

ESTUDO BIOMONITORADO DE FUNGOS ENDOFÍTICOS ASSOCIADOS A PLANTAS MEDICINAIS

BIOMONITORED STUDY OF ENDOFITIC FUNGI ASSOCIATED TO MEDICINAL PLANTS

¹ANDRADE, M.S.; ²MOMESSO, L.S.

¹Discente do Curso de Farmácia, Universidade Paulista – Unip – *Campus Assis-SP*

²Professor do Curso de Farmácia, Faculdades Integradas de Ourinhos-FIO/FEMM e Professor de Curso de Farmácia, Universidade Paulista – Unip – *Campus Assis-SP*

RESUMO

Os estudos sobre o metabolismo secundário de microrganismos têm sido cada vez mais explorados, afim de se compreender os mecanismos de ação frente as bactérias patogênicas responsáveis por doenças cotidianas. O presente estudo teve como objetivos a obtenção de extratos e frações do cultivo de microrganismos associados a espécies vegetais medicinais. Observou-se que os extratos obtidos dos microrganismos isolados apresentaram variedade quanto à diversidade química em seu metabolismo, confirmada por Cromatografia em Camada Delgada (CCD). Além disso, essas amostras apresentaram atividade antimicrobiana promissora frente a *C. albicans* e *S. aureus*, porém foram inativos frente a *E. coli*. Dessa forma, pode-se dizer que os microrganismos que vivem associados às espécies de plantas medicinais apresentam grande potencial antimicrobiano e podem constituir uma alternativa promissora para a descoberta de novos princípios ativos para o controle patogênico de bactérias que tem se observado o aumento de casos de resistência microbiana.

Palavra-Chave: Fungos Endofíticos. Atividade Antimicrobiana. Cromatografia.

ABSTRACT

Studies on the secondary metabolism of microorganisms have been increasingly explored to understand the mechanisms of action against the pathogenic bacteria responsible for everyday diseases. The present study aimed to obtain extracts and fractions of the culture of microorganisms associated with medicinal plant species. It was observed that the extracts obtained from the isolated microorganisms presented a variety of chemical diversity in their metabolism, confirmed by Thin Layer Chromatography (TLC). In addition, these samples showed promising antimicrobial activity against *C. albicans* and *S. aureus*, but were inactive against *E. coli*. Thus, it can be observed that the microorganisms that live associated with the species of medicinal plants present a great antimicrobial potential and can constitute a promising alternative for the discovery of new active principles for the pathogenic control of bacteria that has been observed the increase of cases of microbial resistance.

Keywords: Endophytic Fungi. Antimicrobial Activity. Chromatography.

INTRODUÇÃO

Todos os microrganismos que habitam pelo menos por um período de seu ciclo de vida o interior de um vegetal pode ser considerado como endofítico. Há um gradiente entre as distinções dos termos endofíticos, epifíticos (aqueles que vivem na superfície das plantas) e fitopatógenos (aqueles que causam doenças nas plantas), portanto às vezes torna-se difícil descrever limites para distinguir cada categoria. (AZEVEDO et al., 2000).

Por definição, estes microrganismos vivem nos espaços intercelulares dos tecidos das plantas (STROBEL, 2002). Colonizam os tecidos extra e/ou intercelulares da planta hospedeira, durante sua vida toda ou parte dela, sem causarem-lhe sintomas aparentes de doenças (ZIKMUDOVÁ et al., 2002; TAN; ZOU; 2001). Fungos endofíticos podem estar presentes em todos os órgãos de uma planta hospedeira (PETRINI et al., 1992). Já que muitas destas associações têm se mostrado benéficas para ambos os organismos, o termo endofítico tem sido utilizado como sinônimo de mutualismo. (FAETH; HAMONN, 1997).

Alguns desses endofíticos podem produzir substâncias bioativas que envolvem a relação deles com a planta hospedeira. Estes metabólitos secundários podem ter aplicabilidades na medicina, agricultura e indústria (STROBEL, 2002). Nas associações com formas de vida superiores, os fungos podem mimetizar bioquimicamente o organismo hospedeiro (STROBEL et al., 1996). Isto tem sido demonstrado pela habilidade dos organismos associados em produzir *in vitro* metabólitos secundários algumas vezes idênticos aos da planta hospedeira, e vice-versa.

A simbiose entre planta e endofítico pode ser observada pela proteção e alimentação do microrganismo que, em contrapartida, produz substâncias bioativas (hormônios reguladores de crescimento, antibacterianos, antibióticos, antifúngicos, antivirais, inseticidas, etc.) que aumentam o crescimento e competitividade do hospedeiro na natureza (LU et al., 2000; TAN; ZOU, 2001).

Portanto, novas atenções vêm sendo dadas para a química e bioatividade dos metabólitos dos endofíticos, e também para sua biodiversidade e funções ecológicas. (TAN; ZOU, 2001)

Com base nessas informações, o presente estudo tem por objetivos isolar microrganismos endofíticos de espécies medicinais, bem como avaliar o potencial antimicrobiano de seus extratos.

METODOLOGIA

Obtenção do material vegetal

Coletou-se as plantas medicinais cultivadas no canteiro da Universidade Paulista, *Campus* de Assis-SP, no período da manhã, sendo elas *Salvia officinalis* (Lamiaceae), *Euphorbia tirucalli* (Euphorbiaceae), *Cymbopogon citratus* (Poaceae), *Mentha* sp. (Lamiaceae), *Rosmarinus officinalis* (Lamiaceae). As partes vegetais a

serem utilizadas serão aquelas de uso comum de acordo com o conhecimento empírico popular. Foram escolhidas aquelas que não apresentaram sinais aparentes de rasura, infecção ou qualquer outra alteração. As mesmas foram separadas em embalagens de papel individuais e identificadas pelo Prof. Dr. Luciano Negrão Menezes, do Curso de Ciências Biológicas do mesmo *Campus*.

Obtenção dos microrganismos endofíticos

As partes vegetais coletadas foram esterilizadas conforme a metodologia descrita por Petrini e colaboradores (1992), primeiro em etanol 70 % durante dois a três minutos, passando por uma solução de hipoclorito de sódio a 5 % durante cinco minutos, depois novamente em etanol 70 % por um minuto e por fim por água destilada estéril por um minuto.

Cortou-se as partes vegetais com o auxílio de bisturi e pinça em fragmentos de 0,5 x 0,5 cm, em placa de vidro, dentro da capela de fluxo laminar. Posteriormente colocou-se nove fragmentos por placa de Petri previamente preparada contendo o meio BDA (Ágar Batata Dextrose) (adaptado de Bacon, 1990). Preparou-se um controle, através da inoculação da água estéril utilizada para lavagem do material vegetal em placa de Petri também contendo BDA, a fim de certificar a inexistência de qualquer outro microrganismo que não seja endofítico. Todas as placas foram incubadas em estufa de cultivo à temperatura de 37 °C.

Isolamento dos microrganismos

Conforme as colônias de microrganismos surgiam a partir dos fragmentos das partes vegetais, iam sendo coletados e isolados individualmente para o centro de uma nova placa contendo meio BDA. Estas também foram incubadas em estufa a 37 °C, durante 14 dias, até seu desenvolvimento total, a fim de certificar que as culturas isoladas eram únicas.

Cultivo dos microrganismos e obtenção dos extratos

Após 14 dias de crescimento em meio ágar batata dextrose (BDA), pedaços de aproximadamente 1,0 x 1,0 cm de cada uma das culturas foram inoculados em Erlenmeyers de 500 mL distintos, contendo 90 g de arroz parbolizado e 90 mL de água destilada cada, previamente autoclavados a 121 °C por 40 minutos. As culturas foram posteriormente mantidas em estufa a 30 °C durante 20 dias.

Após o período de cultivo foi adicionado etanol até a total imersão da massa micelial e após aproximadamente 24 horas, a solução foi filtrada e o solvente foi removido por filtração simples, fornecendo os extratos brutos etanólicos, os quais foram submetidos a sucessivas extrações com solventes orgânicos.

Os extratos e frações obtidos foram liofilizados no Laboratório de Microbiologia do Departamento de Biotecnologia da Universidade Estadual Paulista, *Campus* de Assis-SP, sob supervisão e colaboração das Professoras Dra. Lucineia dos Santos e Dra. Valéria Marta Gomes do Nascimento.

Análise dos extratos via Cromatografia em Camada Delgada

O perfil químico dos extratos foi avaliado por meio de Cromatografia em Camada Delgada (CCD).

Foram utilizadas cromatoplaças de silicagel GF₂₅₄ como fase estacionária. Foram utilizadas diferentes fases móveis para os extratos a fim de se obter individualmente o melhor perfil para cada amostra. Foram utilizados como reveladores químicos do experimento vanilina sulfúrica com aquecimento em chapa e também vapores de iodo ressublimado.

Ensaio antimicrobiano pelo método de difusão em ágar

A avaliação da atividade antibacteriana *in vitro* foi realizada pelo método de difusão em disco de papel, conforme metodologia adaptada de Bauer et al. (1966), utilizando a técnica de plaqueamento em superfície. Foi verificada a sensibilidade das bactérias *Candida albicans* (ATCC 64550), *Escherichia coli* (ATCC 25922) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923).

As leveduras foram padronizadas na turvação equivalente ao tubo 0,5 da escala de MacFarland, em solução fisiológica foram cultivadas em placas contendo o meio nutritivo ágar Müller-Hinton.

Em um primeiro momento as amostras foram diluídas nas concentrações de 1 mg/mL e 5 mg/mL. Após, realizou-se novo procedimento com os extratos nas concentrações de 10 mg/mL e 50 mg/mL. Todo o procedimento foi feito em duplicata em capela de fluxo laminar e incubado por 48 horas em estufa à 37 °C.

Como controle positivo foram utilizados antibióticos-padrão de acordo com o tipo de microrganismo. Para bactéria Gram-positivo utilizou-se ciprofloxacina; e

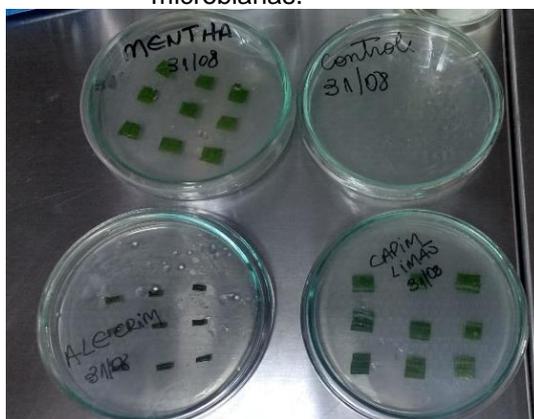
gentamicina para bactéria Gram-negativo. Como controle negativo utilizou-se água estéril.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Obtenção das culturas

As culturas microbianas foram obtidas a partir dos fragmentos das plantas colocados em placa de Petri contendo BDA como meio de cultura, conforme ilustrado na Figura 1.

Figura 1. Preparo das placas contendo fragmentos das plantas para obtenção das culturas microbianas.



As placas foram mantidas em estufa à temperatura de 37 °C e conforme as culturas iam surgindo, estas eram colhidas com auxílio de alça de platina e repicadas em nova placa contendo BDA. Todo o procedimento foi realizado em capela de fluxo laminar.

As culturas obtidas das plantas foram identificadas conforme disposto na Tabela 1.

Tabela 1 – Microrganismos endofíticos obtidos das plantas.

Espécie vegetal	Fragmento	Cultura*	Código
<i>Salvia officinalis</i>	5	1	S.O.5.1
	3	1	S.O.3.1
<i>Euphorbia tirucalli</i>	1	1	E.T.1.1
	5	1	E.T.5.1
<i>Rosmarinus officinalis</i>	2	1	R.O.2.1
<i>Cymbopogon citratus</i>	1	1	C.C.1.1
	1	2	C.C.1.2

*Cultura: quantidade de culturas surgidas no mesmo fragmento

Não foram observadas manifestações de crescimento microbiano para os fragmentos de *Mentha* sp., mesmo com o procedimento de isolamento tendo sido repetido mais uma vez, diminuindo o tempo de imersão nos líquidos esterilizantes. Os motivos para tal resultado não são podem ser esclarecidos, pois também não foram encontradas culturas microbianas na placa de Petri utilizada como controle.

Cultivo dos microrganismos em arroz e obtenção dos extratos e frações

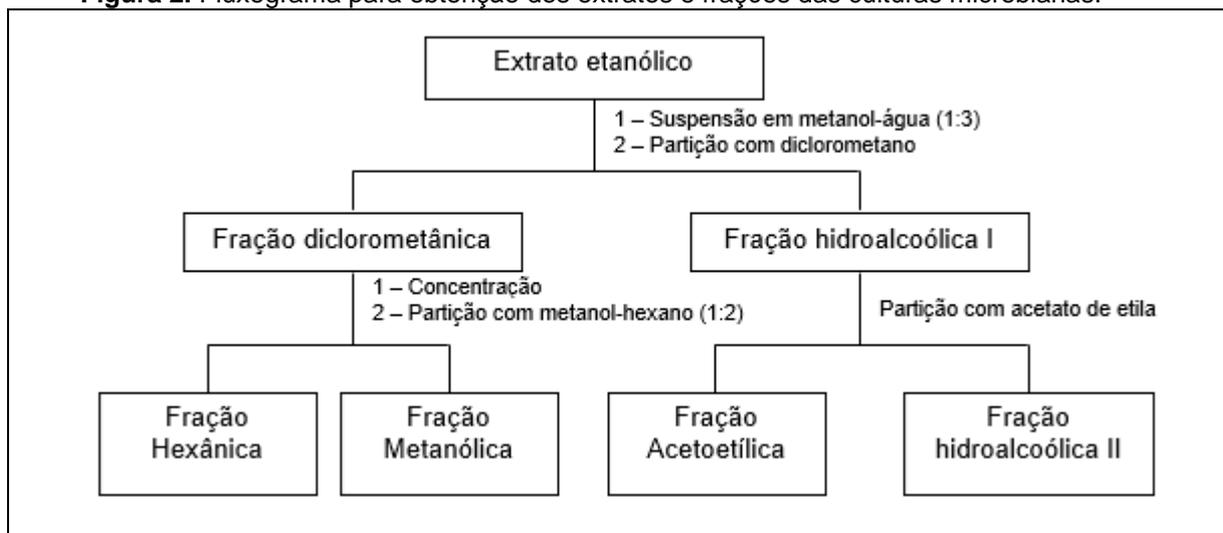
Observou-se após o período de 24 horas de cultivo observou-se modificações em algumas das culturas. A cultura C.C.1.1 apresentou coloração amarelada mais intensa; S.O.3.1 apresentou coloração levemente amarelada; E.T.1.1 apresentou coloração esbranquiçada e o meio de cultivo tornou-se mais pastoso, surgindo diversos pontos de crescimento. Os demais permaneceram sem alterações.

No quarto dia as culturas apresentaram mudanças mais significativas como intensidade de cores somente a C.C.1.1 se manteve na coloração inicial do meio de cultura.

Observou-se no décimo terceiro dia que a E.T.5.1 apresentou coloração mais escura e grãos esbranquiçados; S.O.5.1 e C.C.1.2, não manifestaram alterações de cores, porém alguns grãos esbranquiçados; C.C.1.1 e S.O.3.1 não apresentaram mudanças; R.O.2.1 demonstrou crescimento com coloração esbranquiçada e levemente pastosa e por fim, a cultura E.T.1.1 formou-se uma massa densa e pastosa com sinais de esporulação semelhante a crescimento fúngico.

Após vinte dias de cultivo observou-se que as culturas S.O.5.1, C.C.1.1, R.O.2.1 e S.O.3.1 continuaram não apresentando manifestações de crescimento. A cultura E.T.5.1 apresentou coloração bem escura; C.C.1.2, observou-se uma mescla entre grãos mais escuros e claros e a cultura E.T.1.1 ficou totalmente pastosa com coloração marrom forte, onde a massa micelial ficou bastante aderida às paredes internas do Erlenmeyer.

Passado o período de 20 dias de cultivo, as culturas foram imergidas em etanol 70%, permanecendo durante 48 horas. Em seguida, estas foram filtradas e os extratos brutos etanólicos obtidos foram então submetidos aos procedimentos de partição para obtenção das frações, conforme ilustrado na Figura 2.

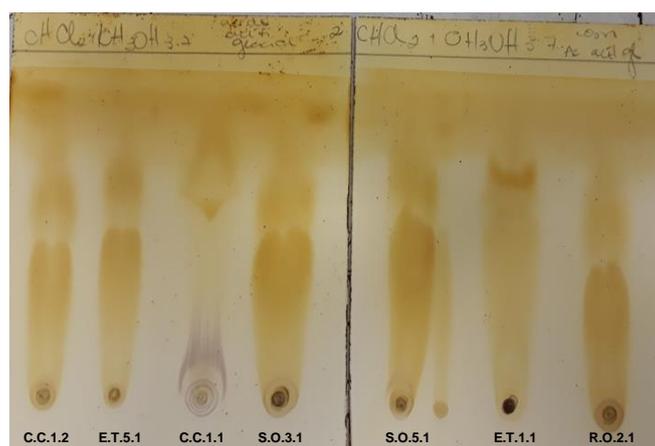
Figura 2. Fluxograma para obtenção dos extratos e frações das culturas microbianas.

Após evaporação parcial dos solventes em temperatura ambiente, foi realizado o procedimento de liofilização dos extratos e frações com a finalidade de desidrata-los totalmente e concentrá-los a fim de facilitar o processo de pesagem e os procedimentos de diluição.

Análise do perfil químico via Cromatografia em Camada Delgada

Para execução do método foram testadas diversas fases móveis, até que fosse possível observar uma boa separação dos componentes da mistura. Primeiramente utilizou-se clorofórmio-metanol (1:1). Em seguida, a fase móvel escolhida foi uma mistura de acetato de etila e éter de petróleo (1:1). Logo após, o procedimento foi repetido utilizando-se clorofórmio-metanol (3:1) e depois clorofórmio-éter de petróleo (4:1). Todas essas fases móveis não demonstraram bons resultados.

Por fim, o procedimento foi repetido utilizando-se como fase móvel uma mistura de clorofórmio-metanol (3:7). Essa fase móvel também não foi a ideal, porém, esgotadas as possibilidades de acordo com os solventes disponíveis, foi possível observar uma boa separação da mistura, além de boa eluição do cromatograma, conforme é possível observar na Figura 3.

Figura 3. Cromatograma das amostras.

Condições do cromatograma:

FE: silicagel GF₂₅₄

FM: clorofórmio-metanol (3:7)

Revelador: iodo ressublimado

Com a finalidade de analisar o perfil químico das diferentes amostras, optou-se pela realização da CCD. Esta técnica consiste na separação de misturas por meio da diferença de afinidades dos componentes da mistura pela fase estacionária ou pela fase móvel, além de constituir um método rápido, de fácil execução, além de ser de baixo custo, conforme descrito por Collins; Braga e Bonato (2006).

O cromatograma obtido sugere que as diferentes amostras avaliadas possuem, em geral, substâncias (ou mistura de substâncias) com características químicas semelhantes, uma vez que apresentaram valores de Fator de Retenção (Rf) próximos, tal como é possível observar na Tabela 2.

Tabela 2 – Fatores de Retenção (Rf) das amostras.

Amostra	Qt. de sinais*	Rf
C.C.1.2	4	0,8
		0,65
		0,5
		0,3
E.T.5.1	2	0,5
		0,4
C.C.1.1	2	0,6
		0,5
S.O.3.1	1	0,3
S.O.5.1	2	0,5
		0,35
R.O.2.1	2	0,45
		0,3

* Sinais mais evidentes observados para cada amostra

Após a avaliação do cromatograma, observou-se a diversidade química das amostras, onde notou-se que o extrato C.C.1.2 apresentou uma mancha evidente com $R_f = 0.8$, não observada nos demais.

As amostras C.C.1.2, S.O.3.1 E R.O.2.1 apresentaram sinais com o mesmo fator de retenção ($R_f = 0,3$). Isso sugere que as substâncias químicas produzidas pelos diferentes microrganismos podem ter características químicas semelhantes. Porém, na amostra C.C.1.2 pôde-se observar uma diversidade maior de sinais em relação as duas outras.

A amostra C.C.1.1 mostrou o perfil químico mais distinto entre as demais. Foram observados apenas dois sinais com R_f mais elevados, porém com características visuais diferentes das outras amostras. Sugere-se que o microrganismo que produziu essa amostra tenha um perfil de metabolismo diferente dos demais analisados.

Devido ao fato de os microrganismos não terem sido identificados, torna-se difícil a discussão dos resultados quanto ao perfil químico dos extratos. Devido a isso, buscou-se um comparativo com estudos realizados a partir das plantas hospedeiras dos microrganismos isolados.

Em um estudo com o extrato bruto da planta *C. citratus*, Mendes; Machado & Falkenberg (2006) usaram como fase móvel uma mistura de clorofórmio-metanol-água (65:25:4) e clorofórmio-metanol (9:1), onde conseguiram verificar o nível de conteúdo glicolípido no extrato bruto de *C. citratus*. Os autores ressaltam o alto nível de concentração de glicolípideos em seu extrato bruto. Com base nisso, obviamente o perfil químico da planta não condiz com o perfil químico do microrganismo associado a ela, avaliado no presente estudo.

Carvalho-Junior (2004) realizou um estudo cromatográfico com extrato de *R. officinalis* utilizando hexano e acetato de etila como fase móvel. O autor observou uma grande quantidade de compostos hidrofílicos, observando a presença do composto 1,8-cineol.

No estudo realizado por Pimpão (2007) foi relatado que *S. officinalis* possui em sua composição química a presença de carnosol e ácido oleanólico, observada em placa de sílica e confirmada por ressonância magnética nuclear.

Dessa forma, tanto as espécies medicinais utilizadas para o isolamento dos microrganismos, quanto os próprios microrganismos endofíticos obtidos neste

trabalho demonstram produção variada de substâncias químicas, cujos perfis são bastante distintos.

Avaliação da atividade antimicrobiana

Num primeiro momento as amostras foram testadas nas concentrações de 1 mg/mL e 5 mg/mL e os resultados do ensaio estão dispostos na Tabela 3.

Tabela 3. Ensaio antimicrobiano pelo método de difusão em agar.

Amostra	<i>C. albicans</i> (1 mg/mL)	<i>C. albicans</i> (5 mg/mL)	<i>E. coli</i> (1 mg/mL)	<i>E. coli</i> (5 mg/mL)	<i>S. aureus</i> (1 mg/mL)	<i>S. aureus</i> (5 mg/mL)
S.O.5.1	+	+	-	-	-	-
E.T.1.1	+	+	-	-	-	-
R.O.2.1	+	+	-	-	-	-
C.C.1.2	+	+	-	-	-	-
E.T.5.1	+	+	-	-	+	+
C.C.1.1	+	+	-	-	-	-
S.O.3.1	+	+	-	-	-	-
Gentamicina	-	-	+	+	-	-
Ciprofloxacina	-	-	-	-	+	+
C. negativo	-	-	-	-	-	-

(-) não ativo; (+) Ativo.

Como a maioria das amostras não apresentou resultados frente aos microrganismos *C. albicans* e *S. aureus*, o experimento foi repetido utilizando-se as concentrações de 10 mg/mL e 50 mg/mL, cujos resultados estão na Tabela 4.

Tabela 4. Ensaio antimicrobiano pelo método de difusão em agar.

Amostra	<i>C. albicans</i> (10 mg/mL)	<i>C. albicans</i> (50 mg/mL)	<i>S. aureus</i> (10 mg/mL)	<i>S. aureus</i> (50 mg/mL)	<i>E. coli</i> (10 mg/mL)	<i>E. coli</i> (50 mg/mL)
S.O.5.1	+	+	-	-	-	-
E.T.1.1	+	+	-	-	-	-
R.O.2.1	+	+	-	-	-	-
C.C.1.2	+	+	-	-	-	-
E.T.5.1	+	+	+	+	-	-
C.C.1.1	+	+	-	-	-	-
S.O.3.1	+	+	-	-	-	-
Gentamicina	-	-	-	-	+	+
Ciprofloxacina	-	-	+	+	-	-
C. negativo	-	-	-	-	-	-

(-) Não ativo; (+) Ativo

Repetiu-se o teste com as amostras que não demonstraram atividades em concentrações mais baixas, utilizando-se dessa vez as concentrações de 10 mg/mL e 50 mg/mL.

Após o período de 48 horas, notou-se um modesto halo de inibição formado pelas amostras, porém a maioria mostrou-se ativa frente aos microrganismos indicadores.

Os resultados negativos observados para as amostras testadas frente à *E coli* permitiu-nos inferir que estas não são ativas em concentrações mais baixas, ou seja, não são capazes de inibir o crescimento da bactéria. Esse fato pode também ser relacionado ao fato de a bactéria em questão ser classificada como Gram-negativo.

Zago et al. (2009) ressaltam que as bactérias Gram-positivo são mais sensíveis à ação de agentes antimicrobianos devido à presença de uma parede bacteriana que normalmente não restringe a penetração de moléculas tóxicas, enquanto as Gram-negativo possuem um sistema de barreira constituído pela membrana externa da parede bacteriana formada por fosfolipídeos, lipopolissacarídeos e proteínas (porinas) que conferem considerável impermeabilidade aos agentes bacterianos, resultando em maior resistência dessas bactérias aos antibióticos.

Frente à *S. aureus*, somente a amostra de E.T.5.1 foi capaz de inibir, mesmo que timidamente, o crescimento bacteriano quando comparada aos demais extratos. Vale ressaltar que o controle positivo (ciprofloxacina) inibiu o crescimento bacteriano.

Observou-se atividade moderada também com as amostras frente *C. albicans*. Cabe destacar uma atividade um pouco mais pronunciada observada para a amostra E.T.5.1 neste ensaio.

Frente à *C. albicans*, a inibição do crescimento bacteriano foi observada em ambas as concentrações das amostras testadas.

Mesmo nas concentrações mais elevadas, os extratos não apresentaram atividade frente a *S. aureus*, exceto a amostra E.T.5.1, que tiveram suas atividades intensificadas quando comparadas ao primeiro ensaio.

Já frente a *E. coli*, as amostras continuaram não manifestando atividade antimicrobiana.

Vale & Orlanda (2001) destacam que a atividade antibacteriana confirmada para o extrato etanólico de *E. tirucalli* pode ser devido à presença de taninos, saponinas e flavonoides que apresentam diversas aplicações biológicas comprovadas.

Almeida et al. (2008) relataram que o extrato hidroalcoólico de *C. citratus* apresentou efeito fungistático e fungicida para as leveduras do gênero estudadas,

entretanto não encontraram atividade inibitória do extrato hidroalcoólico a partir das folhas secas da planta frente à *C. albicans*. Esses autores observaram efeitos antifúngicos dessa planta somente quando foi utilizado o óleo volátil. As propriedades antimicrobianas do óleo essencial de *C. citratus* pode ser atribuída a dois componentes principais: alfa-citral (genianal) e beta-citral (neral).

Nas análises relatadas por Porte & Godoy (2001), a ação bactericida de *R. officinalis* frente a *S. aureus* em carnes tem sido muito citada. Foi observada alta sensibilidade de bactérias Gram-positivo aos óleos essenciais de *R. officinalis* (borneol 26,5%, α -terpineno 15,6%, α -pineno 12,7%) e *Salvia* sp. (tujona 41,5%, limoneno 14,7%), provenientes do Egito, incluindo *S. aureus*, *Micrococcus* sp. e *Sarcina* sp., bem como a levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Entretanto, nenhum ou muito pouco efeito foi verificado contra as bactérias Gram-negativo *Pseudomonas fluorescens*, *E. coli* e *Serratia marcescens*.

Os resultados observados, ainda que modestos, ilustram o potencial biológico de microrganismos que vivem associados às plantas. Cabe ressaltar que o perfil metabólico de uma planta e de um microrganismo simbiote a ela associado são distintos, porém, em ambos os casos, as atividades antibacterianas estão presentes.

Estudos mais aprofundados devem ser realizados para aprofundar o conhecimento a respeito do potencial biológico de microrganismos endofíticos, bem como para ampliar o arsenal terapêutico antimicrobiano da prática clínica atual.

CONCLUSÕES

As análises realizadas neste trabalho revelaram que os extratos dos microrganismos que vivem associados às plantas medicinais mostraram atividades positivas em relação à inibição do crescimento de *S. aureus* e *C. albicans*, porém não são ativos frente à *E. coli*.

A resistência bacteriana tem sido um grande problema de saúde pública no país, principalmente com relação a bactérias Gram-negativo, devido comporem uma classe de microrganismos mais difícil de terem seu crescimento controlado e de rápida proliferação patológica.

Com a diversidade de plantas e microrganismos existentes torna-se imprescindível demais estudos para novas descobertas, afim de aumentar o arsenal terapêutico disponível.

Sugere-se assim um estudo mais detalhado com diferentes concentrações para verificação de novos resultados.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA, R. B. A.; CARRETO, C. F. P.; SANTANA, R. S.; FURLAN, M. R.; JUNQUEIRA, J. C.; JORGEA, O. C. Atividade antimicrobiana de *Cynbopogon citratus* (DC.) Stapf sobre *Candida* spp. **Revista Odontológica da Unesp**, v. 37, n. 2, p. 147-153, 2008.

AZEVEDO, J. L.; MACCHERONI-Jr, W; PEREIRO, J. O.; ARAUJO, W. L. Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 3, p. 40-65, 2000.

BAUER, A. W.; KIRBY, W. M. M.; SHERRIS, J. C.; TURCK, M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. **Am. Int. Cl. Pathol.**, v. 45, p. 493-496, 1966.

CARVALHO-JUNIOR, R. N. **Obtenção de extrato de alecrim (*Rosmarinus officinalis*) por extração de supercrítica: determinação de rendimento global de parâmetros cinéticos e de equilíbrio de outras variáveis do processo.** (Doutorado) Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos. Campinas: Unicamp, 2004.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. **Fundamentos de cromatografia.** Campinas: Unicamp, 2006. 452 p.

FAETH, S. H.; HAMONN, K. Fungal endophytes in Oak Trees: long-term patterns of abundance and associations with leafminers. **Ecology**, v. 78, n. 3, p. 810-819, 1997.

LU, H.; ZOU, W. X.; MENG, J. C.; HU, J., TAN, R. X. New bioactive metabolites produced by *Colletotrichum* sp., an endophytic fungus in *Artemisia annua*. **Plant Science**, v.151, p. 67-73, 2000.

MENDES, B. G.; MACHADO, M. J.; FALKENBERG, M. Triagem de glicolipídeos em plantas medicinais. **Rev. Bras. Farmagn.**, v. 16, n. 4, p. 568-575, 2006.

PETRINI, O., SIEBER, T. N., TOTI, L., VIRET, O. Ecology, metabolite production, and substrate utilization in endophytic fungi. **Natural Toxins**, v. 1, p. 185-196, 1992.

PIMPÃO, R. B. **Estudo fitoquímico da espécie vegetal *Salvia officinalis*.** Florianópolis: UFSC, 2007.

PORTE, A.; GODOY, R. L. O. Alecrim (*Rosarinus officinalis* L): Propriedades antimicrobianas e químicas do óleo essencial. **B. Ceppa**, v. 19, n. 2, 2001.

STROBEL G. A., HESS W. M., FORD E., SIDHU R. S., YANG X. Taxol from fungal endophytes and the issue of biodiversity. **J. Ind. Microbiol. Biot.**, v. 17, p. 417-423, 1996.

STROBEL, G. A. Rainforest endophytes and bioactive products. **Crit. Rev. Biotech.**, v. 22, n. 4, p. 315-333, 2002.

TAN, R. X.; ZOU, W. X. Endophytes: a rich source of functional metabolites. **Nat. Prod. Rep.**, v. 18, p. 448-459, 2001.

VALE, V. V.; ORLANDA, J. F. F. Atividade antimicrobiana do extrato bruto etanólico das partes aéreas de *Euphorbia tirucalli* Lineau (Euphorbiaceae). **Scientia Plena**, v. 7, n. 4, 2001.

ZAGO, J. A. A.; USHIMARU, P. I.; BARBOSA, L. N.; JUNIOR, A. F. Sinergismo entre óleos essenciais e drogas antimicrobianas sobre linhagem de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* isoladas em casos clínicos humanos. **Rev. Bras. Farmacogn.**, v. 19, n. 4, p. 838-833, 2009.

ZIKMUDOVÁ, M.; DRANDAROV, K.; BIGLER, L.; HESSE, M.; WERNER, C. Biotransformation of 2-benzoxazolinone and 2-hidroxy-1,4-benzoxazin-3-one by endophytic fungi isolated from *Aphelandra tetragona*. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 68, p. 4863-4870, 2002.