

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

ANDERSON DE CASTRO RIBEIRO

PESQUISA DE BIOATIVOS E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE  
EXTRATOS HIDROETANÓLICOS DE *Cola acuminata*

Alfenas/MG  
2017

ANDERSON DE CASTRO RIBEIRO

PESQUISA DE BIOATIVOS E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE  
EXTRATOS HIDROETANÓLICOS DE *Cola acuminata*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Saúde, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre.

Área de concentração: Fisiopatologia.

Orientador: Prof. Dr. Jorge Kleber Chavasco.

Alfenas/MG  
2017

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)  
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal de Alfenas  
Biblioteca Central – Campus Sede

R484p Ribeiro, Anderson de Castro  
Pesquisa de bioativos e avaliação da atividade antimicrobiana de extratos hidroetanólicos de *Cola acuminata* / Anderson de Castro Ribeiro. – Alfenas/MG, 2017.  
51 f. : il. -

Orientador: Jorge Kleber Chavasco.  
Dissertação (Mestrado em Biociências Aplicadas à Saúde) - Universidade Federal de Alfenas, 2017.  
Bibliografia.

1. Kola. 2. Extratos Vegetais. 3. Anti-Infeciosos. I. Chavasco, Jorge Kleber. II. Título.

CDD- 616.07

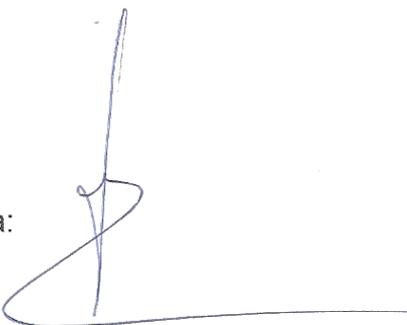
ANDERSON DE CASTRO RIBEIRO

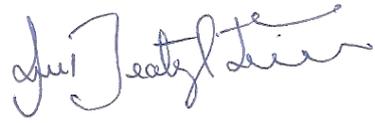
PESQUISA DE BIOATIVOS E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA  
DE EXTRATOS HIDROETANÓLICOS DE *Cola acuminata*

A Banca Examinadora abaixo-assinada aprova a Dissertação apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre, no Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Saúde.

Área de concentração: Fisiopatologia.

Aprovada em: 11 DE DEZEMBRO DE 2017.

Prof(a): VALDEMAR ANTONIO PAFERDO Assinatura:   
Instituição: JUNIOR  
UNIFAL

Prof(a): ANA BEATRIZ ALKMIN TEIXEIRA Assinatura:   
Instituição: LOIOLA  
UNIVAS

Prof(a): MARISA IONTA Assinatura:   
Instituição: UNIFAL

Alfenas/MG

2017

Aos meus Pais,  
Maria Inês e Adair,  
dedico esta dissertação.

## AGRADECIMENTOS

A Deus, pela energia vital e pelo dom da inteligência que proporciona ao ser humano a vontade em se tornar melhor.

À Universidade Federal de Alfenas, por oferecer oportunidades de criação e desenvolvimento de pesquisas em todos os campos das ciências.

Ao meu Orientador, Prof. Dr. Jorge Kleber Chavasco (*in memoriam*), exemplo de sabedoria, competência e alegria, pelo carinho, apoio, dedicação, paciência e conhecimentos transmitidos em todos os momentos.

Ao Prof. Dr. Marcelo Polo, pelo auxílio na identificação, cadastro e arquivamento das amostras da planta estudada. Ao Prof. Dr. Luiz Felipe Leomil Coelho, pela ajuda na avaliação da citotoxicidade dos extratos vegetais desta pesquisa. Ao Prof. Dr. Denismar Alves Nogueira, pelo auxílio na avaliação estatística dos resultados deste estudo.

Aos meus Pais, Maria Inês e Adair, pela educação, pelos conselhos e pelo carinho ao longo de todas as jornadas.

A minha esposa Joseane Paula Rezende Ribeiro e ao meu filho Miguel Rezende Ribeiro, pelo amor, companheirismo, compreensão e por mostrar que a felicidade está na simplicidade de cada momento.

## RESUMO

As plantas com propriedades terapêuticas vêm sendo utilizadas como medicamentos há muito tempo. A pesquisa de princípios ativos, provenientes de compostos naturais, que possam atuar como antimicrobianos se apresenta como opção valiosa aos fármacos sintéticos, principalmente em decorrência dos mecanismos progressivos de resistência bacteriana. *Cola acuminata*, conhecida como noz de cola, é uma planta que produz frutos cujas sementes são utilizadas como alimento e para tratamento de doenças gastrointestinais, respiratórias, cardíacas e neurológicas. Entretanto, sua atividade antimicrobiana tem sido pouco estudada. Neste trabalho foi avaliada a atividade antimicrobiana de extratos hidroetanólicos do caule, folha e semente de *Cola acuminata*, por testes de difusão em ágar. Foi determinada a concentração inibitória mínima e a concentração microbicida mínima sobre bactérias Gram positivas, Gram negativas, leveduras e *Mycobacterium tuberculosis*, mantidos no Laboratório de Microbiologia da UNIFAL-MG. Os extratos de *Cola acuminata* foram ativos sobre *Bacillus cereus*, *Kocuria rizophila*, *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans*, *Saccharomyces cerevisiae* e *Mycobacterium tuberculosis*, sendo que a concentração inibitória mínima variou de 0,78 a 25 mg/mL. Os testes fitoquímicos dos extratos revelaram a presença de taninos, catequinas, terpenos, flavonoides, alcaloides e ácido gálico em variadas concentrações. A  $CC_{50}$  para cultura de células BHK-21 demonstrou menor citotoxicidade para o extrato da folha fresca. Os extratos hidroetanólicos de *Cola acuminata* apresentaram promissora atividade antimicrobiana, especialmente em relação às bactérias Gram positivas, ao *Mycobacterium tuberculosis* e aos fungos *Candida albicans* e *Saccharomyces cerevisiae*, sendo que o extrato do caule seco apresentou índice de seletividade maior que 1, demonstrando melhor perfil entre atividade antimicrobiana e toxicidade celular.

Palavras-chave: *Cola acuminata*. Extratos vegetais. Atividade antimicrobiana.

## ABSTRACT

Plants with therapeutic properties have been used as medicines for a long time. The research of active principles from natural compounds, which may act as antimicrobials presents itself as a valuable option to synthetic drugs, mainly as a result of progressive mechanisms of bacterial resistance. *Cola acuminata*, known as cola nut, is a plant that produces fruit whose seeds are used as food and for treatment of gastrointestinal diseases, cardiac, respiratory and neurological disorders. However, your antimicrobial activity has been little studied. In this work, we evaluated the antimicrobial activity of hidroetanólicos extracts from stem, leaf and seed of *Cola acuminata*, by agar diffusion tests. Minimum inhibitory concentration and minimum microbicide concentration was determined on Gram-positive bacteria, Gram-negative bacteria, yeast and *Mycobacterium tuberculosis*, held in the laboratory of Microbiology of the UNIFAL-MG. The extracts of *Cola acuminata* were active on *Bacillus cereus*, *Kocuria rizophila*, *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans*, *Saccharomyces cerevisiae* and *Mycobacterium tuberculosis*. The minimum inhibitory concentration ranged from 0.78 to 25 mg/mL. Extracts tests revealed the presence of tannins, catechins, terpens, flavonoids, alkaloids and gallic acid in different concentrations. The CC<sub>50</sub> for culture of BHK-21 showed less cytotoxic to the fresh leaf extract. Hydroethanolics extracts of *Cola acuminata* presented promising antimicrobial activity, especially in relation to Gram-positive bacteria, *Mycobacterium tuberculosis* and the yeast *Candida albicans* and *Saccharomyces cerevisiae* species. The dry extract of the stem showed selectivity index greater than 1, demonstrating better profile between antimicrobial activity and cell toxicity.

Keywords: *Cola acuminata*. Plant extracts. Antimicrobial agents.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Locais onde são encontradas as plantas de noz de cola ( <i>Cola acuminata</i> ).....	16
Figura 2 -	Árvore da noz de cola ( <i>Cola acuminata</i> ) .....	18
Figura 3 -	Folha, caule e fruto da noz de cola ( <i>Cola acuminata</i> ) .....	19
Figura 4 -	Sementes da noz de cola ( <i>Cola acuminata</i> ).....	20
Figura 5 -	Esquema do preparo dos extratos da planta fresca ( <i>Cola acuminata</i> ).....	23
Figura 6 -	Esquema do preparo dos extratos da planta seca ( <i>Cola acuminata</i> ).....	24
Figura 7 -	Perfil cromatográfico dos extratos da <i>Cola acuminata</i> .....	31
Figura 8 -	Teste de ação antimicrobiana dos extratos frescos e secos de <i>Cola acuminata</i> sobre a bactéria <i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 0538) .....	35
Figura 9 -	Teste de ação antimicrobiana dos extratos frescos e secos de <i>Cola acuminata</i> sobre a bactéria <i>Micrococcus luteus</i> ( ATCC 10240) .....	36
Figura 10 -	Determinação da concentração Inibitória Mínima dos extratos de <i>Cola acuminata</i> sobre a bactéria <i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 0538) .....	39
Figura 11 -	Concentração Microbicida Mínima dos extratos de <i>Cola acuminata</i> sobre <i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Rv (ATCC 27294) .....	40

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Concentração dos extratos da <i>Cola acuminata</i> em miligramas/mL nas nove colunas da microplaca após diluição .....	28
Tabela 2 -	Avaliação de presença de compostos fitoquímicos observados nos extratos da <i>Cola acuminata</i> .....	32
Tabela 3 -	Teste de difusão em ágar dos extratos da <i>Cola acuminata</i> . Halos de inibição em milímetros. Médias e desvios padrões em triplicata .....	38
Tabela 4 -	Teste de concentração inibitória mínima (CIM) e de concentração microbica mínima (CMM) dos extratos da <i>Cola acuminata</i> . Valores em miligramas/mL .....	41
Tabela 5 -	Teste de citotoxicidade dos extratos da <i>Cola acuminata</i> sobre as culturas de células BHK-21. Médias e desvios padrões em triplicata .....	42
Tabela 6 -	Índice de seletividade dos extratos da <i>Cola acuminata</i> .....	44

## LISTA DE ABREVIÇÕES E SIGLAS

mg	- Miligramas.
mL	- Mililitros.
mm	- Milímetros.
cm	- Centímetros.
µg	- Microgramas.
µL	- Microlitro.
nm	- Nanometros.
nM	- Nanomol.
mg/mL	- Miligrama por mililitro.
m/v	- Massa sobre volume.
v/v	- Volume sobre volume.
mmHg	- Milímetros de mercúrio.
CIM	- Concentração inibitória mínima.
CMM	- Concentração microbicida mínima.
MTT	- (3-(4,5-dimetil tiazol-2yl)-2, 5-difenil brometo de tetrazolina).
MEM	- Meio mínimo essencial de Eagle.
DMSO	- Dimetil sulfóxido.
BKH	- Baby kidney hamster (células de rim de hamster neonatos).
CC <sub>50</sub>	- Concentração citotóxica para 50% das células.
UV	- Ultravioleta.
CCD	- Cromatografia em camada delgada.
NP/PEG	- (2-aminoetil difenilborinato e polietilenoglicol).

## LISTA DE SÍMBOLOS

- °C - Graus Celsius.
- / - Por.
- ° - Graus.
- ' - Minutos.
- " - Segundos.
- % - Por cento.

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	12
<b>2</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	14
2.1	ANTIMICROBIANOS PROVENIENTES DE PRODUTOS NATURAIS .....	14
2.2	GÊNERO <i>Cola</i> .....	15
2.3	<i>Cola acuminata</i> .....	17
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	21
3.1	OBJETIVO GERAL .....	21
3.2	OBJETIVO ESPECÍFICO .....	21
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	22
4.1	OBTENÇÃO E CADASTRAMENTO DA PLANTA .....	22
4.2	PREPARO DOS EXTRATOS VEGETAIS .....	22
<b>4.2.1</b>	<b>Extrato da planta fresca</b> .....	23
<b>4.2.2</b>	<b>Extrato da planta seca</b> .....	24
4.3	AVALIAÇÃO DO PERFIL FITOQUÍMICO DOS EXTRATOS.....	25
4.4	ATIVIDADES BIOLÓGICAS DOS EXTRATOS DE <i>Cola acuminata</i> .....	26
<b>4.4.1</b>	<b>Avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos pelo teste de difusão em ágar</b> .....	26
<b>4.4.2</b>	<b>Avaliação da concentração inibitória mínima dos extratos</b> .....	27
<b>4.4.3</b>	<b>Avaliação da concentração microbicida mínima dos extratos</b> .....	29
<b>4.4.4</b>	<b>Avaliação da citotoxicidade dos extratos para cultura celular</b> .....	29
<b>4.4.5</b>	<b>Avaliação do índice de seletividade dos extratos</b> .....	30
4.5	ESTATÍSTICA .....	30
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	31
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES</b> .....	45
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	46

## 1 INTRODUÇÃO

O reino vegetal representa uma fonte inesgotável de recursos que vem sendo utilizada pelo homem, desde épocas remotas. O emprego de espécies de plantas com propriedades medicinais no tratamento de enfermidades e na recuperação da saúde é tão antiga quanto a própria humanidade (WAGNER; WISENAUER, 2006).

Através dos estudos das plantas, foram descobertas espécies com ações tóxicas e medicinais, sendo catalogados seus efeitos adversos e curativos. Assim, obteve-se uma vasta e sólida documentação científica de várias plantas e suas ações benéficas na cura de várias doenças. Entretanto, apenas 25% dos fármacos prescritos atualmente, nos países industrializados, são originados de produtos naturais (FOGLIO et al., 2006).

A busca por novos fármacos com atividade antimicrobiana constitui um importante campo de desenvolvimento científico. Um dos principais motivos é a evolução dos mecanismos de resistência e do número de microrganismos com pouca ou nenhuma sensibilidade a diversos tipos de medicamentos. Devido a este fato, as pesquisas de novas substâncias com atividade antimicrobiana, provenientes de produtos naturais que possui uma ampla variedade de moléculas, vêm crescendo em um campo promissor (OPLUSTIL, 2012).

*Cola acuminata* é uma planta que pertence à família *Malvaceae*, originária do continente africano. Foi introduzida nas Américas Central e do Sul através da colonização do continente americano, possuindo uma função social e religiosa. Suas sementes são utilizadas para presentear e alimentar as pessoas em reuniões comunitárias. Também é usada como fetiche na prática de rituais religiosos de origem africana (AKOEGNINOU et al., 2006).

Recentemente, foram descobertas substâncias provenientes da *Cola acuminata* com atividades farmacoterapêuticas, o que demonstra um enorme valor fitoterápico, sendo que estudos têm comprovado suas atividades farmacológicas como uso em doenças cardíacas, pulmonares, neurológicas e distúrbios gastrointestinais, (LOWE et al., 2014).

As propriedades antimicrobianas da *Cola acuminata*, evidenciadas por pesquisas com extratos, dão suporte às evidências de suas atividades fitoterápicas sobre microrganismos como bactérias e fungos. Seus constituintes fitoquímicos e

sua a atividade antimicrobiana são demonstrados em várias espécies do gênero *Cola* (ODUGBEMI, 2006).

Sendo assim, acreditamos que este estudo poderá contribuir com as pesquisas para o desenvolvimento de novos fármacos antimicrobianos, baseado na presença de moléculas com atividade antimicrobiana, provenientes dos extratos frescos e secos da folha, caule e semente da planta *Cola acuminata*, possibilitando seu uso futuro no controle de microrganismos e no tratamento de doenças provocadas por infecções.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Os fármacos antimicrobianos são substâncias, sintéticas ou naturais, capazes de impedir o crescimento ou levar a morte de microrganismos, como bactérias e fungos (GUIMARÃES; MOMESSO; PUPO, 2010).

### 2.1 ANTIMICROBIANOS PROVENIENTES DE PRODUTOS NATURAIS

O surgimento dos antimicrobianos foi um grande avanço para a ciência, constituindo uma opção terapêutica de extrema importância no combate de doenças infecciosas, reduzindo drasticamente a morbidade e a mortalidade das pessoas acometidas (SOUSA, 2006).

Nos dias atuais, entretanto, as infecções são a maior causa de mortalidade em pacientes imunodebilitados, principalmente nas pessoas hospitalizadas e institucionalizadas. Além da suscetibilidade orgânica dos imunocomprometidos, o desenvolvimento de microrganismos resistentes aos fármacos atuais agrava ainda mais os riscos para a população, gerando um grande problema de saúde pública (SOUSA et al., 2012).

A resistência dos microrganismos aos fármacos antimicrobianos pode ocorrer quando há mutação espontânea, recombinação e expressão de genes ou transferência horizontal de material genético através da aquisição de plasmídeos. Estes mecanismos proporcionam o aumento da variabilidade genética e o surgimento de linhagens de microrganismos mais aptos a sobreviver em locais hostis (ARIAS; CARRILHO, 2012; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2015).

Esta característica de adaptabilidade dos microrganismos associado ao uso irracional de fármacos antimicrobianos, acelera ainda mais o desenvolvimento da resistência microbiana aos medicamentos. O uso de antibióticos sem diagnóstico preciso e sem prescrição médica são exemplos de práticas que favorecem a seleção de microrganismos resistentes (KRISTIANSSON et al., 2011).

Na comunidade e nos ambientes hospitalares invariavelmente ocorre o contato com microrganismos resistentes a antimicrobianos. Doenças provocadas por

estes tipos de patógenos são de difícil tratamento e podem ter consequências devastadoras para a saúde humana (SANTOS, 2004).

Dessa forma, cada vez mais é necessário o investimento nas pesquisas para o desenvolvimento de novos princípios ativos capazes de agir sobre os microrganismos resistentes ou não resistentes. Substâncias com atividade antimicrobiana, provenientes das plantas, podem constituir uma promissora e concreta fonte de novos medicamentos (FONTENELLE et al., 2007; ROGUES, et al., 2007; SILVEIRA et al., 2009).

## 2.2 O GÊNERO *Cola* sp.

*Cola* sp. é um gênero de plantas pertencentes à subfamília *Sterculiaceae*, cujas variedades mais comuns são obtidas de várias árvores do oeste da África, das Américas Central e do Sul (Figura 1), compreendendo um total de 125 espécies. Dentre as mais importantes economicamente estão a *Cola nitida*, a *Cola vera* e a *Cola acuminata*. O fruto destas plantas é chamado de noz de cola (APG IV, 2016).

As plantas do gênero *Cola* podem se apresentar como arbustos ou árvores, de flores coloridas e pequenas. Os frutos são folículos ou cápsulas, que se abrem na maturação revelando sementes nuas. Alguns frutos permanecem fechados e suas sementes são envolvidos em uma polpa adocicada (APG IV, 2016).

Os frutos maduros das espécies de *Cola* são nozes conhecidas como noz de cola. Ela tem um gosto amargo e pode ser utilizada como redutor do apetite e estimulante do sistema nervoso. A noz de cola também tem efeito similar ao das xantinas encontradas em plantas como coco e chá. Entretanto, seus efeitos diferem por produzir um forte estado de euforia e bem estar, através da estimulação do sistema nervoso central e do coração. A noz de cola é utilizada ainda como fonte de alcalóides em preparações farmacêuticas (SONIBARE; SOLADOYE; ESAN, 2009).



Figura 1 - Locais onde são encontradas as plantas da noz de cola (*Cola acuminata*).

Fonte: DAH-NOUVLESSOUNON et al. (2015).

A noz de cola também é chamada de abajá, café do sudão, cola, mukezu, obi, oribi. Possui um extrato que é produzido principalmente a partir das sementes das espécies *Cola nitida* e *Cola acuminata*. Delas podem ser extraídas várias substâncias, dentre elas a cafeína e a teobromina (BURDOCK, 2010).

A noz de cola é um estimulante natural que é utilizada em vários países africanos, através do consumo *in natura* como alimento, para presentear e homenagear visitantes e em cerimônias religiosas nas comunidades africanas tradicionais (OBEY; SWAMY, 2014).

Diversas características medicinais e farmacológicas foram observadas nas espécies de *Cola*. A noz de cola é frequentemente utilizada para tratamento de quadros clínicos de tosse, broncoespasmo e asma. A presença de cafeína auxilia na ação broncodilatadora, otimizando a passagem de ar pelas vias aéreas. A noz de cola também pode ser utilizada no tratamento da malária e dos quadros febris. Estudos em animais sugerem que ela tenha propriedades lipolíticas e estimule a produção de suco gástrico (SONIBARE; SOLADOYE; ESAN, 2009).

Alguns estudo sugerem que as folhas das espécies de *Cola* podem ser usadas no tratamento de micoses, escabiose, gonorréia, disenterias e alguns tipos de oftalmias. Tradicionalmente, folhas, galhos, flores e frutos de *Cola nitida* e *Cola acuminata* são utilizados para tratamento de diarreia, náuseas, vômitos, tosse e alterações respiratórias (ODUGBEMI, 2006).

### 2.3 *Cola acuminata*

*Cola acuminata* é uma árvore nativa da faixa equatorial africana cujos frutos são conhecidos pelos nomes de noz de cola ou obi(Figura 2). Possui baixa estatura, tronco cinzento e folhagem brilhante (APG IV, 2016).

As flores são unissexuais, brancas ou amarelo-creme com as pontas das pétalas vermelho-escuro e raios da mesma cor, próximo ao centro. Os frutos são cápsulas secas, que se abrem ao secar liberando as sementes (APG IV, 2016).

A noz de cola cresce espontaneamente na África Ocidental e Central em climas quentes e úmidos (Figura 3). O uso de suas sementes difundiu-se na região norte da América Latina, por intermédio dos escravos negros que usavam as nozes de cola como alimento, para suportar trabalhos extenuantes. Depois, foi evada a outros países com finalidades agroindustriais (BURDOCK, 2010).

*Cola acuminata* é uma planta que possui grande valor social e histórico devido ao seu uso empírico, em diversas áreas dos continentes africano e americano. Devido a sua importância e as suas várias utilidades, têm sido realizadas pesquisas para identificar de seus compostos fitoquímicos (SONIBARE; SOLADOYE; ESAN, 2009).

As sementes de *Cola acuminata* podem ser mastigadas na forma fresca, apresentando inúmeros benefícios. Dentre eles, facilitar a digestão, agir como estimulante e proporcionar sensação de bem estar (Figura 4). Elas também agem em funções fisiológicas básicas através do aumento da temperatura corporal, da pressão arterial, e da frequência respiratória (SONIBARE; SOLADOYE; ESAN, 2009).



Figura 2 - Árvore da Noz de cola (*Cola acuminata*).  
Fonte: SOUTHEAST GROWERS (2016).

Dentre as atividades biológicas mais importantes da *Cola acuminata* está sua capacidade de permanecer em altas concentrações no Sistema Nervoso Central, atuando como estimulante e modulador das atividades neuronais. Como possui em sua composição, grande concentrações de cafeína, possibilita sua utilização para tratamento de cefaléias de origem neurogênica (ADAM, 2011).

Outro bioativo presente nas sementes de *Cola acuminata* é a teobromina, que apresenta ação broncodilatadora e vasodilatadora. Em associação com a cafeína, pode proporcionar atividade importante no tratamento de doenças respiratórias e pulmonares (OBEY; SWAMY, 2014).

A análise fitoquímica qualitativa demonstrou que as sementes da planta coletadas no Benin, país da região ocidental da África, possuem em sua composição, taninos, flavonoides, esteroides, triterpenos, saponinas e alcaloides (DAH-NOUVLESSOUNON et al, 2015; KENNETH et al., 2014).



Figura 3 - Folha, caule e fruto da noz de cola (*Cola acuminata*).  
Fonte: LOWE et al. (2014).

Estudos têm mostrado que extratos hidroetanólicos de sementes de *Cola acuminata* apresentam atividade antimicrobiana contra diversos tipos de bactérias, como *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *Pseudomonas aeruginosa* (LOWE et al, 2014).

Testes de sensibilidade da atividade antimicrobiana evidenciaram que extratos etanólicos das folhas e das sementes de *Cola acuminata*, podem inibir o crescimento de vários microrganismos. Os extratos das folhas podem inibir o crescimento de microrganismos como *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Candida albicans* (DAH-NOUVLESSOUNON et al., 2015).

Através de pesquisas feitas para avaliar o perfil fitofarmacológico da *Cola acuminata* e da *Cola nitida*, observou-se atividade antifúngica em extratos hídricos e hidroetanólicos (ABIODUN; OYEKANMI; OLUOTI, 2014).



Figura 4 - Sementes da noz de cola (*Cola acuminata*).  
Fonte: PLANT INTERNATIONAL DATABASE (2013).

### 3 OBJETIVOS

A finalidade deste trabalho foi determinar as características fitoquímicas, citotóxicas, farmacológicas e sobretudo a atividade biológica sobre microrganismos específicos.

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a ação antimicrobiana dos extratos hidroetanólicos das folhas, caules e sementes, secos e frescos de *Cola acuminata*.

#### 3.2 OBJETIVO ESPECÍFICO

- a) Realizar análise fitoquímica dos extratos de *Cola acuminata*;
- b) Avaliar a atividade antimicrobiana da *Cola acuminata*, por teste de difusão em ágar, sobre bactérias Gram positivas, Gram negativas, *Mycobacterium tuberculosis* e fungos;
- c) Determinar a concentração inibitória mínima e concentração microbicida mínima, em microplaca, por microdiluição em caldo dos extratos de folhas, caules e sementes sobre os bactérias e fungos;
- d) Avaliar a citotoxicidade e determinar o índice de seletividade dos extratos;
- e) Comparar a ação dos extratos obtidos da planta fresca e da planta seca.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

Para realização deste estudo foram utilizadas técnicas para análise dos componentes fitoquímicos, propriedades antimicrobianas e ação citotóxica dos extratos hidroetanólicos da *Cola acuminata*.

### 4.1 OBTENÇÃO E CADASTRAMENTO DA PLANTA

As amostras do caule, folha e semente da *Cola acuminata* foram coletadas no mês de dezembro de 2015, no município de Ibitinga, estado de São Paulo (21°46'45" latitude sul e 48°56'04" longitude oeste) a uma elevação de 491 metros do nível do mar.

Após a coleta, a planta foi identificada pelo Prof. Dr. Marcelo Polo, do Instituto de Ciências Naturais, cadastrada e arquivada no Herbário da Universidade Federal de Alfenas, recebendo o número do tombo da exsicata 2707.

### 4.2 PREPARO DOS EXTRATOS VEGETAIS

As amostras do caule, folha e semente da *Cola acuminata* foram coletadas pelo Sr. Reginaldo Fernandes de Melo, encaminhada à cidade de Alfenas e recebidas no Laboratório de Microbiologia da Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL) em 24 horas. Em seguida foram preparados extratos hidroetanólicos da planta fresca e seca, com o propósito de comparar os dois métodos de extração. Nas técnicas abaixo foi utilizado o protocolo modificado por Noronha (2014).

#### 4.2.1 Extrato da planta fresca

Para a obtenção dos extratos da planta fresca, as amostras do caule, folha e semente de *Cola acuminata* foram separadas em três grupos, de acordo com a parte da planta. Depois foram lavadas em água corrente e em seguida cortados manualmente em pedaços menores com o auxílio de uma faca.

Os extratos hidroetanólicos do caule, folhas e semente da planta fresca foram preparados separadamente na proporção de 20% (m/v) utilizando álcool etílico a 70% (v/v). Em seguida, foram processados em liquidificador doméstico e macerados por sete dias ao abrigo da luz, com uma agitação diária manual.

Após a maceração, os extratos foram filtrados em filtro de papel. Posteriormente, foram submetidos à concentração em rotaevaporador, à pressão negativa de 500 mmHg e a temperatura de 60°C (Figura 5).



Figura 5 - Esquema do preparo dos extratos da planta fresca (*Cola acuminata*).  
Fonte: Do autor.

Os extratos rotaevaporados foram distribuídos em frascos de 5 mL, congelados, liofilizados e armazenados sob refrigeração. Antes da liofilização, os frascos foram pesados para a determinação da massa das amostras da planta. No momento da realização dos ensaios, os extratos foram reconstituídos em água destilada de acordo com a concentração desejada de 50mg/mL.

#### 4.2.2 Extrato da planta seca

No preparo dos extratos da planta seca, as amostras do caule, folhas e semente de *Cola acuminata* foram separadas em três grupos, de acordo com a parte da planta. Depois foram lavadas em água corrente, cortadas manualmente em pedaços menores, com o auxílio de uma faca e em seguida, desidratadas a temperatura de 40°C em estufa com circulação de ar, até a obtenção do peso constante. A seguir foram moídos em moinho de facas e acondicionados em sacos plásticos na geladeira até o momento do uso. Os extratos hidroetanólicos da planta seca foram preparados separadamente na proporção de 20% (m/v), utilizando álcool etílico a 70% (v/v), sendo macerados por sete dias ao abrigo da luz, com uma agitação diária manual.

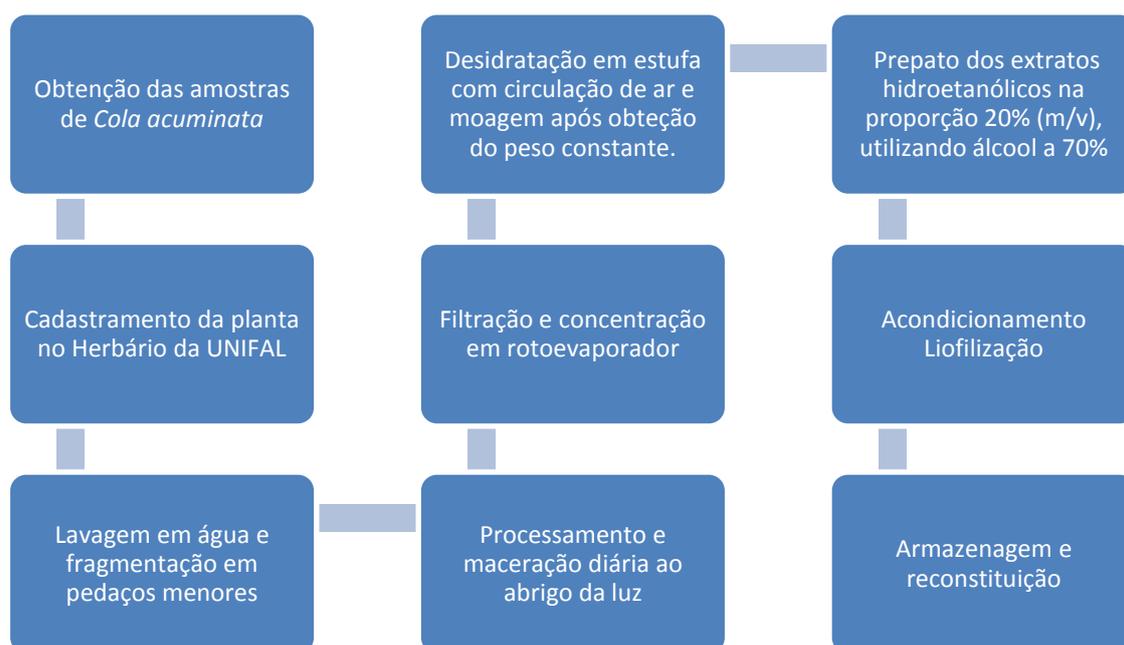


Figura 6 - Esquema do preparo dos extratos da planta seca (*Cola acuminata*).  
Fonte: Do autor.

Após a maceração, os extratos foram filtrados em filtro de papel. Posteriormente, o filtrado obtido foi submetido à concentração em rotaevaporador, à pressão negativa de 500 mmHg e a temperatura de 60 °C (Figura 6).

Os extratos rotaevaporados foram distribuídos em frascos de 5 mL e em seguida pesados para determinação da massa das amostras. Posteriormente, os extratos foram liofilizados e armazenados sob refrigeração. Para realização dos

ensaios, os extratos foram reconstituídos em água destilada de acordo com a concentração de 50mg/mL.

#### 4.3 AVALIAÇÃO DO PERFIL FITOQUÍMICO DOS EXTRATOS

A triagem fitoquímica dos extratos de *Cola acuminata* foi realizada através da técnica de cromatografia em camada delgada (CCD), no Laboratório de Plantas Medicinais e Fitoterápicos da Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL-MG).

Cada um dos extratos de *Cola acuminata* foi dissolvido, separadamente, em metanol, a fim de se obter uma concentração de 1,0 mg/mL. As análises cromatográficas foram feitas em microplacas de sílica gel 60 F<sub>254</sub> (5x5 cm), utilizando uma mistura de acetato de etila, metanol e água (81:11:8) como fase móvel. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

Para a identificação dos compostos químicos presentes, 10 µL das soluções-amostra e de soluções de padrões (Sigma<sup>®</sup>) na mesma concentração (1 mg/mL), sendo elas rutina, quercetina, ácido gálico, catequina, cafeína, pilocarpina, saponina e antraquinona, foram aplicados a cada uma das placas. Todas as placas foram submetidas à revelação por luz ultravioleta (UV) a 250 e 365 nm. Em seguida, cada placa, separadamente, foi submetida a reveladores diferentes:

- a) Anisaldeído sulfúrico com aquecimento a 100°C, para identificação de flavonoides, saponinas, terpenos, taninos e catequinas;
- b) NP/PEG, para identificação de flavonoides;
- c) Cloreto férrico, para identificação de taninos, ácidos fenólicos e catequinas;
- d) Reativo de Dragendorff, para identificação de alcaloides;
- e) Vapores de iodo, para identificação de saponinas;
- f) Hidróxido de potássio alcoólico a 5% (m/v), para identificação de antraquinonas;

Todas as classes de substâncias foram determinadas pela comparação das colorações das manchas observadas nas placas, quando reveladas, com as colorações das classes descritas na literatura (WAGNER, BLADT, ZGAINSKY, 2009).

#### 4.4 ATIVIDADE BIOLÓGICA DOS EXTRATOS DA *Cola acuminata*

A avaliação biológica dos extratos da *Cola acuminata* foi realizada através de 5 etapas a saber: avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos pelo teste de difusão em ágar, avaliação da concentração inibitória mínima dos extratos, avaliação da concentração microbicida mínima dos extratos, avaliação da citotoxicidade dos extratos para cultura celular e avaliação do índice de seletividade dos extratos.

##### 4.4.1 Avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos pelo teste de difusão em ágar

Os testes microbiológicos foram realizados no Laboratório de Microbiologia da UNIFAL. Para a avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos, foram utilizados os seguintes microrganismos, mantidos no Laboratório de Microbiologia da UNIFAL-MG: *Bacillus cereus* ATCC 11778, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Kocuria rizophila* ATCC 9341, *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356, *Micrococcus luteus* ATCC 10240, *Staphylococcus aureus* ATCC 0538, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 1222, *Bordetella bronchiseptica* ATCC 4617, *Enterobacter cloacae* LMI-UNIFAL, *Escherichia coli* ATCC 8739, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Salmonella typhimurium* ATCC 14028, *Serratia marcescens* LMI-UNIFAL, *Mycobacterium tuberculosis* (H37Rv) ATCC 27294, *Candida albicans* ATCC 10231 e *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 6538.

Para a avaliação da atividade antimicrobiana foi utilizado ágar Mueller Hinton para as bactérias e ágar Mueller Hinton com 1% de glicose para as leveduras. As suspensões de microrganismos foram preparadas em soro fisiológico, com turvação correspondente ao tubo 0,5 da Escala de MacFarland. Os extratos liofilizados foram dissolvidos em água destilada, na concentração de 50 mg/mL.

Com auxílio de um tubo metálico foram perfurados poços de 4 mm de diâmetro na superfície do meio de cultura para a aplicação dos extratos a serem testados. Em seguida, a suspensão de microrganismo foi inoculada em toda

superfície do meio e, cada poço foi preenchido com 40µL (2 mg) de extrato. As placas foram incubadas a 37°C por 24 horas.( BAUER; KIRBY, 1966; CLSI, 2003).

Posteriormente, foi realizada a leitura dos diâmetros dos halos de inibição do crescimento microbiano, utilizando como controle positivo de ação antimicrobiana, solução de clorexidina a 0,12% (v/v) e como controle negativo água destilada. Todos os ensaios foram realizados em triplicata e submetidos aos testes de determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e concentração microbicida mínima (CMM) em microplaca.

#### 4.4.2 Avaliação da concentração inibitória mínima dos extratos

A avaliação da concentração inibitória mínima dos extratos (CIM) foi realizada pela técnica de microdiluição em caldo. Tal metodologia se encontra nos documentos M27- A3 (CLSI, 2008), para os ensaios com leveduras e M7- A6 (CLSI, 2003), para os estudos com bactérias.

Para as bactérias foi utilizado o caldo Mueller Hinton e para as leveduras, o caldo Mueller Hinton com 1% de glicose. As suspensões de microrganismos foram preparadas em soro fisiológico com turvação correspondente ao tubo 0,5 da Escala de MacFarland. Os extratos liofilizados foram dissolvidos em água destilada na concentração de 50 mg/mL e em seguida, filtrados em membrana de 0,45 µm de diâmetro de poro, para controle da retenção de partículas.

O ensaio foi realizado em microplacas de fundo chato contendo 96 poços, distribuídos em oito linhas (A - H) e 12 colunas (1 - 12). Um volume de 100 µL de caldo Mueller Hinton, duas vezes concentrado, foi adicionado em cada poço da coluna 1. Os poços das colunas restantes receberam 100 µL de caldo Mueller Hinton.

Em uma segunda etapa, foram adicionados 100 µL do extrato da planta nos poços da coluna 1, realizando-se a diluição do extrato a partir da concentração de 12,5 mg/mL até 0,04 mg/mL. Na diluição, 100 µL da mistura contida em cada poço da coluna 1, foi transferida para a coluna 2 e homogeneizado. Esse processo foi repetido até a coluna 9 da microplaca, sendo desprezados 100 µL da mistura após a homogeneização.

A Tabela 1 mostra a concentração final do extrato nas colunas de 1 a 9 da microplaca após a diluição.

Cada poço recebeu 100  $\mu\text{L}$  do meio de cultura ficando então com volume final de 200  $\mu\text{L}$ . Posteriormente, foi adicionado um volume de 10  $\mu\text{L}$  da suspensão de microrganismo em cada poço nas fileiras de 1 a 10, partindo da linha A até a F. Após a adição de 100  $\mu\text{L}$  de meio de cultura, a concentração inicial passa a ser de 12,5 mg/mL.

Tabela 1 - Concentração dos extratos em miligramas/mL nas nove colunas da microplaca após diluição.

Coluna	Concentração (mg/mL)
1	12,5
2	6,25
3	3,12
4	1,56
5	0,78
6	0,39
7	0,19
8	0,09
9	0,04

Fonte: Do autor.

A coluna 10 foi usada como controle positivo de crescimento do microrganismo (meio de cultura + microrganismo). A coluna 11 foi utilizada como controle de esterilidade do extrato (meio de cultura + extrato) e a coluna 12, como controle de esterilidade do meio de cultura (apenas meio de cultura).

Após a adição dos microrganismos, as placas foram incubadas a 37°C por 24 horas. Posteriormente, foi realizada a leitura visual das placas pela turvação ou não, do meio de cultura, indicando presença ou ausência do crescimento microbiano. Nos poços onde não houve turvação foi coletado uma alíquota de 10  $\mu\text{L}$  do meio e inoculado em agar BHI, incubado a 37°C por 48 horas para avaliação da atividade microbiana. A atividade antimicrobiana sobre *M. tuberculosis* (H37) foi determinada pela técnica em microplaca com caldo Middlebrook 9H10 adicionado de

Middlebrook OADC Enrichment® tendo como controle positivo solução de isoniazida na concentração inicial de 50 µg/mL. As culturas foram incubadas a 37°C por 28 dias (TELLES, 2000). A leitura visual das placas indicou a turvação ou não, do meio de cultura, determinando a presença ou ausência do crescimento microbiano.

O teste de difusão em ágar não é recomendado para o *Mycobacterium tuberculosis* devido longo período de incubação com progressiva difusão das moléculas e perda de ação das mesmas.

#### 4.4.3 Avaliação da concentração microbicida mínima dos extratos

A determinação da concentração microbicida mínima (CMM) dos extratos foi realizada com base nos resultados da CIM, utilizando-se placas contendo ágar Nutriente para as bactérias, agar Sabouraud para leveduras e agar Middlebrook 7H10 com suplemento AODC para *Mycobacterium tuberculosis* (H37Rv) ATCC 27294.

No ensaio, um volume de 10 µL de suspensão proveniente de cada poço da microplaca da CIM onde não se pode observar crescimento foi inoculado na superfície dos respectivos meios de cultura. Após incubação verificou-se a presença ou ausência de crescimento microbiano.

#### 4.4.4 Avaliação da citotoxicidade dos extratos para cultura celular

A citotoxicidade foi avaliada através do método que se baseia na medida da atividade da enzima desidrogenase mitocondrial que, quando ativa, é capaz de metabolizar o reagente MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina) em um composto colorido denominado formazan.

Neste ensaio foram semeadas  $1 \times 10^4$  de células BHK-21 (células de rim de hamster neonato) por poço, em placas de 96 poços contendo meio de cultura MEM (Meio Mínimo Essencial de Eagle), acrescido de 10% de soro fetal bovino e antibióticos. Após 24 horas de incubação a 37°C, o meio de cultivo foi removido e

adicionado à cultura 0,1 mL de meio MEM contendo 1% de soro fetal bovino com diluições decrescentes dos extratos (5mg/mL a 0,039 mg/mL).

As microplacas foram incubadas a 37°C por 48 horas. Após esse período foi acrescentado 10 µL de MTT a uma concentração de 5mg/mL e incubou-se por 4 horas a temperatura ambiente para a incorporação do MTT e formação dos cristais de formazan.

Posteriormente foi removido cuidadosamente o meio de cultura e solubilizado os cristais de formazan pela adição de 100 µL de dimetil sulfóxido (DMSO). A análise espectrofotométrica foi realizada em um leitor de microplacas com comprimento de onda de 570 nm.

A porcentagem de citotoxicidade foi calculada utilizando a fórmula  $[(A-B) / Ax100]$ , onde A e B são valores das densidades ópticas das células controle e tratadas, respectivamente. A concentração citotóxica para 50% das células (CC50) foi estimada a partir de curvas de concentração-efeito após análise de regressão linear (ARAÚJO et al., 2008). Os testes foram realizados em duplicata juntamente com o controle positivo da viabilidade celular.

#### 4.4.5 Avaliação do índice de seletividade dos extratos

O índice de seletividade dos extratos foi calculado avaliando-se a razão entre a relação entre a CC50 e a CIM. Valores superiores a 1 foram considerados promissores para a seleção dos extratos para estudos posteriores.

#### 4.5 ESTATÍSTICA

As avaliações estatísticas dos resultados da atividade antimicrobiana dos extratos hidroetanólicos da *Cola acuminata* pelo teste de difusão em ágar, foi realizada por meio do software Progama R (R CORE TEAM, 2016; FERREIRA, CAVALCANTI, NOGUEIRA, 2013; MENDIBURU, 2016), pela análise de variância (ANOVA) e aplicação dos testes de Tukey e Kruskal-Wallis, para observar as diferenças significativas entre os valores médios ( $p < 0,05$ ).

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O uso terapêutico de substâncias provenientes das plantas é uma prática comum em diversos países. Esta prática decorre da presença de moléculas com propriedades bioativas, que apresentam características que podem proporcionar o desenvolvimento de novos fármacos.

A descoberta de novos medicamentos a partir de bioativos naturais constitui uma vantagem no tratamento de doenças provocadas por patógenos, pois proporciona uma menor possibilidade de resistência dos microrganismos a curto e médio prazo.

A avaliação do perfil fitoquímico dos extratos hidroetanólicos da *Cola acuminata*, realizada pelo método de cromatografia em camada delgada (CCD), evidenciou a presença de taninos, catequinas, terpenos, flavonoides, alcaloides e ácido gálico, variando de acordo com o tipo de extrato testado (Figura 7).

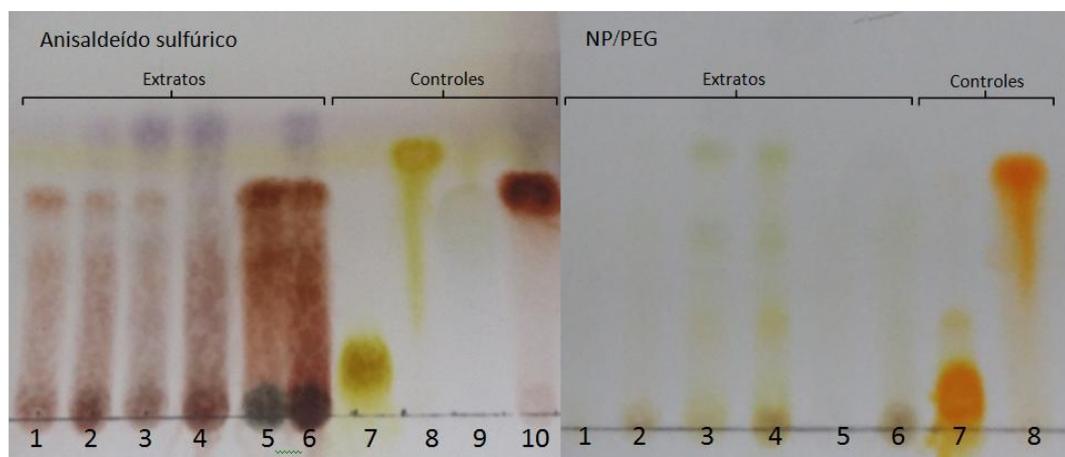


Figura 7 - Perfis cromatográficos dos extratos da *Cola acuminata*, utilizando como reveladores o anisaldeído sulfúrico e o NP/PEG. Legenda: 1 – caule fresco, 2 – caule seco, 3 – folha fresca, 4 – folha seca, 5 – semente fresca, 6 – semente seca. Controles: 7 – rutina, 8 – quercetina, 9 – ácido gálico, 10 – catequina.

Fonte: Do autor.

Foi observada a presença dos constituintes majoritários nos extratos de *Cola acuminata*, sendo que os resultados das análises cromatográficas estão expressos na Tabela 2. Ação antimicrobiana destes extratos estão, provavelmente, relacionado a presença de flavonoides e taninos. Os extratos da semente seca, do caule seco e da folha seca apresentaram uma maior variedade de compostos químicos

Compostos fenólicos, como taninos e flavonoides, presentes em várias partes das plantas pode ser associado a inúmeras atividades biológicas, como atividade antioxidante e atividade antimicrobiana (EINBOND et al., 2004; BANERJEE; DASGUPTA; DE, 2005; CHOI et al., 2006).

A atividade antimicrobiana dos flavonoides se deve ao fato desses compostos serem capazes de reagir com o DNA do microrganismo e interferir na sua replicação, inibindo o seu crescimento (MALEKI et al., 2008; SEYYEDNEJAD et al., 2008).

Os taninos são compostos fenólicos, presentes na maior parte das plantas, capazes de formar complexos que inativam enzimas utilizadas por fitopatógenos (MONTERIO et al., 2005; KAMBA; HASSAN, 2010). Sua atividade antimicrobiana ocorre em função de três características gerais desse grupo: atividade antioxidante e sequestro de radicais livres, formação de complexos com íons metálicos e formação de compostos com moléculas como proteínas e polissacarídeos (MELLO e SANTOS, 2001).

Tabela 2 - Avaliação de presença de compostos fitoquímicos observados nos extratos da *Cola acuminata*.

Extratos Compostos	Semente seca	Semente fresca	Caule seco	Caule fresco	Folha seca	Folha fresca
Ácido gálico	+	+	-	-	-	-
Alcaloides	+	-	+	+	+	-
Antraquinonas	-	-	-	-	-	-
Catequinas	+	+	+	+	+	+
Flavonoides	+	-	+	-	+	+
Saponinas	+	+	+	+	+	+
Taninos condensados	+	+	+	+	+	+
Taninos hidrossolúveis	+	+	+	+	+	+
Terpenos	+	+	+	+	+	+

Fonte: Do autor.

Legenda: (+) Presença. (-) Ausência.

A revelação por UV no comprimento de onda de 250nm demonstrou manchas fluorescentes acastanhadas em todos os extratos, localizadas no ponto de aplicação, que podem corresponder aos taninos condensados. Na análise dos extratos da folha fresca e da folha seca observou-se também manchas fluorescentes levemente amareladas, correspondendo aos flavonoides. Já nos extratos da semente fresca e da semente seca, ocorreu a presença de manchas fluorescentes azuladas que sugerem a presença de taninos hidrolisáveis (esterificados com ácido gálico) e manchas fluorescentes lilás, sugerindo a presença das catequinas.

Utilizando como revelador o UV com comprimento de onda de 365nm constatou-se nos extratos de caule seco, folha seca e semente seca, manchas fluorescentes azuladas, que sugerem a presença de terpenos. Já nos extratos de folha fresca e folha seca, manchas fluorescentes alaranjadas, são indicativas da presença dos flavonoides.

Em todos os extratos da *Cola acuminata*, a revelação com anisaldeído sulfúrico evidenciou manchas escuras de coloração variada, sugerindo a presença dos taninos condensados, dos taninos hidrolisáveis, das catequinas e dos terpenos.

A revelação com NP/PEG constatou a presença de manchas amareladas nos extratos de caule seco, folha fresca, folha seca e semente seca, sugerindo a presença de flavonoides. Os demais extratos não apresentaram manchas de coloração característica dos flavonoides, constatando, portanto, a ausência destes compostos.

A utilização do cloreto férrico como revelador da CCD demonstrou a presença de manchas escuras, verdes, marrons, amareladas e azuis, correspondendo respectivamente aos taninos condensados, as catequinas, aos taninos hidrossolúveis aos flavonoides e aos derivados do ácido gálico.

O reativo de Dragendorff é utilizado especificamente para identificação de compostos alcaloides. Em nosso ensaio de CCD foram observadas manchas sutilmente avermelhadas nos extratos do caule fresco, caule seco e folha seca, podendo indicar a presença de alguns alcaloides, porém em baixas concentrações. Os demais extratos não apresentaram manchas características dos alcaloides, sugerindo a ausência destes compostos.

Através da revelação com vapores de iodo observou-se a presença manchas sutilmente beges, correspondentes aos taninos, sugerindo uma possível presença de saponinas nos extratos analisados.

Após a revelação com KOH alcoólico a 5% não se observaram, em nenhum dos extratos, manchas de coloração púrpura características das antraquinonas, evidenciando a ausência destes compostos.

Espécies do gênero *Cola* geralmente apresentam flavonoides, alcaloides, ácidos fenólicos, saponinas, taninos e terpenos (BOUDJEKO et al., 2009). No entanto, a composição de metabólitos secundários de uma planta pode ser influenciada por fatores como altitude, sazonalidade e idade da planta (GOBBONETO e LOPES, 2007).

A presença de taninos, flavonoides, esteroides, triterpenos, saponinas e alcaloides foi evidenciada em plantas da *Cola acuminata* coletadas no Benin e na Nigéria respectivamente, países da região ocidental da África (DAHNOUVLESSOUNON et al. 2015; KENNETH et al., 2014).

Estudos realizados com extratos hidroetanólicos de folhas secas, de espécies do gênero *Cola*, incluindo a *Cola acuminata*, forma realizados na Nigéria, evidenciando a presença de taninos e flavonoides (SONIBARE; SOLADOYE; ESAN, 2009). Já a presença de taninos e saponinas foi observada em extratos da semente e do caule, obtidos a partir do metanol, éter e clorofórmio (ADENIYI; GROVES; GANGADHARAM, 2004). Dessa forma, os resultados obtidos no presente estudo estão de acordo com relatos referentes à composição química da *Cola acuminata* encontrados na literatura.

A atividade antimicrobiana dos extratos foi avaliada pelo método de difusão em ágar, no qual se analisa como o microrganismo se comporta frente a uma substância biologicamente ativo. Em nosso estudo foram utilizados extratos da semente, da folha e do caule, secos e frescos da planta *Cola acuminata*, colocados em poços previamente marcados no meio de cultura sólido (Figura 8). Para interpretação dos resultados, é observado o tamanho do halo de inibição do crescimento microbiano em volta de cada poço demonstrando a sensibilidade do microrganismo ao extrato testado (OSTROSKY et al., 2008).

Na Tabela 3 podemos observar os resultados das médias e dos desvios padrões no teste de difusão em ágar, demonstrando que houve sensibilidade aos extratos de *Cola acuminata* de bactérias Gram positivas, Gram negativa e fungos.

Dentre as bactérias Gram positivas que demonstraram sensibilidade aos extratos, podemos citar *Bacillus cereus* ATCC 11778, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Kocuria rizophila* ATCC 9341, *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356,

*Micrococcus luteus* ATCC 10240, *Staphylococcus aureus* ATCC 0538 e *Staphylococcus epidermidis* ATCC 1222. *Micrococcus luteus* ATCC 10240 foi a bactéria mais sensível, apresentando halos de inibição de 13,0 a 16,0 mm, exceto para os extratos do caule fresco e caule seco que demonstraram melhor sensibilidade para o *Bacillus cereus* ATCC 11778.

A única bactéria Gram negativa que apresentou sensibilidade aos extratos foi *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027. Este resultado demonstra que os bioativos provenientes de *Cola acuminata* apresentam melhores resultados quando usados em bactérias Gram positivas.

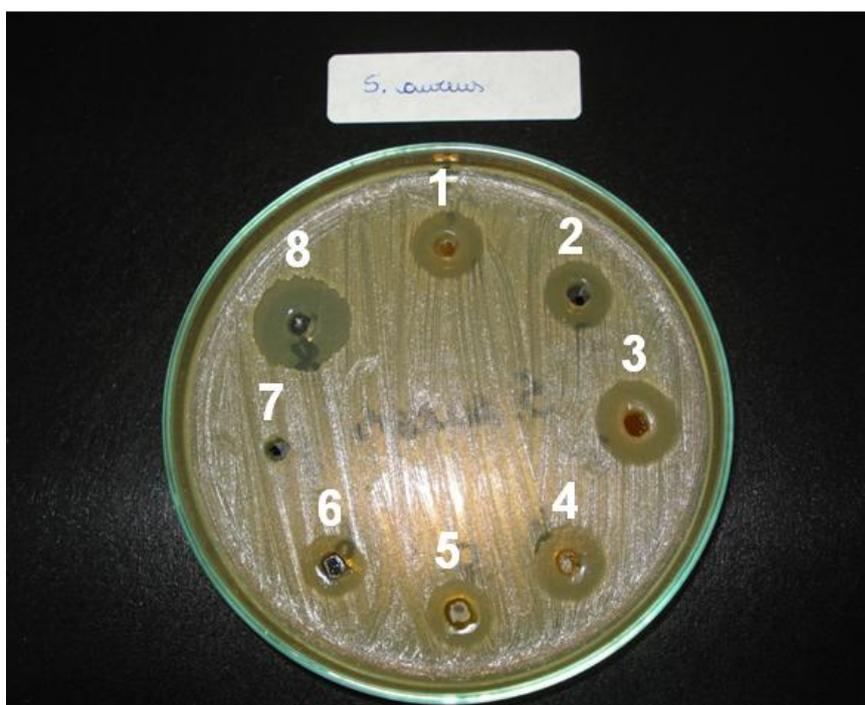


Figura 8 - Teste da ação antimicrobiana dos extratos frescos e secos da *Cola acuminata* sobre a bactéria *Staphylococcus aureus* (ATCC 0538), realizado em triplicata. Legenda: 1 – semente seca, 2 – semente fresca, 3 – caule fresco, 4 – caule seco, 5 – folha seca, 6 – folha fresca, 7 – controle negativo (água destilada), 8 – controle positivo (clorexidine 0,12%).

Fonte: Do autor.

*Candida albicans* ATCC 10231 e *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 6538 foram os fungos testados, sendo que ambos foram inibidos nos testes de difusão em ágar por quase todos os extratos.

Dentre os microrganismos que foram sensíveis aos extratos, os que demonstraram melhor resposta de inibição de crescimento foram *Bacillus cereus* ATCC 11778, *Candida albicans* ATCC 10231, *Kocuria rizophila* ATCC 9341, *Micrococcus luteus* ATCC, *Staphylococcus aureus* ATCC 0538 e *Staphylococcus*

*epidermidis* ATCC 1222, apresentando médias de halos de inibição entre 10,33 e 17,0 mm (Figura 9).



Figura 9 - Teste da ação antimicrobiana dos extratos frescos e secos da *Cola acuminata* sobre a bactéria *Micrococcus luteus* (ATCC 10240), realizado em triplicata. Legenda: 1 – semente seca, 2 – semente fresca, 3 – caule fresco, 4 – caule seco, 5 – folha seca, 6 – folha fresca, 7 – controle negativo (água destilada), 8 – controle positivo (clorexidine 0,12%).

Fonte: Do autor.

A inibição do crescimento não foi observada nas seguintes bactérias, *Bordetella bronchiseptica* ATCC 4617, *Enterobacter cloacae* LMI-UNIFAL, *Escherichia coli* ATCC 8739, *Salmonella tiphymurium* ATCC 14028, *Serratia marcescens* LMI-UNIFAL que são bactérias Gram negativas. Estudos têm mostrado que extratos hidroetanólicos de sementes de *Cola acuminata* fornecem atividade antimicrobiana contra diversos tipos de bactérias, como *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *Pseudomonas aeruginosa* (LOWE et al, 2014). No nosso trabalho a *Pseudomonas aeruginosa* foi a única bactéria Gram negativa sensível aos extratos.

De acordo com os resultados dos testes de difusão em ágar, foi possível verificar diferenças quanto ao espectro de ação e o diâmetro dos halos de inibição entre os extratos preparados com a planta fresca e com a planta seca. Os extratos da semente fresca e da semente seca demonstraram maior espectro de ação em quatro tipos de microrganismos cada um, sendo que em um deles, o

*Saccharomyces cerevisiae* ATCC 6538, o resultado foi igual. O extrato do caule fresco exibiu maior espectro de ação que o extrato do caule seco em todos os microrganismos, com exceção do *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356. Já o extrato da folha seca demonstrou melhores resultado em quase todos os microrganismo testados, com exceção da *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 e do *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 6538. Os melhores resultados quanto ao espectro de ação e o diâmetro dos halos de inibição foram exibidos pelo extrato do caule fresco, seguido pelo extrato do caule seco (Tabela 3).

Testes de sensibilidade da atividade antimicrobiana evidenciaram que extratos etanólicos das folhas e das sementes de *Cola acuminata*, podem inibir o crescimento de vários microrganismos em diferentes níveis. Os extratos das folhas podem inibir o crescimento de bactérias com *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Candida albicans* (DAH-NOUVLESSOUNON et al., 2015). Estes resultados foram semelhantes aos encontrados neste trabalho (Figura 10).

Tabela 3 - Teste de difusão em ágar dos extratos da *Cola acuminata*. Halos de inibição em milímetros. Médias e desvios padrões em triplicata

Extratos Microorganismos ATCC	Semente seca	Semente fresca	Caule fresco	Caule seco	Folha seca	Folha fresca	CHX 0,12%	AnB 100 µg	CLF 30 µg	SMZ 25 µg
<i>B. cereus</i> - 11778,	14,33±1,15	13,0±2,65	17,0±2,0	15,33±1,53	14,67±2,08	13,0±2,65	18,0±0,0	NR	23±0,0	24±0,0
<i>B. subtilis</i> - 6633	9,0±0,0	7,0±0,0	10,0±0,0	6,0±0,0	5,0±0,0	0,0±0,0	20,0±0,0	NR	24,67±0,58	30,0±0,0
<i>K. rizophila</i> - 9341	13,0±2,0	14,67±0,58	15,67±0,58	15,0±1,0	14,67±0,58	13,67±0,58	25,0±0,0	NR	35±0,0	27±0,0
<i>L. acidophilus</i> - 4356	0,0±0,0	8,0±0,0	8,0±0,0	9,0±0,0	9,0±0,0	0,0±0,0	20,0±0,0	NR	25±0,0	31±0,0
<i>M. luteus</i> - 10240	14,67±0,58	15,33±0,58	16,0±1,0	14,33±0,58	14,67±0,58	13,0±1,0	25,0±0,0	NR	24,67±0,58	22,33±05,8
<i>S. aureus</i> - 0538	14,0±0,0	13,67±0,58	13,67±1,53	13,0±1,0	10,67±0,58	10,33±0,58	18,67±1,15	NR	24,33±1,15	22,33±3,79
<i>S. epidermidis</i> - 1222	14,33±0,58	14,0±0,00	14,67±0,58	13,33±0,58	11,33±1,15	10,33±1,53	17,0±1,0	NR	23,33±1,15	21,67±0,58
<i>B. brochiseptica</i> - 4617	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	12,0±0,0	NR	22±0,0	20±0,0
<i>E. cloacae</i> - LMI-UNIFAL	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	11,0±1,0	NR	20,67±1,15	ND
<i>E. coli</i> - 8739	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	14,0±1,0	NR	22,67±0,58	26,0±1,73
<i>S. tiphymurium</i> - 14028	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	10,67±1,15	NR	19,33±1,15	20,0±1,0
<i>S. marcescens</i> - LMI-UNIFAL	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	15,0±0,0	NR	20±0,0	18±0,0
<i>P. aeruginosa</i> - 9027	10,67±1,53	10,67±1,15	12,67±0,58	12,67±1,53	6,0±0,0	6,33±0,58	20,33±0,58	NR	25,67±1,15	ND
<i>C. albicans</i> - 10231	13,67±0,58	14,0±0,00	14,0±0,0	13,67±0,58	12,0±1,0	11,33±0,58	18,67±1,15	15,67±1,15	NR	NR
<i>S. cerevisiae</i> - 6538	10,0±2,00	10,0±1,73	11,67±1,53	11,0±1,0	0,0±0,0	6,67±1,53	15,67±2,08	17,67±2,31	NR	NR

Fonte: Do autor.

Legenda: NR: não realizado. ND: não detectado na concentração testada. CHX: clorexidine. AnB: anfotericina B. CLF: cloranfenicol. SMZ: sulfa.



Figura 10 - Determinação da concentração Inibitória Mínima dos extratos da *Cola acuminata* sobre a bactéria *Staphylococcus aureus* (ATCC 0538).  
Fonte: Do autor.

Através de pesquisas feitas para avaliar o perfil fitoquímico da *Cola acuminata* e da *Cola nitida*, observou-se atividade antifúngica em extratos hídricos e hidroetanólicos (ABIODUN; OYEKANMI; OLUOTI, 2014). Estes resultados foram semelhantes aos nossos, pois *Candida albicans* e *Sacharomyces cerevisiae* foram sensíveis a quase todos os extratos da *Cola acuminata*.

A Concentração Inibitória Mínima (CIM) e a Concentração Microbicida Mínima (CMM) foram realizadas pela técnica de microdiluição em caldo, na qual foi possível verificar a eficiência dos extratos da planta seca e da planta fresca. Tal técnica corresponde a menor concentração do extrato, capaz de inibir o desenvolvimento visível (CIM) e de eliminar os microrganismos (CMM).

Para verificar a sensibilidade dos microrganismos a antimicrobianos específicos, foram realizados testes com Anfotericina B (100 µg), Cloranfenicol (30 µg) e Sulfazotrim (25 µg). A Anfotericina B foi utilizada para os fungos *Sacharomyces cerevisiae* e *Candida albicans*. Já a utilização do Cloranfenicol e do Sulfazotrim foi empregado para avaliar a sensibilidade das bactérias.

Na Tabela 4 podemos observar os resultados das concentrações inibitórias mínimas (CIM) e das concentrações microbicidas mínimas (CMM) dos extratos testados, que impediram o desenvolvimento microbiano ou eliminaram os microrganismos.

Os resultados obtidos nos testes de CIM coincidem com os da difusão em ágar, demonstrando que os microrganismos *Bacillus cereus* ATCC 11778, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Candida albicans* ATCC 10231, *Kocuria rizophila* ATCC 9341, *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356, *Micrococcus luteus* ATCC 10240, *Mycobacterium tuberculosis* (H37Rv) ATCC 27294, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 6538, *Staphylococcus aureus* ATCC 0538 e *Staphylococcus epidermidis* ATCC 1222, foram inibidos por diversas concentrações dos extratos de *Cola acuminata* (Figura 11).

Ao comparar a CIM dos extratos preparados com a planta fresca e os preparados com a planta seca, foi observado diferença de concentrações ativas, sendo que os extratos da semente seca, do caule seco e da folha fresca apresentaram menores valores de concentrações inibitórias mínimas do que os outros extratos. A CIM foi menor no extrato do caule fresco, seguido por caule seco e semente fresca.

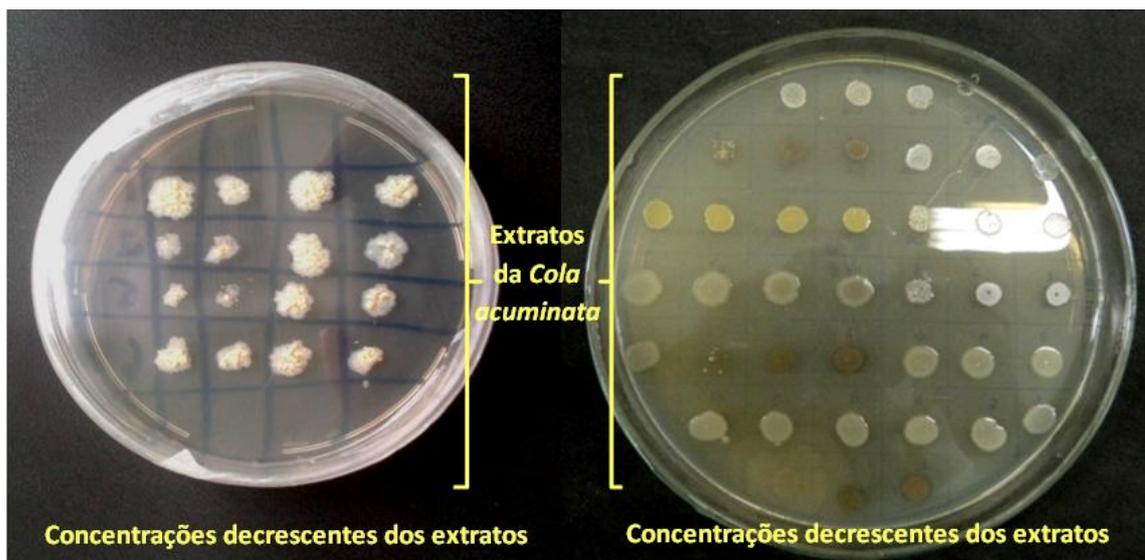


Figura 11 - Concentração Microbicida Mínima dos extratos da *Cola acuminata* sobre *Mycobacterium tuberculosis* (H37Rv) ATCC 27294 (esquerda) e *Micrococcus luteus* ATCC 10240 (direita).

Fonte: Do autor.

Tabela 4 - Testes da concentração inibitória mínima (CIM) e da concentração microbicida mínima (CMM) dos extratos da *Cola acuminata*. Valores em miligramas/mL.

Extratos Microrganismos ATCC	Semente seca CIM/CMM	Semente fresca CIM/CMM	Caule fresco CIM/CMM	Caule seco CIM/CMM	Folha seca CIM/CMM	Folha fresca CIM/CMM
<i>B.cereus</i> – 11778	3,12/12,5	3,12/6,25	0,78/ND	3,12/6,25	3,12/3,12	3,12/6,25
<i>B.subtilis</i> – 6633	12,5/ND	6,25/ND	ND/ND	ND/ND	6,25/ND	ND/ND
<i>K.rizophila</i> - 9341	6,25/6,25	0,78/12,5	0,78/6,25	0,78/12,5	0,78/ND	3,12/3,12
<i>L.acidophilus</i> – 4356	ND/ND	6,25/ND	ND/ND	ND/ND	ND/ND	ND/ND
<i>M. luteus</i> – 10240	12,5/ND	6,25/12,5	ND/ND	6,25/6,25	6,25/6,25	12,5/ND
<i>S. epidermidis</i> – 12228	6,25/6,25	6,25/6,25	3,12/ND	3,12/ND	12,5/ND	12,5/12,5
<i>S.aureus</i> – 0538	ND/ND	ND/ND	3,12/ND	6,25/ND	6,25/ND	12,5/ND
<i>B.brochiseptica</i> – 4617	ND/ND	ND/ND	ND/ND	ND/ND	ND/ND	ND/ND
<i>E. cloacae</i> - LMI-UNIFAL	ND/ND	ND/ND	ND/ND	ND/ND	ND/ND	ND/ND
<i>E.coli</i> - 8739	ND/ND	ND/ND	ND/ND	ND/ND	ND/ND	ND/ND
<i>P. aeruginosa</i> – 9027	12,5/ND	12,5/12,5	6,25/ND	6,25/12,5	12,5/ND	ND/ND
<i>S. marcescens</i> - LMI-UNIFAL	ND/ND	ND/ND	ND/ND	ND/ND	ND/ND	ND/ND
<i>S.tiphymurium</i> – 14028	ND/ND	ND/ND	ND/ND	ND/ND	ND/ND	ND/ND
<i>M. tuberculosis</i> H37 – 27294	1,56/ND	1,56/ND	ND/ND	ND/ND	6,25/ND	6,25/ND
<i>C. albicans</i> – 10231	6,25/6,25	6,25/ND	3,12/3,12	6,25/ND	6,25/25	6,25/ND
<i>S.cerevisae</i> – 6538	6,25/12,5	6,25/ND	6,25/12,5	6,25/12,5	6,25/6,25	12,5/12,5

Fonte: Do autor.

Legenda: ND: não detectado nas concentrações testadas.

Testes de sensibilidade da atividade antimicrobiana evidenciaram que extratos etanólicos das folhas e das sementes de *Cola acuminata*, podem inibir o crescimento de vários microrganismos em diferentes níveis. Os extratos das folhas podem inibir o crescimento de bactérias com *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Candida albicans* (DAH-NOUVLESSOUNON et al, 2015). Estes resultados foram semelhantes aos encontrados neste trabalho.

Tabela 5 - Teste de citotoxicidade dos extratos da *Cola acuminata* sobre as culturas de células BHK-21. Valores em miligramas/mL. Médias e desvios padrões em triplicata.

Extratos da planta	Concentração citotóxica para 50% das células em mg/mL (CC <sub>50</sub> )
Semente seca	1,04 ± 0,35
Semente fresca	0,78 ± 0,17
Caule fresco	0,36 ± 0,16
Caule seco	0,78 ± 0,13
Folha seca	0,87 ± 0,28
Folha fresca	1,66 ± 0,49

Fonte: Do autor.

A determinação da citotoxicidade é uma etapa essencial no processo de desenvolvimento de novas drogas, pois permite determinar a concentração a ser utilizada, fornecendo dados importantes quanto aos possíveis danos celulares (ARAÚJO et al., 2008). Para ser aprovada no teste de citotoxicidade, a substância analisada não deve provocar a morte das células nem afetar as funções celulares. Por meio da utilização de técnicas de cultura de células, os testes de citotoxicidade podem revelar a ocorrência de danos como lise celular e inibição do crescimento das células (DAGUANO; SANTOS; ROGÉRIO, 2007).

A avaliação da citotoxicidade dos extratos de *Cola acuminata*, foi determinada após o estudo de sua atividade sobre culturas de células BHK-21 de rins de hamster neonatos.

A atividade citotóxica é muito importante para o desenvolvimento de novos fármacos, pois fornece informações sobre concentrações ideais que não causam prejuízo às células estudadas.

Através da avaliação da Tabela 5 podemos observar que a concentração citotóxica para 50% das células ( $CC_{50}$ ) foi maior nas amostras de caule fresco e menor nos extratos de folha fresca.

O índice de seletividade dos extratos de *Cola acuminata*, é obtido através da relação entre a  $CC_{50}$  e a CIM. Resultados superiores a 1 demonstram que os extratos apresentam bom perfil entre atividade farmacológica e toxicidade celular.

Avaliando a Tabela 6 podemos observar que os extratos do caule seco da *Cola acuminata* apresentaram índice de seletividade maior ou igual a 1 para os microrganismos *Bacillus cereus* ATCC 11778, *Candida albicans* ATCC 10231, *Kocuria rizophila* ATCC 9341, *Micrococcus luteus* ATCC 10240, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 6538, *Staphylococcus aureus* ATCC 0538 e *Staphylococcus epidermidis* ATCC 1222.

Em dois extratos, semente fresca e folha seca, foi obtido índice de seletividade maior que 1 para apenas a bactéria *Kocuria rizophila* ATCC 9341.

Dessa forma, demonstramos em nosso trabalho que os extratos hidroetanólicos de *Cola acuminata* apresentam moléculas com atividade antimicrobiana, podendo após todas as fases de estudos, proporcionar o desenvolvimento de fármacos que possam ser utilizados para o tratamento de doenças infecciosas provocadas por microrganismos suscetíveis.

Tabela 6 - Índice de seletividade dos extratos da *Cola acuminata*. Relação entre CC<sub>50</sub> e CIM.

Extratos Microrganismos ATCC	Semente seca	Semente fresca	Caule fresco	Caule seco	Folha seca	Folha fresca
<i>B.cereus</i> – 11778	0,33	0,25	0,46	2,17	0,27	0,53
<i>B.subtilis</i> – 6633	008	0,12	ND	ND	0,13	ND
<i>K.rizophila</i> - 9341	0,16	1,00	0,46	8,70	1,11	0,53
<i>L.acidophilus</i> – 4356	ND	0,12	ND	ND	ND	0,06
<i>M. luteus</i> – 10240	0,08	0,12	ND	1,08	0,13	0,13
<i>S. epidermidis</i> – 12228	0,16	0,12	0,11	2,17	0,06	0,13
<i>S.aureus</i> – 0538	ND	ND	0,11	1,08	0,13	0,13
<i>B.brochiseptica</i> – 4617	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<i>E. cloacae</i> - LMI-UNIFAL	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<i>E.coli</i> - 8739	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<i>P. aeruginosa</i> – 9027	0,08	0,06	0,05	1,08	0,06	ND
<i>S. marcescens</i> - LMI-UNIFAL	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<i>S.tiphymurium</i> – 14028	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<i>M. tuberculosis</i> H37 – 27294	0,66	0,50	ND	ND	0,13	0,26
<i>C. albicans</i> – 10231	0,16	0,12	0,11	1,08	0,13	0,26
<i>S.cerevisae</i> – 6538	0,16	0,12	0,05	1,08	0,13	0,13

Fonte: Do autor.

Legenda: ND: não detectado na concentração testada.

## 6 CONCLUSÕES

- a) Os testes fitoquímicos evidenciaram a presença nos extratos hidroetanólicos de taninos condensados, taninos hidrossolúveis, saponinas e flavonoides, que podem justificar as propriedades antimicrobianas;
- b) Os extratos hidroetanólicos de *Cola acuminata* apresentaram promissora atividade antimicrobiana, especialmente em relação às bactérias Gram positivas, ao *Mycobacterium tuberculosis* e aos fungos *Candida albicans* e *Saccharomyces cerevisiae*;
- c) A CC50 para cultura de células BHK demonstrou toxicidade menor no extrato da folha fresca e maior no extrato do caule fresco;
- d) O extrato com índice de seletividade maior que 1 foi o do caule seco, que pode ser considerado promissor para estudos posteriores.

## REFERÊNCIAS

ABIODUN, O. A.; OYEKANMI, A.M.; OLUOTI, O. **Biochemical and Phytochemical Properties of *Cola acuminata* varieties**, Nigeria, v. 4, n.11, p.1280-1287, 2014.

ADAM, S.I.Y; et al. Antimicrobial Activity of the Mastigatory *Cola acuminata* Nut. **Current Research Journal of Biological Science**, Sudão, v.3, n.4, p.357-362, 2011.

ADENIYI, B. A.; GROVES, M. J.; GANGADHARAM, P. R. J. *In vitro* Anti-mycobacterial Activities of three species of *Cola* plant extract (*Sterculiaceae*). **Phytotherapy research**, United Kingdom, v. 18, p. 414-418, 2004.

AKOEGNINO, A.; VAN DER BURG, W.J.; VAN DER MAESEN, L.J.G. Flore analytique du Bénin. **Backhuys Publishers**, Leiden, Netherlands, Wageningen University. 2006.

APG IV. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: **APG IV**. 2016.

ARAÚJO, S. A. C. et al. Avaliação in vitro da atividade citotóxica de drogas antivirais em fibroblastos caprinos. **Ciência Animal**, Ceará, v. 18, n. 1, p.25-31, 2008.

ARIAS, M.V.B.; CARRILHO, C.M.D. Resistência antimicrobiana nos animais e no ser humano. Há motivo para preocupação? **Semina: ciências agrárias**, Londrina, v. 33, n. 2, p. 775-790, 2012.

BANERJEE, A; DASGUPTA, N.; DE, B. In vitro study of antioxidant activity of *Syzygium cumini* fruit. **Food Chemistry**, Kolkata, v. 90, n. 4, p. 727-733, may. 2005.

BAUER A., KIRBY W. Antibiotic susceptibility testing by standardized single disk method. **Amer J Clin Pathol**, United States of America, n. 45, p. 493-496, 1966.

BOUDJEKO, T. et al. Characterisation of cell wall polysaccharides, arabinogalactans-proteins (AGPs) and phenolics of *Cola nitida*, *Cola acuminata* and *Guarcinia kola* seeds. **Carbohydrate Polymers**, United Kingdom, n. 78, p. 820-827, 2009.

BURDOCK, G.A. et al. **Food and Chemical Toxicology**. Benin: Elsevier, 2010.

CHOI, Y. M. et al. Antioxidant and antimicrobial activities of propolis from several regions of Korea. **Food Science and Technology**, Seul, v. 39, n. 7, p. 756-761, sept. 2006.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. **Approved standard - Sixth edition M7-A6**. Wayne, PA, USA: CLSI, 2003.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). Método de Referência para Testes de Diluição em Caldo para Determinação da Sensibilidade de Leveduras à Terapia Antifúngica. **Norma Aprovada - Segunda Edição M27-A3**. Brasil, v. 22, n. 15, 2003.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). Padronização dos testes de sensibilidade a antimicrobianos por disco-difusão. **Norma Aprovada – Oitava Edição M2-A8**. Brasil, vol. 23, n. 01, 2003.

DAGUANO, J. K. M. F.; SANTOS, C.; ROGERIO, S. O. Avaliação da citotoxicidade de biocerâmicas desenvolvidas para uso em sistemas de implantes. **Matéria**, v. 12, n. 1, p. 134-139, 2007.

DAH-NOUVLESSOUNON, D.; et al. Antimicrobial, antioxidant, cytotoxic activities and phytochemical assessment of *Cola acuminata* used in Benin. **European scientific journal**, England, v. 1, n. 36, 2015, a.

DAH-NOUVLESSOUNON, D.; et al. Indigenous knowledge and socioeconomical values of three kola species used in southern Benin. **International Journal and Pharmaceutic Sciences**, Benin, v. 7, p. 102-109, 2015, b.

EINBOND, L.S. et al. Anthocyanin antioxidants from edible fruits. **Food Chemistry**, Miami, v. 84, n. 23-28, jan. 2004.

FERREIRA, E. B.; CAVALCANTI, P. P.; NOGUEIRA, D. A. ExpDes: experimental designs package. **R package version 1.1.2.**, 2013. Disponível em: <<http://www.R-project.org>>. Acesso em: 19 sept. 2017.

FOGLIO, M. A. et al. Plantas Mediciniais como Fonte de Recursos Terapêuticos: Um Modelo Multidisciplinar. **MultiCiências: Construindo a história dos produtos naturais**, v. 5, n. 1, p. 10-38, out. 2006.

FONTENELLE, R. O. et al. Chemical composition, toxicological aspects and antifungal activity of essential oil from *Lippia sidoides*. **Journal of antimicrobial chemotherapy**, Fortaleza, v. 59. n. 5. p. 934-940, 2007.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, Ribeirão Preto, v. 30, n. 2, p. 374-381, 2007.

GUIMARÃES, D.O.; MOMESSO, L.S.; PUPO, M.T. Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. **Química Nova**, Ribeirão Preto, v. 33. n. 3, p. 667-679, 2010.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Biologia celular e molecular**. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. p. 301-304, 2015.

KAMBA, A.; HASSA, L. G. Phytochemical screening and antimicrobial activities of *Euphorbia balsamifera* leaves, stems and root against some pathogenic microorganisms. **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 4, n. 9, p. 645-652, 2010.

KENNETH, E. N., et al. Phytochemical and antimicrobial properties of crude n-hexane and methanol extracts of *Cola acuminata* nuts. **British journal of pharmaceutical research**, v. 4, n. 8, p. 920-928, 2014.

KRISTIANSSON, E. et al. Pyrosequencing of Antibiotic-contaminated River Sediments Reveals High Levels of Resistance and Gene Transfer Elements. **PLoS One**. v. 6, n. 2, p. 17-38, feb. 2011.

LOWE, H.I.C. et al. Promising efficacy of the *Cola acuminata* Plant: A Mini Review. **Adv Biol Chem**, v.4, p. 240-245, 2014.

MALEKI, S. et al. Antibacterial activity of the fruits of Iranian *Torilis leptophylla* against some clinical pathogens. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, Ahwaz, v. 11, N. 9, p. 1286-1289, may. 2008.

MELLO, J. C. P.; SANTOS, S. C. Taninos. In: SIMÕES, C. M.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 3. ed. Porto Alegre: UFRGS/UFSC, p. 517-543, 2001.

MENDIBURU, F. *Agricolae*: statistical procedure for agricultural research. **R package version 1.1.4.**, 2016. Disponível em: <<http://www.R-project.org>>. Acesso em: 19 sept. 2017.

MONTEIRO, J. M. et al. Taninos: uma abordagem da química à ecologia. **Química Nova**, Recife, v. 28, n. 5, p. 892-896, set. 2005.

NORONHA, N. M. **Pesquisa de bioativos e avaliação da atividade biológica de extratos hidroetanólicos de *Ficus pumila* L. (Moraceae)**. 2014. 85f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, 2014.

OBEY, J.K; SWAMY,T.A. Antibacterial activity of methanolic extracts of *Cola nitida* seeds on selected pathogenic organisms, **Internacional Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, Kenya, v.3, n.8, p. 999-1099, 2014.

OBEY, J.K; SWAMY,T.A. *In vitro* evaluation of antibacterial activity of infused *Cola nitida* seeds, **Internacional Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, Kenya, v.3, n.10, p.11-22, 2014.

ODUGBEMI, T. Outlines and pictures of medicinal plants from Nigeria. **University of Lagos Press**: Lagos. 2006.

OPLUSTIL, C. P. Resistência aos antimicrobianos: assunto velho, novas preocupações. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, Rio de Janeiro, v. 48, n. 2, p. 82-83, 2012.

OSTROSKY, E. A.; Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração inibitória mínima (CIM) de plantas medicinais. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 18, n. 2, p. 301-307, abr./jun. 2008.

PLANT INTERNATIONAL DATABASE. Trade winds fruit. [Desenvolvida por PSHelper]. 2013. Disponibiliza informações sobre *Cola acuminata*. Disponível em: <<http://www.tradewindsfruit.com/content/cola-nut.htm>>. Acesso em: 20 de june. 2017.

R CORE TEAM. R: A language and environment for statistical computing. **R foudation for statistical computing**, Viena, Austria, 2016. Disponível em: <<http://www.R-project.org>>. Acesso em: 19 sept. 2017.

ROGUES, A. M. et al. Relationship between rates of antimicrobial consumption and the incidence of antimicrobial resistance in *Sytaphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* isolates from 47 french hospitals. **Infection control and hospital epidemiology**, v. 28. n. 12, p. 1389-1395, 2007.

SANTOS, N. Q. A resistência bacteriana no contexto da infecção hospitalar. **Reflexão**, 13(n. esp), p. 64-70, 2004.

SEYYEDNEJAD, S. M. et al. Antibacterial activity of *Prunus mahaleb* and Parsley (*Petroselinum crispum*) against some pathogens. **Asian Journal of Biological Sciences**. v. 1, n. 1, p. 51-55, 2008.

SILVEIRA, G. P. et al. Estratégias utilizadas no combate a resistência bacteriana. **Química nova**. Florianópolis, v. 29. n. 4, p. 844-855, 2009.

SONIBARE, M.; SOLADOYE, M.; ESAN, O. Phytochemical and Antimicrobial Studies of four species of *Cola*. **African Journal of Traditional, Complementary and Alternative**, Nigeria, v.6, p.518-525, 2009.

SOUSA, J. C. **Manual de Antibióticos Antibacterianos**. 2. ed. Porto: Edições Universidade Fernando Pessoa, 2006.

SOUSA, J. O de et al. Infecção hospitalar em unidade de terapia intensiva neonatal: uma revisão da literatura. **Revista interdisciplinar UNINOVAFAPI**, Teresina, v. 3, n. 5, p. 77-80, set. 2012.

SOUTHEAS GROWERS INC. Cola nut. 2016. Disponibiliza informações sobre *Cola acuminata*. Disponível em: <<http://www.southeastgrowers.com/ZA%20Cola%20acuminata.htm>>. Acesso em: 20 de june. 2017.

TELLES, M.A.S.; MOSCA, A. A avaliação da técnica de microdiluição em placa para determinação de concentração inibitória mínima da isoniazida em cepas de *Mycobacterium tuberculosis*. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 59, n.1-2, p. 15-19, 2000.

WAGNER, H.; BLADT, S.; ZGAINSKY, E.M. **Plant drug analysis – A thin layer chromatography atlas**, London: Springer, 384 p., 2009.

WAGNER, H.; WIESENAUER, M. **Fitoterapia, Fitofármacos, Farmacologia e Aplicações Clínicas**. 2. ed. São Paulo: Pharmabooks, 2006.