

## Estudo comparativo da susceptibilidade de isolados clínicos de *Cryptococcus neoformans* (Sanfelice, 1895) frente a alguns antifúngicos de uso hospitalar e extratos vegetais obtidos de plantas medicinais da região semiárida sergipana

BARBOSA JUNIOR, A. M.\*; MÉLO, D. L. F. M DE; ALMEIDA, F. T. C. DE; TRINDADE, R. DE C.

Laboratório de Microbiologia Aplicada - Universidade Federal de Sergipe, Cidade Universitária Prof. José Aloísio de Campos - Av. Marechal Rondon, S/N; CCBS - Bloco 145 - Sala 15, Jardim Rosa Elze, São Cristóvão, SE, Brasil – CEP: 49100-000 -. Tel (055\*\*79) 2105-6628 microbiologia.ufs@gmail.com. \*amjunior@ufs.br

**RESUMO:** O uso de plantas medicinais no combate as micoses é uma prática comum nas comunidades rurais e, neste contexto, o objetivo desse trabalho foi analisar o perfil de sensibilidade de isolados clínicos de *C. neoformans* frente a extratos brutos aquosos e antifúngicos de uso hospitalar utilizando a técnica de difusão em disco. Esses produtos naturais foram obtidos de plantas medicinais popularmente utilizadas por comunidades do sertão sergipano. Foram analisados os extratos brutos aquosos de juazeiro (*Ziziphus joazeiro* Mart.), catingueira (*Caesalpinia pyramidalis* Tul.), quixabeira (*Bumelia sartorum* Mart.) e jatobá (*Hymenaea courbaril* L.). Do juazeiro foi testado o extrato preparado a partir do infuso da entrecasca e da decoção da folha. Da catingueira foi utilizado o extrato preparado a partir do infuso das folhas. Da quixabeira o extrato utilizado foi preparado a partir da decoção da entrecasca e do jatobá maceração da entrecasca. Todos esses produtos naturais foram submetidos aos seguintes tratamentos: exposição ou não a luz ultravioleta e autoclavagem (121°C por 10 minutos). Em paralelo as leveduras patogênicas foram testadas frente aos seguintes antifúngicos de uso hospitalar: anfotericina B, fluconazol, Itraconazol, Miconazol e cetoconazol. Todos os extratos brutos aquosos apresentaram ação antifúngica frente a todas as linhagens clínicas de *Cryptococcus neoformans*. O tratamento de submeter à autoclavagem e exposição à luz ultravioleta apresentaram melhores resultados de ação antifúngica. Sendo que o tratamento de autoclavar o extrato bruto aquoso prevaleceu estatisticamente com os melhores resultados. Outros estudos de atividade antimicrobiano são necessários para corroborar a ação antimicótica dos produtos naturais testados, como por exemplo killer-time e fracionamento do teste de micodiluição. No teste de sensibilidade dos antifúngicos realizado foi demonstrado que as leveduras apresentaram resistência preocupante ao fluconazol e a itraconazol pelo método de difusão em disco. Para novos conhecimentos desse perfil de resistência há necessidade de testes de melhor acurácia, como por exemplo, microdiluição. Para tanto, deve-se padronizar os testes de sensibilidade quando há uso de produtos naturais oriundos de plantas medicinais, além de fornecer alternativas de uso aos pacientes cometidos por essa levedura com fornecimento de dados científicos que comprovem a ação dos produtos naturais e plantas medicinais de largo uso no sertão sergipano.

**Palavras-chaves:** leveduras patogênicas, difusão a disco, sertão nordestino e produtos naturais.

**ABSTRACT:** Comparative study of the susceptibility of clinical isolates of *Cryptococcus neoformans* (Sanfelice) against some antifungal agents of hospital use and plant extracts obtained from medicinal plants of the semiarid Sergipe region, Brazil. The use of medicinal plants to combat mycoses is a common practice in rural communities, and, in this context, the aim of this study was to analyze the sensitivity of clinical isolates of *C. neoformans* in relation to aqueous crude extracts and antifungal agents of hospital use using the disc diffusion technique. These natural products were obtained from medicinal plants popularly used empirically by backland communities in Sergipe, Brazil. The aqueous crude extracts of *Ziziphus joazeiro* Mart., *Caesalpinia pyramidalis* Tul., *Bumelia sartorum* Mart. and *Hymenaea courbaril* L. were analyzed. From the *Ziziphus joazeiro* Mart., we tested the extract prepared from the infusion of the inner bark and the decoction of the leaf. From the *Caesalpinia pyramidalis* Tul., the extract used was

prepared from the infusion of the leaves. From *Bumelia sartorum* Mart., the extract used was prepared from the decoction of the bark, and from the *Hymenaea courbaril* L. we prepared the extract from the maceration of the inner bark. All these natural products were subjected to the following treatments: exposure to ultraviolet light or not and autoclaving (121°C for 10 minutes). Amphotericin B, fluconazole, itraconazole, miconazole and ketoconazole were tested. All aqueous crude extracts showed antifungal activity against all clinical strains of *Cryptococcus neoformans*. The treatment that underwent autoclaving and exposure to ultraviolet light showed better results for antifungal action. The treatment with autoclaving of the aqueous crude extract statistically prevailed with the best results. There is the need to perform some treatments using these natural products based on the tested medicinal plants for better antifungal activity against this pathogenic yeast so they become more effective. In the antifungal susceptibility test performed, it was demonstrated that the yeast had worrying resistance to fluconazole and itraconazole by the disc diffusion method. For further knowledge on this resistance profile, there is the need of tests with greater accuracy, such as the microdilution test. To do so, susceptibility testing must be standardized when there is the use of natural products derived from medicinal plants, in addition to the provision of alternative uses by patients affected by this yeast, providing scientific data demonstrating the use and action of the natural products and medicinal plants of wide use in Sergipe, Brazil.

**Key words:** pathogenic yeasts, disc diffusion, Brazilian northeast backland, natural products.

## INTRODUÇÃO

O uso de plantas medicinais é uma fonte valiosa de produtos naturais para manter a saúde humana. Nas últimas décadas, estudos mais intensivos sobre terapias naturais têm sido realizados no Brasil associando informação do senso comum a corroboração ou não do efeito biológico desses produtos naturais obtidos de plantas medicinais (SANTOS *et al.*, 1995).

De acordo com a OMS (Organização Mundial de Saúde) as plantas medicinais seriam a melhor fonte para a obtenção de uma variedade de ingredientes ativos antimicrobianos. No Brasil, o uso de compostos de plantas para finalidades farmacêuticas aumenta gradualmente. Sendo assim, tais plantas medicinais devem ser investigadas para compreender melhor suas propriedades, segurança e eficiência biológica (ELLOF, 1998). Vários governos latino-americanos desenvolveram programas para o estudo de produtos naturais para várias atividades, inclusive a atividade antimicrobiana, dentre eles, Cuba (MARTINEZ *et al.*, 1996), Brasil (SARTORATTO *et al.*, 2004 e DUARTE *et al.*, 2005), Honduras (LENTZ *et al.*, 1998) e México (NAVARRO *et al.*, 1996 e ROJAS *et al.*, 2001).

Uma planta ser considerada medicinal quando por meio de experimentação científica, tiver validado suas ações farmacológicas e, então possa ser usada na terapêutica ou como matéria-prima para a fabricação de medicamentos fitoterápicos (MATOS, 1982). FARNSWORTH e SOEJARTO (1985) afirmaram que a OMS estima que 80% das pessoas nos países em desenvolvimento confiam

na medicina tradicional para os cuidados primários da saúde, e que 85% desta medicina tradicional envolve o uso de extratos de plantas. VAITSMAN (1995) complementou, afirmando que no Brasil 60% da população recorre às plantas medicinais.

A Caatinga é uma formação vegetal exclusivamente brasileira que foi reconhecida como uma das 37 Grandes Áreas Naturais do Planeta (GIL, 2002). Ocupa uma área de aproximadamente 800.000 km<sup>2</sup> (70% de toda a região Nordeste), ocorrendo nos Estados do Piauí, Ceará, Rio Grande do Norte, Paraíba, Pernambuco, Alagoas, Sergipe, Bahia e uma pequena faixa no norte de Minas Gerais (PRADO, 2003). A vegetação da Caatinga é composta principalmente por espécies xerofíticas, apresentando fisionomia arbustivo-arbórea, ocorrendo em áreas com marcada sazonalidade, baixas e irregulares índices de precipitação pluviométrica com períodos de escassez e temperaturas médias de 24°C a 32°C ao longo do ano. Quanto à flora, por exemplo, há registro de aproximadamente 1000 espécies vegetais, sendo 380 endêmicas (GIULIETTI *et al.* 2004).

No Nordeste do Brasil, *Bumelia sartorum* Mart., *Sapotaceae*, é comumente conhecido como “Quixaba” ou “Quixabeira”, e tem sido muito utilizado no folclore brasileiro para o tratamento de *diabetes mellitus*, doenças inflamatórias, ulceração e infecções bacterianas (ATAÍDE *et al.*, 2007). Como também citado por CRUZ *et al.* (2007), BANDEIRA e GOMES, (2012) informaram em estudos etnobotânicos na região semiárida

do estado da Bahia, a ocorrência de uso popular da catingueira (*Poincianella pyramidalis*), sendo indicada por 100% dos informantes, seguida pela aroeira (*Schinus terebinthifolium*) e o velande (*Croton heliotropiifolius*), indicadas por 86% dos informantes; candeia (*Gochnata oligocephala*) e jurubeba (*Solanum paniculatum*) citadas por 71%; hortelã miúdo (*Mentha pulegium*) citada por 57% dos informantes; alecrim (*Lippia thymoides*), angico (*Anadenanthera columbrina*), babosa (*Aloe vera*), braúna (*Schinopsis brasiliensis*), cajueiro (*Anacardium occidentale*), erva cidreira (*Lippia alba*), jatobá (*Hymenaea coubaril*), mastruz (*Chenopodium ambrosioides*) e pau d'arco (*Handroanthus impetiginosus*) foram citadas por 43% dos informantes. Analisando-se esses dados observa-se que apenas a catingueira foi citada por todos informantes. No mesmo trabalho, os autores citaram que a maioria das espécies foi indicada para doenças do sistema digestório, infecções e doenças do sistema respiratório. Assim como as folhas e as cascas são as partes mais citadas no preparo dos remédios caseiros, sendo referenciadas para 36% e 30% dos usos, respectivamente (BANDEIRA e GOMES, 2012).

Espécies nativas brasileiras como *Caesalpinia* spp. apresentam diversas atividades biológicas, em especial, atividade antimicrobiana (SABIR e SAAED, 2001). *Caesalpinia pyramidalis* Tul é uma árvore endêmica da região Nordeste e uma das espécies predominantes na caatinga. Popularmente conhecido como "Catingueiro" ou "pau-de-rato", e suas folhas são empregadas na medicina tradicional como diurético, infecções digestivas e antipirético. (GOVERNO DO ESTADO DA BAHIA, 1979).

O juazeiro (*Ziziphus joazeiro* Mart. - *Rhamnaceae*) é uma das espécies endêmicas do bioma caatinga utilizadas na medicina popular como expectorante, no tratamento de bronquites e de úlceras gástricas, na fabricação de cosméticos, xampus anticaxa e creme dental, na alimentação de animais principalmente nos períodos de seca além de apresentar importância ecológica (LORENZI e MATOS 2002). Também há relatos de uso medicinal no tratamento de gastrites, gripes, contusões e ferimentos (LIMA, 2000).

CUNHA e BORTOLOTTI (2011) citaram em estudos etnobotânicos o uso medicinal de jatobá (*Hymenaea* spp.) cuja casca é utilizada para o tratamento de diversas doenças (respiratório e geniturinário). Duas espécies de jatobá foram identificadas para esse fim (*Hymenaea stigonocarpa* e *H. martiana*), mas os moradores não fizeram distinção dessas espécies. As partes mais utilizadas foram: folhas (42%), seguidas por raízes (21%), casca e entrecasca (21%), frutos (5,3%), sementes

(5,1%), planta inteira (3,5%) e outros. As folhas são as mais citadas em diversos trabalhos sobre essas plantas medicinais como SCHARDONG e CERVI (2000), PILLA *et al.* (2006) e MEDEIROS *et al.* (2004).

As micoses profundas ou sistêmicas são causadas por fungos patogênicos primários ou oportunistas que infectam, principalmente, pacientes imunossuprimidos (VERONESI e FOCACCIA, 1996; EDMAN, 1998) assim como pacientes com doenças crônicas graves (leucemias, diabetes mellitus e câncer) ou fazendo uso de corticoides ou outras drogas imunossupressoras ou imunodepressivas (BOHME *et al.*, 1996).

Esses fatos têm estimulado a comunidade científica a desenvolver novos antifúngicos e, nessa busca, a obtenção de produtos naturais obtidos de pesquisas com plantas medicinais com atividade antifúngica tem se destacado (FREIXA *et al.*, 1998).

O uso de plantas medicinais no combate de micoses é uma prática comum nas comunidades rurais do nordeste brasileiro e, neste contexto, o presente trabalho visa conhecer o perfil de sensibilidade e resistência de *Cryptococcus neoformans* a extratos vegetais de plantas medicinais popularmente conhecidas e utilizadas pelo senso comum com ação antimicótica, pela comunidade do povoado de Curituba, Canindé do São Francisco, semiárido sergipano. Além disso, realizar a análise de susceptibilidade dessas leveduras patogênicas frente a antifúngicos de uso rotineiro na prática clínica utilizando o método de difusão em disco.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### Micro-organismos

As linhagens de *Cryptococcus neoformans* utilizadas fazem parte da Coleção de Cultura de Micro-organismos do Laboratório de Microbiologia Aplicada – LMA da Universidade Federal de Sergipe e foram isoladas de líquido cefalorraquidiano de pacientes com quadro clínico suspeito de meningite fúngica. Também foi utilizada linhagem tipo padrão, *Cryptococcus neoformans* ATCC 32608 fornecida pelo Laboratório de Micologia da Universidade Federal de Minas Gerais para padronização da técnica e seus resultados.

### Extratos vegetais

Foram analisados os extratos brutos aquosos das seguintes plantas medicinais: juazeiro (*Ziziphus joazeiro* Mart.), catingueira (*Caesalpinia pyramidalis* Tul.), quixabeira (*Bumelia sartorum* Mart.) e jatobá (*Hymenaea courbaril* L.).

Os extratos vegetais foram fornecidos pelo Laboratório de Farmacologia da Universidade

Federal de Sergipe e suas exsiccatas cadastradas no Herbário DBI/UFS pertencente ao Departamento de Biologia da Universidade Federal de Sergipe.

Apos catalogação, esses materiais botânicos foram acondicionados em sacos de papel até o processo de secagem. Esse procedimento foi realizado em temperatura ambiente. Seguindo ao preparo do extrato bruto, todo o material botânico (casca, folhas e entrecasca) foi triturado e o pó resultante (400g) devidamente cadastrado e estocados em ultrafreezer (-80°C).

Os referidos extratos foram previamente definidos em levantamento etnobotânico realizado com várias plantas medicinais utilizadas empiricamente pela comunidade de Curitiba, município de Canindé do São Francisco, sertão sergipano (CRUZ *et al.*, 2007). CRUZ *et al.*, 2007 citaram algumas formas de obtenção de dados informativos para estudos dessas plantas medicinais como: entrevistas com *mateiras* (senhoras da comunidade que fazem uso corriqueiro dessas plantas medicinais para fins terapêuticos, sempre de forma empírica), feirantes de plantas medicinais e pequenos agricultores.

Constando os seguintes dados ambientais: temperatura de coleta (37°C), coletado no período matutino (9:00hs), umidade relativa (20%) e no verão (março). O georreferenciamento da localidade de coleta consiste em Latitude de -09° 39' 36" e Longitude de -37° 47' 22", altitude de 37m e distância do centro da cidade de 1,7km.

Para o preparo do extrato bruto aquoso (EBA), 3g do extrato vegetal foi diluído em 10mL de água ultrapura esterilizada e homogeneizado, vortexizado por 1 minuto e mantido em repouso por 30 minutos até a realização dos procedimentos, em escala laboratorial, de etapas e preparos similares aos utilizados empíricos pelas comunidades do sertão sergipano.

Os extratos utilizados para os ensaios foram obtidos das seguintes fontes: a partir do infuso da entrecasca (EBA 01) e da decocção da folha (EBA 03) do juazeiro (*Z. joazeiro* Mart.); do infuso das folhas (EBA 02) da catingueira (*C. pyramidalis* Tul.); da decocção da entrecasca (EBA 04) da quixabeira (*B. sartorum* Mart.) e da maceração da entrecasca (EBA 05) do jatobá (*H. courbaril* L.).

Após realização dos preparos, esses extratos brutos aquosos (EBA) foram esterilizados por filtração em membrana celulósica de 0,22µm, liofilizados e estocados a -20°C na coleção de material botânico de interesse biotecnológico no LMA/UFS.

Posteriormente, os extratos brutos aquosos (EBA) testados foram submetidos aos seguintes tratamentos: 1 hora de exposição à luz ultravioleta (COM U.V.); sem exposição à luz ultravioleta e nenhum outro tratamento (SEM U.V.) e autoclavagem (121°C por 10 minutos, denominado como AUTO).

### Teste de sensibilidade

Os testes de sensibilidade foram realizados por meio da técnica de difusão em disco, em Agar Sabouraud (BAUER *et al.*, 1986). Foram utilizadas suspensões celulares com padrão da Escala 0,5 de McFarland, com aproximadamente  $5 \times 10^5$  células fúngicas.

A suspensão microbiana foi semeada na superfície do Agar com auxílio de swabs estéreis. Após 30min foram inoculados 20µl das seguintes concentrações: 4,40 e 100mg/mL de cada extrato, previamente tratado em discos de papel de filtro, e colocados para secar por 30 minutos na temperatura ambiente. Após esse procedimento, cada disco de papel de filtro foi colocado sobre o meio de cultura em placa de petri de modo asséptico e colocados em distancias equidistantes na superfície do Agar Sabouraud semeado com a suspensão fúngica padronizada. As placas foram incubadas a 37°C. Como controle negativo, utilizou-se água destilada e como controles positivos foram utilizados os antifúngicos. Para a investigação do perfil de sensibilidade das linhagens frente aos antifúngicos quimioterápicos (*Sigma*), foram testadas várias concentrações de fluconazol (0,2; 2; 10; 12 e 16mg/mL), anfotericina B (0,25 e 2mg/mL), itraconazol (5mg/mL), cetoconazol e miconazol (10mg/ml) (SHADOMY & SPINEL-INGROF, 1980).

Após 72h horas de cultivo, o resultado foi interpretado por meio da presença ou ausência de halo de inibição em comparação com o padrão de comportamento das linhagens diante dos controles e teste de susceptibilidade fúngica de acordo com os protocolos padronizados de CLSI, 2009.

**QUADRO 1.** Espécies vegetais com nomes populares utilizadas com fins de atividade antifúngica.

Código do Herbário DBI/ UFS	Nome popular	Família	Espécie
01627	Juazeiro	<i>Rhamnaceae</i>	<i>Ziziphus joazeiro</i> Mart.
00261	Catingueira	<i>Caesalpinaceae</i>	<i>Caesalpinia pyramidalis</i> Tul.
00089	Quixabeira	<i>Sapotaceae</i>	<i>Bumelia sartorum</i> Mart.
004553	Jatobá	<i>Caesalpinaceae</i>	<i>Hymenaea courbaril</i> L.

### Análise estatística dos dados

Foi utilizado o software *Graphic Pad Prism* adotando  $p < 0,01$  para todas as análises de dados. Foi realizado teste de comparação de médias (teste t seguido de teste de Turkey) quando verificou a ação dos tratamentos dentro de cada produto natural testado. Também foi comparada a ação antimicrobiana dos diversos produtos naturais independente do tratamento realizado.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Teste de Sensibilidade de *Cryptococcus neoformans* aos extratos vegetais.

Destacam-se poucos estudos de atividade antimicrobiana dessas plantas medicinais com enfoque nessa levedura patogênica, ressaltando o caráter ineditismo desse trabalho. A Tabela 1 mostra a atividade antifúngica dos extratos aquosos de juazeiro, catingueira, quixabeira e jatobá quando na concentração de 4mg/mL frente isolados clínicos (1 a 9) de *Cryptococcus neoformans* utilizando o método de difusão em disco.

Houve atividade antifúngica em todos os extratos brutos aquosos testados de todas as plantas medicinais. Somente não houve diferença estatística entre os dados obtidos da infusão da entrecasca do juazeiro (EBA1) e a maceração da entrecasca de jatobá (E6). Esses extratos brutos citados obtiveram os maiores halos de inibição.

Na infusão da entrecasca do juazeiro (EBA1) houve diferença estatística entre o tratamento que o

extrato foi submetido. O tratamento de autoclavagem obteve os maiores halos (13mm frente a linhagem 3, e 10mm frente as linhagens 6 e 8 de *Cryptococcus neoformans*. Para infusão da folha da catingueira, também o mesmo tratamento (autoclavagem) obteve os melhores halos de inibição de crescimento fúngico (12mm frente a linhagem 2 e 10mm frente a linhagem 3 de *C. neoformans*). Já na decocção da folha do juazeiro não houve diferença estatísticas entre os tratamentos testados, entretanto destaca-se a obtenção dos halos de inibição de 17mm frente a linhagem 3 de *C. neoformans* pelo tratamento de exposição a luz U.V.

Na análise dos dados da decocção da entrecasca da quixabeira destaca-se o efeito antimicrobiano do extrato quando submetido à autoclavagem frente aos outros tratamentos. Somente nesse tratamento foi obtida ação antimicrobiana com halos de inibição de 12mm frente à linhagem 2, 14mm frente à linhagem 3 e 10mm frente à linhagem 8 de *C. neoformans*.

E por fim para a maceração da entrecasca de jatobá houve diferença estatísticas entre todos os tratamentos (com ou sem luz ultravioleta e autoclavagem) tendo como resultados significativos de 15mm frente à linhagem 7 quando submetido à luz ultravioleta e 14mm frente à linhagem 8 e 13mm frente à linhagem 2 de *C. neoformans*.

A Tabela 2 apresenta a atividade antifúngica dos extratos aquosos de juazeiro, catingueira, quixabeira e jatobá quando na concentração de 40mg/mL frente a isolados clínicos de *Cryptococcus neoformans* isolados clínicos utilizando o método de

**TABELA 1.** Halos de inibição em milímetros (mm) dos extratos vegetais aquosos de plantas medicinais testados na concentração de 4mg/mL.

Extratos Vegetais Aquosos	Método utilizado	<i>Cryptococcus neoformans</i> (LMA/UF5)									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	ATCC32608
EBA1	SEM U.V. <sup>b</sup>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Infusão da entrecasca de Juazeiro <sup>3</sup>	COM U.V. <sup>b</sup>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2
	AUTO <sup>a</sup>	0	8	13	0	0	10	7	10	0	2
EBA2	SEM U.V. <sup>b</sup>	0	0	7	0	0	7	0	0	0	0
Infusão da folha de Catingueira <sup>1</sup>	COM U.V. <sup>b</sup>	0	7	0	0	0	0	0	0	0	6
	AUTO <sup>a</sup>	0	12	10	0	0	7	0	8	0	7
EBA3	SEM U.V. <sup>b</sup>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Decocção da folha do Juazeiro <sup>2</sup>	COM U.V. <sup>a</sup>	0	8	17	0	0	5	0	0	0	4
	AUTO <sup>a</sup>	0	10	13	6	0	0	0	0	0	8
EBA4	SEM U.V. <sup>b</sup>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Decocção da entrecasca de Quixabeira <sup>4</sup>	COM U.V. <sup>b</sup>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	9
	AUTO <sup>a</sup>	0	12	14	0	0	0	0	10	0	12
EBA5	SEM U.V. <sup>c</sup>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Maceração da entrecasca de Jatobá <sup>3</sup>	COM U.V. <sup>b</sup>	0	0	0	0	10	15	0	0	0	7
	AUTO <sup>a</sup>	0	13	7	0	0	0	0	14	0	13

a, b e c – Diferenças estatísticas entre os tratamentos realizados, com  $p < 0,01$ . Teste t seguido de teste de Turkey.

1, 2, 3 e 4 - Diferenças estatísticas entre os extratos vegetais testados frente a levedura independente do tratamento realizado, com  $p < 0,01$ . Teste t seguido de teste de Turkey.

difusão em disco.

Na Tabela 2 são apresentados os halos de inibição da atividade antifúngica dos produtos naturais obtidos das plantas medicinais testadas, sendo que nesse caso foi utilizada a concentração de 40mg/mL. Concomitante aos dados obtidos na concentração de 4mg/mL, os perfis de sensibilidade foram semelhantes, entretanto com tamanho de halos de inibição, em mm, mais significativos. Vale informar que após análise estatísticas desses dados, nessa concentração foram semelhantes estatisticamente aos obtidos na concentração de 4mg/mL.

Nessa concentração testada foram destacados os seguintes resultados: para a infusão da entrecasca de juazeiro (EBA 1) houve ação antimicótica quando o produto natural foi submetido à autoclave, tendo como halos de inibição significativos de 14mm frente à linhagem 3, 12mm frente à linhagem 6 e 11mm frente à linhagem 8 de *Cryptococcus neoformans*. Já para a infusão da folha de catingueira (EBA 2) também houve diferença estatística quando o produto foi submetido à autoclavagem ( $p=0,00013$ ) com os melhores resultados de inibição fúngica.

Para a decocção da folha de juazeiro (EBA 3) não houve diferença estatísticas nos dois tratamentos que correram halos de inibição (autoclavagem e exposição à luz ultravioleta). Destacam-se os halos de inibição quando o produto natural foi exposto à luz ultravioleta, de 17mm frente à linhagem 3 e 10mm frente à linhagem 2 de *C. neoformans*. Para decocção da folha de quixabeira

(EBA 4) somente ocorreu ação antimicrobiana quando o produto foi submetido à autoclavagem tendo como halos de inibição de 15mm frente à linhagem 3, 14mm frente à linhagem 2 e 10mm frente à linhagem 8 de *Cryptococcus neoformans*.

E por fim houve ação antimicótica quando ocorreu a maceração da entrecasca de juazeiro (EBA 5) nos tratamentos de exposição de luz ultravioleta e submetido à autoclavagem. Dentre os tratamentos houve diferença estatística ( $p=0,00012$  e  $p=0,00029$ ). Nesse caso os halos de inibição foram significativos: para tratamento da exposição da luz ultravioleta com os seguintes dados 15mm frente à linhagem 6 e 10mm frente à linhagem 5 de *Cryptococcus neoformans* e quando tratado com autoclavagem com os seguintes halos de inibição 16mm frente à linhagem 8 e 13mm frente à linhagem 2 de *C. neoformans*.

A Tabela 3 informa a atividade antifúngica dos extratos aquosos de juazeiro, catingueira, quixabeira e jatobá quando na concentração de 100mg/mL frente isolados clínicos de *Cryptococcus neoformans* isolados utilizando o método de difusão em disco.

Houve diferenças estatísticas entre os dados obtidos pelos extratos brutos aquosos (EBA) analisados na concentração de 100mg/mL. Destaca-se que concentrações elevadas torna-se o método restrito a resultados mais preciso sendo necessários métodos de melhor acuraria e exatidão, por exemplo, micro diluição e macrodiluição. Mesmo com esse fator limitante foram conseguidas diferenças estatísticas entre os produtos naturais

**TABELA 2.** Halos de inibição em milímetros (mm) dos extratos vegetais aquosos de plantas medicinais testados na concentração de 40mg/mL.

Extratos Vegetais Aquosos	Método utilizado	<i>Cryptococcus neoformans</i> (LMA/UFS)									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	ATCC32608
EBA1	SEM U.V. <sup>b</sup>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Infusão da entrecasca de Juazeiro <sup>3</sup>	COM U.V. <sup>b</sup>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	6
	AUTO <sup>a</sup>	0	8	14	0	0	12	7	11	0	8
EBA2	SEM U.V. <sup>b</sup>	0	0	7	0	0	7	0	0	0	0
Infusão da folha de Catingueira <sup>1</sup>	COM U.V. <sup>b</sup>	0	8	0	0	0	0	0	0	0	9
	AUTO <sup>a</sup>	0	14	10	0	0	7	0	9	0	11
EBA3	SEM U.V. <sup>b</sup>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Decocção da folha do Juazeiro <sup>2</sup>	COM U.V. <sup>a</sup>	0	10	17	0	0	5	0	0	0	8
	AUTO <sup>a</sup>	0	11	14	7	0	0	0	0	0	12
EBA4	SEM U.V. <sup>b</sup>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Decocção da entrecasca de Quixabeira <sup>4</sup>	COM U.V. <sup>b</sup>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	11
	AUTO <sup>a</sup>	0	14	15	0	0	0	0	10	0	14
EBA5	SEM U.V. <sup>c</sup>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Maceração da entrecasca de Jatobá <sup>3</sup>	COM U.V. <sup>b</sup>	0	0	0	0	10	15	0	0	0	9
	AUTO <sup>a</sup>	0	13	8	0	0	0	0	16	0	17

a, b e c – Diferenças estatísticas entre os tratamentos realizados, com  $p<0,01$ . Teste t seguido de teste de Turkey.

1, 2, 3 e 4 - Diferenças estatísticas entre os extratos vegetais testados frente à levedura independente do tratamento realizado, com  $p<0,01$ . Teste t seguido de teste de Turkey.

**TABELA 3.** Halos de inibição em milímetros (mm) dos extratos vegetais aquosos de plantas medicinais testados na concentração de 100mg/mL.

Extratos Vegetais Aquosos	Método utilizado	<i>Cryptococcus neoformans</i> (LMA/UFS)									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	ATCC32608
EBA1	SEM U.V. <sup>b</sup>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Infusão da entrecasca de Juazeiro <sup>3</sup>	COM U.V. <sup>b</sup>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	9
	AUTO <sup>a</sup>	0	8	15	0	0	14	10	11	0	11
EBA2	SEM U.V. <sup>b</sup>	0	0	7	0	0	7	0	0	0	0
Infusão da folha de Catingueira <sup>1</sup>	COM U.V. <sup>b</sup>	0	8	0	0	0	0	0	0	0	11
	AUTO <sup>a</sup>	0	14	10	0	0	10	0	12	0	13
EBA3	SEM U.V. <sup>b</sup>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Decocção da folha do Juazeiro <sup>2</sup>	COM U.V. <sup>a</sup>	0	10	17	0	0	8	0	0	0	9
	AUTO <sup>a</sup>	0	11	14	10	0	0	0	0	0	14
EBA4	SEM U.V. <sup>b</sup>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Decocção da entrecasca de Quixabeira <sup>4</sup>	COM U.V. <sup>b</sup>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	13
	AUTO <sup>a</sup>	0	16	17	0	0	0	0	10	0	16
EBA5	SEM U.V. <sup>c</sup>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Maceração da entrecasca de Jatobá <sup>3</sup>	COM U.V. <sup>b</sup>	0	0	0	0	13	15	0	0	0	12
	AUTO <sup>a</sup>	0	15	8	0	0	0	0	16	0	18

a, b e c – Diferenças estatísticas entre os tratamentos realizados, com  $p < 0,01$ . Teste t seguido de teste de Turkey.

1, 2, 3 e 4 - Diferenças estatísticas entre os extratos vegetais testados frente à levedura independente do tratamento realizado, com  $p < 0,01$ . Teste t seguido de teste de Turkey.

testados e formação de halos de inibição de micro-organismos.

Percebe-se que nessa concentração mais elevada foram obtidos valores de halos de inibição mais elevados. Na infusão da entrecasca de juazeiro (EBA 1) somente no uso da autoclavagem como método de tratamento teve resultado e com os seguintes halos de inibição de 15mm frente linhagem 3, 14mm frente à linhagem 6, 11mm frente à linhagem 8 e 10mm frente à linhagem 7 de *C. neoformans*. Para a infusão da folha de catingueira (EBA 2) nos três tratamentos foram obtidos resultados de ação antifúngica, sendo o tratamento da autoclavagem diferente estatisticamente dos outros métodos ( $p = 0,0008$ ) e com quatro perfis de sensibilidade de alto valor de halos de inibição: 14mm frente à linhagem 2, 12mm frente à linhagem 8, 10mm frente às linhagens 3 e 6 de *Cryptococcus neoformans*.

Para a decocção da folha de juazeiro (EBA 3) os tratamentos de exposição à luz ultravioleta e submetido à autoclavagem apresentaram ação antifúngica, mas sem diferenças estatísticas. Para o tratamento de exposição à luz ultravioleta os resultados de halos de inibição mais significativos foram 17mm frente à linhagem 3 e 10mm frente à linhagem 2 de *C. neoformans*. Já para o tratamento da autoclavagem os halos de inibição obtidos foram 14mm frente à linhagem 3, 11mm frente à linhagem 2 e 10mm frente à linhagem 10 de *Cryptococcus neoformans*. Para decocção da entrecasca da quixabeira (EBA 4) somente o tratamento da autoclavagem obteve resultados de

ação antifúngica tendo como resultados de halos de inibição de 17mm frente à linhagem 2, 16mm frente à linhagem 3 e 10mm frente à linhagem 8 de *Cryptococcus neoformans*.

E por fim a maceração da entrecasca de jatobá (EBA 5) houve ação antifúngica nos tratamentos de exposição de luz ultravioleta ( $p = 0,0007$ ) e autoclavagem ( $p = 0,0004$ ) com diferença estatística entre ambos. Para exposição à luz ultravioleta os halos de inibição foram 15mm frente à linhagem 6 e 13mm frente à linhagem 5 de *C. neoformans* e para o tratamento de submetido a autoclavagem os halos de inibição encontrados foram 16mm frente à linhagem 8, 15mm frente à linhagem 2 e 8mm frente à linhagem 3 de *Cryptococcus neoformans*.

Quando se compara as diversas concentrações de extratos brutos aquosos testados (4, 40 e 100mg/mL) percebe-se que não houve diferença estatística com valor de  $p = 0,23$ , adotando  $p < 0,01$ .

Quando se comparou o extrato vegetal frente ao tratamento realizado somente para infusão da folha de catingueira (EBA2), decocção da folha de juazeiro (EBA3) e maceração da entrecasca de jatobá (EBA5) houve diferença estatística ( $p < 0,01$ ). Nesse resultado constatou-se que a infusão da folha da catingueira foi o que melhor apresentou ação antimicrobiana ( $p = 0,0025$ ) frente a *C. neoformans* com 5 perfis de resistência nos três tratamentos realizados. Seguido da decocção da folha de juazeiro ( $p = 0,0017$ ) com 3 perfis de ação antimicrobiana em dois tratamentos realizados,

exposição à luz ultravioleta e autoclavagem. E por fim na maceração da entrecasca de jatobá que apresentou valor de  $p=0,0007$  com atividade antifúngica nos métodos de exposição à luz ultravioleta e autoclavagem.

Quando se compara dentro de cada extrato vegetal os tratamentos realizados (exposição à luz U.V, sem exposição à luz U.V e autoclavagem) houve diferenças estatísticas em todos os tratamentos e todos os extratos vegetais.

Na entrecasca de juazeiro, catingueira e quixabeira a ação de autoclavagem apresentou melhor ação antimicrobiana frente a *C. neoformans* do que em relação aos outros tratamentos. Já na folha de juazeiro e na entrecasca de jatobá houve diferença estatística entre os três tratamentos realizados, sendo o que apresentou melhor ação antimicrobiana frente a essa levedura patogênica foi autoclavagem seguido de exposição à luz UV.

Em todos os extratos brutos analisados a não exposição à luz UV apresentou os resultados mais baixos de susceptibilidade frente a esse fungo tendo como único resultado com formação de halo de inibição no extrato bruto, infusão da folha de catingueira (EBA2). Isso mostra que a obtenção do produto natural sem nenhum tratamento, pode diminuir o seu potencial antimicrobiano. Para essas plantas medicinais da região semiárida testadas, essa característica foi notada e estatisticamente definida.

Os que foram expostos à luz ultravioleta apresentaram focos isolados de sensibilidade, tendo como resultados positivos, ou seja, obtenção de ação antifúngica ou formação de halo de inibição os extratos brutos obtidos da infusão da folha de catingueira (EBA2), decocção da folha de juazeiro (EBA3) e maceração da entrecasca de jatobá (EBA5).

O método realizado, submissão do extrato bruto a autoclavagem 121°C por 10 minutos apresentou os resultados mais significativos de efetividade na ação antifúngica em todos os extratos brutos e plantas medicinais testados. Nesse trabalho, esse tratamento foi o mais adequado na obtenção de ação antifúngica dos extratos brutos obtidos das plantas medicinais popularmente utilizadas no sertão sergipano como antimicrobiano.

Também nota-se que em todos os extratos brutos aquosos (EBA) de todas as plantas medicinais testadas, assim como nas diversas formas de tratamento e concentração a linhagem 9 de *Cryptococcus neoformans* foi resistente a todos os experimentos. Isso se torna importante e eleva a questão de procura de novos fármacos ou fitoquímicos inclusos em produtos naturais a fim de se confrontar a esse aumento de linhagens resistentes, mesmo sendo resultados fenotipicamente.

Martins *et al.* (2010) relataram que maceração de frutos, folhas e entrecasca de jatobá apresentou atividade antibacteriana. Esses estudos também relataram que infusão de folhas e entrecasca dessa espécie apresenta, empiricamente, combate a caspa. Albuquerque *et al.* (2007) informaram que jatobá apresenta diversidade rica de uso etnofarmacológico, tendo a planta inteira diversos usos com fins medicinais, por exemplo, antisséptico bucal, problemas dermatológico (caspa, sarna, dermatite por seborreia e coceiras) e micoses.

Cruz *et al.* (2007) citaram que todos as plantas medicinais analisadas nesse manuscrito apresentam atividade antimicrobiana. Sendo que juazeiro é empiricamente utilizado para tratamento de candidíase e micose superficial, catingueira para candidíase e quixabeira e jatobá para casos de micoses superficiais. Nesse mesmo estudo, foi afirmado que somente infusão da casca de juazeiro e infusão das folhas de catingueira apresentaram ação antifúngica frente a *Cryptococcus neoformans* nos valores de 0,1mg/mL e 0,0125mg/mL. Esses dados são diferentes do que encontrados nesse trabalho em que todas as referidas plantas medicinais e seus extratos brutos aquosos apresentaram atividade antifúngica frente a essa levedura patogênica. Vale enfatizar que em relação a esses dois extratos brutos aquosos (infusão de casca de jatobá e infusão de folhas de catingueira) tiveram ação antifúngica nas diversas concentrações analisadas, 4, 40 e 100mg/mL. Para atingir se haverá ou não ação antifúngica nas concentrações descritas por CRUZ *et al.* (2008) há necessidade de realização de micro diluição para determinação da concentração inibitória mínima (CIM).

Novos estudos prosseguem na análise fotoquímica desses produtos biológicos assim como na execução de técnicas de maior acurácia e exatidão na determinação da atividade antimicrobiana e antibacteriana de produtos naturais de plantas medicinais popularmente utilizadas por comunidades no estado de Sergipe. Dentre essas novas buscas, destacam-se a obtenção de outros extratos (hidro alcoólico e etanólico), óleos essenciais e fitoquímicos componentes desses produtos naturais. Assim como na elaboração de novos procedimentos laboratoriais microbiológicos de análise de comportamento antimicrobiano desses produtos botânicos que conferem maior estabilidade nos resultados, por exemplo, testes de análise de concentração inibitória mínima (CIM) e determinação de efeitos microbicidas e microbiostáticos desses produtos naturais. Porém uma das grandes dificuldades é a obtenção de literatura científica e resultados confiáveis de testes de ação antifúngica desses produtos naturais e plantas medicinais utilizadas.

### Testes de susceptibilidade de *Cryptococcus neoformans* isolados clínicos frente aos antifúngicos de uso rotineiro na prática em saúde.

A Tabela 4 apresenta o teste de sensibilidade de *Cryptococcus neoformans* frente às diversas concentrações de anfotericina B (0,25 e 2mg/mL) quando utilizado o método de difusão em disco.

Como não há pontos de cortes definidos para os isolados brasileiros de *Cryptococcus neoformans*, então são adotados valores de sensível, sensibilidade moderada e resistência para isolados leveduriformes norte-americanos de acordo com o CLSI (2009). Para tanto são adotados para anfotericina B valores até 10mm como linhagens resistentes enquanto que acima de 10mm são referidos como isolados sensíveis a anfotericina B. Apenas duas linhagens das nove testadas apresentaram sensibilidade moderada frente ao antifúngico anfotericina B e somente uma linhagem das nove linhagens amostradas apresentou resistência antimicrobiana. Esse comportamento fenotípico de sensibilidade moderada induz a tendência de essas linhagens tornarem-se resistentes a esse quimioterápico, principalmente pelo uso indiscriminado e descontrolado desse antifúngico. Além disso, esses dados corroboram com as informações demonstradas acima, com produtos naturais que essa linhagem também apresentou resistência constante aos diversos extratos brutos aquosos obtidos de plantas medicinais testados.

Powderly *et al.* (1990) já presenciava linhagens resistentes a Anfotericina B. Este aparecimento do fenômeno de resistência a Anfotericina B de isolados clínicos de *Cryptococcus*

**TABELA 4.** Resultados de sensibilidade obtidos de linhagens clínicas de *Cryptococcus neoformans* pelo método de difusão em discos de Anfotericina B.

<i>Cryptococcus</i> <i>Neoformans</i>	Anfotericina B	
	0,25mg/mL	2mg/mL
1	S 17mm	S 22mm
2	S 20mm	S 21mm
3	S 20mm	S 25mm
4	S 13mm	S 28mm
5	S 15mm	S 30mm
6	S 16mm	S 30mm
7	S 12mm	S 25mm
8	S 15mm	S 20mm
9	R 8mm	R 10mm
ATCC 32608	S 15mm	S 17mm

R – linhagens resistentes e S – linhagens sensíveis; quando se compara com o protocolo CLSI (2009).

neoformans representa um problema clínico importante para a saúde pública, já que essa levedura patogênica está associada a infecções oportunistas e sistêmicas, por exemplo, criptococose, meningite criptocócica e meningoencefalite. Sandven *et al.* (1993) já demonstrava a desempenho de resistência de leveduras patogênicas (*Candida albicans* e *Cryptococcus neoformans*) frente a antifúngicos, em especial, anfotericina B e fluconazol, mesmo na realização de testes de susceptibilidade, rápidos (*screening*), como por exemplo, teste de difusão em discos, atingindo valores de ponto de corte entre 1 a 10mg/mL.

As Tabelas 5 e 6 apresentam o perfil de sensibilidade de *C. neoformans* em relação ao azólicos (Fluconazol, Itraconazol, Miconazol e Cetoconazol) quando utilizado o método de disco de difusão com as seguintes concentrações: 0,2; 2; 10; 12 e 16mg/mL.

Na tabela 5 são descritos os halos de inibição do fluconazol frente às leveduras patogênicas testadas quando utilizado o método de disco de difusão. Para os azólicos o CLSI (2009) descreve como até 20mm cepas com características fenotípicas resistentes, de 20 a 25mm com sensibilidade moderada e acima de 25mm como isolados sensíveis. Percebe-se nesses resultados que houve tendência uniforme de subida dos halos de inibição. Nas menores concentrações foram apresentados os maiores frequências de leveduras com perfis de resistência. Sendo na concentração de 0,2mg/mL, 100% de cepas resistentes. Já na concentração de 2mg/mL, oito das nove linhagens apresentaram comportamento fenotípico resistente. Na concentração de 10mg/mL, três das nove linhagens continuaram apresentando essa característica biológica enquanto que a partir da concentração de 12mg/mL apenas a linhagem nove manteve-se resistente ao fluconazol. Características padrão em todos os experimentos. Vale destacar que o fluconazol é o antifúngico de escolha na terapia das etiologias causadas pelo *Cryptococcus neoformans*, além disso, é o quimioterápico de maior comercialização. Portanto há de se preocupar, que em baixas concentrações da droga, nesse trabalho, foi apresentado alto índice de linhagens com comportamento fenotípico de resistência.

Na tabela 6 são apresentados os valores de halos de inibição dos outros azólicos, seu uso não frequente na prática clínica. Nota-se que para itraconazol na concentração de 5mg/mL, 100% dos isolados analisados de *C. neoformans* apresentou características de sensibilidade resistente frente a esse azólico. Já na concentração de 10mg/mL, apenas a linhagem nove continuou apresentando perfil de resistência enquanto que cinco cepas apresentaram comportamento sensível de

**TABELA 5.** Valores dos halos de inibição nas diferentes concentrações de Fluconazol.

<i>Cryptococcus neoformans</i>	Fluconazol				
	0,2mg/mL	2mg/mL	10mg/mL	12mg/mL	16mg/mL
1	R 17mm	MS 20mm	MS 220mm	S 25mm	S 28mm
2	R 7mm	R 13mm	MS 20mm	MS 23mm	S 25mm
3	R 11mm	R 14mm	R 17mm	MS 21mm	S 28mm
4	R 9mm	R 20mm	S 28mm	S 31mm	S 37mm
5	R 9mm	R 10mm	MS 18mm	S 25mm	S 29mm
6	R 13mm	R 17mm	R 20mm	MS 23mm	S 30mm
7	R 9mm	R 11mm	MS 20mm	MS 22mm	MS 23mm
8	R 9mm	R 12mm	MS20mm	S 25mm	S 27mm
9	R 2mm	R 4mm	R 7mm	R 8mm	R 10mm
ATCC 32608	R 7mm	R 6mm	S 17mm	S 23mm	S 26mm

R – linhagens resistentes; MS – linhagens com sensibilidade moderada e S – linhagens sensíveis; quando se compara com o protocolo CLSI. (2009).

susceptibilidade e três isolados com sensibilidade moderada. Destaca-se que na falha terapêutica no uso frequente de fluconazol em pacientes acometidos com criptococose, deve-se utilizar itraconazol (CLSI, 2009).

Na análise de susceptibilidade das linhagens de *Cryptococcus neoformans* frente aos azólicos de raro uso clínico, foi determinada a concentração única de 10mg/mL tanto para miconazol como cetoconazol. Para miconazol, sete das nove linhagens dessa levedura apresentaram perfil de sensibilidade caracterizado como resistente enquanto que para cetoconazol apenas duas das nove linhagens apresentaram esse perfil.

Vainstein *et al.* (2001) reafirmaram que isolados clínicos apresentaram menor sensibilidade ao fluconazol, e Peetermans *et al.* (1993) afirmam

que em pacientes soropositivos há alta incidência de resistência frente à fluconazol. Também TORRES-RODRIGUEZ *et al.* (1997) citaram a tendência de resistência microbiana dessas leveduras patogênicas frente aos azólicos de uso frequente, fluconazol e itraconazol, tornando preocupante a administração futura desses quimioterápicos e formulando inferências para pesquisa de novos fármacos para esse fim.

Com relação aos demais azólicos (itraconazol, miconazol e cetoconazol), a tabela 4 mostra que duas linhagens (1 e 6), apresentaram sensibilidade ao Itraconazol e resistência aos demais fármacos; a maioria das linhagens (2, 4, 5 e 7) apresentou sensibilidade moderada e, as linhagens 3, 8 e 9 apresentaram resistência. Para Miconazol apenas as linhagens 1 e 2 apresentaram

**TABELA 6.** Testes de sensibilidade de linhagens clínicas de *Cryptococcus neoformans* pelo método de difusão em discos frente ao Itraconazol, Miconazol e Cetoconazol.

<i>Cryptococcus neoformans</i>	Itraconazol	Miconazol	Cetoconazol
	5mg/mL	10mg/mL	10mg/mL
1	R 15mm	S 26mm	MS 23mm
2	R 15mm	S 27mm	MS 20mm
3	R 8mm	MS 25mm	R 7mm
4	R 12mm	S 28mm	R 18mm
5	R 14mm	MS 23mm	R 16mm
6	R 17mm	S 27mm	R 19mm
7	R 15mm	MS 24mm	R 17mm
8	R 10mm	S 26mm	R 12mm
9	R 6mm	R 15mm	R 8mm
ATCC 32608	R 7mm	MS 22mm	R 17mm

R – linhagens resistentes; MS – linhagens com sensibilidade moderada e S – linhagens sensíveis; quando se compara com o CLSI (2009).

sensibilidade, 4, 5, 6, 7 e 8 apresentaram sensibilidade moderada. As linhagens 3 e 9 apresentaram resistência.

Com relação ao Cetoconazol apenas a amostra 2 apresentou sensibilidade; e as amostras 5 e 6 tiveram sensibilidade moderada. As linhagens 3, 4, 7, 8 e 9 apresentaram resistência ao Cetoconazol na concentração de 10mg/mL. Utilizou-se o critério restritivo e consistente numa redução dos limites de sensibilidade aplicado para alguns antifúngicos quando se trata isoladamente de micoses sistêmicas severas (SANDVEN et al., 1993).

Estes resultados sugerem avaliações mais detalhadas acerca do perfil de sensibilidade e resistência de linhagens de *Cryptococcus neoformans* isolados de pacientes HIV+ com quadro clínico de meningite. Essa avaliação inclui a verificação da concentração inibitória mínima dos agentes antifúngicos, utilizando-se os padrões sugeridos pelo NCCLS, para então, reavaliar a atividade dos mesmos extratos vegetais em concentrações mais elevadas, uma vez que os extratos n. 2 e 3 foram testados por CRUZ (2002), diante de vários fungos, inclusive linhagens de *C. neoformans* e apresentaram atividade antifúngica significativa. Em seu trabalho, no entanto, o referido autor, testou linhagens de coleção e este pode ser um dos pontos a serem investigados com critério nos próximos ensaios de atividade antimicrobiana de extratos vegetais.

## CONCLUSÃO

Houve ação antifúngica dos extratos brutos aquosos das diversas plantas medicinais popularmente utilizadas no sertão sergipano frente a linhagens clínicas de *Cryptococcus neoformans*.

Há ação antifúngica da infusão da entrecasca de juazeiro (*Ziziphus joazeiro* Mart.), infusão da folha de catingueira (*Caesalpinia pyramidalis* Tul.), decocção da folha de juazeiro (*Ziziphus joazeiro* Mart.), decocção da entrecasca da quixabeira (*Bumelia sartorum* Mart.) e maceração da entrecasca de jatobá (*Hymenaea courbaril* L.) frente à levedura patogênica testada.

Não houve diferença estatística na ação antimicrobiana dos extratos brutos analisados quando se confrontaram as concentrações testadas. Foi verificado que os extratos brutos quando foram submetidos ao tratamento de autoclavagem potencializou a ação antimicótica.

*Cryptococcus neoformans* isolados clínicos oriundos de pacientes acometidos com meningite criptocócica no estado de Sergipe apresentou perfil de sensibilidade frente anfotericina B com característica fenotípica sensível, entretanto para os

azólicos, em baixas concentrações o comportamento de susceptibilidade foi apresentado como resistente.

## REFERÊNCIAS

- ALBUQUERQUE U.P., MEDEIROS P.M., ALMEIDAA.L.S., MONTEIRO J.M., LINS NETO E.M.F., MELO J.G., SANTOS J.P. Medicinal plants of the caatinga (semi-arid) vegetation of NE Brazil: A quantitative approach, **Journal of Ethnopharmacology**, v. 114, p. 325/328, 2007.
- ATAIDE, R. A., OLIVEIRA, R. A. G., ARAÚJO, E. C., VASCONCELOS, E. M. R. Use of remedies produced by women of the family health program. **Rev Enferm UFPE On Line** v. 1, p. 97-103. 2007.
- BAUER, A. W.; KIRBY, W.M.M.; TURLK, M. Antibiotics susceptibility testing by standardized single disk method. **American Journal Clinical Pathology**, v. 45, p. 493-496, 1986.
- BOHME, T., SANDER, A. PFISTER-WARTHA, A. SCOPF, E. Primary coetaneous Cryptococcosis following trauma of the right forearm. **Mycoses**, v. 39, p. 457-459, 1996.
- CLINICAL LABORATORY STANDARD INSTITUTE, CLSI document M44A2 - Metodologia para Testes de Sensibilidade Antifúngica por Disco-Difusão para Leveduras (Method for Antifungal Disk Diffusion Susceptibility Testing of Yeasts) (Substitui o M44-A), Brasília: ANVISA, 2009.
- CLINICAL LABORATORY STANDARD INSTITUTE, CLSI document M44-S3 - Normas interpretativas de zona diâmetro, correspondente MIC breakpoints interpretativos e limites de controle de qualidade dos testes de sensibilidade a antifúngicos difusão do disco de leveduras (Zone Diameter Interpretive Standards, Corresponding MIC Interpretive Breakpoints, and Quality Control Limits for Antifungal Disk Diffusion Susceptibility Testing of Yeasts) (Utilizar com o M44-A2), Brasília, ANVISA, 2009.
- CRUZ, M. C.S., SANTOS, P.O., BARBOSA JUNIOR, A.M., MELO, D.L.F.M., ALVIANO, C.S., ANTONIOLLI, A.R., ALVIANO, D.S., TRINDADE, R.C. Antifungal activity of Brazilian medicinal plants involved in popular treatment of mycoses. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 111, p. 409-412, 2007.
- CUNHA, S. A.; BORTOLOTO, I. M. Etnobotânica de Plantas Medicinais no Assentamento Monjolinho, município de Anastácio, Mato Grosso do Sul, Brasil. **Acta Bot. Bras.** v. 25 n. 3, 2011.
- DUARTE, M.C.T.; FIGUEIRA, G.M.; PEREIRA, B.; MAGALHÃES, P.M.; DELARMELINA, C. Atividade antimicrobiana de extratos hidroalcoólicos de espécies da coleção de planta medicinais CPQBA/ UNICAMP. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.14, supl. 1, p. 6-8, 2004.
- DUARTE M.C.T., FIGUEIRA G.M., SARTORATTO A., REHDER V.L.G., MACHADO A.L.M., DELARMELINA C. Anti-Candida activity of essential oils and extracts from native and exotic medicinal plants used in Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 97, p. 305-311, 2005.
- EDMAN, J. C. Micologia Médica, p.420-443. In: JAWETZ, E.; MELNICK, J.L.; ADELBERG, E.A. **Microbiologia**

- Médica**, 20. ed. Rio de Janeiro: Guanabara – Koogan, 1998. 524p.
- ELLOF, J.N. Which extractant should be used for the screening and isolation of antimicrobial components from plants? **Journal of Ethnopharmacology**. v. 60, p. 1-6, 1998.
- FARNSWORTH, N. R.; SOEJARTO, D.D. Potential consequences of plant extinction in the United States on the current and future availability of prescription drugs. **Economy Botany**. v. 39(3), p. 231-240, 1985.
- FREIXA, B.; ROSER, V.; VARGAS, L.; LOSANO, N.; ADVET, T.; CANIGUERAL, S. Screaming core antifungal activity of nineteen Latin American Plants. **Phytoterapic Research**. v.12, p.427-430, 1998.
- GIL, P.R. 2002. **Wilderness – Earth's cast wild places**. CEMEX, México.
- GIULIETTI, A.M., DU BOCAGE NETA, A.L., CASTRO, A. A.J.F., GAMARRA-ROJAS, C.F.L., SAMPAIO, E.V. S.B., VIRGÍNIO, J.F., QUEIROZ, L.P., FIGUEIREDO, M.A., RODAL, M.J.N., BARBOSA, M.R.V. & HARLEY, R.M. 2004. Diagnóstico da vegetação nativa do bioma Caatinga. In **Biodiversidade da Caatinga: áreas e ações prioritárias para a conservação** (J.M.C. Silva, M. Tabarelli, M.T. Fonseca & L.V. Lins, orgs.). MMA, UFPE, Conservation International do Brasil, Fundação Biodiversitas, Embrapa Semi-Árido, Brasília, p.48-90.
- GOMES, T.B.; BANDEIRA, F. P. S. de. Uso e diversidade de plantas medicinais em uma comunidade quilombola no Raso da Catarina, Bahia. **Acta Bot. Bras.** vol.26 no.4. 2012.
- GOVERNO DO ESTADO DA BAHIA. **Inventário de Plantas Medicinais do Estado da Bahia**, 1ª. ed.,p. 334, 1979.
- LENTZ D.L., CLARK A.M., HUFFORD C.D., MEURER-GRIMES B., PASSREITER C.M., CORDERO J., IBRAHINI O., OKUNADE A.L. Antimicrobial properties of Honduran medicinal plants, **Journal of Ethnopharmacology**. v. 63, p. 253-263, 1998.
- LIMA, R.B. A família Rhamnaceae no Brasil: diversidade e taxonomia. 2000. 292p. **Tese (Doutorado em Botânica)** -Universidade de São Paulo, Instituto de Biociências, São Paulo.
- LORENZI, H., MATOS, F.J.A. 2002. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. Nova Odessa: Plantarum. 512 p.
- MEDEIROS, M.F.T.; FONSECA, V.S.; ANDREATA, R.H.P. 2004. Plantas medicinais e seus usos pelos sítiantes da Reserva Rio das Pedras, Mangaratiba, RJ, Brasil. **Acta Botanica Brasilica** 18(2): 391-399.
- NAVARRO V., VILLARREAL M.L., ROJAS G., XAVIERB L. Antimicrobial evaluation of some plants used in Mexican traditional medicine for the treatment of infectious diseases, **Journal of Ethnopharmacology**. v. 53(3), p. 143-147, 1996.
- MARTÍNEZ M.J., BETANCOURT J., ALONSO-GONZÁLEZ N., JAUREGUI A. Screening of some Cuban medicinal plants for antimicrobial activity, **Journal of Ethnopharmacology**. v. 52(3), p. 171-174, 1996.
- MARTINS, C.H.G., SOUZA, F.R., FONSECA, C., CASEMIRO, L.C., FURTADO, N.A. J. C., AMBROSIO, S.R., CUNHA, W.R., Determinação in vitro da Atividade Antibacteriana dos Extratos Brutos da Casca e Polpa Farinácea de *Hymenaea courbaril* L. **Investigação**. v. 10, P. 37-43, 2010.
- MATOS, A. Aproveitamento de plantas medicinais da Região Nordeste. **Revista Brasileira de Farmacologia**. v. 4, p. 132-140, 1982.
- MURAKAWA, G.J.; KERSCHMANN, R; BERGER, T. Coetaneous *Cryptococcus* infection and SIDA. **Archives of Dermatology**. v.132, p.545-548, 1996.
- OLIVEIRA, R.A.G. de; LIMA, E.O.; VIEIRA, W.L.; FREIRE, K.R.L.; TRAJANO, V.N.; SILVA-FILHO, R.N. Estudo da interferência de óleos essenciais sobre a atividade de alguns antibióticos usados na clínica. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.16, n.1, p. 77-82, 2006.
- PEETERMANS, S.W.; BOBBAERS, H.; VERHAEGEN, J. VANDEPITTE, J. Fluconazole – resistant *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* in an SIDA patient. **Acta Clinical Belgium** v. 48, p. 405-409, 1993.
- PILLA, M.A.C.; AMOROZO, M.C.M. & FURLAN, A. 2006. Obtenção e uso das plantas medicinais no distrito de Martim Francisco, Município de Mogi-Mirim, SP, Brasil. **Acta Botanica Brasilica** 20(4): 789-802.
- PRADO, D.E. 2003. **As Caatingas da América do Sul. In Ecologia e conservação da Caatinga** (I.R. Leal, M. Tabarelli & J.M.C. Silva, eds.). Editora Universitária, UFPE, Recife, p.3-73.
- POWDERLY, W.G.; KEATH, E.J.; SOKOL-ANDERSON, M. Amphotericin B resistant *Cryptococcus neoformans* in patient with SIDA. **Infection Disease Clinical Practice** v. 1, p. 314-316, 1990.
- ROJAS G., LÉVARO J., TORTORIELLO J., NAVARRO V. (2001) Antimicrobial evaluation of certain plants used in Mexican traditional medicine for the treatment of respiratory diseases, **Journal of Ethnopharmacology**. v. 74(1), p. 97-101, 2001.
- SAEED, M. A.; SABIR, A. W.; Antibacterial activity of *Caesalpinia bonducella* seeds. **Fitoterapia**, v. 72, p. 807. 2001.
- SAETHER, O; CRAIK, D.; CAMPBELL, I.; SLETTEN, K.; JUL, J.; NORMAN, D. Elucidation of the Primary and Three-Dimensional Structure of the Uterotonic Polypeptide Kalata B1. **Biochemistry**, v. 34, p. 4147-4158, 1995.
- SANDVEN, P.; BJORNEKLETT, A.; MAELAND, A.; THE NOVERGIAN YEAST STUDY GROUP. *Candida albicans* strains to fluconazole: emergence of resistance. **Antimicrobial Agents Chemotherapy** v. 37, p. 2443-2448, 1993.
- SANFELICE, F. Contributo alla morfologia e biologia dei *blastomiceti* che si *sviluppano* nci succi di alcuni frutti. **Annals Igieneri** v.4, p. 463-495, 1894.
- SANTOS, P.R.V.; OLIVEIRA, A.C.X.; TOMASSINI, T.C.B. Controle microbiológico de produtos fitoterápicos. **Revista Farmacologia Bioquímica**. v. 31, p. 35-38, 1995.
- SARTORATTO A., MACHADO A.L.M., DELARMELINA C., FIGUEIRA G.M., DUARTE M.C.T., REHDER V.L.G. Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. **Brazilian Journal Microbiology**. v. 35, p. 273-280, 2004.
- SCHARDONG, R.M.F. & CERVI, A.C. 2000. Estudos etnobotânicos das plantas de uso medicinal e místico na comunidade de São Benedito, bairro

- São Francisco, Campo Grande, MS, Brasil. **Acta Biológica Paranaense** 29(1/4): 187-217.
- SHADOMY, S. & SPINEL-INGROF, A. Susceptibility testing: with antifungal drugs. In: LENNETTE, E. (Ed.). **Manual of clinical microbiology**. 3.ed. Washington: American Society for Microbiology, 1980. Cap.62, p. 647-653.
- TORRES-RODRIGUEZ, J.M.; HERNADEZ-MOLLINA, J.M.; CARCELLER, A.; MONTSANT, L.; ESTIVILL, D.; TUR, C.; MUNOZ, A.J.C. Resistencia in vitro al fluconazol e itraconazolena islamientos clínicos de *Candida spp.* y *Cryptococcus neoformans*. **Revista Iberoamericana Micologia** v. 14, p. 50-54, 1997.
- VAINSTEIN, M. H.; CASALI, A.K.; LUBECK, I.; COSTA, J.M.; OLIVEIRA, L.T.; ALVES, S. H. In vitro susceptibility to antifungal agents of clinical and environmental *Cryptococcus neoformans* isolated in southern of Brazil. **Revista Instituto Medicina Tropical São Paulo**. v. 43 (5), p. 267-270, 2001.
- VAITSMAN, H. Perigo: **remédios**. *O Globo*: Rio de Janeiro, 20 ago. 1995.
- VERONESI, R., FOCACCIA, R. *Veronesi: Tratado de Infectologia*. v.2. São Paulo: Atheneu, 1996. p. 1756.