáveis pela toxicidade fenólica aos microrganismos incluem a inibição enzimática, possivelmente através da reação com grupos sulfidríla ou através de interações mais inespecíficas com proteínas de membrana (COWAN 1999).

Além disso, pesquisas anteriores (FUQUA et al., 1994) sugeriram que fitoquímicos presentes em plantas medicinais suprimem a expressão de genes responsáveis pela patogenicidade bacteriana, interferindo na formação do

biofilme. No entanto, os extratos vegetais compreendem muitos componentes e espera-se que seus mecanismos de ação envolvam múltiplos alvos nas células bacterianas, em vez de um único mecanismo (WIJESUNDARA; VASANTHA RUPASINGHE 2019). Portanto, acreditamos que a ação bactericida observada em nosso estudo contra a cepa de *S. aureus* deve-se ao sinergismo com os fitoquímicos das folhas de Jatobá, principalmente, a classe dos fenólicos totais.

Muitos extratos hidroetanólicos (EHE), como Pimenta Nepal (KHAN et al., 2018), e Alecrim (QUAVE et al., 2008) são eficazes na remoção de biofilme. Em geral, o EHE se difunde através da matriz polissacarídica do biofilme pré-formado e o desestabiliza devido à maior atividade antimicrobiana intrínseca (GENOVESE et al., 2021).

Os resultados aqui obtidos sugerem fortemente que existem componentes com atividade antibacteriana nos extratos brutos das folhas de Jatobá, o que se faz provavelmente por seus constituintes, principalmente devido aos compostos fenólicos totais encontrados nesta espécie vegetal.

A formação de biofilme é um importante fator associado à resistência, o que dificulta a erradicação de infecções microbianas. Notavelmente, compostos com características de dispersão de biofilme são raros. A necessidade de novos e eficientes agentes antibiofilme para superar este problema é sentida mais do que nunca, pois eles poderiam ser usados em terapia combinada com antibióticos tradicionais (NARMANI et al., 2019). Assim, a descoberta de compostos com alta atividade contra *S. aureus* formadores de biofilme podem levar a melhores ferramentas para combater este problema global.

4.4 Análise UPLC-HRMS/MS dos extratos de *H. courbaril*

Neste estudo, os três extratos das folhas de Jatobá (ESJF, AMJF e USJF) exibiram bons resultados de atividade inibitória de biofilme contra *S. aureus*, respectivamente, 78,29%, 71,49% e 73,68%, todos estatisticamente semelhantes ao do cloranfenicol (78,85%; $p < 0,001$), e, portanto, foram selecionados para análise do perfil químico. Por meio da análise UPLC-HRMS/MS dos extratos

ESJF, AMJF e USJF, foi possível obter o perfil químico detalhado e anotar as substâncias em *H. courbaril*, principalmente flavonoides (Tabela 5).

Tabela 5 - Dados de UPLC-HRMS/MS de compostos anotados em extratos de *H. courbaril*.

R_t(min)	[M-H]⁻ (m/z)	[M+H]⁺ (m/z)	Fórmula molecular	MS/MS (MS²)	Compostos propostos
ESJF^a					
0,60	341.0149	-	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	179.0089	Sacarose (1)
		-		161.0020, 149.0117, 142.9959, 131.0033, 119.0040, 100.9987, 89.0012, 70.9955	Hexose (2)
0,60	179.0089		C ₆ H ₁₂ O ₆	299.9359	
5.27	607.9508	-	C ₂₈ H ₃₂ O ₁₅		Crisoeriol-7-O- rutinosídeo (3) ou Crisoeriol-7-O- neohesperidosídeo (4)
5.28	609.9561	-	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	301.9397	Rutina (5)
5.62	593.0129	-	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	285.9650	Kaempferol-3-O- rutinosídeo (6)
5.68	623.0092	-	C ₂₈ H ₃₂ O ₁₆	315.9617	Isorhamnetina-3- O-rutinosídeo (7)
5,78	477.9869	-	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₂	315.9658, 299.9429,	Isorhamnetina-3- O-glicosídeo (8)

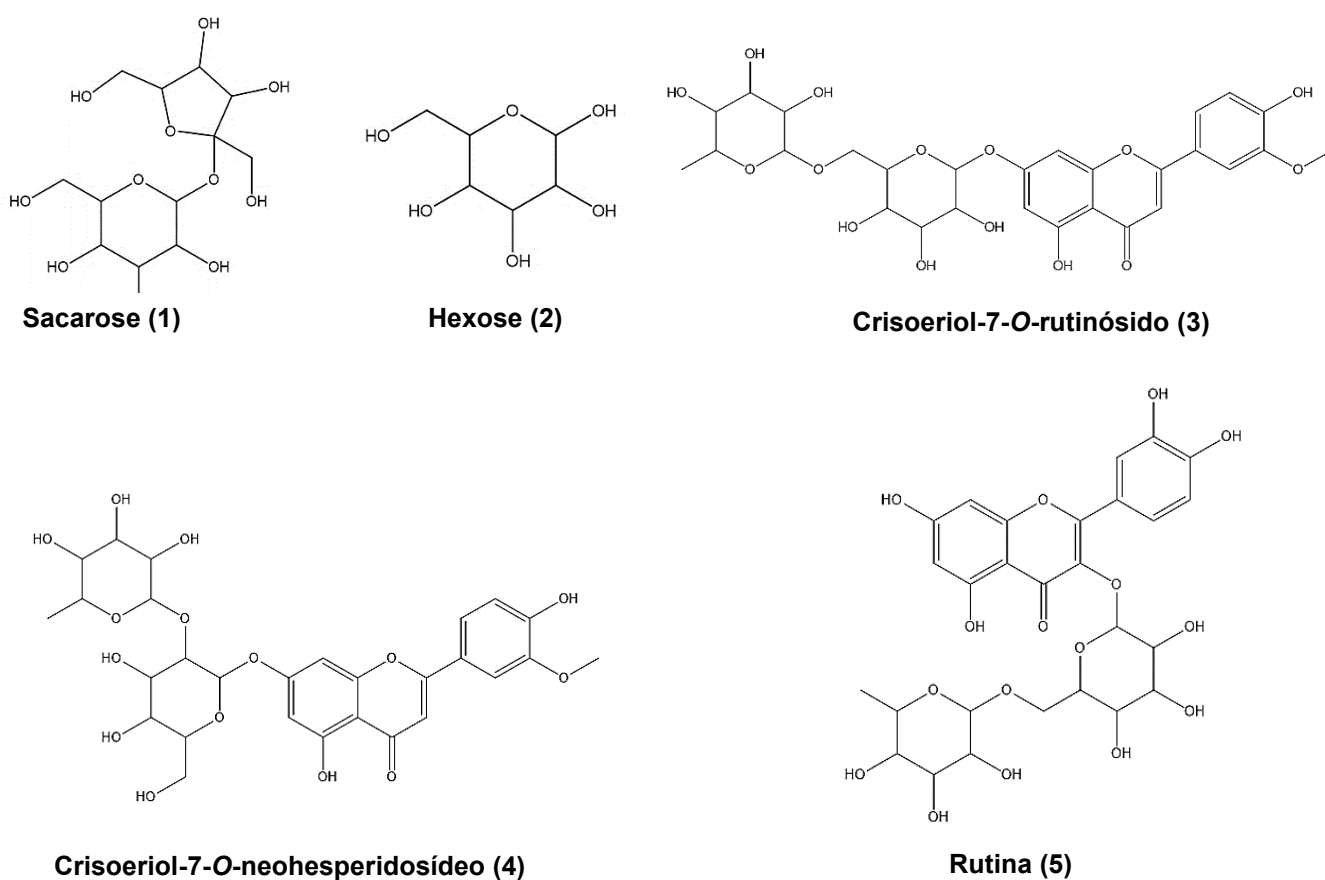
				270.9479	
7.38	313.9497	-	C ₁₇ H ₁₄ O ₆	298.9301, 270.9445	Crisoeriol-5-metil éter (9)
7.38	329.9728	-	C ₁₇ H ₁₄ O ₇	314.9513, 299.9359	3,7-Di-O- metilquercetina (10)
8.37	317.1195	-	C ₁₅ H ₁₀ O ₈	289.1298	Miricetina (11)
14.19	633.3182	-	C ₂₈ H ₂₆ O ₁₇	305.1683	Epigalocatequina- 3-O-galato-3'-O- glucuronídeo (12)
5.37	-	633,7400 [M+Na] ⁺	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	465.5418, 303.3375	Rutina (5)
5.49	-	487,5446 [M+Na] ⁺	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	303.3339	Quercetina-3-O- glicosídeo (13)
5.74	-	317.3806	C ₁₆ H ₁₂ O ₇	302.3412	Isorhamnetina (14)
USJF^b					
0,60	341.0376	-	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	179.0199	Sacarose (1)
0,60	179.0199	-	C ₆ H ₁₂ O ₆	161.0124, 149.0217, 143.0057, 131.0127, 119.0107, 101.0049, 89.0070, 71.0007	Hexose (2)
5.26	607.9912	-	C ₂₈ H ₃₂ O ₁₅	299.9536	Crisoeriol-7-O- rutinosídeo (3) ou Crisoeriol-7-O- neohesperidosídeo (4)
5.26	609.9966	-	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	301.9610	Rutina (5)

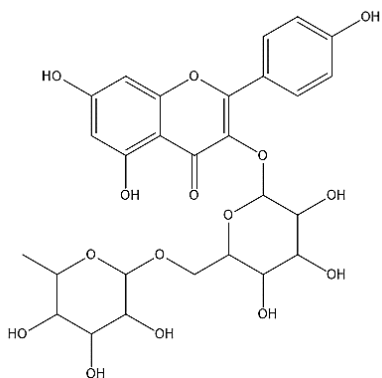
5.67	623.0296	-	C ₂₈ H ₃₂ O ₁₆	315.9726	Isorhamnetina-3-O-rutinósido (7)
6.71	285.9754	-	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	150.9716, 132.9994	Luteolina (15)
7.38	313.9642	-	C ₁₇ H ₁₄ O ₆	298.9443, 270.9580	Crisoeriol-5-metil éter (9)
7.38	329.9876	-	C ₁₇ H ₁₄ O ₇	314.9695, 299.9500	3,7-Di-O-metilquercetina (10)
5.28	-	633,1422 [M+Na] ⁺	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	465.1071, 303.0519	Rutina (5)
5.40	-	487.0886 [M+Na] ⁺	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	303.0519	Quercetina-3-O-glicosídeo (13)
5.67	-	317.0632	C ₁₆ H ₁₂ O ₇	302.0388	Isorhamnetina (14)
AMJF^c					
0,60	341.0451	-	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	179.0253	Sacarose (1)
0,60	179.0253	-	C ₆ H ₁₂ O ₆	161.0176, 143.0105, 131.0150, 119.0151, 101.0069, 89.0090, 71.0024	Hexose (2)
5.28	609.0568	-	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	301.9893	Rutina (5)
5.67	623.1573	-	C ₂₈ H ₃₂ O ₁₆	315.0493	Isorhamnetina-3-O-rutinósido (7)
7.39	329.0812	-	C ₁₇ H ₁₄ O ₇	314.0585, 299.0328	3,7-Di-O-metilquercetina (10)
14.18	633.5037	-	C ₂₈ H ₂₆ O ₁₇	305.2577	Epigallocatequina-3-O-galato-3'-O-

Nota: ^a ESJF = Maceração Estática Folha de Jatobá; ^b UBJF = Banho Ultrassônico Folha de Jatobá; ^c AMJF = Agitação Magnética Folha de Jatobá.

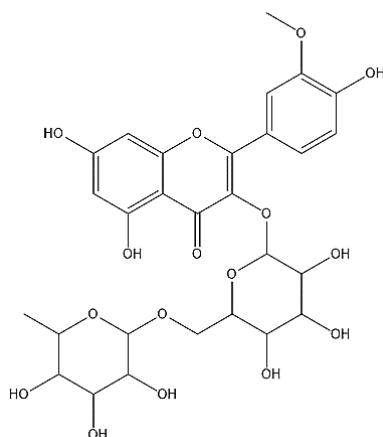
Alguns dos compostos anotados (Figura 6) foram relatados anteriormente no gênero *Hymenaea*, como a Epigalocatequina-3-O-galato-3'-O-glucuronídeo (12) (ARTAVIA, 1995) e a Luteolina (15), que foi isolada das folhas de *H. palustris* e demonstrou atividade inibitória contra patógenos gram-negativos, como *Neisseria gonorrhoeae* (PETTIT et al., 2003). Por outro lado, os achados do presente estudo foram pioneiros na descrição dos compostos crisoeriol-7-O-neohesperidosídeo (4), isorhamnetina-3-O-glicosídeo (8), 3,7-Di-O-metilquercetina (10) e miricetina (11) pela primeira vez na literatura nas folhas de *H. courbaril*.

Figura 6 - Compostos anotados nos extratos de *H. courbaril*.

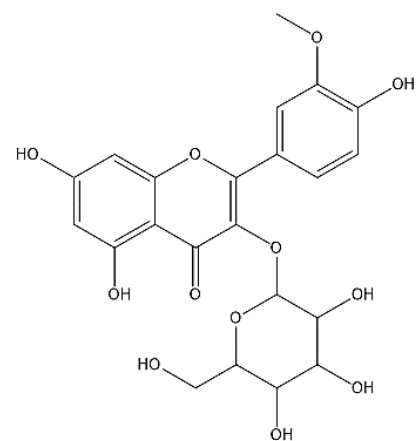




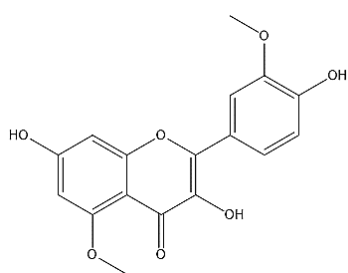
Kaempferol-3-O-rutinosídeo (6)



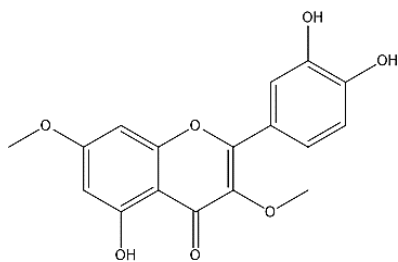
Isorhamnetina-3-O-rutinosídeo (7)



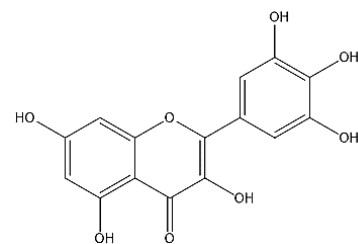
Isorhamnetina-3-O-glicosídeo (8)



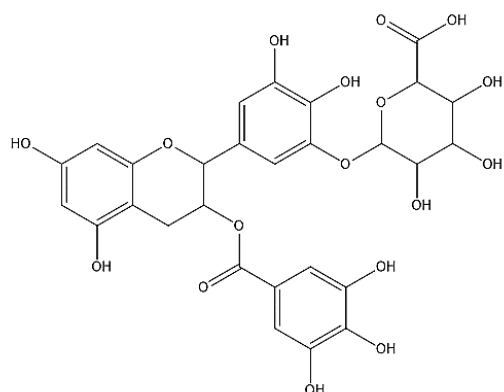
Éter crisoeriol-5-metílico (9)



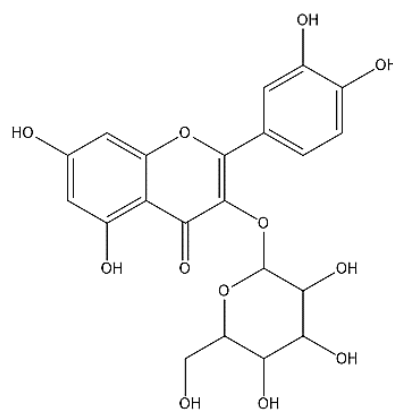
3,7-Di-O-metilquercetina (10)



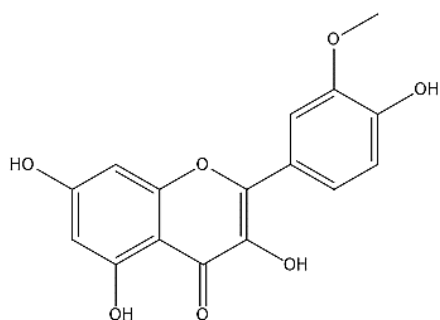
Miricetina (11)



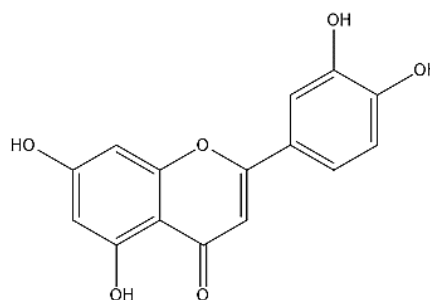
Epigallocatequina-3-O-galato-3'-O-glicoronídeo (12)



Quercetina-3-O-glicosídeo (13)



Isoramnetina (14)



Luteolina (15)

A atividade promissora dos extratos das folhas de Jatobá (ESJF, AMJF e USJF) contra *S. aureus* possivelmente seja atribuída à sua composição química. Estudos anteriores mostraram que alguns flavonoides presentes nos extratos de *H. courbaril* são compostos antimicrobianos promissores que podem contribuir para a atividade antibacteriana contra o biofilme de *S. aureus*, como a rutina (**5**) (AL-SHABIB et al., 2017; LODOVICO et al., 2022), miricetina (**11**) (KANG et al., 2006) e luteolina (**15**) (CHO et al., 2015). Outros flavonoides também mostraram atividade contra *S. aureus*, incluindo kaempferol-3-O-rutinosídeo (**6**) (MING et al., 2017), epigallocatequina-3-O-galato-3'-O-glucuronídeo (**12**) (BLANCO et al., 2005, MIKLASIŃSKA-MAJDANIK et al., 2018), quercetina-3-O-glicosídeo (**13**) (LEE et al., 2013) e isorhamnetina (**14**) (BLANDO et al., 2019). Além disso, a quercetina foi capaz de inibir a expressão de genes relacionados ao biofilme, como o gene *agrA* relacionado ao *quorum sensing* (MARKOWSKA; GRUDNIAK; WOLSKA, 2013).

Esses trabalhos anteriores propuseram que os flavonoides têm vários modos de ação contra o biofilme de *S. aureus*, como o bloqueio de adesinas de superfície funcionais no envelope da parede celular, interferindo na síntese de DNA bacteriano, inibindo a expressão de genes relacionados ao biofilme e interferindo com polissacarídeos que formam o glicocálice de *S. aureus* (O'GARA 2007, LEE et al., 2013, LODOVICO et al., 2022, MING et al., 2017, BLANCO et al., 2005, MIKLASIŃSKA-MAJDANIK et al., 2018).

Conseqüentemente, todos esses estudos suportam a noção de que a classe de flavonoides identificada no presente trabalho em extratos de *H.*

courbaril (Tabela 5 e Figura 6) contribui para sua atividade contra a formação de biofilme em *S. aureus*. Portanto, sugere-se que os extratos de folhas de *H. courbaril* (ESJF, AMJF e USJF) podem representar uma alternativa para superar o fenômeno da resistência antimicrobiana em biofilmes. Além disso, eles devem ser mais estudados a fim de desenvolver fármacos eficazes contra biofilmes estafilococos.

No entanto, mesmo que esses extratos sejam considerados promissores, novas investigações de sua eficácia clínica são necessárias.

5. CONCLUSÕES

Com base na investigação do seu perfil fitoquímico, o extrato da casca do fruto (exocarpo) de *H. courbaril*, se destacou por apresentar o maior teor de compostos fenólicos totais. Considerando esse achado, é razoável afirmar que a atividade antioxidante obtida pelo Jatobá é expressiva e está relacionada a esse grupo de metabólitos.

Além disso, os extratos ESJF, AMJF e USJF exibem atividade inibitória formadora de biofilme contra *S. aureus* semelhante à de drogas ou antibióticos padrão, indicando o potencial das folhas dessa planta para serem usadas como potentes agentes antibiofilme. Esta descoberta é relevante, considerando que este patógeno é frequentemente resistente a uma variedade de antibióticos amplamente utilizados. Portanto, a combinação de conhecimento farmacológico avançado e tradicional pode ser um passo útil para o desenvolvimento de novos medicamentos menos dispendiosos e mais eficazes contra patógenos clinicamente relevantes, como o *S. aureus*.

Os resultados deste estudo sugerem que alguns dos compostos bioativos descritos nas folhas de *H. courbaril*, como kaempferol-3-O-rutinosídeo (**6**), miricetina (**11**), quercetina-3-O-glicosídeo (**13**), isorhamnetina (**14**) e luteolina (**15**), podem ter contribuído para a atividade antimicrobiana observada contra o biofilme de *S. aureus*. Além disso, sugere-se que tais compostos atuem em combinação para inibir o crescimento microbiano e atividade antibiofilme.

Ademais, nossos resultados dão suporte ao uso medicinal do Jatobá no tratamento de infecções relacionadas à assistência em saúde causadas por *S. aureus* e sugerem que os extratos de folhas de *H. courbaril* podem representar uma alternativa para superar o fenômeno da resistência antimicrobiana dos biofilmes no âmbito clínico. A partir destes resultados, o futuro deste trabalho seria testar os extratos das folhas contra bactérias com perfil multirresistente e com espécies formadoras de biofilmes de cepas clínicas causadoras de infecções hospitalares.

6. REFERÊNCIAS

AGUIAR, K. V. C. S. et al. Sepsis em Unidade de Terapia Intensiva: Fatores Predisponentes e a Atuação Preventiva do Enfermeiro. **Revista de Psicologia**, v. 14, n. 52, p. 214–230, 2020.

<https://doi.org/10.14295/online.v14i52.2661>

ALBERNAZ, L. C. et al. Investigation of plant extracts in traditional medicine of the Brazilian Cerrado against protozoans and yeasts. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 131, n. 1, p. 116–121, 2010.

<https://doi.org/10.1016/j.jep.2010.06.011>

AL-SHABIB, N. A. et al. Rutin inhibits mono and multi-species biofilm formation by foodborne drug resistant *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. **Food Control**, v. 79, p. 325–332, 1 set. 2017.

<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2017.03.004>

ARASU, M. V. et al. In vitro and in vivo enhancement of adipogenesis by Italian Ryegrass (*Lolium multiflorum*) in 3T3-L1 cells and mice. **PLoS ONE**, v. 9, n. 1, 2014.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0085297>

ARASU, M. V. et al. Identification and Characterization of *Lactobacillus brevis* P68 with Antifungal, Antioxidant and Probiotic Functional Properties. **Indian Journal of Microbiology**, v. 55, n. 1, p. 19–28, 2015.

<https://doi.org/10.1007/s12088-014-0495-3>

ARTAVIA, D., B. M., C. O. A flavanonol rhamnoside from *Hymenaea courbaril* leaves. **Fitoterapia**, v. 66, n. 1, p. 91–92, 1995.

ASFOUR, H. Anti-quorum sensing natural compounds. **Journal of Microscopy and Ultrastructure**, v. 6, n. 1, p. 1, 2018.

https://doi.org/10.4103/JMAU.JMAU_10_18

ASKARI, G. AL et al. Evaluation of Antimicrobial Activity of Aqueous and Ethanolic Extracts of Leaves of *Vitis vinifera* Collected from Different Regions in Morocco. **Environmental Science**, v. 12, n. 1, p. 85–90, 2012.

ASKARINIA, M. et al. A review on medicinal plant extracts and their active ingredients against methicillin-resistant and methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus*. **Journal of HerbMed Pharmacology**, v. 8, n. 3, p. 173–184, 2019.

<https://doi.org/10.15171/jhp.2019.27>

BALOUIRI, M.; SADIKI, M.; IBNSOUDA, S. K. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, v. 6, n. 2, p. 71–79, 2016.

<https://doi.org/10.1016/j.jpha.2015.11.005>

BANDEIRA, P. N. et al. A New Diterpene Isolated from the Resin of: *Hymenaea courbaril*. **Chemistry of Natural Compounds**, v. 51, n. 4, p. 693–696, 2015.

<https://doi.org/10.1007/s10600-015-1386-5>

BARROQUEIRO, E. S. B. et al. Immunomodulatory and Antimicrobial Activity of Babassu Mesocarp Improves the Survival in Lethal Sepsis. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2016, p. 6–12, 2016.

<https://doi.org/10.1155/2016/2859652>

BATISTÃO, D. W. F. Marcadores genéticos de risco para forte produção de biofilme em cepas clínicas de *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina e sua associação com o perfil clonal. **Tese (Doutorado em Imunologia e Parasitologia aplicada)** – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, p. 87, 2014.

BEN ABDALLAH, F.; LAGHA, R.; GABER, A. Biofilm inhibition and eradication properties of medicinal plant essential oils against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical isolates. **Pharmaceuticals**, v. 13, n. 11, p. 1–15, 2020.

<https://doi.org/10.3390/ph13110369>

BENZIE, I. F. F.; CHOI, S. W. **Antioxidants in food: Content, measurement, significance, action, cautions, caveats, and research needs**. 1. ed. [s.l.] Elsevier Inc., v. 71, 2014.

<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800270-4.00001-8>

BEZERRA, G. P. et al. Phytochemical study guided by the myorelaxant activity of the crude extract, fractions and constituent from stem bark of *Hymenaea courbaril* L. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 149, n. 1, p. 62–69, 2013.

<https://doi.org/10.1016/j.jep.2013.05.052>

BITUA, V. C. N. et al. Ethnopharmacological study of plants sold for therapeutic purposes in public markets in Northeast Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 172, p. 265–272, 2015.

<https://doi.org/10.1016/j.jep.2015.06.022>

BLANCO, A. R. et al. Epigallocatechin gallate inhibits biofilm formation by ocular staphylococcal isolates. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, n. 10, p. 4339–4343, 2005.

<https://doi.org/10.1128/AAC.49.10.4339-4343.2005>

BLANDO, F. et al. Antimicrobial and antibiofilm activity against *Staphylococcus aureus* of *Opuntia ficus-indica* (L.) mill. cladode polyphenolic extracts. **Antioxidants**, v. 8, n. 5, 2019.

<https://doi.org/10.3390/antiox8050117>

BONIFACE, P. K.; BAPTISTA FERREIRA, S.; ROLAND KAISER, C. Current state of knowledge on the traditional uses, phytochemistry, and pharmacology of the genus *Hymenaea*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 206, p. 193–223, 2017.

<https://doi.org/10.1016/j.jep.2017.05.024>

BOULEKBACHE-MAKHLOUF, L. et al. Effect of solvents extraction on phenolic content and antioxidant activity of the byproduct of eggplant. **Industrial Crops and Products**, v. 49, p. 668–674, 2013.

<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.06.009>

BRAMBILLA, L. Z. S. et al. Anti-biofilm activity against *Staphylococcus aureus* MRSA and MSSA of neolignans and extract of *Piper regnellii*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 27, n. 1, p. 112–117, 2017.

<https://doi.org/10.1016/j.bjp.2016.08.008>

CARVALHO, L. S.; PEREIRA, K. F.; ARAÚJO, E. G. Botanical characteristics, therapeutic effects and active principles present in Pequi (*Caryocar brasiliense*). **Arquivos de Ciências da Saúde da UNIPAR**, v. 19, n. 2, p. 147–157, 2015.

<https://doi.org/10.25110/arqsaude.v19i2.2015.5435>

CAVALCANTE, C. F.; SANTOS, R. A.; ZAMBUJA, S. C. M. Os benefícios da nutrição na prevenção do envelhecimento da pele. **Revista Conexão Eletrônica**, v. 13, p. 1–10, 2016.

CHAVASCO, J. M. et al. Avaliação das atividades antimicrobiana e citotóxica de extratos de plantas do cerrado do Sul de Minas Gerais. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 56, n. 1, p. 13–20, 2014.

<https://doi.org/10.1590/S0036-46652014000100002>

CHAVES, M. V. et al. **Potencial Fungicida De Plantas Medicinais Do Cerrado Da Costa Leste Do Estado De Mato Grosso Do Sul**, v. 53, n. 9, p. 1689–1699, 2018.

CHO, H. S. et al. Red wines and flavonoids diminish *Staphylococcus aureus* virulence with anti-biofilm and anti-hemolytic activities. **Biofouling**, v. 31, n. 1, p. 1–11, 2015.

<https://doi.org/10.1080/08927014.2014.991319>

CLEMENTINO-NETO, J. et al. Toxicological, Antidiarrheal and Spasmolytic Activities of *Solanum paniculatum*. **Planta Medica**, v. 82, n. 1–2, p. 58–64, 2015.

<https://doi.org/10.1055/s-0035-1557831>

CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute. **Performance standards for antimicrobial disk susceptibility testing**; Approved Standard. 2023.

CORREIA, A. F. et al. Activity of crude extracts from Brazilian cerrado plants against clinically relevant *Candida* species. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 16, n. 1, 2016.

<https://doi.org/10.1186/s12906-016-1164-3>

COWAN, M. M. Plant products as antimicrobial agents. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 12(4), p. 564–582, 1999.

<https://doi.org/10.1128/CMR.12.4.564>

CRUZ, C. D.; SHAH, S.; TAMMELA, P. Defining conditions for biofilm inhibition and eradication assays for Gram-positive clinical reference strains. **BMC Microbiology**, v. 18, n. 1, p. 1–9, 2018.

<https://doi.org/10.1186/s12866-018-1321-6>

CUSHNIE, T. P. T.; LAMB, A. J. **Antimicrobial activity of flavonoids**. **International Journal of Antimicrobial Agents**, Elsevier, 2005.

<https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2005.09.002>

DA COSTA, M. P. et al. Antifungal and cytotoxicity activities of the fresh xylem sap of *Hymenaea courbaril* L. and its major constituent fisetin. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 14, p. 1–7, 2014.

<https://doi.org/10.1186/1472-6882-14-245>

DA CRUZ, J. E. R. et al. Phytochemical Analysis and Evaluation of Antimicrobial Activity of *Peumus boldus*, *Psidium guajava*, *Vernonia polysphaera*, *Persea Americana*, *Eucalyptus citriodora* Leaf Extracts and *Jatropha multifida* Raw Sap. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, v. 20, n. 5, p. 433–444, 2019.

<https://doi.org/10.2174/1389201020666190409104910>

DAVID, M. Z. et al. Recently approved antibacterials for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and other Gram-positive pathogens: the shock of the new. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 50, n. 3, p. 303–307, 2017.

<https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2017.05.006>

DE ALMEIDA ALVES, T. M. et al. Biological Screening of Brazilian Medicinal Plants. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 95, n. 3, p. 367–373, 2000.

<https://doi.org/10.1590/S0074-02762000000300012>

DE VARGAS, F. S. et al. Antioxidant activity and peroxidase inhibition of Amazonian plants extracts traditionally used as anti-inflammatory. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 16, n. 1, p. 1–8, 2016.

<https://doi.org/10.1186/s12906-016-1061-9>

DEWAGE, E. et al. Mechanisms, and Applications: A Review. 2022.

DIAS, L. S.; LUZIA, D. M. M.; JORGE, N. Physicochemical and bioactive properties of *Hymenaea courbaril* L. pulp and seed lipid fraction. **Industrial Crops and Products**, v. 49, p. 610–618, 2013.

<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.06.005>

DI LODOVICO, S. et al. Complex Chronic Wound Biofilms Are Inhibited in vitro by the Natural Extract of *Capparis spinose*. **Frontiers in Microbiology**, v. 13, 11 abr. 2022.

<https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.832919>

DIMECH, G. S. et al. Phytochemical and Antibacterial Investigations of the Extracts and Fractions from the Stem Bark of *Hymenaea stigonocarpa* Mart. ex Hayne and Effect on Ultrastructure of *Staphylococcus aureus* Induced by Hydroalcoholic Extract. **The scientific World Journal**, v. 2013, n. 2013, p. 1–8, 2013.

<https://doi.org/10.1155/2013/862763>

EL-GUEZZANE, C. et al. A comparative study of the antioxidant activity of two Moroccan prickly pear cultivars collected in different regions. **Chemical Data Collections**, v. 31, p. 100637, 2021.

<https://doi.org/10.1016/j.cdc.2020.100637>

EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Desafios para a agricultura nos biomas brasileiros**. Brasília, DF. 2020.

FERNANDES, T. T.; SANTOS, A. T. F.; PIMENTA, F. C. Atividade antimicrobiana das plantas *Plathymenia reticulata*, *Hymenaea courbaril* e *Guazuma ulmifolia*. **Revista de Patologia Tropical**, v. 34, n. 2, p. 113–122, 2007.

<https://doi.org/10.5216/rpt.v34i2.1916>

FERREIRA, L. C. et al. Anti-inflammatory and antinociceptive activities of *Campomanesia adamantium*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 145, n. 1, p. 100–108, 2013.

<https://doi.org/10.1016/j.jep.2012.10.037>

FEVEREIRO, D. E. et al. NC-ND LICENSE ANAIS: Encontro anual da biofísica (2018): 1-4 biofísica e radiobiologia desrepliação de flavonoides de *Hymenaea martiana* Hayne POR LC-MS/MS. 2018.

FIGUEIREDO, P. A. Avaliação do potencial antioxidante, citotóxico e fotoprotetor de extratos de *Hymenaea courbaril* L. e *Hymenaea stigonocarpa* Mart. ex Hayne. **Dissertação (Mestrado em Biociências)**. Faculdade de Ciências e Letras, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Assis, pp. 70, 2014.

FIGUEIREDO, P. A. et al. Antioxidant activity and chemical characterization of extracts from the Genus *Hymenaea*. **Research Journal of Medicinal Plant**, v. 10, n. 5, p. 330–339, 2016.

<https://doi.org/10.3923/rjmp.2016.330.339>

FUQUA, W. C.; WINANS, S. C.; GREENBERG, E. P. Quorum sensing in bacteria: The LuxR-LuxI family of cell density- responsive transcriptional regulators. **Journal of Bacteriology**, v. 176, n. 2, p. 269–275, 1994.

<https://doi.org/10.1128/jb.176.2.269-275.1994>

FÜRST, R.; ZÜNDORF, I. Plant-derived anti-inflammatory compounds: Hopes and disappointments regarding the translation of preclinical knowledge into clinical progress. **Mediators of Inflammation**, v. 2014, 2014.

<https://doi.org/10.1155/2014/146832>

GARCIA, C. S.; UEDA, S. M. Y.; MIMICA, L. M. J. Evaluation of in vitro antibacterial activity of hydro-ethanol from vegetable extracts against MRSA and

MSSA *Staphylococcus aureus*. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 70, n. 4, p. 589–598, 2011.

<https://doi.org/10.53393/rial.2011.v70.32519>

GENOVESE, C. et al. In vitro antibacterial, anti-adhesive and anti-biofilm activities of *Krameria Lappacea* (Dombey) burdet B.B. Simpson root extract against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. **Antibiotics**, v. 10, n. 4, 2021.

<https://doi.org/10.3390/antibiotics10040428>

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Medicinal plants: Factors influencing the content of secondary metabolites. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 374–381, 2007.

<https://doi.org/10.1590/S0100-40422007000200026>

GUIMARÃES, D. O.; DA SILVA MOMESSO, L.; PUPO, M. T. Antibióticos: Importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. **Química Nova**, v. 33, n. 3, p. 667–679, 2010.

<https://doi.org/10.1590/S0100-40422010000300035>

HICKL, J. et al. Mediterranean herb extracts inhibit microbial growth of representative oral microorganisms and biofilm formation of *Streptococcus mutans*. **PLoS ONE**, v. 13, n. 12, p. 1–24, 2018.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0207574>

HUSSAIN, H. et al. The chemistry and biology of bicoumarins. **Tetrahedron**, v. 68, n. 12, p. 2553–2578, 2012.

IRENJI, N.; PILLAI, S. K. G.; WEST-JONES, J. S. Serious life-threatening multifocal infection in a child, caused by Panton-Valentine leucocidin-producing *Staphylococcus aureus* (PVL-MSSA). **BMJ Case Reports**, v. 2018, 2018.

<https://doi.org/10.1136/bcr-2017-222138>

JAYAPRAKASAM, B. et al. Terpenoids from Stinking toe (*Hymenae courbaril*) fruits with cyclooxygenase and lipid peroxidation inhibitory activities. **Food Chemistry**, v. 105, n. 2, p. 485–490, 2007.

<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.04.004>

KANG, S. S. et al. Flavonols Inhibit Sortases and Sortase-Mediated *Staphylococcus aureus* Clumping to Fibrinogen. **Biology Pharmaceutical Bull.** [s.l: s.n.].

KANG, X. et al. Potential Mechanisms of Quercetin Influence the ClfB Protein During Biofilm Formation of *Staphylococcus aureus*. **Frontiers in Pharmacology**, v. 13, 2022.

<https://doi.org/10.3389/fphar.2022.825489>

KATRIN SCHILCHER, A. R. H. Staphylococcal Biofilm Development: Structure, Regulation, and Treatment Strategies. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 84, n. 3, p. 1–36, 2020.

<https://doi.org/10.1128/MMBR.00026-19>

KATSUURA, Y. et al. Metastatic MSSA infection of the spine and extremities. **BMJ Case Reports**, v. 2018, p. 1–4, 2018.

<https://doi.org/10.1136/bcr-2017-222778>

KHAN, M. F. et al. Antibacterial properties of medicinal plants from Pakistan against multidrug-resistant ESKAPE pathogens. **Frontiers in Pharmacology**, v. 9, 2018.

<https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00815>

KIM, S. J. et al. Identification and quantification of volatile and phenolic compounds composition in buckwheat sprouts by GC/MS and HPLC. **Asian Journal of Chemistry**, v. 26, n. 3, p. 777–782, 2014.

<https://doi.org/10.14233/ajchem.2014.15538>

KLANČNIK, A. et al. Evaluation of diffusion and dilution methods to determine the antibacterial activity of plant extracts. **Journal of Microbiological Methods**, v. 81, n. 2, p. 121–126, 2010.

<https://doi.org/10.1016/j.mimet.2010.02.004>

KLINK, C. A., MACHADO, R. B. A conservação do Cerrado brasileiro. **Megadiversidade**, v. 1, n. 1, p. 147–155, 2005.

LAMBERT, P. A. Bacterial resistance to antibiotics: Modified target sites. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 57, n. 10, p. 1471–1485, 2005.

<https://doi.org/10.1016/j.addr.2005.04.003>

LEE, J. H. et al. Anti-biofilm activities of quercetin and tannic acid against *Staphylococcus aureus*. **Biofouling**, v. 29, n. 5, p. 491–499, 2013.

<https://doi.org/10.1080/08927014.2013.788692>

LIMA, M. R. F. DE et al. The antibiotic activity of some Brazilian medicinal plants. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, n. 3, p. 300–306, 2006.

<https://doi.org/10.1590/S0102-695X2006000300004>

LINSBINSKI, P.D.; SIMÕES, C. A. P.; FERNANDES, H. P., et al. Evaluación antioxidante del extracto de la semilla de *Hymenaea courbaril* L. (jatobá) en camundongos tratados con acetaminofeno. **Revista Cubana de Plantas Medicinales**, v. 1, n. 25, p. 1-13, 2020.

LI, S. et al. Research progress of natural antioxidants in foods for the treatment of diseases. **Food Science and Human Wellness**, v. 3, n. 3–4, p. 110–116, 2014.

<https://doi.org/10.1016/j.fshw.2014.11.002>

LUIZ-FERREIRA, A. et al. Mechanisms of the gastric antiulcerogenic activity of *Anacardium humile* St. Hil on ethanol-induced acute gastric mucosal injury in rats. **Molecules**, v. 15, n. 10, p. 7153–7166, 2010.

<https://doi.org/10.3390/molecules15107153>

MARANHÃO, C. A. et al. Antitermitic and antioxidant activities of heartwood extracts and main flavonoids of *Hymenaea stigonocarpa* Mart. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 79, p. 9–13, 2013.

<https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2013.01.005>

MARKOWSKA K.; GRUDNIAK A. M.; WOLSKA K.I. Nanopartículas de prata como estratégia alternativa contra biofilmes bacterianos. **Acta Biochimica Polonica**, n. 4, v. 60, 523–530, 2013.

MELÉNDEZ, P. A.; CAPRILES, V. A. Antibacterial properties of tropical plants from Puerto Rico. **Phytomedicine**, v. 13, n. 4, p. 272–276, 2006.

<https://doi.org/10.1016/j.phymed.2004.11.009>

MENDES, D. B. et al. Metabólitos secundários e hipertireodismo. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, v. 3, n. 1, p. 1–69, 2012.

MENDONÇA, J. DA S. et al. Natural Antioxidant Evaluation: A Review of Detection Methods. **Molecules**, v. 27, n. 11, p. 1–37, 2022.

<https://doi.org/10.3390/molecules27113563>

MENEZES, A. P. S. et al. Utilização De Plantas Medicinais Em Um Município Inserido No Bioma Pampa Brasileiro. **Revista Da Universidade Vale Do Rio Verde**, v. 14, n. 2, p. 206–219, 2016.

<https://doi.org/10.5892/ruvrd.v14i2.2672>

MESQUITA, A. S. S. et al. Infecção relacionada à assistência à saúde em Unidade de Terapia Intensiva. **Revista Eletrônica Acervo Saúde**, v. 23, n. 8, 2023.

<https://doi.org/10.25248/reas.e13099.2023>

MIKLASIŃSKA-MAJDANIK, M. et al. Phenolic compounds diminish antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* clinical strains. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, 2018.

<https://doi.org/10.3390/ijerph15102321>

MILLER, L. S. et al. Development of a vaccine against *Staphylococcus aureus* invasive infections: **Evidence based on human immunity, genetics and bacterial evasion mechanisms**. [s.l.: s.n.]. v. 44.

<https://doi.org/10.1093/femsre/fuz030>

MING, D. et al. Kaempferol inhibits the primary attachment phase of biofilm formation in *Staphylococcus aureus*. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. 15, 2017.

<https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02263>

MIRANDA, V. B.; CAMPOS, A. C. V.; VIEIRA, A. B. R. Infecções relacionadas à assistência à saúde nos hospitais de Belém, Pará, Brasil. **Revista Saúde e Ciência**, v. 9, n. 2, p. 53-63, 2020.

MOTA, L. L. S. et al. Abordagem etnobotânica continuada na comunidade remanescente de quilombo palmeirinha, Pedras De Maria Da Cruz – Mg. **Revista Cerrados**, v. 13, n. 1, p. 156–172, 2015.

NARMANI, A. et al. Cytotoxic, anti-biofilm and antimicrobial polyketides from the plant associated fungus *Chaetosphaeronema achilleae*. **Fitoterapia**, v. 139, 2019.

<https://doi.org/10.1016/j.fitote.2019.104390>

NATHAN, K. et al. *Staphylococcus aureus* biofilms Properties, regulation and roles in human disease. **Virulence**, v. 2:5, p. 445–459, 2011.

<https://doi.org/10.4161/viru.2.5.17724>

NEGI, B. S.; DAVE, B. P.; AGARWAL, Y. K. Evaluation of Antimicrobial Activity of *Bauhinia purpurea* Leaves Under In Vitro Conditions. **Indian Journal of Microbiology**, v. 52, n. 3, p. 360–365, 2012.

<https://doi.org/10.1007/s12088-012-0264-0>

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. **Journal of Natural Products**, v. 75, n. 3, p. 311–335, 2012.

<https://doi.org/10.1021/np200906s>

O’GARA, J. P. ICA and beyond: Biofilm mechanisms and regulation in *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus*. **FEMS Microbiology Letters**, 2007.

<https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2007.00688.x>

OLIVEIRA, F. G. S. et al. The Genus *Hymenaea* (Fabaceae): A Chemical and Pharmacological Review. **Studies in Natural Products Chemistry**, v. 58, p. 339–388, 2018.

<https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64056-7.00012-X>

OLIVEIRA, W. L. Boas práticas de manejo para o extrativismo sustentável do pequi – Brasília: **Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia**, 2010.

OTTO M. Staphylococcal Biofilms. **Microbiology Spectrum**. v. 6, n. 4, 2018.

<https://doi.org/10.1128/microbiolspec.GPP3-0023-2018>

OYAIZU, M. Studies on products of browning reaction. Antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. **The Japanese Journal of Nutrition and Dietetics**, v. 44, n. 6, p. 307–315, 1986.

<https://doi.org/10.5264/eiyogakuzashi.44.307>

PAHARIK, A. E.; HORSWILL, A. R. The staphylococcal biofilm: Adhesins, regulation, and host response. **Virulence Mechanisms of Bacterial Pathogens**, v. 4, n. 2, p. 529–566, 2016.

<https://doi.org/10.1128/9781555819286.ch19>

PETTIT, G. R. et al. Isolation and structure of palstatin from the amazon tree *Hymenaea palustris*. **Journal of Natural Products**, v. 66, n. 2, p. 259–262, 2003.

<https://doi.org/10.1021/np020231e>

PINAZO, A. et al. Amino acid-based surfactants: New antimicrobial agents. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 228, p. 17–39, 2016.

<https://doi.org/10.1016/j.cis.2015.11.007>

POPOVICH, K. J. et al. SHEA/IDSA/APIC Practice Recommendation: Strategies to prevent methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* transmission and infection in acute-care hospitals: 2022 Update. **Infection Control and Hospital Epidemiology**, v. 44, n. 7, p. 1039–1067, 2023.

<https://doi.org/10.1017/ice.2023.102>

PRIETO, P.; PINEDA, M.; AGUILAR, M. Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation. **Analytical Biochemistry**, v. 269, p. 337–341, 1999.

<https://doi.org/10.1006/abio.1999.4019>

QUAVE, C. L. et al. Effects of extracts from Italian medicinal plants on planktonic growth, biofilm formation and adherence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 118, n. 3, p. 418–428, 2008.

<https://doi.org/10.1016/j.jep.2008.05.005>

RAHMAN, M. M. et al. Total synthesis of acylphloroglucinols and their antibacterial activities against clinical isolates of multi-drug resistant (MDR) and methicillin-resistant strains of *Staphylococcus aureus*. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 155, p. 255–262, 2018.

<https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2018.05.038>

RAZA, M. A role for physicians in ethnopharmacology and drug discovery. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 104, n. 3, p. 297–301, 2006.

<https://doi.org/10.1016/j.jep.2006.01.007>

ROCHA, E. C.; SARTORI, C. A.; NAVARO, F. F. The application of antioxidant foods in the prevention of skin aging. **Revista Científica Uniararas**, v. 4, n. 1, p. 19–26, 2016.

<https://doi.org/10.55660/revfho.v4i1.71>

RÖMLING, U.; BALSALOBRE, C. Biofilm infections, their resilience to therapy and innovative treatment strategies. **Journal of Internal Medicine**, v. 272, n. 6, p. 541–561, 2012.

<https://doi.org/10.1111/joim.12004>

RUNGELRATH, V.; DELEO, F. R. *Staphylococcus aureus*, Antibiotic Resistance, and the Interaction with Human Neutrophils. **Antioxidants and Redox Signaling**, v. 34, n. 6, p. 452–470, 2021.

<https://doi.org/10.1089/ars.2020.8127>

SALAM, A. M.; QUAVE, C. L. Opportunities for plant natural products in infection control. **Current Opinion in Microbiology**, v. 45, p. 189–194, 2018.

<https://doi.org/10.1016/j.mib.2018.08.004>

SARKER, S.D; LATIF, Z; GRAY, A. I. **Natural Products Isolation**. 2^a ed. ed. New Jersey: [s.n.].

SARMENTO, C. G. et al. Estudo bibliográfico sobre o uso das plantas medicinais e fitoterápicos no Brasil. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, v. 8, n. 5, p. 208–212, 2013.

SENA, N. S. et al. Infecções hospitalares em Unidade de Terapia Intensiva: Uma revisão integrativa. **Research, Society and Development**, v. 11, n. 10, 2022.

<https://doi.org/10.33448/rsd-v11i10.32591>

SCHILCHER, K.; HORSWILL, A. R. **Staphylococcal Biofilm Development: Structure, Regulation, and Treatment Strategies**. [s.l: s.n.].

SHANKAR, PR. Book review: Tackling drug-resistant infections globally. **Archives of Pharmacy Practice**, v. 7, n. 3, p. 110, 2016.

<https://doi.org/10.4103/2045-080X.186181>

SILVA, J. J. et al. In vitro screening antibacterial activity of *Bidens pilosa* linné and *Annona crassiflora* mart. against oxacillin resistant *Staphylococcus aureus* (ORSA) from the aerial environment at the dental clinic. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 56, n. 4, p. 333–340, jul. 2014.

<https://doi.org/10.1590/S0036-46652014000400011>

SILVA, R. W. V. et al. Use of response surface methodology in optimization of phenolic compounds extraction from the shell of *Hymenaea courbaril* L. (Jatobá) fruits. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 22, 2019.

SIMÕES, K., et al. Ipomopsin and hymenain, two biscoumarins from seeds of *Hymenaea courbaril*. **Phytochemistry Letters**, v. 2, p. 59-62, 2009.

<https://doi.org/10.1016/j.phytol.2008.11.003>

SIMÕES, M.; BENNETT, R. N.; ROSA, E. A. S. Understanding antimicrobial activities of phytochemicals against multidrug resistant bacteria and biofilms. **Natural Product Reports**, v. 26, n. 6, p. 746–757, 2009.

<https://doi.org/10.1039/b821648g>

SINGLETON, V. L. ROSSI, J. A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. **American journal of Enology and Viticulture**, v. 16 (3), p. 144–158, 1965.

<https://doi.org/10.5344/ajev.1965.16.3.144>

PRABU, S. L.; UMAMAHESWARI, A.; GRACE, G. F. Investigation on the biofilm eradication potential of selected medicinal plants against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Biotechnology Reports**, v. 28, 2020.

<https://doi.org/10.1016/j.btre.2020.e00523>

SOUZA-MOREIRA, T. M.; QUEIROZ-FERNANDES, G. M.; PIETRO, R. C. L. R. *Stryphnodendron* species known as “barbatimão”: A comprehensive report. **Molecules**, v. 23, n. 4, p. 1–25, 2018.

STROMMINGER, B. et al. Evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* towards increasing resistance. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 69, n. 3, p. 616–622, 2014.

<https://doi.org/10.1093/jac/dkt413>

TAVARES. **Manual de antibióticos e quimioterápicos anti-infecciosos**. 3ª ed. ed. Sao Paulo: [s.n.].

TCHANA, M. E. S. et al. Activities of selected medicinal plants against multi-drug resistant Gram-negative bacteria in Cameroon. **African Health Sciences**, v. 14, n. 1, p. 167–172, 2014.

TIAGO, P. V. et al. Morpho-anatomical, Phytochemical, and Histochemical characterization of *Hymenaea courbaril* (Leguminosae), occurring in Southern Amazon. **Rodriguesia**, v. 7, 2020.

TOMA, M. et al. Investigation of the effects of ultrasound on vegetal tissues during solvent extraction. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 8, n. 2, p. 137–142, 2001.

[https://doi.org/10.1016/S1350-4177\(00\)00033-X](https://doi.org/10.1016/S1350-4177(00)00033-X)

TONG, S. Y. C. et al. *Staphylococcus aureus* infections: Epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 28, n. 3, p. 603–661, 2015a.

TONG, S. Y. C. et al. *Staphylococcus aureus* infections: Epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 28, n. 3, p. 603–661, 2015b.

TSUCHIYA, H.; SATO, M.; MIYAZAKI, T. et al. Comparative study on the antibacterial activity of phytochemical flavanones against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 50, n. (1), p. 27–34, 1996.

[https://doi.org/10.1016/0378-8741\(96\)85514-0](https://doi.org/10.1016/0378-8741(96)85514-0)

TURNER, N. A. et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an overview of basic and clinical research. **Nature Reviews Microbiology**, v. 17, n. 4, p. 203–218, 2019.

UC-CACHÓN, A. H. et al. Antibacterial and antibiofilm activities of Mayan medicinal plants against Methicillin-susceptible and -resistant strains of *Staphylococcus aureus*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 279, n. April, 2021.

<https://doi.org/10.1016/j.jep.2021.114369>

VALLI, M.; BOLZANI, V. S. Natural Products: Development, Perspectives and Challenges for the Brazilian Plant Species and the Bioeconomy. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 91, p. 1-7, 2019.

VAN DER MEER, J. W. M. et al. Antimicrobial innovation: Combining commitment, creativity and coherence. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 13, n. 10, p. 709–710, 2014.

<https://doi.org/10.1038/nrd4448>

VIEIRA, S. C. H. et al. Levantamento de fitoterápicos manipulados em farmácias magistrais de Dourados-MS. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 1, p. 28–34, 2010.

<https://doi.org/10.1590/S0102-695X2010000100007>

WHO. Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics. **Who**, p. 7, 2017.

WIJESUNDARA, N. M.; VASANTHA RUPASINGHE, H. P. Bactericidal and anti-biofilm activity of ethanol extracts derived from selected medicinal plants against *Streptococcus pyogenes*. **Molecules**, v. 24, n. 6, 2019.

XU, H. X.; LEE, S. F. Activity of plant flavonoids against antibiotic-resistant bacteria. **Phytotherapy Research**, v. 15, n. 1. p. 39-43, 2001.

[https://doi.org/10.1002/1099-1573\(200102\)15:1<39::AID-PTR684>3.0.CO;2-R](https://doi.org/10.1002/1099-1573(200102)15:1<39::AID-PTR684>3.0.CO;2-R)

ZAFAR, F. et al. A comprehensive review on medicinal plants possessing antioxidant potential. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**. v. 3, n. 50, p. 205-217, 2023.

<https://doi.org/10.1111/1440-1681.13743>

ZANDI, K. et al. In vitro antiviral activity of Fisetin, Rutin and Naringenin against Dengue virus type-2. **Journal of Medicinal Plant Research**, v. 5, n. 23, p. 5534–5539, 2011.

ZEB, A. Concept, mechanism, and applications of phenolic antioxidants in foods. **Journal of Food Biochemistry**, v. 44, n. 9, p. 1–22, 2020.

ZIYATDINOVA, G.; KALMYKOVA, A. Electrochemical Characterization of the Antioxidant Properties of Medicinal Plants and Products: A Review. **Molecules**. v. 28, n. 5, 2023.

<https://doi.org/10.3390/molecules28052308>

Apêndice I

Artigo Científico

Periódico: **Antibiotcs**

Fator de impacto: **4.8**

Qualis: **A3**

Article

Evaluation of the Antioxidant, Antimicrobial, and Anti-Biofilm Effects of the Stem Bark, Leaf, and Seed Extracts from *Hymenaea courbaril* and Characterization by UPLC-ESI-QTOF-MS/MS Analysis

Jhonatas Emílio Ribeiro da Cruz ^{1,*}, Hellyssa Cataryna Saldanha ¹, Andressa Moreira do Nascimento ¹, Rafaela Barbosa Borges ¹, Marcos de Souza Gomes ², Guilherme Ramos Oliveira e Freitas ¹, Carla Monteiro Leal ³, Everton Allan Ferreira ³, Ademar Alves da Silva Filho ³ and Enyara Rezende Morais ¹

- ¹ Institute of Biotechnology, Federal University of Uberlândia, Campus Patos de Minas, Rua Major Jerônimo, 566, sala 205, Patos de Minas 38700-002, MG, Brazil; hellyssa.saldanha@ufu.br (H.C.S.); andressa.moreira@ufu.br (A.M.d.N.); rafaela.barbosa@ufu.br (R.B.B.); grofрейtas@ufu.br (G.R.O.e.F.); ermorais@ufu.br (E.R.M.)
- ² Institute of Chemistry, Federal University of Uberlândia, Campus Patos de Minas, Rua Major Jerônimo, 566, Patos de Minas 38700-002, MG, Brazil; marcos.gomes@ufu.br
- ³ Faculty of Pharmacy, Department of Pharmaceutical Sciences, Federal University of Juiz de Fora, Rua José Lourenço Kelmer, s/n, Juiz de Fora 36036-900, MG, Brazil; carla.leal@estudante.ufjf.br (C.M.L.); allan.everton@estudante.ufjf.br (E.A.F.); ademar.alves@ufjf.br (A.A.d.S.F.)
- * Correspondence: jhonatas.cruz@ufu.br; Tel.: +55-(34)3823-3714

Abstract: Currently, biofilm-forming bacteria are difficult to treat by conventional antibiotic therapy and are, thus, becoming a clinical and epidemiological problem worldwide. Medicinal plants have been identified as novel alternative treatments due to their therapeutic and antimicrobial effects. In this context, the present study aimed to determine the total phenolic content, antioxidant capacity, and antimicrobial and anti-biofilm potential of nine extracts of *Hymenaea courbaril* (Fabaceae), popularly known as Jatobá. Furthermore, extracts that exhibited biofilm inhibitory activity against *S. aureus* (ATCC 25923) were selected for UPLC-HRMS/MS chemical analysis. Our results showed a high total phenolic content, mainly in the stem bark extract, and that the plant is rich in compounds with antioxidant activity. In the anti-biofilm analysis, leaf extracts stood out in comparison with chloramphenicol, with inhibition percentages of 78.29% and 78.85%, respectively. Through chemical analysis by UPLC-HRMS/MS, chrysoeriol-7-*O*-neohesperidoside, isorhamnetin-3-*O*-glucoside, and 3,7-di-*O*-methylquercetin were annotated for the first time in the leaves of *H. courbaril*. Therefore, these results showed the potential use of *H. courbaril* as an antioxidant and point to its use in antimicrobial therapy with an anti-biofilm effect.

Keywords: antibacterial potential; antioxidant activity; biofilm inhibition; *Hymenaea courbaril*; *Staphylococcus aureus*



Citation: Cruz, J.E.R.d.; Saldanha, H.C.; Nascimento, A.M.d.; Borges, R.B.; Gomes, M.d.S.; Freitas, G.R.O.e.; Leal, C.M.; Ferreira, E.A.; da Silva Filho, A.A.; Morais, E.R. Evaluation of the Antioxidant, Antimicrobial, and Anti-Biofilm Effects of the Stem Bark, Leaf, and Seed Extracts from *Hymenaea courbaril* and Characterization by UPLC-ESI-QTOF-MS/MS Analysis.

Antibiotics **2023**, *12*, 1601. <https://doi.org/10.3390/antibiotics12111601>

Academic Editor: Jean-Marc Sabatier

Received: 11 September 2023

Revised: 12 October 2023

Accepted: 18 October 2023

Published: 8 November 2023



Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

According to data from the World Health Organization (WHO), about 700,000 people die annually from infections by resistant bacteria, and this number is projected to increase to 10 million deaths per year in 2050 [1]. In view of the difficulty of treating infections caused by *Staphylococcus aureus*, which produces biofilms, the need for novel and effective therapies is urgent [2,3]. For this reason, the development of novel therapeutic strategies, such as the use of medicinal plants with antimicrobial activity with a focus on inhibition or eradication of biofilm, is of great interest.

Some plant species and their phytoconstituents are promising sources of antimicrobial agents [4]. Thus, studies on the anti-infective activity of medicinal plants have become a progressive trend. Among the 162 new antibiotics approved in the period from 1981 to 2019, 94 of them originated from natural products [5].

Hymenaea courbaril (Fabaceae) is a medicinal plant species popularly known in Brazil as Jatobá that has a long history of use by Indigenous tribes in the Amazon basin, including communities in the Caatinga and Cerrado [6].

Plants of the genus *Hymenaea* (Fabaceae) are used in traditional South American and Asian medicine to treat a multitude of disorders, such as cough, diarrhea, dysentery, intestinal colic, lung weakness, asthma, anemia, and sore throat, as well as for the treatment of kidney disease and illnesses related to viruses and bronchitis [7].

Previous studies on the medicinal properties of *H. courbaril* have revealed antimicrobial activity against Gram-positive [8] and Gram-negative bacteria [9] and dengue virus type 2 [10]. However, little research has focused on the pharmacological activity of the stem bark and leaves of *H. courbaril* [7].

In this article, we demonstrate, for the first time, the anti-biofilm activity of *H. courbaril* leaf extracts and the annotation of their chemical compounds by UPLC-HRMS/MS that may contribute to the inhibition of a biofilm-forming *S. aureus*, a pathogenic bacterium of medical importance. It is noteworthy that there is no record in the literature, thus far, of investigations into the anti-biofilm activity of this species.

2. Results

2.1. Quantitative Determination of the Total Phenolic (PT) Content

The results offer new and valuable quantitative data on PT in *H. courbaril*, a plant popularly used in the Cerrado region, one of the areas with the greatest biodiversity in the world (Figure 1).

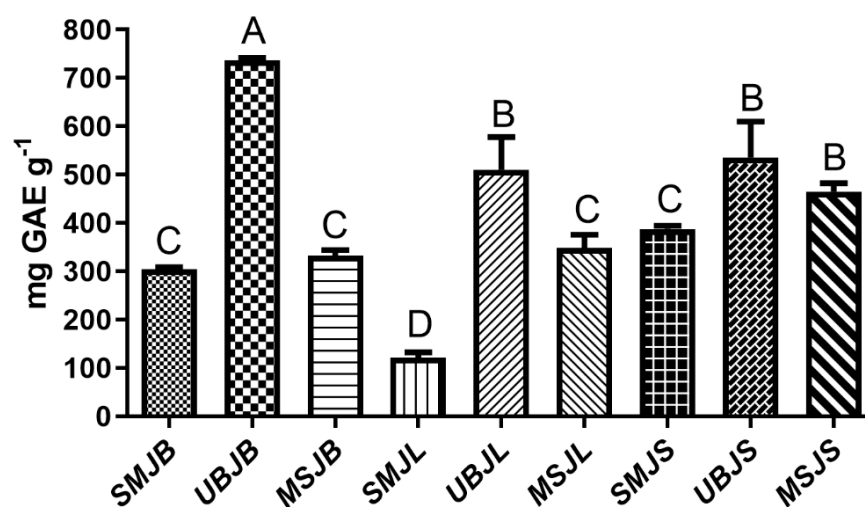


Figure 1. Total phenolic content of the crude extracts of Jatobá. Results are expressed as the mean \pm standard deviation ($n = 3$). Means followed by the same letter in a column do not differ significantly at 5% probability by the Scott–Knott test. SMJB = Static Maceration Jatobá Bark; UBJB = Ultrasonic Bath Jatobá Bark; MSJB = Magnetic Stirring Jatobá Bark; SMJL = Static Maceration Jatobá Leaf; UBJL = Ultrasonic Bath Jatobá Leaf; MSJL = Magnetic Stirring Jatobá Leaf; SMJS = Static Maceration Jatobá Seed; UBJS = Ultrasonic Bath Jatobá Seed; MSJS = Magnetic Stirring Jatobá Seed.

Bark extracts of Jatobá prepared by ultrasonic bath (UBJB; 736.1 mg GAE g⁻¹) presented the highest levels of PT, followed by UBJS (535.7 mg GAE g⁻¹) and, lastly, UBJL (510.6 mg GAE g⁻¹), both statistically similar (Figure 1).

2.2. Determination of Antioxidant Activity

2.2.1. Phosphomolybdenum Complex Reduction Method

Data on the total antioxidant activity of the nine Jatobá extracts determined by the phosphomolybdenum method expressed as milligrams of BHT Equivalent per gram of extract (mg BHTE g⁻¹) are shown in Table 1.

Table 1. Values of total antioxidant activity of Jatobá extracts by the phosphomolybdenum method.

Extracts	Phosphomolybdenum Complex mg BHTE g ⁻¹	A <i>p</i> -Value < 0.05 Was Considered Significant
SMJB	1086.7	(B)
UBJB	1231.0	(A)
MSJB	1218.2	(A)
SMJL	1195.5	(A)
UBJL	1213.4	(A)
MSJL	1135.5	(A)
SMJS	1030.0	(B)
UBJS	1190.3	(A)
MSJS	1218.2	(A)

Mean values followed by the same letter in a column do not differ significantly at 5% probability by the Scott–Knott test. Results are expressed as the mean ± standard deviation (n = 3). SMJB = Static Maceration Jatobá Bark; UBJB = Ultrasonic Bath Jatobá Bark; MSJB = Magnetic Stirring Jatobá Bark; SMJL = Static Maceration Jatobá Leaf; UBJL = Ultrasonic Bath Jatobá Leaf; MSJL = Magnetic Stirring Jatobá Leaf; SMJS = Static Maceration Jatobá Seed; UBJS = Ultrasonic Bath Jatobá Seed; MSJS = Magnetic Stirring Jatobá Seed.

It can be argued that the Jatobá leaf extracts showed a high level of total antioxidant capacity, with statistically similar values of 1213.0, 1195.5, and 1135.5 mg BHTE g⁻¹ being obtained for the three extraction processes. On the other hand, seed (1030.0 mg BHTE g⁻¹) and bark (1086.7 mg BHTE g⁻¹) extracts showed statistically lower values (*p* < 0.05); this indicates that the leaves of this species can be considered an important source of compounds with antioxidant action, which makes them potentially useful for nutrition and pharmaceutical purposes.

In Figure 2, it can be observed that the evaluated extracts demonstrated antioxidant activity, revealing a dependent relationship between absorbance (nm) and concentration. In other words, as the absorbance increases, the concentration of the extract also increases, with the increase in absorbance reflecting the increase in antioxidant activity.

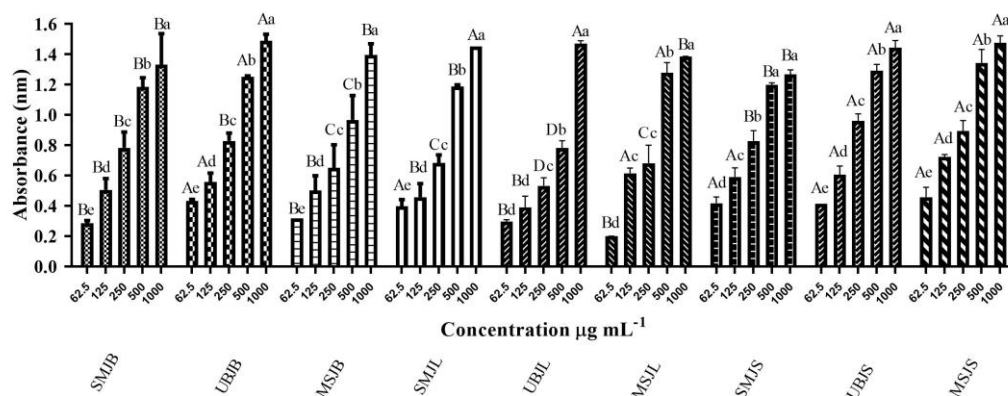


Figure 2. Reducing power of the phosphomolybdenum complex of the selected Jatobá extracts. Results expressed as the mean ± standard deviation (n = 3) at concentrations of 62.5–1000 µg mL⁻¹. Means followed by the same letter do not differ significantly at 5% probability by the Scott–Knott test. Uppercase letters are used to compare the concentration between extracts, and lowercase to compare the concentration within each extract. SMJB = Static Maceration Jatobá Bark; UBJB = Ultrasonic Bath Jatobá Bark; MSJB = Magnetic Stirring Jatobá Bark; SMJL = Static Maceration Jatobá Leaf; UBJL = Ultrasonic Bath Jatobá Leaf; MSJL = Magnetic Stirring Jatobá Leaf; SMJS = Static Maceration Jatobá Seed; UBJS = Ultrasonic Bath Jatobá Seed; MSJS = Magnetic Stirring Jatobá Seed.

2.2.2. Ferric Reducing Antioxidant Power Assay

Table 2 shows data on the total antioxidant activity of the nine Jatobá extracts determined by the reducing power method, expressed in mg BHTE g⁻¹.

Table 2. Values of total antioxidant activity of Jatobá extracts by the reducing power method.

Extracts	Reducing Power mg BHTE g ⁻¹	A <i>p</i> -Value < 0.05 Was Considered Significant
SMJB	636.7	(B)
UBJB	708.1	(B)
MSJB	617.2	(B)
SMJL	418.1	(B)
UBJL	620.0	(B)
MSJL	834.3	(A)
SMJS	721.0	(B)
UBJS	802.0	(A)
MSJS	659.6	(B)

Means followed by the same letter in a column do not differ significantly at 5% probability by the Scott–Knott test. Results are expressed as the mean \pm standard deviation ($n = 3$). SMJB = Static Maceration Jatobá Bark; UBJB = Ultrasonic Bath Jatobá Bark; MSJB = Magnetic Stirring Jatobá Bark; SMJL = Static Maceration Jatobá Leaf; UBJL = Ultrasonic Bath Jatobá Leaf; MSJL = Magnetic Stirring Jatobá Leaf; SMJS = Static Maceration Jatobá Seed; UBJS = Ultrasonic Bath Jatobá Seed; MSJS = Magnetic Stirring Jatobá Seed.

Based on the above data, it was observed that the MSJL extract showed the greatest potential for reducing Fe³⁺, with a value of 834.3 mg BHTE g⁻¹, followed by the UBJS extract (802.0 mg BHTE g⁻¹) ($p < 0.05$). The values found showed that the leaf is an important plant organ for the storage of secondary metabolites with antioxidant potential. Jatobá leaves are known to possess important antioxidant constituents, including flavonoids, such as astilbin, and other phenolic compounds.

The findings showed that absorbance values (nm) increased slightly for concentrations ranging from 62.5 to 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$ and then increased rapidly at a concentration of 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (Figure 3).

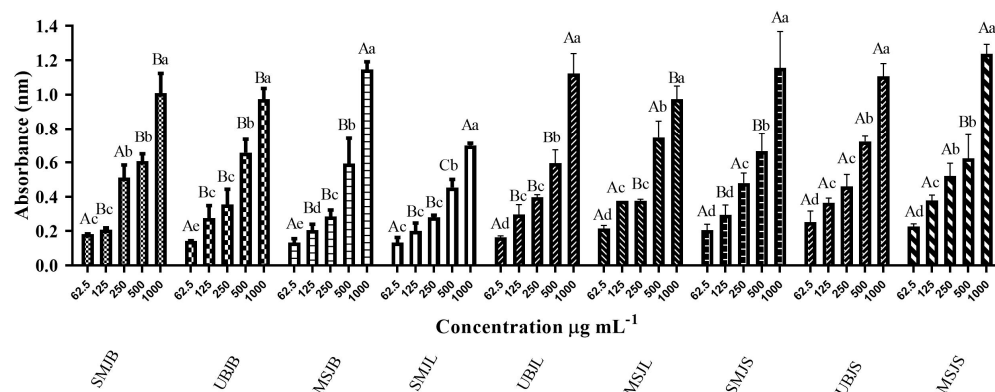


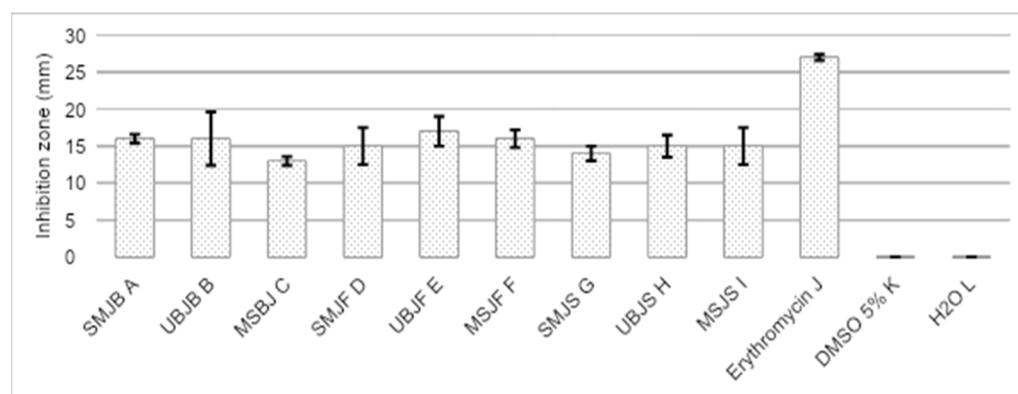
Figure 3. Ferric reducing antioxidant power (FRAP) of the selected Jatobá extracts. Results expressed as the mean \pm standard deviation ($n = 3$) at concentrations of 62.5–1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Means followed by the same letter do not differ significantly at 5% probability by the Scott–Knott test. Uppercase letters are used to compare the concentration between extracts, and lowercase to compare the concentration within each extract. SMJB = Static Maceration Jatobá Bark; UBJB = Ultrasonic Bath Jatobá Bark; MSJB = Magnetic Stirring Jatobá Bark; SMJL = Static Maceration Jatobá Leaf; UBJL = Ultrasonic Bath Jatobá Leaf; MSJL = Magnetic Stirring Jatobá Leaf; SMJS = Static Maceration Jatobá Seed; UBJS = Ultrasonic Bath Jatobá Seed; MSJS = Magnetic Stirring Jatobá Seed.

2.3. Test for Susceptibility to the Antimicrobial Action of Plant Extracts

2.3.1. Disc Diffusion Method

To assess antibacterial activity, the nine Jatobá extracts were tested at a concentration of 500 mg mL⁻¹ against the Gram-positive species *S. aureus* (ATCC 25923) (Scheme 1).

Extracts	Microorganism	
500 mg/ml	<i>S. aureus</i> (ATCC 25923)	Result of antimicrobial activity (mm)
SMJB ^A	(S) 16 ± 0.6	
UBJB ^B	(S) 16 ± 3.6	
MSJB ^C	(S) 13 ± 0.6	
SMJL ^D	(S) 15 ± 2.5	
UBJL ^E	(S) 17 ± 2.0	
MSJL ^F	(S) 16 ± 1.2	
SMJS ^G	(S) 14 ± 1.0	
UBJS ^H	(S) 15 ± 1.5	
MSJS ^I	(S) 15 ± 2.5	
Erythromycin ^J	(S) 27 ± 0.4	
DMSO 5% ^K	R	
H ₂ O ^L	R	



Scheme 1. Top left: Mean of inhibition zones obtained from the disk diffusion tests in millimeters. S = Sensitive, R = Resistant. Data are shown as mean ± standard deviation from triplicate experiments. Top right: Inhibition halos. Letters indicate the correspondence between the extracts and controls and the pictures. Bottom: Graphic representation of the means. SMJB (A) = Static Maceration Jatobá Bark; UBJB (B) = Ultrasonic Bath Jatobá Bark; MSJB (C) = Magnetic Stirring Jatobá Bark; SMJL (D) = Static Maceration Jatobá Leaf; UBJL (E) = Ultrasonic Bath Jatobá Leaf; MSJL (F) = Magnetic Stirring Jatobá Leaf; SMJS (G) = Static Maceration Jatobá Seed; UBJS (H) = Ultrasonic Bath Jatobá Seed; MSJS (I) = Magnetic Stirring Jatobá Seed; (J) = Positive control for *S. aureus*; (K,L) = negative controls.

2.3.2. Broth Microdilution Method

The results of the anti-staphylococcal activity of Jatobá extracts are shown in Table 3. The results presented in this technique showed that the leaf extracts SMJL, UBJL, and MSJL, with MIC of 1.56, 1.56, and 3.12 mg mL⁻¹, respectively, are better inhibitors than bark extracts (SMJB, UBJB, and MSJB), with MIC of 12.5 mg mL⁻¹; this indicates the potential of *H. courbaril* leaves as a potent antibacterial agent.

On the other hand, Jatobá extracts from seeds (SMJS, UBJS, and MSJS) did not show antimicrobial activity against *S. aureus* (ATCC 25923); this can be explained by the fact that the solvent used (96% ethanol) was not able to adequately extract the bioactive compounds from the Jatobá seeds or, better yet, because the compounds of the Jatobá seeds are inactive or unable to penetrate the natural barrier of the cell wall of the bacterium *S. aureus*.

Table 3. Minimum inhibitory concentration (MIC) values of plant extracts and antibiotic correspondence against a strain of *S. aureus*.

Extracts	Microorganism
	<i>S. aureus</i> (ATCC 25923)
	Minimum Inhibitory Concentration (mg/mL)
SMJB ^a	12.5
UBJB ^b	12.5
MSJB ^c	12.5
SMJL ^d	1.56
UBJL ^e	1.56
MSJL ^f	3.12
SMJS ^g	S/A ¹
UBJS ^h	S/A
MSJS ⁱ	S/A
Chloramphenicol ^j	32.0 ± 0.4 µg/mL
DMSO 5% ^k	S/A
H ₂ O ^k	S/A

Data are shown as mean ± standard deviation from triplicate experiments. ^a SMJB = Static Maceration Jatobá Bark; ^b UBJB = Ultrasonic Bath Jatobá Bark; ^c MSJB = Magnetic Stirring Jatobá Bark; ^d SMJL = Static Maceration Jatobá Leaf; ^e UBJL = Ultrasonic Bath Jatobá Leaf; ^f MSJL = Magnetic Stirring Jatobá Leaf; ^g SMJS = Static Maceration Jatobá Seed; ^h UBJS = Ultrasonic Bath Jatobá Seed; ⁱ MSJS = Magnetic Stirring Jatobá Seed; ^j Positive control for *S. aureus*; ^k Negative control; ¹ S/A: No activity.

2.3.3. Anti-Biofilm Activity against *S. aureus*

With the results of the MIC test, the anti-biofilm activity of the most promising extracts (SMJL, UBJL, and MSJL) that showed antibacterial activity with an MIC equal to or less than 3.12 mg mL⁻¹ for *S. aureus* (ATCC 25923) was determined (Figure 4). Different concentrations of the leaf extracts (50 to 1.56 mg mL⁻¹) were prepared; they were inoculated on biofilms of *S. aureus*, and their activity was evaluated through the colorimetric MTT assay.

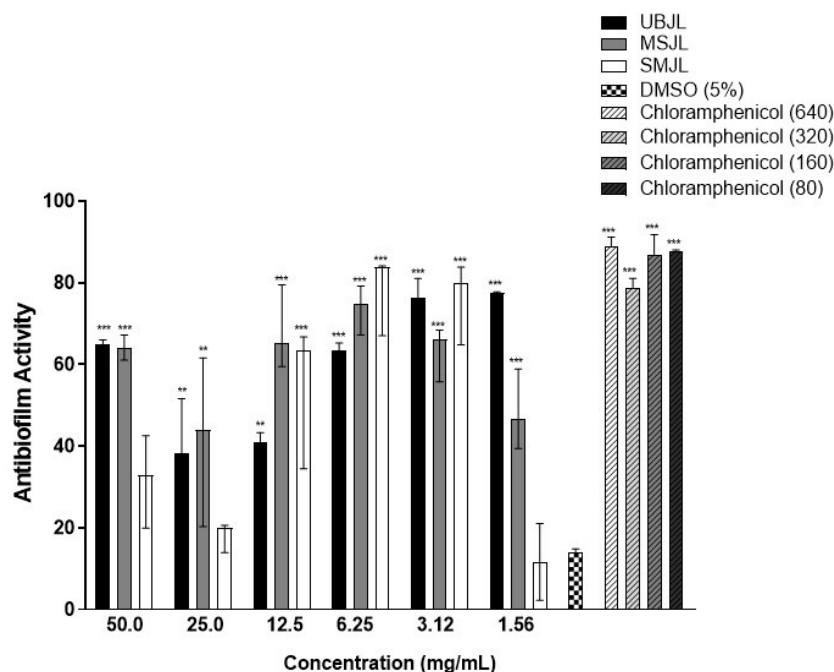


Figure 4. Activity of different concentrations of Jatobá leaf extracts against *S. aureus* biofilm (ATCC 25923). Anti-biofilm activity was calculated as a percentage by comparing the absorbance results (A560) of treated cells with those of untreated cells. The average values for treatment with each extract were compared to the average value for treatment with 5% DMSO (negative control). ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$. UBJL = Ultrasonic Bath Jatobá Leaf; MSJL = Magnetic Stirring Jatobá Leaf; SMJL = Static Maceration Jatobá Leaf.

The three Jatobá leaf extracts (UBJL, MSJL, and SMJL) exhibited good results of biofilm inhibitory activity against *S. aureus*. Among the extracts tested, SMJL, at a concentration of 6.25 mg mL⁻¹, showed the greatest anti-biofilm activity (78.29%) against *S. aureus*. This result is noteworthy since this in vitro anti-biofilm effect was statistically similar to that of chloramphenicol (inhibitory effect of 78.85%) ($p < 0.001$), which is the standard antimicrobial. Furthermore, it should be noted that no previous studies on the anti-biofilm activities of *H. courbaril* (Jatobá) leaf extracts against *S. aureus* have been reported. Thus, our findings are the first of their kind to be reported in the literature.

2.4. UPLC-HRMS/MS Analysis of *H. courbaril* Extracts

In this study, as the Jatobá leaf extracts (SMJL, UBJL, and MSJL) exhibited good results of biofilm inhibitory activity against *S. aureus*, they were selected for chemical profile analysis. Through UPLC-HRMS/MS analysis of SMJL, UBJL, and MSJL extracts, it was possible to obtain detailed chemical profiles and annotate many compounds in *H. courbaril*, especially flavonoids (Table 4) (see Supplementary Material).

Table 4. UPLC-HRMS/MS data of annotated compounds in *H. courbaril* extracts.

R _t (min)	[M – H] [–] (m/z)	[M + H] ⁺ (m/z)	Molecular Formula	MS/MS (MS ²)	Proposed Compounds
SMJL ^a					
0.60	341.0149	-	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	179.0089	Sucrose (1)
0.60	179.0089	-	C ₆ H ₁₂ O ₆	161.0020, 149.0117, 142.9959, 131.0033, 119.0040, 100.9987, 89.0012, 70.9955	Hexose (2)
5.27	607.9508	-	C ₂₈ H ₃₂ O ₁₅	299.9359	Chrysoeriol-7- <i>O</i> -rutinoside (3) or Chrysoeriol-7- <i>O</i> -neohesperidoside (4)
5.28	609.9561	-	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	301.9397	Rutin (5)
5.62	593.0129	-	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	285.9650	Kaempferol-3- <i>O</i> -rutinoside (6)
5.68	623.0092	-	C ₂₈ H ₃₂ O ₁₆	315.9617	Isorhamnetin-3- <i>O</i> -rutinoside (7)
5.78	477.9869	-	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₂	315.9658, 299.9429, 270.9479	Isorhamnetin-3- <i>O</i> -glucoside (8)
7.38	313.9497	-	C ₁₇ H ₁₄ O ₆	298.9301, 270.9445	Chrysoeriol-5-methyl ether (9)
7.38	329.9728	-	C ₁₇ H ₁₄ O ₇	314.9513, 299.9359	3,7-Di- <i>O</i> -methylquercetin (10)
8.37	317.1195	-	C ₁₅ H ₁₀ O ₈	289.1298	Myricetin (11)
14.19	633.3182	-	C ₂₈ H ₂₆ O ₁₇	305.1683	Epigallocatechin-3- <i>O</i> -gallate-3'- <i>O</i> - glucuronide (12)
5.37	-	633.7400 [M + Na] ⁺	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	465.5418, 303.3375	Rutin (5)
5.49	-	487.5446 [M + Na] ⁺	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	303.3339	Quercetin-3- <i>O</i> -glucoside (13)
5.74	-	317.3806	C ₁₆ H ₁₂ O ₇	302.3412	Isorhamnetin (14)
UBJL ^b					
0.60	341.0376	-	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	179.0199	Sucrose (1)
0.60	179.0199	-	C ₆ H ₁₂ O ₆	161.0124, 149.0217, 143.0057, 131.0127, 119.0107, 101.0049, 89.0070, 71.0007	Hexose (2)
5.26	607.9912	-	C ₂₈ H ₃₂ O ₁₅	299.9536	Chrysoeriol-7- <i>O</i> -rutinoside (3) or Chrysoeriol-7- <i>O</i> -neohesperidoside (4)
5.26	609.9966	-	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	301.9610	Rutin (5)
5.67	623.0296	-	C ₂₈ H ₃₂ O ₁₆	315.9726	Isorhamnetin-3- <i>O</i> -rutinoside (7)

Table 4. Cont.

R _t (min)	[M – H] [–] (m/z)	[M + H] ⁺ (m/z)	Molecular Formula	MS/MS (MS ²)	Proposed Compounds
6.71	285.9754	-	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	150.9716, 132.9994	Luteolin (15)
7.38	313.9642	-	C ₁₇ H ₁₄ O ₆	298.9443, 270.9580	Chrysoeriol-5-methyl ether (9)
7.38	329.9876	-	C ₁₇ H ₁₄ O ₇	314.9695, 299.9500	3,7-Di-O-methylquercetin (10)
5.28	-	633.1422 [M + Na] ⁺	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	465.1071, 303.0519	Rutin (5)
5.40	-	487.0886 [M + Na] ⁺	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	303.0519	Quercetin-3-O-glucoside (13)
5.67	-	317.0632	C ₁₆ H ₁₂ O ₇	302.0388	Isorhamnetin (14)
MSJL ^c					
0.60	341.0451	-	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	179.0253	Sucrose (1)
0.60	179.0253	-	C ₆ H ₁₂ O ₆	161.0176, 143.0105, 131.0150, 119.0151, 101.0069, 89.0090, 71.0024	Hexose (2)
5.28	609.0568	-	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	301.9893	Rutin (5)
5.67	623.1573	-	C ₂₈ H ₃₂ O ₁₆	315.0493	Isorhamnetin-3-O-rutinoside (7)
7.39	329.0812	-	C ₁₇ H ₁₄ O ₇	314.0585, 299.0328	3,7-Di-O-methylquercetin (10)
14.18	633.5037	-	C ₂₈ H ₂₆ O ₁₇	305.2577	Epigallocatechin-3-O-gallate-3'-O-glucuronide (12)

^a SMJL = Static Maceration Jatobá Leaf; ^b UBJL = Ultrasonic Bath Jatobá Leaf; ^c MSJL = Magnetic Stirring Jatobá Leaf.

Our findings describe, for the first time, the annotation of the compounds chrysoeriol-7-O-neohesperidoside (4), isorhamnetin-3-O-glucoside (8), 3,7-di-O-methylquercetin (10), and myricetin (11) in the leaves of *H. courbaril* (Figure 5).

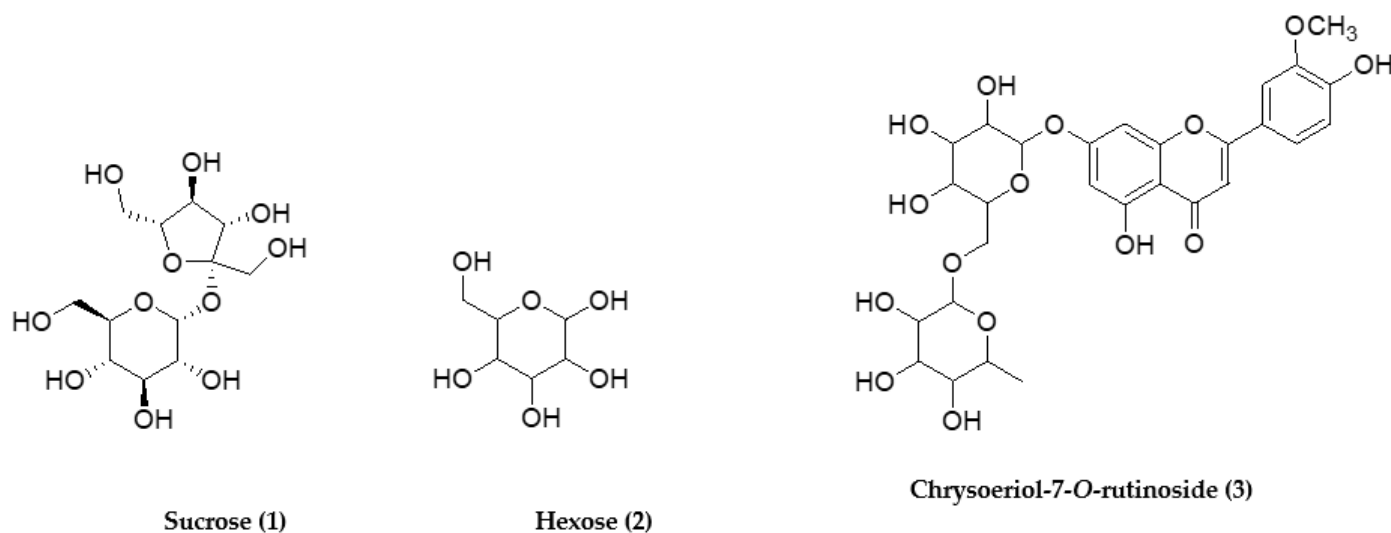
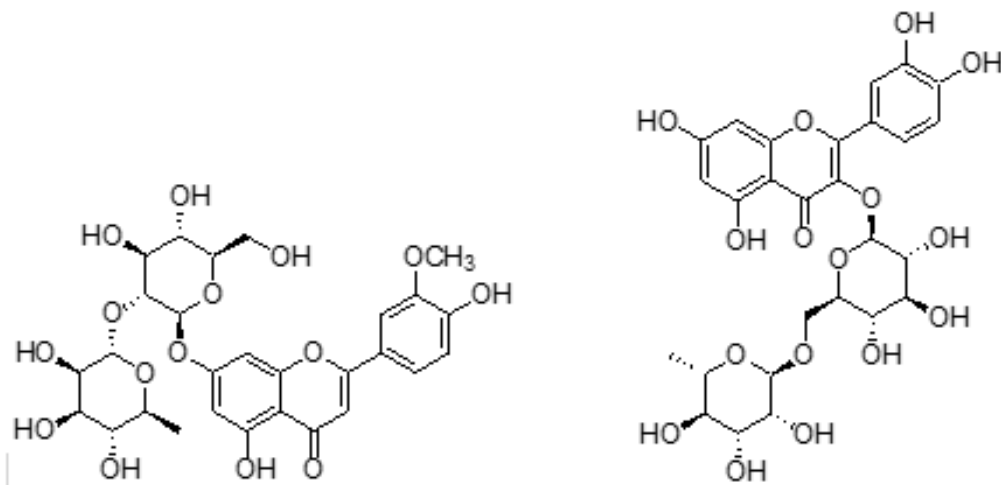
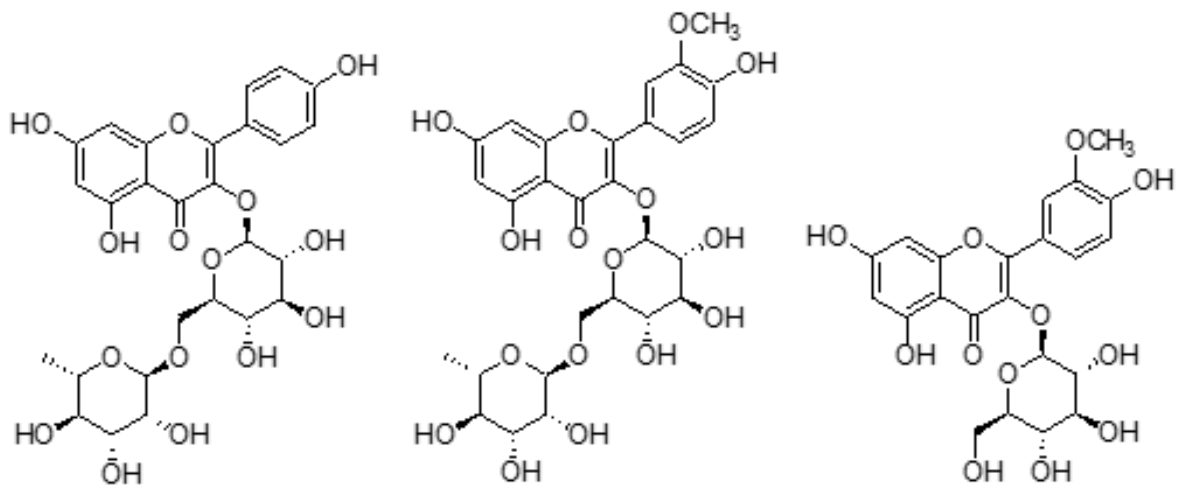
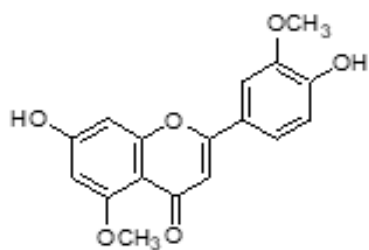
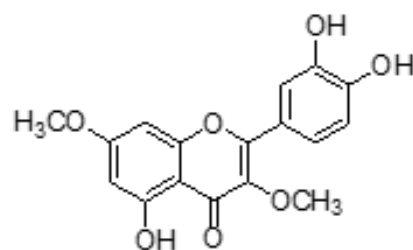
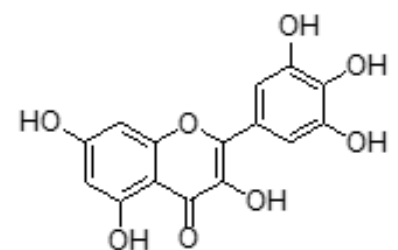


Figure 5. Cont.

**Chrysoeriol-7-O-neohesperidoside (4)****Rutin (5)****Kaempferol-3-O-rutinoside (6)****Isorhamnetin-3-O-rutinoside (7)****Isorhamnetin-3-O-glucoside (8)****Chrysoeriol-5-methyl ether (9)****3,7-Di-O-methylquercetin (10)****Myricetin (11)****Figure 5. Cont.**

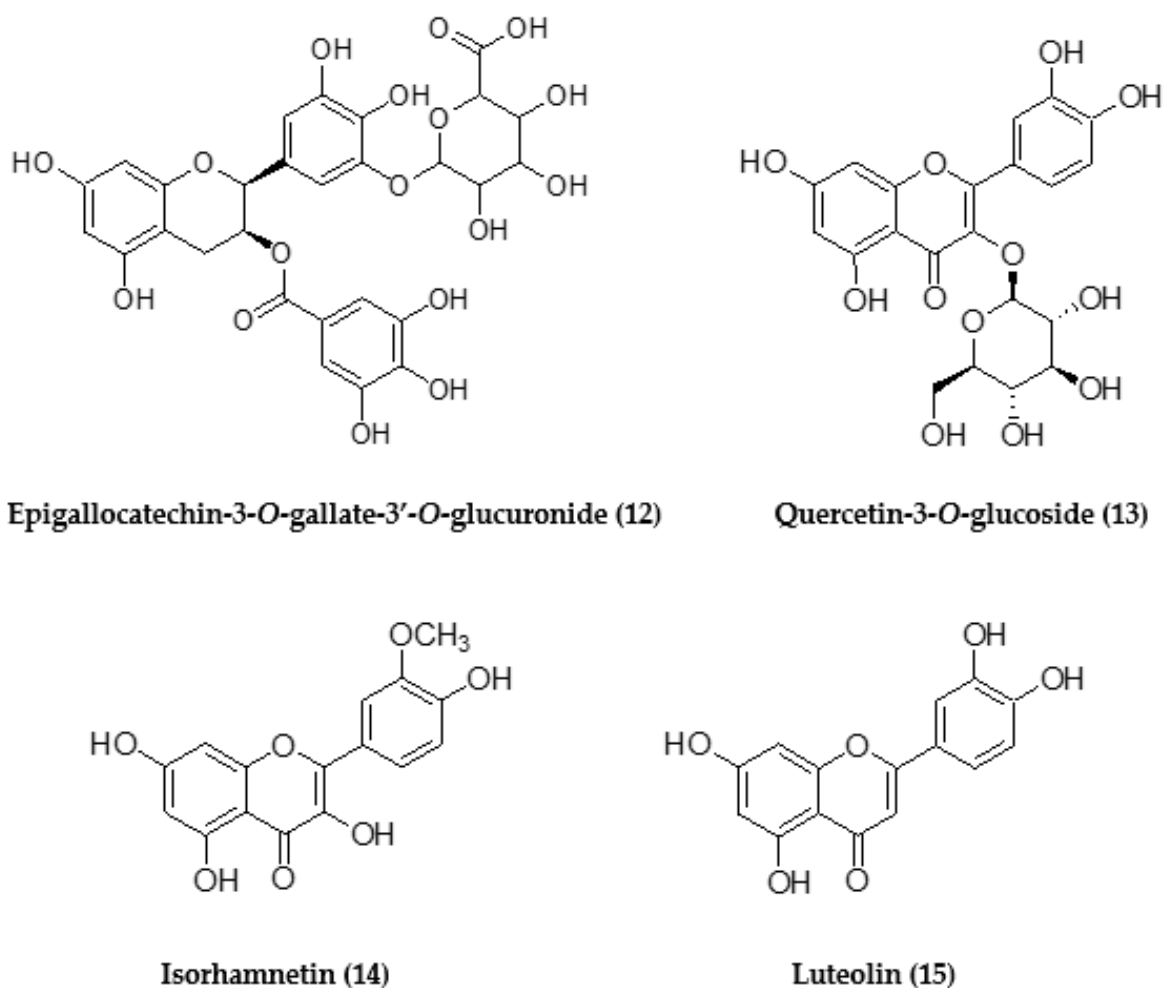


Figure 5. Annotated compounds in *H. courbaril* leaf extracts.

3. Discussion

The antioxidant, antimicrobial, and anti-biofilm properties of different *H. courbaril* extracts were investigated in our work, and the extracts that exhibited good biofilm inhibitory activity against *S. aureus* were also selected for UPLC-HRMS/MS chemical analyses.

Phenolic compounds are reported to have important therapeutic activity, such as antitumor action, and they may also act in the prevention of illnesses, such as cardiovascular disease, Alzheimer's, Parkinson's, cataracts, and diabetes [11–13]. Also, phenolic compounds are highly effective scavengers of most oxidizing molecules, including singlet oxygen and various free radicals implicated in diverse diseases [14,15]. Thus, phenolics are an important class of natural products with possible antioxidant action.

According to our results, a significant amount of phenolic content was detected in Jatobá extracts. Currently, special attention is given to natural products with an antioxidant function that may reduce oxidative stress and may be used in the treatment of infectious and/or inflammatory diseases [16].

Previous studies conducted with other plant species have shown a positive correlation between plant phenolic content and antioxidant properties [14,15], suggesting that the antioxidant action may be related to the phenolic content. Phenols may act as antioxidants not only because of their ability to donate hydrogen or electrons and chelating metals but also because of their stable intermediate radicals, which prevent oxidation [14].

Our findings demonstrated that at the lowest tested concentrations, all Jatobá extracts have free radical-scavenging metabolites with antioxidant activity, which are also correlated with the PT content in the extracts. Previous studies have shown that other *Hymenaea*

species have interesting antioxidant capacity. In addition, Maranhão et al. [17] showed that quercetin, a flavonoid identified in *H. stignocarpa* heartwood extract, revealed promising antioxidant effects.

Our findings demonstrated that all Jatobá extracts exhibited high antioxidant capacity, except for seed extract, which presented weaker antioxidant properties in comparison with those from the leaves and bark. The leaves and stem bark, due to greater external environmental influences, may have a high content of phenolic compounds, which may confer selective advantages and defense mechanisms against microbial attacks, insect predation, and herbivorous animals [18].

Also, it was observed that the efficiency of extracting antioxidant compounds from the leaves was in the order of MS > UB > SM. Therefore, magnetic stirring, which promotes a homogeneous mixture and faster extraction [19], was more efficient for extracting the antioxidants present in Jatobá leaves. Another advantage of magnetic stirring is the use of room temperature, which may prevent the degradation of thermolabile metabolites [19]. However, the ultrasonic bath was more efficient for extracting antioxidant compounds from bark. As bark has high mechanical resistance, the ultrasonic bath causes cavitations and mechanical stress on the bark cells, increasing the capacity for mass transfer and cell rupture [20], which may improve the extraction of compounds. Therefore, the efficiency of the method used for extracting antioxidant compounds depends on which sample is used. If leaves are used, magnetic stirring is the best method, and if bark or seed are used, an ultrasonic bath guarantees better extraction.

Thus, in this context, Jatobá extracts are potentially effective in combating free radicals in humans, which are said to be involved in the genesis or development of various diseases via oxidative stress [15].

In addition, species of the genus *Hymenaea*, including *H. courbaril*, are popularly used in phytotherapy for the treatment of bacterial infections [6,7,21]. Therefore, the antibacterial activity of Jatobá extracts against *S. aureus* was also investigated. Our results showed that the leaf and bark extracts were active.

According to Chavasco et al. [22], plant products with antimicrobial activity at an MIC of less than 100 mg mL⁻¹ are considered relevant for therapeutic applications. Thus, our antibacterial results showed the antibacterial potential of both Jatobá bark and leaf extracts, which exhibited action against *S. aureus* at concentrations lower than 100 mg mL⁻¹. Interestingly, the Jatobá bark extracts SMJB, and UBJB showed antibiotic action against the *S. aureus* strain (ATCC 25923). These results are in agreement with those of Fernandes et al. [23], who reported the antibacterial properties of the hydroethanolic extract of the inner bark of *H. courbaril* against *S. aureus* (ATCC 10495).

Nevertheless, as the best antibacterial activity in the MIC test was found for the Jatobá leaf extracts, these were assayed in the anti-biofilm capacity of *S. aureus* since microbial biofilms increase bacterial resistance to various antimicrobial agents [2,3]. In this regard, investigation of the anti-biofilm effects of bioactive natural substances, such as Jatobá extracts, remains of interest. Also, no previous studies on the anti-biofilm activities of *H. courbaril* leaf extracts against *S. aureus* have been reported.

In the anti-biofilm capacity assay, all Jatobá leaf extracts presented good results of biofilm inhibitory activity against *S. aureus*. Among them, the SMJL extract showed the best anti-biofilm activity, with an anti-biofilm effect statistically comparable to that of chloramphenicol.

The antibacterial activity of *H. courbaril* leaf extracts against the *S. aureus* strain can be correlated with their chemical composition. Previous studies of this plant showed the presence of the flavonoid fisetin as the major compound that showed recognized antimicrobial properties [6]. In *H. courbaril*, there is a wide variety of antimicrobial agents, including phenolic and flavonoid compounds. Catechin and dihydrokaempferol-glucoside have been reported in the bark, while astilbin and epicatechin are found in the leaves of this plant [7]. Flavonoids are one of the main compounds responsible for antimicrobial

activity, whose mechanism of action may be due to their ability to form complexes with the bacterial cell wall [24].

Our chemical characterization of the active Jatobá leaf extracts (SMJL, UBJL, and MSJL) by UPLC-HRMS/MS analysis showed detailed chemical profiles and the annotation of many compounds, especially phenolics and flavonoids, such as luteolin, rutin, and myricetin.

Some of the annotated compounds in the Jatobá leaf extracts have been previously reported in the genus *Hymenaea*, such as epigallocatechin-3-*O*-gallate-3'-*O*-glucuronide (12) [25] and luteolin (15), which were isolated from the leaves of *H. palustris* and demonstrated inhibitory activity against Gram-negative pathogens, such as *Neisseria gonorrhoeae* [26]. On the other hand, we are describing, for the first time, the annotation of the compounds chrysoeriol-7-*O*-neohesperidoside (4), isorhamnetin-3-*O*-glucoside (8), 3,7-di-*O*-methylquercetin (10), and myricetin (11) in the leaves of *H. courbaril*.

Also, previous studies have shown that some of the flavonoids that were annotated in *H. courbaril* extracts display promising antimicrobial properties that may contribute to the antibacterial activity of *H. courbaril* extracts against *S. aureus* biofilm, such as rutin (5) [27,28], myricetin (11) [29], and luteolin (15) [30].

Furthermore, our phytochemical investigation revealed that phenolic compounds were present at high concentrations in the leaf extracts. This observation may explain the anti-biofilm activity against the *S. aureus* strain since phenols are one of the main plant metabolites with good antimicrobial properties [16]. In this sense, the mechanisms of phenolic activity against microorganisms may include enzymatic inhibition and nonspecific interactions with membrane proteins [31]. However, as plant extracts comprise many components, it is expected that their mechanisms of action may involve multiple targets in bacterial cells rather than a single mechanism [32]. Thus, in our study, we believe that the bactericidal action against *S. aureus* may also be due to a synergism among all compounds in the extracts, especially phenolics.

Therefore, our results suggest that the phenolic compounds found in Jatobá extracts, especially flavonoids, are related to their antibacterial activity against *S. aureus*, although the effects of other possible active metabolites in *H. courbaril* cannot be discarded.

4. Material and Methods

4.1. Collection and Identification of Plant Material

The leaves, bark, and seeds of *H. courbaril* were collected on 14 December, 2020, at Rua Feliciano Donato de Macedo, Maravilha, Uberlândia, MG, 38401-844, Brazil (18°53'11.9" S, 48°18'20.1" W). The plant materials were identified by the agronomist, Prof. Dr. Terezinha Aparecida Teixeira. The specimen was registered and deposited in the Herbarium of the Federal University of Uberlândia (UFU) under the number HUFU 81526.

4.2. Preparation of Powdered Plant Material

Leaves, bark, and seeds of *H. courbaril* were first washed in water to remove impurities, and then all materials were stored separately in an ultra-freezer (Coldilab[®], Piracicaba, SP, Brazil) at a temperature of −80 °C. In order to obtain crude extracts, plant materials were removed from the ultra-freezer and quickly placed to dry in a lyophilizer (Liotop[®] L101, São Carlos, SP, Brazil) for a period of 72 h, followed by crushing in a mill with knives (Willey[®] Star FT50, Piracicaba, SP, Brazil) into a fine powdered state.

4.3. Preparation of *H. courbaril* Extracts

4.3.1. Extracts Obtained by Ultrasonic Bath Extraction

Powdered bark (4.95 g), leaves (4.86 g), and seeds (4.91 g) of Jatobá (*H. courbaril*) were separately submitted to extraction in an ultrasonic bath (Sanders Medical[®]—SoniClean 6, Santa Rita do Sapucaí, MG, Brazil), using 100 mL of 96% ethanol (Sigma[®], St. Louis, MO, USA) as a solvent [33], at a fixed temperature of 40 °C, for 15 min, performed in three cycles. After filtration, the solvent was removed via rotary evaporation (Fisatom[®], Perdizes, SP,

Brazil) at 50 °C to yield crude extracts of Jatobá bark (UBJB, 3.36 g), leaves (UBJL, 3.59 g), and seeds (UBJS, 2.97 g). Finally, the crude extracts UBJB, UBJL, and UBJS were lyophilized, placed in 50-mL Falcon tubes, and stored in a refrigerator (4 °C).

4.3.2. Extracts Obtained by Magnetic Stirring

Powdered bark (4.80 g), leaves (4.92 g), and seeds (4.87 g) of Jatobá (*H. courbaril*) were placed separately in 500-mL amber bottles, and 100 mL of 96% ethanol (Sigma[®], St. Louis, MO, USA) was added, followed by constant stirring on a magnetic stirrer (Marconi[®] MA-085L, Piracicaba, SP, Brazil) at 1200 rpm, protected from light, at room temperature (25 °C), for 24 h. Immediately after, the extracts were filtered separately under vacuum and dried on a rotary evaporator (Fisatom[®], Perdizes, SP, Brazil) at 50 °C. At the end of rotary evaporation, to remove residual water, Jatobá bark (MSJB, 2.95 g), leaf (MSJL, 3.75 g), and seed (MSJS, 3.24 g) extracts obtained by magnetic stirring were placed in a lyophilizer (Liotop[®] L101, São Carlos, SP, Brazil) for 24 h. The final preparations were placed in 50-mL Falcon tubes and stored in a refrigerator (4 °C).

4.3.3. Extracts Obtained by Static Maceration

Powdered bark (4.95 g), leaves (4.93 g), and seeds (4.90 g) of Jatobá (*H. courbaril*) were placed separately in 500-mL amber bottles, and then 100 mL of 96% ethanol (Sigma[®], St. Louis, MO, USA) was added and the bottles left to rest, protected from light, at room temperature (25 °C), for 24 h. This procedure was repeated three times for maximum extraction (depletion) of all compounds by the solvent. Then, the extracts were vacuum-filtered and dried in a rotary evaporator (Fisatom[®], Perdizes, SP, Brazil) at 50 °C. At the end of rotary evaporation, to remove the remaining water, Jatobá bark (SMJB, 3.01 g), leaf (SMJL, 3.62 g), and seed (SMJS, 3.40 g) extracts obtained by static maceration were lyophilized (Liotop[®] L101, São Carlos, SP, Brazil) for 24 h. The final preparations were placed in 50-mL Falcon tubes and stored in a refrigerator (4 °C).

4.4. Determination of PT Content

An aliquot of 0.5 mL of the diluted sample (50 g L⁻¹) of each extract of Jatobá bark (UBJB, MSJB, SMJB), leaves (UBJL, MSJL, SMJL), and seeds (UBJS, MSJS, SMJS) was mixed with 2.5 mL of Folin–Ciocalteu reagent (Sigma; 0.2 mol L⁻¹) [34]. Subsequently, 2 mL of saturated sodium carbonate solution (Sigma; 75 g L⁻¹) was added to the reaction mixture. Absorbance readings were taken at 760 nm after incubation at room temperature for 2 h. Gallic acid (Neon[®], Suzano, SP, Brazil) was used as a reference standard, and the results were expressed in milligrams of gallic acid equivalent (mg GAE) per gram of dry weight of plant material. All tests were performed in triplicate.

4.5. Analysis of Antioxidant Activity

4.5.1. Phosphomolybdenum Complex Reduction Method

To prepare the reaction medium, an aliquot of 100 µL of each extract of Jatobá bark (UBJB, MSJB, SMJB), leaves (UBJL, MSJL, SMJL), and seeds (UBJS, MSJS, SMJS) at a concentration of 100 µL mL⁻¹ was conditioned in test tubes, and then 1 mL of the reagent (0.6 M sulfuric acid; 28 mM sodium phosphate, and 4 mM ammonium molybdate; Sigma) was added to the same tubes [35]. The tubes were capped and incubated in a water bath (Cientec[®], Belo Horizonte, MG, Brazil) at 95 °C for 60 min. After the test tubes were cooled, readings were performed in a spectrophotometer (Gehaka[®] UV-340G, São Paulo, SP, Brazil) at 695 nm. The values were compared with a standard curve of several concentrations of the synthetic antioxidant BHT (butylhydroxytoluene; Sigma) (1000, 500, 250, 125, and 62.5 µg mL⁻¹). The results were expressed in milligrams of BHT Equivalent per gram of dry weight of plant material (mg BHTE g⁻¹).

4.5.2. Ferric Reducing Power Test

Antioxidant activity was evaluated through the method of reducing power according to the methodology of Oyaizu [36]. An aliquot of 100 μL of each extract of Jatobá bark (UBJB, MSJB, SMJB), leaves (UBJL, MSJL, SMJL), and seeds (UBJS, MSJS, SMJS) at a concentration of 100 $\mu\text{L mL}^{-1}$ was conditioned in test tubes, and then 1 mL each of 0.2 M phosphate buffer pH 6.0 and 1% potassium ferrocyanide aqueous solution was added to the same tubes. After 20 min of incubation in a water bath at 50 °C (Cientec[®]), 1 mL of 10% trichloroacetic acid was added to the mixture. Then, 3 mL of distilled water and 600 μL of 0.1% ferric chloride were added. Readings were performed using a spectrophotometer (Gehaka[®]) at 700 nm. The values were compared with a curve of several concentrations of the synthetic antioxidant BHT (Sigma[®]) (1000, 500, 250, 125, and 62.5 $\mu\text{g mL}^{-1}$). The results were expressed in milligrams of BHT Equivalent per gram of extract (mg BHTE g^{-1}).

4.6. Evaluation of the Antimicrobial Activity of Extracts by Disk Diffusion in Agar

The microorganism used to screen for sensitivity to plant extracts was *S. aureus* (ATCC 25923). The disk diffusion method in agar was used according to the standards described by the Clinical and Laboratory Standards Institute [37]. Bacteria were kept on tryptone soy agar (TSA; Kasvi[®], São Paulo, SP, Brazil), incubated for 24 h at 37 °C, resuspended in sterile 0.85% saline solution, and adjusted according to the 0.5 McFarland standard (10^8 CFU mL^{-1}).

The suspension containing the bacteria was homogeneously inoculated in Petri dishes containing 70 mL of Mueller–Hinton agar (MHA; bioMérieux[®], Jacarepaguá, RJ, Brazil). After 15 min, sterile filter paper discs (6 mm in diameter) containing 10 μL of fractions diluted to 500 mg mL^{-1} were deposited on the surface of the culture medium, with a minimum distance of 24 mm between them, and the plates were then incubated at 37 °C for 24 h. The tests were performed in triplicate. For the experiment, 15 μg of the antibiotic erythromycin (Cecon[®], São Paulo, SP, Brazil) was used as a positive control for *S. aureus*, and the compounds 96% ethanol (Sigma) and 5% DMSO (Sigma) were used as negative controls.

4.7. Determination of Minimum Inhibitory Concentration (MIC) by Broth Microdilution

The extracts of Jatobá bark (UBJB, MSJB, SMJB) and leaves (UBJL, MSJL, SMJL) that presented antibacterial activity in the preliminary assessment were subjected to MIC determination by the broth microdilution technique [37,38]. Tests were performed in Mueller–Hinton medium (MHB; bioMérieux) in a sterile 96-well plate. An aliquot of 10 μL of each plant extract of Jatobá bark (UBJB, MSJB, SMJB) and leaves (UBJL, MSJL, SMJL) at concentrations of 1.562, 3.125, 6.25, 12.5, 25 and 50 mg mL^{-1} was deposited in each well containing MHB and microorganism suspension to a final volume of 200 μL per well. For the experiment, 5% DMSO (Sigma) was added as a negative control and 30 mg mL^{-1} chloramphenicol (Cecon) as a positive control.

All plates were incubated at 37 °C for 24 h. To indicate bacterial growth, 10 μL of bromide in methylthiazolyldiphenyl tetrazolium (MTT; Sigma) at 0.2 mg mL^{-1} was added to each well and incubated for 4 h. The MIC was defined as the lowest fractional concentration able to inhibit microbial growth.

4.8. Biofilm Inhibition Assay Performed In Vitro

The anti-biofilm assay was a minor modification of the method reported by Brambilla et al. [39]. Biofilms of *S. aureus* (ATCC 25923) were formed in 96-well polystyrene microtiter plates. A suspension in 100 μL that contained 10^8 cells mL^{-1} in tryptone soy broth (TSB; Kasvi) was inoculated into the wells and incubated at 37 °C for 24 h under agitation at 120 rpm. The well contents were discharged, and the wells were washed with 0.9% saline. Dilutions of Jatobá leaf extracts (UBJL, MSJL, SMJL) at concentrations of 50, 25, 12.5, 6.25, 3.12, and 1.56 mg mL^{-1} and the standard drug chloramphenicol as a positive control (Cecon) at concentrations of 640, 320, 160, and 80 $\mu\text{L mL}^{-1}$ were then added to each well. After incubation at 37 °C for 24 h, the wells were washed with 0.9% saline solution. The MTT reduction assay (Sigma) was performed to assess the viability of biofilms. MTT

solution (50 μL ; 2 mg mL^{-1} ; Sigma) was added to each well, and the plates were incubated at 37 °C for 2 h. After color development, the solution in MTT was removed from each well, and 100 μL of 5% DMSO (Sigma) was added to dissolve the MTT crystals (Sigma). Subsequently, 100 μL of the resulting-colored solution was transferred to a new plate, and the optical density was measured at 560 nm using a microplate reader (Multiskan™ FC, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). The assays were performed in triplicate.

The standard antibiotic (chloramphenicol at concentrations of 640, 320, 160, and 80 $\mu\text{g mL}^{-1}$; Sigma) was used as a positive control for biofilm prevention, 5% DMSO (Sigma), TSB medium (Kasvi®), and half TSB (Kasvi) in wells without bacterial inoculum was used as the negative control, treatment control, and sterility control, respectively.

The absorbance obtained is inversely proportional to the anti-biofilm activity, which was calculated using the values of the wells treated with the different concentrations of the extracts and the values of wells to which only TSB medium (treatment control; Kasvi) was added, using the following formula:

$$AA (\%) = \left(1 - \frac{DO_{ext} - DO_b}{DO_{ct} - DO_b} \right) \times 100$$

where:

AA (%) = anti-biofilm activity as a percentage;

DO_{ext} = average optical density of treatment with extracts at many different concentrations;

DO_b = median optical density of wells without the addition of reagents (white);

DO_{ct} = average optical density of the control treatment.

4.9. UPLC-HRMS/MS Analysis

The leaf extracts of Jatobá obtained by the static maceration (SMJL), ultrasonic bath (UBJL), and magnetic stirring (MSJL) methods were analyzed by ultra-performance liquid chromatography (UPLC) using an ACQUITY UPLC system (Waters Corporation, Milford, MA, USA) equipped with a binary pump, in-line degasser, and autosampler coupled to an electrospray ionization quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometer (ESI-QTOF-MS/MS) (Waters Corporation, Milford, MA, USA). The samples were dissolved in methanol (10 mg mL^{-1}), centrifuged at 10,000 rpm, and filtered with a 0.22- μm filter, and 5 μL was injected at a flow rate of 0.4 mL min^{-1} . Chromatographic analysis was performed on a BEH C18 column (100 mm \times 2.1 mm, 1.7 μm ; Milford, MA, USA), and the mobile phase consisted of 0.1% formic acid (A) and LC-grade acetonitrile (B) with the following gradient profiles: 0–2 min, 5% B; 2–14 min, 5%–98% B; 14–16 min, 98% B; and 16–20 min, 98–5% B. Mass spectrometry analysis was performed with a XEVO G2S QTOF mass spectrometer (Waters Corporation, Milford, MA, USA) equipped with an ESI ionization source, operated in negative and positive modes. The capillary voltage was 3.0 kV, the lowest collision energy was 6 eV, and the highest collision energy was 15 to 30 eV. The ion source temperature was 120 °C, and the desolvation temperature was 450 °C. Nitrogen was used as a source of desolvation gas (800 L h^{-1}) and cone gas (50 L h^{-1}). For accurate mass measurements, data were centered during acquisition and 200 pg mL^{-1} leucine-enkephalin (m/z 565.2771) (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany), dissolved in acetonitrile/0.1% formic acid (50:50, v/v), was continuously infused as an external reference (LockSpray™) into the ESI source with automatic mass correction enabled. The full scan acquisition was in the mass range m/z 100–1000, and the acquired data were processed using the ChromaLynx™ application manager with MassLynx™ 4.1 software (Waters Corporation, Milford, MA, USA). The MS² spectra were compared with literature and online databases such as PubChem, ChemSpider, and MassBank.

4.10. Statistical Analysis

For the evaluation of PT content and antioxidant activity, the experiment was arranged in a completely randomized design for the nine types of extracts: bark (UBJB, MSJB, SMJB),

leaves (UBJL, MSJL, SMJL), and seeds (UBJS, MSJS, SMJS), in three replicates. The statistical program used was the Analysis System of Variance for Balanced Data (Sisvar), and the data were submitted for analysis of variance and the means compared with a Scott–Knott test at the 5% probability level.

GraphPad Prism (v.5) software was used to analyze the results of the anti-biofilm test. Means and standard deviations were calculated for each of the treatments and compared with the results found for the group treated with 5% DMSO (negative control; Sigma). The distribution from dice was evaluated, and the comparison between groups fulfilled the assumptions of ANOVA and Tukey's post hoc test for multiple comparisons. Differences were considered statistically significant at $p < 0.05$.

5. Conclusions

The prevalence of phenolic compounds observed in the *H. courbaril* extracts provides evidence that this plant is a potential source of metabolites with reducing power. The results of the phosphomolybdenum assay showed that Jatobá leaf extracts efficiently inhibited free radicals in vitro. Also, SMJL, UBJL, and MSJL extracts exhibited biofilm-forming inhibitory activity against *S. aureus* similar to standard drugs, indicating their potential to be used as anti-biofilm agents. Furthermore, our results suggest that some of the bioactive compounds annotated in *H. courbaril* leaf extracts by UPLC-HRMS/MS analysis, such as flavonoids, may contribute to the antibacterial activity against *S. aureus* biofilm. Moreover, our findings give support for the medicinal use of Jatobá in the treatment of infections caused by *S. aureus* and suggest that *H. courbaril* leaf extracts may represent an alternative to overcome the disturbing phenomenon of antimicrobial resistance in biofilms. Finally, even though *H. courbaril* leaf extracts may be considered promising natural samples against *S. aureus* biofilms; further clinical and antibacterial studies are needed.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at <https://www.mdpi.com/article/10.3390/antibiotics12111601/s1>, Figures S1–S31: LC-MS data of Jatoba extracts.

Author Contributions: Conceptualization, J.E.R.d.C.; Data curation, J.E.R.d.C., R.B.B. and E.A.F.; Formal analysis, J.E.R.d.C., H.C.S., M.d.S.G., G.R.O.e.F., E.A.F. and E.R.M.; Acquisition of financing, A.A.d.S.F., G.R.O.e.F. and E.R.M.; Investigation, J.E.R.d.C., R.B.B., C.M.L. and E.R.M.; Methodology, A.A.d.S.F. and E.R.M.; Project administration, M.d.S.G. and A.A.d.S.F.; Resources, A.M.d.N. and E.R.M.; Programs, M.d.S.G., C.M.L., E.A.F. and E.R.M.; Supervision, M.d.S.G., G.R.O.e.F., A.A.d.S.F. and E.R.M.; Validation, H.C.S. and E.R.M.; Visualization, A.M.d.N. and C.M.L.; Writing—original draft, H.C.S., R.B.B., G.R.O.e.F., A.A.d.S.F. and E.R.M.; Writing—review and editing, J.E.R.d.C., M.d.S.G., G.R.O.e.F., A.A.d.S.F. and E.R.M. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by FAPEMIG, grant numbers APQ-00705-22 and APQ-03773-22 and the APC was funded by PROPP-UFU.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: The data presented in this study are available in the article and supplementary material.

Acknowledgments: The authors are grateful to CAPES and CNPq for fellowships, as well as to Laboratório Multiusuário de Bioprodutos e Bioprocessos (CENTRALBIO/UFJF) for UPLC-ESI-QTOF-MS/MS analysis.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Shankar, P.; Palaian, S. Book Review: Responsible Use of Medicines—A Layman's Handbook. *Arch. Pharm. Pract.* **2016**, *7*, 109. [CrossRef]
2. Jara, M.C.; Frediani, A.V.; Zehetmeyer, F.K.; Bruhn, F.R.P.; Müller, M.R.; Miller, R.G.; Nascente, P.D.S. Multidrug-Resistant Hospital Bacteria: Epidemiological Factors and Susceptibility Profile. *Microb. Drug Resist.* **2021**, *27*, 433–440. [CrossRef] [PubMed]

3. Schilcher, K.; Horswill, A.R. Staphylococcal Biofilm Development: Structure, Regulation, and Treatment Strategies. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2020**, *84*, 10–1128. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Ben Abdallah, F.; Lagha, R.; Gaber, A. Biofilm Inhibition and Eradication Properties of Medicinal Plant Essential Oils against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Clinical Isolates. *Pharmaceuticals* **2020**, *13*, 369. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Newman, D.J.; Cragg, G.M. Natural Products as Sources of New Drugs over the Nearly Four Decades from 01/1981 to 09/2019. *J. Nat. Prod.* **2020**, *83*, 770–803. [[CrossRef](#)]
6. Costa, M.P.; Bozini, M.C.V.; Andrade, W.M.; Costa, C.R.; da Silva, A.L.; Alves de Oliveira, C.M.; Kato, L.; de Fernandes, O.F.L.; Souza, L.K.H.; do Silva, M.R.R. Antifungal and Cytotoxicity Activities of the Fresh Xylem Sap of *Hymenaea courbaril* L. and Its Major Constituent Fisetin. *BMC Complement. Altern. Med.* **2014**, *14*, 245. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Boniface, P.K.; Baptista Ferreira, S.; Roland Kaiser, C. Current State of Knowledge on the Traditional Uses, Phytochemistry, and Pharmacology of the Genus *Hymenaea*. *J. Ethnopharmacol.* **2017**, *206*, 193–223. [[CrossRef](#)]
8. De Brito, M.S.; Melo, M.B.; Perdigão, J.; Alves, D.A.; Fontenelle, S.; Feliciano, M.; Betânia, L. Partial Purification of Trypsin/Papain Inhibitors from *Hymenaea courbaril* L. Seeds and Antibacterial Effect of Protein Fractions Materials and Methods. *Hoehnea* **2016**, *43*, 11–18. [[CrossRef](#)]
9. Aleixo, A.A.; Camargos, V.N.; Herrera, K.M.S.; dos Santos Pereira Andrade, A.C.; dos Santos, M.; Miranda, V.C.; Carvalho, R.S.; de Magalhães, J.T.; de Magalhães, J.C.; dos Santos Lima, L.A.R.; et al. Synergistic Activity Of *Hymenaea courbaril* Terra *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville Against Multidrug-resistant Bacterial Strains. *J. Med. Plant Res.* **2015**, *9*, 741–748.
10. Zandi, K.; Teoh, B.T.; Sam, S.S.; Wong, P.F.; Mustafa, M.R.; Abubakar, S. In Vitro Antiviral Activity of Fisetin, Rutin and Naringenin against Dengue Virus Type-2. *J. Med. Plant Res.* **2011**, *5*, 5534–5539.
11. Rocha, E.C.; Sartori, C.A.; Navaro, F.F. The Application of Antioxidant Foods in the Prevention of Skin Aging. *Rev. Cient. Uniararas* **2016**, *4*, 19–26.
12. Barroqueiro, E.S.B.; Prado, D.S.; Barcellos, P.S.; Silva, T.A.; Pereira, W.S.; Silva, L.A.; Maciel, M.C.G.; Barroqueiro, R.B.; Nascimento, F.R.F.; Gonçalves, A.G.; et al. Immunomodulatory and Antimicrobial Activity of Babassu Mesocarp Improves the Survival in Lethal Sepsis. *Evid. Based Complement. Altern. Med.* **2016**, *2016*, 6–12. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Silva, C.M.; Santos, R.A.; Cavalcante, C.F.E. The Benefits of Nutrition in Preventing Skin Aging. *Rev. Conex. Eletron.* **2016**, *13*, 1–10.
14. Cruz, J.E.R.; Costa, G.J.F.; Souza, G.M.; Freitas, G.R.O.; Morais, E.R. Phytochemical Analysis and Evaluation of Antimicrobial Activity of *Peumus boldus*, *Psidium guajava*, *Vernonia polysphaera*, *Persea americana*, *Eucalyptus citriodora* Leaf Extracts and *Jatropha multifida* Raw Sap. *Curr. Pharm. Biotechnol.* **2019**, *20*, 433–444. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Alexandre, G.P.; Simão, J.L.S.; Tavares, M.O.A.; Zuffo, I.M.S.; Prado, S.V.; De Paiva, J.A.; Mustapha, A.N.; De Oliveira, A.E.; Kato, L.; Severino, V.G.P. Dereplication by HPLC-ESI-MS and Antioxidant Activity of Phenolic Compounds from *Banisteriopsis laevifolia* (Malpighiaceae). *An. Acad. Bras. Cienc.* **2022**, *94*, 1–15. [[CrossRef](#)]
16. Lemos, A.S.O.; Campos, L.M.; Souza, T.F.; Granato, J.T.; Oliveira, E.E.; Aragão, D.M.O.; Apolônio, A.C.M.; Ferreira, A.P.; Fabri, R.L. Combining UFLC-QTOF-MS Analysis with Biological Evaluation of *Centrosema coriaceum* (Fabaceae) Leaves. *An. Acad. Bras. Cienc.* **2022**, *94*, e20200491. [[CrossRef](#)]
17. Maranhão, C.A.; Pinheiro, I.O.; Santana, A.L.B.D.; Oliveira, L.S.; Nascimento, M.S.; Bieber, L.W. Antitermitic and Antioxidant Activities of Heartwood Extracts and Main Flavonoids of *Hymenaea stigonocarpa* Mart. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* **2013**, *79*, 9–13. [[CrossRef](#)]
18. Singh, S.; Kaur, I.; Kariyat, R. The Multifunctional Roles of Polyphenols in Plant-Herbivore Interactions. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 1442. [[CrossRef](#)]
19. Cruz, J.E.R.; Ribeiro, P.S.; Farisco, F.; Gomes, M.S.; Morais, E.R. Composition of Phenolics, Flavonoids, Anthocyanins, Determination of Antioxidant Activity and Comparison of Extractive Methods of *Caryocar brasiliense* Leaf and Bark. *Rev. Ciênc. Méd. Biol.* **2022**, *21*, 18–24. [[CrossRef](#)]
20. Sarker, S.D.; Latif, Z.; Gray, A.I. *Natural Products Isolation*, 2nd ed.; Springer Science: Totowa, NJ, USA, 2007.
21. Cruz, J.E.R.; Guimarães, I.I.S.M.; Almeida, K.C.; Amâncio, N.F.G. Antifungal and antibacterial activities of the medicinal plant Jatobá (*Hymenaea courbaril* Linnaeus) occurring in the Brazilian Cerrado: A review. *Res. Soc. Dev.* **2023**, *12*, e22612139812. [[CrossRef](#)]
22. Chavasco, J.M.; Prado, P.B.H.M.; Cerdeira, C.D.; Leandro, F.D.; Coelho, L.F.L.; Silva, J.J.; Chavasco, J.K.; Dias, A.L.T. Evaluation of Antimicrobial and Cytotoxic Activities of Plant Extracts from the Cerrado of Southern Minas Gerais. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo* **2014**, *56*, 13–20. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Fernandes, T.T.; Fernandes, A.T.S.; Pimenta, F.C. Antimicrobial activity of plants *Plathymenia reticulata*, *Hymenaea courbaril* and *Guazuma ulmifolia*. *Rev. Patol. Trop.* **2007**, *34*, 113–122. [[CrossRef](#)]
24. Tsuchiya, H.; Sato, M.; Miyazaki, T.; Fujiwara, S.; Tanigaki, S.; Ohyama, M.; Tanaka, T.; Iinuma, M. Comparative Study on the Antibacterial Activity of Phytochemical Flavanones against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Ethnopharmacol.* **1996**, *50*, 27–34. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Artavia, D.; Barrios, M.; Castro, O. Flavanonol Rhamnoside from *Hymenaea courbaril* Leaves. *Fitoterapia* **1995**, *66*, 91–92.
26. Pettit, G.R.; Meng, Y.; Stevenson, C.A.; Doubek, D.L.; Knight, J.C.; Cichacz, Z.; Pettit, R.K.; Chapis, J.C.; Schmidt, J.M. Isolation and Structure of Palstatin from the Amazon Tree *Hymenaea palustris*. *J. Nat. Prod.* **2003**, *66*, 259–262. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Al-Shabib, N.A.; Husain, F.M.; Ahmad, I.; Khan, M.S.; Khan, R.A.; Khan, J.M. Rutin Inhibits Mono and Multi-Species Biofilm Formation by Foodborne Drug Resistant *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Food Control* **2017**, *79*, 325–332. [[CrossRef](#)]

28. Di Lodovico, S.; Bacchetti, T.; D'Ercole, S.; Covone, S.; Petrini, M.; Di Giulio, M.; Di Fermo, P.; Diban, F.; Ferretti, G.; Cellini, L. Complex Chronic Wound Biofilms Are Inhibited in Vitro by the Natural Extract of *Capparis spinose*. *Front. Microbiol.* **2022**, *13*, 832919. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Kang, S.S.; Kim, J.-G.; Lee, T.-H.; Oh, K.-B. Flavonols Inhibit Sortases and Sortase-Mediated *Staphylococcus aureus* Clumping to Fibrinogen. *Biol. Pharm. Bull.* **2006**, *29*, 1751–1755. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. Cho, H.S.; Lee, J.H.; Cho, M.H.; Lee, J. Red Wines and Flavonoids Diminish *Staphylococcus aureus* Virulence with Anti-Biofilm and Anti-Hemolytic Activities. *Biofouling* **2015**, *31*, 1–11. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
31. Cowan, M.M. Plant Products as Antimicrobial Agents. *Clin. Microbiol. Rev.* **1999**, *12*, 564–582. [[CrossRef](#)]
32. Wijesundara, N.M.; Vasantha Rupasinghe, H.P. Bactericidal and Anti-Biofilm Activity of Ethanol Extracts Derived from Selected Medicinal Plants against *Streptococcus pyogenes*. *Molecules* **2019**, *24*, 1165. [[CrossRef](#)]
33. Sá, M.C.A.; Peixoto, R.M.; Krewer, C.C.; Almeida, J.R.G.S.; Vargas, A.C.; Costa, M.M. Antimicrobial Activity of Caatinga Biome Ethanolic Plant Extracts against Gram Negative and Positive Bacteria. *Rev. Bras. Ciênc. Vet.* **2011**, *18*, 62–66. [[CrossRef](#)]
34. Singleton, V.L.; Rossi, J.A. Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. *Am. J. Enol. Vitic.* **1965**, *16*, 144–158. [[CrossRef](#)]
35. Prieto, P.; Pineda, M.; Aguilar, M. Spectrophotometric Quantitation of Antioxidant Capacity through the Formation of a Phosphomolybdenum Complex: Specific Application to the Determination of Vitamin E. *Anal. Biochem.* **1999**, *269*, 337–341. [[CrossRef](#)]
36. Oyaizu, M. Studies on Products of Browning Reaction. Antioxidative Activities of Products of Browning Reaction Prepared from Glucosamine. *Jpn. J. Nutr. Diet.* **1986**, *44*, 307–315. [[CrossRef](#)]
37. *Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Testing; Approved Standard*; CLSI Clinical and Laboratory Standards Institute: Wayne, PA, USA, 2018.
38. Ferreira, L.M.R.; Azevedo, X.E.C.P.; Luna, J.S.; Goulart, S.A.E. The Antibiotic Activity of Some Brazilian Medicinal Plants. *Braz. J. Pharmacog.* **2006**, *16*, 300–306. [[CrossRef](#)]
39. Brambilla, L.Z.S.; Endo, E.H.; Cortez, D.A.G.; Filho, B.P.D. Anti-Biofilm Activity against *Staphylococcus aureus* MRSA and MSSA of Neolignans and Extract of *Piper regnellii*. *Braz. J. Pharmacog.* **2017**, *27*, 112–117. [[CrossRef](#)]

Disclaimer/Publisher's Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

Anexo I

Dados da caracterização química dos extratos de Jatobá por UPLC-HRMS/MS

SMJL (negative ionization mode)

Fig. S1. MS² spectrum of 341.0149 *m/z* [M-H]⁻ in SMJL extract.

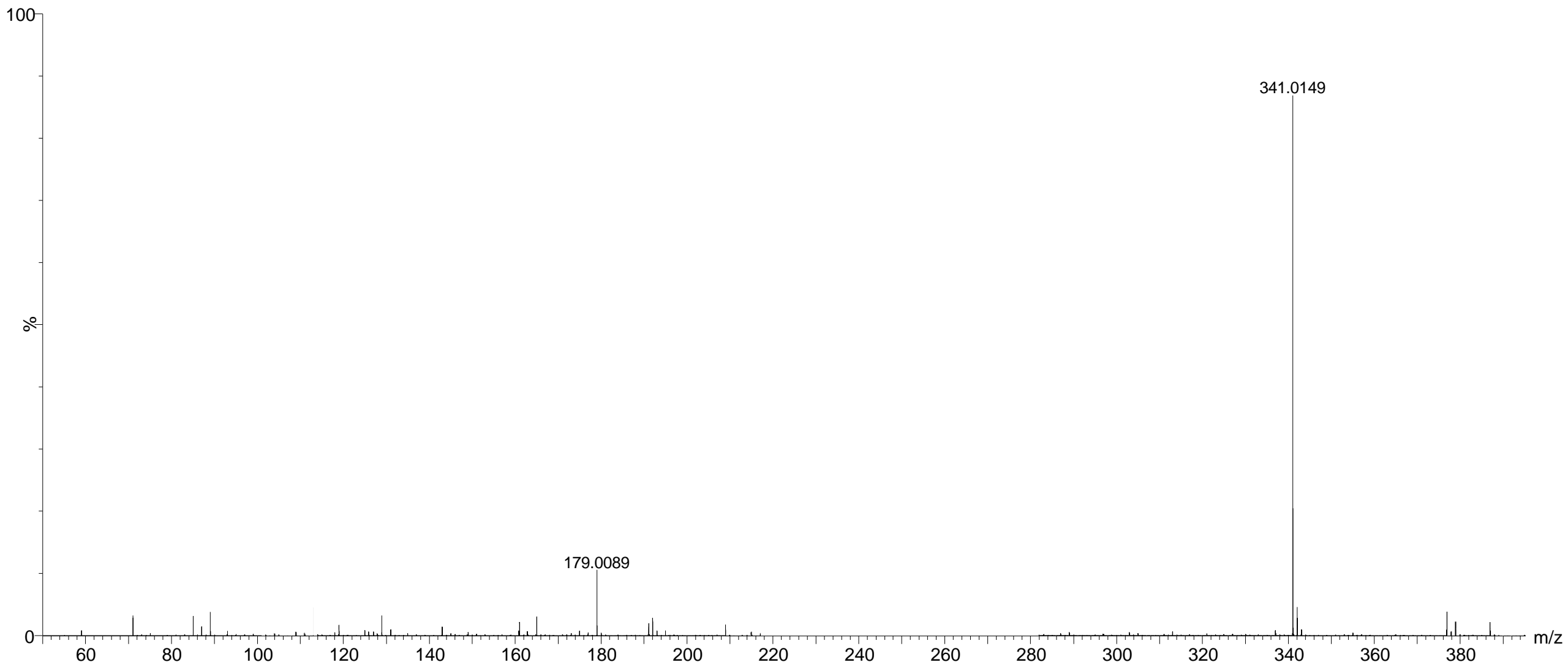


Fig. S2. MS² spectrum of 179.0089 *m/z* [M-H]⁻ in SMJL extract.

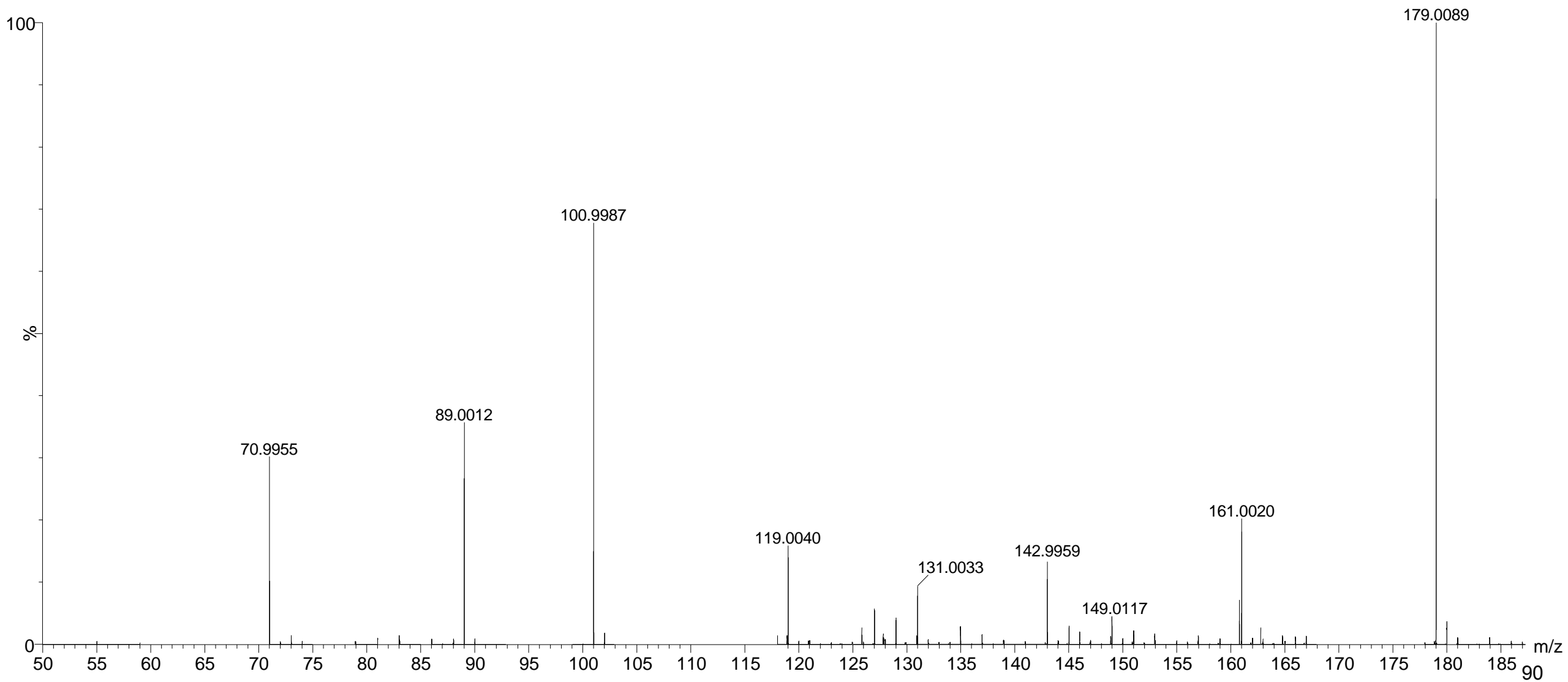


Fig. S3. MS² spectrum of 607.9508 *m/z* [M-H]⁻ in SMJL extract.

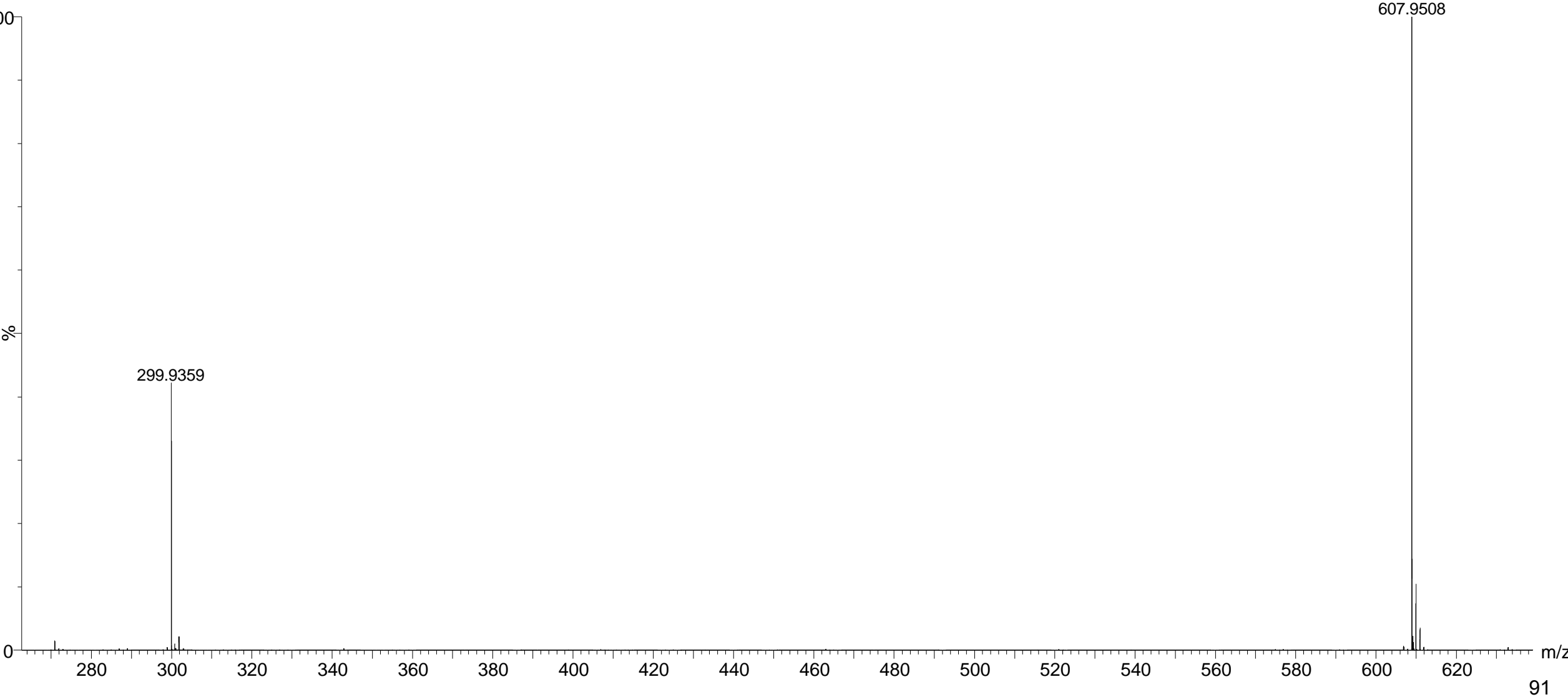


Fig. S4. MS² spectrum of 609.9561 *m/z* [M-H]⁻ in SMJL extract.

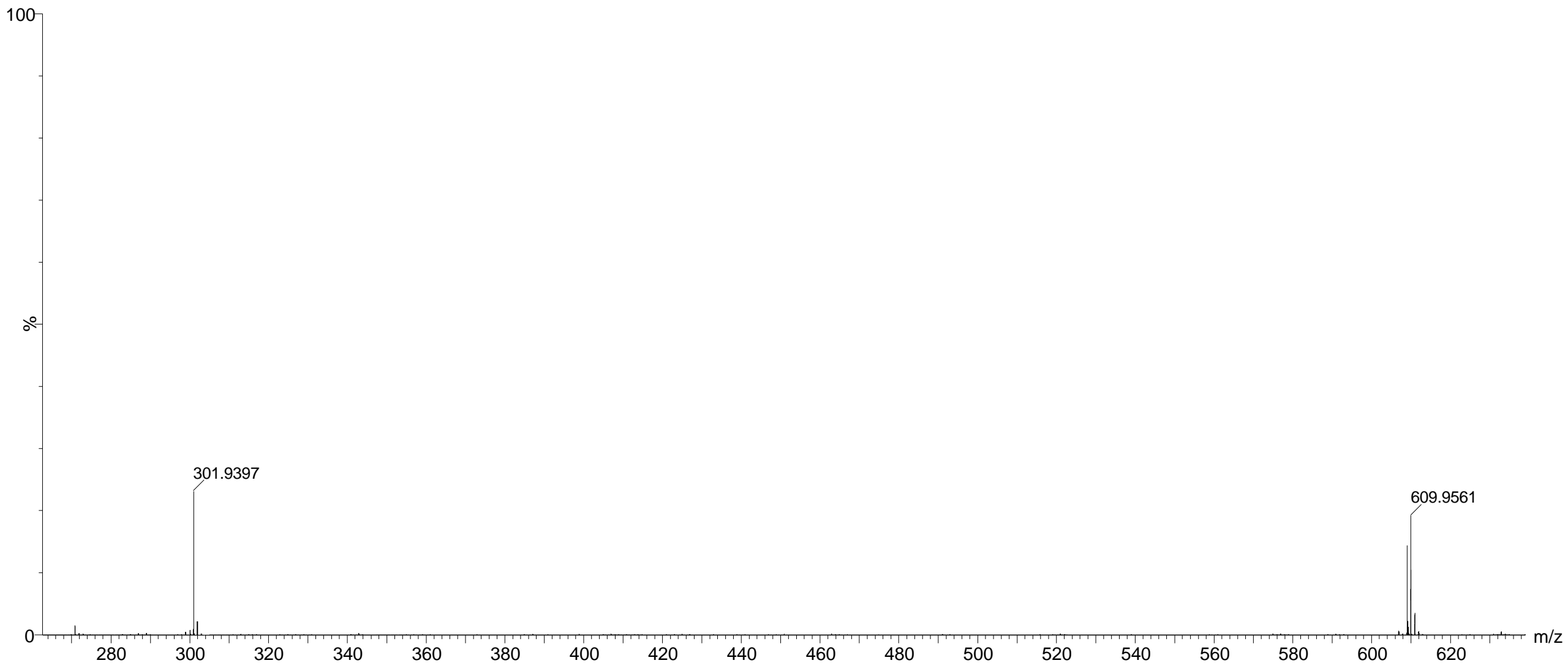


Fig. S5. MS² spectrum of 593.0129 *m/z* [M-H]⁻ in SMJL extract.

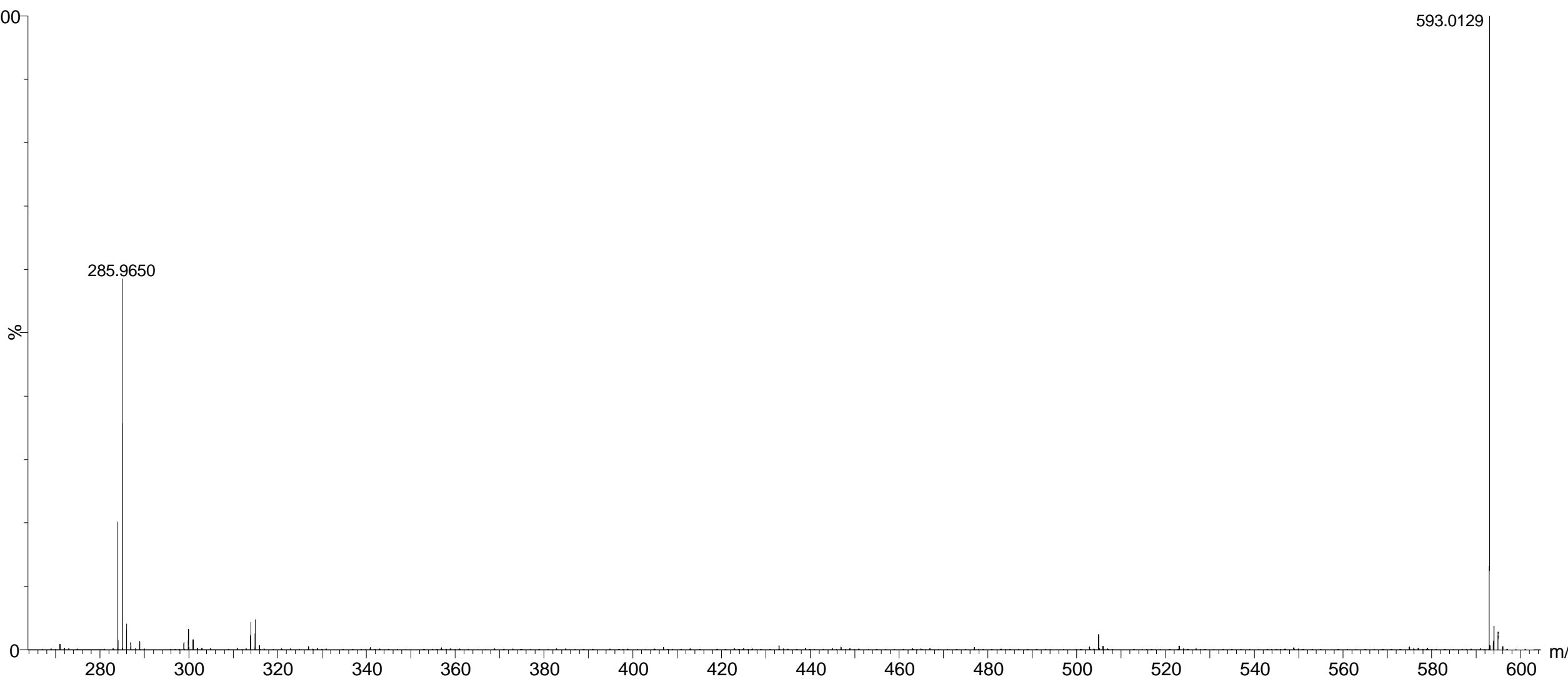


Fig. S6. MS² spectrum of 623.0092 *m/z* [M-H]⁻ in SMJL extract.

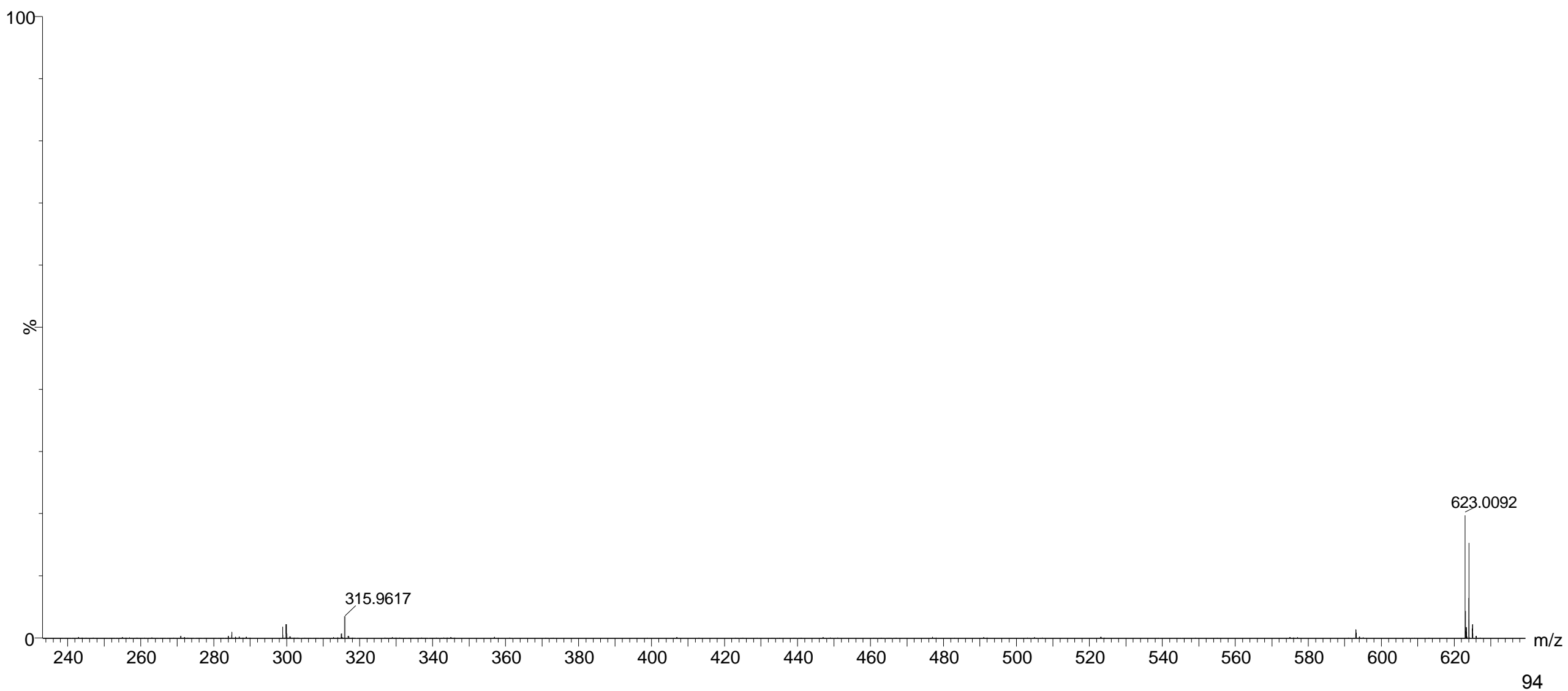


Fig. S7. MS² spectrum of 477.9869 *m/z* [M-H]⁻ in SMJL extract.

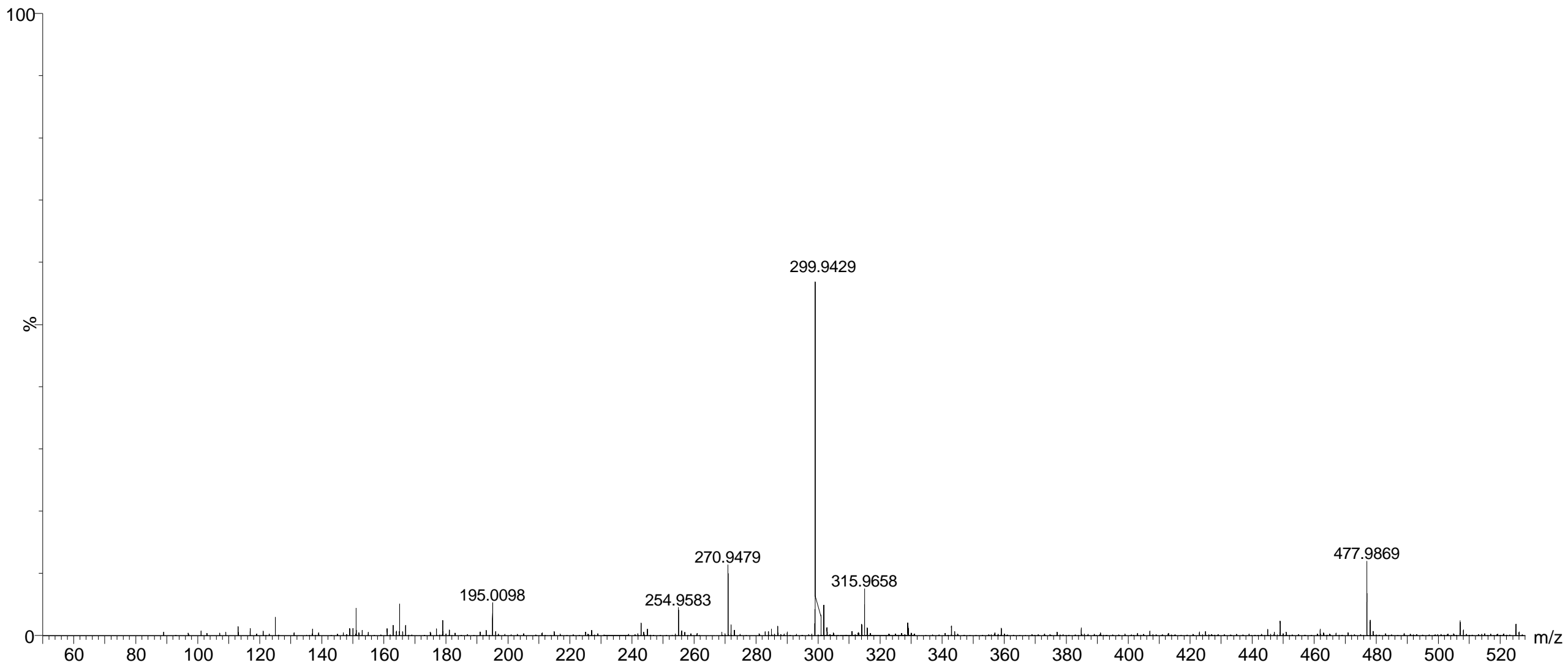


Fig. S8. MS² spectrum of 329.9728 *m/z* [M-H]⁻ in SMJL extract.

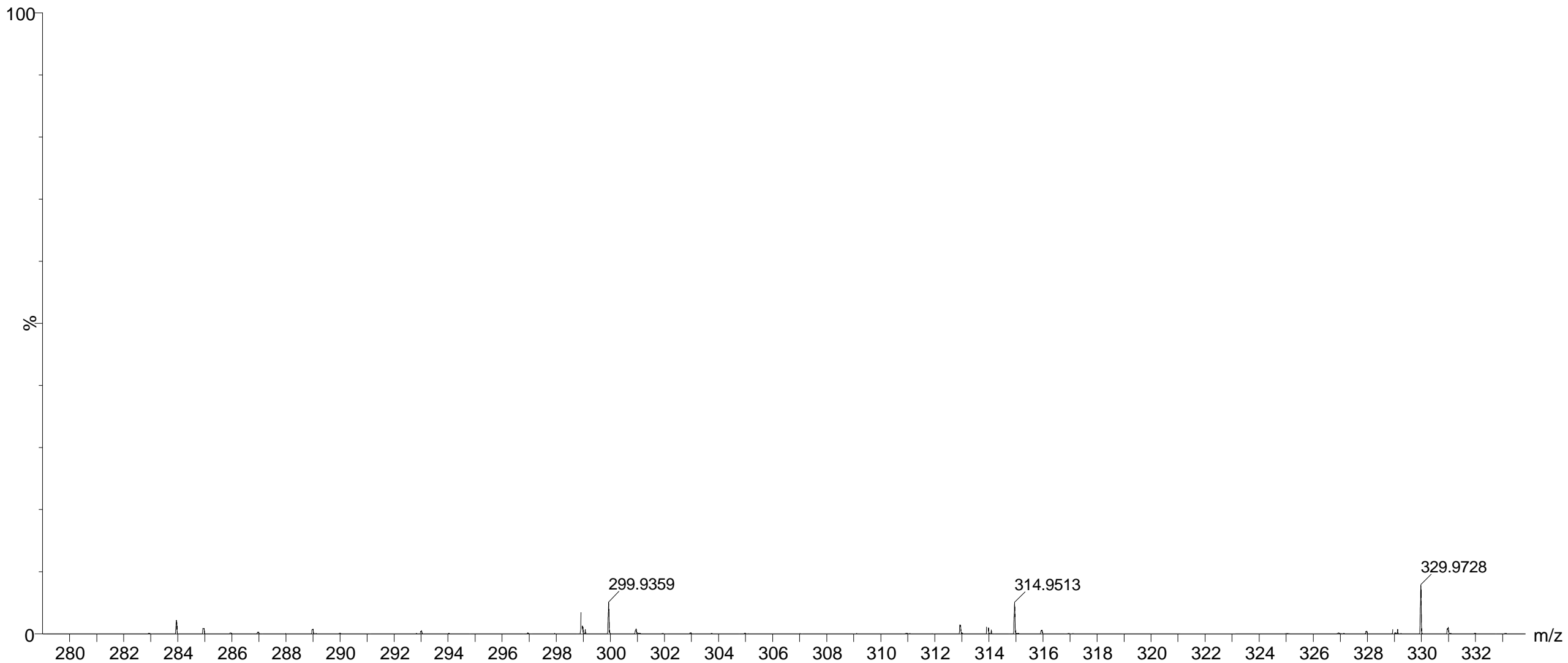


Fig. S9. MS² spectrum of 313.9497 *m/z* [M-H]⁻ in SMJL extract.

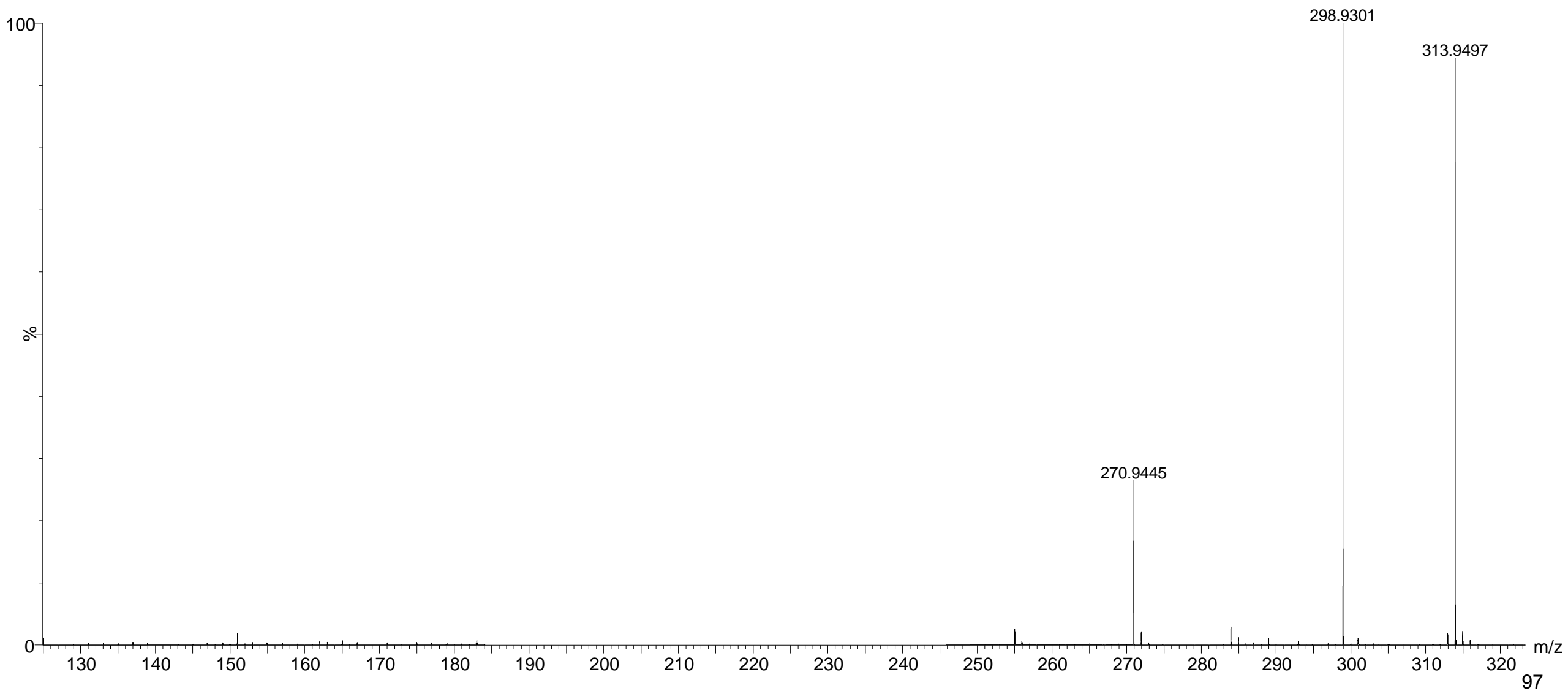


Fig. S10. MS² spectrum of 317.1195 *m/z* [M-H]⁻ in SMJL extract.

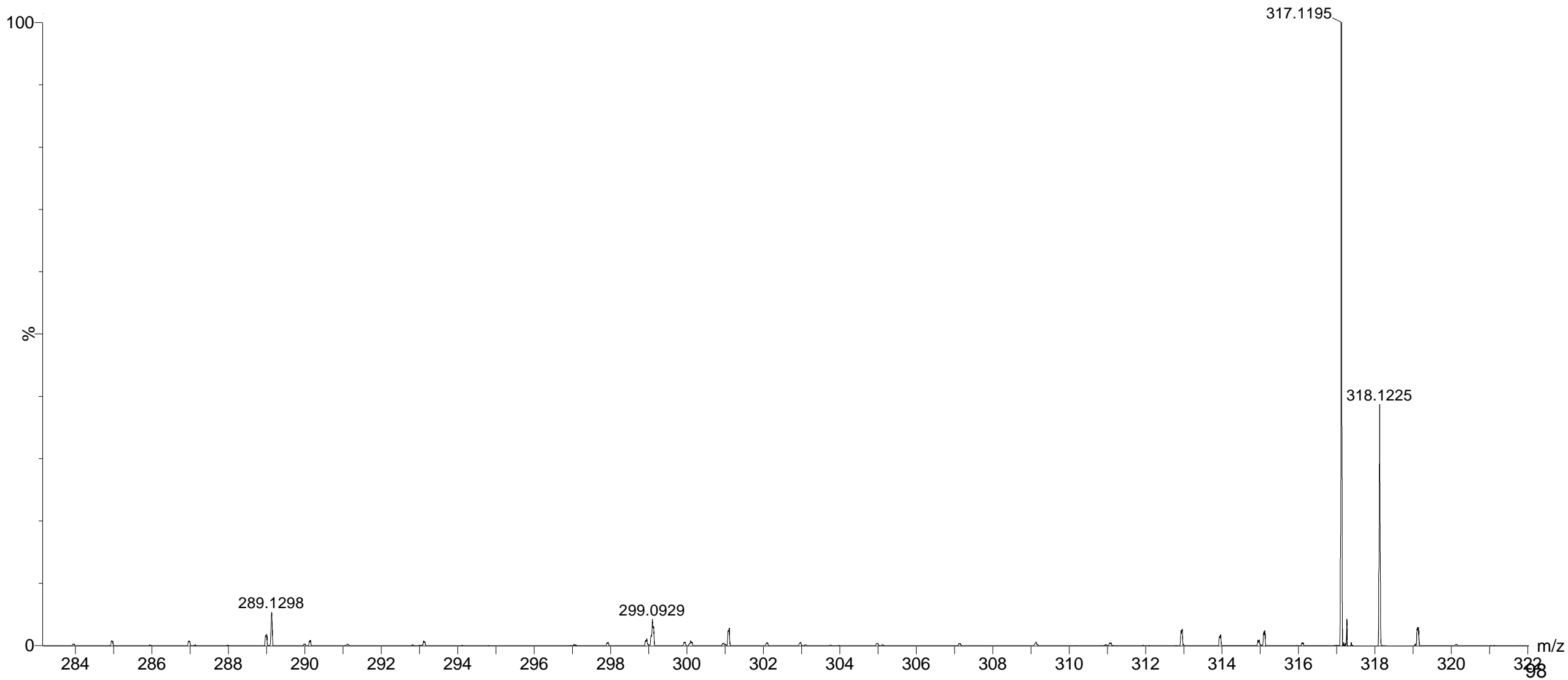
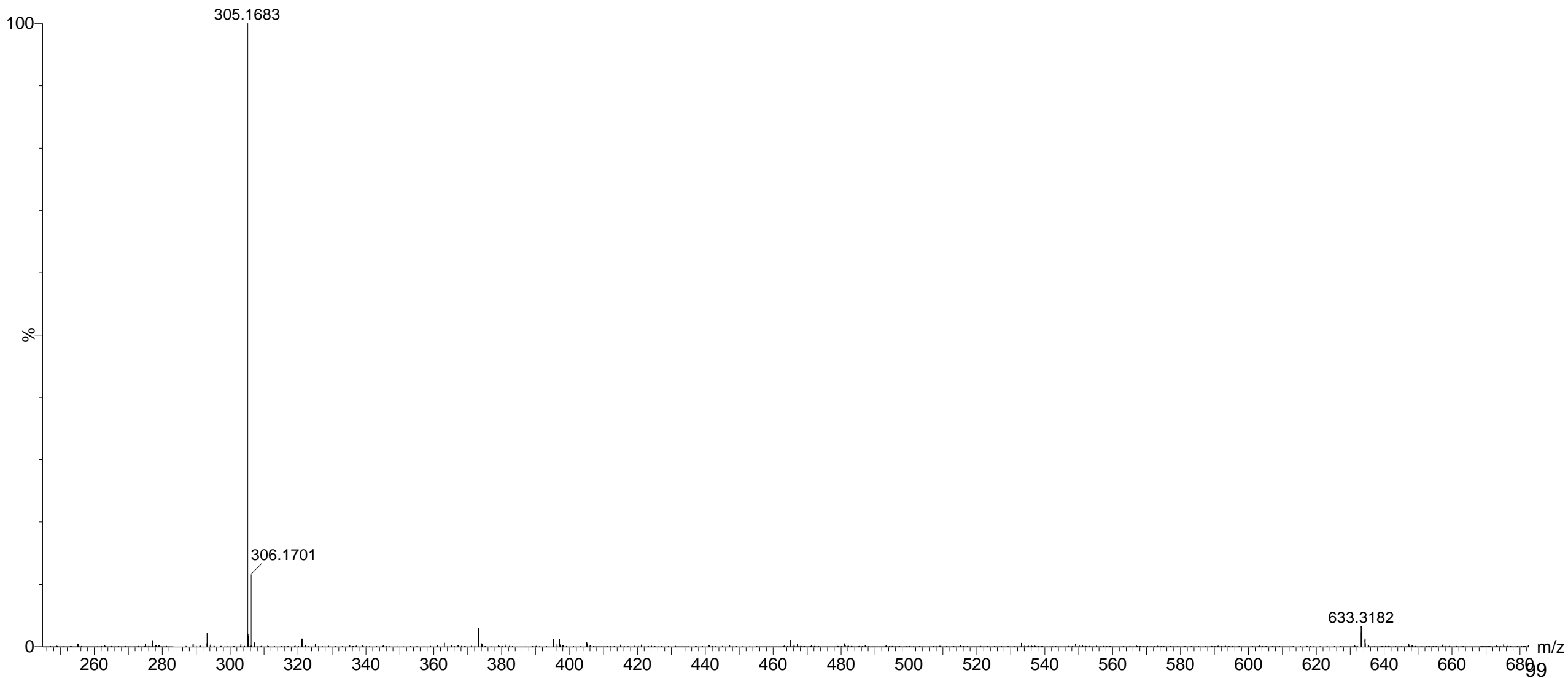


Fig. S11. MS² spectrum of 633.3182 *m/z* [M-H]⁻ in SMJL extract.



SMJL (positive ionization mode)

Fig. S12. MS² spectrum of 633.7400 *m/z* [M+Na]⁺ in SMJL extract.

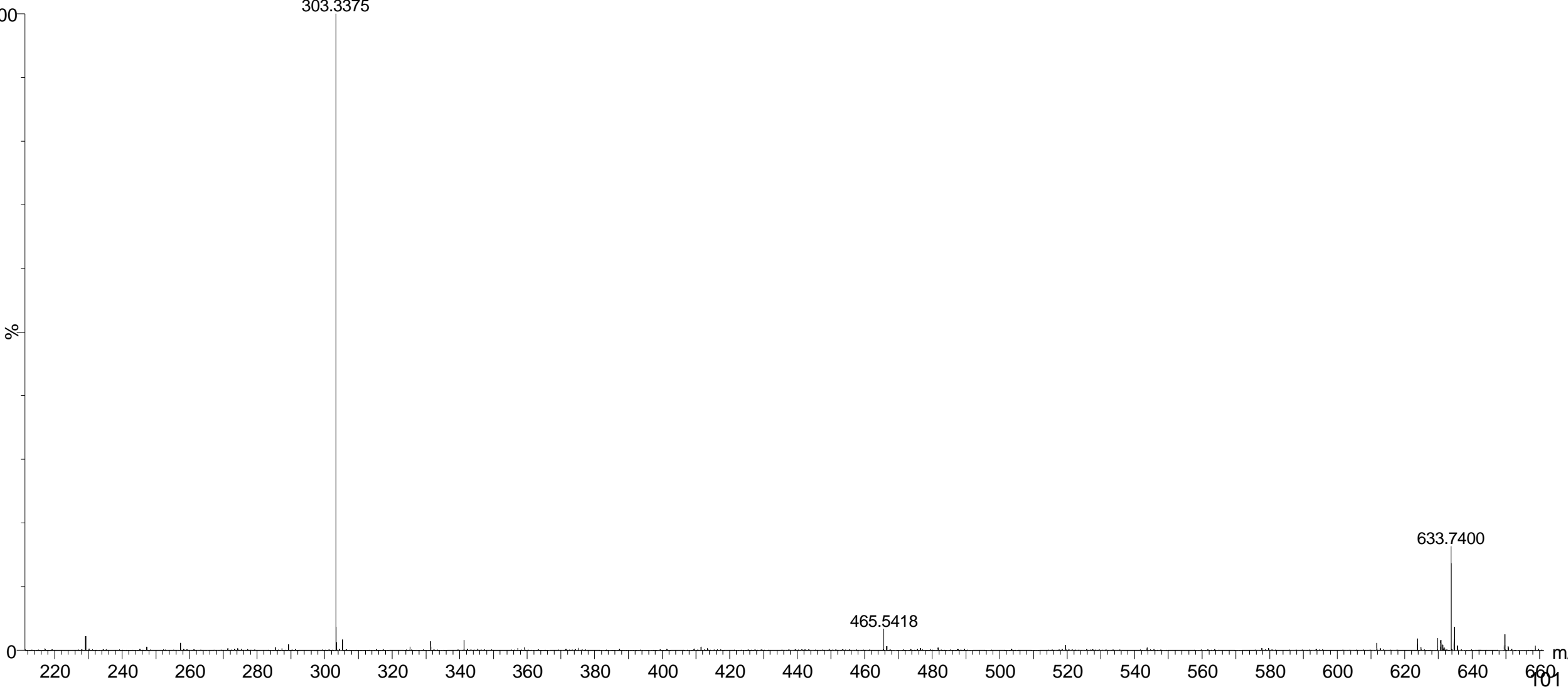


Fig. S13. MS² spectrum of 487.5446 *m/z* [M+Na]⁺ in SMJL extract.

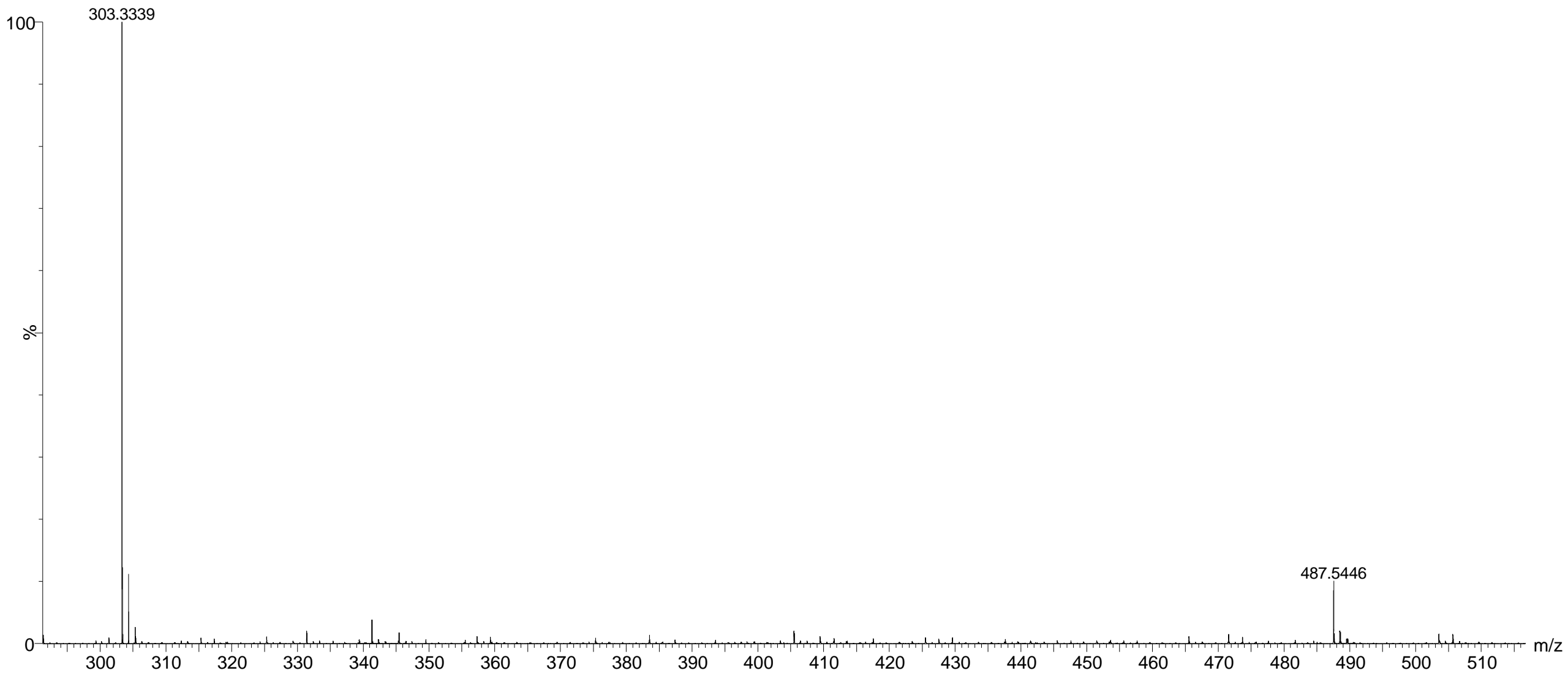
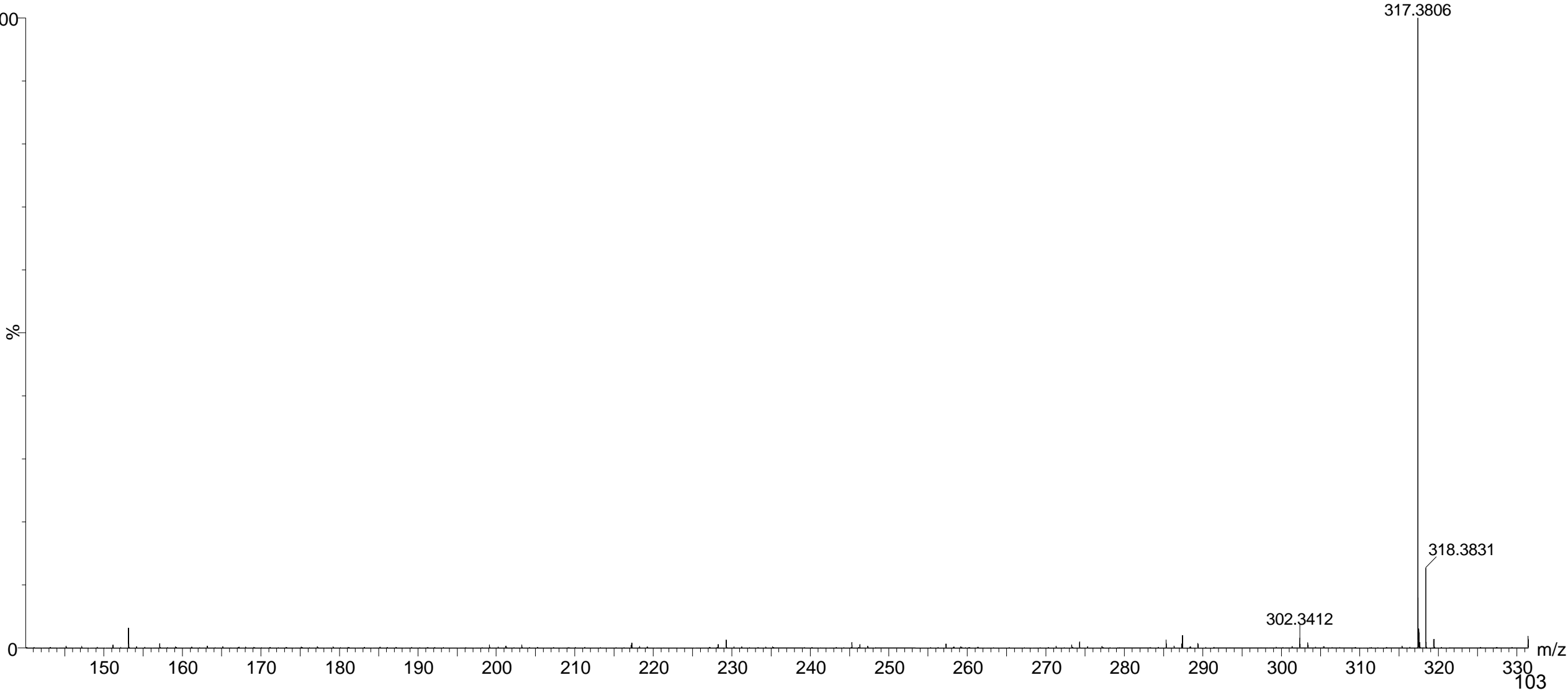


Fig. S14. MS² spectrum of 317.3806 *m/z* [M+H]⁺ in SMJL extract.



UBJL (negative ionization mode)

Fig. S15. MS² spectrum of 341.0376 *m/z* [M-H]⁻ in UBJL extract.

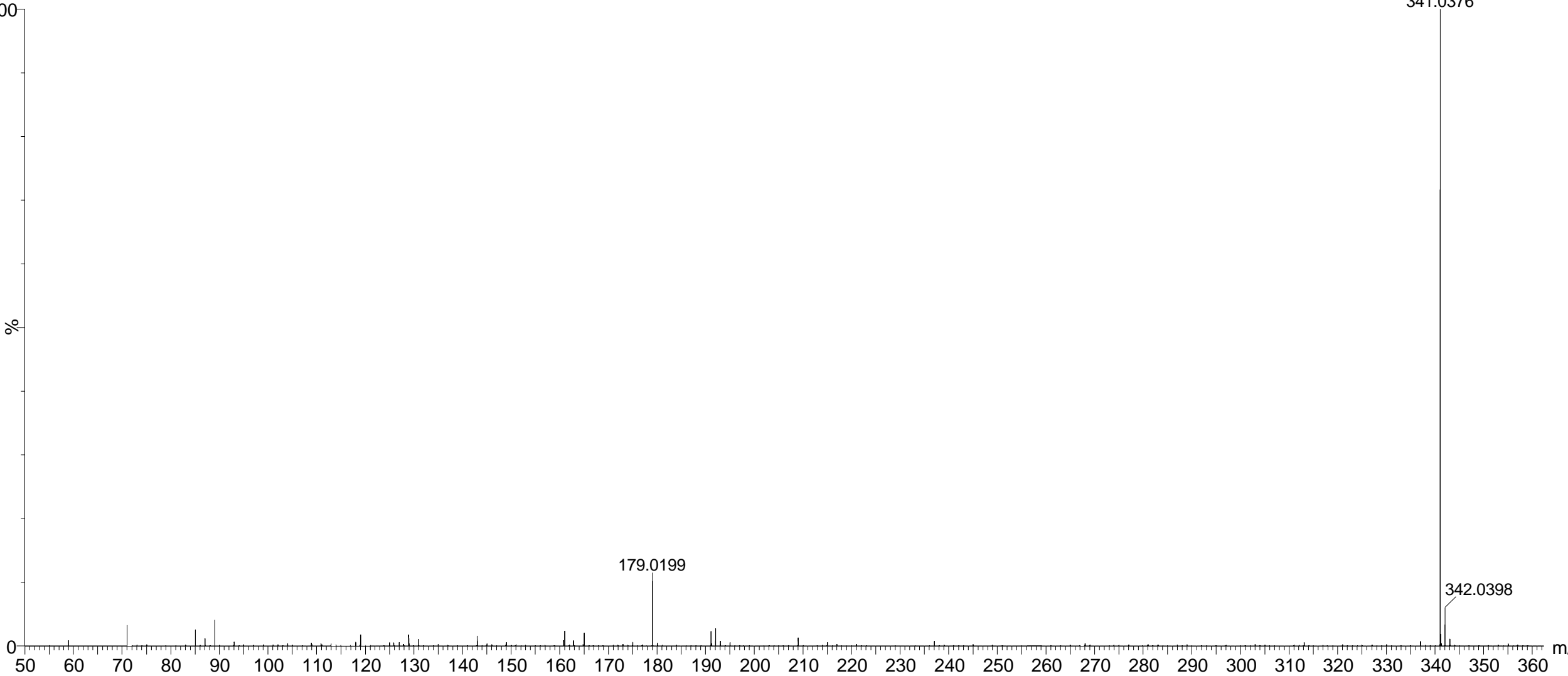


Fig. S16. MS² spectrum of 179.0199 *m/z* [M-H]⁻ in UBJL extract.

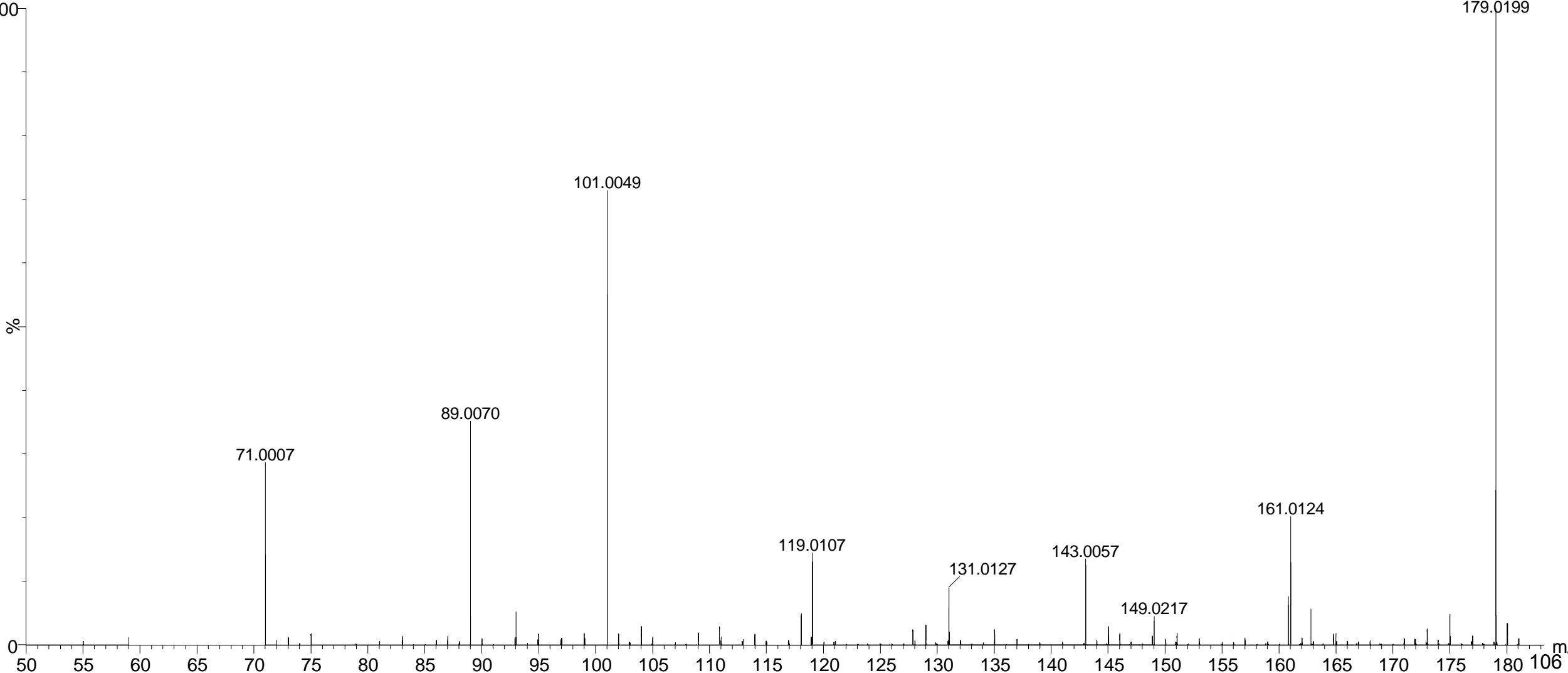


Fig. S17. MS² spectrum of 607.9912 *m/z* [M-H]⁻ in UBJL extract.

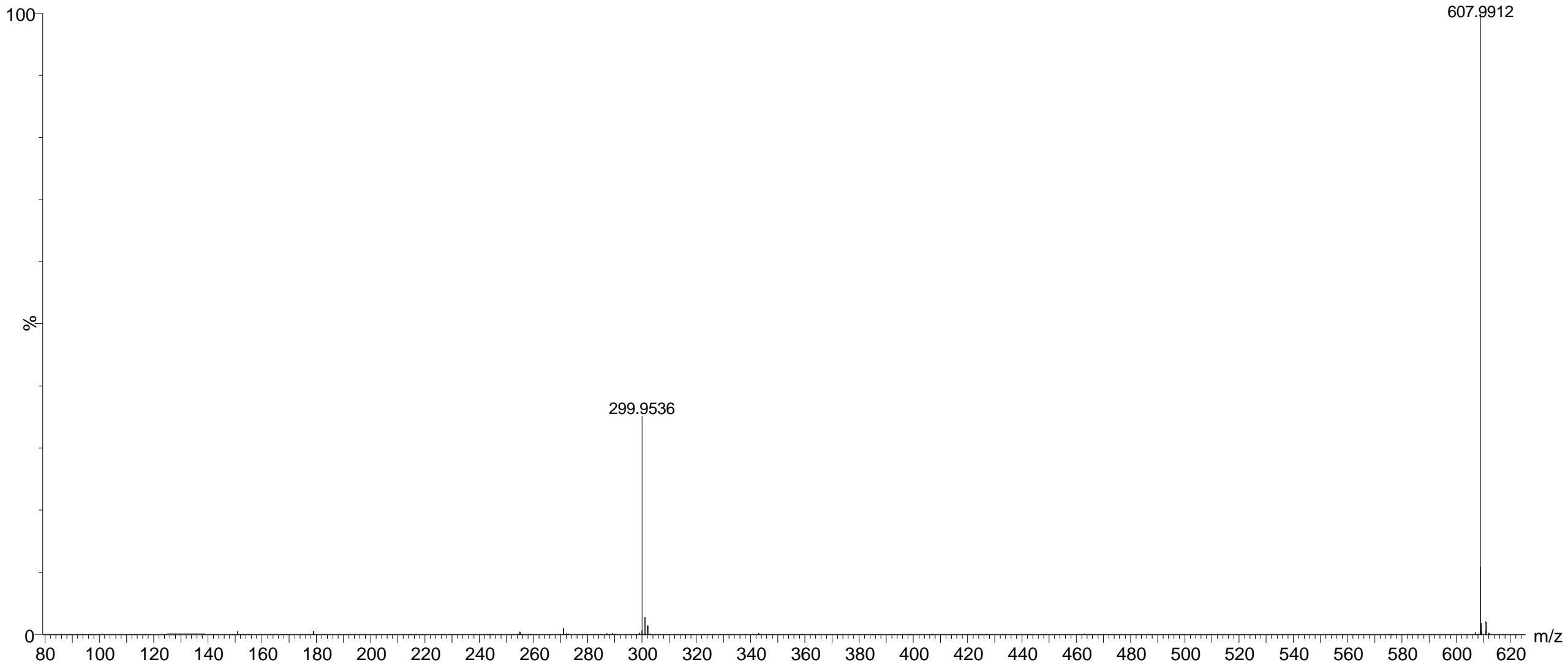


Fig. S18. MS² spectrum of 609.9966 *m/z* [M-H]⁻ in UBJL extract.

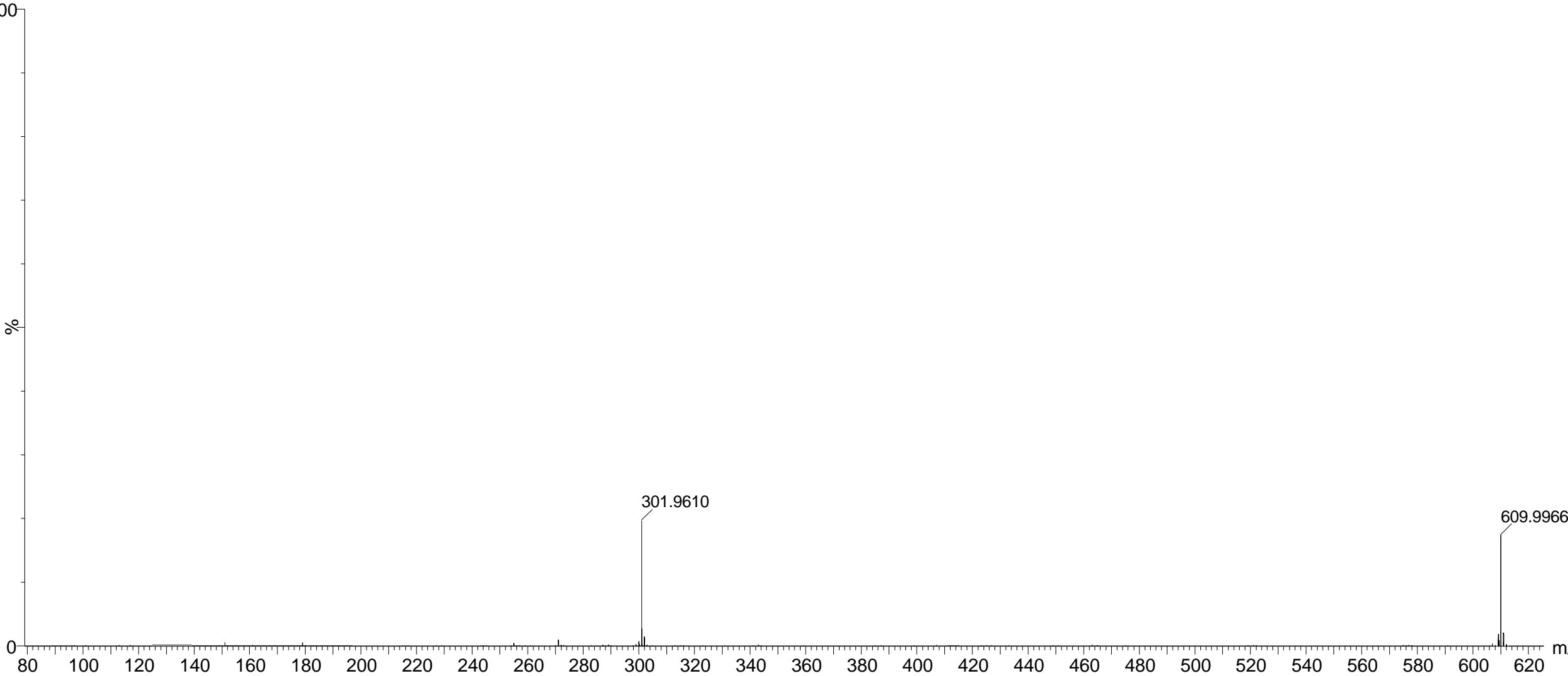


Fig. S19. MS² spectrum of 623.0296 *m/z* [M-H]⁻ in UBJL extract.

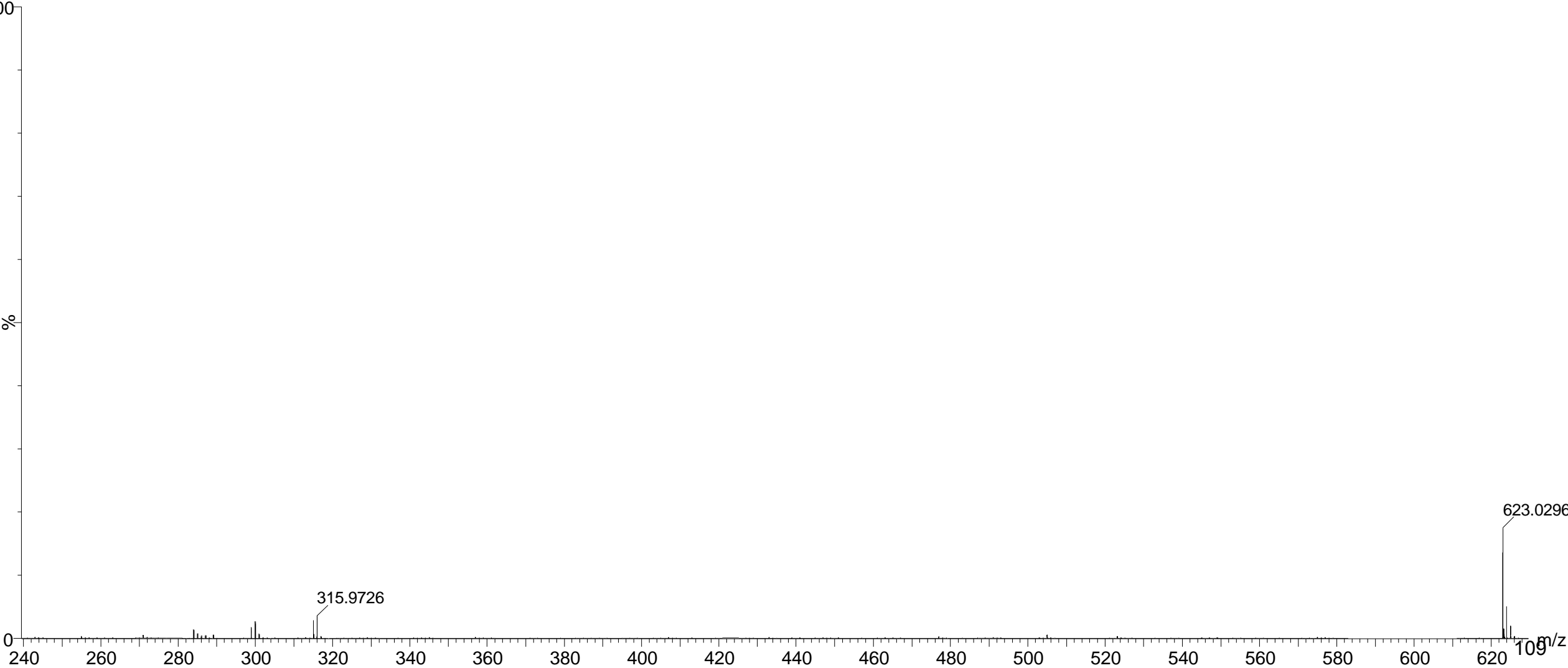


Fig. S20. MS² spectrum of 285.9754 *m/z* [M-H]⁻ in UBJL extract.

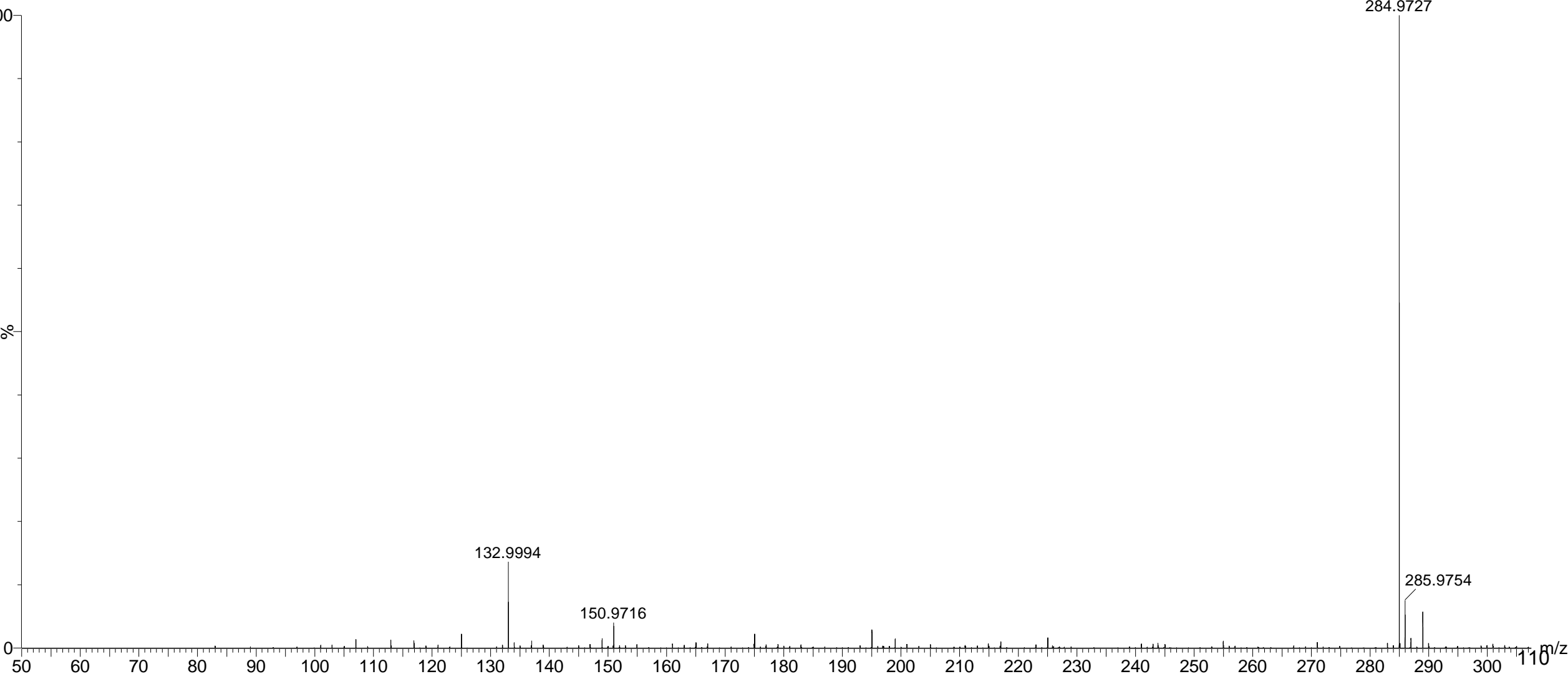


Fig. S21. MS² spectrum of 313.9642 *m/z* [M-H]⁻ in UBJL extract.

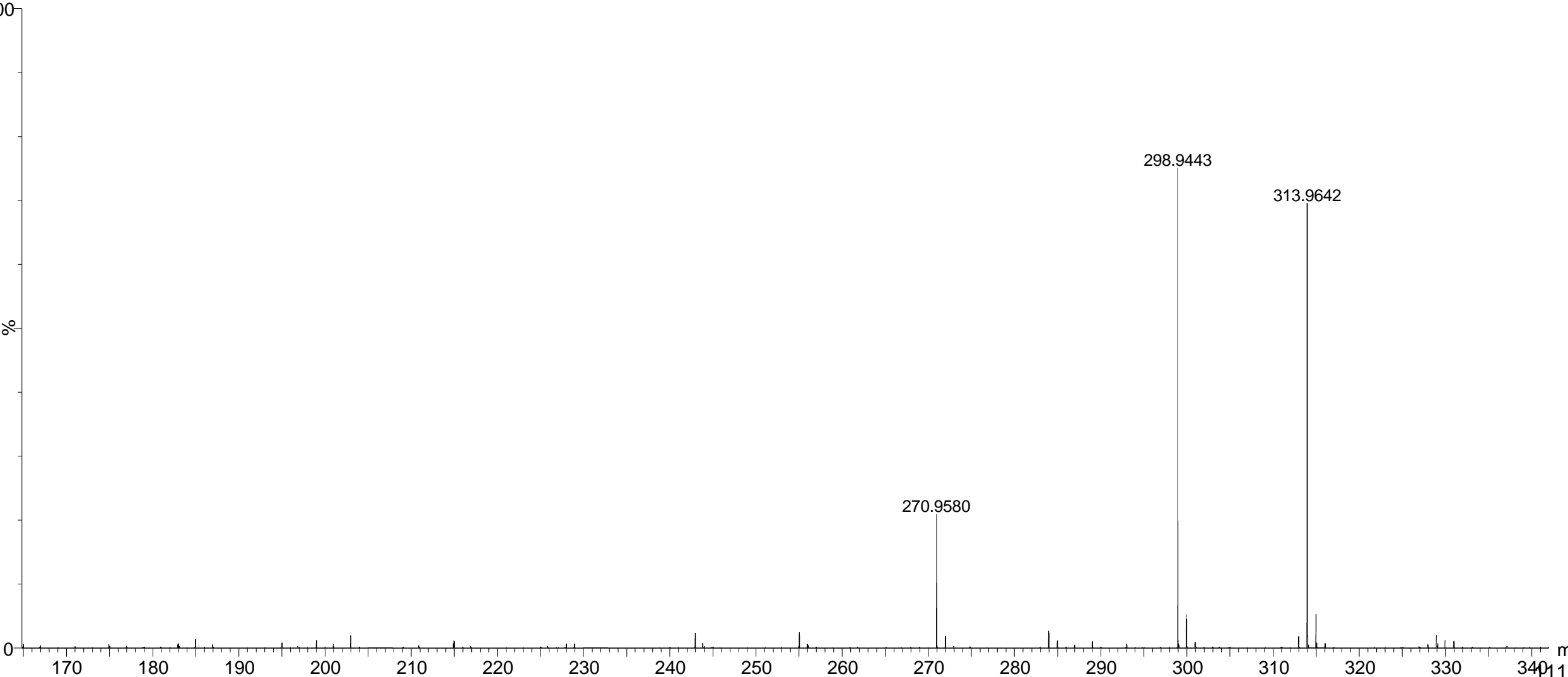
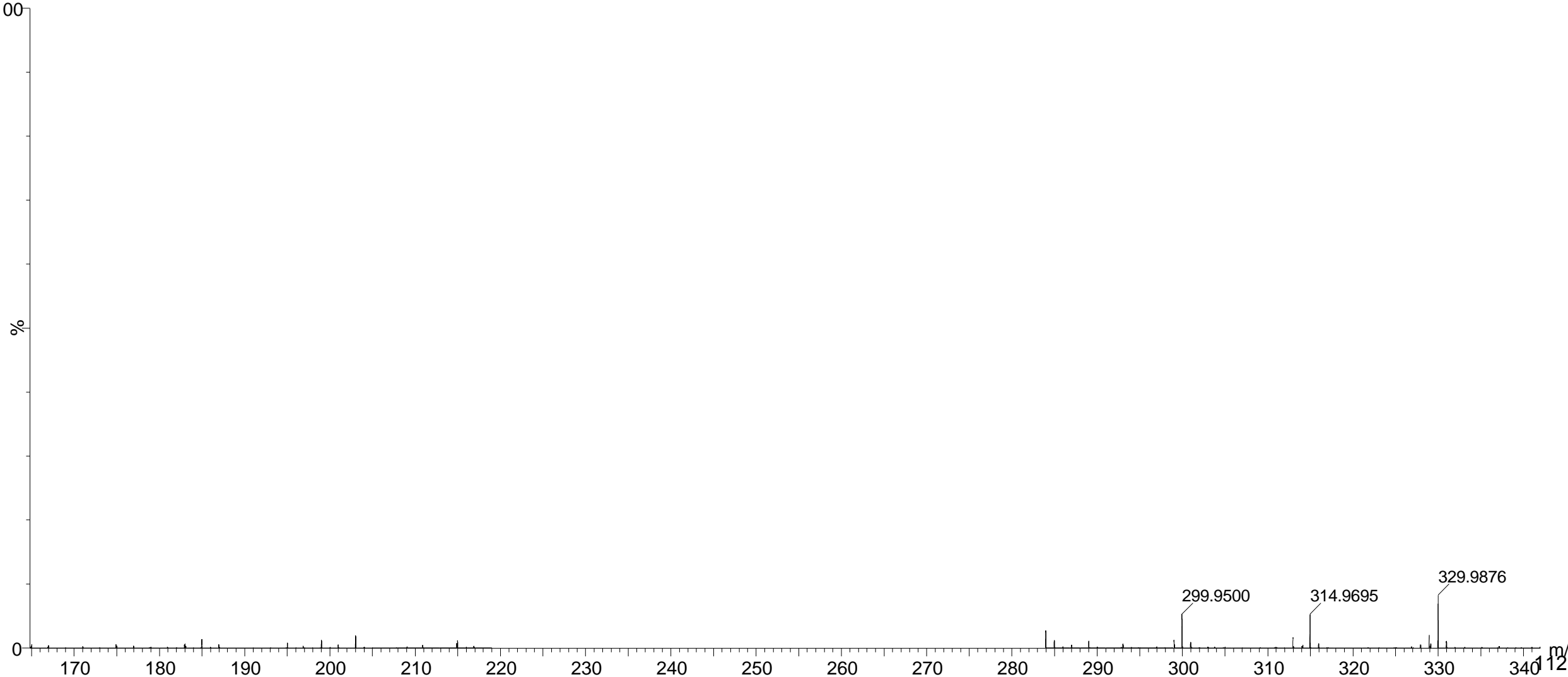


Fig. S22. MS² spectrum of 329.9876 *m/z* [M-H]⁻ in UBJL extract.



UBJL (positive ionization mode)

Fig. S23. MS² spectrum of 633.1422 *m/z* [M+Na]⁺ in UBJL extract.

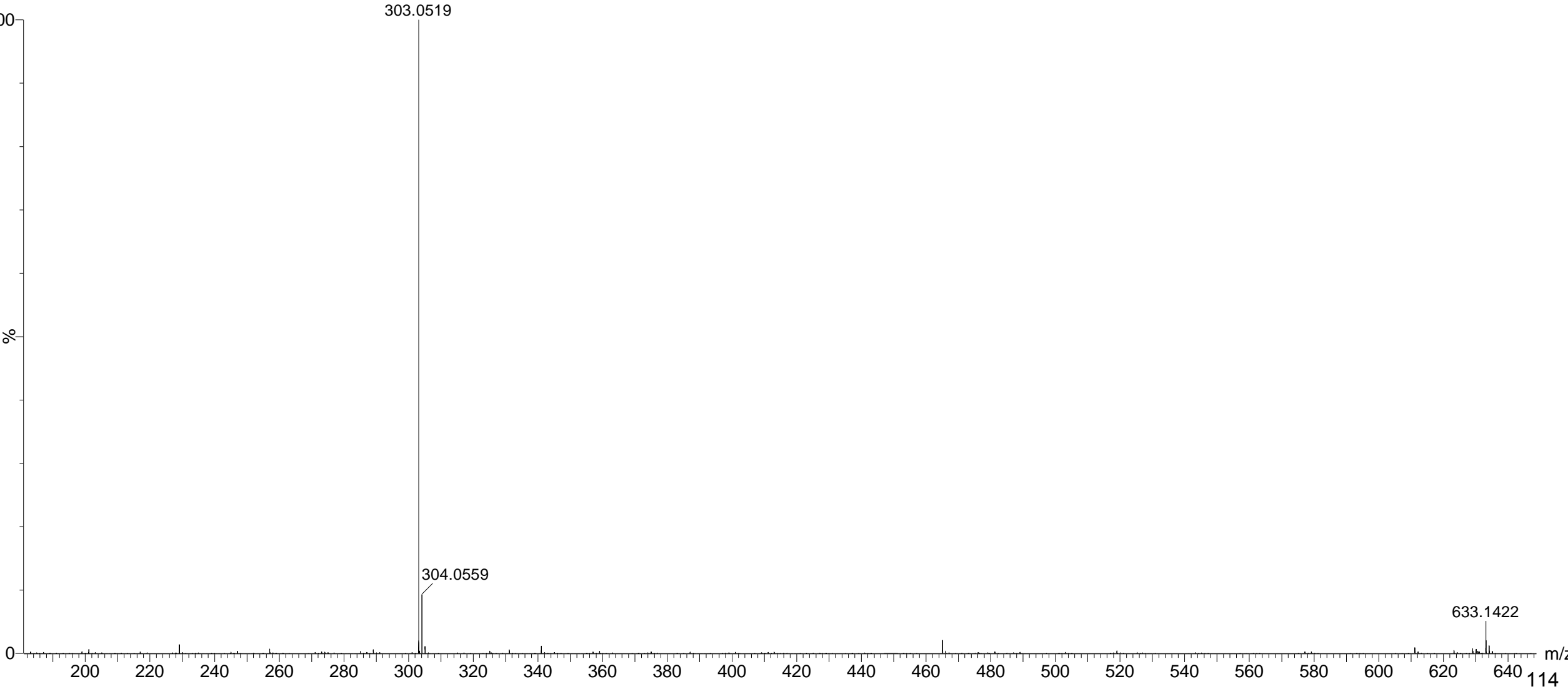


Fig. S24. MS² spectrum of 487.0886 *m/z* [M+Na]⁺ in UBJL extract.

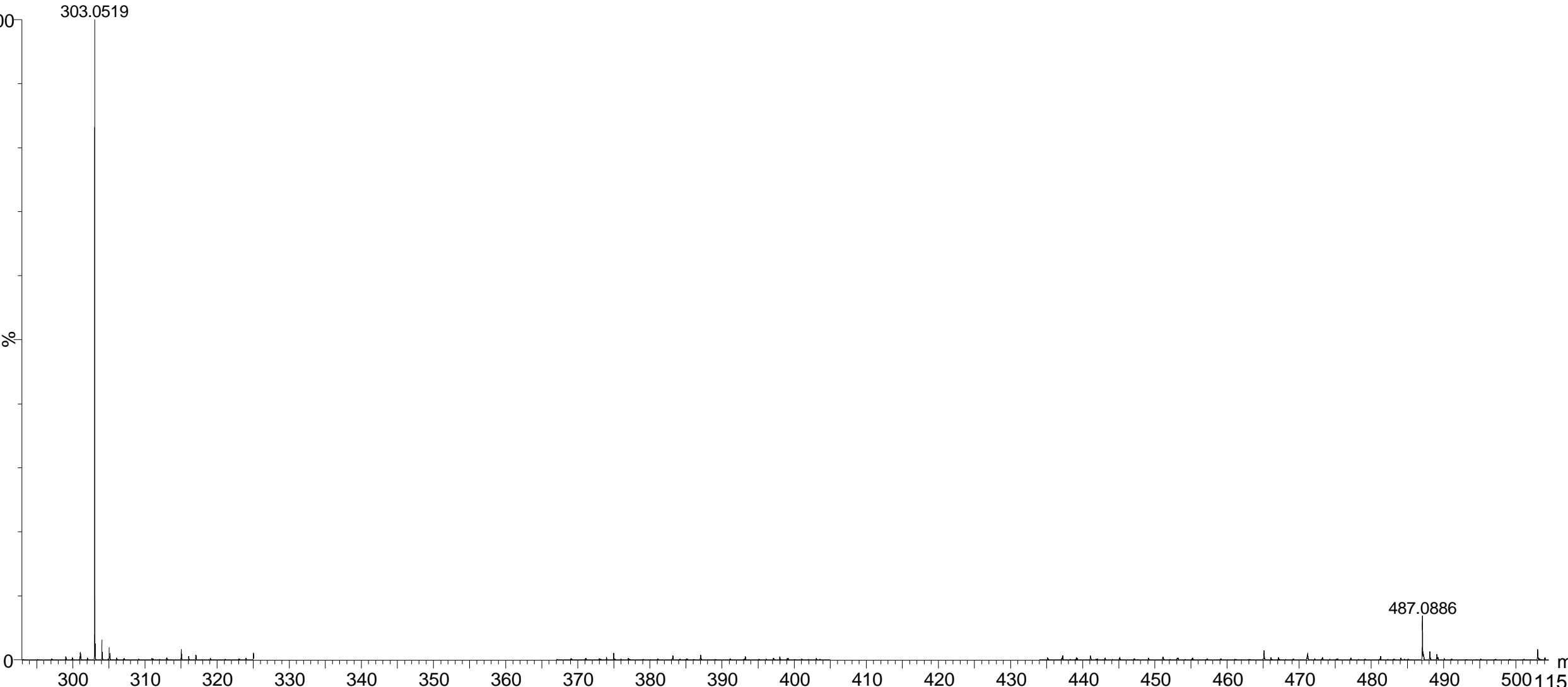
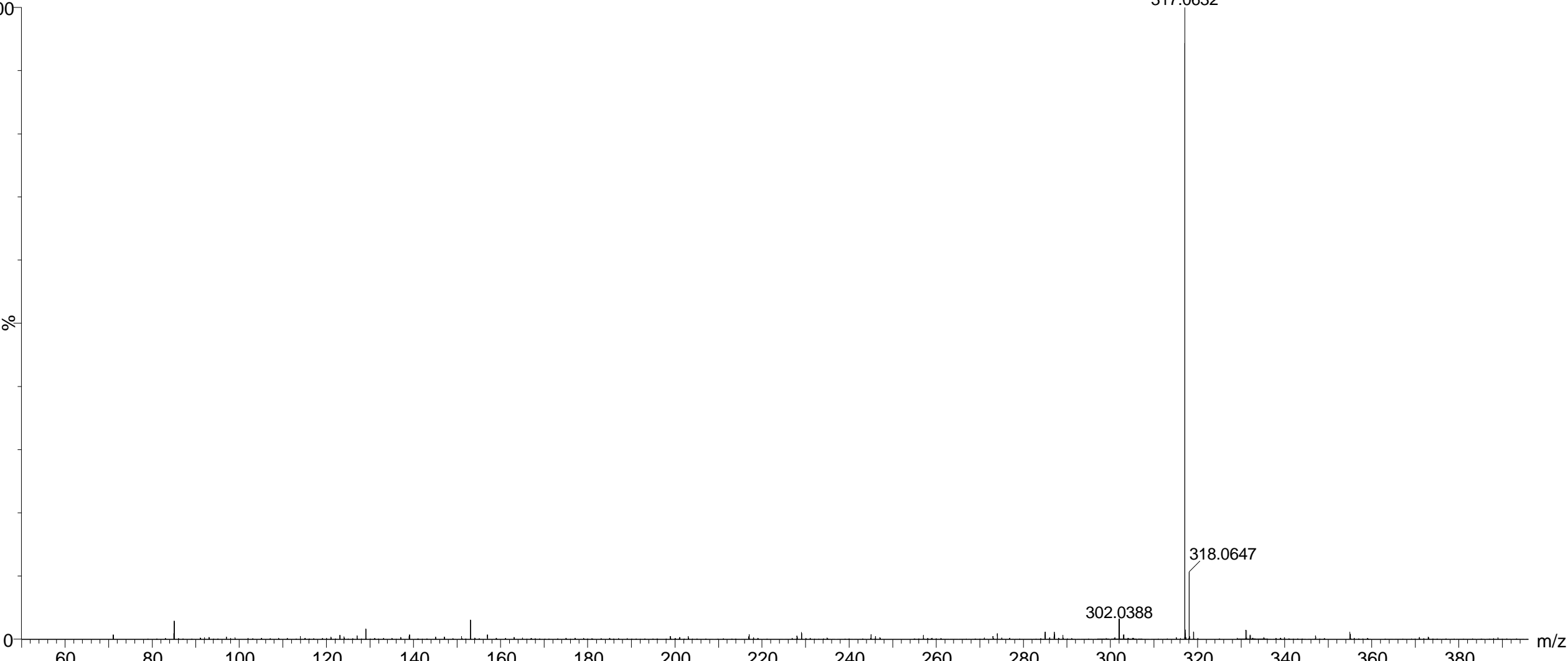


Fig. S25. MS² spectrum of 317.0632 *m/z* [M+H]⁺ in UBJL extract.



MSJL (negative ionization mode)

Fig. S26. MS² spectrum of 341.0451 *m/z* [M-H]⁻ in MSJL extract.

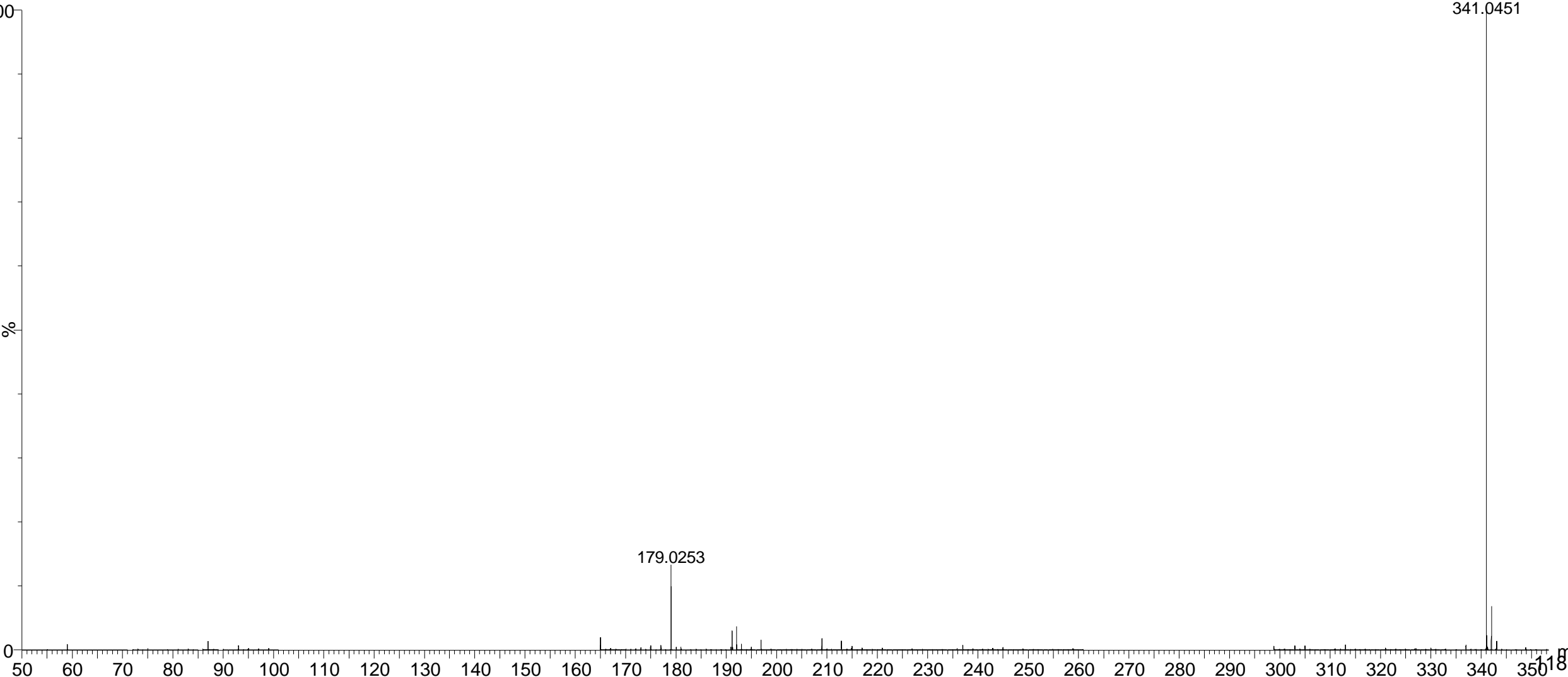


Fig. S27. MS² spectrum of 179.0253 *m/z* [M-H]⁻ in MSJL extract.

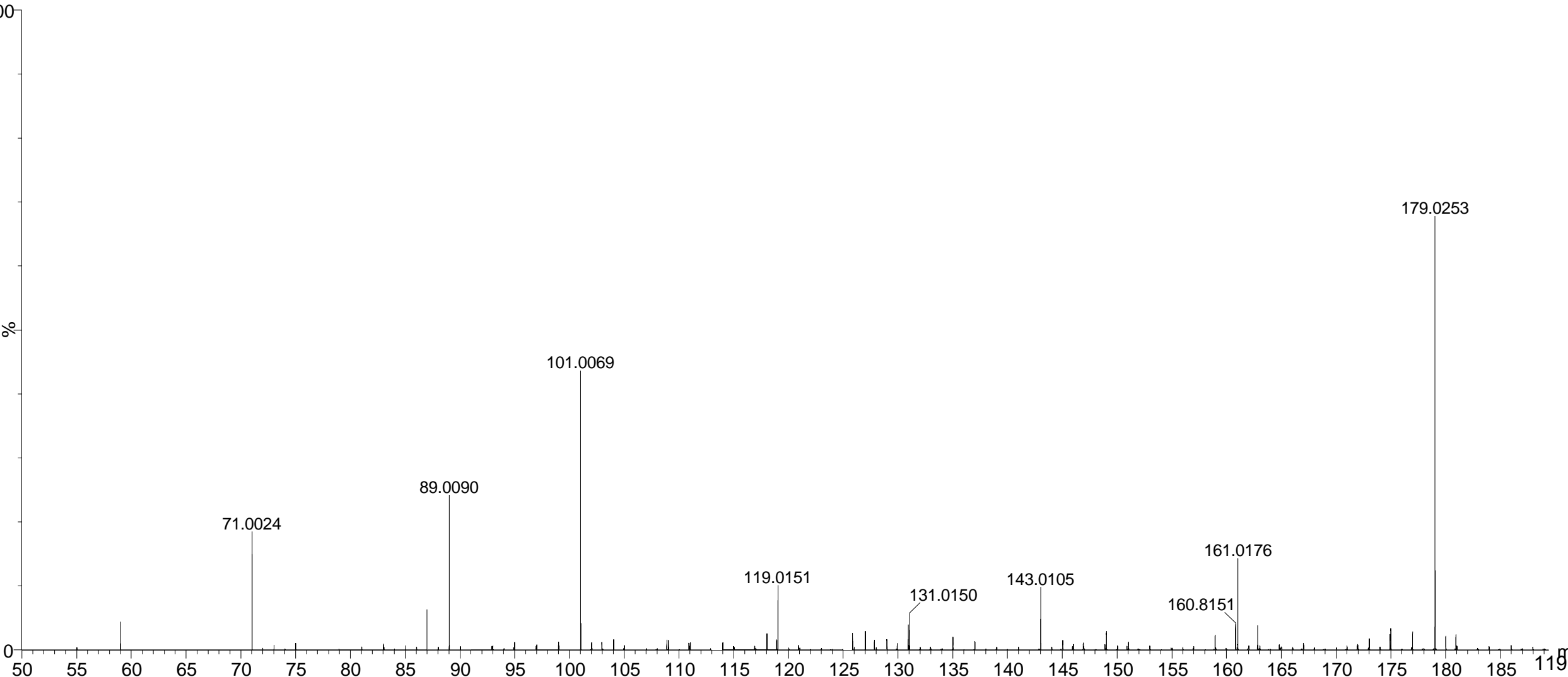


Fig. S28. MS² spectrum of 609.0568 *m/z* [M-H]⁻ in MSJL extract.

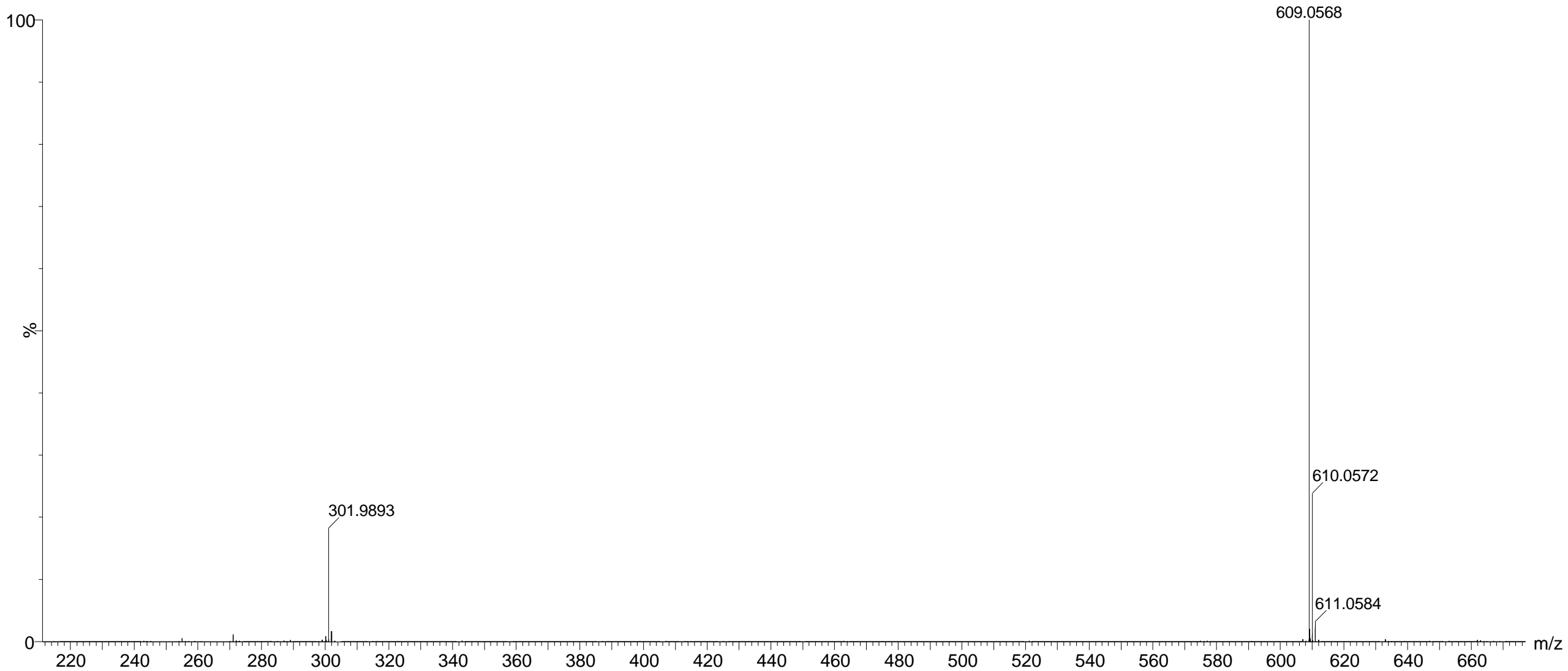


Fig. S29. MS² spectrum of 623.1573 *m/z* [M-H]⁻ in MSJL extract.

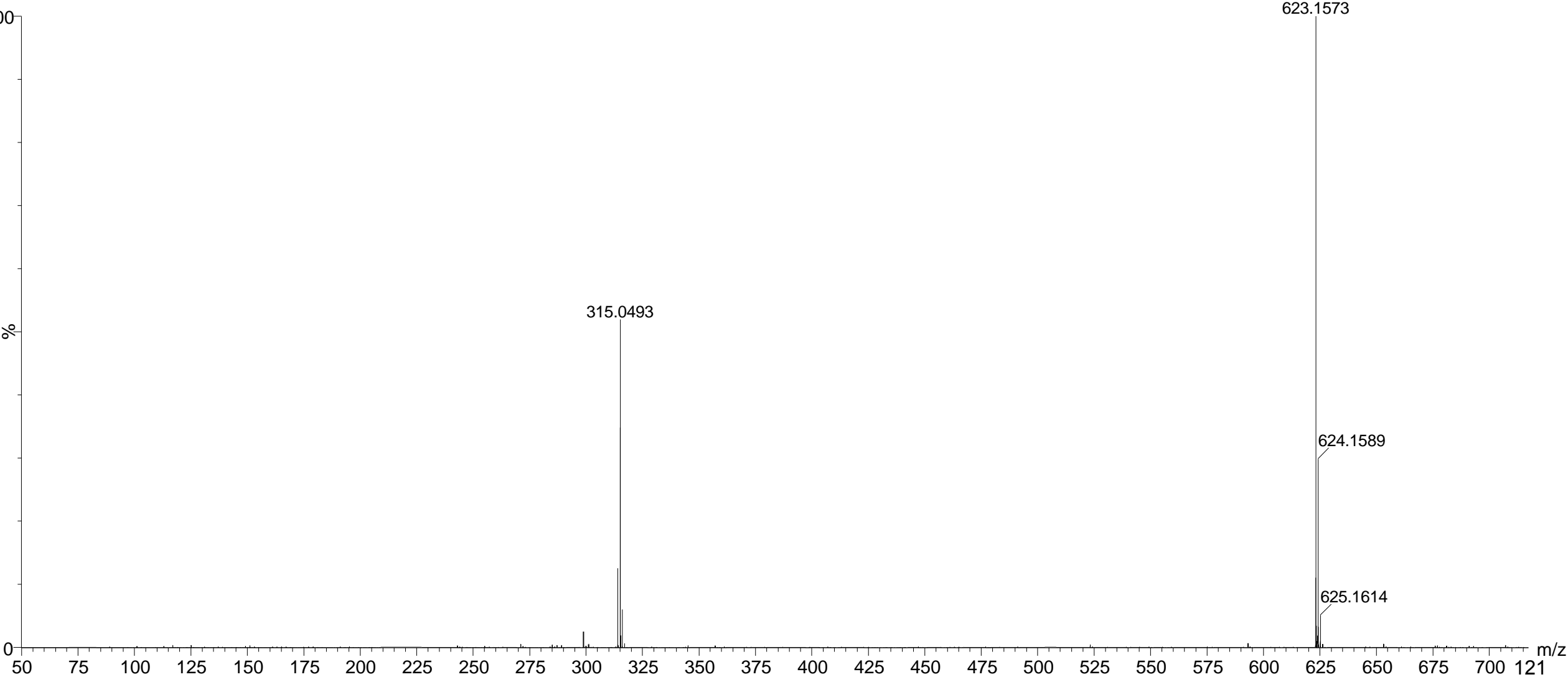


Fig. S30. MS² spectrum of 329.0812 *m/z* [M-H]⁻ in MSJL extract.



Fig. S31. MS² spectrum of 633.5037 *m/z* [M-H]⁻ in MSJL extract.

