



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA E MEDICINA LEGAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS

MARIA ISABEL DE SOUZA SILVA

**MICROPARTÍCULAS DE QUITOSANA E ÓLEO ESSENCIAL DE CÚRCUMA NO
CONTROLE *IN VITRO* DE *Cryptococcus* spp.: ATIVIDADE ANTIFÚNGICA EM
CÉLULAS PLANCTÔNICAS, BIOFILMES E INTERAÇÃO COM ANTIFÚNGICOS**

Fortaleza

2026

MARIA ISABEL DE SOUZA SILVA

MICROPARTÍCULAS DE QUITOSANA E ÓLEO ESSENCIAL DE CÚRCUMA NO
CONTROLE *IN VITRO* DE *Cryptococcus* spp.: ATIVIDADE ANTIFÚNGICA EM
CÉLULAS PLANCTÔNICAS, BIOFILMES E INTERAÇÃO COM ANTIFÚNGICOS

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de mestre em Ciências Médicas. Área de concentração: Patogênese das doenças imunoinflamatórias.

Orientadora: Profa. Dra. Raimunda Sâmia Nogueira Brilhante

Fortaleza

2026

MARIA ISABEL DE SOUZA SILVA

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de mestre em Ciências Médicas. Área de concentração: Patogênese das doenças imunoinflamatórias.

Orientadora: Profa. Dra. Raimunda Sâmia Nogueira Brilhante

Aprovada em:

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Raimunda Sâmia Nogueira Brilhante (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Dr. Hélio Vitoriano Nobre Júnior
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Dr. Luiz Antônio Soares Romeiro
Universidade de Brasília (UnB)



ATA DA SESSÃO DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS

Como parte das exigências para concessão do grau de mestra, às 14:00 horas do dia 24 de Fevereiro de 2026, realizou-se a sessão pública da defesa de dissertação de mestrado da aluna MARIA ISABEL DE SOUZA SILVA. O trabalho tinha como título: "MICROPARTÍCULAS DE QUITOSANA E ÓLEO ESSENCIAL DE CÚRCUMA NO CONTROLE IN VITRO DE *Cryptococcus* spp.: ATIVIDADE ANTIFÚNGICA EM CÉLULAS PLANCTÔNICAS, BIOFILMES E INTERAÇÃO COM ANTIFÚNGICOS".

Compunham a banca examinadora os professores(as) doutores(as) RAIMUNDA SAMIA NOGUEIRA BRILHANTE, orientadora, HELIO VITORIANO NOBRE JUNIOR e LUIZ ANTONIO SOARES ROMEIRO. A candidata expôs oralmente a dissertação, em seguida os membros da banca procederam à arguição, e a sessão foi finalizada com a APROVAÇÃO, por parte da banca examinadora, do trabalho sem ressalvas.

Foi lavrada a presente ata que é abaixo assinada pelos membros da referida banca:

RAIMUNDA SAMIA NOGUEIRA BRILHANTE
UFC - Orientadora

HELIO VITORIANO NOBRE JUNIOR
UFC - Examinador Externo ao Programa

LUIZ ANTONIO SOARES ROMEIRO
UNB - Examinador Externo à Instituição

Fortaleza, 24 de Fevereiro de 2026

À todos que não apenas acompanharam,
mas também construíram o caminho junto comigo.

AGRADECIMENTOS

Inicialmente, gostaria de agradecer a mim pela coragem de mais uma vez enfrentar os medos e receios para alcançar os meus sonhos, possibilitando um futuro melhor e também fortalecendo a mente com sabedoria.

Minha jornada não foi feita apenas por mim, por isso existem incontáveis pessoas que merecem minha gratidão mais profunda. Nem todas eu citarei para não cair no erro de esquecer alguém.

Ao meu namorado, Daniel Matos, a quem por vezes recorri para desabafar, me consolar, me auxiliar, iluminar minha cabeça em busca de soluções e, em especial, vencer o Excel.

A Gleiciane Rocha, técnica do laboratório, que foi meu braço direito na realização dos meus experimentos. Sua vivência auxiliou meu crescimento enquanto cientista.

Aos colegas e amigos do laboratório, em geral. Todos de alguma forma contribuíram como minha formação enquanto cientista e enquanto ser humano, adicionando bagagem à minha jornada.

Aos meus amigos da vida a fora, pelas risadas, pelas aventuras, pelos desejos compartilhados, pelos momentos inesquecíveis.

Ao Victor Crimson, não apenas pelos mais de 10 anos de amizade, mas por me fazer enxergar meu potencial e não me deixar ser tão pessimista.

À Profa. Dra. Raimunda Sâmia Nogueira Brilhante, pela confiança no meu trabalho e acompanhamento na minha trajetória acadêmica desde a graduação.

À Universidade Federal do Ceará por ser minha casa de longa permanência e que sempre será um refúgio para mim.

Ao OneHmic Lab, pelo aparato necessário para a realização desse projeto.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ), à Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (CAPES) e à Fundação Cearense de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FUNCAP) pelo fomento investido em cada espaço desta e de outras pesquisas.

“One door isn't enough
A million doors aren't enough”
- Patti Smith

RESUMO

As espécies do complexo *Cryptococcus neoformans/Cryptococcus gattii* são leveduras encapsuladas responsáveis pela criptococose, uma micose oportunista que acomete principalmente indivíduos imunocomprometidos. A presença de fatores de virulência, como a cápsula polissacarídica e a capacidade de formação de biofilmes, contribui para a persistência do microrganismo e para a redução da eficácia dos antifúngicos convencionais, o que reforça a necessidade de novas estratégias terapêuticas. Nesse contexto, este estudo avaliou a atividade antifúngica de micropartículas de quitosana associadas ao óleo essencial de cúrcuma contra células planctônicas e biofilmes maduros desse complexo, além da interação com antifúngicos clássicos e do perfil de citotoxicidade da formulação. Testes de sensibilidade planctônica e de biofilmes maduros foram realizados seguindo protocolos padronizados, utilizando cristal violeta para quantificação da biomassa e MTT para avaliação da atividade metabólica. A interação farmacológica foi investigada pelo método *checkerboard* com anfotericina B e fluconazol, enquanto a citotoxicidade foi determinada por ensaios de viabilidade celular em cultura de células. Considerou-se significância estatística de $P < 0,05$ para a análise dos resultados obtidos. Os resultados indicaram concentrações inibitórias mínimas entre 4-256 $\mu\text{g/mL}$ para 50% de inibição e 256-1024 $\mu\text{g/mL}$ para 100% de inibição nas células planctônicas. Em biofilmes maduros, a formulação reduziu até 33% da biomassa e 42% da atividade metabólica na concentração de 256 $\mu\text{g/mL}$, maior concentração testada. Nos testes de interação farmacológica, observou-se perfil indiferente na associação com os antifúngicos clássicos, sem evidência de antagonismo. Nos ensaios de citotoxicidade, a concentração de 400 $\mu\text{g/mL}$ reduziu aproximadamente 75% da viabilidade celular. Em conjunto, os resultados demonstram que micropartículas de quitosana carregadas com óleo essencial de cúrcuma apresentam atividade antifúngica *in vitro* contra células planctônicas e biofilmes maduros do complexo *Cryptococcus neoformans/Cryptococcus gattii*, embora a necessidade de concentrações mais elevadas e a limitação citotóxica indiquem a necessidade de estudos adicionais para otimização da formulação e melhor compreensão de sua aplicabilidade biomédica.

Palavras-chave: criptococose; leveduras; produtos naturais; citotoxicidade; encapsulamento.

ABSTRACT

Species of the *Cryptococcus neoformans/Cryptococcus gattii* complex are encapsulated yeasts responsible for cryptococcosis, an opportunistic mycosis that primarily affects immunocompromised individuals. Virulence factors such as the polysaccharide capsule and the ability to form biofilms contribute to microbial persistence and reduce the effectiveness of conventional antifungal therapies, highlighting the need for new therapeutic strategies. In this context, the present study evaluated the in vitro antifungal activity of chitosan microparticles loaded with turmeric essential oil against planktonic cells and mature biofilms of the *C. neoformans/C. gattii* complex, as well as their interaction with conventional antifungal agents and the cytotoxicity profile of the formulation. Planktonic susceptibility and mature biofilm assays were performed following standardized protocols. Biofilm biomass was quantified using crystal violet staining, while metabolic activity was assessed by the MTT assay. Drug interaction was evaluated using the checkerboard method with amphotericin B and fluconazole. Cytotoxicity was determined through cell viability assays in cultured cells. Statistical significance was established at $P < 0.05$. Minimum inhibitory concentrations ranged from 4–256 $\mu\text{g/mL}$ for 50% inhibition and 256–1024 $\mu\text{g/mL}$ for 100% inhibition in planktonic cells. In mature biofilms, the formulation reduced biomass by up to 33% and metabolic activity by up to 42% at 256 $\mu\text{g/mL}$, the highest concentration tested. Drug interaction assays demonstrated an indifferent profile in combination with conventional antifungals, with no evidence of antagonism. In cytotoxicity assays, a concentration of 400 $\mu\text{g/mL}$ reduced cell viability by approximately 75%. Overall, chitosan microparticles loaded with turmeric essential oil exhibited in vitro antifungal activity against planktonic cells and mature biofilms of the *C. neoformans/C. gattii* complex. However, the requirement for relatively high concentrations and the observed cytotoxicity highlight the need for further studies to optimize the formulation and better assess its potential biomedical applications.

Keywords: cryptococcosis; yeasts; natural products; cytotoxicity; encapsulation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Esquema de contágio pelo gênero <i>Cryptococcus</i> spp.	23
Figura 2 - Aspectos morfológicos do gênero <i>Cryptococcus</i> spp.	25
Figura 3 - Cultivo melanizado de <i>Cryptococcus</i> spp. em Ágar Niger	26
Figura 4 - Atividade antifúngica contra biofilmes maduros, <i>in vitro</i> , das micropartículas com o óleo essencial de cúrcuma, do óleo essencial de cúrcuma e das micropartículas de quitosana frente a cepas do complexo de <i>Cryptococcus</i> spp.	40
Figura 5 - Quadros de interação farmacológica entre MPCEO e antifúngicos clássicos. ..	41
Figura 6 - Gráfico de viabilidade celular do MPCEO.	43

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Atividade antifúngica planctônica, <i>in vitro</i> , das micropartículas com o óleo essencial de cúrcuma, do óleo essencial de cúrcuma, das micropartículas de quitosana, anfotericina B e fluconazol frente a cepas do complexo de <i>Cryptococcus</i> spp.	37
Tabela 2 - Concentrações de interação farmacológica entre MPCEO e antifúngicos clássicos.	42

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Classificação das espécies do complexo <i>Cryptococcus</i> <i>neoformans/Cryptococcus</i> <i>gattii</i> .	18
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMB	Anfotericina B
CEO	Óleo essencial de cúrcuma
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CrAg	Antígeno Criptocócico
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
FLC	Fluconazol
GalXM	Galactoxilomanana
GXM	Glucuronoxilomanana
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
ICIF	Índice de Concentração Inibitória Fracionado
LFA	Ensaio de Fluxo Lateral
MOPS	Ácido 3-(N-morfolina) propanosulfônico
MP	Micropartículas de Quitosana
MPCEO	Micropartículas de Quitosana com Óleo Essencial de Cúrcuma
MTT	Brometo de 3-4,5-dimetil-tiazol-2-il-2,5-difeniltetrazólio
OMS	Organização Mundial da Saúde
OneHMic	One Health Microbiology Laboratory
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
SNC	Sistema Nervoso Central
UFC	Universidade Federal do Ceará
UV	Ultravioleta

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1 <i>Cryptococcus</i> spp.	18
2.1.1 Aspectos taxonômicos	18
2.1.2 Aspectos ecológicos e epidemiológicos	19
2.1.3 Fatores de virulência	21
2.1.4 Patogenia da criptococose	23
2.1.5 Manifestações clínicas	25
2.1.6 Diagnóstico da criptococose	26
2.1.7 Tratamento farmacológico	27
2.2 COMPOSTOS TESTE	28
2.2.1 Quitosana	28
2.2.2 Óleo essencial de cúrcuma	30
3 HIPÓTESES	32
4 OBJETIVOS	33
4.1 Objetivo geral	33
4.2 Objetivos específicos	33
5 METODOLOGIA	34
5.1 Local de estudo	34
5.2 Microrganismos	34
5.3 Encapsulamento das micropartículas de quitosana	34
5.4 Teste de sensibilidade planctônica	35
5.5 Teste de sensibilidade dos biofilmes maduros	35
5.6 Teste de interação entre drogas clássicas e composto teste - Método <i>Checkerboard</i>	36
5.7 Avaliação da viabilidade celular do composto teste	37
5.8 Análise estatística	37
6 RESULTADOS	38
6.1 Sensibilidade planctônica	38
6.2 Sensibilidade de biofilmes maduros	39
6.3 Teste de interação entre drogas clássicas e composto teste	41
6.4 Avaliação da viabilidade celular do composto teste	43
7 DISCUSSÃO	45

8 CONSIDERAÇÕES FINAIS	53
9 PERSPECTIVAS	54
REFERÊNCIAS	55

1 INTRODUÇÃO

As espécies que integram o complexo *Cryptococcus neoformans/Cryptococcus gattii* são caracterizadas como leveduras encapsuladas responsáveis por causar a criptococose, uma doença fúngica que afeta humanos e também animais (Freitas & Santos, 2021). Essa micose é caracterizada como uma patologia oportunista que acomete principalmente indivíduos imunocomprometidos, como pessoas vivendo com HIV, usuários de medicamentos imunossupressores e transplantados. Nesse contexto, a criptococose apresenta uma elevada importância epidemiológica entre as infecções fúngicas oportunistas, tanto na comunidade científica quanto na população global, sobretudo entre pessoas imunossuprimidas (Montoya *et al.*, 2021; Zhao *et al.*, 2023).

A criptococose é uma micose de distribuição global, associada a elevadas taxas de mortalidade, especialmente quando evolui para manifestações clínicas graves, como a meningite criptocócica (Rathore *et al.*, 2022). A infecção é adquirida a partir do ambiente, principalmente pela inalação de propágulos fúngicos presentes em substratos como madeira em decomposição ou excretas de pombos (Rodrigues *et al.*, 2022). Em decorrência dessa via de transmissão, o trato respiratório constitui a principal porta de entrada do patógeno no hospedeiro (Howard-Jones *et al.*, 2022). Contudo, destaca-se também o marcado neurotropismo dessas leveduras, que favorece a disseminação para o Sistema Nervoso Central (SNC), onde podem causar infecções graves, como a meningite criptocócica (Mohamed *et al.*, 2022).

No que se refere às abordagens terapêuticas atualmente disponíveis para o tratamento da criptococose, observa-se um cenário desafiador, evidenciado por dados da literatura que relatam o aumento da resistência antifúngica aos medicamentos convencionalmente utilizados (Bermas & Geddes-McAllister, 2020). Diante desse contexto, aliado aos efeitos adversos associados às terapias existentes, há uma ampliação na busca por novos fármacos com potencial atividade antifúngica, capazes de atuar de forma promissora na inibição *in vitro* de espécies do gênero *Cryptococcus* (Yier *et al.*, 2021).

O uso das micropartículas de quitosana (MP) com óleos essenciais têm demonstrado atividade antimicrobiana aprimorada, bem como a redução de biofilmes fúngicos, o que certifica o potencial dos sistemas de encapsulamento para possíveis aplicações biomédicas (Garcia *et al.*, 2023). Através da encapsulação de extratos ou óleos essenciais de *Curcuma longa* (CEO) em micropartículas de quitosana certificou-

se uma estratégia eficaz para melhorar a liberação controlada e estabilidade do composto bioativo em sistemas poliméricos (Yupanki *et al.*, 2024).

Embora modelos experimentais recentes descrevam a atividade antifúngica da quitosana contra biofilmes, a aplicação de sistemas microencapsulados com óleos essenciais frente a biofilmes do complexo *Cryptococcus neoformans/Cryptococcus gattii* permanece pouco explorada (Costa *et al.*, 2025). Resultados semelhantes ao estudo de Garcia *et al.*, (2023) também foram descritos em outros fungos, como *Histoplasma capsulatum*, indicando que micropartículas de quitosana carregadas com óleos essenciais podem ampliar a eficácia antibiofilme em fungos de relevância clínica, reforçando o potencial dessa estratégia (Costa *et al.*, 2025). Nesse contexto, a avaliação dessa abordagem contra biofilmes maduros do gênero *Cryptococcus* destaca a originalidade e a contribuição do presente estudo.

Desta forma, este trabalho objetivou avaliar a influência das micropartículas de quitosana carregadas com óleo essencial de cúrcuma (MPCEO) como um composto natural alternativo manifestando ação antifúngica frente às células planctônicas e biofilmes maduros do complexo *Cryptococcus neoformans/Cryptococcus gattii*, bem como avaliar possíveis interações farmacológicas com os tratamentos antifúngicos convencionais e efeitos citotóxicos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 *Cryptococcus* spp.

2.1.1 Aspectos taxonômicos

Em 1894, na Itália, Francesco Sanfelice realizou uma descoberta que marcou o início do conhecimento sobre o gênero *Cryptococcus*, ao isolar um microrganismo até então desconhecido a partir de suco de pêssego (Lima *et al.*, 2023). No mesmo ano, os médicos alemães Otto Busse e Abraham Buschke relataram o isolamento de uma levedura com características semelhantes às descritas por Sanfelice, proveniente de uma lesão tibial em uma paciente jovem com quadro de doença granulomatosa crônica (Julian *et al.*, 2024).

Inicialmente, o microrganismo foi denominado *Saccharomyces neoformans* (Giro, 2021). Posteriormente, em 1901, Jean Paul Vuillemin estabeleceu o gênero *Cryptococcus*, caracterizando-o como um grupo de leveduras encapsuladas, não fermentativas e incapazes de formar ascósporos, características que o distinguem do gênero *Saccharomyces*, no qual havia sido previamente classificado de forma equivocada (Diniz-Lima *et al.*, 2022). Além dessas propriedades, outras características fenotípicas relevantes incluem a capacidade de melanogênese, bem como a produção de enzimas extracelulares, como fosfolipase B e urease, e a habilidade de crescer em temperaturas compatíveis com a temperatura corporal de mamíferos. Esses atributos contribuem para a classificação e para a patogenicidade das espécies pertencentes ao gênero *Cryptococcus* (Do Carmo *et al.*, 2022).

Atualmente, o gênero *Cryptococcus* compreende mais de 70 espécies descritas; entretanto, apenas um número restrito apresenta relevância clínica para seres humanos (Montoya *et al.*, 2021). No contexto da patogenicidade, a comunidade científica reconhece sete espécies pertencentes ao complexo *Cryptococcus neoformans/Cryptococcus gattii* (Quadro 1). Essas espécies estão associadas a quatro sorotipos principais (A, B, C e D) e têm passado por revisões taxonômicas ao longo dos anos. Como exemplo, *Cryptococcus deneoformans* era anteriormente considerado um híbrido de *Cryptococcus neoformans sensu stricto*. Além disso, uma nova espécie foi recentemente proposta dentro do complexo *Cryptococcus gattii*, embora, até o momento, não haja relatos de casos clínicos associados a esse táxon (Francisco *et al.*, 2021; Zhao *et al.*, 2023; Coelho *et al.*, 2025).

Quadro 1. Classificação das espécies do complexo <i>Cryptococcus neoformans/Cryptococcus gattii</i>.					
Complexo	Espécie Formal	Sorotipo	Genótipo (VG)	Nome Proposto (histórico)	AFLP
Complexo <i>Neoformans</i>	<i>Cryptococcus neoformans</i>	A	VNI, VNII, VNBI, VNBII	<i>C. neoformans sensu stricto</i>	AFLP1, AFLP1A, AFLP1B
	<i>Cryptococcus deneoformans</i>	D	VNIV	<i>C. neoformans var. deneoformans</i>	AFLP2
Complexo <i>Gattii</i>	<i>Cryptococcus gattii</i>	B	VGI	<i>C. gattii sensu stricto</i>	AFLP4
	<i>Cryptococcus deuterogattii</i>	B	VGII	<i>C. gattii</i> VGII	AFLP6
	<i>Cryptococcus bacillisporus</i>	B	VGIII	<i>C. gattii</i> VGIIIa	AFLP5
	<i>Cryptococcus decagattii</i>	C	VGVI	<i>C. gattii</i> VGIIIb/VGVI	AFLP10
	<i>Cryptococcus tetragattii</i>	C	VGIV	<i>C. gattii</i> VGIV	AFLP7
	<i>Cryptococcus hyracis</i> sp. nov.	-	VG V	<i>C. hyracis</i> (nome proposto)	AFLP13

Fonte: adaptado do artigo de Coelho *et al.*, 2025.

2.1.2 Aspectos ecológicos e epidemiológicos

Os fungos do gênero *Cryptococcus* são tidos como cosmopolitas, estando distribuídos em todos os continentes, com exceção da Antártida (Coelho *et al.*, 2025). De modo geral, a principal função ecológica das espécies do gênero é a capacidade de degradar matéria orgânica, ou seja, são espécies saprófitas. Tal atribuição no meio ambiente induz o crescimento dessas espécies em madeiras envelhecidas e em excretas de aves, por exemplo (Serna-Espinosa *et al.*, 2021).

Embora sua distribuição seja global, o gênero apresenta padrões distintos de disposição, revelando sua grande plasticidade ecológica e sua capacidade de adaptação a diferentes condições ambientais (Hitchcock & Xu, 2022). Na literatura científica, *C. neoformans* está mais amplamente distribuída, sendo comum em centros urbanos e associado às excretas de pombos, estes sendo considerados vetores de dispersão. Enquanto, *C. gattii* tem sido relacionado com regiões tropicais/subtropicais e em associação com espécies arbóreas, especialmente eucaliptos (De Bastos *et al.*, 2022).

A sobrevivência prolongada do gênero no ambiente se dá pelas adaptações estruturais e fisiológicas. A exemplo da espessa cápsula polissacarídica, da produção de melanina e da capacidade de formação de biofilmes, são fatores que garantem proteção contra estresses abióticos e também desempenham um papel importante na virulência e na persistência em superfícies inertes, como dispositivos hospitalares (Momin & Webb, 2021; Black *et al.*, 2024).

Por ser adquirida através de fontes ambientais, a epidemiologia da doença está diretamente ligada aos aspectos ecológicos. Logo, a distribuição geográfica da doença se correlaciona com a presença do patógeno no ambiente (Edwards *et al.*, 2021). Outra contextualização epidemiológica pertinente da criptococose é o perfil das pessoas infectadas, já que a doença tem maior acometimento em imunocomprometidos, em especial aqueles que vivem com HIV/Aids (Rajasingham *et al.*, 2022).

Segundo Rajasingham *et al.* (2017), há uma estimativa de cerca de 223.100 casos de pessoas sofrendo com meningite criptocócica, uma das principais manifestações clínicas da doença, sendo mais de 181.100 mortes anuais atribuídas aos quadros. Em países subdesenvolvidos a situação se agrava devido aos casos subnotificados, como é o caso do Brasil e Colômbia, se destacando com maiores números em incidências na América Latina (Dos Reis *et al.*, 2022).

No Brasil, a criptococose foi considerada endêmica no Amazonas através de um estudo científico, tendo uma prevalência de casos em pacientes vivendo com HIV/Aids causados pela espécie *Cryptococcus neoformans* (Alves *et al.*, 2022). Entre 2000 e 2012 cerca de 45-60% das pessoas infectadas com criptococose faleceram tendo a meningite como complicação fúngica (Alves Soares *et al.*, 2019).

Estudos realizados no Hospital São José de Doenças Infecciosas em Fortaleza/CE demonstraram que, entre 2021 e 2023, a criptococose representou uma

parcela significativa dos casos de micoses invasivas diagnosticadas, especialmente em pacientes imunocomprometidos com coinfeção por HIV. Ademais, a meningoencefalite criptocócica foi a forma clínica mais comum entre os casos confirmados, com mortalidade observada em aproximadamente 23% dos pacientes acompanhados (Júnior *et al.*, 2024).

Até o presente momento a criptococose ainda não é de notificação obrigatória, embora em 2022 a OMS tenha classificado a espécie *C. neoformans* como “prioridade crítica” devido sua alta mortalidade e complicações no diagnóstico/tratamento, enquanto *C. gattii* foi categorizada como “prioridade média” (Alves Soares *et al.*, 2019; WHO, 2022).

2.1.3 Fatores de virulência

No gênero *Cryptococcus* existem, assim como em outros microrganismos patógenos, fatores de virulência que permitem a invasão ao sistema imunológico do hospedeiro, dificultando a resposta imune e intensificando a doença. Esses mecanismos se tornam cruciais para a sobrevivência do fungo no ambiente, adaptação dentro do vetor e para sua disseminação (Al-huthaifi *et al.*, 2024). Assim como em outros oportunistas, os fatores de virulência do gênero são multifatoriais, resultado de interações organizadas entre diversas fontes que atuam desde a colonização inicial até a persistência nos sistemas do hospedeiro (Baker & Casadevall, 2023).

A cápsula polissacarídica é tida, por alguns trabalhos científicos, como o central e mais comum fator de virulência dentre os diversos descritos (Jang *et al.*, 2022). Composta por glucuronoxilomanana (GXM) e galactoxilomanana (GalXM), principais componentes, atua como uma barreira física contra fagocitose, além de interferir na modulação da resposta inflamatória e proteger contra o estresse oxidativo (LaRocque-Freitas *et al.*, 2024). Ademais, o componente GXM contribui para a arquitetura e estabilidade do biofilme, um outro importante fator de virulência, favorecendo a permanência da levedura em superfícies biológicas e abióticas (Qian *et al.*, 2024).

Formar estruturas organizacionais complexas de comunidades microbianas em uma matriz extracelular polimérica, ou seja, produzir biofilme, também é um dos recursos da levedura causadora da criptococose (Mannan *et al.*, 2024). O biofilme criptocócico é composto não apenas de células organizadas, mas também de uma matriz rica em GXM, proteínas e DNA extracelular, conferindo integridade estrutural e

proteção para as células envolvidas (Brandt, Singha & Ene, 2024). Dessa forma, é garantida a adesão e colonização de superfícies, inclusive de materiais médicos, além de ter caráter de resistência contra os tratamentos e de tolerância contra o sistema imune (Melhem *et al.*, 2024).

A formação de biofilme pelo complexo *Cryptococcus neoformans/Cryptococcus gattii* se dá por meio de um processo gradual que inclui a conexão inicial das células, seu agrupamento e a posterior maturação da matriz extracelular (Wang *et al.*, 2024). Assim, o processo de formação inicia-se pela aderência às superfícies bióticas e abióticas, mediada por adesinas e por características físico-químicas da cápsula polissacarídica. Sob condições de estresse, como a limitação de nitrogênio, ocorre a diferenciação em células gigantes, chamadas também de células titãs, as quais apresentam elevada capacidade de adesão e contribuem para o estabelecimento inicial do biofilme (Trevijano-Contador *et al.*, 2018; García-Barbazán *et al.*, 2024).

A maturação do biofilme é, por meio da matriz extracelular polimérica abundante, o principal mecanismo de proteção da comunidade fúngica nesse contexto. Em *Cryptococcus*, essa matriz é composta majoritariamente por GXM, como foi citado, além de α -1,3-glucano, proteínas e DNA extracelular (eDNA). O eDNA, liberado através de lise celular parcial, interage fisicamente com a GXM e contribui para a estabilidade estrutural do biofilme, sendo que sua degradação enzimática provoca desorganização significativa da matriz. Essa estrutura atua como barreira à difusão, reduzindo a penetração de antifúngicos, como a anfotericina B, e a ação de células do sistema imune (Zaragoza, 2019; Kim, Zarnowski & Andes, 2025; Pruitt *et al.*, 2025).

Deste modo, as leveduras passam a apresentar características diferentes das células planctônicas, como maior produção de componentes capsulares e ativação de mecanismos de proteção. Essa complexidade estrutural também facilita a comunicação entre células por meio de sinais químicos, regulando processos como dispersão celular e adaptação metabólica (Santi *et al.*, 2024; Woods *et al.*, 2025).

De outra forma, o SNC induz no gênero *Cryptococcus* a capacidade de produzir melanina devido aos compostos fenólicos presentes no liquor cefalorraquidiano, sendo esse outro mecanismo virulento. Inicialmente, a melanização parece ter evoluído como um mecanismo de proteção ambiental contra a radiação UV, temperaturas extremas e predadores microbianos, apenas posteriormente foi considerada uma estratégia de sobrevivência no hospedeiro (Mattoon, Cordero & Casadevall, 2023). Essa capacidade se dá pela ação da enzima lacase a partir de precursores fenólicos, atuando como um

escudo antioxidante e aumentando a resistência aos ataques imunológicos (Pasrija & Kumari, 2025). Casos de meningite criptocócica e ocorrências mais graves da doença, estão associados a esse fator de virulência (Zaragoza *et al.*, 2019).

O gênero conta também com a aptidão para suportar temperaturas elevadas, conhecida como termotolerância, que possibilita que o microrganismo se estabeleça e colonize o corpo de animais de sangue quente, sendo mais um indicativo de resistência (Andrade-Silva *et al.*, 2023). A produção de enzimas, como Urease e Fosfolipase B, facilitam a invasão tecidual e disseminação no sistema imune, sendo consideradas como estratégias bioquímicas dentro do arsenal de recursos do gênero *Cryptococcus* (Jabbar & Abbas, 2024).

Diante da relevância desses fatores de virulência, especialmente da cápsula polissacarídica e da formação de biofilmes ricos em GXM, que contribuem para a proteção do microrganismo e para a redução da eficácia de antifúngicos convencionais, torna-se pertinente investigar abordagens capazes de interferir nesses mecanismos de virulência. Nesse contexto, a avaliação das micropartículas de quitosana com óleo essencial de cúrcuma serve como uma estratégia promissora para explorar novas possibilidades de controle antifúngico frente às espécies do complexo *Cryptococcus neoformans/Cryptococcus gattii*.

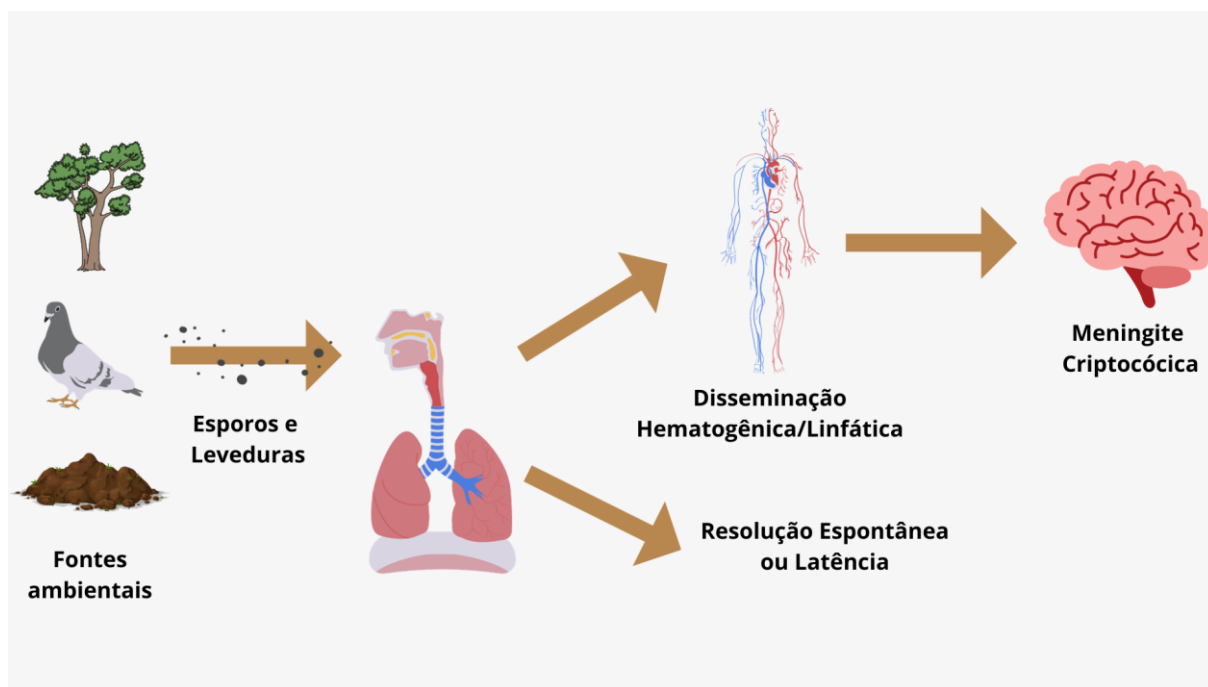
2.1.4 Patogenia da criptococose

Um conjunto de eventos está associado à patogenia do gênero *Cryptococcus*, permitindo que o fungo se estabeleça em seu hospedeiro, desvie das respostas do sistema imune e manifeste diferentes quadros clínicos (Yang *et al.*, 2022). Mesmo sendo um patógeno oportunista e causando, predominantemente, mais infecções em pessoas imunocomprometidas, existem também casos descritos em pessoas imunocompetentes (Cao, 2025).

Conforme ilustrado na Figura 1, o processo se inicia a partir da inalação de células leveduriformes desidratadas presentes no ambiente, sendo a via principal de entrada do fungo no hospedeiro. Esses propágulos fúngicos atingem os alvéolos pulmonares, originando assim, os primeiros focos da infecção (Howard-Jones *et al.*, 2022). Em grande parte dos casos, apenas a resposta imunológica já é suficiente para combater a infecção, resultando em quadros assintomáticos. Contudo, uma condição

latente pode surgir após a prevalência fúngica, com manifestações clínicas mais graves a depender do estado imunológico do indivíduo (Kenosi *et al.*, 2022).

Figura 1. Esquema de contágio pelo gênero *Cryptococcus* spp.



Fonte: autora, adaptado de Lin & Heitman, 2006. Imagem adaptada a partir de um fluxograma.

Legenda: Na Figura 1, está ilustrado o ciclo de infecção da criptococose, cuja principal via de entrada ocorre pela inalação de propágulos fúngicos presentes em fontes ambientais. Uma vez estabelecida a infecção pulmonar, o processo pode seguir diferentes desfechos: em alguns casos, há a disseminação hematogênica, que permite ao fungo alcançar o sistema nervoso central e provocar meningite criptocócica; em outros, a resposta imune do hospedeiro é suficiente para controlar o agente, resultando na resolução do quadro ou na manutenção de uma condição latente.

A partir do foco pulmonar, a infecção começa a se disseminar através da corrente sanguínea, chegando a outros órgãos e tecidos. A disseminação hematogênica está associada ao fato de a levedura sobreviver no interior de fagócitos, facilitando assim o transporte. Embora diversos órgãos possam ser comprometidos pela doença, há a compreensão do tropismo pelo SNC sendo a meningite criptocócica sua manifestação mais grave (Bednarek & Brown, 2024; Zhou *et al.*, 2024).

Para além da proximidade com a região primariamente afetada, o líquido cefalorraquidiano, que fornece proteção imunológica e equilibra a pressão intracraniana, apresenta uma abundância de recursos para o fungo. Portanto, ao adentrar no SNC, a levedura encontra um ambiente propício para se multiplicar,

resultando na inflamação meníngea, aumento da pressão intracraniana e lesões neurológicas graves. Em pacientes imunodeficientes esse estágio da doença está relacionado com alta morbidade e mortalidade (Hu *et al.*, 2022; Perfect & Kronstad, 2025).

2.1.5 Manifestações clínicas

Ao se tratar das manifestações clínicas da criptococose, a infecção pulmonar é a mais comum, uma vez que constitui como a porta de entrada. Caso não seja a forma assintomática, a doença pode se manifestar através de uma síndrome pseudogripal, com o quadro clínico inicial se caracterizando por febre, tosse seca, dor torácica e mal-estar no geral (Perfect & Bicanic, 2023). Em determinados casos, há o desenvolvimento de pneumonia subaguda ou crônica, podendo ser confundida com neoplasias e até mesmo tuberculose, por conta dos achados radiológicos (Cardoso & Carroll, 2024).

Em decorrência da disseminação hematogênica e do tropismo pelo SNC, a neurocriptococose é a forma clínica mais grave e mais predominante em pessoas que vivem com HIV. Dentre os sintomas da meningite criptocócica estão incluídos febre persistente, náuseas, vômitos, cefaleia intensa, alterações visuais e rigidez na nuca. Em imunossuprimidos, a doença tem rápida evolução e está associada a altas taxas de mortalidade (Wang *et al.*, 2022; Zhao *et al.*, 2023).

Outras formas, como a criptococose disseminada, também podem ocorrer, envolvendo pele, ossos e órgãos viscerais. Lesões cutâneas, com aspecto nodular, papuloso ou ulcerado, podem, erroneamente, serem confundidas com dermatites ou neoplasias cutâneas (Zhang *et al.*, 2023). Tanto o acometimento ósseo quanto o acometimento renal são considerados não tão comuns, estando associados com quadros mais avançados da forma sistêmica (Stefani, Gomes & Moya, 2023).

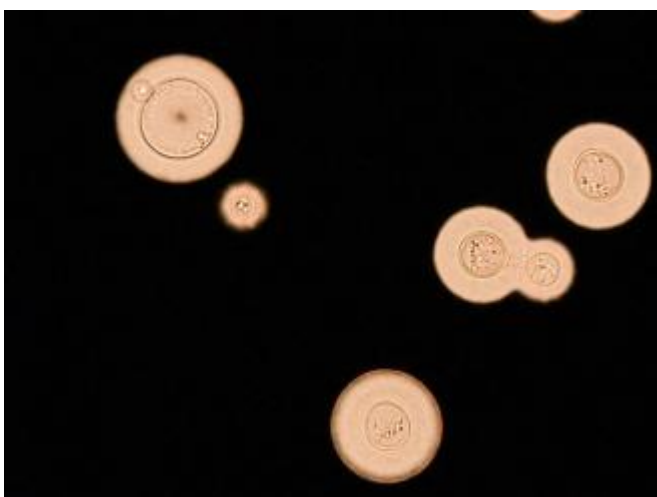
Dentre os fatores de risco para a progressão da criptococose, ressaltam-se a imunossupressão grave, a infecção por HIV em estágios avançados, o uso de corticoides e imunossupressores por longo período, assim como ter se submetido a recentes transplantes (Zhang *et al.*, 2023). No entanto, nos últimos anos há um aumento de registros científicos relatando casos em indivíduos imunocompetentes, reforçando a plasticidade ecológica e adaptativa do fungo (Mani *et al.*, 2023).

2.1.6 Diagnóstico da criptococose

Para pessoas vivendo com HIV/Aids, transplantados e com outros tipos de imunocomprometimentos é de suma importância uma rápida detecção da criptococose a fim de reduzir morbidade e mortalidade. Algumas diretrizes globais recentes recomendam a combinação clínica, teste de antígeno criptocócico (CrAg), cultura e métodos moleculares a depender dos recursos disponíveis (Chang *et al.*, 2024). O padrão ouro no Brasil costuma ser a associação do exame direto com a cultura (BRASIL, 2021).

No exame direto, utilizando a Tinta Nanquim como contracorante no líquido cefalorraquidiano, é possível visualizar a presença da cápsula polissacarídica característica do gênero *Cryptococcus* (Figura 2). Entretanto, essa técnica não deve ser utilizada sozinha devido a sensibilidade da amostra e a possibilidade de baixas cargas fúngicas. Se faz necessária a cultura fúngica para a real confirmação, bem como outros testes podem ser complementares (Damasceno *et al.*, 2022).

Figura 2. Aspectos morfológicos do gênero *Cryptococcus* spp.



Fonte da figura: Ngan, Flower & Day, 2022. **Legenda:** imagem microscópica de leveduras do gênero *Cryptococcus* spp. contra coradas com Tinta Nanquim, evidenciando a cápsula polissacarídica característica do gênero.

O cultivo pode ser realizado em Ágar Sabouraud ou Ágar batata, ademais a utilização de um meio diferencial, no caso o Ágar Níger, evidencia a melanização por meio dos compostos fenólicos, o que auxilia na identificação fenotípica no isolamento primário do gênero (Figura 3). Métodos moleculares, como PCR e sequenciamento de DNA, garantem uma detecção direta em amostras clínicas, além da diferenciação

entre as espécies do complexo (Skipper, Abassi & Boulware, 2019; Lopez Mora *et al.*, 2022).

Figura 3. Cultivo melanizado de *Cryptococcus* spp. em Ágar Niger.



Fonte da figura: acervo pessoal. Legenda: cultura melanizada de *Cryptococcus* spp. semeada em meio Ágar Níger.

Novas diretrizes e revisões recentes priorizam o CrAg LFA (Ensaio de Fluxo Lateral) como teste inicial pela sua alta precisão e resultado rápido. Essa ferramenta é nova e considerada de baixo custo (De Mello Vianna & Mosegui, 2022). A utilização de exames de imagens, como tomografia computadorizada e ressonância magnética, pode ser útil para avaliar comprometimento na região do SNC, podendo aliar-se com o contexto clínico-laboratorial (Anjum *et al.*, 2023).

2.1.7 Tratamento farmacológico

Baseado em eficácia comprovada, o tratamento contra a criptococose inclui três fármacos considerados de primeira linha: anfotericina B, fluconazol e flucitosina (Ngan, Flower & Day, 2022). São agentes farmacológicos que podem ser empregados nas diferentes fases do tratamento, sendo elas: indução, consolidação e manutenção (Chang *et al.*, 2024). Além disso, a terapia possui recomendações a depender do quadro clínico e da condição do sistema imune da pessoa enferma (Wang *et al.*, 2023).

A anfotericina B é tida como o pilar da terapia, sendo amplamente utilizada na formulação desoxicolato, contudo apresenta alta toxicidade nefrológica. Formulações lipossomais têm sido prepostas por revelarem um perfil mais seguro para uso, porém

o custo de produção é alto (Ndyetukira *et al.*, 2024). O fluconazol, de maneira geral, é considerado de baixa toxicidade e amplamente disponível, entretanto seu uso prolongado pode causar o favorecimento de resistência fúngica e apresenta falhas terapêuticas (Sousa *et al.*, 2023).

Por sua vez, a flucitosina tem sido usada de maneira sinérgica junto a anfotericina B, além de contribuir com uma alta taxa de redução do fungo no líquido (Hurt *et al.*, 2021). Apesar desses atributos, seu uso isolado é restrito devido à disponibilidade limitada em muitos países e seus efeitos adversos, como por exemplo hepatotoxicidade e mielotoxicidade (Sigera & Denning, 2023). A otimização desses antifúngicos visa diminuir a carga fúngica inicial, prevenir recaídas e garantir o controle da infecção a longo prazo (Casadevall & Shoham, 2025).

Pessoas vivendo com HIV/Aids, normalmente, são mais afetadas com o tratamento e exigem maior tempo de manutenção, sendo utilizado o fluconazol para essa finalidade (Qureshi *et al.*, 2024). Já os transplantados correm maior risco de recidivas por conta do uso contínuo de imunossupressores, necessitando verificação das interações medicamentosas (Gras *et al.*, 2021). Em pessoas imunocompetentes, embora sejam menos afetadas, a criptococose pode evoluir para a gravidade, exigindo protocolos de terapia semelhantes aos imunossuprimidos (Stack *et al.*, 2023).

2.2 COMPOSTOS TESTE

2.2.1 Quitosana

Diante de um cenário que envolve o aumento da resistência fúngica aos antifúngicos clássicos utilizados no tratamento padrão, bem como os inúmeros efeitos colaterais que o uso desses fármacos ocasiona, se faz necessária a busca por novos compostos que apresentem atividade antifúngica (Yang *et al.*, 2021; Fisher *et al.*, 2022). Produto da desacetilação da quitina, presente em exoesqueletos de crustáceos e insetos, a quitosana é um biopolímero natural e abundante (Iber *et al.*, 2022).

Composta por unidades de glucosamina e N-acetilglucosamina, sua estrutura lhe confere características únicas como solubilidade variável e alta reatividade química (Lingait *et al.*, 2024). Tais características tornam a quitosana um material versátil e amplamente estudado em diferentes áreas, incluindo o campo da biomedicina. Vantagens, como biocompatibilidade, biodegradabilidade e baixa toxicidade, permitem

a utilização segura deste composto em sistemas de formulações antimicrobianas, por exemplo (Chicea & Nicolae-Maranciuc, 2024).

No contexto das doenças infecciosas, a quitosana já possui atividade antimicrobiana reconhecida, atuando contra bactérias e também contra fungos (Yan *et al.*, 2021). A atividade antifúngica se dá pela interação eletrostática entre os grupos amino protonados do polímero e os componentes aniônicos da membrana fúngica (Ke *et al.*, 2021). Essa interatividade causa desestabilização na estrutura, modificando a permeabilidade celular e extravasando os materiais intracelulares, resultando na morte celular (Wrońska *et al.*, 2024).

Quando assimilada a hidrogéis, micropartículas ou até mesmo nanopartículas, a quitosana pode potencializar o efeito de fármacos, permitindo um maior contato com o microrganismo alvo (Poznanski, Hameed & Orcizik, 2023; Zaccaron *et al.*, 2023). Nesse contexto, o uso da quitosana na forma de micropartículas ou nanopartículas ganhou relevância uma vez que sistemas encapsulados apresentam vantagens significativas quando comparados à quitosana em sua forma livre (Gonciarz *et al.*, 2025).

Um outro fator que influencia diretamente a atividade antifúngica e também o desempenho de micro e nanoencapsulados é o peso molecular da quitosana. Segmentos de menor peso molecular tendem a apresentar maior solubilidade e mobilidade, o que favorece a interação com a superfície celular fúngica e contribui para alterações de permeabilidade e inibição do crescimento microbiano. De outra forma, a quitosana de alto peso molecular confere maior estabilidade estrutural às partículas, influenciando a eficiência de encapsulamento e o perfil de liberação de compostos bioativos (Ing *et al.*, 2012; El-Araby *et al.*, 2024).

Dentre as vantagens da microencapsulação cita-se a maior estabilidade do polímero, o aumento da área de contato com as células fúngicas e liberação controlado de compostos bioativos como os óleos essenciais e até mesmo antifúngicos clássicos (Mondéjar-López *et al.*, 2022; Abdelwahed, Pinijsuwan & Tongdeesoontorn, 2025). Trabalhos recentes mostram que micropartículas de quitosana carregadas com substâncias naturais ou fármacos apresentam atividade antifúngica superior, além de potencializar efeitos sinérgicos quando associadas a antifúngicos clássicos, reduzindo concentrações e, conseqüentemente, possíveis efeitos tóxicos (Kolge *et al.*, 2023; Shakib *et al.*, 2025).

Ademais, alguns estudos recentes demonstraram que a combinação entre a quitosana e antifúngicos clássicos, como a anfotericina B e o fluconazol, possuem efeito sinérgico (Costa *et al.*, 2025). Essa interação sinérgica pode significar um aumento da atividade antifúngica, assim como a redução dos efeitos adversos causados pela terapia usual, como citados anteriormente.

2.2.2 Óleo essencial de cúrcuma

Amplamente cultivado em regiões tropicais, o açafrão-da-terra, também chamado de cúrcuma, pertence à família Zingiberaceae e tem como nome científico *Curcuma longa* L (Setzer *et al.*, 2021). O óleo essencial é extraído, principalmente, dos rizomas através da hidrodestilação, apresentando uma composição variável de acordo com a origem e método da extração. Seus principais compostos responsáveis por grande parte de suas atividades biológicas são: ar-turmerona, α -turmerona, β -turmerona e zingibereno (Orellana-Paucar, 2024).

Sendo considerada tradição, a cúrcuma tem sido utilizada na medicina popular asiática no tratamento de processos inflamatórios, distúrbios digestivos e doenças infecciosas (Fuloria *et al.*, 2022). Para além do seu uso cosmético e culinário, alguns estudos farmacológicos modernos constataam que o óleo essencial possui algumas propriedades. Dentre elas, inclui-se atividades antioxidante, anti-inflamatória, imunomoduladora e antimicrobiana, com destaque para o efeito antifúngico (Jantan *et al.*, 2021; Mermazia *et al.*, 2021).

A ação antifúngica do óleo essencial de cúrcuma está associada com a desestabilização da membrana celular fúngica, alterações na permeabilidade e inibição de processos metabólicos (Achimón *et al.*, 2021). Resultados *in vitro* sugerem uma atividade significativa frente a espécies como *Candida* spp., *Aspergillus* spp. e *Trichophyton* spp., além dos possíveis efeitos sinérgicos com tratamentos convencionais (Pino *et al.*, 2018; Sharma *et al.*, 2022; Rahman *et al.*, 2025).

Portanto, essa versatilidade tem estimulado seu uso em diferentes vias biotecnológicas, pretendendo otimizar sua eficácia terapêutica. Por meio de sistemas de liberação controlada, é possibilitado um aumento da estabilidade química, proteção de compostos voláteis e potencialização da ação antifúngica, inclusive sobre biofilmes (Valizadeh *et al.*, 2021; Sindhu *et al.*, 2023). Diante desse contexto, a associação do óleo essencial de cúrcuma com biomateriais, como a quitosana, representa uma

abordagem promissora para o controle do complexo de espécies *Cryptococcus neoformans/Cryptococcus gattii*.

3 HIPÓTESES

- As micropartículas de quitosana e o óleo essencial de cúrcuma, isoladamente e combinados, são capazes de inibir o crescimento planctônico das espécies do complexo *Cryptococcus neoformans/Cryptococcus gattii*.
- As micropartículas de quitosana e o óleo essencial de cúrcuma, isoladamente e combinados, possuem capacidade de inibir o biofilme formado das espécies do complexo *Cryptococcus neoformans/Cryptococcus gattii*.
- As micropartículas de quitosana combinadas ao óleo essencial de cúrcuma possuem potencial de interação sinérgica, juntos aos antifúngicos clássicos anfotericina B e fluconazol, inibindo o crescimento planctônico das espécies do complexo *Cryptococcus neoformans/Cryptococcus gattii*.
- As micropartículas de quitosana contendo óleo essencial de cúrcuma apresentam baixa citotoxicidade *in vitro*, demonstrando potencial para uso seguro em aplicações antifúngicas.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

Avaliar a sensibilidade planctônica, a sensibilidade do biofilme maduro, a existência de interação com antifúngicos clássicos, anfotericina B e fluconazol, e o perfil de citotoxicidade das micropartículas de quitosana combinadas ao óleo essencial de cúrcuma frente às espécies do complexo *Cryptococcus neoformans/Cryptococcus gattii*.

4.2 Objetivos específicos

- Analisar o efeito das micropartículas de quitosana e do óleo essencial de cúrcuma, isoladamente e combinados, em células planctônicas das espécies do complexo *Cryptococcus neoformans/Cryptococcus gattii*.
- Investigar a ação das micropartículas de quitosana e do óleo essencial de cúrcuma, de forma isolada e combinados, em biofilmes formados das espécies do complexo *Cryptococcus neoformans/Cryptococcus gattii*.
- Avaliar a possível sinergia das micropartículas de quitosana encapsuladas ao óleo essencial de cúrcuma com os antifúngicos clássicos, anfotericina B e fluconazol, nas células planctônicas das espécies do complexo *Cryptococcus neoformans/Cryptococcus gattii*.
- Determinar o perfil de citotoxicidade das micropartículas de quitosana contendo óleo essencial de cúrcuma *in vitro*.

5 METODOLOGIA

5.1 Local de estudo

As pesquisas relacionadas a esse trabalho foram realizadas no laboratório *One Health Microbiology Laboratory* (OneHMic Lab), do Departamento de Patologia e Medicina Legal da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará (UFC).

5.2 Microrganismos

Para os experimentos laboratoriais foram utilizadas uma cepa ATCC 90113 de *Cryptococcus neoformans*, sendo essa usada como controle experimental, e outras 11 cepas clínicas de origem humana e animal pertencentes à micoteca do *One Health Microbiology Laboratory* (OneHMic Lab), da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará (UFC). Todas as cepas foram repicadas e cultivadas em meio ágar batata dextrose a 35 °C por 48 horas antes de quaisquer testes realizados.

5.3 Encapsulamento das micropartículas de quitosana

Seguindo a metodologia descrita por Ilk *et al.* (2017), uma solução aquosa de quitosana foi preparada pela dissolução de quitosana (1%, p/v) em água destilada com ácido acético 0,5% (v/v). Em seguida, Tween-80 (1%, p/v) foi dissolvido na solução de quitosana. A lecitina (7,5%, p/v) foi dissolvida na solução de DMSO (10%, v/v). O óleo essencial de cúrcuma em diferentes concentrações foi adicionado à solução de lecitina/DMSO sob agitação magnética. A solução de quitosana (11,5 mL) e o complexo lecitina/óleo foram aquecidos a 60 °C. Em seguida, 1 mL de solução de lecitina/óleo essencial foi injetado gota a gota em solução aquosa de quitosana pré-aquecida a 60 °C sob agitação magnética. Após a agitação, o pH da suspensão das micropartículas foi ajustado para 4,5, obtendo-se micropartículas de quitosana de baixo peso molecular/óleo de cúrcuma. As micropartículas de baixo peso molecular vazias de lecitina/quitosana foram sintetizadas com o método descrito acima usando uma solução de lecitina sem óleo essencial.

5.4 Teste de sensibilidade planctônica

O teste de sensibilidade antifúngica foi realizado utilizando a técnica de microdiluição em caldo, conforme padronizado no documento M27 - 4th pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2017), a fim de avaliar a sensibilidade planctônica dos isolados. Foram utilizadas 12 cepas clínicas de *Cryptococcus neoformans/C. Gattii*, contando com a cepa de referência ATCC 90113 de *Cryptococcus neoformans*, esta última empregada como controle de qualidade. Inicialmente, os isolados foram cultivados em ágar batata dextrose a 35 °C por 48 horas. Posteriormente, foi preparado o inóculo em solução salina estéril (0,9% NaCl), ajustando-se a turbidez à escala 0,5 de McFarland, correspondente a aproximadamente $1,5 \times 10^8$ células/mL. Essa suspensão foi submetida a uma diluição de 1:50 e, em sequência, uma diluição de 1:20 em meio RPMI-1640 (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA), tamponado com 0,165 M de MOPS em pH 7,0. Em placas de poliestireno transparente de 96 poços com fundo em formato U, 100 µL de meio RPMI suplementado com os agentes antifúngicos em diluições seriadas decrescentes e 100 µL do inóculo final. Os antifúngicos drogas clássicos utilizados no tratamento da criptococose, anfotericina B e fluconazol, foram testadas como controle iniciando nas concentrações de 16 e 64 µg/mL, respectivamente. Para as micropartículas de quitosana carregadas com o óleo essencial de cúrcuma, o óleo essencial isolado e as micropartículas de quitosana de baixo peso molecular a concentração inicial para diluição foi de 1024 µg/mL, sendo diluída e chegando ao mínimo de 2 µg/mL. Depois de incubadas a 35 °C por 72 horas, as placas foram submetidas a leitura visual a fim de determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) nos valores de 50% para o fluconazol, 100% para a anfotericina B e 50% e 100% para os três compostos teste.

5.5 Teste de sensibilidade dos biofilmes maduros

O teste de sensibilidade dos biofilmes maduros se baseou no trabalho de Brilhante *et al.*, (2020). Sendo utilizadas 6 cepas ao todo, que se destacaram melhores formadoras de biofilme na experimentação, pertencentes ao complexo de espécies *Cryptococcus neoformans/Cryptococcus gattii*. Foram cultivadas previamente em ágar batata dextrose por 48 horas a 35 °C. Os inóculos foram preparados em meio RPMI-1640 (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA), tamponado com 0,165 M de MOPS em pH 7,0,

sendo ajustados para a turbidez na escala 1,0 McFarland. Alíquotas de 100 µL foram adicionadas a placas de poliestireno 96 poços com fundo chato, para a formação do biofilme. Após 48 h de maturação do biofilme, foram acrescentados os compostos teste em concentrações que variaram de 64-256 µg/mL para MPCEO e 32-128 µg/mL para o CEO e as MP. As concentrações maiores foram determinadas a partir do menor valor de CIM da sensibilidade planctônica para cada composto. Para a anfotericina B a concentração variou de 4-16 µg/mL, enquanto para o fluconazol variou de 16-64 µg/mL. Passadas 48 horas, as placas incubadas a 35 °C foram analisadas, com a inclusão dos biofilmes sem acréscimo de fármacos antifúngicos para servirem de controle de crescimento. A biomassa total do biofilme foi quantificada pelo método de coloração com cristal violeta, com leituras espectrofotométricas a 540 nm. Já a atividade metabólica foi determinada pelo ensaio de redução do MTT (brometo de 3-4,5-dimetil-tiazol-2-il-2,5-difeniltetrazólio), também com leituras espectrofotométricas a 540 nm.

5.6 Teste de interação entre fármacos clássicos e composto teste - Método *Checkerboard*

A interação entre os antifúngicos clássicos (anfotericina B e fluconazol) e o composto teste principal, MPCEO, foi avaliada pelo método de microdiluição em caldo no formato checkerboard, utilizando placas de 96 poços. A escolha das duas cepas do complexo de espécies *Cryptococcus neoformans/Cryptococcus gattii* foi baseada na CIM obtida através da sensibilidade planctônica, de forma que os valores fossem conhecidos tanto para o MPCEO, quanto para os compostos isolados. Os compostos biotivos foram preparados em concentrações seriadas, de modo a gerar combinações bidimensionais (7 linhas × 10 colunas). Para o composto teste (MPCEO), a concentração inicial a ser seriada foi 1024 µg/mL, para a anfotericina B foi 0,0313-2 µg/mL e o fluconazol foi 0,125-8 µg/mL, consoante com as concentrações de MPCEO. Após a adição do inóculo padronizado na escala 0,5 de McFarland e diluições subsequentes em meio RPMI-1640, as placas foram incubadas a 35 °C por 72 horas. Foi realizado o ensaio de redução do MTT, com leituras espectrofotométricas a 540 nm que posteriormente foram analisadas no *software* Combeneft para geração de gráficos e análise dos dados, seguindo as instruções recomendadas por Di Veroli *et al.* (2016). A Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi determinada por inspeção visual, considerando-se tanto os fármacos isolados quanto em combinação. A partir

desses valores, calculou-se o Índice de Concentração Inibitória Fracionada (ICIF), segundo a fórmula proposta por Odds (2003). As interações foram classificadas como sinérgicas ($ICIF \leq 0,5$), indiferentes ($0,5 < ICIF \leq 4$) ou antagônicas ($ICIF > 4$).

5.7 Avaliação da viabilidade celular do composto teste

A citotoxicidade das MPCEO foi avaliada em macrófagos de murinos RAW 264.7 por meio do ensaio de MTT, conforme metodologia descrita por Mosmann (1983). Inicialmente, as células foram semeadas em placas de 96 poços, na densidade de 3×10^5 células/poço, e incubadas por 24 h a 37 °C e 5% de CO₂. Em seguida, foram tratadas com o composto teste nas concentrações de 6,25 a 400 µg/mL, dissolvido em DMSO (0,4% v/v; Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA), por mais 24 h. Após o tratamento, foi adicionado 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenil tetrazólio brometo (MTT; 500 µg/mL; Sigma-Aldrich) a cada poço, seguido de incubação por 4 h a 37 °C. Posteriormente, o meio contendo MTT foi removido e os cristais de formazan formados foram dissolvidos com DMSO. A absorbância foi lida em 570 nm em leitor de microplacas (Asys UVM 340, Biochrom, EUA). Três experimentos independentes foram realizados em triplicata.

5.8 Análise estatística

Inicialmente as duplicatas foram transformadas em médias. As absorbâncias foram testadas para normalidade por intermédio do teste de Kolmogorov-Smirnov, para todos os tratamentos analisados. As comparações das absorbâncias médias foram realizadas por intermédio do teste t-Student para amostras pareadas. O nível de significância máximo adotado para as conclusões foi de 5%. Para a análise da interação farmacológica entre os compostos testados foi utilizado o software Combenefit, no modelo de Loewe.

6 RESULTADOS

6.1 Sensibilidade planctônica

Na Tabela 1 estão explanados os resultados da atividade das MPCEO, do óleo essencial de cúrcuma isolado, das micropartículas de quitosana vazias em células planctônicas do complexo *Cryptococcus neoformans/Cryptococcus gattii*. Fora tabelada a Concentração Inibitória Mínima (CIM) referente às leituras de 50% de inibição e 100% de inibição para as cepas utilizadas.

Tabela 1. Atividade antifúngica planctônica, *in vitro*, das micropartículas com o óleo essencial de cúrcuma, do óleo essencial de cúrcuma, das micropartículas de quitosana, anfotericina B e fluconazol frente a cepas do complexo de *Cryptococcus* spp.

CEPAS	MPCEO		CEO		MP		AMB (µg/mL)	FLC (µg/mL)
	CIM (µg/mL)		CIM (µg/mL)		CIM (µg/mL)			
	50%	100%	50%	100%	50%	100%		
ONEHMIC 03-1-001	32	512	32	256	32	128	4	4
ONEHMIC 03-1-002	16	256	4	128	64	256	1	2
ONEHMIC 03-1-004	64	512	64	1024	64	512	4	2
ONEHMIC 03-1-003	128	>1024	32	512	128	512	2	8
ONEHMIC 03-1-005	32	512	64	1024	32	256	2	4
ONEHMIC 03-1-006	16	256	16	1024	32	128	2	1
ONEHMIC 03-1-009	256	>1024	16	1024	512	>1024	1	8
ONEHMIC 03-1-010	4	512	8	256	16	>1024	4	2
ONEHMIC 03-3-011	32	512	32	1024	256	>1024	4	2
ONEHMIC 03-1-012	64	512	8	1024	128	>1024	2	16
ONEHMIC 03-1-007	256	1024	128	1024	256	>1024	4	8
ONEHMIC 03-1-008	64	1024	128	512	1024	>1024	4	8

*CIM: Concentração inibitória mínima; CEO: óleo essencial de cúrcuma; MP: micropartículas de baixo peso molecular; MPCEO: micropartículas de quitosana com óleo essencial de cúrcuma; AMB: anfotericina B; FLC: fluconazol, OneHMic: One Health Microbiology Laboratory..

Para o óleo essencial de cúrcuma encapsulado pelas micropartículas de quitosana, as concentrações foram de 4-256 µg/mL para 50% de inibição e 256-1024 µg/mL para 100% de inibição. Já para o óleo essencial de cúrcuma, as concentrações variaram de 4-128 µg/mL relativa à inibição de 50%, enquanto para a inibição de 100% as concentrações foram de 128-1024 µg/mL. Por fim, para as micropartículas de quitosana vazias, as concentrações foram de 16-1024 µg/mL para 50% de inibição, ao passo que variou de 128-512 µg/mL para 100% de inibição.

No que diz respeito à combinação entre as micropartículas e o óleo essencial de cúrcuma, apenas duas das cepas utilizadas demandam concentração maior que 1024 µg/mL para 100% de inibição. No uso isolado do óleo essencial de cúrcuma, todas as cepas tiveram uma CIM encontrada, diferente das micropartículas de quitosana vazias e das micropartículas combinadas ao óleo essencial de cúrcuma. Com relação às micropartículas de quitosana vazias, seis das cepas utilizadas requerem uma concentração maior que 1024 µg/mL para inibição de 100%.

Para os antifúngicos clássicos, anfotericina B e fluconazol, utilizados como controle do experimento, as concentrações variaram de 1-4 µg/mL para 100% de inibição e 1-16 µg/mL para 50% de inibição, respectivamente.

6.2 Sensibilidade de biofilmes maduros

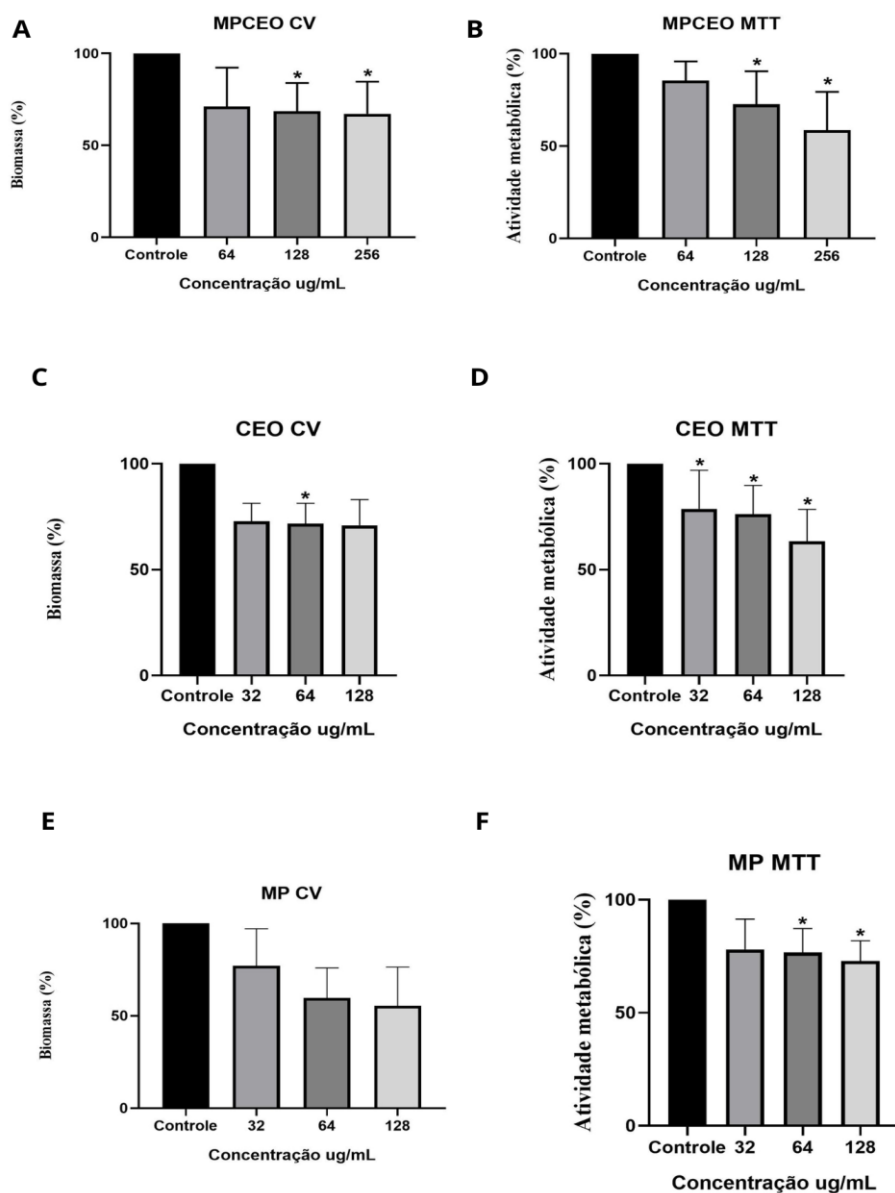
Para a realização da sensibilidade dos biofilmes maduros foram selecionadas apenas 6 cepas. Testou-se as MPCEO, as MP e também o CEO na forma livre. As concentrações testadas foram de 64-256 µg/mL para o composto principal (MPCEO) e de 32-128 µg/mL para as micropartículas de quitosana (MP) e para o óleo essencial de cúrcuma (CEO) isolados, com representações gráficas dos resultados (Figura 4).

Na comparação entre os biofilmes maduros verificados através da leitura do ensaio de cristal violeta, para quantificar a biomassa, foi possível verificar que as micropartículas de quitosana combinadas ao óleo essencial de cúrcuma foram capazes de inibir em até 29, 32 e 33% nas concentrações de 64 µg/mL, 128 µg/mL e 256 µg/mL, respectivamente. Contudo, apenas as concentrações de 128 µg/mL ($p = 0,0052$) e 256 µg/mL ($p = 0,0094$) apresentaram reduções estatisticamente

significativas. Para o uso do óleo essencial de cúrcuma observou-se a redução de até 30% na biomassa para as concentrações de 32 µg/mL, 64 µg/mL e 128 µg/mL, não havendo muitas diferenças percentuais entre as concentrações testadas. No entanto, as concentrações de 32 µg/mL ($p = 0,1389$) e 128 µg/mL ($p = 0,0891$) não apresentaram diferença estatística significativa em relação ao controle, enquanto a concentração de 64 µg/mL foi significativamente menor estatisticamente ($p = 0,0080$). Por outro lado, as micropartículas de quitosana mostraram redução de até 23, 41 e 45% nas concentrações de 32 µg/mL, 64 µg/mL e 128 µg/mL, respectivamente, na biomassa do complexo de espécies *Cryptococcus neoformans/Cryptococcus gattii*.

Na comparação entre os biofilmes maduros avaliados na leitura do ensaio de MTT, foi possível observar que, as micropartículas de quitosana combinadas ao óleo essencial de cúrcuma (MPCEO) foram capazes de reduzir 15, 28 e 42% da atividade metabólica para as concentrações de 64 µg/mL, 128 µg/mL e 256 µg/mL, respectivamente. Dentre as concentrações testadas, 64 µg/mL ($p = 0,2345$) não apresentou diferença estatística significativa em relação ao controle. Na utilização do óleo essencial de cúrcuma (CEO) observou-se redução de 22, 24 e 37% na atividade metabólica para as concentrações de 32 µg/mL, 64 µg/mL e 128 µg/mL, respectivamente. Todas as concentrações de CEO testadas apresentaram significância estatística inferior quando comparadas ao controle ($p < 0,0085$). Por fim, as MP mostraram-se capazes de inibir 22, 24 e 28%. Dessa forma, a concentração de 32 µg/mL apresentou discretamente uma redução na atividade metabólica do biofilme maduro em relação ao controle, embora sem significância estatística ($p = 0,0527$). Já as concentrações de 64 µg/mL ($p = 0,0247$) e 128 µg/mL ($p = 0,0081$) resultaram em valores significativamente menores que o controle, indicando redução na atividade metabólica do biofilme maduro do complexo de espécies *Cryptococcus neoformans/Cryptococcus gattii*.

Figura 4. Atividade antifúngica contra biofilmes maduros, *in vitro*, das micropartículas com o óleo essencial de cúrcuma, do óleo essencial de cúrcuma e das micropartículas de quitosana frente a cepas do complexo de *Cryptococcus* spp.

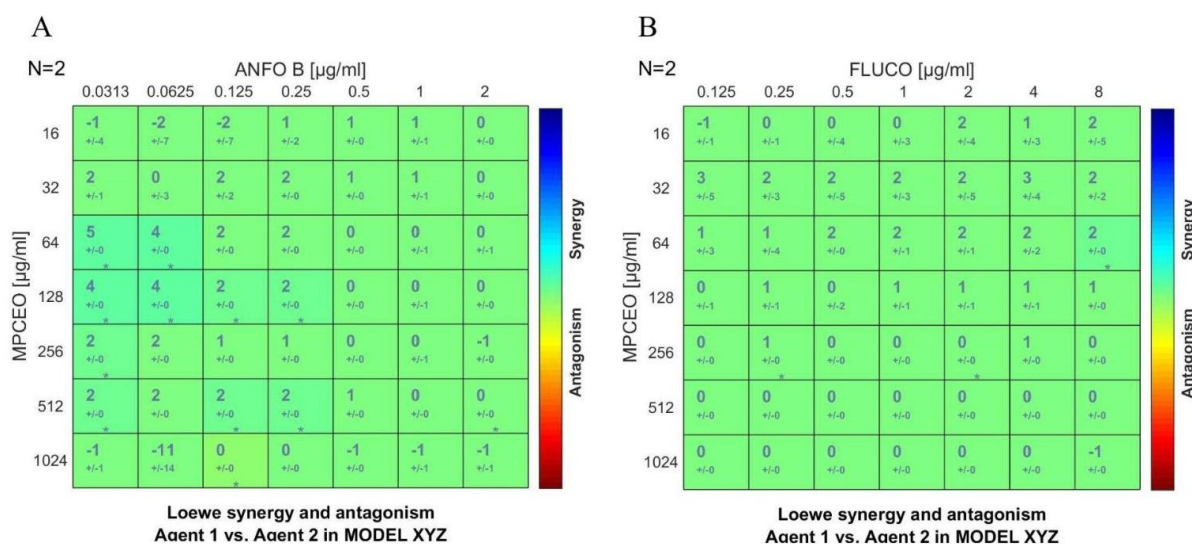


Fonte: autora. Atividade metabólica e biomassa de biofilmes do complexo *C. neoformans/ C. gattii* expostos a diferentes concentrações das micropartículas com o óleo essencial de cúrcuma, do óleo essencial de cúrcuma e das micropartículas de quitosana. A, C e E: Biomassa do biofilme maduro exposto aos compostos. B, D e F: Atividade metabólica do biofilme maduro exposto aos compostos. *: diferenças estatísticas $P < 0,05$ em relação ao controle livre de compostos teste.

6.3 Teste de interação entre fármacos clássicos e composto teste

Utilizando o software CombeneFit, foram gerados dois gráficos seguindo o modelo Loewe. Ao observar a figura 5, no que tange à interação entre as antifúngicos clássicos testados, anfotericina B e fluconazol, e as MPCEO, pode-se concluir que são indiferentes entre elas. Ou seja, não há atividade sinérgica nem antagônica entre a anfotericina B e MPCEO, bem como entre Fluconazol e MPCEO.

Figura 5. Quadros de interação farmacológica entre MPCEO e antifúngicos clássicos.



Legenda: Na Figura 5A é demonstrada a interação entre anfotericina B e MPCEO nas concentrações 0.0313-2 µg/mL e 16-1024 µg/mL, respectivamente. Na Figura 5B é demonstrada a interação entre fluconazol e MPCEO nas concentrações 0.125-8 µg/mL e 16-1024 µg/mL, respectivamente. Nas duas situações foram utilizadas duas cepas do gênero *Cryptococcus* spp. A coloração verde predominante indica indiferença, quando comparada ao espectro do lado direito dos quadros.

Além do uso do CombeneFit, foi empregada também a fórmula utilizada por Odds (2003) para encontrar o valor do Índice de Concentração Inibitória Fracionada. Foram testadas os medicamentos clássicos isolados, o composto principal isolado, assim como as combinações respectivas. A leitura da anfotericina B e MPCEO foi realizada para encontrar 100% de inibição no crescimento das células fúngicas. Já para a combinação entre fluconazol e MPCEO a leitura buscou encontrar 50% de inibição nas células fúngicas.

Após a obtenção das concentrações individuais de cada composto testado, bem como das suas combinações, os valores foram dispostos na fórmula e os valores de ICIF foram determinados. O resultado (Tabela 2) ressalta que não houve interação

entre os compostos, não existindo antagonismo nem sinergismo, sendo apenas combinações indiferentes. Seriam determinadas como sinérgicas se $ICIF \leq 0,5$ ou antagônicas se $ICIF > 4$, contudo são consideradas indiferentes pois $0,5 < ICIF \leq 4$.

Tabela 2. Concentrações de interação farmacológica entre MPCEO e antifúngicos clássicos.

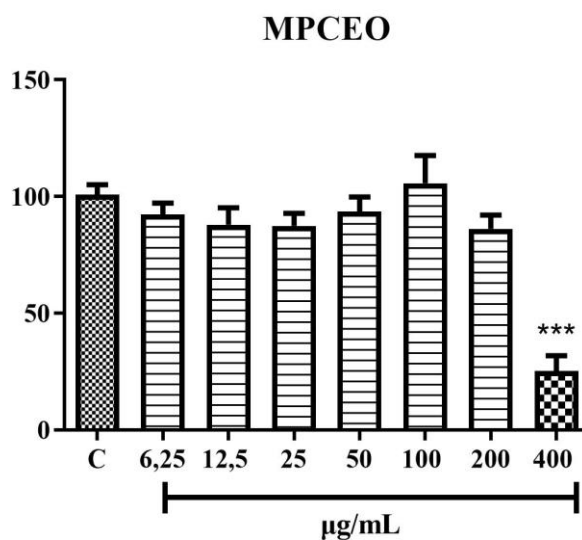
CEPAS	TESTE ANFO B				TESTE FLUCO			
	MPCEO	ANFO B	MPCEO + ANFO B	ICIF	MPCEO	FLUCO	MPCEO + FLUCO	ICIF
ONEHMIC 03-1-001	1024 µg/mL	2 µg/mL	16-1 µg/mL	0,51	64 µg/mL	4 µg/mL	32-2 µg/mL	1
ONEHMIC 03-1-007	1024 µg/mL	0,5 µg/mL	16-0,25 µg/mL	0,51	128 µg/mL	16 µg/mL	64-2 µg/mL	0,62
				INDIF				INDIF

Legenda: a tabela exhibe as concentrações inibitórias mínimas da interação farmacológica entre o composto principal e dos antifúngicos clássicos, anfotericina B e fluconazol. Os fármacos foram testados isolados e também combinados, resultando na indiferença entre si. O ICIF (Índice de Concentração Inibitória Fracionada) foi verificado aplicando as concentrações determinadas na fórmula proposta por Odds (2003).

6.4 Avaliação da viabilidade celular do composto teste

Para a avaliação da viabilidade celular, as MPCEO foram testadas em concentrações de 6,25-400 µg/mL. Foi observada uma redução significativa ($p < 0,001$) da viabilidade celular na maior concentração testada, 400 µg/mL, reduzindo os macrófagos de murino testados em 74,89% quando comparados ao controle. Enquanto nas outras concentrações testadas a viabilidade celular se manteve próxima de 100%, sem grandes diferenças significativas quando comparadas ao controle não tratado e também entre si, apresentando baixa toxicidade e boa biocompatibilidade. Portanto, demonstrou-se através dos resultados que MPCEO reduz a viabilidade celular, tornando-se citotóxico, a partir de 400 µg/mL. (Figura 6).

Figura 6. Gráfico de viabilidade celular de MPCEO.



Legenda: o gráfico mostra a viabilidade celular das concentrações testadas e comparadas ao controle (células sem o composto adicionado). Todas as concentrações, com exceção de 400 µg/mL, apresentaram viabilidade celular quando comparadas ao controle. Enquanto a maior concentração testada, reduziu cerca de 75% da viabilidade celular quando comparada ao controle.

7 DISCUSSÃO

Levando em consideração os múltiplos fatores de virulência do gênero *Cryptococcus*, em especial a produção de biofilme, abordada neste trabalho, conclui-se que o tratamento conta com desafios para o combate desse gênero (Al-Huthaifi *et al.*, 2024; Casadevall *et al.*, 2025). Mesmo com o uso do tratamento reconhecido como padrão ouro, adversidades como efeitos colaterais e a resistência fúngica motivam a comunidade científica a recorrer em busca de novos fármacos viáveis contra a criptococose (Iyer *et al.*, 2021; Sousa *et al.*, 2023; Qureshi *et al.*, 2024).

A partir dessas novas buscas farmacêuticas, a versatilidade da quitosana tornou-se difundida, sendo reconhecida como um polímero biodegradável, atóxico e biocompatível com membranas celulares, possibilitando uma série de aplicações biomédicas a serem testadas contra espécies fúngicas (Yadav, Malviya & Kaushik, 2024). Alguns estudos já revelaram os mecanismos de ação da quitosana, destacando as interações eletrostáticas entre os grupos amino protonados e os componentes com carga negativa presentes nas superfícies celulares (Martinez *et al.*, 2010; Posnanski, Hameed & Orczyk, 2023).

O peso molecular da quitosana também está correlacionado com sua capacidade de interação com as membranas celulares. Posnanski *et al.* (2023), destaca também que a quitosana de baixo peso molecular pode ter mais influência dentro dos processos celulares, uma vez que seu tamanho e baixo potencial zeta favorecem uma melhor inserção nas células. Uma possibilidade é que a quitosana exerça sua ação por meio da permeabilização da membrana plasmática, resultando no aumento da produção intracelular de espécies reativas de oxigênio, o que pode culminar na morte celular (Torrez-Rodriguez *et al.*, 2025).

Inicialmente, foi avaliada a sensibilidade de células planctônicas do complexo *Cryptococcus neoformans/Cryptococcus gattii* frente às micropartículas de quitosana carregadas com óleo essencial de cúrcuma. A formulação foi testada contra as células planctônicas, apresentando resultados satisfatórios quando comparada às formulações avaliadas isoladamente. Entre as 12 cepas analisadas, 10 apresentaram concentrações mínimas inibitórias (CIM), na leitura de 100% de inibição, variando entre 256 e 1024 µg/mL. Por outro lado, duas cepas requereram concentrações superiores a 1024 µg/mL do composto para alcançar 100% de inibição do crescimento de células fúngicas planctônicas.

A exigência de concentrações superiores a 1024 µg/mL para duas das cepas evidencia a heterogeneidade biológica do complexo *Cryptococcus neoformans/Cryptococcus gattii*, refletindo variações intrínsecas de suscetibilidade antifúngica. Estudos recentes indicam que diferenças fenotípicas e mecanismos adaptativos, incluindo variações na cápsula polissacarídica e na organização da parede celular, podem modificar a interação com agentes antifúngicos e impactar os valores de concentração inibitória mínima. Esse comportamento reforça a importância de avaliar múltiplas cepas na investigação de novas formulações antifúngicas, considerando a diversidade biológica da levedura (Lahiri & Chandrashekar, 2022; Taha *et al.*, 2024).

Quando se trata do uso do óleo essencial de cúrcuma no complexo de espécies *Cryptococcus neoformans/Cryptococcus gattii*, notou-se que todas as cepas utilizadas foram inibidas na leitura de 100%, com a maioria das cepas atingindo a maior concentração testada, 1024 µg/mL. Esse padrão é coeso com outros achados na literatura de que óleos essenciais exibem propriedades antifúngicas, porém frequentemente implicam altas concentrações para atingir inibição completa em células planctônicas, isso explica-se devido à sua baixa solubilidade em meios aquosos, volatilidade dos componentes e limitação na penetração celular (Hu *et al.*, 2017; Leiva-Mora *et al.*, 2025).

O efeito dose-dependente observado para o óleo essencial de cúrcuma contra o complexo *Cryptococcus neoformans/Cryptococcus gattii* está de acordo com a literatura. Yanti *et al.* (2021) demonstraram que, no gênero *Aspergillus*, baixas concentrações apenas retardaram o crescimento fúngico, enquanto doses mais altas promoveram inibição significativa. Esse resultado indica que a atividade antifúngica do óleo é progressiva e requer concentrações elevadas para ação eficiente, o que justifica os achados do presente estudo e reforça a relevância de estratégias que potencializem sua eficácia.

Os resultados das MP isoladas demonstraram que houve inibição de 100% na leitura visual de metade das cepas testadas, com concentrações variando de 128-512 µg/mL, enquanto a outra metade não atingiu inibição com a maior concentração testada, abrangendo concentrações maiores que 1024 µg/mL. No trabalho de Garcia *et al.* (2021) as micropartículas de quitosana de baixo peso molecular são utilizadas contra a espécie *Candida albicans*, que apesar de se tratar de outro microrganismo, também é uma levedura. Dentre as cepas testadas no trabalho citado, a maioria obteve

inibição na concentração de 512 µg/mL e nenhuma ultrapassou essa concentração, levantando um contraste entre os gêneros. Essa diferença de concentrações poderia ser justificada pela presença da cápsula polissacarídica no *Cryptococcus* spp, tornando o gênero menos suscetível às formulações testadas.

Em relação aos biofilmes maduros, a combinação de micropartículas de quitosana com óleo essencial de cúrcuma apresentou efeito antifúngico intermediário em relação aos compostos isolados. Apenas as concentrações mais altas reduziram significativamente a atividade metabólica e a biomassa dos biofilmes, com inibição de até 42% no ensaio de MTT e 33% no cristal violeta. O óleo essencial isolado também demonstrou ação contra biofilmes maduros, reduzindo significativamente a atividade metabólica em todas as concentrações, enquanto a diminuição da biomassa foi mais discreta e estatisticamente relevante apenas na maior concentração. Esses achados sugerem que o óleo atua prioritariamente sobre a atividade metabólica dos biofilmes, com impacto estrutural mais limitado nas condições testadas.

Alguns trabalhos científicos sobre a atividade antibiofilme de óleos essenciais indicam que esses compostos possuem mecanismos de ação diversificados, como a interferência na integridade da membrana celular e na sinalização metabólica das células fúngicas dentro do biofilme, mas apresentam capacidade limitada de degradar a matriz estrutural dos biofilmes maduros, especialmente em concentrações baixas. Essa diferença explicaria por que ensaios de viabilidade metabólica podem revelar reduções significativas, enquanto ensaios de biomassa total mostram respostas menos relevantes (El-Tarabily *et al.*, 2021; Touati *et al.*, 2025).

No que tange o uso das MP observou-se redução na atividade metabólica significativa a partir da concentração 64 µg/mL, representando um comportamento dose-dependente, que resultou em até 28% de redução para a maior concentração testada. De outra forma, no ensaio de cristal violeta, que quantifica a biomassa total, revelou-se uma redução de até 45% para a maior concentração testada. Essa notável diferença percentual pode sugerir que as MP, mesmo afetando o metabolismo celular nas concentrações a partir de 64 µg/mL testadas nesse experimento, comprometem mais a integridade do biofilme maduro, causando perdas relevantes nas células aderidas.

Portanto, a limitação da ação do composto frente aos biofilmes pode ser atribuída a características estruturais do complexo *Cryptococcus neoformans/Cryptococcus gattii* que favorecem maior tolerância antifúngica. A cápsula polissacarídica rica em

GXM e a matriz extracelular do biofilme funcionam como barreiras físicas e químicas, reduzindo a eficácia dos agentes (Martinez & Casadevall, 2006; Al-Huthaifi *et al.*, 2024). Embora concentrações mais altas pudessem teoricamente aumentar a ação antifúngica, sua aplicação é limitada pela citotoxicidade do composto, o que impõe um equilíbrio entre eficácia, explicando a resposta restrita observada nos biofilmes.

A utilização da quitosana contra biofilmes do gênero *Cryptococcus* já é relatada ao longo dos anos, como demonstrado por Martinez *et al.* (2010), que evidenciaram danos desse composto em biofilmes de *Cryptococcus neoformans*. Mesmo sendo um estudo antigo, esses achados reforçam a consistência das pesquisas com a quitosana, cuja versatilidade serve de motivação para investigações mais recentes em formulações estratégicas. Esse efeito é atribuído à natureza catiônica do polímero, que interage com componentes da parede celular e da matriz do biofilme, promovendo desorganização estrutural e comprometimento metabólico, em concordância com os resultados observados neste estudo (Ganan *et al.*, 2021; Brilhante *et al.*, 2023).

Evidências recentes indicam que a incorporação de compostos bioativos em sistemas de quitosana pode resultar em valores elevados de CIM para células planctônicas, sem provocar perda de atividade antifúngica. Giammarino *et al.* (2025) observaram que nanopartículas de quitosana associadas a floroglucinol ou curcumina apresentaram CIM superiores em relação às suas formas livres, sugerindo que o encapsulamento modula a disponibilidade do composto e sua interação com a célula fúngica. Esse comportamento acompanha os achados do presente estudo, indicando que a formulação favorece estabilidade e liberação gradual, o que pode explicar a necessidade de concentrações mais altas para inibição planctônica.

Vale ressaltar que o compilado de estudos citados acima utilizam a quitosana em nanopartículas, resultando em concentrações mais baixas e maiores inibições, enquanto o atual estudo utiliza a formulação em micropartículas. Nanopartículas podem ter melhor permeabilidade nas membranas celulares em comparação com micropartículas. Em especial no gênero *Cryptococcus*, nanopartículas possivelmente atuam melhor para atravessar a cápsula polissacarídica da levedura, isso deve ser considerado em futuros experimentos envolvendo partículas e o gênero aqui estudado.

A combinação de nanopartículas de quitosana encapsulando óleo essencial de cúrcuma com efeito antimicrobiano foi abordada no estudo de Sindhu *et al.* (2023). Nesse estudo comprovou-se completa inibição de crescimento *in vitro* do fungo *Fusarium graminearum*, bem como de espécies de bactérias que afetam plantações,

demonstrando que as nanopartículas com o óleo essencial de cúrcuma seriam uma opção de conservante alimentício, afastando-se do contexto clínico. Ainda assim, a principal finalidade do estudo é constatar que a técnica de encapsulação é uma abordagem prática pois evita a degradação do óleo em ambientes adversos e aumenta a sua estabilidade.

Embora a interação farmacológica não tenha sido classificada como sinérgica, a combinação entre as micropartículas de quitosana carregadas com óleo essencial de cúrcuma e os antifúngicos clássicos promoveu reduções nas concentrações necessárias para inibição das cepas, evidenciando um efeito farmacológico favorável e, sobretudo, a ausência de antagonismo entre os compostos. Esse comportamento pode ser atribuído à atuação simultânea dos agentes na membrana celular, envolvendo permeabilização, interferência na síntese de ergosterol e interações da quitosana com a superfície fúngica, resultando em efeito complementar capaz de justificar a redução observada nas concentrações (De Azevedo *et al.*, 2024).

Mesmo com o efeito da anfotericina B, que é capaz de causar poros nas membranas celulares causando o extravasamento do material intracelular, e a ação do fluconazol, que inibe a síntese do ergosterol alterando a permeabilidade da membrana celular, as micropartículas de quitosana com o óleo essencial de cúrcuma não foram capazes de ter resultado sinérgico com as drogas clássicas utilizadas (Susan *et al.* 2025). Lo *et al.* (2020) demonstrou em seu trabalho que a interação entre quitosana e anfotericina B foi indiferente contra as espécies de leveduras *Candida albicans* e *Candida parapsilosis*, justificando isso por meio de inibição competitiva na membrana fúngica.

Ainda no estudo anterior citado, a ação da quitosana junto ao fluconazol foi sinérgica frente às mesmas espécies, indicando uma controvérsia com o presente estudo. Isso pode se dar pela diferença entre os microrganismos fúngicos investigados e pela utilização do óleo essencial de cúrcuma incorporado às micropartículas de quitosana. Dessa forma, cabem mais investigações sobre a composição do óleo e de seus componentes isoladamente a fim de entender melhor sobre as interações com outros compostos.

No estudo de Rocha *et al.* (2021), a curcumina, principal composto bioativo da cúrcuma, demonstrou efeito fungicida contra *Paracoccidioides* spp. e interação sinérgica com antifúngicos clássicos, anfotericina B e itraconazol. Diferentemente disso, óleos essenciais são misturas complexas, nas quais os diversos componentes

podem interferir entre si, influenciando a disponibilidade e a ação do composto ativo. Assim, a maior atividade combinada observada no estudo citado com a curcumina isolada pode refletir uma ação mais direcionada e menos sujeita à interferência química dos outros componentes presentes no óleo essencial.

Não há ainda trabalhos publicados sobre o óleo essencial de cúrcuma no gênero *Cryptococcus*, ainda sim o óleo já é objeto de estudos contra fungos há anos, mesmo que os mecanismos de ação sejam pouco elucidados, com destaque para sua dependência de concentração (Albaqami *et al.*, 2022). De maneira geral, os óleos essenciais parecem afetar a integridade da membrana, reduzir os níveis de ergosterol, inibir a formação da parede celular e da expressão gênica (Silva-Beltran *et al.*, 2023). Por outro lado, seu uso vantajoso para a ciência como um antifúngico também pode ser restrito, dado ao seu efeito citotóxico e sua alta volatilidade, demandando formulações estratégicas para sua aplicação biomédica (Bunse *et al.*, 2022).

Ao realizar a avaliação dos níveis de citotoxicidade do composto principal, MPCEO, em cultura de células, notou-se que concentrações na faixa de aproximadamente 6,25-200 µg/mL são seguras para os testes realizados, tendo poucas variações na viabilidade celular entre si. Entretanto, com a inibição de quase 75% das células da cultura na maior concentração testada, constatou-se que apenas concentrações abaixo de 400 µg/mL seriam seguras para possíveis futuros testes *in vivo*. A redução da viabilidade do composto teste pode estar relacionada ao óleo essencial, em virtude da sua característica de toxicidade abordada no parágrafo anterior.

A avaliação citotóxica revelou uma faixa de concentração que pode ser considerada segura para a formulação, evidenciando o comportamento dose-dependente dos compostos bioativos. A redução da viabilidade celular em concentrações mais elevadas é condizente com a natureza lipofílica dos constituintes do óleo essencial, que podem interagir com membranas celulares e induzir alterações de permeabilidade. Esse efeito é descrito na literatura como um limite farmacológico esperado para óleos essenciais (Russo *et al.*, 2015; Abdalla *et al.*, 2025).

Evidências experimentais reforçam que a atividade antifúngica de compostos derivados de *Curcuma longa* contra *Cryptococcus neoformans* é dependente da concentração. Costa *et al.* (2025) demonstraram que a curcumina, utilizada como pré-tratamento associado à terapia, aumentou a sensibilidade fúngica, exercendo efeito protetor frente ao estresse oxidativo em baixas concentrações e, em doses mais

elevadas, promoveu alterações epigenéticas que comprometeram a viabilidade celular. Esse comportamento dose-dependente dialoga com os achados do presente estudo e sustenta a citotoxicidade desses compostos, reforçando a relevância do encapsulamento como estratégia para otimizar sua ação antifúngica.

Outros estudos *in vitro* relatam que extratos de *Curcuma longa* e curcuminoides podem apresentar citotoxicidade dependente de concentração e do tipo celular, o que é compatível com a redução de viabilidade observada em concentrações elevadas no presente trabalho (Afzali *et al.*, 2021; Kuchta-Gładysz *et al.*, 2025) Essas literaturas indicam que esses compostos tendem a impactar mais intensamente células expostas a altas doses, enquanto concentrações menores mantêm perfil mais seguro. Nesse contexto, o encapsulamento em micro e nanopartículas de quitosana surge como estratégia relevante para modular a liberação do composto, com intuito de reduzir efeitos citotóxicos e ampliar a janela terapêutica.

Os resultados dos biofilmes maduros aliados a avaliação da viabilidade celular realizada no composto principal reforçam a hipótese que as micropartículas de quitosana, quando associadas ao óleo essencial de cúrcuma, podem atenuar a citotoxicidade do óleo, dada a técnica do encapsulamento e possibilidade de uma liberação controlada. As análises confirmam um comportamento antifúngico gradativo, tendo reduções significativas apenas entre as concentrações mais elevadas. Dessa maneira, a combinação parece oferecer uma possibilidade de equilíbrio entre a atividade bioativa e a segurança ao expor células, cenário desejado e já relatado na literatura para formulações aplicadas no contexto biomédico (Zhu, Morkos & Liu, 2026).

Ademais, a atividade antifúngica observada nas micropartículas de quitosana contendo óleo essencial de cúrcuma pode estar relacionada à natureza química de seus constituintes bioativos. Enquanto os curcuminóides correspondem a compostos fenólicos com propriedades antioxidantes e antimicrobianas, o óleo essencial é composto predominantemente por cetonas, como as turmeronas, que apresentam atividade biológica associada à alteração da permeabilidade de membranas e à interferência em processos metabólicos microbianos (Anoosha *et al.*, 2025; Yu *et al.*, 2025).

Para além disso, a presença de grupos amina livres na quitosana pode favorecer interações químicas com compostos carbonílicos presentes no óleo essencial, uma vez que cetonas podem reagir com aminas formando iminas, estruturas

potencialmente tóxicas (Hussain & Berry, 2024; Çelikçi, Nuran & Ziba, 2025). No contexto de biofilmes fúngicos, esse processo pode ser intensificado pelo microambiente da matriz extracelular, frequentemente caracterizado por gradientes de pH levemente ácido (Massey, Zarnowski & Andes, 2023; Wu *et al.*, 2025). Sendo assim, a associação entre quitosana e óleo essencial de cúrcuma pode promover não apenas interações físico-químicas com a superfície celular, mas também possíveis reações entre grupos funcionais, contribuindo para o aumento do estresse celular e para a redução da viabilidade fúngica observada neste estudo.

O uso apenas de métodos colorimétricos para avaliar os biofilmes representa uma limitação no presente estudo, pois esses testes indicam de forma indireta a atividade celular e a quantidade de biomassa, sem mostrar como o biofilme está organizado ou quais células permanecem viáveis. Por isso, o uso de técnicas complementares, como diferentes tipos de microscopia, podem auxiliar na visualização mais detalhada da estrutura do biofilme e dos efeitos das formulações testadas, permitindo uma análise mais completa dos resultados.

Entretanto, embora haja limitação no uso de compostos com óleo essencial em altas concentrações, sendo possível apenas concentrações mais baixas para o uso *in vivo*, há também uma outra possibilidade para esse composto. O trabalho de Silva-Beltrán *et al.* (2023) apontou ainda a hipótese do uso de nanopartículas de óleos essenciais como potenciais desinfetantes antifúngicos ambientais, visto que há poucos estudos neste âmbito. Por se mostrarem de baixo custo e ambientalmente favoráveis, os compostos naturais serviriam como conservantes alimentares, pesticidas verdes, bem como agentes terapêuticos em menores dosagens.

8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

À luz das considerações discutidas, este estudo demonstrou que micropartículas de quitosana carregadas com óleo essencial de cúrcuma apresentam atividade antifúngica contra cepas do complexo *Cryptococcus neoformans/Cryptococcus gattii*, tanto em células planctônicas quanto em biofilmes maduros, evidenciando um potencial investigativo da formulação. Observou-se que concentrações elevadas foram necessárias para a inibição fúngica, sendo essa aplicação limitada pela citotoxicidade associada ao óleo essencial. Além disso, o desempenho do composto não evidenciou vantagens expressivas em relação ao uso isolado dos seus componentes, as micropartículas de quitosana de baixo peso molecular e o óleo essencial de cúrcuma. Nos testes de interação farmacológica com anfotericina B e fluconazol, a formulação apresentou comportamento indiferente, sem indícios de sinergia ou antagonismo. A viabilidade celular restrita a faixas de menor concentração reforça a necessidade de cautela na interpretação dos resultados, assim como pela busca de formulações ainda mais estáveis, bem como testar outras cepas e outras linhagens celulares. Assim, os achados devem ser compreendidos como evidências preliminares obtidas em modelo *in vitro*, que contribuem para a investigação de estratégias antifúngicas alternativas, mas que ainda demandam estudos complementares para melhor elucidação de sua aplicabilidade na biomedicina.

9 PERSPECTIVAS

- Aprofundar a investigação dos mecanismos de ação do óleo essencial de cúrcuma em células fúngicas, visando identificar alvos celulares e vias envolvidas na atividade antifúngica.
- Realizar estudos de otimização e caracterização físico-química das micropartículas, buscando maior estabilidade da formulação e redução da citotoxicidade.
- Comparar o desempenho de micropartículas e nanopartículas de quitosana, a fim de avaliar estratégias de liberação e eficácia antifúngica.
- Expandir a avaliação do composto para modelos experimentais mais complexos, incluindo estudos *in vivo*, para melhor estimativa de segurança e potencial terapêutico.

REFERÊNCIAS

ABDALLA, Mohga S. *et al.* Broad-spectrum bioactivities and therapeutic potential of essential oils of certain aromatic and medicinal plants and their combination. **Scientific Reports**, v. 15, n. 1, p. 32463, 2025.

ABDELWAHED, Ahmed A.; PINIJSUWAN, Suttiporn; TONGDEESOONTORN, Wirongrong. Clove essential oil-loaded chitosan nanoparticles: Development, characterization and antifungal activity. **Microbial Biosystems**, v. 10, n. 2, 2025.

ACHIMÓN, Fernanda *et al.* Chemical composition and antifungal properties of commercial essential oils against the maize phytopathogenic fungus *Fusarium verticillioides*. **Revista argentina de microbiología**, v. 53, n. 4, p. 21-30, 2021.

AFZALI, Elham *et al.* Cytotoxicity effects of curcumin loaded on chitosan alginate nanospheres on the KMBC-10 spheroids cell line. **International Journal of Nanomedicine**, p. 579-589, 2021.

ANDRADE-SILVA, Leonardo Eurípedes *et al.* Genotyping Analysis of *Cryptococcus deuteroformans* and Correlation with Virulence Factors and Antifungal Susceptibility by the Clinical and Laboratory Standards Institute and the European Committee on Antifungal Susceptibility Testing Methods. **Journal of Fungi**, v. 9, n. 9, p. 889, 2023.

ANJUM, Seher H. *et al.* Neuroimaging of cryptococcal meningitis in patients without human immunodeficiency virus: data from a multi-center cohort study. **Journal of Fungi**, v. 9, n. 5, p. 594, 2023.

ANOOSHA, Anoosha; PRABHU K, Prabhu K; CS, Janaki; KAVIMANI, Kavimani; M, Shresht; ANNAND, Suhani. Molecular Docking-Based Insights Into The Antifungal Potential Of Turmerone: Mechanistic Evaluation Of Fungal Enzyme Inhibition. **Journal of Neonatal Surgery**, Lahore, Pakistan, v. 14, n. 6, p. 232–238, 2025.

ALBAQAMI, Jawaher J. *et al.* Chemical composition and biological activities of the leaf essential oils of *Curcuma longa*, *Curcuma aromatica* and *Curcuma angustifolia*. **Antibiotics**, v. 11, n. 11, p. 1547, 2022.

AL-HUTHAIFI, Ammar Mutahar *et al.* Mechanisms and virulence factors of *Cryptococcus neoformans* dissemination to the central nervous system. **Journal of Fungi**, v. 10, n. 8, p. 586, 2024

ALVES SOARES, Emmanuel *et al.* Mortality by cryptococcosis in Brazil from 2000 to 2012: A descriptive epidemiological study. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 13, n. 7, p. e0007569, 2019.

ALVES, Marla Jalene *et al.* Cryptococcosis in HIV/AIDS patients in northern Brazil: Clinical aspects, molecular types and isolation of agents from environmental samples associated with patients. **Tropical Medicine & International Health**, v. 27, n. 4, p. 387-396, 2022.

BAKER, Rosanna P.; CASADEVALL, Arturo. Reciprocal modulation of ammonia and melanin production has implications for cryptococcal virulence. **Nature communications**, v. 14, n. 1, p. 849, 2023.

BEDNAREK, Joseph M.; BROWN, Jessica CS. Elements of dissemination in cryptococcosis. **mBio**, v. 15, n. 12, p. e02155-23, 2024.

BERMAS, Arianne; GEDDES-MCALISTER, Jennifer. Combatting the evolution of antifungal resistance in *Cryptococcus neoformans*. **Molecular microbiology**, v. 114, n. 5, p. 721-734, 2020.

BLACK, Braydon *et al.* Glutathione-mediated redox regulation in *Cryptococcus neoformans* impacts virulence. **Nature microbiology**, v. 9, n. 8, p. 2084-2098, 2024.

BRANDT, Philipp; SINGHA, Rima; ENE, Iuliana V. Hidden allies: how extracellular vesicles drive biofilm formation, stress adaptation, and host-immune interactions in human fungal pathogens. **MBio**, v. 15, n. 12, p. e03045-23, 2024.

BRASIL. *SUS ganha novo teste para diagnóstico de meningite criptocócica*. **Comissão Nacional de Incorporação de Tecnologias no SUS (CONITEC)**, 17 jun. 2021. Disponível em: <https://www.gov.br/conitec/pt-br/assuntos/noticias/2021/junho/sus-ganha-novo-teste-para-diagnostico-de-meningite-criptococica>.

BRILHANTE, R. S. N. *et al.* Antifungal activity of promethazine and chlorpromazine against planktonic cells and biofilms of *Cryptococcus neoformans*/*Cryptococcus gattii* complex species. **Medical Mycology**, v. 58, n. 7, p. 906-912, 2020.

BUNSE, Marek *et al.* Essential oils as multicomponent mixtures and their potential for human health and well-being. **Frontiers in Pharmacology**, v. 13, p. 956541, 2022.

ÇELİKÇİ, Nuran; ZIBA, Cengiz Ayhan; TÜMER, Mehmet. Chitosan-based schiff base compounds: synthesis, chemical characterization and antibacterial properties.

Journal of Fluorescence, v. 35, n. 10, p. 10063-10073, 2025.

CARDOSO, Kylee; CARROLL, Lisa. Pulmonary Cryptococcosis: A Diagnostic and Management Challenge Case Report. **Cureus**, v. 16, n. 4, 2024.

CASADEVALL, Arturo. Pathogenicity and virulence of *Cryptococcus neoformans* from an environmental perspective. **Virulence**, v. 16, n. 1, p. 2547090, 2025.

CASADEVALL, Arturo; SHOHAM, Shmuel. Cryptococcosis: update on therapeutics and new targets. **Current opinion in infectious diseases**, p. 10.1097, 2025.

CAO, Chengjun. The emerging fungal pathogen *Cryptococcus gattii*: Epidemiology, pathogenesis, immunomodulatory attributes, and drug susceptibility. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 19, n. 7, p. e0013245, 2025.

CHANG, Christina C. *et al.* Global guideline for the diagnosis and management of cryptococcosis: an initiative of the ECMM and ISHAM in cooperation with the ASM. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 24, n. 8, p. e495-e512, 2024.

CHICEA, Dan; NICOLAE-MARANCIUC, Alexandra. A review of chitosan-based materials for biomedical, food, and water treatment applications. **Materials**, v. 17, n. 23, p. 5770, 2024.

COELHO, Marco A. *et al.* Decoding *Cryptococcus*: From African biodiversity to worldwide prevalence. **Plos Pathogens**, v. 21, n. 2, p. e1012876, 2025.

COELHO, Marco A. *et al.* Genomic and phenotypic insights into the expanding phylogenetic landscape of the *Cryptococcus* genus. **bioRxiv**, p. 2025.06. 18.660340, 2025.

COSTA, Adelaide Fernandes *et al.* Chitosan nanoparticles encapsulating farnesol show potent antifungal activity against *Candida albicans* biofilms. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 56, n. 2, p. 905-912, 2025.

COSTA, Anderson da Cunha *et al.* In vitro study of essential oils encapsulated in chitosan microparticles against *Histoplasma capsulatum* and their pathogenicity in *Caenorhabditis elegans*. **Biofouling**, v. 41, n. 2, p. 181-196, 2025.

COSTA, Fabiana Chagas *et al.* Effect of Curcumin Pretreatment on the Susceptibility of *Cryptococcus neoformans* to Photodynamic Therapy Mediated by Aluminum Phthalocyanine in Nanoemulsion. **Pharmaceuticals**, v. 18, n. 2, p. 240, 2025.

DAMASCENO, Lisandra Serra *et al.* PERFORMANCE DA TINTA DA CHINA NO LÍQUOR DE PACIENTES INTERNADOS COM MENINGITE CRIPTOCÓCICA, NO PERÍODO DE 2010 A 2018. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 26, p. 102223, 2022.

DE AZEVEDO, Mayara Itala Geronimo *et al.* Chitosan and chitooligosaccharides: antifungal potential and structural insights. **Chemistry & Biodiversity**, v. 21, n. 6, p. e202400044, 2024.

DE BASTOS, Angélica Lima *et al.* Aspectos clínicos e epidemiológicos da criptococose associada e não associada à infecção pelo HIV na região Centro-Oeste do Brasil. **Revista Brasileira de Desenvolvimento**, v. 8, não. 3, pág. 18214-18230, 2022.

DE MELLO VIANNA, Cid Manso; MOSEGUI, Gabriela Bittencourt Gonzalez. Cost-effectiveness analysis of the implementation of Cryptococcal Antigen lateral flow assay for the diagnosis of Cryptococcal Meningitis in symptomatic people living with

human immunodeficiency virus in Brazil. **Value in Health Regional Issues**, v. 29, p. 53-59, 2022.

DINIZ-LIMA, Israel *et al.* *Cryptococcus*: history, epidemiology and immune evasion. **Applied Sciences**, v. 12, n. 14, p. 7086, 2022.

DI VEROLI, G. Y. *et al.* Combenefit: an interactive platform for the analysis and visualization of drug combinations. *Bioinformatics*, v. 32, n. 18, p. 2866-2868, 2016

DO CARMO, Fabíolla Nascimento *et al.* *Cryptococcus* spp. and Cryptococcosis: focusing on the infection in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 53, n. 3, p. 1321-1337, 2022.

DOS REIS, Danielle Saraiva Tuma *et al.* Cryptococcosis: identification of risk areas in the Brazilian amazon. **Microorganisms**, v. 10, n. 7, p. 1411, 2022.

EDWARDS, Hannah M. *et al.* The need for environmental surveillance to understand the ecology, epidemiology and impact of *Cryptococcus* infection in Africa. **FEMS microbiology ecology**, v. 97, n. 7, p. fiab093, 2021.

EL-ARABY, Abir *et al.* Chitosan, chitosan derivatives, and chitosan-based nanocomposites: eco-friendly materials for advanced applications (a review). **Frontiers in Chemistry**, v. 11, p. 1327426, 2024.

EL-TARABILY, Khaled A. *et al.* Using essential oils to overcome bacterial biofilm formation and their antimicrobial resistance. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 28, n. 9, p. 5145-5156, 2021.

FISHER, Matthew C. *et al.* Tackling the emerging threat of antifungal resistance to human health. **Nature reviews microbiology**, v. 20, n. 9, p. 557-571, 2022.

FRANCISCO, Elaine Cristina; DE JONG, Auke W.; HAGEN, Ferry. Cryptococcosis and *cryptococcus*. **Mycopathologia**, v. 186, n. 5, p. 729-731, 2021.

FREITAS, Gustavo JC; SANTOS, Daniel A. *Cryptococcus gattii* polysaccharide capsule: An insight on fungal-host interactions and vaccine studies. **European Journal of Immunology**, v. 51, n. 9, p. 2206-2209, 2021.

FULORIA, Shivkanya *et al.* A comprehensive review on the therapeutic potential of *Curcuma longa* Linn. in relation to its major active constituent curcumin. **Frontiers in Pharmacology**, v. 13, p. 820806, 2022.

GANAN, Monica *et al.* Synergistic antifungal activity of chito-oligosaccharides and commercial antifungals on biofilms of clinical candida isolates. **Journal of Fungi**, v. 7, n. 9, p. 718, 2021.

GARCIA, Lana Glerieide Silva *et al.* Essential oils encapsulated in chitosan microparticles against *Candida albicans* biofilms. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 166, p. 621-632, 2021.

GARCÍA-BARBAZÁN, Irene *et al.* Accumulation of endogenous free radicals is required to induce titan-like cell formation in *Cryptococcus neoformans*. **MBio**, v. 15, n. 1, p. e02549-23, 2024.

GIRO, A. Review on *Cryptococcus* disease. **J. Trop Dis**, v. 9, p. 288, 2021.

GRAS, Julien *et al.* *Cryptococcus neoformans* meningitis in kidney transplant recipients: A diagnostic and therapeutic challenge. **Medical mycology case reports**, v. 32, p. 84-87, 2021.

GONCIARZ, Weronika *et al.* Chitosan-based formulations for therapeutic applications. A recent overview. **Journal of Biomedical Science**, v. 32, n. 1, p. 62, 2025.

HITCHCOCK, Megan; XU, Jianping. Analyses of the global multilocus genotypes of the human pathogenic yeast *Cryptococcus neoformans* species complex. **Genes**, v. 13, n. 11, p. 2045, 2022.

HOWARD-JONES, Annaleise R. *et al.* Pulmonary cryptococcosis. **Journal of Fungi**, v. 8, n. 11, p. 1156, 2022.

HU, Yichen *et al.* Mechanisms of antifungal and anti-aflatoxigenic properties of essential oil derived from turmeric (*Curcuma longa* L.) on *Aspergillus flavus*. **Food chemistry**, v. 220, p. 1-8, 2017.

HU, Shijun *et al.* Management of long-term cryptococcal meningitis neoformans in a surviving patient: A case report. **Frontiers in Medicine**, v. 9, p. 1035201, 2022.

HUSSAIN, Shazia; BERRY, Shiwani. A review study on green synthesis of chitosan derived schiff bases and their applications. **Carbohydrate Research**, v. 535, p. 109002, 2024.

IBER, Benedict Terkula *et al.* A review of various sources of chitin and chitosan in nature. **Journal of Renewable Materials**, v. 10, n. 4, p. 1097, 2022.

ILK, Sedef; SAGLAM, Necdet; ÖZGEN, Mustafa. Kaempferol loaded lecithin/chitosan nanoparticles: Preparation, characterization, and their potential applications as a sustainable antifungal agent. **Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology**, v. 45, n. 5, p. 907-916, 2017.

ING, Ling Yien *et al.* Antifungal activity of chitosan nanoparticles and correlation with their physical properties. **International journal of Biomaterials**, v. 2012, n. 1, p. 632698, 2012.

IYER, Kali R. *et al.* Treatment strategies for cryptococcal infection: challenges, advances and future outlook. **Nature Reviews Microbiology**, v. 19, n. 7, p. 454-466, 2021.

JABBAR, Sara Hayder; ABBAS, Ali Hadi. The Main Virulence Factors of *Cryptococcus neoformans*, A Review Article. **Kufa Journal for Veterinary Medical Sciences**, v. 15, n. 2, 2024.

JANG, Eun-Ha *et al.* Unraveling capsule biosynthesis and signaling networks in *Cryptococcus neoformans*. **Microbiology spectrum**, v. 10, n. 6, p. e02866-22, 2022.

JANTAN, Ibrahim *et al.* Immunomodulatory effects and mechanisms of curcuma species and their bioactive compounds: A review. **Frontiers in pharmacology**, v. 12, p. 643119, 2021.

JULIAN, Julian; ADAWIYAH, Robiatul; WAHDINI, Sri. Biomolecular activity of *cryptococcus* during cryptococcosis: a review of molecular interactions of *cryptococcus* with human immune system and blood-brain-barrier. **African Journal of Infectious Diseases**, v. 18, n. 1, p. 11-22, 2024.

JÚNIOR, Antônio Mauro Barros Almeida *et al.* EP-072-EPIDEMIOLOGIA E FORMAS CLÍNICAS DAS INFECÇÕES FÚNGICAS IDENTIFICADAS NO AMBULATÓRIO DE MICOSES DO HOSPITAL SÃO JOSÉ DE DOENÇAS INFECCIOSAS, EM FORTALEZA/CEARÁ. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 28, p. 103998, 2024.

KE, Cai-Ling *et al.* Antimicrobial actions and applications of chitosan. **Polymers**, v. 13, n. 6, p. 904, 2021.

KENOSI, Keabonye *et al.* Recent advances in the ecoepidemiology, virulence and diagnosis of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* species complexes. **The Open Microbiology Journal**, v. 17, n. 1, 2023.

KIM, Min-Ju; ZARNOWSKI, Robert; ANDES, David. Composition and Role of the Extracellular Matrix in Fungal Biofilm Drug Resistance. **Fungal Biofilms**, p. 193-205, 2025.

KUCHTA-GŁADYSZ, Marta *et al.* The In Vitro Toxicity Profile of Nanoencapsulated Curcumin in a Chitosan–Alginate Gel Carrier Using Rabbit Lymphocytes: Preliminary Research. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 26, n. 17, p. 8577, 2025.

KOLGE, Henry *et al.* A pH-tuned chitosan-PLGA nanocarrier for fluconazole delivery reduces toxicity and improves efficacy against resistant *Candida*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 227, p. 453-461, 2023.

LAHIRI, Shayanki; CHANDRASHEKAR, Nagarathna. Advanced approach for antifungal susceptibility and characterization of resistance properties in clinical and environmental isolates of *Cryptococcus* species complex. **Infectious Medicine**, v. 1, n. 3, p. 147-153, 2022.

LAROCQUE-DE-FREITAS, Isabel F. *et al.* Inhibition of Microbicidal Activity of Canine macrophages DH82 Cell line by Capsular polysaccharides from *Cryptococcus neoformans*. **Journal of Fungi**, v. 10, n. 5, p. 339, 2024.

LEIVA-MORA, Michel *et al.* Antifungal mechanisms of plant essential oils: A comprehensive literature review for biofungicide development. **Agriculture**, v. 15, n. 21, p. 2303, 2025.

LIMA, Airton *et al.* Criptococose: revisão de literatura. **Scientific Electronic Archives**, v. 16, n. 9, 2023.

LIN, Xiaorong; HEITMAN, Joseph. The biology of the *Cryptococcus neoformans* species complex. **Annu. Rev. Microbiol.**, v. 60, n. 1, p. 69-105, 2006.

LINGAIT, Diksha *et al.* A review on versatile applications of biomaterial/polycationic chitosan: An insight into the structure-property relationship. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 257, p. 128676, 2024.

LO, Wei-Hsuan *et al.* Synergistic antifungal activity of chitosan with fluconazole against *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, and fluconazole-resistant strains. **Molecules**, v. 25, n. 21, p. 5114, 2020.

LÓPEZ MORA, Eduardo *et al.* Recomendaciones para el diagnóstico y tratamiento de la infección por *Cryptococcus* spp. **Revista chilena de infectología**, v. 39, n. 6, p. 725-730, 2022.

MANI, Valli *et al.* 825. Cryptococcosis in the Immunocompetent Patient: Incidence and Outcomes. In: **Open Forum Infectious Diseases**. US: Oxford University Press, 2023. p. ofad500. 870.

MANNAN, Mohammad *et al.* Host immune response against fungal biofilms. **Current Opinion in Microbiology**, v. 81, p. 102520, 2024.

MARTINEZ, Luis R.; CASADEVALL, Arturo. Susceptibility of *Cryptococcus neoformans* biofilms to antifungal agents in vitro. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 50, n. 3, p. 1021-1033, 2006.

MARTINEZ, Luis R. *et al.* The use of chitosan to damage *Cryptococcus neoformans* biofilms. **Biomaterials**, v. 31, n. 4, p. 669-679, 2010.

MASSEY, Justin; ZARNOWSKI, Robert; ANDES, David. Role of the extracellular matrix in *Candida* biofilm antifungal resistance. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 47, n. 6, p. fuad059, 2023.

MATTOON, Ellie Rose; CORDERO, Radames JB; CASADEVALL, Arturo. Melanization reduces *Cryptococcus neoformans* susceptibility to mechanical stress. **Mosphere**, v. 8, n. 1, p. e00591-22, 2023.

MELHEM, Marcia SC *et al.* Antifungal resistance in cryptococcal infections. **Pathogens**, v. 13, n. 2, p. 128, 2024.

MEMARZIA, Arghavan *et al.* Experimental and clinical reports on anti-inflammatory, antioxidant, and immunomodulatory effects of *Curcuma longa* and curcumin, an updated and comprehensive review. **BioFactors**, v. 47, n. 3, p. 311-350, 2021.

MOHAMED, Sally H. *et al.* Fungal CNS infections in Africa: the neuroimmunology of cryptococcal meningitis. **Frontiers in immunology**, v. 13, p. 804674, 2022.

MOMIN, Mahek; WEBB, Ginny. The environmental effects on virulence factors and the antifungal susceptibility of *Cryptococcus neoformans*. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 12, p. 6302, 2021.

MONDÉJAR-LÓPEZ, Maria *et al.* Chitosan nanoparticles loaded with garlic essential oil: A new alternative to tebuconazole as seed dressing agent. **Carbohydrate Polymers**, v. 277, p. 118815, 2022.

MONTOYA, Marhiah C.; MAGWENE, Paul M.; PERFECT, John R. Associations between *Cryptococcus* genotypes, phenotypes, and clinical parameters of human disease: a review. **Journal of Fungi**, v. 7, n. 4, p. 260, 2021.

MOSMANN, Tim. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of immunological methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983.

NDYETUKIRA, Jane Frances *et al.* Using single-dose liposomal amphotericin B for cryptococcal meningitis induction therapy: nurse pearls and practical perspectives. **Wellcome Open Research**, v. 9, p. 253, 2024.

NGAN, Nguyen Thi Thuy; FLOWER, Barnaby; DAY, Jeremy N. Treatment of cryptococcal meningitis: how have we got here and where are we going?. **Drugs**, v. 82, n. 12, p. 1237-1249, 2022.

NORBERG, Antonio Neres *et al.* INFECÇÃO SECUNDÁRIA POR CRYPTOCOCCUS SPP. EM PACIENTES HIV-NEGATIVOS NA CONJUNTURA DA COVID-19. **InterSciencePlace**, v. 18, n. 1, 2023.

ODDS, Frank C. Synergy, antagonism, and what the checkerboard puts between them. **Journal of antimicrobial chemotherapy**, v. 52, n. 1, p. 1-1, 2003.

ORELLANA-PAUCAR, Adriana Monserrath. Turmeric essential oil constituents as potential drug candidates: a comprehensive overview of their individual bioactivities. **Molecules**, v. 29, n. 17, p. 4210, 2024.

PASRIJA, Ritu; KUMARI, Deepika. Melanin Formation in *Cryptococcus* sp. In: **Protocols for Studying Pathogenic Fungi**. Singapore: Springer Nature Singapore, 2025. p. 177-188.

PERFECT, J. R.; BICANIC, T. *Cryptococcosis Clinical Presentation*. **Medscape**, 2023. Disponível em: <https://emedicine.medscape.com/article/215354-overview>.

PERFECT, John R.; KRONSTAD, James W. Cryptococcal nutrient acquisition and pathogenesis: dining on the host. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 89, n. 1, p. e00015-23, 2025.

PINO, Jorge A. *et al.* Chemical composition and biological activities of essential oil from turmeric (*Curcuma longa* L.) rhizomes grown in Amazonian Ecuador. **Revista CENIC. Ciencias Químicas**, v. 49, n. 1, p. 1-8, 2018.

POZNANSKI, Pawel; HAMEED, Amir; ORCZYK, Waclaw. Chitosan and chitosan nanoparticles: parameters enhancing antifungal activity. **Molecules**, v. 28, n. 7, p. 2996, 2023.

PRUITT, Hope M. *et al.* The hidden fortress: a comprehensive review of fungal biofilms with emphasis on *Cryptococcus neoformans*. **Journal of Fungi**, v. 11, n. 3, p. 236, 2025.

QIAN, Weidong *et al.* Deciphering antifungal and antibiofilm mechanisms of isobavachalcone against *Cryptococcus neoformans* through RNA-seq and functional analyses. **Microbial Cell Factories**, v. 23, n. 1, p. 107, 2024.

QURESHI, Zaheer A. *et al.* Cryptococcosis and cryptococcal meningitis: A narrative review and the up-to-date management approach. **Cureus**, v. 16, n. 3, 2024.

RAHMAN, ABZ Naimur *et al.* Antidermatophytic activity of *Curcuma longa* against *Trichophyton* spp.: compound identification and molecular docking to lanosterol 14 α -

demethylase. **BMC Complementary Medicine and Therapies**, v. 25, n. 1, p. 321, 2025.

RAJASINGHAM, Radha *et al.* Global burden of disease of HIV-associated cryptococcal meningitis: an updated analysis. **The Lancet infectious diseases**, v. 17, n. 8, p. 873-881, 2017.

RAJASINGHAM, Radha *et al.* The global burden of HIV-associated cryptococcal infection in adults in 2020: a modelling analysis. **The Lancet infectious diseases**, v. 22, n. 12, p. 1748-1755, 2022.

RATHORE, Sudarshan Singh *et al.* A holistic review on *Cryptococcus neoformans*. **Microbial pathogenesis**, v. 166, p. 105521, 2022.

ROCHA, Olívia Basso *et al.* In vitro and in silico analysis reveals antifungal activity and potential targets of curcumin on *Paracoccidioides* spp. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 52, n. 4, p. 1897-1911, 2021.

RODRIGUES, Hévelen Ferreira; MORAES, Melânia Santana; DE MESQUITA, Elieth Afonso. Incidência de criptococose em pombos (*Columba livia*) e seu impacto na saúde pública em Porto Velho/RO. **Research, Society and Development**, v. 11, n. 15, p. e126111536931-e126111536931, 2022.

RUSSO, Rossella *et al.* Exploitation of cytotoxicity of some essential oils for translation in cancer therapy. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2015, n. 1, p. 397821, 2015.

SANTI, Lucélia *et al.* Proteomic profile of *Cryptococcus gattii* biofilm: Metabolic shift and the potential activation of electron chain transport. **Journal of Proteomics**, v. 290, p. 105022, 2024.

SETZER, William N. *et al.* Variation in the chemical composition of five varieties of *Curcuma longa* rhizome essential oils cultivated in North Alabama. **Foods**, v. 10, n. 2, p. 212, 2021.

SINDHU, Murugesan *et al.* Functionalized nanoencapsulated *Curcuma longa* essential oil in chitosan nanopolymer and their application for antioxidant and antimicrobial efficacy. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 251, p. 126387, 2023.

SHAKIB, Pegah *et al.* Antifungal Activity of Chitosan Nanocomposites against *Candida albicans*: A Systematic Review. **Current Bioactive Compounds**, v. 21, n. 2, p. E160424228952, 2025.

SHARMA, Nitin *et al.* Evaluation of the antifungal, antioxidant, and anti-diabetic potential of the essential oil of *Curcuma longa* leaves from the North-Western Himalayas by in vitro and in silico analysis. **Molecules**, v. 27, n. 22, p. 7664, 2022.

SIGERA, L. Shamithra M.; DENNING, David W. Flucytosine and its clinical usage. **Therapeutic advances in infectious disease**, v. 10, p. 20499361231161387, 2023.

SILVA-BELTRAN, Norma Patricia *et al.* Antifungal activity and mechanism of action of natural product derivatives as potential environmental disinfectants. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 50, n. 1, p. kuad036, 2023.

SINDHU, Murugesan *et al.* Functionalized nanoencapsulated *Curcuma longa* essential oil in chitosan nanopolymer and their application for antioxidant and antimicrobial efficacy. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 251, p. 126387, 2023.

SKIPPER, Caleb; ABASSI, Mahsa; BOULWARE, David R. Diagnosis and management of central nervous system cryptococcal infections in HIV-infected adults. **Journal of Fungi**, v. 5, n. 3, p. 65, 2019.

SOLEIMANI, Hajar; MOSTOWFIZADEH-GHALAMFARSA, Reza; ZAREI, Afsaneh. Chitosan nanoparticle encapsulation of celery seed essential oil: Antifungal activity and defense mechanisms against cucumber powdery mildew. **Carbohydrate Polymer Technologies and Applications**, v. 8, p. 100531, 2024.

SOUSA, Naira Sulany Oliveira de *et al.* Searching for new antifungals for the treatment of cryptococcosis. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 56, p. e0121-2023, 2023.

STACK, Matthew *et al.* Cryptococcal meningitis in young, immunocompetent patients: a single-center retrospective case series and review of the literature. In: **Open Forum Infectious Diseases**. US: Oxford University Press, 2023.

STEFANI, Heloi; GOMES, Laís Lopes Almeida; MOYA, Fernanda Gonçalves. An unusual case of disseminated cryptococcosis in an immunocompetent host presenting with verrucous skin lesions. **Medical Mycology Case Reports**, v. 42, p. 100606, 2023.

SUSAN, Victoria *et al.* Antifungal Drugs for the Treatment of Invasive Fungal Infections—A Limited Therapeutic Toolbox Facing Growing Resistances. **Pharmaceuticals**, v. 18, n. 8, p. 1220, 2025.

TAHA, Mohamed *et al.* Genetic diversity and antifungal susceptibilities of environmental *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* species complexes. **IMA fungus**, v. 15, n. 1, p. 21, 2024.

TREVIJANO-CONTADOR, Nuria *et al.* *Cryptococcus neoformans* can form titan-like cells in vitro in response to multiple signals. **PLoS pathogens**, v. 14, n. 5, p. e1007007, 2018.

TOUATI, Abdelaziz *et al.* Essential Oils for Biofilm Control: Mechanisms, Synergies, and Translational Challenges in the Era of Antimicrobial Resistance. **Antibiotics**, v. 14, n. 5, p. 503, 2025.

VALIZADEH, Masomeh *et al.* Controlled release of turmeric oil from chitosan nanoparticles extends shelf life of *Agaricus bisporus* and preserves its postharvest quality. **Food Bioscience**, v. 44, p. 101401, 2021.

WANG, Fengjuan *et al.* Clinical characteristics and risk factors for mortality in cryptococcal meningitis: evidence from a cohort study. **Frontiers in Neurology**, v. 13, p. 779435, 2022.

WANG, Yu *et al.* The management and outcome of cryptococcosis in patients with different immune statuses and treatment protocols: A multicenter real-world study in Jiangsu Province-China. **Journal of Medical Mycology**, v. 33, n. 3, p. 101389, 2023.

WANG, Dandan *et al.* Fungal biofilm formation and its regulatory mechanism. **Heliyon**, v. 10, n. 12, 2024.

WOODS, Michael *et al.* Spatiotemporal dynamics of cryptococcal infection reveal novel immune modulatory mechanisms and antifungal targets. **bioRxiv**, p. 2025.05.30.657021, 2025.

World Health Organization. **Fungal Priority Pathogens List to guide research, development and public health action**. WHO; 25 Oct 2022.

WROŃSKA, Natalia *et al.* Antifungal Chitosan Nanocomposites—A New Perspective for Extending Food Storage. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 25, n. 23, p. 13186, 2024.

WU, Jiajie *et al.* Visualisation and quantification of biofilm-substrate interface microenvironments based on a fungal-bacterial interaction model: an in-depth investigation into microbially mediated corrosion processes. **Corrosion Science**, v. 246, p. 112725, 2025.

YADAV, Harsh; MALVIYA, Rishabha; KAUSHIK, Niranjan. Chitosan in biomedicine: A comprehensive review of recent developments. **Carbohydrate Polymer Technologies and Applications**, v. 8, p. 100551, 2024.

YAN, Dazhong *et al.* Antimicrobial properties of chitosan and chitosan derivatives in the treatment of enteric infections. **Molecules**, v. 26, n. 23, p. 7136, 2021.

YANG, Yan-Li *et al.* Adverse effects associated with currently commonly used antifungal agents: a network meta-analysis and systematic review. **Frontiers in pharmacology**, v. 12, p. 697330, 2021.

YANG, Chen *et al.* Cryptococcus escapes host immunity: What do we know?. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 12, p. 1041036, 2022.

YANTI, Rini *et al.* Chemical composition and antifungal activity of oil extracted from leaves turmeric (*Curcuma longa*). **Canrea Journal: Food Technology, Nutritions, and Culinary Journal**, p. 123-131, 2021.

YU, Jingyi; HU, Wenjie; ZHANG, Xuebin. Study on the synthesis, structural characterization and antifungal mechanism of ar-turmerone derivatives. **Journal of Molecular Structure**, v. 1346, p. 142821, 2025.

YUPANQUI, Chutha Takahashi *et al.* Spray-dried microparticles of turmeric extract for improved delivery and low toxicity. **Pharmacia**, v. 71, p. 1-10, 2024.

ZACARON, Thiago Medeiros *et al.* Advancements in chitosan-based nanoparticles for pulmonary drug delivery. **Polymers**, v. 15, n. 18, p. 3849, 2023.

ZARAGOZA, Oscar. Basic principles of the virulence of *Cryptococcus*. **Virulence**, v. 10, n. 1, p. 490-501, 2019.

ZHANG, H. *et al.* Disseminated cryptococcosis involving skin and lung in an immunocompromised patient after kidney transplantation: a case report. **Dermatological Health**, [S.I.], v. 2, n. 3, p. 39-43, 2023.

ZHANG, Fan *et al.* Identification of risk factors for disseminated cryptococcosis in non-hiv patients: a retrospective analysis. **European Journal of Medical Research**, v. 28, n. 1, p. 612, 2023.

ZHAO, Youbao *et al.* *Cryptococcus neoformans*, a global threat to human health. **Infectious Diseases of Poverty**, v. 12, n. 02, p. 1-18, 2023.

ZHU, Ran; MORKOS, Beshoy; LIU, Lingling. Therapeutic Potentials and Encapsulation Strategies of Essential Oils. **Processes**, v. 14, n. 2, 2026.