



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA
BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

MARIA ISABEL DE SOUZA SILVA

**EFEITO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE CAPIM-LIMÃO E GERÂNIO
ENCAPSULADOS EM NANOPARTÍCULAS DE QUITOSANA DE BAIXO PESO
MOLECULAR CONTRA CÉLULAS PLANCTÔNICAS E BIOFILME DAS
ESPÉCIES DO COMPLEXO *Cryptococcus neoformans*/*Cryptococcus gattii***

Fortaleza

2023

MARIA ISABEL DE SOUZA SILVA

EFEITO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE CAPIM-LIMÃO E GERÂNIO
ENCAPSULADOS EM NANOPARTÍCULAS DE QUITOSANA DE BAIXO PESO
MOLECULAR CONTRA CÉLULAS PLANCTÔNICAS E BIOFILME DAS ESPÉCIES
DO COMPLEXO *Cryptococcus neoformans/ Cryptococcus gattii*

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Curso de Graduação em Ciências Biológicas do Centro de Ciências da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientadora: Profa. Dra. Raimunda Sâmia Nogueira Brilhante

Fortaleza

2023

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Sistema de Bibliotecas

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- S581e Silva, Maria Isabel de Souza.
EFEITO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE CAPIM-LIMÃO E GERÂNIO ENCAPSULADOS
EM NANOPARTÍCULAS DE QUITOSANA DE BAIXO PESO MOLECULAR CONTRA
CÉLULAS PLANCTÔNICAS E BIOFILME DAS ESPÉCIES DO COMPLEXO *Cryptococcus*
neoformans/ *Cryptococcus gattii* / Maria Isabel de Souza Silva. – 2023.
47 f. : il. color.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Centro
de Ciências, Curso de Ciências Biológicas, Fortaleza, 2023.

Orientação: Profa. Dra. Raimunda Sâmia Nogueira Brilhante.

1. combinação. 2. levedura. 3. encapsulamento. 4. antifúngicos. I. Título.

CDD 570

MARIA ISABEL DE SOUZA SILVA

EFEITO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE CAPIM-LIMÃO E GERÂNIO
ENCAPSULADOS EM NANOPARTÍCULAS DE QUITOSANA DE BAIXO PESO
MOLECULAR CONTRA CÉLULAS PLANCTÔNICAS E BIOFILME DAS ESPÉCIES
DO COMPLEXO *Cryptococcus neoformans*/*Cryptococcus gattii*

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Curso de Graduação em Ciências Biológicas do Centro de Ciências da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientadora: Profa. Dra. Raimunda Sâmia Nogueira Brilhante

Aprovada em: 04/12/23

BANCA EXAMINADORA

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

Mestre Raissa Geovanna Pereira Lopes
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profa. Dra. Germana Costa Paixão
Universidade Estadual do Ceará (UECE)

A mim. Por não ter desistido.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a mim, por ter sido meu maior porto seguro, fonte de coragem e determinação.

Ao meu pai, Narcélio, por me ensinar, mesmo que de forma questionável, as manhas de como viver a vida e por ter se esforçado para me criar dignamente.

À minha madrasta, Sônia, por ter um coração tão puro que me acolheu como sua filha e me cuidou em tantos momentos.

À minha irmã, Abelle, que é luz em minha vida desde seu nascimento. Que eu possa acompanhar e inspirar sua jornada.

Ao meu amado, Daniel, pelo zelo e companheirismo. Continuo me surpreendendo.

Às minhas duas avós, paterna e materna, pelo cuidado comigo.

Aos amigos que fiz pelo caminho e permanecem ao meu lado.

Aos colegas de laboratório maravilhosos que ganhei ao ingressar no CEMM.

À minha orientadora, Profa. Dra. Raimunda Sâmia Nogueira Brilhante, por me dar a oportunidade de experienciar o CEMM e por acreditar no meu potencial.

À Universidade Federal do Ceará (UFC) e ao Centro Especializado em Micologia Médica (CEMM) pela estrutura, equipamentos e materiais necessários para realização deste trabalho.

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 apoio financeiro investido.

“Eu continuo correndo porque um vencedor
não desiste de si mesmo”.
(Freedom - Beyoncé)

RESUMO

As variedades pertencentes ao complexo *Cryptococcus neoformans/C. gattii* são patógenos responsáveis pelo desenvolvimento da criptococose, uma condição que, em situações mais severas, pode levar à meningite criptocócica. A aplicação de óleos essenciais e quitosana em ambientes controlados, tanto contra bactérias quanto fungos, tem demonstrado ser uma abordagem eficiente na diminuição da proliferação desses microrganismos. Por esses motivos, esse estudo teve como enfoque avaliar a atividade antifúngica das nanopartículas de quitosana de baixo peso molecular, de quitosana de baixo peso molecular/capim-limão e de quitosana do baixo peso molecular/gerânio em células planctônicas e em biofilmes maduros de *Cryptococcus spp.* Após a exposição às diferentes concentrações dos compostos teste, os intervalos de concentração inibitória mínima (CIM) foram de 128-512 µg/ml para quitosana de baixo peso molecular, de 128-256 µg/ml para quitosana de baixo peso molecular/capim-limão e quitosana de baixo peso molecular/gerânio, para ambos. No que se referem aos biofilmes, as amostras foram capazes de reduzir a atividade metabólica e a biomassa dos biofilmes maduros das espécies do complexo *C. neoformans/C. gattii* em 49% e 50% para nanopartículas de quitosana de baixo peso molecular, 58% e 53% para nanopartículas de quitosana de baixo peso molecular/capim-limão e 65% e 68% para nanopartículas de quitosana de baixo peso molecular/gerânio, respectivamente, ($P < 0,05$). Nos biofilmes maduros, também foi observado que as nanopartículas de quitosana de baixo peso molecular/gerânio ocasionaram maiores reduções do que as nanopartículas de quitosana e quitosana de baixo peso molecular/capim-limão. Dessa forma, as nanopartículas de quitosana de baixo peso, de quitosana de baixo peso molecular/capim-limão e quitosana de baixo peso molecular/gerânio apresentaram atividade antifúngica, *in vitro*, ante o planctônico das espécies do complexo *C. neoformans/C. gattii*, sendo capazes de reduzir os biofilmes maduros. Em vista disso, essas descobertas são importantes para direcionar pesquisas futuras para melhor compreender as técnicas envolvidas na ação das nanopartículas, combinadas ou não, contra as espécies do complexo *C. neoformans/C. gattii*.

Palavras-chave: combinação; levedura; encapsulamento; antifúngicos.

ABSTRACT

The varieties belonging to the *Cryptococcus neoformans/C. gattii* are pathogens responsible for the development of cryptococcosis, a condition that, in more severe situations, can lead to cryptococcal meningitis. The application of essential oils and chitosan in controlled environments, against both bacteria and fungi, has proven to be an efficient approach in reducing the proliferation of these microorganisms. For these reasons, this study focused on evaluating the antifungal activity of low molecular weight chitosan, low molecular weight chitosan/lemongrass and low molecular weight chitosan/geranium nanoparticles in planktonic cells and mature *Cryptococcus* biofilms. spp. After exposure to different concentrations of the test compounds, the minimum inhibitory concentration (MIC) ranges were 128-512 µg/ml for low molecular weight chitosan, 128-256 µg/ml for low molecular weight chitosan/grass lemon and low molecular weight chitosan/geranium, for both. Regarding biofilms, the samples were able to reduce the metabolic activity and biomass of mature biofilms of species from the *C. neoformans/C. complex. gattii* by 49% and 50% for low molecular weight chitosan nanoparticles, 58% and 53% for low molecular weight chitosan nanoparticles/lemongrass and 65% and 68% for low molecular weight chitosan nanoparticles/geranium, respectively, ($P < 0.05$). In mature biofilms, it was also observed that low molecular weight chitosan/geranium nanoparticles caused greater reductions than chitosan nanoparticles and low molecular weight chitosan/lemongrass. Thus, nanoparticles of low-weight chitosan, low-molecular-weight chitosan/lemongrass and low-molecular-weight chitosan/geranium showed antifungal activity, *in vitro*, against planktonic species of the *C. neoformans/C. complex. gattii*, being able to reduce mature biofilms. In view of this, these findings are important to direct future research to better understand the techniques involved in the action of nanoparticles, combined or not, against species of the *C. neoformans/C. complex. gattii*.

Keywords: combination; yeast; encapsulation; antifungals.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1 - Aspectos morfológicos do gênero <i>Cryptococcus</i> spp. | 18 |
| Figura 2 - Esquema de contágio pelo gênero <i>Cryptococcus</i> spp. | 22 |
| Figura 3. Sensibilidade <i>in vitro</i> de biofilmes maduros das espécies do complexo <i>C. neoformans</i> / <i>C. gattii</i> exposto às nanopartículas de quitosana de baixo peso molecular, das nanopartículas combinadas ao óleo essencial de gerânio e das nanopartículas combinadas ao óleo essencial de capim-limão. | 36 |

LISTA DE QUADROS

| | |
|---|----|
| Quadro 1 - Espécies, sorotipos e variedades das espécies do complexo <i>C. neoformans</i> e <i>C. gatti</i> | 18 |
| Quadro 2 - Sintomas mais comuns da criptococose pulmonar em hospedeiros imunocompetentes e imunocomprometidos. | 24 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 1- Atividade antifúngica planctônica, <i>in vitro</i> , das nanopartículas de quitosana baixo peso molecular, quitosana baixo peso molecular/capim-limão e quitosana baixo peso molecular/gerânio frente a cepas das espécies do complexo <i>Cryptococcus</i> spp. | 33 |
|--|----|

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|------|--|
| CEMM | Centro Especializado em Micologia Médica |
| CIM | Concentração Inibitória Mínima |
| DMSO | Dimetilsulfóxido |
| GXM | Glucuronoxilomanana |
| MOPS | Ácido 3-(N-morfolina) propanosulfônico |
| MTT | Brometo de 3-4,5-dimetil-tiazol-2-il-2,5-difeniltetrazólio |
| RPMI | Meio suplementado (de Roswell Park Memorial Institute) |
| SIDA | Síndrome da Imunodeficiência Adquirida |
| SNC | Sistema Nervoso Central |

SUMÁRIO

| | |
|--|-----------|
| 1 INTRODUÇÃO | 15 |
| 2 REVISÃO DE LITERATURA | 17 |
| 2.1 <i>Cryptococcus</i> spp. | 17 |
| 2.1.1 Aspectos taxonômicos | 17 |
| 2.1.2 Aspectos ecológicos | 18 |
| 2.1.3 Aspectos epidemiológicos | 19 |
| 2.1.4 Fatores de virulência | 20 |
| 2.1.5 Patogenia da criptococose | 21 |
| 2.1.6 Manifestações clínicas | 23 |
| 2.1.7 Diagnóstico da criptococose | 24 |
| 2.1.8 Tratamento farmacológico | 25 |
| 2.2 COMPOSTOS TESTE | 27 |
| 2.2.1 Quitosana | 27 |
| 2.2.2 Óleos essenciais de capim-limão e de gerânio | 28 |
| 3 OBJETIVOS | 29 |
| 3.1 Objetivo geral | 29 |
| 3.2 Objetivos específicos | 29 |
| 4 METODOLOGIA | 30 |
| 4.1 Local de estudo | 30 |
| 4.2 Microrganismos | 30 |
| 4.3 Drogas teste | 30 |
| 4.4 Ensaio de sensibilidade planctônica | 30 |
| 4.5 Ensaio de sensibilidade do biofilme | 31 |
| 4.6 Análise estatística | 31 |
| 5 RESULTADOS | 33 |
| 5.1 Avaliação do efeito das nanopartículas de quitosana, de quitosana/capim-limão, quitosana/gerânio sobre as células planctônicas do complexo <i>Cryptococcus neoformans/Cryptococcus gattii</i> | 33 |
| 5.2 Avaliação do efeito das nanopartículas de quitosana, de quitosana/capim-limão, quitosana/gerânio sobre biofilmes maduros do complexo <i>Cryptococcus neoformans/Cryptococcus gattii</i> | 34 |
| 6 DISCUSSÃO | 37 |
| 7 CONSIDERAÇÕES FINAIS | 40 |
| REFERÊNCIAS | 41 |

1 INTRODUÇÃO

A criptococose é uma doença sistêmica provocada pelas espécies do complexo *Cryptococcus neoformans/Cryptococcus gattii*. Essa micose afeta o sistema respiratório e o sistema nervoso central, ocasionando a meningite criptocócica (TEMFACK, 2019). É uma infecção oportunista que possui predileção por imunossuprimidos, como no caso de pessoas que vivem com SIDA (Síndrome da Imunodeficiência Adquirida), transplantados ou pessoas que utilizam medicamentos que comprometam seu sistema imune (DO CARMO *et al.*, 2022).

As espécies do complexo *Cryptococcus neoformans/Cryptococcus gattii* são leveduras e a infecção causada por elas é relatada como cosmopolita. (ZHAO & XIARONG, 2021). A infecção por esse fungo ocorre pela inalação de propágulos encontrados nas fezes de aves e morcegos, ricas em nitrogênio e creatinina, ou ainda em madeira em decomposição, matérias orgânicas que favorecem seu crescimento (RODRIGUES *et al.*, 2020).

Quando se trata de manifestações clínicas, a criptococose acomete o sistema respiratório, podendo evoluir para o sistema nervoso central em casos graves (MONTROYA & MAGWENE & PERFECT, 2021). Em caso de criptococose pulmonar, os alvéolos são o alvo dessa micose após a inalação dos propágulos da levedura dessecada. Há ainda o neurotropismo da levedura, migrando para a região do Sistema Nervoso Central (SNC). É bastante comum a ocorrência de ambos os acometimentos (HOWARD-JONES *et al.*, 2022).

Para além das consequências clínicas citadas anteriormente, as espécies do complexo *C. neoformans/C. gattii* detém diferentes fatores de virulência, capazes de afetar o sistema imunológico (DE SOUSA *et al.*, 2023). A cápsula polissacarídica, cujo principal polissacarídeo conhecido é o glucuronoxilomanana (GXM), tem a capacidade de resistir à desidratação e alterar sua espessura a depender da alteração do pH, disponibilidade de recursos, temperatura, entre outras mudanças (DOS SANTOS *et al.*, 2021; LIMA *et al.*, 2023).

Diante de tantas estratégias de infectividade do fungo, há relatos de resistência antifúngica com os tratamentos utilizados na atualidade (ARAÚJO *et al.*, 2023). Embora o uso de derivados azólicos, como o fluconazol, seja uma das alternativas mais utilizadas, casos de resistência a essa droga estão sendo notados e descritos em estudos (QUEIROZ-FERNANDES & MAGALHÃES, 2020).

Em meio aos desafios no combate à criptococose, a comunidade científica busca soluções para reverter as dificuldades que a resistência aos antifúngicos está causando. Uma das substâncias alternativas que estão sendo analisadas, *in vitro*, é a quitosana, um polímero resultado da desacetilação da quitina (ÓLINCON-HERNÁNDEZ *et al.*, 2019). Com características de atoxicidade, biocompatibilidade, atividades antimicrobiana, a versatilidade da quitosana faz com que esse carboidrato possa ser usado de diferentes formas e pesos moleculares (TUCHTENHAGEN *et al.*, 2021). Garcia (2019), evidenciou a eficácia de diferentes pesos moleculares da quitosana contra a *Sporothrix brasiliensis*, um fungo dimórfico.

Os óleos essenciais, utilizados no controle antifúngico, atuam na membrana biológica, causando desestabilização e morte celular (DE SOUSA OLIVEIRA *et al.*, 2023) Ademais, a quitosana combinada aos óleos essenciais apresenta atividade sinérgica, contribuindo no controle de crescimento (MOHAMMADI *et al.*, 2015).

Dessa forma, esse estudo teve como propósito analisar os efeitos das nanopartículas de quitosana de baixo molecular, isoladamente, das nanopartículas de quitosana de baixo peso molecular combinadas ao óleo essencial de capim-limão e ao óleo essencial de gerânio no crescimento planctônico e no biofilme maduro de espécies do complexo *C. neoformans/C. gattii*.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 *Cryptococcus* spp.

2.1.1 Aspectos taxonômicos

O primeiro registro do gênero *Cryptococcus* spp. ocorreu em 1894 em um isolado encontrado em suco de pêssago, na Itália. A descoberta foi feita por Francesco Sanfelice, que inicialmente nomeou o microrganismo como *Saccharomyces neoformans* (Kwon-chung *et al.*, 2014). No mesmo ano, Otto Busse, patologista, relatou o primeiro caso de criptococose em um caso clínico de onde um isolado foi retirado de um ferimento tibial, tratando o patógeno como *Saccharomyces* spp (DINIZ-LIMA *et al.*, 2022).

Contudo, em 1901, o micologista Jean-Paul Vuillemin, através dos estudos relatados em 1894, chegou à conclusão de que a levedura citada não pertencia a *Saccharomyces* spp. pela falta de ascósporos, uma das características marcantes do grupo. Já Vuillemin identificou o novo gênero como *Cryptococcus* spp., lhe dando duas espécies: *C. hominis* e *C. neoformans* (HEITMAN *et al.*, 2011).

Ao longo do século XX, outros relatos de infecção pelo mesmo patógeno foram divulgados em diferentes partes do corpo humano, como em pele, pulmão e cérebro. No ano de 1912 foram descritos, por Rusk e Farnell, dois casos de criptococose, sendo um no Sistema Nervoso Central e outro na região pulmonar (MAZIARZ & PERFECT, 2023). Esses relatos abriram margem para pesquisadores buscarem mais informações sobre as espécies e seus sorotipos.

No Brasil, em um panorama geral, a espécie *C. neoformans* tem se mostrado mais prevalente na maior parte dos casos, enquanto a espécie *C. gattii* tem sido mais relacionada com as regiões Norte e Nordeste do país (SOUTO *et al.*, 2016). Devido à alta ocorrência de casos e mortalidade, o país é considerado um dos mais acometidos pela doença na América Latina (DAMASCENO *et al.*, 2023). Pessoas imunocompetentes, também são acometidos pela criptococose, com alta morbiletalidade associada à espécie *C. gattii* (CARRIJO *et al.*, 2021).

Dentro da taxonomia, os agentes etiológicos da criptococose estão inseridos no filo *Basidiomycota*, classe dos *Blastomycetes*, ordem *Sporidiales*, família *Sporidiobolaceae*, gênero *Cryptococcus* (DINIZ-LIMA *et al.*, 2022). Existem 5 (cinco) categorias de sorotipos que podem ser observados na Tabela 1, sendo A, D e AD

(sorotipo híbrido) pertencentes à espécie *C. neoformans*. Enquanto a espécie *C. gattii* possui sorotipo B e C (HAGEN *et al.*, 2015). Por conta da variedade genética esses patógenos foram classificados como um complexo de espécies.

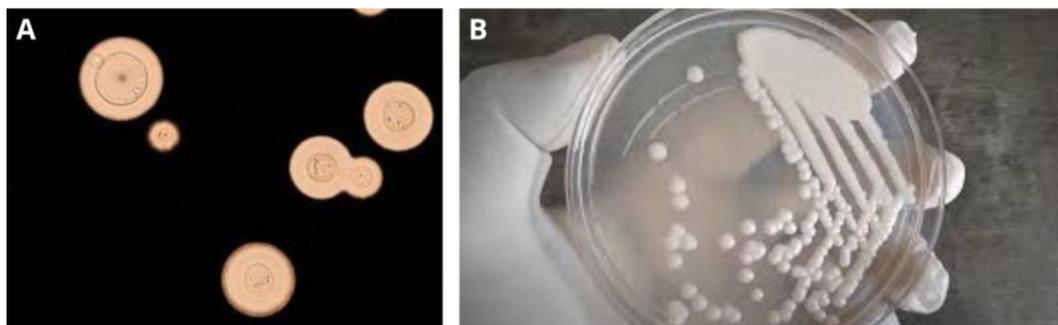
Quadro 1. Espécies, sorotipos e variedades do complexo *C. neoformans* e *C. gattii*.

| Espécies | Sorotipos | Variedades |
|--------------------------------|-----------|---|
| <i>Cryptococcus neoformans</i> | A | <i>C. neoformans</i> var. <i>grubii</i> |
| | D | <i>C. neoformans</i> var. <i>neoformans</i> |
| | AD | - |
| <i>Cryptococcus gattii</i> | B e C | - |

Fonte: autora, baseado em Hagen et al. (2015).

O gênero *Cryptococcus* é composto por leveduras, de formato arredondado ou ovalado, com uma cápsula polissacarídica, células medindo entre 4 e 6 µm, como se pode conferir na Figura 1. Suas colônias são reconhecidas por terem aspecto cremoso com coloração que varia entre branco e amarelado, apresentando atividade de urease e produção de amido. Acomete animais domésticos e silvestres, além de humanos (RIBEIRO & CERQUEIRA, 2019).

Figura 1. Aspectos morfológicos do gênero *Cryptococcus* spp.



Fonte: (A) NGAN *et al.*, 2022, (B) Disponível em: <<https://1nq.com/universe84a-cryp>>. **Legenda:** Na Figura 1A é possível observar através da microscopia o gênero *Cryptococcus* spp. com o fundo corado por Tinta da China, sendo viável visualizar a cápsula polissacarídica que caracteriza o gênero. Na Figura 1B observa-se uma cultura, em meio ágar batata dextrose, do gênero *Cryptococcus* spp. com as colônias de aspecto cremoso e coloração branca.

2.1.2 Aspectos ecológicos

O gênero *Cryptococcus* possui múltiplas espécies, sendo *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii* as duas mais investigadas como causadoras de infecções em humanos e animais (SAIDYKHAN & ONYISHI & MAY, 2022). A criptococose é descrita como cosmopolita, ou seja, ocorre em todas as partes do globo terrestre (SALOMÃO, 2017). No entanto, as espécies apresentam nichos ecológicos diferenciados.

Ao se tratar das características que diferem espacialmente nos nichos ecológicos as espécies pertencentes ao complexo *Cryptococcus neoformans/Cryptococcus gattii*, pode-se observar que a espécie *C. neoformans* é encontrada frequentemente em fezes de pombos, enquanto a espécie *C. gattii* é mais achada em troncos de árvores em estado de decomposição. Dessa forma, possuem predileção por ricas fontes de matéria orgânica e são conhecidos por terem hábitos saprófitos (VERONESI & FOCACCIA, 2009; ALVES, 2022).

Os pombos urbanos, considerados principais responsáveis pela disseminação dos agentes etiológicos da criptococose, são também considerados como pragas urbanas, por conta da sua rápida capacidade de reprodução (SARMENTO *et al.*, 2021). O contato estreito com os seres humanos possibilitou que essas aves tenham acesso a restos de comida jogados pelos humanos, viabilizando maior interação dos humanos e outros bichos com as excretas geradas pelos pombos (RODRIGUES & MORAES & DE MESQUITA, 2022).

Por causa de sua predominância nas regiões tropicais e subtropicais, outro depósito comum do gênero *Cryptococcus spp.* são as árvores, em especial o eucalipto (RODRIGUES *et al.*, 2020). Porém, ao que indica o estudo de Kidd *et al.* (2007), *C. gattii* já foram encontrados em isolados coletados no ar, em solos ácidos, na água do mar e na água doce, como por exemplo na Colúmbia Britânica, localizada no Canadá.

2.1.3 Aspectos epidemiológicos

Por ser cosmopolita, a criptococose é uma doença com distribuição global. Contudo, existem situações que propiciam o crescimento prolífero dessa levedura, que se desenvolve em substratos orgânicos nitrogenados (RODRIGUES *et al.*, 2020). Enquanto a espécie *C. neoformans* está constantemente associada às excretas de aves, *C. gatti* está mais associada às árvores de regiões tropicais e subtropicais (DE BASTOS *et al.*, 2022). Ambas as espécies podem acontecer de forma simultânea em

um mesmo ambiente, assim como podem existir isoladamente uma da outra (SOUTO *et al.*, 2016).

Outro fator que facilita a disseminação de espécies do complexo *C. neoformans* e *C. gattii* é o estado de saúde da população. Dos Santos e Figueiredo (2021) apontam que pessoas acometidas pela SIDA (Síndrome da Imunodeficiência Adquirida) são mais suscetíveis a serem infectadas por criptococose. A micose sistêmica está frequentemente relacionada com pessoas imunocomprometidas, sendo essas, pessoas transplantadas, pessoas que fazem uso de corticoides ou quaisquer humanos com o sistema imune debilitado (PAPPAS, 2013).

A nível mundial, a criptococose se tornou destaque em regiões subdesenvolvidas como a África subsaariana por apresentar um número de casos de meningite criptocócica, uma das manifestações clínicas da criptococose, em pacientes com SIDA, maior do que o número de casos de tuberculose na mesma região (DA SILVA FONTENELE *et al.*, 2022).

Com dados mais atualizados, no Brasil a meningite causada pela criptococose causou mortalidade entre 45-60% das pessoas que foram acometidas pela infecção, em um período entre os anos 2000-2012 (ALVES SOARES *et al.*, 2019). Mesmo com a inclusão da micose na lista de doenças de notificação compulsória nacional há poucos anos, por meio da Portaria nº264/2020, o acesso a informações precisas segue escasso, não sendo possível mensurar casos e mortalidade no país.

2.1.4 Fatores de virulência

A criptococose é frequentemente tratada como uma doença sistêmica, ou seja, é uma doença que afeta mais de um órgão ou região (MURRAY *et al.*, 2006). No que se trata de estratégias para intensificar a virulência no hospedeiro, o gênero *Cryptococcus* possui diferentes meios (BERMAS & MCALISTER, 2020).

Uma das estratégias que ganha notoriedade quando se trata dos fatores de virulência é a capacidade desse patógeno de resistir às altas temperaturas, sendo um indicativo de resistência a formas de combate em seres humanos e outros animais de sangue quente (ANDRADE-SILVA *et al.*, 2023). Persistir a temperaturas elevadas possibilita que o microrganismo se estabeleça e colonize o corpo de animais de sangue quente (SALOMÃO *et al.*, 2017).

A existência da cápsula polissacarídica no gênero também conta como um dos vários fatores de virulência. Isso se dá pela presença de GXM (glucuronoxilomanana), protegendo a célula infectada da fagocitose e interferindo na ação de antígenos pelo hospedeiro (ABULREESH *et al.*, 2019). Autores, como Murray *et al.* (2006), apontam esse como o seu principal fator de virulência, pois a cápsula causa uma interação negativa que confere repulsão eletrostática entre as células do fungo e as da pessoa contaminada.

O gênero possui ainda um tropismo pelo SNC, conferindo ao *Cryptococcus* um outro importante fator de virulência, que é a capacidade de produzir melanina (DE SÁ *et al.*, 2019). Esse aspecto está diretamente ligado aos casos de meningite criptocócica, manifestada em casos graves de criptococose, causando a deposição de melanina na parede celular fúngica, protegendo a célula fúngica do estresse oxidativo e temperaturas extremas. (ZARAGOZA *et al.*, 2019).

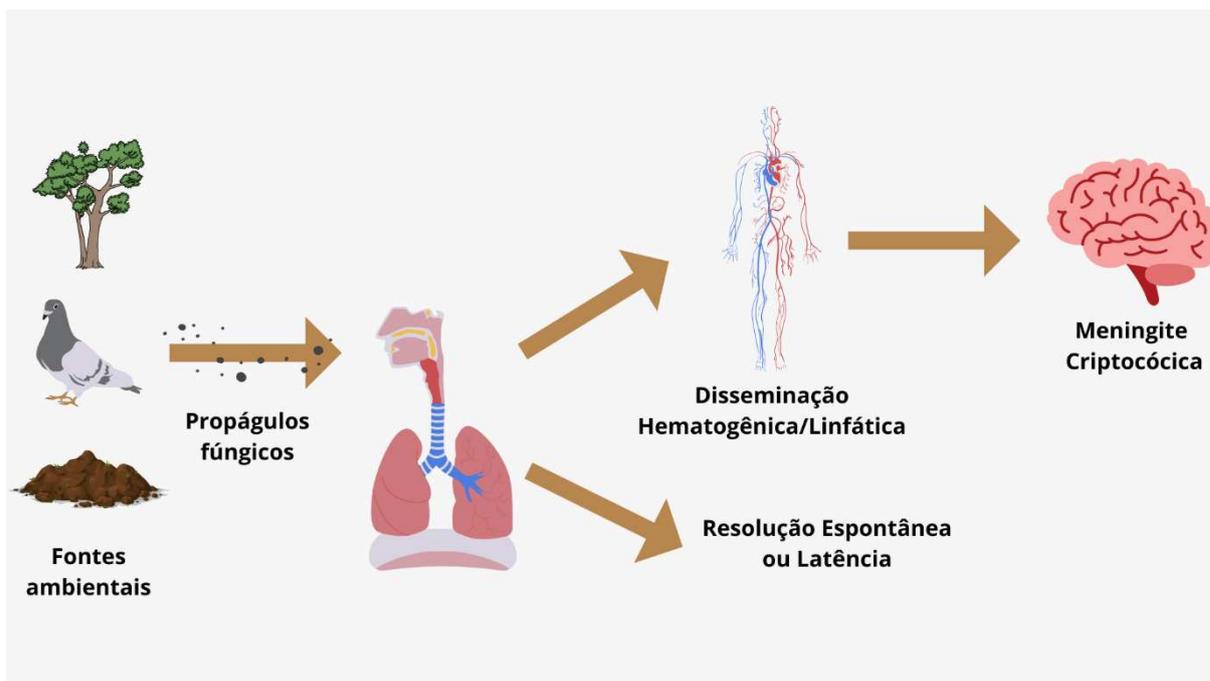
O gênero possui também a capacidade de formar biofilme, que é um aglomerado de comunidades microbianas com uma estrutura organizacional complexa inserida em uma matriz polimérica, encontrado em ambientes bióticos ou abióticos (BRILHANTE *et al.*, 2020). A competência de produzir esse biofilme como fator de virulência confere ao gênero tolerância contra o hospedeiro e resistência à ação de antifúngicos (DE CASTRO TEIXEIRA *et al.*, 2023).

Todos esses aspectos garantem ao fungo habilidades de evitar a desidratação ao meio ambiente, burlar os ataques do sistema imunológico do hospedeiro, proliferar entre as adversidades citadas e demonstrar resistência aos tratamentos que vierem a ser utilizados em casos de infecção (VEIGA *et al.*, 2020).

2.1.5 Patogenia da criptococose

O contágio da criptococose acontece através da inalação dos propágulos dos basidiósporos ou das leveduras dissecadas que se tornam poeira no ambiente, como se pode observar no esquema (Figura 2) sendo os alvéolos pulmonares o primeiro local onde a micose se instala (NORBERG *et al.*, 2023). De modo primário, o hospedeiro desenvolve um complexo linfonodal pulmonar, que pode, ou não, se manifestar por meio de sintomas pulmonares. Como resultado de infecções primárias ou secundárias, a disseminação da micose pode se espalhar para outras regiões por via hematogênica ou sanguínea (SALOMÃO *et al.*, 2017).

Figura 2. Esquema de contágio pelo gênero *Cryptococcus* spp.



Fonte: adaptado de Norberg *et al.* (2023). **Legenda:** No esquema representado na Figura 2, demonstra-se a forma de contaminação da criptococose, que se dá pela inalação dos propágulos fúngicos contidos nas fontes ambientais. Após a infecção pulmonar o corpo do hospedeiro pode evoluir para um quadro de disseminação, que pode acometer o SNC causando meningite criptococose. O outro “caminho” após a criptococose pulmonar seria o sistema imunológico combater a infecção ou o corpo entrar num estado de latência.

Posterior a infecção pulmonar inicial, ocorre uma evolução regressiva do quadro, sucedendo de eventuais focos extrapulmonares, que raramente se calcificam nas regiões fora dos pulmões (ANDRADE *et al.*, 2022). Ademais, a infecção costuma apresentar tropismo pela região cerebral, tanto por conta da proximidade da região primária atingida, como pela abundante disponibilidade de nutrientes assimiláveis para o fungo, tais como a tiamina, glutamina, dopamina, dentre outros. Esses recursos que estão presentes no líquido cefalorraquidiano e que são substratos utilizados na melanização dos fungos nessa região sugere que o hospedeiro possui meningite criptocócica (RUDNIK *et al.*, 2020).

No corpo do hospedeiro, *Cryptococcus* spp. se apresenta como levedura encapsulada e lhe confere um perfil único entre patógenos fúngicos. Pode ser observado com ou sem brotamento, fracamente encapsulado, ou totalmente sem cápsula (SIDRIM & ROCHA, 2004). Utilizando os variados fatores de virulência, o

fungo consegue inibir a fagocitose, produzir melanina a partir de substratos como dopamina e da ação da fenoloxidase, driblando os mecanismos que tentam dizimá-lo (DE BASTOS *et al.*, 2022).

2.1.6 Manifestações clínicas

Se tratando das manifestações clínicas da criptococose, o fator mais importante é levar em consideração o estado do sistema imune do hospedeiro. As manifestações podem ocorrer através de regiões autodelimitadas até um estágio em que a doença esteja disseminada. O acometimento primário do complexo pulmonar-linfonodo pode ser assintomático, contudo, pode também favorecer a disseminação da doença em casos de imunossupressão (SCHUTZ *et al.*, 2021).

Uma das manifestações frequentes é a criptococose pulmonar, que está presente em indivíduos imunocomprometidos e nos imunossuprimidos (DE OLIVEIRA *et al.*, 2022). Em imunocompetentes não é regra que apresente sintomas da micose, dependendo exclusivamente da condição imunológica da pessoa contaminada. É válido ressaltar que ao longo da vida uma pessoa pode ser exposta diversas vezes ao patógeno e não externar nenhum sintoma. Entretanto, se o hospedeiro estiver em um momento de imunossupressão, a atividade de focos pulmonares poderá ocorrer (ANDRADE *et al.*, 2022).

Comumente a disseminação para o SNC acontece em pessoas com a imunidade comprometida, sendo verificado em 90% dos casos, tendo alto índice de mortalidade (LIMA *et al.*, 2023). Ainda se tratando de pessoas imunocomprometidas, esse estágio de comprometimento respiratório é clinicamente parecido com pneumonia causada por *Pneumocystis jiroveci*, ocorrendo por vezes confusão no diagnóstico (SALOMÃO, 2017). Pode ser confundida também com tuberculose, outra doença que acomete o sistema respiratório. Em todo caso, faz-se necessário o diagnóstico assertivo para iniciar o tratamento, de forma que evite a disseminação ou até mesmo o óbito (ZHAO *et al.*, 2023).

Outras formas clínicas também podem ocorrer, como a criptococose cutânea, que pode ser definida como localizada, quando acontece somente em regiões delimitadas, ou como uma consequência da criptococose disseminada (NOWAK *et al.*, 2020). O estudo de Noguchi *et al.* (2019), mostrou que é um tipo de manifestação

incomum, podendo acontecer em imunocompetentes e imunocomprometidos sem demonstrar predileção entre os infectados.

Quadro 2. Sintomas mais comuns da criptococose pulmonar em hospedeiros imunocompetentes e imunocomprometidos.

| Imunocompetentes | Imunocomprometidos |
|---------------------------|-----------------------------------|
| Tosse | Febre |
| Tosse com escarro mucóide | Tosse |
| Febre baixa | Dispneia |
| Dispneia | Cefaleia |
| Perda de peso | Perda de peso |
| Atrito pleural | Síndrome respiratória aguda grave |

Fonte: adaptado de Salomão (2017).

2.1.7 Diagnóstico da criptococose

Em relação ao diagnóstico, pode haver certa dificuldade quanto a identificação da doença devido à confusão na observação das manifestações clínicas, não podendo ser levado em conta apenas o caso clínico do paciente, pois os sintomas das micoses oportunistas podem ser confundidos entre si ou com outra doença que também atinge o sistema respiratório, como a pneumonia, por exemplo (SILVEIRO *et al.*, 2023). Entretanto, há procedimentos reconhecidos como padrão ouro para diagnosticar essa infecção sistêmica, sendo utilizada a combinação de cultura com exame histopatológico (GALAN *et al.*, 2022).

A análise microscópica direta é um dos principais procedimentos concomitantes a cultura, também costuma ser de baixo custo, envolvendo o uso da técnica de coloração com a tinta da China (nanquim) para obter a coloração da cápsula polissacarídica que é uma característica morfológica marcante do gênero *Cryptococcus*. Essa técnica, da mesma forma, pode ser aplicada para investigação em caso de suspeita de meningite criptocócica, sendo utilizado o líquido cefalorraquidiano como amostra (ALMEIDA-PAES *et al.*, 2022).

Faz-se necessário o cultivo de hemoculturas também, sendo uma técnica de fácil acesso e baixo custo em locais com recursos limitados. Um dos meios de cultivo

mais utilizados é o ágar sabouraud dextrose, onde a amostra é inoculada e após 48h incubada a 35°C já se obtém crescimento e se pode fazer uma análise visual da coloração e mucosidade das colônias. Através do meio ágar níger, um meio seletivo para *Cryptococcus* spp., é possível constatar o crescimento de colônias de coloração marrom, devido a presença de substratos fenólicos que induzem a atividade fenoloxidase (LÓPEZ MORA *et al.*, 2022).

Outras técnicas como a reação em cadeia da polimerase, teste de presença de antígenos e exame histopatológico são idem utilizados, ainda de acordo com López Mora *et al.* (2022). Porém, segundo Veronesi & Focaccia (2009), o uso de cultura segue melhor recomendado, para garantir o acompanhamento do paciente durante o tratamento com antifúngicos, averiguando resistência ou ressurgimento da micose.

2.1.8 Tratamento farmacológico

Atualmente, existem três antifúngicos clássicos que são utilizados no tratamento da criptococose, elas são Anfotericina B, Fluconazol e Flucitosina (NGAN & FLOWER & DAY, 2022). São drogas que possuem recomendações e usos diferentes, isso porque depende do quadro clínico e do estado do sistema imune do paciente (SALOMÃO, 2017). Quando o paciente não possui comprometimento imunológico, o tratamento costuma ser eficiente. Ao contrário de quando o paciente tem o sistema imunológico debilitado, tornando o tratamento árduo (ARAÚJO *et al.*, 2023).

Entretanto, a alta incidência de criptococose nos últimos anos, levou ao uso indiscriminado de medicamentos para o tratamento da infecção, como por exemplo o fluconazol, contribuindo em uma era de resistência fúngica (QUEIROZ-FERNANDES & MAGALHÃES, 2021). Por conta da existência de cepas resistentes ao uso dos antifúngicos, o tratamento tem sido desafiante, em especial para pessoas que vivem com SIDA e/ou transplantados. No caso dos pacientes soropositivos, derivados azólicos costumam ser utilizados em combinação com Anfotericina B, sendo necessária uma terapia de manutenção posterior ao tratamento inicial (DOS SANTOS & FIGUEREDO, 2021).

Para além da problemática da resistência antifúngica, existe também o problema relacionado à toxicidade dos medicamentos utilizados. A flucitosina, por exemplo, é uma droga com ação mielotóxica e hepatotóxica, sendo necessários

acompanhamento de hemogramas e hepatogramas durante o uso em tratamentos. A Anfotericina B, por sua vez, tem sido utilizada na formulação lipídica, buscando um menor efeito tóxico (SALOMÃO, 2017).

Sendo assim, a combinação de Anfotericina B com Flucitosina é comumente recomendada numa primeira fase de tratamento, sendo a mais indicada por várias literaturas (DE OLIVEIRA *et al.*, 2022). Entretanto, no Brasil a Flucitosina passou algum tempo não sendo disponibilizada nos tratamentos, sendo mais utilizada a combinação entre Anfotericina B com Fluconazol, embora o Fluconazol não seja tão recomendado para a fase de manutenção (SASAKI *et al.*, 2022). Nos casos de meningoencefalite causada por criptococose segue a mesma recomendação, ajustada de acordo com o quadro do paciente em três fases: indução, consolidação e manutenção (PERFECT *et al.*, 2010).

2.2 COMPOSTOS TESTE

2.2.1 Quitosana

Ao se utilizar a quitosana como um método alternativo com efeito antifúngico, caso desse trabalho, é necessário explicar o que é esse polissacarídeo. A quitosana é um produto resultante da desacetilação parcial da quitina, segundo polímero mais abundante do mundo (DE MELO *et al.*, 2023). A quitina está na composição das conchas de crustáceos, assim como compõe a parede celular de espécies fúngicas. Sendo seu produto, a quitosana, considerada um recurso biocompatível com sistemas biológicos, atóxico, biodegradável, além de possuir ação antimicrobiana (DE MELO BARROS *et al.*, 2020).

O potencial de ação da quitosana depende do nível de desacetilação e de fatores extrínsecos, como outros nutrientes utilizados juntos ao polissacarídeo, substratos químicos e condições ambientais, ainda de acordo com De Melo Barros e *et al.* (2020). Sua utilização em pesos moleculares diferentes está relacionada à sua ação antimicrobiana, se mostrando variável e possuindo especificidades em baixo, médio e alto peso molecular (GARCIA *et al.*, 2020). O tamanho ao qual está submetida, micropartículas por exemplo, pode influenciar idem a sua ação antimicrobiana (GARCIA *et al.*, 2023).

A utilização da quitosana na indústria mostra-se cada vez mais versátil, atraindo a atenção da comunidade científica para seu uso antifúngico. Na indústria alimentícia, através da técnica de gelificação iônica, sua utilização como nanopartículas associada a óleos essenciais, prata, cobre e outros, protege os alimentos da proliferação fúngica (DA COSTA MEDEIROS *et al.*, 2021). Outro estudo utilizou a quitosana para combater a infecção antimicrobiana de patógenos do bicho da seda, entre eles *Staphylococcus aureus* e *Aspergillus flavus*, com registro de maior atividade com concentrações seriadas de 100 µg/ml (EL-ADLY *et al.*, 2022).

A técnica de encapsulamento se faz imprescindível para a proteção dos óleos essenciais, uma vez que estes são limitados por suas características biológicas. As condições de luminosidade e temperatura afetam a estrutura dos óleos essenciais, diminuindo sua eficácia, de modo que o encapsulamento por nanopartículas os protege de tais intempéries (GARCIA *et al.*, 2021).

2.2.2 Óleos essenciais de capim-limão e de gerânio

Os óleos essenciais de maneira geral, produto do metabolismo secundário das plantas, têm sido utilizados na indústria farmacêutica, alimentícia e cosmética (BOLOURI *et al.*, 2022). Não obstante, o uso das suas propriedades antimicrobianas tem sido avaliado em estudos *in vitro*, conferindo à comunidade científica certa animosidade pela sua viabilidade (OLIVEIRA & MORAIS, 2019).

As folhas da erva capim-limão são consumidas através de chás e infusões com objetivo de curar cólicas, agir como anti-inflamatório, tratar má digestão, entre outros benefícios que populares atribuíram (DE MORAIS *et al.*, 2023). O óleo essencial mostrou eficiência contra bactérias e fungos, sendo sua ação antifúngica sendo comprovada contra *Candida* spp (DOMINGUES & PAIVA, 2021).

A composição química do óleo essencial de capim-limão conta com a presença de bioativos como neral, isoneral, geranial, entre outros que constituem os principais da maioria das espécies de capim-limão. Pode ocorrer variação na composição desse óleo essencial a depender do desenvolvimento da planta, do método de extração e do solvente utilizado nesse processo (MUKARRAM *et al.*, 2021).

Já o óleo essencial de gerânio também tem uso similar pelos populares, além de demonstrar potencial de inibição contra a levedura *Candida* spp, inibindo e impedindo o desenvolvimento do patógeno (FERRÃO *et al.*, 2020). Em relação a sua composição química, seus principais constituintes são citronelol e geraniol. A atividade do óleo essencial de gerânio junto a quitosana através de uma nanoemulsão com hidrogel já demonstrou potencial de tratamento contra candidíase vaginal (DOS SANTOS *et al.*, 2020).

De forma ampla, os óleos essenciais costumam apresentar variados mecanismos de ação. Entre eles, o principal a ser citado é o efeito da interação entre o óleo e a membrana plasmática/parede celular dos microrganismos, impedindo o crescimento do biofilme (DE SOUZA FONTES *et al.*, 2021). Essa interação se dá pela natureza volátil e lipofílica que os óleos têm; possuindo capacidade de desestabilizar a membrana e inibir a síntese da mesma através de complexo de transferência de carga (MUKARRAM *et al.*, 2021).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar a atividade antifúngica das nanopartículas de quitosana de baixo peso molecular, de quitosana de baixo peso molecular/capim-limão e de quitosana do baixo peso molecular/gerânio em células planctônicas e em biofilmes maduros de *Cryptococcus spp.*

3.2 Objetivos específicos

- Analisar o perfil de sensibilidade de células planctônicas de espécies do complexo *C. neoformans/ C. gattii* frente às nanopartículas da quitosana de baixo peso molecular isoladamente.
- Avaliar o perfil de sensibilidade de células planctônicas de espécies do complexo *C. neoformans/ C. gattii* frente às nanopartículas da quitosana de baixo peso molecular combinadas ao óleo essencial de capim-limão.
- Averiguar o perfil de sensibilidade de células planctônicas de espécies do complexo *C. neoformans/ C. gattii* frente às nanopartículas da quitosana de baixo peso molecular combinadas ao óleo essencial de gerânio.
- Avaliar o perfil de sensibilidade dos biofilmes das espécies de espécies do complexo *C. neoformans/C. gattii* frente às nanopartículas da quitosana de baixo peso molecular isoladamente.
- Avaliar o perfil de sensibilidade dos biofilmes das espécies das espécies do complexo *C. neoformans/C. gattii* frente às nanopartículas da quitosana de baixo peso molecular combinadas ao óleo essencial de capim-limão.
- Avaliar o perfil de sensibilidade dos biofilmes das espécies de espécies do complexo *C. neoformans/C. gattii* frente às nanopartículas da quitosana de baixo peso molecular combinadas ao óleo essencial de gerânio.

4 METODOLOGIA

4.1 Local de estudo

As pesquisas para esse trabalho foram desenvolvidas nos laboratórios do CEMM (Centro Especializado em Micologia Médica), da Universidade Federal do Ceará (UFC).

4.2 Microrganismos

Um total de 12 cepas pertencentes ao complexo *Cryptococcus neoformans*/*Cryptococcus gattii* e uma cepa de *Candida parapsilosis* ATCC 22019, sendo a última citada usada como controle, foram testadas neste estudo, todas pertencentes à Micoteca do CEMM da Universidade Federal do Ceará. Em toda a experimentação, as cepas utilizadas foram cultivadas em meio ágar batata dextrose por 48 h, à 28 °C.

4.3 Drogas teste

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 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 da nanopartícula foi ajustado para 4,5, obtendo-se nanopartículas de quitosana de baixo peso molecular/capim-limão e nanopartículas de quitosana de baixo peso molecular/gerânio. As nanopartículas vazias de lecitina/quitosana foram sintetizadas com o método descrito acima usando uma solução de lecitina sem óleos essenciais.

4.4 Ensaio de sensibilidade planctônica

O teste de susceptibilidade foi realizado com 12 cepas de *C. neoformans* / *C. gattii* e uma cepa de *Candida parapsilosis* ATCC 22019, por meio da técnica de

microdiluição em caldo, conforme o documento M27- 4th, que padroniza a sensibilidade de leveduras (CLSI, 2017). As drogas antifúngicas clássicas usadas no tratamento da criptococose, Anfotericina B e Fluconazol, foram testadas como controle. Os isolados foram previamente semeados em ágar batata e incubados em estufa a 35 °C por 48 horas. Foi preparado um inóculo das leveduras em solução salina estéril (0,85% NaCl), ajustando a turbidez da suspensão à escala 0,5 de McFarland. A suspensão fúngica foi submetida à diluição de 1:50 e, posteriormente, a 1:20 em meio RPMI-1640 tamponado com 0,165 M de MOPS a pH 7,0. Alíquotas de 100 µL do inóculo final foram adicionadas às placas já contendo 100 µL de RPMI-1640, suplementadas das drogas, distribuídas em diluições seriadas decrescentes. As placas foram incubadas a 35 °C por 72 horas. As leituras dos pontos de corte das drogas foram determinadas pelo MIC100 de acordo com documento M27-A4 (CLSI, 2017).

4.5 Ensaio de sensibilidade do biofilme

O efeito das nanopartículas de quitosana na formação de biofilme foi avaliado baseado em Brilhante *et al.* (2020). Assim, 6 cepas de *C. neoformans* e 6 cepas de *C. gattii* foram cultivadas em ágar batata dextrose a 35 °C por 48 h. Em seguida, os inóculos foram preparados em RPMI 1640 e ajustados para turbidez na escala 0,5 de McFarland. Alíquotas de 200 µL foram transferidas para placas de 96 poços. Após 72 h de maturação do biofilme, foram acrescentadas as quitosanas em concentrações a partir de 8× concentração inibitória mínima (CIM) 100%. O biofilme foi analisado após incubação de 35 °C por 48 h. O crescimento de biofilme livre de drogas foi incluído como controle de crescimento. Em seguida, a biomassa do biofilme foi quantificada por coloração com cristal violeta com leitura espectrofotométrica a 540 nm. A atividade metabólica do biofilme foi avaliada utilizando o ensaio de redução do brometo de 3-4,5-dimetil-tiazol-2-il-2,5-difeniltetrazólio (MTT) com leitura espectrofotométrica a 540 nm.

4.6 Análise estatística

Todos os experimentos foram realizados em três repetições independentes. Todos os testes utilizaram o software GraphPad Prism 8.0 (GraphPad Software, San

Diego, CA, USA). Em todas as situações, o nível máximo de significância adotado para rejeitar a hipótese de nulidade será de 5%.

5 RESULTADOS

5.1 Avaliação do efeito das nanopartículas de quitosana, de quitosana/capim-limão, quitosana/gerânio sobre as células planctônicas do complexo *Cryptococcus neoformans/Cryptococcus gattii*

Os dados referentes à sensibilidade das cepas planctônicas estão descritos na Tabela 1. Todas as cepas do complexo *C. neoformans/C. gattii* foram inibidas pelas nanopartículas de quitosana de baixo peso molecular, de quitosana de baixo peso molecular combinadas ao óleo essencial de capim-limão e de quitosana de baixo peso molecular combinadas ao óleo essencial de gerânio. Os valores de CIM variaram de 128 a 512 µg/ml para nanopartículas de quitosana de baixo peso molecular. Em relação às nanopartículas de quitosana de baixo peso molecular combinadas aos óleos essenciais, pode-se observar, conforme a Tabela 1, que a CIM variou entre 128 e 256 µg/ml para nanopartículas de quitosana de baixo peso molecular/capim-limão e para nanopartículas de quitosana de baixo peso molecular/gerânio.

Tabela 1. Atividade antifúngica planctônica, *in vitro*, das nanopartículas de quitosana baixo peso molecular, quitosana baixo peso molecular/capim-limão e quitosana baixo peso molecular/gerânio frente a cepas do complexo de *Cryptococcus* spp.

| Espécies | Cepas | Nanopartículas | | |
|----------------------------|------------------|------------------------|------------------------------------|--------------------------------|
| | | Quitosana/ Lecitina | Quitosana/Lecitina/Capim -Limão | Quitosana/Lecitina/ Gerânio |
| | | CIM (µg/ml) | CIM (µg/ml) | CIM (µg/ml) |
| | | 100% | 100% | 100% |
| <i>Cryptococcus gattii</i> | CEMM 03-1-104 | 128 | 256 | 128 |
| | CEMM 03-1-109 | 256 | 256 | 256 |
| | CEMM 03-1-110 | 128 | 256 | 256 |

| | | | | |
|------------------------------------|------------------|-----|-----|-----|
| | CEMM 03-1-112 | 512 | 128 | 128 |
| | CEMM 03-1-116 | 128 | 128 | 256 |
| | CEMM 03-1-117 | 256 | 128 | 128 |
| <i>Cryptococcus neoformans</i> | CEMM 03-1-118 | 128 | 128 | 128 |
| | CEMM 03-1-119 | 256 | 128 | 128 |
| | CEMM 03-1-120 | 128 | 256 | 256 |
| | CEMM 03-1-121 | 256 | 128 | 128 |
| | CEMM 03-1-123 | 128 | 256 | 256 |
| <i>Candida parapsilosis</i> | ATCC 90113 | 128 | 128 | 256 |

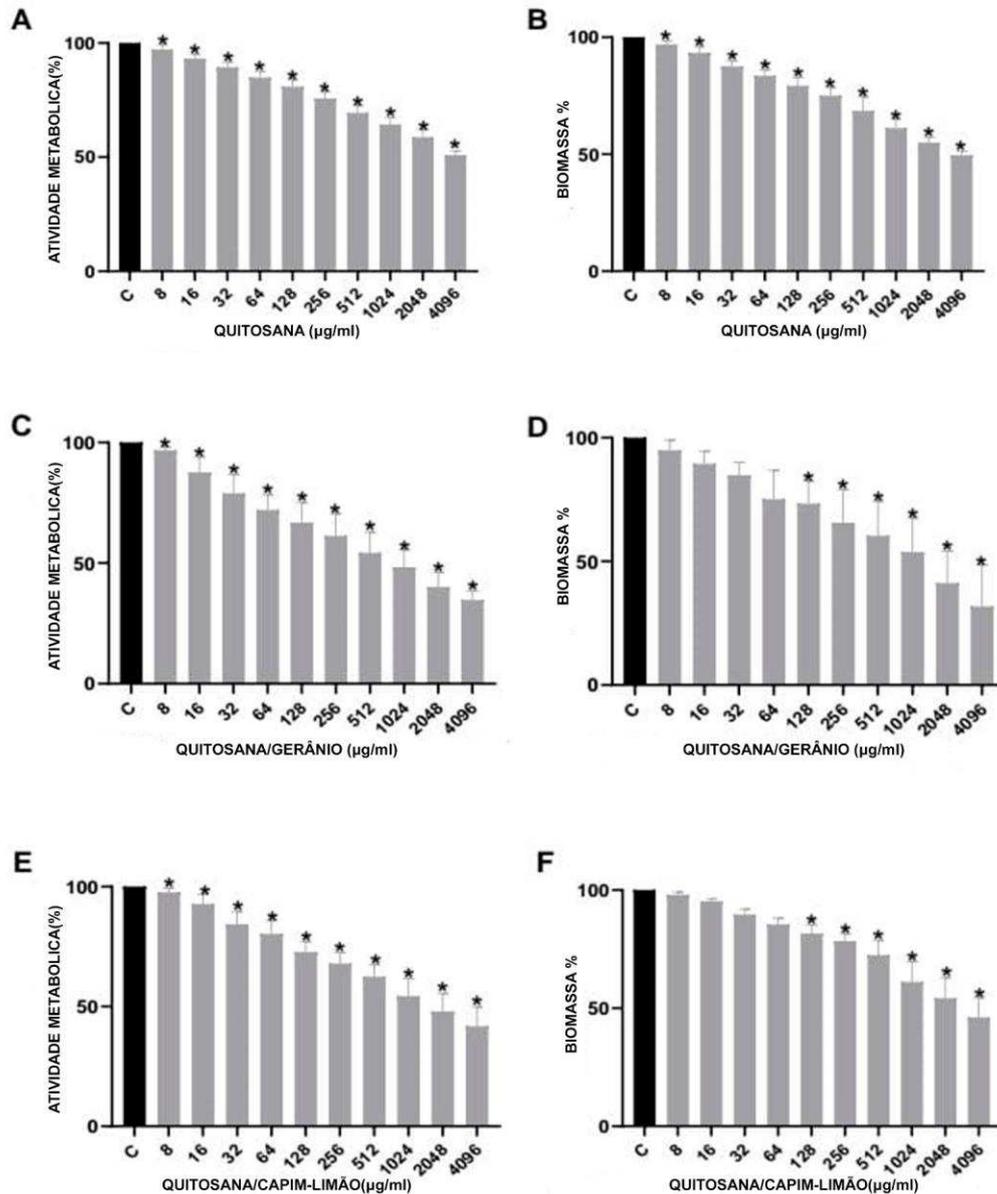
*CIM: Concentração inibitória mínima.

5.2 Avaliação do efeito das nanopartículas de quitosana, de quitosana/capim-limão, quitosana/gerânio sobre biofilmes maduros do complexo *Cryptococcus neoformans/Cryptococcus gattii*

Nos biofilmes, as reduções da atividade metabólica de espécies do complexo *C. neoformans/ C. gatti* frente às nanopartículas de quitosana utilizada na sensibilidade do biofilme maduros, demonstrou que na maior concentração testada de 4096 µg/ml teve redução de aproximadamente 49% (Figura 1A), para as nanopartículas combinadas ao óleo essencial de gerânio observa-se 65% na inibição (Figura 1C) e para as nanopartículas de quitosana combinadas ao óleo essencial de capim-limão nota-se 58% de redução (Figura 1E). Na biomassa, a redução dos biofilmes frente às nanopartículas de quitosana, na maior concentração de 4096

$\mu\text{g/ml}$, apresenta uma redução em torno de 50% (Figura 1B). No que se refere às nanopartículas de quitosana encapsuladas ao óleo essencial de gerânio observa-se uma redução de cerca de 68%, na maior concentração de 4096 $\mu\text{g/ml}$ (Figura 1D), da biomassa do *Cryptococcus* spp. Em relação às nanopartículas de quitosana combinadas ao óleo de capim-limão observou-se que na biomassa houve inibição de cerca de 53% do crescimento na concentração de 4096 $\mu\text{g/ml}$ (Figura 1F).

Figura 3. Sensibilidade *in vitro* de biofilmes maduros de espécies do complexo *C. neoformans/ C. gattii* exposto às nanopartículas de quitosana de baixo peso molecular, das nanopartículas combinadas ao óleo essencial de gerânio e das nanopartículas combinadas ao óleo essencial de capim-limão.



Legenda: Atividade metabólica e biomassa de biofilmes do complexo *C. neoformans/ C. gattii* expostos a diferentes concentrações de quitosana de baixo peso molecular. A, C e E: Atividade metabólica do biofilme exposta às nanopartículas. B, D e F: Biomassa de biofilme exposta às nanopartículas. *: diferenças estatísticas $P < 0,05$ em relação ao controle (C) livre de nanopartículas.

6 DISCUSSÃO

Neste trabalho, avaliou-se a performance das nanopartículas de quitosana de baixo peso molecular de forma isolada e a combinação entre as nanopartículas de quitosana de baixo peso molecular com o óleo essencial de capim-limão e com o óleo essencial de gerânio. Embora o uso isolado das nanopartículas tenha apresentado inibição tanto em células planctônicas quanto biofilme, as combinações dos óleos essenciais encapsulados pelas nanopartículas apresentaram melhor performance de redução nos biofilmes maduros.

Ainda são poucos os trabalhos que testam a quitosana, em diferentes pesos moleculares ou diferentes tamanhos moleculares, disponíveis no meio acadêmico. Portanto os dados amostrados abaixo são prospecções otimistas, tendo em vista que os microrganismos dos estudos citados, embora sejam fungos patógenos, possuem características e comportamentos diferentes. Com relação aos mecanismos de ação dos óleos essenciais contra microrganismos, é relatada capacidade de desestabilizar as membranas e paredes biológicas por meio de um complexo de transferência de carga (MUKARRAM *et al.*, 2021).

As nanopartículas de quitosana de baixo peso molecular, neste estudo, apresentaram 100% de inibição nas células planctônicas de espécies do complexo *C. neoformans/C. gatti*, variando de 128 - 512 µg/ml. O baixo peso molecular, comparado a outros pesos moleculares maiores, pode ser um fator que melhora o desempenho da quitosana devido ao seu potencial de penetração, adentrando membranas biológicas com facilidade (FILHO *et al.*, 2020). O mesmo se aplica às nanopartículas.

Com relação ao uso das nanopartículas de quitosana de baixo peso molecular combinadas aos óleos, também se averiguou que todas as cepas de espécies do complexo *C. neoformans/C. gattii* apresentaram as concentrações mínimas inibitórias variando de 128-256 µg/ml para nanopartículas com ambos os óleos, capim-limão e gerânio, em células planctônicas. No trabalho de Garcia *et al.* (2021), micropartículas de quitosana combinadas aos óleos essenciais de capim-limão e gerânio são utilizados contra células planctônicas e biofilmes de *Candida albicans*, uma levedura. Sendo apresentados valores de MIC variando entre 64-512 µg/ml para micropartículas de quitosana isoladas, 4-128 µg/ml para combinação micropartículas de quitosana/óleo de capim-limão e 4-256 µg/ml para combinação micropartículas de

quitosana/óleo de gerânio. Quando comparados os valores da inibição nas células planctônicas entre os dois trabalhos é possível notar que são valores que apresentam similaridade.

As nanopartículas de quitosana de baixo peso molecular testadas isoladas na concentração de 4098 µg/ml frente ao biofilme maduro das espécies do complexo *C.neoformans/C. gattii* apresentaram reduções de 49% e 50%, na atividade metabólica e na biomassa respectivamente. Os resultados da sensibilidade do biofilme mostram que o óleo essencial de capim-limão encapsulado pelas nanopartículas na concentração de 4098 µg/ml apresentou redução de 58% e 53% na atividade metabólica e biomassa respectivamente. O óleo essencial de gerânio encapsulado pelas nanopartículas na concentração de 4098 µg/ml apresentou redução entre 65% e 68% na atividade metabólica e biofilme, tendo melhor desempenho na biomassa.

De acordo com o estudo de Garcia *et al.* (2023), o encapsulamento dos óleos essenciais de capim-limão e gerânio apresentou efeito antimicrobiano ao reduzir o biofilme misto das espécies *Streptococcus mutans* e *Candida albicans*. Tanto as micropartículas de quitosana isoladas quanto sua combinação com os óleos essenciais apresentaram inibição próxima ou maior que 50% na maior concentração testada de 4098 µg/ml, tendo uma melhor inibição a combinação entre as micropartículas encapsulando o óleo essencial de capim-limão. Também apresentando valores similares a este estudo.

Segundo Rêgo (2019), a estrutura química da quitosana é favorável a interação com cargas negativas, sejam de polímeros ou outras moléculas, por conta dos 3 agrupamentos funcionais ativos em sua conformação - um grupo amino no Carbono 2, uma hidroxila no Carbono 3 e uma outra hidroxila no Carbono 6. Quaisquer variações nesses agrupamentos podem surgir modificações das suas propriedades, sendo possível variadas aplicações e usos, comprovando assim sua versatilidade ao ser utilizadas junto a outros compostos.

Embora os óleos essenciais sejam eficazes contra microrganismos, como fungos e bactérias, eles apresentam toxicidade quando utilizados de forma direta para quaisquer tratamentos é inviável devido às limitações biológicas, tais quais a alta volatilidade e degradação quando expostos à temperatura e à luz (DE ASSIS *et al.*, 2023). Por isso, a utilização da técnica de encapsulamento dos óleos essenciais pelas nanopartículas de quitosana, protegendo os óleos essenciais da evaporação,

tornando a toxicidade diminuta após aplicação, utilizando os principais benefícios da quitosana (GARCIA *et al.*, 2021).

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

- As células planctônicas das espécies do complexo *Cryptococcus neoformans/Cryptococcus gattii* testadas neste trabalho apresentaram inibição frente ao uso das nanopartículas de quitosana de baixo peso molecular; das nanopartículas de quitosana de baixo peso molecular/capim-limão e das nanopartículas de quitosana de baixo peso molecular/gerânio.
- Os biofilmes maduros das espécies do complexo *Cryptococcus neoformans/Cryptococcus gattii* testadas neste trabalho apresentaram inibição frente à combinação entre nanopartículas de quitosana de baixo peso molecular; das nanopartículas de quitosana de baixo peso molecular/capim-limão e das nanopartículas de quitosana de baixo peso molecular/gerânio.

REFERÊNCIAS

- ABULREESH, Hussein et al. Diversity, Virulence Factors, and Antifungal Susceptibility Patterns of Pathogenic and Opportunistic Yeast Species in Rock Pigeon Fecal Droppings in Western Saudi Arabia. **Polish Journal of Microbiology**, v. 68, n. 4, p. 493-504, 2019.
- ALMEIDA-PAES, Rodrigo et al. Immunologic diagnosis of endemic mycoses. **Journal of Fungi**, v. 8, n. 10, p. 993, 2022.
- ALVES, Marla Jalene. **Criptococose em pacientes com HIV. 2022. 99 f. Tese (Doutorado em Medicina Tropical)** - Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2022.
- 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.
- ANDRADE, Raquel Barcelos et al. Criptococose pulmonar: Pulmonary cryptococcosis. **Brazilian Journal of Health Review**, v. 5, n. 5, p. 18656-18667, 2022.
- ANDRADE-SILVA, Leonardo Eurípedes et al. Genotyping Analysis of *Cryptococcus deuterogattii* 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.
- ARAÚJO, Renato Kennedy Souza et al. RISCO EMERGENTE DAS INFECÇÕES FÚNGICAS INVASIVAS: REVISÃO DA LITERATURA. **Revista Ibero-Americana de Humanidades, Ciências e Educação**, v. 9, n. 8, p. 1111-1125, 2023.
- BERMAS, Arianne; GEDDES-MCALISTER, Jennifer. Combatting the evolution of antifungal resistance in *Cryptococcus neoformans*. **Molecular microbiology**, v. 114, n. 5, p. 721-734, 2020.
- 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.
- BOLOURI, Parisa et al. Applications of essential oils and plant extracts in different industries. **Molecules**, v. 27, n. 24, p. 8999, 2022.
- CARRIJO, Amanda Vieira et al. Análise clínico-epidemiológica de criptococose em indivíduos com hiv: uma revisão sistemática. **Brazilian Applied Science Review**, v. 5, n. 2, p. 802-817, 2021

CLSI. **Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts. Approved Standard - Fourth Edition.** CLSI document M27. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards, 2017.

DA COSTA MEDEIROS, José Alberto et al. NANOPARTÍCULAS DE QUITOSANA NA CONSERVAÇÃO E PRODUÇÃO DE ALIMENTOS. **AVANÇOS EM CIÊNCIAS E TECNOLOGIAS DE ALIMENTOS**, v 4, p. 417–429, 2021.

DA SILVA FONTINELE, Danilo Rafael et al. Análise clínica e epidemiológica da infecção por criptococose em pacientes do hospital de referência em doenças tropicais de Teresina, Brasil. **Revista Brasileira de Pesquisa em Saúde/Brazilian Journal of Health Research**, v. 24, n. 2, p. 25-34, 2022.

DAMASCENO, Lisandra Serra et al. Cryptococcal meningoenzephalitis: Risk factors associated to death in a hospital in Northeastern Brazil. **Journal of Medical Mycology**, p. 101407, 2023.

DE ASSIS, Alexia Rebecca Macena et al. O USO DE ÓLEOS ESSENCIAIS UTILIZADO COMO TERAPIA COMPLEMENTAR NO TRATAMENTO DA CANDIDÍASE: UMA REVISÃO DA LITERATURA. **Caderno de Graduação-Ciências Biológicas e da Saúde-UNIT-SERGIPE**, v. 8, n. 1, p. 77-89, 2023.

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 CASTRO TEIXEIRA, Anna Paula et al. Antifungal Activity, Antibiofilm and Association Studies with O-Alkylamidoximes against *Cryptococcus* spp. **Chemistry & Biodiversity**, v. 20, n. 3, p. e202200539, 2023.

DE MELO, Elisandra Cibely Cabral et al. Efeito de coberturas comestíveis a base de quitosana e extrato de romã em parâmetros de qualidade de queijo coalho. **Scientia Plena**, v. 19, n. 1, 2023.

DE MELO BARROS, Dayane et al. Utilização de quitosana na conservação dos alimentos. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 4, p. 17717-17731, 2020.

DE MORAIS, Juliana Gomes et al. Potencial antifúngico do *Cymbopogon citratus* ante levedura *Candida albicans* em casos de dermatomicoses. **Seven Editora**, p. 379-399, 2023.

DE OLIVEIRA, Vítor Falcão et al. CRIPTOCOCOSE DISSEMINADA POR *CRYPTOCOCCUS GATTI* EM PACIENTE TRANSPLANTADO RENAL COM FALHA TERAPÊUTICA INICIAL AO FLUCONAZOL. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 26, p. 101914, 2022.

DE SÁ, Nívea Pereira et al. Thiazole derivatives act on virulence factors of *Cryptococcus* spp. **Medical Mycology**, v. 57, n. 1, p. 84-91, 2019.

DE SOUSA, Aline Ellen Duarte et al. Ação antifúngica de óleos essenciais contra podridão de *Fusarium* em melão. **Revista Caatinga**, v. 36, n. 3, p. 486-493, 2023.

DE SOUZA FONTES, Caroline et al. Potencial de nanoemulsões contendo óleos essenciais para o controle alternativo de dermatoses fúngicas em animais domésticos. **TÓPICOS ESPECIAIS EM CIÊNCIA ANIMAL X**, p. 233, 2021.

DINIZ-LIMA, I. et al. *Cryptococcus*: History, Epidemiology and Immune Evasion. **Applied Sciences**, v. 12, n. 14, p. 7086, 2022.

DO CARMO, FN, de Camargo Fenley, J., Garcia, MT et al. *Cryptococcus spp.* e Criptococose: enfocando a infecção no Brasil. **Braz J Microbiol** 53, 1321–1337 2022.

DOMINGUES, Sabrina de Alvarenga; PAIVA, Luiz Francisley de. Atividade antifúngica de *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf frente à leveduras do gênero *Candida sp.* **Revista Fitos**, v. 15, n. 1, p. 22-31, mar. 2021.

DOS REIS, Camila Mara; AZEVEDO, Letícia Maria Soares; DA FONSECA CASTELUBER, Marisa Cristina. *Ruta graveolens*, *Pelargonium graveolens* e *Hibiscus cannabinus* COMO INIBIDORES FARMACOLÓGICOS NATURAIS DO CRESCIMENTO DE *Candida albicans*. **Revista Uningá**, v. 58, p. eUJ4124-eUJ4124, 2021.

DOS SANTOS, Eliete Fernandes; FIGUEIREDO, Erick Frota Gomes. Criptococose: consequência da infecção por *Cryptococcus neoformans* em pacientes com AIDS no Brasil. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 15, p. e150101522591-e150101522591, 2021.

DOS SANTOS, Maíra Kerpel et al. A chitosan hydrogel-thickened nanoemulsion containing *Pelargonium graveolens* essential oil for treatment of vaginal candidiasis. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 56, p. 101527, 2020.

DOS SANTOS, Matheus Henrique et al. Titan Cells and Yeast Forms of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* Are Recognized by GXMR-CAR. **Microorganisms**, [s. l.], 5 set. 2021.

EL-ADLY, AM et al. Avaliação de nanopartículas de quitosana e prata contra patógenos isolados de bicho-da-seda, *Bombyx mori* L. (Lepidoptera: Bombycidae), em condições de laboratório. **Revista Brasileira de Biologia**, v. 82, 2022.

FERRÃO, Simone Krause et al. Atividade antifúngica de óleos essenciais frente a *Candida spp.* **Brazilian journal of health review. Curitiba. Vol. 3, n. 1 (jan./fev. 2020)**, p. 100-113, 2020.

FILHO, SH de Ávila; FERREIRA, P.G. de C.; TARIFAS, NB; SILVA, LAF da. Propriedades físico-químicas, atividades biológicas e resultados obtidos após utilização médica da quitosana e seus derivados. **Revista Brasileira de Desenvolvimento**, [S. l.], v. 12, pág. 95250–95270, 2020.

GALAN, Luis Enrique Bermejo et al. CRIPTOCOCOSE CUTÂNEA SEM ACOMETIMENTO ENCEFÁLICO EM PACIENTE COM SIDA. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 26, p. 101834, 2022.

GARCIA, Lana Glerieide Silva et al. Antifungal activity of different molecular weight chitosans against planktonic cells and biofilm of *Sporothrix brasiliensis*. **International Journal of Biological Macromolecules**, Elsevier, 6 dez. 2020.

GARCIA, Lana Glerieide Silva et al. Chitosan microparticles loaded with essential oils inhibit duo-biofilms of *Candida albicans* and *Streptococcus mutans*. **Journal of Applied Oral Science**, v. 31, p. e20230146, 2023.

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

GUIMARÃES, Luiz Gustavo de Lima et al. Atividades antioxidante e fungitóxica do óleo essencial de capim-limão e do citral. **Revista Ciência Agronômica**, v. 42, p. 464-472, 2011.

HAGEN, Ferry et al. Recognition of seven species in the *Cryptococcus gattii*/*Cryptococcus neoformans* species complex. **Fungal genetics and biology**, v. 78, p. 16-48, 2015.

HEITMAN, J. et al. *Cryptococcus*: from human pathogen to model yeast. **ASM press**, 2011.

HOWARD-JONES, Annaleise R. et al. **Pulmonary Cryptococcosis**. *Journal of Fungi*, [s. l.], 31 out. 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.

KIDD, Sarah E. et al. Characterization of environmental sources of the human and animal pathogen *Cryptococcus gattii* in British Columbia, Canada, and the Pacific Northwest of the United States. **Applied and environmental microbiology**, v. 73, n. 5, p. 1433-1443, 2007.

KWON-CHUNG, K. J. et al. *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*, the etiologic agents of cryptococcosis. **Cold Spring Harbor perspectives in medicine**, v. 4, n. 7, p. a019760, 2014.

LIMA, Patrícia Michelle Nagai de. **Efeitos sinérgicos antimicrobianos da combinação de óleos essenciais de gerânio e lemongrass sobre *Streptococcus mutans*, *Staphylococcus aureus* e *Candida spp.*** 2022. Dissertação (Mestrado em Ciências Aplicadas à Saúde Bucal) - Universidade Estadual Paulista, [S. l.], 2022.

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

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.

MAZIARZ, Eileen K.; PERFECT, John R. Cryptococcosis. **Diagnosis and Treatment of Fungal Infections**, p. 245-265, 2023

MOHAMMADI, Ali *et al.* Nanoencapsulation of Zataria multiflora essential oil preparation and characterization with enhanced antifungal activity for controlling *Botrytis cinerea*, the causal agent of gray mould disease. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, [s. l.], v. 28, p. pages 73-80, 1 jan. 2015.

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.

MUKARRAM, Mohammad et al. Lemongrass essential oil components with antimicrobial and anticancer activities. **Antioxidants**, v. 11, n. 1, p. 20, 2021.

MURRAY, Patrick R. e ROSENTHAL, Ken S. e PFALLER, Michael A. **Microbiologia Médica**. Rio de Janeiro: Elsevier. Acesso em: 14 nov. 2023. 2006.

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.

NOGUCHI, Hiromitsu et al. Cutaneous cryptococcosis. **Medical Mycology Journal**, v. 60, n. 4, p. 101-107, 2019.

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.

NOWAK, Marcela et al. Cutaneous cryptococcosis: an underlying immunosuppression? Clinical manifestations, pathogenesis, diagnostic examinations and treatment. **Advances in Dermatology and Allergology/Postępy Dermatologii i Alergologii**, v. 37, n. 2, p. 154-158, 2020.

OLICÓN-HERNÁNDEZ, Dario Rafael et al. Quitosano y mucílago de *Opuntia ficus-indica* (nopal) como base de una película polimérica comestible para la protección de tomates contra *Rhizopus stolonifer*. **TIP. Revista especializada en ciencias químico-biológicas**, v. 22, 2019.

OLIVEIRA, Silvana; MORAES, Carla Aparecida Pedriali. Desenvolvimento de uma emulsão O/A associada ao óleo essencial de Gerânio (*Pelargonium graveolens*) e ao óleo essencial de palmarosa (*Cymbopogon martinii*). **Brazilian Journal of Natural Sciences**, v.2, p. 127 - 138, 2019.

PAPPAS, Peter G. Cryptococcal infections in non-HIV-infected patients. **Transactions of the American Clinical and Climatological Association**, v. 124, p. 61, 2013.

PRADO, Marli et al. Mortality due to systemic mycoses as a primary cause of death or in association with AIDS in Brazil: a review from 1996 to 2006. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, p. 513-521, 2009.

PERFECT, John R. et al. Clinical practice guidelines for the management of cryptococcal disease: 2010 update by the Infectious Diseases Society of America. **Clinical infectious diseases**, v. 50, n. 3, p. 291-322, 2010.

QUEIROZ-FERNANDES, G.; MAGALHÃES, JC dos S. Perfil de resistência de agentes de micoses oportunistas no Brasil. **Revista Interamericana de Medicina e Saúde**, [S. l.], v. 4, 2021.

RÊGO, Maricleia Freitas et al. Análise bibliográfica dos principais aspectos da criptococose. **Brazilian Journal of Health Review**, v. 2, n. 4, p. 3797-3807, 2019.

RIBEIRO, Aleksandra Salvador; CERQUEIRA, Carla Tereza Ruiz. Criptococose disseminada em paciente imunocompetente: Relato de Caso. **Revista Uningá**, v. 56, n. 4, p. 164-170, 2019.

RODRIGUES, Talita Oliveira; GODOY, Juliana Reis; MALANDRIM, Patrícia; SOSSAI, Vinícius; DE SOUZA, Mariely Thaís. Criptococose em felino: relato de caso. **Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia do CRMV-SP**, São Paulo, v.18, n.3, 2020.

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.

RUDNIK, Camila Ribeiro Batista et al. Epidemiological Findings of Neurocryptococcosis in Immunocompetent Patients: Case Reports from a Public Hospital in Joinville, Brazil. **Revista de Epidemiologia e Controle de Infecção**, v. 10, n. 3, p. 312-317, 2020.

SAIDYKHAN, Lamin; ONYISHI, Chinaemerem U.; MAY, Robin C. The *Cryptococcus gattii* species complex: Unique pathogenic yeasts with understudied virulence mechanisms. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 16, n. 12, p. e0010916, 2022.

SALOMÃO, Reinaldo. Infectologia: Bases clínicas e tratamento. **São Paulo: Gen**, 2017.

SARMENTO, Kênia Kelly Freitas et al. Análise de agentes patogênicos em fezes de pombos da Cidade de Campina Grande–PB. **Pesquisa, Sociedade e Desenvolvimento**, v. 10, n. 10, pág. e387101018717-e387101018717, 2021.

SASAKI, Marli et al. CRIPTOCOCOSE DISSEMINADA POR CRYPTOCOCCUS GATTI COM PERFIL DE RESISTÊNCIA INTERMEDIÁRIO A FLUCONAZOL EM

IMUNOCOMPETENTE-MANEJO E TRATAMENTO DE CASO. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 26, p. 102477, 2022.

SCHÜTZ, F. S. et al. Criptococose pulmonary: relato de caso. **Brazilian Journal of Health Review**, v. 4, n. 5, p. 21898-21903. 2021.

SILVIERO, A. S. et al. Meningoencefalomielite e pneumonia causada por *Cryptococcus* spp. em um gato-relato de caso. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 75, p. 941-946, 2023.

SOUTO, Ana CP et al. Population genetic analysis reveals a high genetic diversity in the Brazilian *Cryptococcus gattii* VGII population and shifts the global origin from the Amazon rainforest to the semi-arid desert in the Northeast of Brazil. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 10, n. 8, p. e0004885, 2016.

TEMFACK, Elvis et al. New insights into *Cryptococcus* spp. biology and cryptococcal meningitis. **Current neurology and neuroscience reports**, v. 19, p. 1-10, 2019.

TUCHTENHAGEN, Henrique Blank et al. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE AMOSTRAS DE QUITOSANA SINTETIZADAS POR DIFERENTES MÉTODOS. **Anais do Salão Internacional de Ensino, Pesquisa e Extensão**, v. 13, n. 3.

VEIGA, Flávia Franco et al. FATORES DE VIRULÊNCIA E SUSCEPTIBILIDADE A ANTIFÚNGICOS DE *Cryptococcus* spp. **Arquivos de Ciências da Saúde da UNIPAR**, v. 24, n. 1, 2020.

VERONESI, Ricardo; FOCACCIA, Roberto. Tratado de Infectologia. v. 1. In: **Tratado de infectologia. v. 1**. 2009. p. 1351-1351.

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

ZHAO, Youbao et al. *Cryptococcus neoformans*, a global threat to human health. **Infectious Diseases of Poverty**, v. 12, n. 1, p. 20, 2023.

ZHAO, Youbao, and XIARONG Lin. "*Cryptococcus neoformans*: sex, morphogenesis, and virulence." **Infection, Genetics and Evolution** 89 (2021): 104731.