

Larissa dos Santos Corrêa

**AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE E DO POTENCIAL
ANTI-*Cryptococcus* DO COMPOSTO DE
COORDENAÇÃO À BASE DE ZINCO COMPLEXADO
A 1,10-FENANTROLINA-5,6-DIONA**



Monografia apresentada ao
Instituto de Microbiologia Paulo
de Góes, da Universidade
Federal do Rio de Janeiro, como
pré-requisito para a obtenção do
grau de Bacharel em Ciências
Biológicas: Microbiologia e
Imunologia.

INSTITUTO DE MICROBIOLOGIA PAULO DE GÓES
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

RIO DE JANEIRO
JULHO / 2025

**Trabalho realizado no Departamento de
Microbiologia Geral do Instituto de
Microbiologia Paulo de Góes, UFRJ, sob
a orientação do Professor André Luis
Souza dos Santos e coorientação de Lucas
Giovanini**

FICHA CATALOGRÁFICA

CIP - Catalogação na Publicação

d824a dos Santos Corrêa, Larissa AVALIAÇÃO
DA TOXICIDADE E DO POTENCIAL ANTI
Cryptococcus DO COMPOSTO DE COORDENAÇÃO À BASE DE
ZINCO COMPLEXADO A 1,10-FENANTROLINA-5,6-DIONA /
Larissa dos Santos Corrêa. -- Rio de Janeiro, 2025.
87 f.

Orientador: André Santos.
Coorientador: Lucas Giovanini.
Trabalho de conclusão de curso
(graduação) Universidade Federal do Rio de
Janeiro, Instituto de Microbiologia, Bacharel em
Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia,
2025.

1. Cryptococcus. 2. Compostos de coordenação. 3.
Galleria mellonella. I. Santos, André, orient. II.
Giovanini, Lucas, coorient. III. Título.

Elaborado pelo Sistema de Geração Automática da UFRJ com os dados fornecidos pelo(a) autor(a), sob a responsabilidade de Miguel Romeu Amorim Neto - CRB-7/6283.

FOLHA DE APROVAÇÃO

INSTITUTO DE MICROBIOLOGIA PAULO DE GÓES / UFRJ COORDENAÇÃO DE ENSINO DE GRADUAÇÃO

ATA DA APRESENTAÇÃO DE MONOGRAFIA PARA APROVAÇÃO NO RCS DE TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO, BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: MICROBIOLOGIA E IMUNOLOGIA

ALUNO(A): Larissa dos Santos Corrêa DRE:120061726

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Leonardo Nimrichter (Presidente)
Prof. Thais Pereira Mello
Prof. Lucimar Kneipp
Prof. Dirlei Nico (Suplente)

Titulo da Monografia: "Avaliação da toxicidade e do potencial anti-*Cryptococcus* do composto de coordenação à base de zinco complexado a 1,10-fenantrolina-5,6-diona"

Local: sala E044 (PPG), IMPG, CCS/UFRJ

Data e hora de início: 03 de julho de 2025 às 13:00h

Em sessão pública, após exposição de cerca de 50 minutos, o aluno foi argüido pelos membros da Banca Examinadora, demonstrando suficiência de conhecimentos e capacidade de sistematização no tema de sua Monografia, tendo, então, obtido nota 10 neste requisito do RCS de TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO. Na forma regulamentar, foi lavrada a presente ata que é assinada pelos membros da banca examinadora, aluno, orientador (e/ou coorientador) e pelo coordenador do RCS.

Rio de Janeiro, 3... de JULHO de 2025.

NOTA:

10

Banca Examinadora:

Leonardo Nimrichter

Prof. Leonardo Nimrichter (Presidente)

10

Thais Pereira de Mello

Prof. Thais Pereira Mello

10

Lucimar Kneipp

Prof. Lucimar Kneipp

Aluno(a):

Larissa dos Santos Corrêa

Larissa dos Santos Corrêa

Orientador(a)

(e coorientador):

André Luis de Souza dos Santos

Lucas Giovanini

Prof. André Luis de Souza dos Santos e Lucas Giovanini

Coordenadora de

TCC:

Marinella Silva Laport

Profa. Marinella Silva Laport

DEDICATÓRIA

Em memoria à Edinah Alves, minha avó materna, uma das minhas maiores inspirações de vida. Uma mulher verdadeiramente guerreira e que desde muito cedo sempre batalhou muito para sobreviver e sustentar seus filhos. Passou por tantas dificuldades que a levaram a construir uma armadura para se proteger de tantos momentos ruins e do seu jeito, demonstrava o quanto amava seus filhos e netos. Mesmo que não conseguisse dizer eu te amo, eu sentia e sigo sentindo seu amor. Obrigada por cuidar de mim, por me ensinar a importância e o valor da família e por ter me ensinado com a sua trajetória de vida que o mundo é sempre cruel e injusto com a mulher, mas que nem por isso deve-se desistir. Foi por ela que eu não desisti e não desistirei de conquistar meu lugar e seguir abrindo as portas para mais mulheres na ciência e pesquisa. Eu sei que daí de cima conseguirá me ver te dando orgulho, indo mais longe do que a senhora sonhou em ir. Eu sigo fazendo ciência em homenagem a você e tantas outras mulheres que não puderam sonhar, estudar porque os tempos eram outros.

AGRADECIMENTOS

Quero agradecer primeiramente à Deus, que sustenta meu espírito e me concede uma nova oportunidade a cada novo dia que nasce. Aos meus pais, Valéria e Ricardo que me ensinaram não só com palavras mas com o exemplo de suas próprias vidas, a transformação que a educação pode gerar na vida de uma pessoa. Muito obrigado por sempre apoiarem desde a Lalázinha que brincava de alquimista com as tintas guaches e corantes de bolo, até a Larissa que decidiu deixar o magistério para persistir no sonho de ser cientista. Ao meu irmão Levi, por me incentivar a perseverar no caminho da educação, pelas broncas que me levaram a amadurecer, por me passar o amor e a conexão profunda com a música, que sempre esteve presente em nosso lar.

As amizades do magistério que seguiram comigo até mesmo depois de seguirmos caminhos diferentes. Sem vocês eu não sobreviveria ao ciclo básico de educação rs. Ellen, Fabi Jessica, Rachel, Sara, Stephanie, obrigada por permanecer.

As amizades do meu curso, meus “micro amigos”! Obrigada por cada momento desde os tempos difíceis da pandemia estudando no período remoto, nossa amizade seguiu mesmo depois do 5º período. Ana, Érica, Lorena, Paloma, sempre seremos o grupo misericórdia no meu coração e que o nosso futuro seja grandioso.

Aos Lucas da minha vida. Um, meu melhor amigo desde a época do ginásio e lá se vão mais de 10 anos de amizade... mesmo seguindo caminhos tão diferentes, sei que sempre posso contar com você e sempre estarei aqui por você também, obrigada por sempre acreditar em mim e por ser meu irmão de coração. O outro, meu grande amor, que me mostrou que Amar não precisa doer, que sempre está ao meu lado me apoiando, torcendo por mim. Obrigada pelo amor, carinho, por ser meu confidente e porto seguro nos momentos de tempestade. Vocês são meu tudo, amo vocês pra sempre.

A todos do LEAMER, ICs, mestrandos, doutorandos, pós-doutoradas e a Denise, cada um foi um pouquinho meu orientador ao longo dessa jornada de iniciação científica, obrigada por compartilharem comigo o conhecimento de vocês e pelos momentos em que a rotina pesada e estressante do laboratório se tornou mais leve e por me acolherem nos momentos difíceis.

Agradeço os meus orientadores André e Marta, por me acolherem e tornarem possível a minha jornada científica, por todo o conhecimento e sabedoria que me passaram, por serem professores tão dedicados e estarem sempre de portas abertas para nos ouvir e aconselhar,

sempre acreditando no potencial de cada aluno de ser cada vez melhor e nos inspirando a lutar pela educação e ciência, tem sido um privilégio e uma honra ser aluna de vocês.

Agradecimento especial aos membros da família *Cryptococcus*. Giovanini, ou como Denise o rebatizou, Java (risos) meu coorientador que está no cotidiano da bancada, colocando meus pés no chão quando os resultados não saem como o esperado ou me fazendo arrancar os cabelos nas correções de escrita. Obrigada pela paciência, por me ensinar tanto, por confiar no meu potencial até quando eu mesma duvido e por me permitir te ensinar um pouquinho também nessa troca aluno-mestre (em breve doutor). Ana Lúcia, que em tão pouco tempo nos tornamos amigas tão próximas, obrigada pelo ombro amigo, os momentos de desabafo, de notícias felizes, de risadas bobas e por me permitir fazer o mesmo por você. A Lucieri, que me orienta no fazer ciência de cada dia juntamente de Giovanini e Ana, me abraçando como parte da família *Cryptococcus*, obrigada pelo carinho e por dividir sua vasta sabedoria e conhecimento comigo.

Aos órgãos de fomento que tornaram este projeto possível, CNPq, PIBIC UFRJ, FAPERJ e CAPES.

RESUMO

LARISSA DOS SANTOS CORRÊA

Avaliação da toxicidade e do potencial anti-*Cryptococcus* do composto de coordenação à base de zinco complexado a 1,10-fenantrolina-5,6-diona

Orientador: André Luis de Souza dos Santos

Coorientador: Lucas Giovanini

A criptococose tem se destacado como uma das principais infecções fúngicas de relevância global, figurando entre as prioridades da Organização Mundial da Saúde (OMS) desde 2022 como um sério problema de saúde pública. Atualmente, o tratamento padrão envolve o uso combinado de anfotericina B, 5-flucitosina e fluconazol. No entanto, o uso de doses elevadas desses antifúngicos está associado a quadros severos de toxicidade comprometendo a segurança terapêutica. Além disso, a crescente frequência de isolamento de cepas resistentes tem contribuído para a redução da eficácia clínica desses tratamentos. Diante desse cenário, investigamos a atividade antifúngica do composto de coordenação Zn²⁺-fendiona contra três isolados clínicos de *Cryptococcus gattii* (23, 25 e 27) e três de *Cryptococcus neoformans* (213, 223 e 350). A estrutura química do composto em estudo não foi apresentada, em razão de a rota sintética estar atualmente em processo final de redação visando ao depósito de patente. A concentração inibitória mínima (CIM) do composto foi de 6,25 µM para todas as cepas testadas, exceto para a cepa 223, cuja CIM foi de 3,125 µM. Nas análises *in silico* realizadas com o programa Swiss ADME, Zn²⁺-fendiona apresentou poucas infrações às regras dos filtros Lipinski, Ghose, Muegge, Egan e Veber; uma alta absorção gastrointestinal e moderada permeabilidade cutânea, além de ser possível sua metabolização pelas principais isoenzimas do citocromo P450 e excreção pela glicoproteína-P, sugerindo que Zn²⁺-fendiona apresenta baixa toxicidade. No ensaio de toxicidade *in vitro*, o composto não induziu lise de eritrócitos de carneiro até a concentração de 125 µM, apresentando índice de seletividade (IS) >20 para todas as cepas de *C. gattii* e *C. neoformans* exceto, para a cepa 223 de *C. neoformans* com >40. Em modelo *in vivo*, larvas de *Galleria mellonella* inoculadas com até 1000 µM de Zn²⁺-fendiona, apresentaram 90%, de sobrevivência e IS >160 para *C. gattii* e *C. neoformans* exceto para a cepa 223 de *C. neoformans* com >320. Além disso, foi observado um aumento na densidade de hemócitos de larvas expostas a doses diárias de 62,5 µM por até cinco dias, sugerindo possível modulação imunológica. Os resultados obtidos neste trabalho indicam que o composto Zn²⁺-fendiona possui atividade promissora contra *Cryptococcus* spp., aliada a baixa toxicidade nos modelos de *G. mellonella* e em eritrócitos de carneiro, configurando-se como um candidato promissor a novo agente antifúngico.

Palavras-chave: *Cryptococcus*, compostos de coordenação, *in vivo*, *Galleria mellonella*, Swiss ADME

ABSTRACT

LARISSA DOS SANTOS CORRÊA

Evaluation of the toxicity and anti-*Cryptococcus* potential of a zinc-based coordination compound complexed with 1,10-phenanthroline-5,6-dione

Advisor: André Luis de Souza dos Santos

Co-advisor: Lucas Giovanini

Cryptococcosis has emerged as one of the major fungal infections of global relevance, and since 2022 it has been listed among the World Health Organization (WHO) priorities as a serious public health concern. Currently, the standard treatment involves the combined use of amphotericin B, 5-flucytosine, and fluconazole. However, the use of high doses of these antifungals is associated with severe toxicity, compromising therapeutic safety. In addition, the increasing frequency of resistant strain isolation has contributed to a reduction in the clinical efficacy of these treatments. In this context, we investigated the antifungal activity of the coordination compound Zn²⁺-fendione against three clinical isolates of *Cryptococcus gattii* (23, 25, and 27) and three of *Cryptococcus neoformans* (213, 223, and 350). The chemical structure of the compound under study was not disclosed, as the synthetic route is currently in the final stages of drafting for patent filing. The minimum inhibitory concentration (MIC) of the compound was 6.25 µM for all tested strains, except for strain 223, for which the MIC was 3.125 µM. *In silico* analyses performed using the SwissADME software showed that Zn²⁺-fendione had few violations of the Lipinski, Ghose, Muegge, Egan, and Veber filter rules; high gastrointestinal absorption; and moderate skin permeability. Additionally, it was predicted to be metabolized by major cytochrome P450 isoenzymes and excreted via P-glycoprotein, suggesting that Zn²⁺-fendione has low toxicity. In the *in vitro* toxicity assay, the compound did not induce lysis of sheep erythrocytes at concentrations up to 125 µM, presenting a selectivity index (SI) >20 for all *C. gattii* and *C. neoformans* strains, except for *C. neoformans* strain 223, for which SI was >40. In an *in vivo* model, *Galleria mellonella* larvae inoculated with up to 1000 µM of Zn²⁺-phendione showed 90% survival and SI >160 for *C. gattii* and *C. neoformans*, except for *C. neoformans* strain 223, for which SI was >320. Moreover, an increase in hemocyte density was observed in larvae exposed to daily doses of 62.5 µM for up to five days, suggesting possible immunomodulatory activity. The results obtained in this study indicate that Zn²⁺-phendione exhibits promising activity against *Cryptococcus* spp., along with low toxicity in *G. mellonella* and sheep erythrocytes, positioning it as a promising candidate for a new antifungal agent.

Key-words: *Cryptococcus*, coordination compounds, *in vivo*, *Galleria mellonella*, Swiss ADME

RESUMO PARA LEIGOS

LARISSA DOS SANTOS CORRÊA

Orientador: André Luis de Souza dos Santos

Coorientador: Lucas Giovanini.

Avaliação de um composto químico como novo candidato para tratamento contra criptococose

A criptococose, também conhecida como “doença do pombo”, é uma infecção causada pelo fungo *Cryptococcus* que acomete os pulmões e cérebro de indivíduos infectados causando pneumonia grave e meningite. O paciente infectado encontra vários desafios no tratamento, pois diversos fungos como *Cryptococcus* tem se tornado cada vez mais resistentes aos medicamentos utilizados, que por sua vez, também são muito tóxicos para o paciente, se tornando um desafio no tratamento dessas infecções, principalmente para grupos de risco, como pessoas que convivem com síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA/AIDS), idosos, indivíduos com imunidade baixa. Com isso, o objetivo deste estudo foi avaliar um medicamento em desenvolvimento a base de zinco, em relação ao seu nível de toxicidade e efeito antifúngico. Observamos que pequenas doses desse composto são capazes de eliminar o fungo causador da “doença do pombo”. Além disso, através de simulações em aplicativos, testes com células sanguíneas e experimentos em insetos, observamos que esse medicamento não é tóxico. Esses resultados animadores sugerem uma possível nova opção para tratar criptococose.

Palavras-chave: doença do pombo, meningite, novos medicamentos

ÍNDICE

FICHA CATALOGRÁFICA	iii
FICHA CATALOGRÁFICA.....	iii
FOLHA DE APROVAÇÃO.....	iv
DEDICATÓRIA	v
AGRADECIMENTOS	vi
RESUMO.....	viii
ABSTRACT	ix
RESUMO PARA LEIGOS	x
ÍNDICE.....	xi
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	xiii
LISTA DE TABELAS.....	xiv
LISTA DE FIGURAS	xv
1. INTRODUÇÃO.....	16
1.1 <i>Cryptococcus</i> spp.....	16
1.3 Criptococose	17
1.3.1 Patogênese.....	17
1.3.2 Epidemiologia	20
1.4 Tratamento	23
1.5 Compostos de coordenação e suas aplicações	26
1.6 Derivados de fendiona e seus efeitos antimicrobianos	27
1.7 Propriedades medicinais e aplicações farmacológicas do zinco.....	30
1.8 <i>Galleria mellonella</i> : modelo <i>in vivo</i>	33
2. JUSTIFICATIVA	36
3. OBJETIVOS.....	37
3.1 Objetivo geral	37
3.2 Objetivos específicos.....	37
4. MATERIAIS E MÉTODOS	38
4.1 Fungos e cultivo celular.....	38

4.1.1 Microrganismos.....	38
4.1.2 Estocagem das cepas	38
4.1.3 Cultivo celular.....	38
4.2 Composto de coordenação Zn ²⁺ -fendiona	38
4.3 Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM) da fendiona, sal zinco e complexo Zn ²⁺ -fendiona	39
4.4 Avaliação da estabilidade da atividade do composto de coordenação Zn ²⁺ -fendiona, em estoques à temperatura ambiente	39
4.5 Previsão do potencial terapêutico e avaliação dos parâmetros farmacocinéticos do Zn ²⁺ - fendiona	40
4.6 Ensaio de hemólise	40
4.7 Ensaios de toxicidade <i>in vivo</i>	41
4.7.1 Toxicidade aguda	41
4.7.2 Toxicidade crônica	42
4.8 Índice de seletividade.....	42
4.9 Análises estatísticas	43
5. RESULTADOS	44
5.1 CIM e CFM.....	44
5.2 Avaliação da estabilidade do composto de coordenação Zn ²⁺ -fendiona, em estoques à temperatura ambiente.....	45
5.3 Previsão do potencial terapêutico e avaliação dos parâmetros farmacocinéticos do Zn ²⁺ - fendiona	46
5.4 Ensaio de hemólise	50
5.5 Ensaios de toxicidade <i>in vivo</i>	51
5.5.1 Toxicidade aguda	51
5.5.2 Toxicidade crônica	53
5.6 Índice de seletividade.....	55
6. DISCUSSÃO	56
7. CONCLUSÕES	66
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	67
9. PRODUÇÃO E PARTICIPAÇÃO CIENTÍFICA.....	87

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- ADME – Absorção, Distribuição, Metabolização e Excreção
- BHE – Barreira Hematoencefálica
- CIM – Concentração Inibitória Mínima
- CFM – Concentração Fungicida Mínima
- EROs – Espécies Reativas de Oxigênio
- GalXM – Galactoxilomananas
- GXM – Glucuroxilomanano
- GXMGal – Glucuronoxilomananagalactano
- HBMECs – Células Microvasculares Cerebrais Humanas Endoteliais (do inglês - *Human Brain Microvascular Endothelial Cells*)
- HIV – Vírus da Imunodeficiência Humana (do inglês – *Human Immunodeficiency Virus*)
- IFN γ – Interferon Gama
- IL-6 – Interleucina-6
- IL-12 – Interleucina-12
- iNOS – Sintase de Óxido Nítrico Indutível (do inglês - *Inducible Nitric Oxide Synthase*)
- LCR – Líquido Cefalorraquidiano
- MG-CIM – Média Geométrica da Concentração Mínima Inibitória
- MPR-1 – Metaloprotease 1
- NO – Óxido Nítrico
- OMS - Organização Mundial da Saúde
- SARS-CoV-2 - Síndrome Respiratória Aguda Grave - Coronavírus 2
- SIDA – Síndrome de Imunodeficiência Adquirida
- SNC – Sistema Nervoso Central
- STAT-1 – Sinal Transdutor e Ativador de Transcrição 1
- TARV - Terapia Antirretroviral Altamente Ativa
- Th-1 – Linfócito T Auxiliar -1 (do inglês – *T Helper-1 Lymphocyte*)
- THP-1 – Linhagem Celular Derivada de Monócitos Humanos
- TNF – Fator de Necrose Tumoral (do inglês – *Tumoral Necrose Factor*)

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Classificação de espécies de <i>Cryptococcus</i>	17
Tabela 2 - Lista da OMS	21
Tabela 3 – Estimativa da prevalência global de meningite criptocócica e morte associadas a meningite criptocócica.....	22
Tabela 4 – Concentração Inibitória Mínima (CIM) da fendiona, derivado metálico Zn ²⁺ -fendiona e sal de zinco em µg/mL.....	44
Tabela 5 – Concentração Fungicida Mínima (CFM) da fendiona e derivado metálico Zn ²⁺ -fendiona em µg/mL	45
Tabela 6 – Avaliação de estabilidade da atividade anti- <i>Cryptococcus</i> de Zn ²⁺ -fendiona	46
Tabela 7 – Previsão do potencial terapêutico dos compostos Zn ²⁺ -fendiona, Anfotericina B e Fluconazol	48
Tabela 8 – Propriedades farmacocinéticas dos compostos Zn ²⁺ -fendiona, Anfotericina B e Fluconazol	50
Tabela 9 – Índice de seletividade do composto de coordenação Zn ²⁺ -fendiona	55

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Microscopia de campo claro da cápsula polissacarídica de Cryptococcus.....	18
Figura 2: Ciclo de infecção de Cryptococcus	20
Figura 3: Correlação entre número de casos de infecções criptocócicas e condições da disponibilidade de diagnóstico e tratamento em cada país	26
Figura 4: Atividade hemolítica do composto de Zn ²⁺ -fendiona	51
Figura 5: Gráfico de sobrevivência das larvas de <i>G. mellonella</i> inoculadas com o composto de coordenação Zn ²⁺ -fendiona, em toxicidade aguda	52
Figura 6: Ensaio de densidade de hemócitos das larvas <i>G. mellonella</i> inoculadas ou não com o composto de coordenação Zn ²⁺ -fendiona	53
Figura 7: Gráfico de sobrevivência das larvas de <i>G. mellonella</i> inoculadas com o composto de coordenação Zn ²⁺ -fendiona, em toxicidade crônica	53
Figura 8: Ensaio de densidade de hemócitos das larvas <i>G. mellonella</i> inoculadas ou não com o composto de coordenação Zn ²⁺ -fendiona em toxicidade crônica	54

1. INTRODUÇÃO

1.1 *Cryptococcus* spp.

Cryptococcus é um gênero de fungos leveduriformes encontrados no ambiente, apresentando ampla distribuição global (Uejio *et al.*, 2015; Cigliati, 2021). Os principais complexos de espécies desse gênero, *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii*, apresentam predileção a diferentes ambientes, sendo os principais reservatórios do complexo *C. neoformans* solos com fezes de aves (principalmente pombos) e resíduos vegetais (Raso *et al.*, 2004; Abegg *et al.*, 2006; Diaz, 2019); enquanto o complexo *C. gattii* pode ser encontrado principalmente em troncos ocos de árvores na natureza ou utilizadas no paisagismo de cidades, em aves da família dos Psitacídeos (papagaios, araras, periquitos, dentre outros) e em resíduos de solos contaminados (Uejio *et al.*, 2015; Nascimento *et al.*, 2016; Diaz, 2019). Nas últimas décadas as mudanças climáticas têm contribuído para a ampliação da distribuição geográfica do gênero *Cryptococcus* (Uejio *et al.*, 2015; Vanhove *et al.*, 2017; Rickerts, 2019; Cigliati, 2021).

Diversos estudos genômicos foram feitos para classificar da melhor forma este gênero de fungos leveduriformes. Utilizando técnicas imunológicas com anticorpos reativos, obtiveram a descoberta de quatro sorotipos antigenéticos (A, B, C e D) através de diferenças específicas nos polissacarídeos capsulares, classificando e identificando a partir desta informação, o gênero *Cryptococcus* a nível de espécies (Ngamskulrungroj *et al.*, 2009), ou organizando de forma mais compacta estas espécies e seus híbridos em dois complexos (Kwon-Chung & Varma, 2006): complexo *Cryptococcus gattii*, composto pelos tipos moleculares VGII (*C. deuterogattii*), VGIV (*C. decagattii*), VGIII (*C. bacillisporus*), VGI (*C. gattii*) e VGIV (*C. tetragattii*); complexo *Cryptococcus neoformans* com os tipos moleculares VNI, VNII (*C. neoformans* var. *grubii*), VNIV (*C. deneoformans* ou *C. neoformans* var. *neoformans*) e os híbridos *C. neoformans* x *C. deneoformans* (VNII, híbrido intervariável), *C. neoformans* var. *neoformans* x *C. gattii*, *C. neoformans* var. *grubii* x *C. gattii* (AFLP4/VGI) e *C. neoformans* x *C. gattii* (AFPL6/VGII), descritos na **Tabela 1**. Entretanto, ambas nomenclaturas são utilizadas estando a critério do autor e dependendo do tipo de análise, com alguns pesquisadores aderindo ao conceito de 2 complexos de espécies, sugerido por Kwon-Chung e Varma em 2006 e outros que aderindo ao conceito de 7 espécies e 4 híbridos sugerido por Ngamskulrungroj *et al.*, em 2009 (Kwon-Chung & Varma, 2006; Ngamskulrungroj *et al.*, 2009; Hagen *et al.*, 2015; Ferreira-Paim *et al.*, 2017; Altamirano *et al.*, 2020).

Tabela 1: Tabela com os 2 tipos de classificação das espécies de *Cryptococcus*, de acordo com a proposta apresentada por Kwon-Chung & Varma, 2006 (à esquerda) e a proposta de Ngamskulrungroj *et al.*, 2009 (à direita). No centro, os tipos moleculares de cada complexo/espécie. adaptado de: Hagen *et al.*, 2015.

Nomenclatura de espécies, proposta por Kwon-Chung & Varma	Tipo molecular/Genótipo RFLP	Nomenclatura de espécies, proposta por Ngamskulrungroj <i>et al.</i>
<i>Cryptococcus gattii</i>	VGI; VGIII;	<i>Cryptococcus gattii</i> <i>Cryptococcus bacillisporus</i>
	VGII;	<i>Cryptococcus deuterogattii</i>
	VGIV;	<i>Cryptococcus tetragattii</i>
	VGIV/VGIIIc	<i>Cryptococcus decagattii</i>
<i>Cryptococcus neoformans</i> var. <i>grubii</i>	VNI, VNII	<i>Cryptococcus neoformans</i>
<i>Cryptococcus neoformans</i> var. <i>neoformans</i>	VNIV	<i>Cryptococcus deneoformans</i>
<i>Cryptococcus neoformans</i> híbrido intravarietal	VNIII	Híbrido de <i>Cryptococcus neoformans</i> x <i>Cryptococcus deneoformans</i>
Híbrido <i>Cryptococcus neoformans</i> var. <i>neoformans</i> x <i>Cryptococcus gattii</i>	AFLP4/VGI	Híbrido de <i>Cryptococcus deneoformans</i> x <i>Cryptococcus gattii</i>
Híbrido <i>Cryptococcus neoformans</i> var. <i>grubii</i> x <i>Cryptococcus gattii</i>	AFLP4/VGI	Híbrido de <i>Cryptococcus deneoformans</i> x <i>Cryptococcus gattii</i>
Híbrido <i>Cryptococcus neoformans</i> var. <i>grubii</i> x <i>Cryptococcus gattii</i>	AFLP6/VGII	Híbrido de <i>Cryptococcus neoformans</i> x <i>Cryptococcus deuterogattii</i>

1.3 Criptococose

1.3.1 Patogênese

A criptococose, infecção fúngica causada por *Cryptococcus*, se inicia com a inalação de basidiósporos presentes no ar de ambientes contaminados, especialmente por resíduos orgânicos em decomposição, como fezes de pombos e material vegetal contendo basidiósporos (**Figura 2**). Esses esporos alcançam o trato respiratório inferior, alcançando os alvéolos pulmonares, onde ocorrerá a ativação metabólica da levedura e o início de sua proliferação celular, resultando na pneumonia criptocócica (Lin, 2009; Zhao *et al.*, 2023). Nesse ambiente pulmonar, o fungo interage com os macrófagos alveolares. Durante essa interação a cápsula polissacarídica, uma estrutura densa, altamente hidratada e diretamente ancorada à parede celular fúngica, atua como uma barreira física, dificultando e inibindo diretamente a fagocitose (Casadevall *et al.*, 2018; Chen *et al.*, 2022). Essa cápsula é composta principalmente por glucuronoxilomananas (GXM) e, em menor quantidade, por galactoxilomananas (GalXM), além de conter manoproteínas e lipídios, que em conjunto contribuem para a proteção e adaptação do fungo frente às condições do hospedeiro (Moretti *et al.*, 2008; O'Meara & Alspaugh, 2012; Casadevall *et al.*, 2018). Além disso, quando ocorre a fagocitose, o

Cryptococcus pode conseguir sobreviver e se replicar no interior dos fagolisossomos com a ajuda da sua cápsula polissacarídica (**Figura 1**), que induz a redução da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e de citocinas pró-inflamatórias dessas células imunológicas. Outros fatores também auxiliam na sobrevivência do fungo como a melanina, sintetizada pela enzima lacase, que oferece proteção contra o estresse oxidativo (Eisenman *et al.*, 2011; Black *et al.*, 2024) e a urease que contribui com a elevação do pH intracelular de fagolisossomas, o que também favorece a síntese de melanina e auxilia na sobrevivência fúngica (Olszewski *et al.*, 2004; Baker & Casadevall, 2023). Outro fator que dificulta a eliminação do patógeno pelos macrófagos é a presença de células titãs, uma subpopulação com diâmetro maior que 10 µM, cápsula mais espessa, altamente entrelaçada e uma parede celular reforçada, cuja fagocitose pode vir a ser fisicamente inviabilizada devido ao elevado tamanho (Okagaki *et al.*, 2012; Godoy *et al.*, 2025). Juntos, esses fatores de virulência permitem que o fungo persista no ambiente intracelular dos macrófagos e, com a falha da resposta imune — principalmente em hospedeiros imunocomprometidos — alcance a corrente sanguínea, causando fungemia, e possibilitando sua disseminação sistêmica (Zhao *et al.*, 2019).

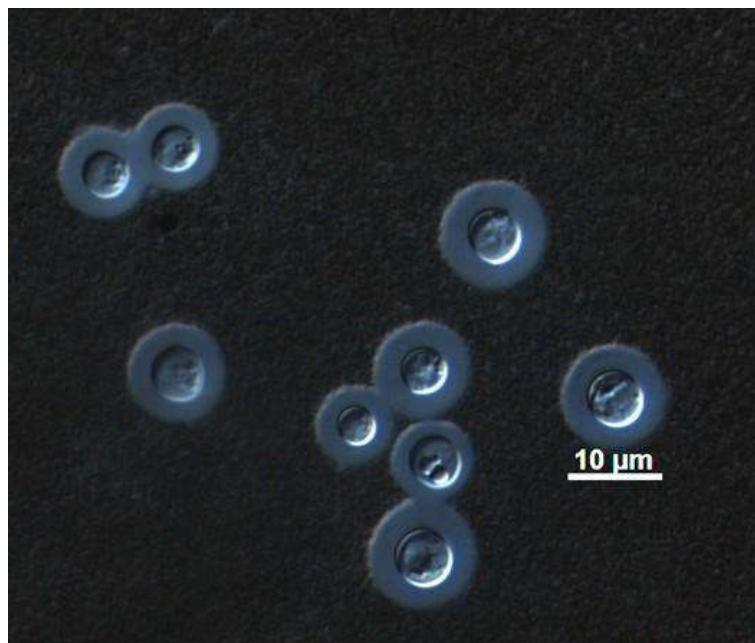


Figura 1: Microscopia de campo claro com contraste em tinta nanquim, evidenciando a cápsula polissacarídica do fungo (imagem cedida por Lucas Giovanini).

Uma vez na circulação sanguínea, *Cryptococcus* pode atingir o sistema nervoso central (SNC). Para isso, o fungo precisa ultrapassar a barreira hematoencefálica (BHE), uma estrutura altamente seletiva composta por células endoteliais interligadas por zonas de oclusão, astrócitos e pericitos, que regulam a entrada de substâncias no cérebro (Vu *et al.*, 2014; Chen *et al.*, 2022;

Rathore *et al.*, 2022). O fungo pode empregar até três mecanismos independentes para superar essa barreira (**Figura 2**). O primeiro mecanismo é a transcitose, na qual o fungo adere às células endoteliais cerebrais humanas (HBMECs) por meio da expressão de ácido hialurônico em sua superfície. Essa interação com receptores do hospedeiro induz a fagocitose mediada pelas HBMECs, permitindo a internalização do fungo. Em seguida, as células fúngicas são transportadas por vesículas através do citoplasma das células endoteliais e liberadas no parênquima cerebral, completando a travessia da BHE (Jong *et al.*, 2007; Rathore *et al.*, 2022; Dores *et al.*, 2024). O segundo mecanismo é a paracitose, que envolve a disfunção das junções de oclusão e reorganização do citoesqueleto das células endoteliais, permitindo que o fungo atravesse os espaços intercelulares. Esse processo é facilitado pela secreção de enzimas de superfície, como a fosfolipase B1, urease e lacase (Cox *et al.*, 2001; Maruvada *et al.*, 2012; Qiu *et al.*, 2012). Além disso, proteases como MPR1 e enzimas da família M36 degradam componentes do epitélio local, enquanto a expressão de uroquinases do hospedeiro ativa a conversão de plasminogênio em plasmina, promovendo a quebra da integridade da barreira (Stie *et al.*, 2009; Vu *et al.*, 2014; Ayón-Núñez *et al.*, 2018; Rathore *et al.*, 2022). Por fim, o terceiro mecanismo é conhecido como estratégia do “cavalo de Troia”, na qual o fungo é fagocitado por macrófagos e aproveita o processo natural de diapedese dessas células para atravessar a BHE. Após alcançar o SNC, *Cryptococcus* escapa do macrófago por vomocitose, mantendo sua viabilidade e capacidade infectiva (Chen *et al.*, 2022; LaRocque-de-Freitas *et al.*, 2024). A cooperação entre esses mecanismos e fatores de virulência permite que *Cryptococcus* colonize o SNC, desencadeando o quadro de meningite criptocócica, considerada a manifestação mais grave da infecção, com aumento da pressão intracraniana e, em casos graves, sequelas neurológicas ou óbito (Lin, 2009; Rathore *et al.*, 2022; Zhao *et al.*, 2023).

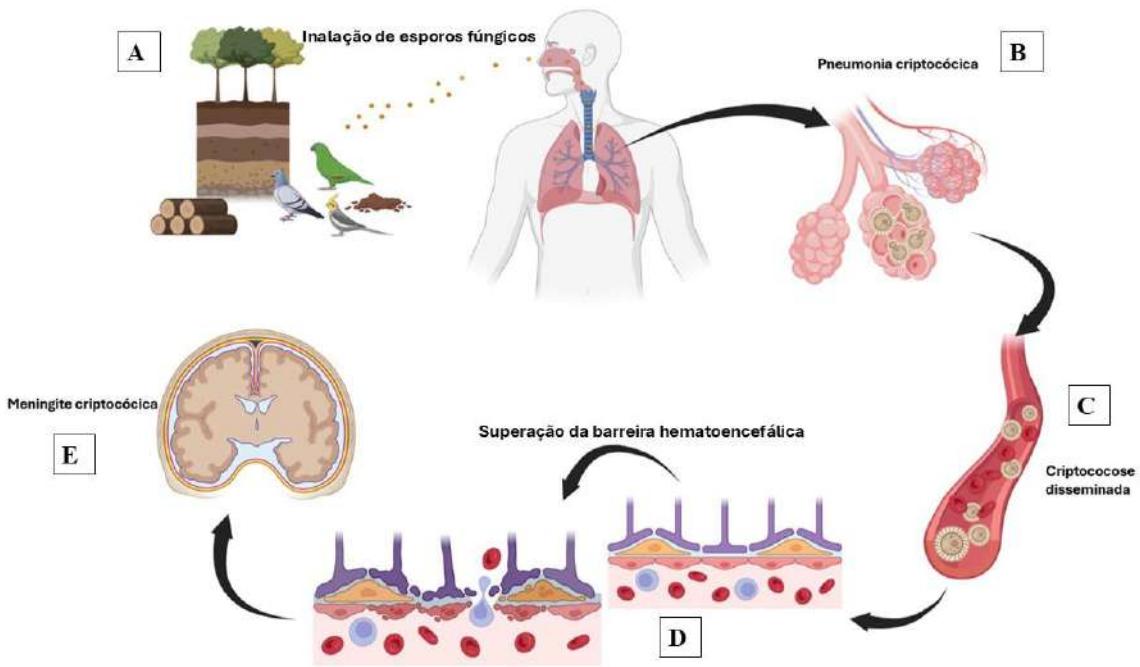


Figura 2: Ciclo de infecção de *Cryptococcus* em humanos, onde inicialmente, ocorre a inalação dos esporos fúngicos (A), que chegam ao trato respiratório do hospedeiro e causam o quadro de pneumonia criptocócica (B); havendo sucesso na infecção esse fungo pode alcançar a corrente sanguínea e causar a criptococose disseminada (C); a partir deste tecido, o fungo consegue alcançar a barreira hematoencefálica (BHE) e pode superá-la através de 3 mecanismos distintos: transcitose, paracitose ou cavalo-de-Tróia (D). Finalmente, a levedura chega ao sistema nervoso central (SNC), mais especificamente as meninges, causando o quadro mais grave da infecção, a meningite criptocócica (E).

1.3.2 Epidemiologia

A criptococose passou a receber maior atenção a partir dos surtos de SIDA na década de 80, período em que sua forma mais grave — a meningite criptocócica — se tornou mais evidente na prática clínica. Esse aparente aumento no número de casos está relacionado não apenas à maior incidência da infecção oportunista em pacientes imunossuprimidos, mas também há um aumento no número de diagnósticos, que até então eram escassos devido à limitada investigação laboratorial e consequente subnotificação (Bedimo & Skiest, 2008; Ibe *et al.*, 2023).

Dessa forma, a SIDA não apenas agravou o cenário clínico da doença, mas também contribuiu para que a criptococose fosse mais amplamente reconhecida e monitorada (Bedimo & Skiest, 2008; Ibe *et al.*, 2023). A partir deste contexto, desde a década de 80 até os dias atuais, a criptococose vem acometendo cerca de 200.000 pessoas anualmente, e apresentando uma taxa

de mortalidade global estimada em 60% para indivíduos tratados e para os não-tratados essa porcentagem alcança 100% de óbitos (WHO, 2022A; Denning, 2024).

Com isso, em 2022 a organização mundial da saúde (OMS) listou as principais infecções fúngicas destacando a urgência de pesquisas e ações para combater essas doenças. Essa lista também classificou os patógenos em ordem de prioridade em estudos utilizando como critério os fatores de: resistência antifúngica, número de mortes dos pacientes infectados, tratamentos disponíveis e a sua taxa de sucesso, acesso a diagnóstico, incidência anual, sequelas e complicações aos pacientes infectados. *Cryptococcus neoformans* aparece liderando esta lista, seguido de *Candida auris*, *Aspergillus fumigatus* e *Candida albicans*, compondo juntos o grupo de prioridade crítica dentro da lista (**Tabela 2**) (WHO, 2022).

Tabela 2: Lista da OMS com os grupos de prioridades dos principais fungos patogênicos (adaptado de: development and public health action. Geneva: World Health Organization, 2022A).

Grupo Crítico	Grupo Alta	Grupo Média
 <i>Cryptococcus neoformans</i>	 <i>Nakaseomyces glabrata</i> (<i>Candida glabrata</i>)	 <i>Scedosporium</i> spp.
 <i>Candida auris</i>	 <i>Histoplasma</i> spp.	 <i>Lomentospora</i> <i>prolificans</i>
 <i>Aspergillus fumigatus</i>	 Agentes causadores da eumicetoma	 <i>Coccidioides</i> spp.
 <i>Candida albicans</i>	 Mucorais	 <i>Pichia kudriavzevii</i> (<i>Candida krusei</i>)
	 <i>Fusarium</i> spp.	 <i>Cryptococcus gattii</i>
	 <i>Candida tropicalis</i>	 <i>Talaromyces marneffei</i>
	 <i>Candida parapsilosis</i>	 <i>Pneumocystis jirovecii</i>
		 <i>Paracoccidioides</i> spp.

Segundo Zhao *et al* (2023), de 2009 até os dias atuais vem ocorrendo uma redistribuição geográfica em relação ao impacto global de criptococose, onde regiões como América do Norte, América do Sul e Europa tem apresentado um aumento crescente nos números de casos de criptococose, enquanto a região da África subsaariana e a Ásia vem demonstrando uma redução nestes números (**Tabela 3**). Seu estudo sugere que essa redução no número de casos na África subsaariana resulta da expansão ao acesso à terapia antirretroviral altamente ativa (TARV).

Entretanto, a África subsaariana segue como região do planeta mais afetada pela criptococose e infecções por vírus da imunodeficiência humana (HIV) (Zhao *et al.*, 2023).

Tabela 3: Estimativa da prevalência global de meningite criptocócica e morte associadas a meningite criptocócica. Adaptado de Zhao *et al.*, 2023.

	Casos positivos CrAg (milhares)		Casos de meningite criptocócica (milhares)			Mortes por meningite criptocócica (milhares)		
	2014	2020	2007	2014	2020	2007	2014	2020
Global	278.0 (195.5–341.0) ^b	179.0 (133.0–219.0)	957.9 (371.7–1544)	223.1 (150.6–282.4)	152.0 (111.0–185.0)	624.7 (125.0–1124.9)	181.1 (119.4–234.3)	112.0 (79.0–134.0)
África Subsaariana	204.3 (148.4–237.8)	97.0 (73.0–120.0)	720.0 (144.0–1300.0)	162.5 (113.6–193.9)	82.0 (61.0–101.0)	504.0 (100.8–907.2)	135.9 (93.9–163.9)	71.0 (52.0–88.0)
Ásia e Pacífico	52.3 (32.9–74.1)	51.0 (42.0–60.0)	133.6 (26.7–240.5)	43.2 (25.3–64.7)	44.0 (35.0–51.0)	67.2 (13.4–121)	39.7 (20.6–59.7)	26.0 (21.0–30.0)
América Latina	7.0 (3.6–11.1)	14.0 (10.0–17.0)	54.4 (10.9–97.9)	5.3 (2.6–8.9)	12.0 (9.0–14.0)	29.9 (6.0–53.8)	2.4 (1.1–4.4)	7.0 (5.0–9.0)
América do Norte e Europa	8.9 (7.0–11.1)	15.0 (13.0–17.0)	34.5 (7.1–64.0)	7.4 (5.7–9.3)	12.0 (10.5–14)	15.8 (3.1–28.4)	2.5 (1.8–3.4)	7.0 (5.7–8.4)
Caribe	1.8 (1.3–2.2)	2.0 (1.7–2.3)	7.8 (1.6–14.1)	1.4 (1.0–1.8)	1.7 (1.4–1.9)	4.3 (0.9–7.8)	0.7 (0.5–0.9)	1.0 (0.8–1.0)
Oriente Médio e Norte da África	3.6 (2.6–5.0)	0.5 (0.1–0.6)	6.5 (11.3–7.6)	3.3 (2.4–4.5)	0.4 (0.1–0.5)	3.6 (0.7–6.4)	1.9 (1.3–2.7)	0.2 (0.1–0.3)

O cenário da criptococose no Brasil ainda apresenta desafios significativos, especialmente em regiões com altas taxas de SIDA e dificuldades no acesso aos serviços de saúde (Silva *et al.*, 2020). Segundo Cavassin *et al.* (2022), 79,2% dos casos registrados ocorrem em pacientes vivendo com HIV, com destaque para a região Nordeste, onde a meningite criptocócica representa 81,5% das manifestações clínicas da criptococose.

Na região norte, principalmente no Amazonas, a criptococose é considerada endêmica, apresentando uma taxa de incidência de 3,41 casos a cada 100.000 habitantes e uma taxa de mortalidade de 40% (Alves *et al.*, 2022; Reis *et al.*, 2022). Na região Sul do Brasil, a criptococose afeta cerca de 40% dos pacientes com HIV/SIDA, representando cerca de 8,1% das hospitalizações anuais relacionadas a essa coinfecção, sendo que, em um estudo realizado no Hospital Universitário da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (HU-UFRGS), os autores também observaram que, em diversos casos, a criptococose foi a condição que marcou a transição clínica do paciente HIV positivo para a fase de SIDA, refletindo o avanço da imunossupressão e o surgimento de infecções oportunistas características desse estágio (Silva *et al.*, 2020). Na região centro-oeste, os casos se concentram na região urbana, com ocorrência de um pico de incidência em 2022, relatado no estudo epidemiológico de Santana *et al.* (Bastos *et al.*, 2022; Santana *et al.*, 2023; Perazzoni *et al.*, 2024). Na região sudeste tem sido observado um declínio nos casos de criptococose que estão associados a SIDA representando apenas

11,23% dos casos. Essa queda se deve ao maior acesso da população as terapias antirretrovirais; enquanto que em pacientes não infectados pelo HIV, mas afetados por outras condições de imunossupressão foi observado um aumento no número de casos nessa mesma região (Ferreira *et al.*, 2019; Nascimento *et al.*, 2020; Nascimento *et al.*, 2021).

Este aumento nos casos de criptococose em populações não infectadas pelo HIV, indicam uma potencial modificação do perfil epidemiológico dessa doença e que reforça a necessidade de estratégias aprimoradas de diagnóstico e tratamento para reduzir o impacto da criptococose em todo o Brasil e no mundo (Cavassin *et al.*, 2022, 2023; Reis *et al.*, 2022).

Um dos principais obstáculos na construção de dados epidemiológicos da criptococose no Brasil é a subnotificação de casos pelas autoridades de saúde pública, de modo que, a escassez de dados epidemiológicos como número de casos e distribuição da doença contribui para a dificuldade em estratégias de controle e distribuição de recursos para tratamento. Esta subnotificação é agravada pela falta registros hospitalares, principalmente na região nordeste que possui os maiores números de casos de infecção por HIV/SIDA e criptococose (Macêdo *et al.*, 2019; Silva *et al.*, 2020).

1.4 Tratamento

O tratamento para criptococose tem como objetivo eliminar a infecção e prevenir sua disseminação para outros órgãos do hospedeiro, podendo ser utilizado apenas um antifúngico ou realizar uso combinado de diferentes fármacos (Chandra & Ghannoum, 2017; Chander *et al.*, 2022; WHO, 2022B; Qureshi *et al.*, 2024). Atualmente, o protocolo recomendado pela OMS para o tratamento consiste na administração de 3 antifúngicos: anfotericina B (poliênico), que ao se ligar aos esteróis da membrana celular do fungo, causando a formação de poros que permitem o extravasamento dos componentes celulares, além de causar dano oxidativo a célula fúngica; 5-flucitosina (antimetabólito), que atua na inibição da síntese de ácido desoxirribonucleico (DNA) da célula fúngica ao bloquear a ação da timidilato sintase, que é crucial para a replicação do DNA; e fluconazol (azol), que tem sua ação através da inibição da 14- α -esterol-demetylase, inibindo assim a síntese de ergosterol e, consequentemente, causando rompimento da membrana citoplasmática da levedura (Chandra & Ghannoum, 2017; Chander *et al.*, 2022; WHO, 2022B; Qureshi *et al.*, 2024). Vale destacar que a caspofungina, da classe de equinocandinas, não é utilizada, devido à resistência intrínseca que *Cryptococcus* apresenta a esta classe de medicamentos (Kalem *et al.*, 2021; Papon & Goldman, 2021; Aguiar *et al.*, 2024).

O processo terapêutico para criptococose com estes antifúngicos é dividido em três fases: indução, consolidação e manutenção. Na fase de indução, tem-se como objetivo diminuir significativamente a carga fúngica do líquido cefalorraquidiano (LCR) nas primeiras duas semanas, pois essa redução é fundamental para obter resultados positivos no tratamento contra a criptococose e minimizar o risco de falhas terapêuticas. A OMS recomenda que, na fase de indução, seja administrado uma terapia combinada de uma dose única de anfotericina B lipossomal (10 mg/kg) juntamente com 14 dias de flucitosina (100 mg/kg, dividido em 4 doses ao dia) e fluconazol (1200 mg/dia para adultos e 12 mg/kg por dia, para crianças e adolescentes) (WHO, 2022B; Qureshi *et al.*, 2024).

Após 2 semanas da fase de indução, se o paciente apresentar uma resposta clínica satisfatória, como coleta de LCR estéril (Srichatrapimuk & Sungkanuparph, 2016; Devi *et al.*, 2021; WHO, 2022B), pode-se avançar para a terapia de consolidação em que é descontinuado o uso de flucitosina e passa-se a utilizar apenas fluconazol em dose mais elevada (800 mg/dia para adultos, 6-12 mg/kg por dia para crianças e adolescentes), por 8 semanas. Depois de completada a fase de consolidação, o paciente segue para a fase de manutenção, visando a redução na taxa de reincidência da criptococose (WHO, 2022B; Qureshi *et al.*, 2024). Na manutenção, o paciente faz uso de fluconazol numa dose menor que na fase de indução e consolidação (200 mg/dia para adultos, 6 mg/kg por dia para crianças e adolescentes), até que se tenha a reconstituição da imunidade do paciente (indicado pelo valor de TCD4 >200 células/mm³ no soro do paciente) (WHO, 2022B). Devido ao aumento do risco de mortalidade em indivíduos com HIV é necessário que a terapia antiretroviral seja iniciada apenas após 4-6 semanas da fase de indução (WHO, 2022B).

Contudo, a abordagem terapêutica indicada pela OMS também possui diversas problemáticas que contribuem para as altas taxas de mortalidades (Denning, 2024). Anfotericina B e flucitosina são altamente tóxicos para o paciente, podendo causar quadros de nefrotoxicidade (Laniado-Laborín & Cabrales-Vargas, 2009; Dobrek, 2023), e hepatotoxicidade (Folk *et al.*, 2016; Kyriakidis *et al.*, 2017; Houšť *et al.*, 2020), respectivamente ao paciente. Devido a esta toxicidade, a OMS recomenda em seu guia de tratamento para criptococose que seja realizada uma rigorosa tentativa de monitoramento dos efeitos tóxicos aos pacientes, durante o tratamento. Contudo, em muitos casos, as estratégias para minimizar os efeitos tóxicos podem não ser eficazes, principalmente em imunossuprimidos, que já possuem um organismo mais fragilizado (WHO, 2022).

Além disso, o uso indiscriminado de antimicrobianos leva à contaminação de efluentes e influentes de águas residuais e de água potável em estações de tratamento, favorecendo a seleção de cepas resistentes a antifúngicos (Assress *et al.*, 2020) e causando um aumento no número de relatos de isolados de *Cryptococcus* resistentes ao longo das últimas décadas (Perfect & Cox, 1999; Arechavala *et al.*, 2009; Bongomin *et al.*, 2018; Lahiri & Chandrashekhar, 2022; Denning, 2024).

Entre os principais mecanismos de resistência a antifúngicos observados em *Cryptococcus*, destacam-se as alterações nos esfingolipídios e ergosteróis da membrana celular, que dificultam a ação de poliênos como a anfotericina B (Madaan & Kumar Bari, 2023). Outro mecanismo envolve modificações no metabolismo mitocondrial, especialmente em células de idade geracional avançada, que passam a produzir mais ergosterol e a superexpressar transportadores da família ABC. Essas alterações contribuem para a tolerância aos azóis, além de estarem associadas a mudanças na composição dos ergosteróis da membrana (Yoo *et al.*, 2024). Mutações nas quinases sensoras híbridas, como Tco1 e Tco2, também foram identificadas como fatores de resistência. Essas quinases afetam vias de sinalização intracelular que regulam processos como a produção de melanina, a resposta ao estresse oxidativo e a biossíntese de ergosterol. Como consequência, há aumento da tolerância à flucitosina, restringindo seu uso clínico à combinação com outros antifúngicos (Song *et al.*, 2012; Chandra & Ghannoum, 2017; Chander *et al.*, 2022).

A baixa acessibilidade aos antifúngicos recomendados pela OMS, como a anfotericina B e a flucitosina, representa um dos principais entraves no tratamento da criptococose em países de baixa e média renda. Custos elevados, dificuldades de distribuição e limitações dos sistemas de saúde tornam essas terapias inacessíveis em regiões como a África Subsaariana e o Sudeste Asiático, agravando a carga da doença (**Figura 3**) (Alikova, 2022; Mashau *et al.*, 2022; Burry *et al.*, 2022). Com isso, a alta taxa de mortalidade, associada à crescente resistência aos antifúngicos, torna a criptococose um desafio crescente para a saúde pública global, exigindo uma resposta urgente da comunidade científica e dos sistemas de saúde (Lizarazo *et al.*, 2007; Desalermos *et al.*, 2012; La Hoz & Pappas, 2013; Jemal *et al.*, 2021; Zono *et al.*, 2022; Denning, 2024).

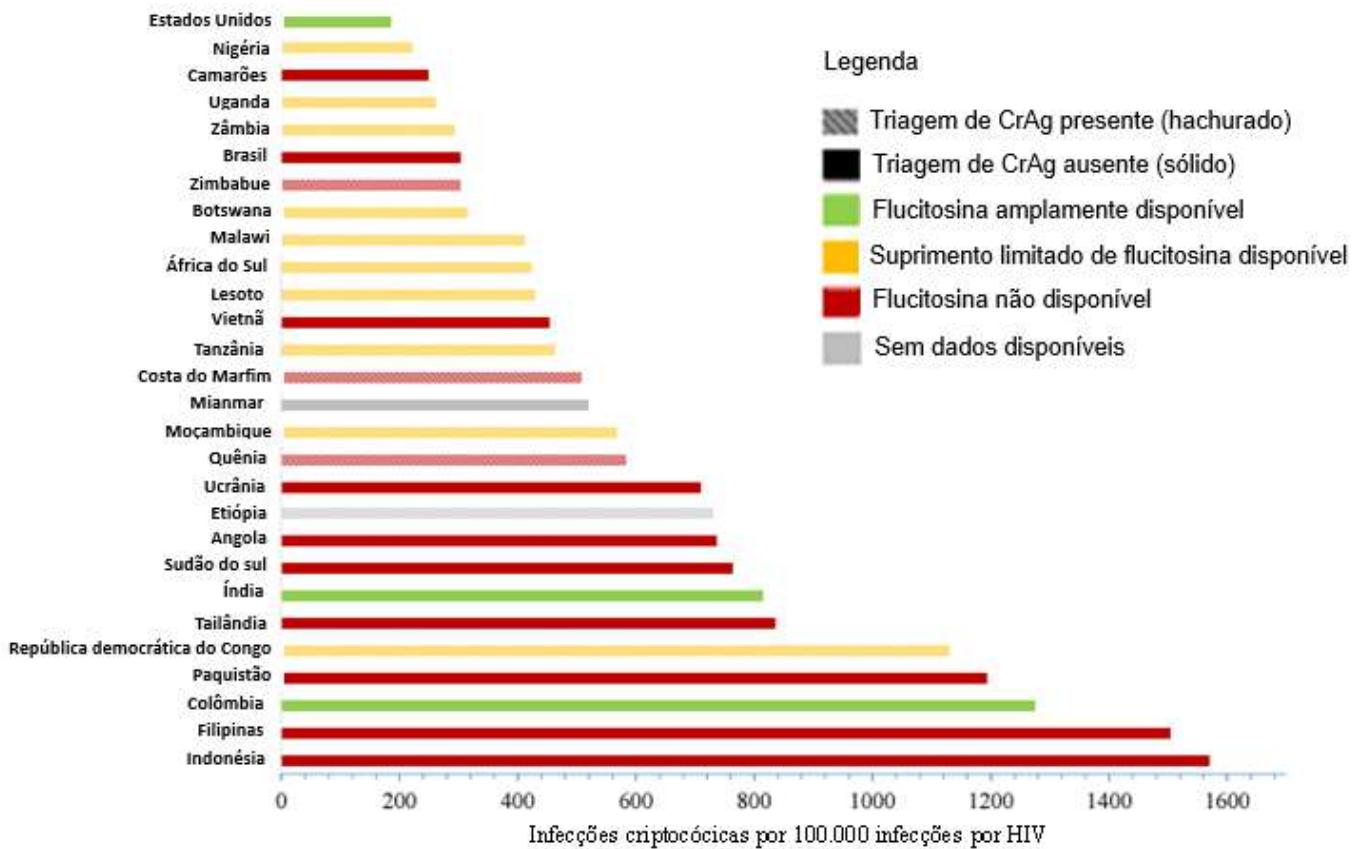


Figura 3: Correlação entre número de casos de infecções criptocócicas em pacientes com SIDA e condições da disponibilidade de diagnóstico e tratamento em cada país. Adaptado de: Rajasingham *et al.*, 2022

1.5 Compostos de coordenação e suas aplicações

Os compostos de coordenação, também chamados de complexos metálicos, são formados por íons metálicos que se ligam a moléculas orgânicas, os ligantes, criando estruturas químicas estáveis. Essas ligações ocorrem por meio de ligações covalentes nas quais o átomo central ou íon metálico aceita pares de elétrons dos ligantes (Lohar *et al.*, 2004; Nelson & Cox, 2017; Cherkasova *et al.*, 2020). As características dos ligantes, como suas propriedades estéricas, eletrônicas e o estado de oxidação do metal, determinam a força, a estabilidade dessas ligações e a geometria final do composto (House & House, 2010; Akpan *et al.*, 2023).

Nos últimos anos, diversos estudos vêm demonstrando que compostos de coordenação podem apresentar atividade antimicrobiana ou antitumoral, com uma baixa toxicidade para o hospedeiro (Warra *et al.*, 2011; McCann *et al.*, 2012; Viganor *et al.*, 2015; Krasnovskaya *et al.*, 2020; Turecka *et al.*, 2021). A cisplatina, por exemplo, tem sido amplamente utilizada no tratamento anti-tumoral desde a sua descoberta em 1965. Este medicamento, à base de platina, permanece um dos principais agentes terapêuticos no combate ao câncer (Omer *et al.*, 2024). Além da cisplatina, seus derivados como oxaliplatina e carboplatina também são usados no

tratamento contra o câncer, oferecendo diferentes perfis de eficácia e toxicidade (Trudu *et al.*, 2015; Mohammed & Tripathi, 2020).

Os compostos de coordenação de antimônio pentavalente, como o estibogluconato de sódio (Pentostam®) e o antimonato de meglumina (Glucantime®), são as formas comerciais mais comuns encontradas na clínica médica e são amplamente utilizados no tratamento de leishmaniose há mais de 5 décadas (Herwaldt & Berman, 1992; Frézard *et al.*, 2009; Franco *et al.*, 2016).

1.6 Derivados de fendiona e seus efeitos antimicrobianos

A 1,10-fenantrolina (fenantrolina) é um ligante bidentado nitrogenado amplamente utilizado na química de coordenação por sua capacidade de formar complexos estáveis com metais de transição (Calderazzo *et al.*, 1999; McCann *et al.*, 2004). Sua molécula derivada, a 1,10-fenantrolina-5,6-diona (fendiona), possui grupos cetona que conferem propriedades redox (Eckert & Bruice, 1983; Hilt *et al.*, 1997; McCann *et al.*, 2004). Ambas são comercialmente disponíveis e têm sido amplamente exploradas em estudos químicos e biológicos (McCann *et al.*, 2004). Neste contexto, as moléculas de 1,10-fenantrolina e 1,10-fenantrolina-5,6-diona demonstraram uma boa atividade antimicrobiana em diversos estudos contra bactérias, protozoários, fungos leveduriformes e filamentosos (McCann *et al.*, 2012; Gandra *et al.*, 2020, 2024; Granato *et al.*, 2021).

Um de nossos colaboradores, o professor Dr. Malachy McCann do Departamento de Química da Universidade Nacional Maynooth (Irlanda) e sua equipe, sintetizou compostos de coordenação, utilizando as moléculas de fenantrolina ou fendiona complexadas a diversos íons metálicos de transição como íons de cobre (Cu^{2+}), prata (Ag^+) ou manganês (Mn^{2+}). Dentre estes diversos complexos de coordenação sintetizados, destacaram-se as moléculas de $[Ag(phendione)_2]ClO_4$ (Ag-fendiona) e $[Cu(phendione)_3](ClO_4)_2 \cdot 4H_2O$ (Cu-fendiona) (McCann *et al.*, 2004).

Com relação à toxicidade dos compostos de coordenação Ag-fendiona e Cu-fendiona, ensaios *in vitro* utilizando culturas de células de epitélio pulmonar, renal e hepático, fibroblasto pulmonar, macrófagos peritoneais e pulmonares tratados com esses compostos e os resultados mostraram baixos níveis de toxicidade desses compostos frente a essas linhagens celulares (McCann *et al.*, 2012; Granato *et al.*, 2021). Em ensaios *in vivo*, com o modelo animal de *Galleria mellonella*, foi observada uma taxa de sobrevivência de 100% das larvas tratadas com os compostos em concentração de até 500 $\mu g/mL$ (McCann *et al.*, 2012; Gandra *et al.*, 2020;

Granato *et al.*, 2021). Notavelmente, em ensaios de toxicidade *in vivo* com o modelo de *Galleria mellonella*, os complexos de coordenação contendo fendiona, Cu-fendiona e Ag-fendiona foram testados com o regime de dose única, em uma faixa de concentrações de 1000 a 125 µM, não apresentando mortalidade em nenhuma das doses avaliadas, com 100% de sobrevivência das larvas ao final de 7 dias (Gandra *et al.*, 2020; Granato *et al.*, 2021; Giovanini *et al.*, 2025). Além da ausência de toxicidade, foi observada a toxicidade a partir de possíveis alterações sobre a densidade de hemócitos (células imunológicas de *G. mellonella*); Cu-fendiona aumentou a densidade dessas células em concentrações mais baixas, enquanto nas concentrações mais elevadas apresentou uma pequena redução. Por outro lado, o Ag-fendiona não promoveu alterações significativas na densidade dessas cels, mesmo em concentrações altas (Gandra *et al.*, 2020; Giovanini *et al.*, 2025). Já no regime de dose diária, os complexos foram administrados diariamente na concentração de 62,5 µM, com análise da sobrevivência das larvas pelo período total de 7 dias. Nesse regime de inoculações diárias também não foi observada toxicidade, mantendo-se a taxa de sobrevivência em 100% (Giovanini *et al.*, 2025). Durante os 5 dias de inoculação diaria, os compostos não induziram nenhuma alteração na densidade de hemocitos dessas larvas, indicando que os compostos não apresentaram toxicidade a esses animais, mesmo após inoculações diárias (Giovanini *et al.*, 2025). Além desse modelo, também foram realizados ensaios de toxicidade aguda *in vivo* utilizando camundongos e após 7 dias de avaliação, observaram sobrevivência de 100% dos animais inoculados com os compostos nas concentrações de 45 mg/kg de Cu-fendiona ou 150 mg/kg de Ag-fendiona (McCann *et al.*, 2012). Adicionalmente, foi realizada uma avaliação de toxicidade crônica em camundongos, os quais foram inoculados com 45 mg/kg de Ag-fendiona ou Cu-fendiona por 5 dias e acompanhados até o decimo segundo dia. Ao final do período de observação não ocorreu nenhuma morte nem alterações comportamentais, alimentares ou no peso corporal desses animais, reafirmando a baixa toxicidade dos compostos de coordenação (McCann *et al.*, 2012).

Os compostos de Ag-fendiona e Cu-fendiona, nas respectivas concentrações de 4 mg/L e 5 mg/L, demonstraram eficácia contra *Phialophora verrucosa*. O co-tratamento com Ag-fendiona ou Cu-fendiona junto a anfotericina B resultou em um efeito aditivo na inibição do crescimento do fungo filamentoso (Granato *et al.*, 2021). Durante o processo de formação de biofilme, concentrações subinibitórias de fendiona e seus complexos reduziram a produção de biomassa (fendiona = 0,6 mg/L; Cu-fendiona = 0,6 mg/L; Ag-fendiona = 1,2 mg/L) e da matriz extracelular (fendiona = 1,2 mg/L; Ag-fendiona = 0,6 mg/L) do biofilme. Além disso, o

tratamento de biofilmes maduros com altas concentrações dos compostos (fendiona, 20 mg/L; Ag-fendiona, 80 mg/L e Cu-fendiona, 20 mg/L) diminuiu a atividade mitocondrial de forma dose-dependente (Granato *et al.*, 2021). Através do ensaio de interação entre células conidiais de *P. verrucosa* e macrófagos THP-1 (linhagem celular derivada de monócitos humanos), foi demonstrado que o pré-tratamento das células conidiais com Ag-fendiona causou uma redução significativa no número de células fúngicas intracelulares (Granato *et al.*, 2021). Também vale ressaltar que, neste estudo foi visto que o pós-tratamento de macrófagos infectados com os compostos, levou a um aumento significativo no processo de eliminação de células fúngicas. Em ensaios *in vivo*, a exposição a Ag-fendiona protegeu as larvas de *G. mellonella* de infecções por *P. verrucosa* (Granato *et al.*, 2021).

Em outro estudo utilizando os compostos de cobre, prata e manganês coordenados a fendiona, desta vez contra *Scedosporium apiospermum*, *S. minutisporum*, *S. aurantiancum* e *Lomentospora prolificans*, foi visto que os compostos com o íon manganês foram capazes de inibir a viabilidade de células conidiais dessas espécies filamentosas (Mello *et al.*, 2023). Além disso, os compostos coordenados a manganês inibiram a formação de biofilmes, bem como também reduziram a atividade metabólica mitocondrial de biofilmes maduros (Mello *et al.*, 2023).

Gandra *et al.*, 2017, que avaliou compostos de coordenação de prata, cobre e manganês complexados a fenantrolina, quanto à sua capacidade de inibir o crescimento planctônico e a formação de biofilmes do complexo de espécies *Candida haemulonii*. Os complexos de prata foram os mais eficazes com uma média geométrica da concentração mínima inibitória (MG-CIM) na faixa de 0,26 a 2,16 µM), seguidos pelos de manganês (MG-CIM de 0,87 a 10,71 µM) e cobre (MG-CIM de 3,37 a >72 µM) (Gandra *et al.*, 2017).

Em 2020, Gandra *et al.*, avaliou potencial terapêutico de compostos de coordenação de prata, cobre e manganês complexados a fendiona ou fenantrolina no tratamento de larvas de *G. mellonella* infectadas por *Candida haemulonii*, utilizando o modelo *in vivo* de larvas de. As análises realizadas neste estudo revelaram que os compostos testados possuem atividade fungistática em concentrações baixas ($[\text{Ag}(\text{phendione})_2]\text{ClO}_4 = 0,02 \text{ mg/L}$; $\text{Ag}_2(3,6,9\text{-tdda})(\text{phen})_4\text{EtOH} = 0,07 \text{ mg/L}$; $[\text{Ag}(\text{phen})_2]\text{ClO}_4 = 0,08 \text{ mg/L}$; $\{\text{Cu}(3,6,9\text{-tdda})(\text{phen})_2\}\text{3H}_2\text{O}\text{.EtOH}\}_{\text{n}} = 0,08 \text{ mg/L}$) e fungicida em concentrações altas ($[\text{Ag}(\text{phendione})_2]\text{ClO}_4 = 2 \text{ mg/L}$; $[\text{Ag}_2(3,6,9\text{-tdda})(\text{phen})_4]\text{EtOH} = 8 \text{ mg/L}$; $[\text{Ag}(\text{phen})_2]\text{ClO}_4 = 1 \text{ mg/L}$; $\{\text{Cu}(3,6,9\text{-tdda})(\text{phen})_2\}\text{3H}_2\text{O}\text{.EtOH}\}_{\text{n}} = 8 \text{ mg/L}$) (Gandra *et al.*, 2020).

Giovanini (2024) avaliou compostos de coordenação contendo fendiona complexada a metais como cobre e prata, os quais demonstraram atividade antifúngica frente a 6 isolados clínicos de *C. neoformans* e *C. gattii*. O ligante fendiona isolado apresentou CIM de 12,5 µM para todas as cepas testadas, enquanto os complexos Cu-fendiona e Ag-fendiona exibiram menores valores de atividade inibitória, com CIMs de 6,25 µM e 3,125 µM para Cu-fendiona, e 1,56 µM para Ag-fendiona, respectivamente (Giovanini *et al.*, 2025). Quanto à atividade fungicida, observou-se que a fendiona apresentou concentração fungicida mínima (CFM) apenas contra três cepas, enquanto Cu-fendiona e Ag-fendiona exibiram CFM para todas as cepas e em menores concentrações, especialmente contra os isolados de *C. gattii* (Giovanini *et al.*, 2025).

No modelo *in vivo* com *Galleria mellonella*, os compostos de coordenação foram avaliados quanto ao potencial terapêutico contra cepas de *Cryptococcus* em tratamento com protocolo de dose única ou dose diária. No tratamento com dose única, apenas Ag-fendiona foi capaz de aumentar significativamente a sobrevida das larvas infectadas com isolado clínico de *C. neoformans*, especialmente na concentração de 125 µM, promovendo sobrevida de 70% das larvas tratadas por até 21 dias (Giovanini, 2024). Já no tratamento com dose diária, tanto Cu-fendiona quanto Ag-fendiona (ambos na concentração de 62,5 µM) aumentaram a sobrevida em até 90% das larvas infectadas com *C. neoformans* por até 7 dias, mas essa sobrevida não não foi obtida quando o mesmo tratamento foi aplicado em larvas infectadas por *C. gattii* (Giovanini, 2024). Além disso, foi observada ausência de melanização no terceiro dia em larvas tratadas com os complexos metálicos, em contraste com o grupo controle infectado e tratado com PBS, que já apresentava melanização nesse mesmo período, sugerindo assim uma possível redução nos sinais de estresse desencadeado pela infecção durante as primeiras 72 horas (Giovanini, 2024).

1.7 Propriedades medicinais e aplicações farmacológicas do zinco

Na literatura, o zinco é amplamente reconhecido por suas diversas aplicações e propriedades antimicrobianas. Estudos com zinco e as espécies bacterianas *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, demonstram que a capacidade do zinco de induzir morte celular e inibir o crescimento de biofilmes bacterianos, ocorre através dos danos diretos na membrana celular e em componentes intracelulares, como proteínas e enzimas dependentes de zinco que, em altas concentrações, pode levar ao comprometimento dos

processos metabólicos, defesa e da regulação celular (Blindauer *et al.*, 2001; Martin *et al.*, 2017; d'Agostino *et al.*, 2024; Vitasovic *et al.*, 2024).

Além disso, efeitos antivirais do zinco também já foram observados, como a supressão da biossíntese viral do *Enterovírus D68* (Liu *et al.*, 2021). O zinco também tem mostrado atividade anti-SARS-CoV-2, por meio da inibição da proteína M do vírus (uma proteína de membrana envolvida na montagem e estabilidade do envelope viral) e da amplificação da resistência do hospedeiro, especialmente nos estágios iniciais da infecção (Ishida, 2020).

Estudos *in vitro* demonstram a eficácia do zinco na redução da viabilidade de trofozoítos de *Trichomonas vaginalis* (Marchetti *et al.*, 2022). Além disso, complexos de zinco com hidrazonas à base de pirazolona exibem atividade antitripanossomal contra *Trypanosoma brucei*, apresentando baixa citotoxicidade em células de mamíferos (Salih *et al.*, 2022).

Li *et al.* (2020) avaliaram a atividade antibacteriana e a capacidade fotocatalítica do óxido de zinco, demonstrando que nanomateriais à base de óxido de zinco podem atuar por diferentes mecanismos, como a liberação de íons Zn²⁺ na superfície, capazes de inativar células bacterianas, e a geração de EROS induzida por reação fotocatalítica. Fitocompostos à base de óxido de zinco também demonstraram eficácia em inibir a hemólise de eritrócitos induzida por toxinas de *Staphylococcus aureus*, sugerindo um possível efeito protetor contra os danos celulares causados por esse patógeno (Li *et al.*, 2020). Por fim, observou-se que esses compostos também reduziram a atividade inflamatória do sistema imunológico em mamíferos (Li *et al.*, 2020). Os principais mecanismos da atividade bactericida do óxido de zinco contra *Staphylococcus aureus* foram o comprometimento do funcionamento da membrana celular e interferência na cadeia de transporte de elétrons, produção de EROS, levando as células bacterianas ao estresse oxidativo e causando a destruição da membrana plasmática bacteriana, desnaturação de enzimas, inibição da respiração celular e da replicação do material genético bacteriano, causando extravasamento do conteúdo citoplasmático e consequente morte da célula bacteriana (Li *et al.*, 2020). Hutching *et al.*, 2020, avaliou o efeito antimicrobiano de íons de zinco, como um potencial tratamento antibacteriano para indústrias de laticínios e demonstrou que a adição de íons de zinco a estes tratamentos já utilizados inibia a formação de biofilme *Bacillus subtilis*, regulando negativamente a produção de matriz extracelular. Além disso, também relatou que células microbianas passaram a ser mais termossensíveis após a exposição aos íons de zinco (Hutching *et al.*, 2020).

Moléculas resultantes da coordenação de porfirazinas (moléculas similares às porfirinas) por íons de zinco, exibiu alta toxicidade contra células tumorais em comparação às células saudáveis. Esse diferencial na citotoxicidade evidencia a seletividade desses compostos, tornando-os candidatos promissores para aplicação, por exemplo, na terapia fotodinâmica, amplamente utilizada no tratamento de câncer de pele e infecções bucais causadas por microrganismos resistentes (Pinheiro *et al.*, 2024).

Na micologia o zinco também tem ganhado destaque devido às suas propriedades antifúngicas, especialmente contra cepas multirresistentes (Pasquet *et al.*, 2014; Hutchings *et al.*, 2020; Li *et al.*, 2020). Dentro disso, um dos mecanismos antifúngicos inclui a coordenação do zinco com peptídeos antimicrobianos, como sheperin II, induzindo mudanças estruturais neste peptídeo e aprimorando sua atividade antifúngica contra o fungo leveduriforme *Candida albicans* (Szarszoń *et al.*, 2023). Além disso, as nanopartículas de óxido de zinco têm mostrado atividade antifúngica contra cepas resistentes de *Candida tropicalis* (Yassin *et al.*, 2024). Quando combinadas com fluconazol, essas nanopartículas de óxido de zinco demonstram efeitos sinérgicos, contra cepas de *Candida albicans* e *C. parapsilosis*, ampliando as possibilidades terapêuticas antifúngicas (Yassin *et al.*, 2024). O zinco também se destaca como agente de cobertura em nanopartículas de sulfeto de cobre, potencializando sua eficácia contra *Fusarium verticillioides* e destacando sua importância nas formulações de nanopartículas (Sharma & Sidhu, 2019).

Nesse contexto, o íon zinco tem sido amplamente utilizado na formação de complexos metálicos com propriedades antifúngicas. França *et al.*, 2021, relataram a síntese de três complexos metálicos de zinco com cetoconazol. Entre os complexos analisados, os de zinco-cetoconazol destacaram-se pela maior eficácia antifúngica contra *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* e *Sporothrix brasiliensis*. Os complexos de zinco 1 {[Zn(KTZ)₂(Ac)₂].H₂O} e 3 {[Zn(KTZ)₂(H₂O)(NO₃)](NO₃)} exibiram amplo espectro de ação em baixas concentrações, e baixa toxicidade para células de mamíferos, exibindo assim alta seletividade a célula fúngica. Além disso, alterações morfológicas em células de *Sporothrix brasiliensis*, como danos à parede celular, foram observadas após o tratamento com ambos os complexos (França *et al.*, 2021).

Em um outro estudo foram sintetizados e caracterizados três complexos de zinco com ligantes N-heterocíclicos e fenantrolina: [ZnCl₂(qz)₂] (1), [ZnCl₂(1,5-naph)]_n (2) e [ZnCl₂(4,7-phen)₂] (3) (Andrejević *et al.*, 2020). Os três complexos foram testados contra as espécies de

leveduras *Candida albicans*, *Candida krusei*, *Candida tropicalis* e *Candida parapsilosis*, demonstrando atividade inibitória com CIM > 250 µg/mL para todas as cepas de *Candida*, exceto o composto 3, que apresentou CIM > 125 µg/mL contra *C. krusei*. Além disso, os complexos não induziram efeitos tóxicos à linhagem celular de fibroblastos humanos saudáveis (MRC-5) (Andrejević *et al.*, 2020). Embora essa atividade não tenha sido fungicida, [ZnCl₂(4,7-phen)₂] demonstrou uma capacidade de inibição no processo de formação de hifas e pseudo hifas em *Candida*, um processo crucial durante a infecção. Além disso, [ZnCl₂(4,7-phen)₂] também apresentou efeito sinérgico significativo quando combinado com o antifúngico poliênico nistatina, indicando um potencial composto para uso combinado no tratamento de infecções por *Candida* (Andrejević *et al.*, 2020).

Devido às diversas atividades antimicrobianas observadas nos compostos Ag-fendiona e Cu-fendiona, bem como os relatos na literatura científica sobre o potencial terapêutico de complexos coordenados por íons zinco, a Dra. Cristiane Fernandes, do departamento de química da Universidade Federal de Santa Catarina e sua equipe, em parceria com nosso laboratório, sintetizou um composto de coordenação similar, complexando a fendiona ao íon de zinco (Zn²⁺) resultando na molécula Zn²⁺-fendiona.

1.8 *Galleria mellonella*: modelo *in vivo*

O uso de animais em experimentação *in vivo* tem sido amplamente discutido ao longo das últimas décadas, buscando definir até que ponto a utilização de animais é realmente indispensável, além de estabelecer as condições adequadas para o manejo desses animais antes, durante e após os ensaios (Ambrose *et al.*, 2007; Zhao *et al.*, 2016; Gill *et al.*, 2020). Ainda assim, os modelos *in vivo* continuam sendo fundamentais para a avaliação da toxicidade e da eficácia de novos compostos em desenvolvimento, fornecendo informações que não podem ser integralmente obtidas por métodos *in vitro* ou *in silico*. (Ambrose *et al.*, 2007; Zhao *et al.*, 2016; Gill *et al.*, 2020). No contexto da experimentação animal, o princípio dos 3Rs orienta o desenvolvimento de estudos mais éticos e responsáveis. Estes princípios são definidos então como: reduzir, substituir e refinar. Reduzir: estabelecendo bancos de dados, estímulo a publicações de resultados negativos, qualidade genética, sanitária e ambiental dos animais reduzindo a dispersão dos resultados e a quantidade de animais utilizados; Substituir: utilizando métodos alternativos ao uso de animais vertebrados, como uso de invertebrados, embriões, microrganismos, culturas de tecidos e células e uso de simulações de processos fisiológicos em ensaios *in silico*; Refinar: melhorando os protocolos experimentais a fim de minimizar o

sofrimento e estresse dos animais utilizados (Universidade Federal do Espírito Santo, 2013; Hubrecht & Carter, 2019).

A partir dos princípios dos 3Rs, o uso de animais invertebrados em experimentação animal surge como alternativa a fim de substituir animais vertebrados em ensaios preliminares. Nesta categoria de animais invertebrados, existe uma diversidade de insetos que vem sendo utilizados como *Drosophila melanogaster*, *Tenebrio molitor* e *Galleria mellonella* (Champion et al., 2016; Hubrecht & Carter, 2019; Pereira et al., 2020; Curtis et al., 2022). O modelo de *G. mellonella* se destaca como um inseto amplamente utilizado em experimentação animal, tendo sido utilizada pela primeira vez como modelo de toxicidade, em estudos de fármaco antituberculose em 1951 e validada para uso como modelo de infecção em diversas espécies bacterianas e fúngicas na década de 60 (Smissman et al., 1961; Kurstak & Vega, 1968; Champion et al., 2016; Serrano et al., 2023). A *G. mellonella* é pertence ao filo Arthropoda, da ordem Lepidoptera e família Pyralidae, conhecida popularmente como “traça-da-cera”, parasita de colmeias, sendo encontrada então em colmeias de abelhas mas também em ninhos de vespas ou em estoques de cera de abelha, das quais estas mariposas se alimentam (Gniazdo et al., 2023; Serrano et al., 2023).

Essa espécie de inseto se destaca como um modelo alternativo ao uso de animais mamíferos pela: sua facilidade de manejo, baixo custo em sua aquisição e manutenção, comparado aos modelos de mamíferos. As larvas podem ser armazenadas em temperatura ambiente (25-27 °C) mas resiste a temperatura de 37 °C, utilizada em modelo de infecção, buscando mimetizar as condições de hospedeiros humanos. O ciclo de vida da *G. mellonella* favorece a realização de experimentos com um alto número de animais sendo possível utilizar diversos sistemas para avaliações simultâneas, além de não necessitar de aprovação do comitê de ética (Pereira et al., 2020; Smith & Casadevall, 2021; Serrano et al., 2023).

A imunidade da *G. mellonella*, similarmente a imunidade inata de mamíferos, atua na fagocitose e eliminação de microrganismos, além de realizar a manutenção da homeostase do hospedeiro (Serrano et al., 2023). Sua resposta imune celular é mediada pelos hemócitos, células fagocíticas que apresentam mecanismo de fagocitose similar a atividade encontrada pelos macrófagos de mamíferos. Os hemócitos são encontrados ligados a órgãos internos como o trato digestivo, corpo gorduroso e na superfície do coração ou livres na circulação da hemolinfa, um fluido circulatório que desempenha funções semelhantes ao sangue e fluido linfático em vertebrados (Browne et al., 2013; Arteaga Blanco et al., 2017; Serrano et al., 2023).

Esses hemócitos são classificados em seis tipos celulares distintos — plasmócitos, células granulares, pró-hemócitos, coagulócitos, esferulócitos e oenocitóides — e possuem características como alta capacidade fagocítica, formação de EROs, produção de peptídeos antimicrobianos, secreção de ácidos nucleicos extracelulares para o sequestro de patógenos, ativação da coagulação da hemolinfa e melanização, a qual pode indicar o nível de estresse do inseto (Bolouri Moghaddam *et al.*, 2016; Bismuth *et al.*, 2021; Smith & Casadevall, 2021; Serrano *et al.*, 2023).

Estes hemócitos podem reconhecer microrganismos patogênicos através de 2 formas: O reconhecimento de forma direta ocorre através da interação entre seus receptores de superfície e as moléculas do patógeno; enquanto que na forma indireta, o reconhecimento é realizado através de células que se ligam e opsonizam o microrganismo melhorando seu reconhecimento por fagócitos (Smith & Casadevall, 2021; Serrano *et al.*, 2023).

A *G. mellonella*, também já foi demonstrada como um bom modelo alternativo para diversos estudos, seja em pesquisas de novos tratamentos contra protozoários como *Leishmania* (Reddy *et al.*, 2017; Patiño-Márquez *et al.*, 2018) e *Trichomonas vaginalis* (Oliveira, *et al.*, 2023B) ou estudo de infecções *in vivo*, como infecções por *Leptospira* (Prakoso *et al.*, 2022) e *Brucella* (Wang *et al.*, 2023). *G. mellonella* também é frequentemente utilizada em estudos de infecções fúngicas, sendo validada como modelo de infecção tanto para fungos filamentosos como *Aspergillus fumigatus* (Vanhoffelen *et al.*, 2023), *Paracoccidioides lutzii* e *Histoplasma capsulatum* (Thomaz *et al.*, 2013) como para fungos leveduriformes, como *Candida haemulonii* e *Candida auris* (Gandra *et al.*, 2020; Garcia-Bustos *et al.*, 2022; Frota *et al.*, 2024A).

Podemos destacar também sua utilização em estudos com o gênero fúngico *Cryptococcus*, sendo possível estimar a virulência de diferentes cepas deste fungo, estudar as interações patógeno-hospedeiro, seja de células planctônicas ou associadas a biofilmes de *Cryptococcus spp.*, além de realizar avaliações do potencial terapêutico e toxicidade de novas moléculas e medicamentos contra criptococose (Benaducci *et al.*, 2016; Ali *et al.*, 2020; Stempinski *et al.*, 2022; Vanhoffelen *et al.*, 2024).

2. JUSTIFICATIVA

Infecções fúngicas, como a criptococose, representam um desafio de saúde pública, especialmente em populações imunossuprimidas, onde apresentam maior gravidade e dificuldade de tratamento. *Cryptococcus*, em particular, é um dos patógenos fúngicos mais desafiadores no contexto clínico, conforme destacado pela OMS em 2022 (WHO, 2022). Esse cenário se deve pelas limitações dos tratamentos atuais, que enfrentam desafios como alta toxicidade e a crescente resistência aos antifúngicos licenciados (WHO, 2022; WHO, 2022B). Dado a urgência em encontrar alternativas terapêuticas eficazes, compostos de coordenação têm se destacado por seus efeitos antimicrobianos significativos e baixa toxicidade ao hospedeiro, tanto em ensaios *in vitro* com *in vivo* (McCann *et al.*, 2012; Viganor *et al.*, 2015; Gandra *et al.*, 2020; Granato *et al.*, 2021; Santos *et al.*, 2022; Oliveira *et al.*, 2023). O íon metálico de zinco, por sua vez, é amplamente estudado na medicina, com aplicações em suplementação, cicatrização de feridas e como agente terapêutico com propriedades antimicrobianas, antivirais e anticâncer (Wiesmann *et al.*, 2020; Abdullaeva *et al.*, 2024; Ying *et al.*, 2024).

Diante do cenário de resistência crescente a antifúngicos e a toxicidade das terapias atuais, este projeto se revela essencial ao explorar novas alternativas terapêuticas que possam oferecer maior segurança e eficácia contra infecções por *Cryptococcus* (Mourad & Perfect, 2018; Spadari *et al.*, 2020; Iyer *et al.*, 2021). Ao investigar a ação anti-*Cryptococcus* do composto de coordenação Zn²⁺-fendiona, este projeto visa contribuir no desenvolvimento de alternativas terapêuticas mais seguras e eficazes, que não apenas supram as limitações atuais, mas também promovam avanços na qualidade de vida dos pacientes afetados.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar a atividade antifúngica *in vitro* do composto de coordenação Zn²⁺-fendiona contra seis isolados clínicos de *Cryptococcus* spp. (três cepas de *C. neoformans* e três de *C. gattii*), bem como investigar o perfil de toxicidade desse composto por meio de abordagens *in silico*, *in vitro* e *in vivo*.

3.2 Objetivos específicos

- Definir a concentração inibitória mínima e a concentração fungicida mínima da Zn²⁺-fendiona, para os isolados clínicos de *C. neoformans* e *C. gattii*;
- Avaliar a estabilidade da atividade antifúngica do composto de coordenação, Zn²⁺-fendiona, quando estocado à temperatura ambiente e protegido da luz;
- Realizar a previsão de potencial terapêutico e a avaliação dos parâmetros farmacocinéticos do Zn²⁺-fendiona *in silico*, utilizando o software Swiss ADME;
- Avaliar a atividade hemolítica do composto de coordenação em modelo *in vitro* de eritrócitos de carneiro;
- Avaliar a toxicidade aguda *in vivo* do composto de coordenação em dose única, utilizando o modelo de *G. mellonella*;
- Avaliar a toxicidade crônica *in vivo* do composto de coordenação em dose diária, utilizando o modelo de *G. mellonella*;
- Definir o índice de seletividade de Zn²⁺-fendiona para os modelos de *in vitro* (hemólise de eritrócitos de carneiro) e *in vivo* (*G. mellonella*);

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Fungos e cultivo celular

4.1.1 Microrganismos

As cepas de *Cryptococcus* spp. que foram utilizadas neste trabalho, foram isoladas de pacientes do Instituto Nacional Infectologia Evandro Chagas (INI-FIOCRUZ) e foram fornecidas pela Fundação Oswaldo Cruz (Dr. Rodrigo Almeida – INI), resultando na obtenção de 3 cepas de *Cryptococcus gattii*: CFP00023, CFP00025, CFP00027 e 3 cepas de *Cryptococcus neoformans*: CFP00213, CFP00223 e CFP00350. Ao longo deste projeto as cepas passaram a ser chamadas, respectivamente, de 23; 25; 27; 213; 223; 350.

4.1.2 Estocagem das cepas

As cepas foram estocadas em criotubos contendo 95% de soro fetal bovino e 5% de dimetilsulfóxido (DMSO, SIGMA) e conservadas em nitrogênio líquido (- 197 °C). Também preservamos as cepas em criotubos contendo 70% de meio de infusão de cérebro e coração (BHI, BD, França) e 30% de glicerol (ISOFAR), mantidas a -20 °C. Além disso, as cepas foram cultivadas em placas de Petri contendo meio ágar Sabouraud dextrosado e mantidas à temperatura ambiente, com repiques realizados a cada duas semanas, para manutenção do microrganismo e seu metabolismo.

4.1.3 Cultivo celular

Previamente a realização de cada experimento foi repicado uma alíquota do cultivo em ágar Sabouraud dextrosado para o meio RPMI, que foi mantido a 37 °C por 48 horas, com o objetivo de promover a proliferação celular e estimulação da ativação metabólica. O meio de cultura RPMI 1640 (Sigma Aldrich, EUA), de pH 7,2, tamponado com 0,165 M de MOPS (Sigma Aldrich, EUA), foi utilizado a fim de favorecer o desenvolvimento capsular da célula fúngica (Reis *et al.*, 2019; Giovanini *et al.*, 2025).

4.2 Composto de coordenação Zn²⁺-fendiona

O composto Zn²⁺-fendiona foi sintetizado pela Dra. Christiane Fernandes Horn (Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC). A síntese, bem como a fórmula do composto, não fora informada devido ao sigilo requerido pelo processo de geração de patente. O ligante, o composto coordenado e seu respectivo sal foram dissolvidos

em dimetilsulfóxido (DMSO, SIGMA) a 50, 5 ou 1 mM e armazenados a temperatura ambiente no escuro.

4.3 Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM) da fendiona, sal zinco e complexo Zn²⁺-fendiona

Avaliamos o perfil de susceptibilidade utilizando o método de microdiluição em meio RPMI 1640 (Sigma Aldrich, EUA) tamponado com 0,165 M de MOPS (Sigma Aldrich, EUA), conforme descrito no protocolo M27-A3 do CLSI (CLSI, 2017). Nas placas de cultivo celular de 96 poços (BIOFIL, EUA) foi adicionado RPMI contendo os compostos testes (fendiona, Zn²⁺-fendiona e sal de zinco, (Zn(ClO₄)₂.6H₂O) em diferentes concentrações, variando de 0,78-100 µM (0,29 – 37,2 µg/mL). A partir do crescimento fúngico em ágar Sabouraud dextrosado, foi feito um repique para um tubo Falcon, contendo RPMI 1640 tamponado com 0,165 M de MOPS e incubado por 48 horas a 37 °C em agitação. Com esse crescimento em meio líquido, as colônias foram suspensas com PBS 1X estéril e ajustadas para 5×10⁴ células/mL, sendo adicionado 10 µL dessa suspensão final a cada poço da placa contendo 190 µL de meio com ou sem o composto, totalizando a concentração de 5×10² células por poço. As placas foram incubadas por 48 horas a 37 °C. Consideramos CIM a menor concentração de cada composto capaz de inibir 100% do crescimento fúngico, conforme determinado pela ausência de turbidez visível em cada poço. Utilizamos como controle os sistemas contendo RPMI mais suspensão fúngica e apenas RPMI.

Para determinar a CFM, transferimos para placas de Petri contendo meio ágar Sabouraud dextrosado uma alíquota de 10 µL dos poços que não exibiram turbidez. Incubamos as placas por 48 h a 37 °C. Consideramos a CFM, a menor concentração de cada composto que não apresentou formação de colônia (Franconi & Lupetti, 2023). Para a análise de efeito antifúngico, adotamos o critério segundo o qual o efeito é considerado fungicida quando o valor de CFM é ≤ 4 vezes o valor da CIM; sendo considerado efeito fungistático quando CFM > 4 vezes CIM (Pfaller *et al.*, 2004).

4.4 Avaliação da estabilidade da atividade do composto de coordenação Zn²⁺-fendiona, em estoques à temperatura ambiente

Avaliamos a estabilidade antifúngica do composto de coordenação em relação a sua atividade de CIM a partir de uma solução estoque em 5 mM, armazenada à temperatura ambiente (25-32 °C) e na ausência de luz por até 2 anos. Realizamos, a cada seis meses,

repetições dos ensaios de susceptibilidade (CIM) dos seis isolados de *Cryptococcus* spp. contra Zn²⁺-fendiona, utilizando o método de microdiluição, conforme descrito no protocolo M27-A3 do CLSI (CLSI, 2017) e descrito no item anterior (4.3).

4.5 Previsão do potencial terapêutico e avaliação dos parâmetros farmacocinéticos do Zn²⁺-fendiona

A previsão de potencial terapêutico e farmacocinética de Zn²⁺-fendiona foi realizada com o auxílio do aluno de doutorado Lucas Giovanini, sendo calculada utilizando o programa Swiss ADME (Absorção, Distribuição, Metabolização e Excreção) (Daina, Michielin & Zoete, 2017). Além disso, foi realizado um controle comparativo utilizando a anfotericina B e o fluconazol (drogas já utilizadas na clínica em criptococose), cujas estruturas químicas foram obtidas no banco de dados PubChem. Para Zn²⁺-fendiona, sua estrutura química foi criada utilizando o programa DiscoveryStudio, v20 (Accelrys, San Diego, CA, EUA).

Após a obtenção das estruturas químicas, o composto foi submetido ao Swiss ADME para avaliação de suas propriedades físico-químicas e estimativa do potencial terapêutico e farmacocinética. Para estimar o potencial terapêutico, foram utilizados cinco filtros distintos, fundamentados em regras para previsão da biodisponibilidade oral: Lipinski (Lipinski *et al.*, 2001), Ghose (Ghose, Viswanadhan & Wendoloski, 1999), Veber (Veber *et al.*, 2002), Egan (Egan, Merz & Baldwin, 2000) e Muegge (Muegge, Heald & Brittelli, 2001), sendo estas regras baseadas na análise de outros fármacos aprovados para uso clínico.

A previsão da farmacocinética foi realizada a partir da avaliação da capacidade de inibição das isoenzimas do citocromo P450 (CYP1A2, CYP2C19, CYP2C9, CYP2D6, CYP3A4). Foram calculadas as propriedades físico-químicas, a área de superfície polar topológica e o coeficiente de partição entre água e *n*-octanol, a fim de estimar a absorção gastrointestinal passiva (AGI), a transposição da barreira hematoencefálica (BHE) e o efluxo da glicoproteína P, utilizando o modelo BOILED-Egg (Daina & Zoete, 2016). Além disso, o tamanho molecular e a lipofilicidade foram calculados para a predição do coeficiente de permeabilidade da pele (Log K_p em cm/s).

4.6 Ensaio de hemólise

Para a avaliação de atividade hemolítica utilizamos o método de micro diluição com PBS 1X em placas de cultivo celular de 96 poços (BIOFIL, EUA). Adicionamos PBS 1X contendo o composto teste (Zn²⁺-fendiona) em diferentes concentrações, variando de 125 a 1,9

μM . Após isso, adicionamos os eritrócitos de carneiro (Cultilab, Rio de Janeiro) diluído em PBS 1X na concentração final de 2% para cada poço (aproximadamente 2×10^8), totalizando volume final de 200 μL por poço. Incluímos um controle negativo, contendo apenas hemácias e PBS 1X e um controle positivo contendo: hemácias, PBS 1X e Triton-X-100 (Vetec) (na concentração de 1% para cada poço). As placas foram incubadas a 37 °C por 24 horas. Após a incubação, a placa foi centrifugada a 500x G a 4 °C, por 10 minutos. Após a centrifugação, transferimos 100 μL do sobrenadante de cada poço para outra microplaca de 96 poços na qual realizamos a leitura da absorbância usando um leitor de microplaca (MULTISKAN SkyHigh; Thermo Scientific) a 415 nm (Frota *et al.*, 2024A).

Para o cálculo do resultado final, realizamos a média da absorbância do controle negativo, para então realizar a subtração do valor dessa média e dos valores de absorbância dos demais grupos. Assumimos o valor da média de absorbância do controle positivo como o valor de 100% de hemólise e calculamos a porcentagem dos demais grupos.

4.7 Ensaios de toxicidade *in vivo*

A toxicidade *in vivo* do composto de coordenação foi realizada utilizando o modelo animal de *G. mellonella* em todos os ensaios. A criação e manutenção do modelo animal de larvas de *G. mellonella* foi realizada em nosso laboratório, seguindo os protocolos estabelecidos para todo seu ciclo (Fernandes *et al.*, 2017; Firacative *et al.*, 2020; Giovanini *et al.*, 2025), não sendo necessária a aprovação do comitê de ética, para este modelo animal. Para os experimentos foram selecionadas as larvas saudáveis na faixa de peso entre 0,2 – 0,3 g. O procedimento de inoculação das larvas foi realizado utilizando seringa de insulina (Bd-Ultra-Fine), sobre a última pró-leg esquerda e o volume de inóculo utilizado sendo de 10 μL . A sobrevivência das larvas foi avaliada através da observação de resposta ao estímulo tátil com ponteira de micropipeta na cabeça das larvas, percorrendo todo o corpo do animal, avaliando a resposta ao toque. Além disso, estimamos o nível de estresse das larvas através de produção de melanina, padrão de produção de seda/casulo e mobilidade da larva (Giovanini *et al.*, 2025).

4.7.1 Toxicidade aguda

Para avaliar a toxicidade aguda do composto *in vivo*, inoculamos no modelo animal de *G. mellonella*, o composto (Zn^{2+} -fendiona) diluído em PBS 1X, nas concentrações de 1000 μM , 500 μM , 250 μM , 125 μM , 62,5 μM , 31,25 μM e 15,6 μM . Cada grupo foi formado por 15 larvas onde, o grupo controle foi formado por larvas inoculadas apenas com uma solução de

PBS 1X estéril com dimetilsulfóxido (DMSO) a 4%, seguindo também a metodologia descrita no tópico anterior (4.7). Depois de inoculados, os animais foram incubados a 37 °C e suas condições avaliadas a cada 24 horas até que ocorresse a morte completa em todos os grupos inoculados, ou ao final de 7 dias (McCann *et al.*, 2012; Gandra *et al.*, 2020; Frota *et al.*, 2024B; Giovanini *et al.*, 2025).

Além disso, após 24 horas da inoculação coletamos os hemócitos de 2 larvas de cada grupo, selecionadas de forma aleatória, para a determinação da densidade de hemócitos. Para isso, realizamos uma incisão na região ventral caudal da larva, entre suas últimas pró-legs, com auxílio de um bisturi cirúrgico e coletamos 10 µL da hemolinfa de cada larva, que foi diluída (1 pra 100) em 990 µL de tampão solução anticoagulante (98 mM NaOH, 186 mM NaCl, 17 mM EDTA, e 41 mM ácido cítrico - pH 4,5). Com o auxílio de uma câmara de Neubauer, contamos o número de células presentes em cada diluição (Kelly & Kavanagh, 2011; Gandra *et al.*, 2020; Frota *et al.*, 2024^a; Giovanini *et al.*, 2025).

4.7.2 Toxicidade crônica

Para avaliação da toxicidade crônica do composto de coordenação, inoculamos diariamente ao longo de 7 dias as larvas de *G. mellonella* com 10 µL do composto (Zn^{2+} -fendiona), nas concentrações de CIM, 2,5X CIM, 5X CIM e 10X CIM. Cada grupo consistiu em 20 larvas, onde o grupo controle foi composto por larvas inoculadas apenas com uma solução de PBS 1X estéril com dimetilsulfóxido (DMSO) a 4%. Todos os grupos permaneceram incubados a 37 °C. Ao longo de todo este experimento, avaliamos as condições e sobrevivência dos grupos a cada período de 24 horas, para que então pudéssemos prosseguir novamente com o tratamento, inoculando o composto nas larvas, até que ocorresse a morte completa dos animais em todos os grupos inoculados ou ao final de 7 dias, seguindo também a metodologia descrita anteriormente (4.7) (Giovanini *et al.*, 2025). Além disso, durante o período de 5 dias, também coletamos uma alíquota da hemolinfa de 2 larvas de cada grupo, selecionadas aleatoriamente, a cada intervalo de 24 a 24 horas, para a determinação da densidade de hemócitos, seguindo o protocolo descrito anteriormente para a determinação da densidade de hemócitos (Giovanini *et al.*, 2025).

4.8 Índice de seletividade

O índice de seletividade (IS) do composto foi calculado por meio da razão entre a concentração de 50% de citotoxicidade (CC₅₀) no modelo *in vitro*, utilizando o modelo de

eritrócitos de carneiro ou o modelo *in vivo* de larvas de *G. mellonella*. Este valor do CC₅₀ foi dividido pelo CIM₁₀₀ deste composto contra *C. neoformans* ou *C. gattii* (Vargas Rigo *et al.*, 2019; Oliveira *et al.*, 2023B; Frota *et al.*, 2024A).

4.9 Análises estatísticas

Todos os experimentos foram realizados em duplicata ou em triplicata e repetidos três vezes em conjuntos experimentais independentes. Todos os gráficos e todas as análises estatísticas foram realizados com auxílio do programa Graphpad Prism v8.0.1. Em todas as análises, foi considerado o p-valor $\leq 0,05$ como estatisticamente significante e foram utilizados os testes one way ANOVA e two way ANOVA. Para os ensaios de toxicidade em *G. mellonella* foi utilizado o teste Mantel-Cox, com análise individual das curvas do grupo tratado com o grupo não tratado (Giovanini *et al.*, 2025).

5. RESULTADOS

5.1 CIM e CFM

Os valores de CIM foram determinados para o ligante fendiona, o sal de zinco ($\text{Zn}(\text{ClO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) e o composto de coordenação Zn^{2+} -fendiona frente aos isolados clínicos de *Cryptococcus*. Os resultados demonstraram que o ligante apresentou CIM de 12,5 μM (4,65 $\mu\text{g/mL}$) contra os 6 isolados (**Tabela 4**), enquanto o sal de zinco exibiu um valor de CIM >100 μM (>37,2 $\mu\text{g/mL}$) contra todos os 6 isolados, portanto não apresentando atividade inibitória nas concentrações testadas. Já o composto de coordenação destacou-se com a menor CIM, apresentando valores de 6,25 μM (2,32 $\mu\text{g/mL}$) para todos isolados, exceto para a cepa 223 de *C. neoformans* qual foi necessário apenas 3,125 μM (1,16 $\mu\text{g/mL}$) para alcançar a CIM.

Tabela 4: Concentração Inibitória Mínima (CIM) da fendiona, derivado metálico Zn^{2+} -fendiona e $\text{Zn}(\text{ClO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ em μM e $\mu\text{g/mL}$ contra os isolados de *C. gattii* (23, 25 e 27) e *C. neoformans* (213, 223 e 350).

Espécies de <i>Cryptococcus</i>	Cepa	CIM, [μM ($\mu\text{g/mL}$)]		
		Fendiona	$\text{Zn}(\text{ClO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	Zn^{2+} -fendiona
<i>C. gattii</i>	23	12,5 (2,5)	> 100 (> 37,2)	6,25 (2,32)
	25	12,5 (2,5)	> 100 (> 37,2)	6,25 (2,32)
	27	12,5 (2,5)	> 100 (> 37,2)	6,25 (2,32)
<i>C. neoformans</i>	213	12,5 (2,5)	> 100 (> 37,2)	6,25 (2,32)
	223	12,5 (2,5)	> 100 (> 37,2)	3,125 (1,16)
	350	12,5 (2,5)	> 100 (> 37,2)	6,25 (2,32)

O ligante apresentou valores de CFM de 100 μM (37,2 $\mu\text{g/mL}$) para as cepas 25, 27 e 223, ou >100 μM (>37,2 $\mu\text{g/mL}$) para as demais cepas (23, 213 e 350) (**Tabela 5**). O composto de coordenação, também apresentou variações em seus valores de CFM de acordo com a cepa testada. Sendo a CFM de 25 μM (9,30 $\mu\text{g/mL}$) para as cepas 23 de *C. gattii* e 350 de *C. neoformans*, 12,5 μM (4,65 $\mu\text{g/mL}$) para a cepa 25 de *C. gattii* e 223 de *C. neoformans* e 100 μM (37,2 $\mu\text{g/mL}$) para as cepas 27 de *C. gattii* e 213 de *C. neoformans* (**Tabela 5**). Observou-se então efeito fungicida para as cepas 23, 27, 213, 223 e 350, enquanto para a cepa 25, a ação

foi apenas fungistática. A CFM do sal de zinco ($Zn(ClO_4)_2 \cdot 6H_2O$) não foi realizada uma vez que não apresentou efeito inibitório nas concentrações de até 100 μM .

Tabela 5: Concentração fungicida mínima (CFM) da fendiona e derivado metálico Zn^{2+} -fendiona μM e $\mu g/mL$ contra os isolados de *C. gattii* e *C. neoformans*. Valores marcados com asterístico (*) sinalizam efeito fungicida (valor de CFM \leq 4 vezes o valor da CIM).

Espécies de <i>Cryptococcus</i>	Cepa	CFM [μM ($\mu g/mL$)]	
		Fendiona	Zn^{2+} -fendiona
<i>C. gattii</i>	23	>100 (37,2)	25 (9,30) *
	25	>100 (37,2)	12,5 (4,65)
	27	100 (37,2)	100 (37,2) *
<i>C. neoformans</i>	213	100 (37,2)	100 (37,2) *
	223	100 (37,2)	12,5 (4,65) *
	350	> 100 (37,2)	25 (9,30) *

5.2 Avaliação da estabilidade do composto de coordenação Zn^{2+} -fendiona, em estoques à temperatura ambiente

Avaliamos a estabilidade do composto de Zn^{2+} -fendiona quanto a sua atividade antifúngica contra os seis isolados de *Cryptococcus*, ao longo de 2 anos, utilizando uma solução estoque na concentração de 5 mM armazenada à temperatura ambiente, e na ausência de luz. Todas as repetições subsequentes mantiveram valores de CIM semelhantes àquelas observadas na primeira análise, não havendo variações relevantes de acordo com os critérios estabelecidos pelo protocolo do CLSI M27 (Ed. 4) (Tabela 6) (CLSI,2017). Essas variações de até uma diluição são consideradas dentro da normalidade experimental e não impactam a interpretação da estabilidade da atividade anti-*Cryptococcus* do composto (CLSI,2017).

Tabela 6: avaliação de estabilidade da atividade anti-*Cryptococcus* de Zn²⁺-fendiona mensurado por meio da CIM, repetida semestralmente ao longo de 2 anos.

Espécies de <i>Cryptococcus</i>	Cepa	Avaliação da estabilidade			
		Zn ²⁺ -fendiona [μM (μg/mL)]			
		2024.1	2024.2	2025.1	2025.2
<i>C. gattii</i>	23	6,25 (2,32)	3,125 (1,16)	3,125 (1,16)	3,125 (1,16)
	25	6,25 (2,32)	6,25 (2,32)	6,25 (2,32)	3,125 (1,16)
	27	6,25 (2,32)	6,25 (2,32)	6,25 (2,32)	3,125 (1,16)
<i>C. neoformans</i>	213	6,25 (2,32)	6,25 (2,32)	6,25 (2,32)	3,125 (1,16)
	223	3,125 (1,16)	3,125 (1,16)	3,125 (1,16)	1,56 (1,49)
	350	6,25 (2,32)	6,25 (2,32)	6,25 (2,32)	3,125 (1,16)

5.3 Previsão do potencial terapêutico e avaliação dos parâmetros farmacocinéticos do Zn²⁺-fendiona

Os resultados obtidos a partir das análises de previsão de potencial terapêutico, ou perfil farmacológico favorável, da Zn²⁺-fendiona foram realizados utilizando a ferramenta Swiss ADME (Daina *et al.*, 2017).

Pela regra de Lipinski, o complexo Zn²⁺-fendiona apresentou duas violações (**Tabela 7**). A primeira está relacionada ao peso molecular elevado (696,94 g/mol), que excede o limite de 500 g/mol recomendado para uma boa difusão passiva através da membrana celular; a segunda violação refere-se ao número de átomos de oxigênio e nitrogênio que Zn²⁺-fendiona apresentou N ou O = 12, sendo superior ao limite de 10 átomos, indicando uma polaridade elevada que pode impactar de forma negativa na sua permeabilidade e absorção oral (Lipinski *et al.*, 2001). Na regra de Ghose, também foram identificadas duas violações; a primeira está associada novamente ao peso molecular, que ultrapassa o limite de 480 g/mol e a segunda violação está relacionada ao momento refrativo do composto, ou refratividade molar, em que Zn²⁺-fendiona apresentou MR >130, um parâmetro que reflete a tendência à polarização eletrônica (Ghose, Viswanadhan & Wendoloski, 1999). Os valores elevados de momento refrativo do composto, sugerem uma maior complexidade estrutural, que pode reduzir a interação do composto com alvos biológicos ou sua capacidade de atravessar barreiras

fisiológicas (Ghose, Viswanadhan & Wendoloski, 1999). A regra de Muegge apresentou duas violações: o peso molecular do composto excedeu o limite de 600 g/mol, e o número de anéis na estrutura do composto excede o limite de 7 anéis aromáticos (Muegge, Heald & Brittelli, 2001). Embora o composto de coordenação não tenha apresentado violações na Regra de Veber, indicando que o número de rotações livres das ligações está dentro dos limites aceitáveis para a biodisponibilidade oral, foi identificada uma violação no filtro de Egan. Essa violação está relacionada à área de superfície polar topológica do composto ($TPSA = 132,00 \text{ \AA}^2$), que ultrapassa o limite estabelecido ($131,6 \text{ \AA}^2$) (Egan, Merz, & Baldwin, 2000).

O fluconazol foi utilizado como um dos controles no estudo, sendo um antifúngico amplamente empregado no tratamento de infecções fúngicas, inclusive no tratamento da criptococose. A previsão de seu potencial terapêutico (**Tabela 7**) demonstrou que o composto atende aos critérios de Lipinski, Ghose, Veber, Egan e Muegge, sem apresentar violações, o que sugere boa adequação a parâmetros avaliados por essas regras.

Além do fluconazol, outro controle utilizado no estudo foi a anfotericina B, um antifúngico de referência também amplamente empregado no tratamento de infecções fúngicas sistêmicas. Diferente do fluconazol, a anfotericina B mostrou múltiplas violações aos filtros utilizados na previsão da viabilidade de um composto como candidato a fármaco oral (**Tabela 7**). A anfotericina B violou três critérios do filtro de Lipinski: apresentando peso molecular superior a 500 Da; número total de átomos de nitrogênio e oxigênio superior a 10 e número de grupos hidroxila (-OH) ou aminas (-NH₃) maior que 5 (Lipinski *et al.*, 2001). Também violou três critérios do filtro de Ghose: peso molecular superior a 480 Da; refratividade molar maior que 130 e número total de átomos, excluindo hidrogênios, superior a 70 (Ghose, Viswanadhan & Wendoloski, 1999). Além disso, houve uma violação ao filtro de Veber, pois a área de superfície polar topológica excedeu 140 \AA^2 (Veber *et al.*, 2002), e uma ao filtro de Egan em razão da mesma propriedade físico-química mencionada anteriormente (Egan, Merz & Baldwin, 2000). Por fim, a anfotericina B também violou quatro critérios do filtro de Muegge: peso molecular superior a 600 g/mol; área de superfície polar topológica superior a 150 \AA^2 ; número de aceptores de hidrogênio maior que 10 e número de doadores de hidrogênio superior a 5 (Muegge, Heald & Brittelli, 2001) (**Tabela 7**).

Tabela 7: Previsão do potencial terapêutico dos compostos Zn²⁺-fendiona, Anfotericina B e Fluconazol de acordo com o número de violações de regras de cada um dos filtros analisados: Lipinski, Ghose, Veber, Egan e Muegge.

Filtro de regras	Nº de violações		
	Zn ²⁺ -fendiona	Anfotericina B	Fluconazol
Lipinski	2	3	0
Ghose	2	3	0
Veber	0	1	0
Egan	1	1	0
Muegge	2	4	0

A avaliação farmacocinética do composto Zn²⁺-fendiona e dos controles, fluconazol e anfotericina B foi realizada utilizando a ferramenta Swiss ADME (Daina *et al.*, 2016). Os resultados apresentados na **Tabela 8**, indicaram que o composto apresenta alta absorção passiva pelo trato gastrointestinal. No entanto, foi determinado que o composto não apresenta potencial de penetração na BHE, sugerindo uma baixa probabilidade de atravessar essa barreira fisiológica e exercer efeitos no sistema nervoso central.

Com relação à interação com proteínas de transporte, Zn²⁺-fendiona foi predito como um substrato para a glicoproteína P, proteínas de transporte que removem compostos do meio intracelular, atuando como bomba de efluxo, contribuindo para a proteção de tecidos contra acúmulo tecidual de diversas substâncias (Lee *et al.*, 2019). A análise dos parâmetros farmacocinéticos também revelou que o complexo não apresenta potencial de inibição das principais isoenzimas do citocromo P450, como CYP1A2, CYP2C19, CYP2C9, CYP2D6 e CYP3A4. Essas isoenzimas desempenham um papel essencial na biotransformação hepática de moléculas exógenas e a ausência de inibição predita, sugerindo que o Zn²⁺-fendiona pode ser metabolizado de forma eficiente, sem sobrecarregar essas vias enzimáticas. Esse perfil pode favorecer um metabolismo mais previsível, contribuindo para uma eliminação adequada reduzindo assim o risco de acúmulo no organismo (Foti & Dalvie, 2016; Gougis *et al.*, 2021). Além disso, o composto apresentou um valor de Log K_p de -8,22 cm/s, indicando moderada permeabilidade cutânea de acordo com o modelo de Potts & Guy (Potts & Guy, 1992).

No entanto, o composto fluconazol não apresenta permeabilidade através da barreira hematoencefálica (BHE), o que pode limitar sua metabolização e ação no sistema nervoso central (SNC). Além disso, o fluconazol é predito como substrato da glicoproteína-P, um transportador de efluxo que pode limitar sua absorção e distribuição tecidual, ao promover a extrusão do fármaco para fora das células epiteliais, especialmente no trato gastrointestinal e

em barreiras fisiológicas como a hematoencefálica. Em relação à metabolização hepática, fluconazol inibe a isoenzima CYP2C19, responsável por catalisar reações de oxidação em compostos exógenos no fígado. Essa inibição pode afetar o metabolismo de outras moléculas coadministradas que dependem dessa via enzimática, alterando sua taxa de biotransformação e comprometendo a previsibilidade de sua farmacocinética (Foti & Dalvie, 2016; Gougis *et al.*, 2021), embora não tenha apresentado inibição das outras isoformas CYP1A2, CYP2C9, CYP2D6 e CYP3A4. Por fim, o coeficiente de permeabilidade cutânea ($\text{Log } K_p$) foi estimado em -7,92 cm/s, indicando uma baixa penetração pela via transdérmica (**Tabela 8**), o que sugere que sua administração tópica pode não ser a via mais adequada para alcançar concentrações terapêuticas eficazes.

A anfotericina B não apresentou atividade inibitória sobre as isoenzimas do citocromo P450 (CYP1A2, CYP2C19, CYP2C9, CYP2D6 e CYP3A4), sugerindo uma alta taxa de metabolização pelo organismo humano. O composto também demonstrou ser substrato para a glicoproteína-P, o que pode comprometer sua biodisponibilidade oral e limitar sua penetração em tecidos-alvo, com a ação desta proteína reduzindo a concentração intracelular do fármaco em locais como o trato gastrointestinal e o SNC. Além disso, apresentou baixa absorção gastrointestinal, o que reforça a possibilidade de um aproveitamento limitado pela via oral, e não demonstrou permeabilidade através BHE, indicando que, em condições fisiológicas normais, pode não alcançar concentrações terapêuticas no SNC; além disso, exibiu um coeficiente de permeabilidade cutânea ($\text{Log } K_p$) de -11,94 cm/s, indicando absorção transdérmica extremamente baixa (**Tabela 8**).

Tabela 8: Propriedades farmacocinéticas dos compostos Zn²⁺-fendiona, anfotericina B e fluconazol, avaliando a capacidade de inibição das isoenzimas do citocromo P450 (CYP1A2, CYP2C19, CYP2C9, CYP2D6 e CYP3A4), a absorção gastrointestinal (AGI), cruzar a barreira hematoencefálica (BHE), ser substrato da glicoproteína-P e permeabilidade cutânea (indicada pelo Log K_p em cm/s).

Propriedades farmacocinéticas	Zn ²⁺ -fendiona	Anfotericina B	Fluconazol
Inibição da enzima CYP1A2	Não	Não	Não
Inibição da enzima CYP2C19	Não	Não	Sim
Inibição da enzima CYP2C9	Não	Não	Não
Inibição da enzima CYP2D6	Não	Não	Não
Inibição da enzima CYP3A4	Não	Não	Não
Absorção gastrointestinal	Alta	Baixa	Alta
Permeabilidade da BHE	Não	Não	Não
Substrato da glicoproteína-P	Sim	Sim	Sim
Log K _p (permeabilidade cutânea)	- 8,22 cm/s	- 11,94 cm/s	- 7,92 cm/s

5.4 Ensaio de hemólise

O resultado obtido no ensaio de hemólise indica que o composto de coordenação Zn²⁺-fendiona não apresentou atividade hemolítica nas concentrações testadas (125 µM - 1,9 µM) no modelo de eritrócitos de carneiro (hemólise < 0,5%) (**Figura 4**).

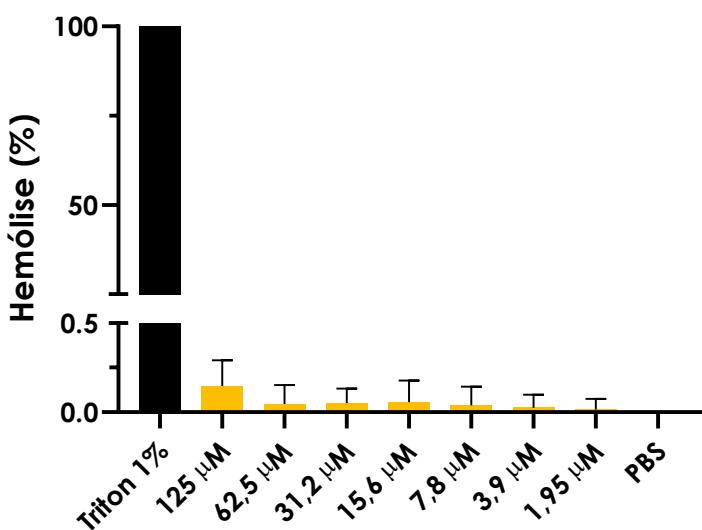


Figura 4: Atividade hemolítica do composto de Zn^{2+} -fendiona (nas concentrações de 125 μM ; 62,5 μM ; 31,25 μM ; 15,625 μM ; 7,8 μM e 3,9 μM) expressos em porcentagem, utilizando como controle positivo eritrócitos tratados com Triton-X-100 a 1% e controle negativo de eritrócitos com PBS 1X. O resultado é demonstrado por leitura em espectrofotômetro a 415 nm. Para obter a porcentagem de hemólise, realizamos a média da absorbância do controle negativo e subtraímos o valor dessa média dos valores de absorbância dos demais grupos. Após isso, assumimos o valor da média de absorbância do controle positivo como nosso 100% de hemólise e calculamos a porcentagem dos demais grupos.

5.5 Ensaios de toxicidade *in vivo*

5.5.1 Toxicidade aguda

A toxicidade aguda do Zn^{2+} -fendiona foi avaliada por meio do modelo *in vivo* de larvas de *Galleria mellonella*, que foram inoculadas com diferentes concentrações do composto de coordenação (1000 μM , 500 μM , 250 μM e 125 μM). Os resultados, apresentados na **Figura 5**, indicaram que Zn^{2+} -fendiona não apresentou toxicidade em nenhuma das concentrações testadas. Na concentração de 1000 μM apenas 10% de mortalidade foi observada, não havendo relevância estatística (p -valor = 0,4574) de acordo com o teste estatístico Mantel-Cox e reforçando assim, a baixa toxicidade do composto.

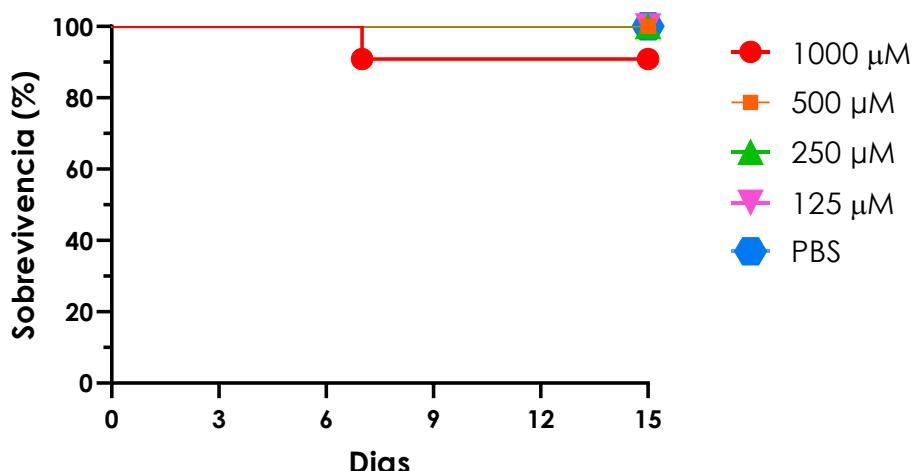


Figura 5: Gráfico de sobrevivência das larvas de *G. mellonella* inoculadas em tratamento agudo com o composto de coordenação Zn^{2+} -fendiona nas concentrações de 1000-125 µM ou com uma solução de PBS 1X estéril com dimetilsulfóxido (DMSO) a 4%.

A **Figura 6** apresenta a contagem da densidade celular dos hemócitos dessas larvas após dose única de Zn^{2+} -fendiona. O ensaio foi conduzido com concentrações variando de 1000 µM a 15,6 µM. Observou-se que, não houve aumento ou redução significativa na densidade de hemócitos das larvas de acordo com o teste de variância one wayANOVA (p -valor $\geq 0,9999$), quando comparados com o controle de PBS 1X.

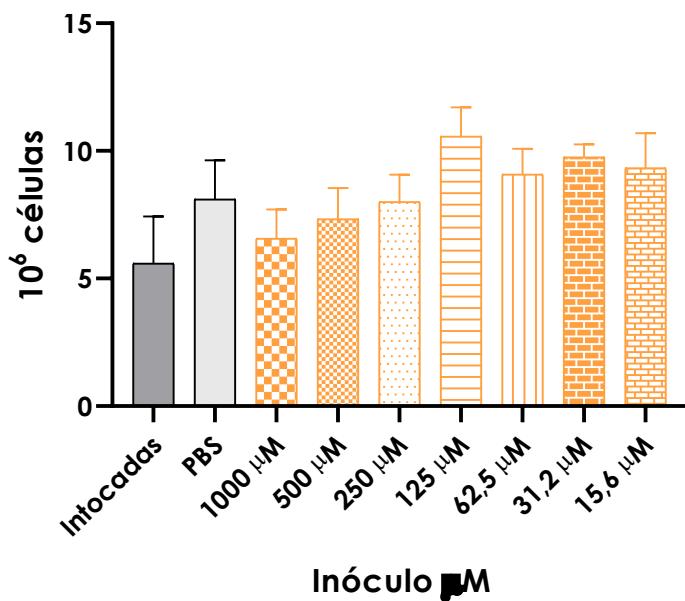


Figura 6: Ensaio de densidade de hemócitos das larvas *G. mellonella* inoculadas ou não com o composto de coordenação Zn^{2+} -fendionna (nas concentrações variando de 1000 μM – 15,6 μM) ou PBS 1X. A coleta da hemolinfa foi realizada 24 horas após o inóculo, sendo mantidas a 37 °C ao longo desse período.

5.5.2 Toxicidade crônica

As larvas foram tratadas por 7 dias com doses diáriamente com Zn^{2+} -fendionna na concentração de 62,5 μM . Os resultados apresentados na **Figura 7** demonstraram que doses diárias de Zn^{2+} -fendionna na concentração de 62,5 μM não apresentaram toxicidade, pois não houve morte em nenhum dos grupos tratados.

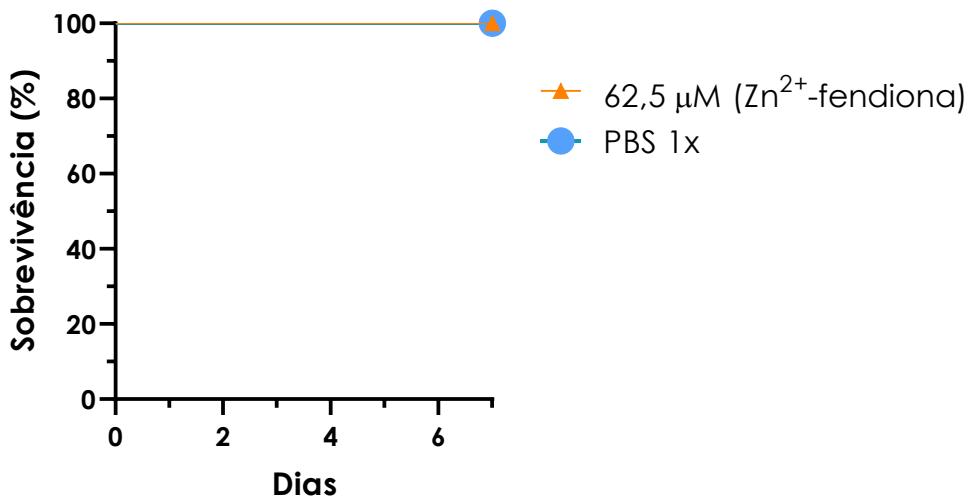


Figura 7: Gráfico de sobrevivência das larvas de *G. mellonella*, em protocolo de dose diária de 10 μL do composto de coordenação Zn^{2+} -fendionna, na concentração de 62,5 μM por 7 dias e grupo controle com PBS 1X.

Como mostrado na **Figura 8**, a densidade de hemócitos após tratamento diário com PBS 1X permaneceu relativamente constante ao longo do período de 5 dias analisado, sem variações estatisticamente significativas, de acordo com o teste two way ANOVA, entre os dias. Por outro lado, ao realizar análise comparativa com o grupo controle, as larvas tratadas diariamente com Zn²⁺-fendiona apresentaram um aumento progressivo na densidade de hemócitos a partir do terceiro dia de tratamento, tornando-se significativamente superior ao controle nos dias 3, 4 e 5 (p valor < 0,0001), de acordo com o teste two way ANOVA. No quinto dia a densidade de hemócitos atingiu o maior valor, comparado aos dias anteriores.

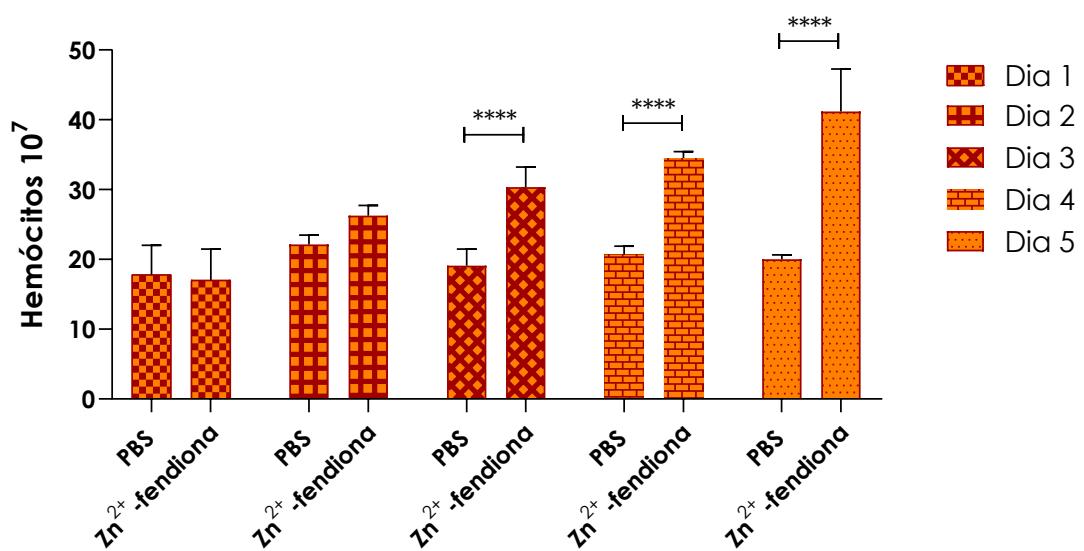


Figura 8: Ensaio de densidade de hemócitos das larvas *G. mellonella* inoculadas ou não com o composto de coordenação Zn²⁺-fendiona (na concentração de 62,5 μM) ou PBS 1X em dose diária. A coleta da hemolinfa foi realizada 24 horas após o primeiro inóculo e seguiu sendo coletada por 5 dias para realização da contagem de células, com as larvas sendo mantidas a 37 °C ao longo desse período.

5.6 Índice de seletividade

O índice de seletividade para o Zn²⁺-fendiona foi calculado com base nos dados de toxicidade *in vivo* em *Galleria mellonella* e *in vitro* com eritrócitos de carneiro. Consideramos o CC₅₀ > 1000 µM para *G. mellonella* e CC₅₀ > 125 µM para eritrócitos de carneiro. No modelo de *G. mellonella*, o índice foi superior a 160 para todas as cepas, exceto para a cepa 223, que apresentou um índice superior a 320 (**Tabela 9**). Para o modelo de eritrócitos, o índice foi superior a 20 para todas as cepas, exceto para a cepa 223, que apresentou um índice superior a 40 (**Tabela 9**).

Tabela 9: Índice de seletividade do composto de coordenação Zn²⁺-fendiona, calculado a partir do CC₅₀ de toxicidade *in vivo* (*G. mellonella*) e *in vitro* (eritrócitos de carneiro)

Espécies de <i>Cryptococcus</i>	Cepas	Índice de seletividade da Zn ²⁺ -fendiona	
		<i>Galleria mellonella</i>	Eritrócito
	23	> 160	> 20
<i>C. gattii</i>	25	> 160	> 20
	27	> 160	> 20
	213	> 160	> 20
<i>C. neoformans</i>	223	> 320	> 40
	350	> 160	> 20

6. DISCUSSÃO

Visando a busca por novas moléculas com ação anti-*Cryptococcus*, investigamos o composto de coordenação Zn²⁺-fendiona como potencial agente antifúngico. A CIM é um parâmetro fundamental para avaliar a eficácia de compostos antimicrobianos, pois representa a menor concentração necessária para inibir o crescimento do microrganismo (Butterfield *et al.*, 2012; Singhal *et al.*, 2022). Os resultados demonstraram que o Zn²⁺-fendiona apresentou valores menores de CIM frente aos isolados de *C. neoformans* (6,25 ou 3,125 µM) e *C. gattii* (6,25 µM), quando comparado ao ligante livre (fendiona), cuja CIM foi de 12,5 µM, e ao sal de zinco, com CIM >100 µM para todas as cepas. Esses dados indicam que a coordenação do íon metálico à fendiona potencializa a atividade inibitória da molécula, efeito também observado para Cu-fendiona e Ag-fendiona em estudos anteriores (Giovanini *et al.*, 2025).

Giovanini *et al.* (2025) demonstrou que a CIM do fluconazol varia entre 13–26 µM para os isolados de *C. neoformans* e 52,24–104,48 µM para os de *C. gattii*. Comparado a esses dados, o Zn²⁺-fendiona demonstrou maior eficácia inibitória, com CIMs entre 3,125 e 6,25 µM contra os mesmos isolados. Embora amplamente utilizado, o fluconazol tem eficácia limitada em alguns casos, o que pode comprometer seu desempenho clínico frente a cepas tolerantes.

Por outro lado, a anfotericina B apresentou CIM de 0,032 µM frente aos mesmos isolados clínicos (Giovanini *et al.*, 2025), um valor significativamente mais baixo. Ainda assim, o Zn²⁺-fendiona mostrou atividade frente à cepa 223, que se mostrou tolerante à anfotericina B (CIM >17,3 µM), sugerindo que pode ter aplicação em contextos de tolerância antifúngica. Sua eficácia superior ao fluconazol em termos de CIM reforça esse potencial.

Diversos compostos de coordenação metálicos contendo fendiona ou ligantes relacionados têm sido investigados contra *Cryptococcus*. Giovanini *et al.* (2025) demonstrou que o Cu-fendiona apresentou CIMs de 6,25 µM para *C. gattii* e 3,125 µM para *C. neoformans*, enquanto o Ag-fendiona exibiu CIM de 1,56 µM para todas as cepas testadas. Frei *et al.* (2021) relataram valores entre 0,78–3,125 µM com complexos de cobalto ($[\text{Co}(\text{ATS})(\text{DMAP})_2]\text{NO}_3$) que testaram contra as espécies *C. deuterogattii* e *C. neoformans*, e Dennis *et al.* (2021) obtiveram CIMs ainda mais baixas com compostos de ouro, com 3,5 µM para o composto Bis-[1,2-bis-(diphenylphosphino)benzene]gold(I) e 0,6 µM para o composto Bis-[1,2-bis[(2R,5R)-2,5-dimethylphospholano]benzene]gold(I), enquanto os compostos de cobre e cobalto apresentaram valores similares ao Zn²⁺-fendiona, os de ouro demonstraram maior potência inibitória.

Além dos estudos focados especificamente em *Cryptococcus*, compostos metálicos têm demonstrado atividade antifúngica relevante contra outros gêneros. Granato *et al.* (2021) observaram CIMs de 4 µM e 5 µM para Ag-fendiona e Cu-fendiona, respectivamente, frente a *Phialophora verrucosa*. Gandra *et al.* (2017) também relataram CIMs entre 0,87–2,16 µM para complexos contendo prata e manganês ($[Ag(phen)_2]ClO_4$ (CIM = 1,76 µM) e $[Mn_2(oda)(phen)_4(H_2O)_2][Mn_2(oda)(phen)_4(oda)_2] \cdot 4H_2O$ (CIM = 0,87 µM)) frente a *Candida haemulonii*.

Em relação a concentração fungicida mínima (CFM), Zn²⁺-fendiona apresentou valores de CFM entre 12,5 e 100 µM, a depender da cepa testada, enquanto que a fendiona isolada apresentou CFM apenas para as cepas 223, 350 e 25, todas na concentração de 100 µM, e o sal de zinco não apresentou CFM nas concentrações testadas.

Embora os valores de CFM do Zn²⁺-fendiona tenham sido ligeiramente maiores do que os obtidos para os complexos Cu-fendiona (CFM = 12,5 µM para todas as cepas de *C. gattii* e 50 µM para as cepas de *C. neoformans*) e Ag-fendiona (CFM = 12,5 µM para todas as cepas de *C. gattii* e para a cepa 223 de *C. neoformans*, e 25 µM contra as cepas 213 e 350 de *C. neoformans*) contra os mesmos isolados, o fato de Zn²⁺-fendiona alcançar CFM na faixa de 12,5 µM, especialmente frente às cepas 223 de *C. neoformans* e 25 de *C. gattii*, que apresentaram CIM acima do ponto de corte do CLSI epidemiológico (CLSI M60, Ed. 2023) para os antifúngicos clássicos (anfotericina B, caspofungina e fluconazol), destacando seu potencial como agente antifúngico (Giovanini *et al.*, 2025). Esses achados, tanto em *Cryptococcus* quanto em outras espécies fúngicas, reforçam que a eficácia inibitória dos compostos de coordenação metálicos depende diretamente da composição química, geometria de coordenação e natureza dos ligantes representando, assim, uma classe promissora de candidatos a agentes antifúngicos de nova geração.

Dentro desse contexto, também foi realizada semestralmente a avaliação da estabilidade da atividade antifúngica de Zn²⁺-fendiona. O composto de coordenação manteve a mesma atividade anti-*Cryptococcus* ao longo desses dois anos, sendo mantido protegido da luz e à temperatura ambiente. Embora tenham sido observadas pequenas variações, o CLSI M27 Ed4E prevê que variações, sejam de uma casa para cima ou para baixo, na CIM são aceitáveis e de certo modo, esperadas. Além disso, a estabilidade da atividade antifúngica de Zn²⁺-fendiona pode representar uma vantagem significativa no contexto de saúde pública, especialmente em regiões com infraestrutura limitada (Colberg *et al.*, 2017; Plewes *et al.*, 2023). A possibilidade

de armazenar o composto por longos períodos, sem a necessidade de refrigeração, facilita sua adoção em programas de combate à criptococose, inclusive em áreas remotas ou com restrições logísticas (Colberg *et al.*, 2017; Plewes *et al.*, 2023).

No entanto, para que um novo candidato antifúngico seja viável clinicamente, não basta apenas apresentar atividade inibitória; é essencial também avaliar suas propriedades farmacocinéticas, como absorção, permeabilidade, perfil de metabolização e excreção (Daina *et al.*, 2016, 2017). Nesse sentido, ferramentas de predição computacional, como o Swiss ADME, são essenciais para estimar o potencial terapêutico de novas moléculas antes de testes *in vivo* (Daina *et al.*, 2016, 2017). Uma baixa taxa de violações às regras de filtros de propriedades físico-químicas indica a possibilidade de que o composto possa ser absorvido de forma eficiente ao desempenhar sua ação antifúngica, sem causar toxicidade ao hospedeiro (Lipinski *et al.*, 2001; Muegge, Heald & Brittelli, 2001; Veber *et al.*, 2002).

Zn^{2+} -fendiona apresentou 7 violações para os filtros analisados (Ghose, Viswanadhan & Wendoloski, 1999; Lipinski *et al.*, 2001; Muegge, Heald & Brittelli, 2001). Dentro disso, a anfotericina B, fármaco comercial utilizado no tratamento da criptococose, possui um maior número de violações dessas regras com 12 violações no total, nos cinco filtros analisados (Ghose, Viswanadhan & Wendoloski, 1999; Lipinski *et al.*, 2001; Muegge, Heald & Brittelli, 2001). O fluconazol, outro fármaco utilizado como controle, não apresentou violações nos cinco filtros, sendo considerado um modelo de referência ideal para compostos com boa administração oral (Ghose, Viswanadhan & Wendoloski, 1999; Lipinski *et al.*, 2001; Muegge, Heald & Brittelli, 2001), o que corrobora sua ampla utilização clínica como antifúngico de referência (Saple *et al.* 2022; Xie *et al.*, 2023).

Outros compostos de coordenação metálica contendo fendiona também tiveram seus potenciais terapêuticos teóricos avaliados por meio da ferramenta SwissADME, como é o caso dos complexos Ag-fendiona e Cu-fendiona, analisados por Giovanini *et al.* (2025). Nesse estudo, Ag-fendiona mostrou apenas 3 violações no total, o que indica um melhor potencial de absorção oral. Já o Cu-fendiona apresentou 7 violações, traçando um perfil mais semelhante ao do Zn^{2+} -fendiona. Esses dados evidenciam que, apesar de Zn^{2+} -fendiona apresentar maior número de violações em relação a Ag-fendiona e fluconazol (0 violações). Todavia, diversos fármacos bioativos amplamente utilizados, como a própria anfotericina B (12 violações), não se enquadram plenamente nesses parâmetros e, ainda assim, apresentam grande eficácia terapêutica (Haddad *et al.*, 2022; Ma et al., 2022; Cui & Zhao, 2024). Portanto, a violação a

esses filtros que analisam características físico-químicas utilizados em ferramentas computacionais como o SwissADME devem ser interpretados como guias orientativos, e não como critérios excludentes. Nesse contexto, os resultados obtidos para o Zn²⁺-fendiona não o desqualificam como candidato antifúngico. Pelo contrário, destacam a importância de uma análise integrada, que considere não apenas os dados de estrutura química e propriedades preditivas, mas também os dados experimentais *in vitro* e *in vivo*, permitindo uma avaliação mais realista e completa do seu potencial terapêutico.

Em relação à inibição das principais isoenzimas do citocromo P450 (CYP), responsáveis pelo metabolismo de uma ampla variedade de fármacos, o Zn²⁺-fendiona não apresentou inibição significativa para nenhuma das isoformas testadas. Assim, o perfil do Zn²⁺-fendiona frente às enzimas do sistema CYP indica menor risco de interações medicamentosas, mas também um potencial de segurança farmacocinética (Lin & Lu, 1997; Zanger & Schwab, 2013; Zhao *et al.*, 2021). Por outro lado, a não inibição deste conjunto de isoenzimas também significa que a metabolização hepática do Zn²⁺-fendiona será rápida e eficiente, levando o complexo a apresentar uma menor biodisponibilidade no organismo do indivíduo, necessitando de estratégias para contornar essa característica (Zanger & Schwab, 2013; Hakkola *et al.*, 2020; Zhao *et al.*, 2021). Esse perfil se assemelha ao da anfotericina B e demonstra vantagem em relação ao fluconazol, que apresentou inibição da isoenzima CYP2C19, CYP2C9 e CYP3A4 (Hakkola *et al.*, 2020; Guengerich, 2021). Destaca-se que a ausência de inibição dessas isoenzimas pode reduzir a probabilidade de interações medicamentosas adversas, que ocorrem frequentemente quando um fármaco inibe o metabolismo de outros, levando ao acúmulo tóxico no organismo (Lin & Lu, 1997; Zanger & Schwab, 2013; Zhao *et al.*, 2021). Além disso, fármacos que não inibem o sistema CYP tendem a apresentar um metabolismo hepático mais eficiente e permite um controle mais previsível das concentrações plasmáticas do fármaco, o que favorece sua eliminação e reduz o risco de efeitos adversos relacionados à bioacumulação (Lin & Lu, 1997; Zanger & Schwab, 2013; Zhao *et al.*, 2021; Abdelmonem *et al.*, 2024). Além disso, o complexo foi predito como um substrato da glicoproteína-P, um transportador de efluxo que regula negativamente a entrada e retenção de moléculas no interior das células (Lee *et al.*, 2019). Embora ser substrato da glicoproteína-P possa comprometer a biodisponibilidade do composto, essa característica pode representar uma vantagem ao diminuir a probabilidade de acúmulo tecidual e, consequentemente, reduzir potenciais efeitos tóxicos (Subramanian *et al.*, 2018; Crawford *et al.*, 2019), especialmente em órgãos vitais como fígado, rins, coração e

cérebro, onde essa proteína desempenha um papel essencial na eliminação de moléculas potencialmente prejudiciais (Lee *et al.*, 2010; McCormick *et al.*, 2015; Peng *et al.*, 2021).

A absorção gastrointestinal do Zn²⁺-fendiona foi predita como alta, assim como a do fluconazol, sugerindo que o composto pode ser administrado via oral, ao contrário da anfotericina B, que possui baixa absorção e requer administração intravenosa (Fernández-García *et al.*, 2017; Faustino & Pinheiro, 2020).

No caso da criptococose, a capacidade do fármaco de atingir o sistema nervoso central também merece atenção especial, uma vez que o *Cryptococcus* apresenta neurotropismo (Vu *et al.*, 2014B; Akins & Jian, 2018). Os três compostos analisados não apresentaram permeabilidade significativa à BHE, o que poderia indicar a necessidade de uma formulação específica para viabilizar sua ação no SNC, como nanopartículas de óxido de zinco (Li *et al.*, 2020). No entanto, no contexto da criptococose, a própria progressão da infecção leva ao comprometimento da integridade da BHE, resultando na formação de poros que facilitam a passagem de moléculas (Vu *et al.*, 2014A; Chen *et al.*, 2022; Rathore *et al.*, 2022), como ocorre com a anfotericina B e o fluconazol que também realizam sua atividade antifúngica no SNC a partir da entrada pelos poros formados pela própria levedura (Cavani *et al.*, 2012; Petraitis *et al.*, 2019). Dessa forma, embora a permeabilidade de BHE predita para o Zn²⁺-fendiona tenha sido de que ele não é capaz de transpor a BHE, esse fator pode não representar um obstáculo determinante para sua eficácia contra criptococose.

A permeabilidade cutânea é um fator essencial para determinar se um composto pode ser utilizado em formulações tópicas (Potts & Guy, 1992; Oh *et al.*, 2020). Compostos que possuem uma baixa penetração dérmica podem ser inadequados para aplicação transdérmica, enquanto aqueles com permeabilidade moderada a alta podem ser selecionados para utilização no tratamento de micoses cutâneas (Potts & Guy, 1992; Oh *et al.*, 2020). A predição computacional do Swiss ADME indicou que Zn²⁺-fendiona apresenta uma permeabilidade cutânea classificada como moderada ($\text{Log } K_p = -8,22$). No entanto, estudos realizados por Frota *et al.*, (2024) indicaram que compostos de coordenação similares, como CoTheo, CTB, e CTP, apresentaram valores de $\text{Log } K_p$ similares, mas ainda assim foram considerados promissores para administração transdérmica (Frota *et al.*, 2024). Isto porque o cetoconazol, um antifúngico amplamente utilizado em tratamentos dermatológicos, apresenta um $\text{Log } K_p$ predito de -6.46 cm/s de acordo com o modelo de Potts e Guy (Potts & Guy, 1992). Esse valor demonstra que mesmo fármacos com permeabilidade cutânea moderada podem ser eficazes em formulações

tópicas, reforçando o potencial de Zn²⁺-fendiona para essa via de administração (Alonso *et al.*, 2019; Frota *et al.*, 2024). Ensaios experimentais futuros como testes *ex vivo* utilizando peles de animais criopreservadas (Ling *et al.*, 2023), assim como metodologias não animais utilizando testes *in vitro* como as células de difusão (Ruela *et al.*, 2021), ensaio de permeabilidade com membrana artificial simulando pele (Skin-PAMPA) (Sinkó *et al.*, 2021) ou modelos de tecido gerados por engenharia de tecidos (Costa *et al.*, 2023), serão essenciais para validar a hipótese de que Zn²⁺-fendiona pode ser aplicada em formulações tópicas. Por fim, também será essencial avaliar a eficácia dessas formulações de uso tópico em modelos de infecção cutânea *in vivo*.

A avaliação da atividade hemolítica do composto Zn²⁺-fendiona demonstrou que, mesmo nas concentrações mais elevadas (até 125 µM), a porcentagem de hemólise observada em eritrócitos de carneiro foi inferior a 2%, indicando baixa toxicidade hemolítica. De acordo com critérios descritos na literatura, valores inferiores a 10% são geralmente classificados como indicativos de baixa hemólise (Alves *et al.*, 2020; Huang *et al.*, 2004). Esses dados reforçam o perfil de segurança do composto, especialmente considerando que a concentração máxima testada equivale a 20 vezes o valor da CIM obtida contra cepas de *Cryptococcus*. Resultados semelhantes foram observados por Giovanini *et al.* (2025), em que os complexos Cu-fendiona e Ag-fendiona também não induziram hemólise significativa, mesmo quando aplicados em concentrações superiores a 10 vezes suas respectivas CIMS. Krasnovskaya *et al.* (2023) relataram baixa citotoxicidade hemolítica para complexos metálicos de cobre com 2-dimethylaminopyridinium com atividade antimicrobiana.

Os valores de índice de seletividade (IS), foram superiores a 20 para todas as cepas de *Cryptococcus*, com destaque para a cepa 223, cujo IS foi superior a 40. Tais resultados indicam não apenas uma alta seletividade do composto para o patógeno, mas também uma baixa toxicidade nos modelos testados (Indrayanto *et al.*, 2021). Além disso, o fato da determinação do CC₅₀ ter sido realizada com as maiores concentrações avaliadas, devido ao pequeno valor de porcentagem de hemólise (>125 µM para eritrócitos) reforça a baixa toxicidade do composto (González-Maldonado *et al.*, 2022; Barros *et al.*, 2023). Comparativamente, estudos recentes como o de Alotaibi (2023) observou valores de IS variando de >16 a >64 para compostos metálicos com baixa toxicidade hemolítica, reforçando que índices superiores a 10 já são considerados promissores em termos de seletividade terapêutica. De forma semelhante, Mangmee *et al.* (2021) demonstraram que complexos metálicos com IS >10, associados à baixa toxicidade *in vitro*, são fortes candidatos ao desenvolvimento de novos fármacos antifúngicos.

Além da atividade hemolítica, a toxicidade do composto Zn²⁺-fendiona também foi avaliada *in vivo*, utilizando o modelo animal *Galleria mellonella* em que o complexo metálico também apresentou baixa toxicidade a esse modelo animal. Neste ensaio, foi observado apenas 10% de mortalidade no grupo inoculado com 1000 µM de Zn²⁺-fendiona, porém não foi significativa (*p*-valor = 0,4574) Esses resultados estão de acordo com dados previamente descritos por Giovanini *et al.* (2025), que avaliou os complexos Cu-fendiona e Ag-fendiona no mesmo modelo experimental, não sendo observado mortalidade nas larvas inoculadas com até 1000 µM dos compostos (equivalente a 960 µg/mL para Cu-fendiona e 621 µg/mL para Ag-fendiona) nos testes de toxicidade com dose única, nem durante o protocolo de aplicação de dose diária, mesmo com aplicações diárias em concentrações correspondentes a 10× CIM (15,6 µM para Cu-fendiona e 62,5 µM para Ag-fendiona).

De forma semelhante, Gandra *et al.* (2020) relataram baixa toxicidade em larvas de *G. mellonella* expostas a compostos de coordenação contendo íons de cobre, prata ou manganês ligados a fendiona ou fenantrolina. Na concentração de 500 µg/mL, nenhum dos compostos causou mortalidade. No entanto, ao elevar a dose para 750 µg/mL, alguns complexos causaram aumento significativo na mortalidade larval, com taxas de 60% ($\{[Cu(3,6,9-tdda)(phen)_2].3H_2O.EtOH\}_n$), 40% ($[Mn(ph)(phen)(H_2O)_2]$), 35% ($[Mn(ph)(phen)2(H_2O)].4H_2O$) e 13% ($\{[Mn(phen)_2(H_2O)_2]\}2(isoph)_2(phen).12H_2O$) para compostos de cobre ou manganês ligados a fenantrolina, enquanto Ag-fendiona induziu apenas 10% de mortalidade, e os demais compostos testados não apresentaram mortalidade ou algum efeito tóxico nessa mesma concentração (Gandra *et al.*, 2020).

Segundo Indrayanto *et al.* (2021) e Barros *et al.* (2023), compostos com IS superior a 10 já são considerados promissores para desenvolvimento farmacológico. Os valores de IS da Zn²⁺-fendiona no modelo *in vivo* com *G. mellonella* de >160 para todas as cepas e >320 para a cepa 223, são comparáveis aos observados para o complexo Cu-fendiona, que apresentou IS >160 para *C. gattii* e >320 para *C. neoformans*; em relação a Ag-fendiona, o IS foi >641 para ambas as espécies (Giovanini *et al.*, 2025). Já no modelo *in vitro* com eritrócitos de carneiro, o Zn²⁺-fendiona demonstrou IS >20 para a todas as cepas e >40 para a cepa 223, valores próximos aos encontrados para Cu-fendiona (IS >10 *C. gattii* e >20 *C. neoformans*) e Ag-fendiona (IS >40) (Giovanini *et al.*, 2025). Esses achados posicionam o Zn²⁺-fendiona como um possível candidato seguro para futuras aplicações terapêuticas, especialmente em infecções oportunistas como a criptococose, em que a toxicidade dos fármacos convencionais representa um desafio

clínico. Entretanto, ensaios *in vivo* com modelos mais próximos de seres humanos, como mamíferos são necessários para que seja aprovado e encaminhado para aplicação terapêutica.

Hemócitos são células imunológicas presentes na hemolinfa de *G. mellonella*, com funções semelhantes às dos macrófagos em mamíferos. Atuam na fagocitose, produção de EROs e outros mecanismos de defesa inata, sendo amplamente utilizados como biomarcadores em estudos de toxicidade e resposta imunológica (Browne *et al.*, 2013; Arteaga Blanco *et al.*, 2017; Serrano *et al.*, 2023). Alterações na densidade de hemócitos em *G. mellonella* são amplamente utilizadas como biomarcadores para avaliação de toxicidade e ativação imunológica, pois dependendo da direção e do padrão da mudança elas podem indicar diferentes processos fisiológicos (Dettloff *et al.*, 2001; Cytryńska *et al.*, 2007; Er *et al.*, 2024; Gallorini *et al.*, 2024). Um aumento na densidade de hemócitos geralmente pode ocorrer em situações como exposição a patógenos ou componentes microbianos, sendo interpretado como um sinal de ativação do sistema imune celular, sendo possível também sua indução por compostos químicos (Browne *et al.*, 2014; Sheehan *et al.*, 2021; Reis *et al.*, 2023). Por outro lado, uma diminuição acentuada e sustentada na densidade de hemócitos, pode refletir estresse fisiológico intenso ou toxicidade induzida por compostos químicos (Arteaga Blanco *et al.*, 2017; Iwański *et al.*, 2022). Dessa forma, o comportamento da densidade hemocitária permite inferir se a resposta do organismo está mais relacionada a um processo imunológico de defesa ou a uma disfunção causada por estresse tóxico.

Nos ensaios de toxicidade com dose única de Zn²⁺-fendiona, não foram observadas variações significativas na densidade de hemócitos. Esse achado reforça o perfil de baixa toxicidade do composto no modelo *in vivo* utilizado, estando de acordo com estudos prévios que também não identificaram alterações significativas em condições semelhantes. Gandra *et al.* (2020), por exemplo, avaliaram compostos metálicos com ligantes à base de fenantrolina, como [Mn(ph)(phen)(H₂O)₂], [Mn₂(oda)(phen)₄(H₂O)₂][Mn₂(oda)(phen)₄(oda)₂]₂.4H₂O e [Ag₂(3,6,9-tdda)(phen)₄].EtOH, e relataram ausência de alterações significativas na densidade de hemócitos em larvas inoculadas com 500 µM desses compostos. Esses resultados são compatíveis com o comportamento observado para o Zn²⁺-fendiona, indicando que, em doses únicas, compostos com esse tipo de estrutura podem apresentar baixa toxicidade no modelo *G. mellonella*.

Além disso, Gandra *et al* (2020) também demonstraram que o efeito imunológico e toxicológico pode ser diferente, de acordo com a concentração de composto de coordenação

utilizada. Por exemplo, o complexo $[\text{Mn}(\text{ph})(\text{phen})_2(\text{H}_2\text{O})].4\text{H}_2\text{O}$, que inicialmente causava aumento da densidade de hemócitos, passou a promover redução quando a dose foi aumentada de 500 μM para 700 μM . Já o composto $\{\text{[Mn(3,6,9-tdda)(phen)}_2]\cdot3\text{H}_2\text{O}\cdot\text{EtOH}\}_n$ manteve o aumento da densidade de hemócitos mesmo em dose mais elevada. Esses dados sugerem que tanto a estrutura química quanto a concentração dos compostos metálicos influenciam diretamente a resposta imune das larvas.

Por outro lado, na dose repetida diariamente, foi observada ausência de morte larval em resposta à presença contínua do composto. Respostas semelhantes já foram descritas na literatura. Giovanini *et al.* (2025) também avaliou a toxicidade crônica dos complexos Cu-fendiona e Ag-fendiona em *Galleria mellonella*, observando ausência de mortalidade ao longo dos sete dias de inóculos diáridos. Além disso, os animais tratados não apresentaram sinais clássicos de estresse, como formação de casulos ou melanização, indicando uma boa tolerância dos modelos mesmo em regime de exposição prolongada.

No presente estudo, a administração diária de Zn^{2+} -fendiona não causou nenhuma alteração nas larvas, corroborando com seu perfil de baixa toxicidade em *Galleria mellonella*. Além disso, o aumento progressivo na densidade de hemócitos observado ao longo do protocolo de inoculação diária sugere também uma ativação imunológica ou possível recrutamento de hemócitos. Essa resposta pode refletir uma ativação imunológica induzida pelo composto, sem estar associada a efeitos tóxicos (Serrano *et al.*, 2023). Comparando com os dados de Giovanini *et al.* (2025), a inoculação diária de Cu-fendiona ou Ag-fendiona (concentração de 62,5 μM) não induziu alterações relevantes na densidade de hemócitos, entretanto, esse resultado reforça a baixa toxicidade dos complexos metálicos testados pelo grupo. Frente a esses achados, o Zn^{2+} -fendiona apresentou um perfil balanceado: aumentou a densidade de hemócitos, sem comprometer a viabilidade das larvas, mesmo após aplicação de doses diárias, o que reforça seu potencial como candidato a antifúngico seguro e eficaz.

A partir dos dados apresentados neste estudo somados ao que pode ser encontrado na literatura, a resposta imune em *G. mellonella* frente a compostos metálicos não depende apenas da presença do metal central, mas das variações na estrutura química e do regime de exposição ao composto. No caso do composto de coordenação Zn^{2+} -fendiona, a ausência de alterações na densidade celular em dose única e o aumento moderado de hemócitos em doses diárias apontam para um perfil de baixa toxicidade aguda, com uma possível atividade imunomoduladora num regime de exposição prolongado. Esses resultados ampliam a compreensão do comportamento

do Zn²⁺-fendiona em modelo *in vivo*, contribuindo para o entendimento inicial do perfil de toxicidade e a atividade antifúngica do Zn²⁺-fendiona. No entanto, a validação desses resultados em modelos de mamíferos, como camundongos e hamsters, é fundamental para avançar na caracterização pré-clínica do composto e consolidar sua aplicabilidade terapêutica.

7. CONCLUSÕES

- Zn^{2+} -fendiona apresenta CIM de 6,25 μM para isolados de *C. neoformans* e *C. gattii* e 3,125 μM para o isolado 223 de *C. neoformans*;
- O composto de coordenação apresentou variações nos valores de CFM, com efeito fungicida para todas as cepas de *C. gattii* e *C. neoformans*, exceto para a cepa 25 de *C. gattii* em que o efeito foi fungistático;
- Zn^{2+} -fendiona apresentou estabilidade de pelo menos 2 anos quando estocado em condições de temperatura ambiente e protegidos da luz;
- Zn^{2+} -fendiona apresenta bom potencial terapêutico, boa absorção gastrointestinal, boa absorção cutânea, pode ser metabolizado pelas isoenzimas do citocromo P450 e excretado pela glicoproteína-P, entretanto não apresenta capacidade de transpassar a BHE;
- O composto de coordenação não apresenta atividade hemolítica em concentrações até 125 μM ;
- Zn^{2+} -fendiona não apresenta toxicidade aguda ao modelo de *Galleria mellonella* inoculadas com até 1 mM deste composto e nenhuma alteração na densidade de hemócitos;
- Zn^{2+} -fendiona não apresenta toxicidade crônica aos grupos de larvas inoculadas com 62,5 μM , apresentando aumento da densidade de hemócitos a partir do terceiro dia de inoculação;
- Zn^{2+} -fendiona apresenta IS de > 160 ao modelo de eritrócitos e > 20 ao modelo de *G. mellonella*, exceto para a cepa 223 de *C. neoformans* que apresentou IS > 40 em modelo de eritrócitos e > 320 em modelo de *G. mellonella*;

Obs: No **tópico 9** foram relatadas as produções e participações científicas durante o período de graduação.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aaron, P. A., Jamklang, M., Uhrig, J. P., & Gelli, A. (2018). The blood-brain barrier internalizes *Cryptococcus neoformans* via the EphA2-tyrosine kinase receptor. *Cellular Microbiology*, 20(3), e12811. <https://doi.org/10.1111/cmi.12811>
- Abbas, A. K., Lichtman, A. H., & Pillai, S. (2019). Imunologia celular e molecular. *Elsevier*.
- Abd-Elmaqsoud, I., Elsaadawi, H., Ahmed, A., AbdelKhalek, A., & Arisha, A. (2022). The vast biomedical applications of zinc oxide nanoparticles. *Zagazig Veterinary Journal*, 50(3), 201–218. <https://doi.org/10.21608/zvjj.2022.144910.1182>
- Abdelmonem, B. H., Abdelaal, N. M., Anwer, E. K. E., Rashwan, A. A., Hussein, M. A., Ahmed, Y. M., Khashana, R., Hanna, M. M., & Abdelnaser, A. (2024). Decoding the role of CYP450 enzymes in metabolism and disease: A comprehensive review. *Biomedicines*, 12(7), 1467–1467. <https://doi.org/10.3390/biomedicines12071467>
- Abdullaeva, Zh., Dzhumaeva, Zh., Bepiev, E., Urmonov, D., & Topchubaeva, B. (2024). Synthesis of zinc oxide nanoparticles, study of structure, properties and applications in medicine. *Bulletin of Science and Practice*, 10(3), 60–64. <https://doi.org/10.33619/2414-2948/100/06>
- Abegg, M. A., Celli, F. L., Faganello, J., Valente, P., Schrank, A., & Henning Vainstein, M. (2006). *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* Isolated from the Excreta of Psittaciformes in a Southern Brazilian Zoological Garden. *Mycopathologia* 161(2), 83–91. <https://doi.org/10.1007/s11046-005-0186-z>
- Aguiar, T. K., Costa, A. C., Neto, N. A., Brito, D. M., Freitas, C. D., Neto, J. M., Mesquita, F. P., & Souza, P. F. (2024). Rise and fall of caspofungin: The current status of caspofungin as a treatment for *Cryptococcus neoformans* infection. *Future Microbiology*, 19(7), 621–630. <https://doi.org/10.2217/fmb-2023-0236>
- Aguirre, K. M., & Gibson, G. W. (2000). Differing requirement for inducible nitric oxide synthase activity in clearance of primary and secondary *Cryptococcus neoformans* infection. *Medical Mycology*, 38(5), 343–353. <https://doi.org/10.1080/mmy.38.5.343.353>
- Ahn, S.-Y., Jang, S., Sudheer, P. D. V. N., & Choi, K.-Y. (2021). Microbial production of melanin pigments from caffeic acid and L-Tyrosine using *Streptomyces glaucescens* and FCS-ECH-Expressing *Escherichia coli*. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(5), 2413. <https://doi.org/10.3390/ijms22052413>
- Akins, P. T., & Jian, B. (2018). The frozen brain state of *Cryptococcus gattii*: A globe-trotting, Tropical, Neurotropic Fungus. *Neurocritical Care*, 30(2), 272–279. <https://doi.org/10.1007/s12028-018-0538-4>
- Akpan, E. D., Kumar Singh, A., Lgaz, H., Quadri, T. W., Kumar Shukla, S., Mangla, B., Dwivedi, A., Dagdag, O., Sheetal, Edem Inyang, E., & Ebenso, E. E. (2024). Coordination compounds as corrosion inhibitors of metals: A review. *Coordination Chemistry Reviews*, 499, 215503. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2023.215503>
- Ali, M. F., Tansie, S. M., Shahan, J. R., Seipelt-Thiemann, R. L., & McClelland, E. E. (2020). Serial passage of *Cryptococcus neoformans* in *Galleria mellonella* results in increased capsule and intracellular replication in hemocytes, but not increased resistance to hydrogen peroxide. *Pathogens*, 9(9), 732. <https://doi.org/10.3390/pathogens9090732>
- Alotaibi, A. A. (2023). Investigating the properties and biological activity of a new Cu(II) complex with a 2-Dimethyaminopyridinium cation (C7H12N2)2[CuCl4]. *Journal of King Saud University - Science*, 35(4), 102620–102620. <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2023.102620>
- Alspaugh, J. A. (2015). Virulence mechanisms and *Cryptococcus neoformans* pathogenesis. *Fungal Genetics and Biology*, 78, 55–58. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2014.09.004>
- Altamirano, S., Jackson, Katrina M., & Nielsen, K. (2020). The interplay of phenotype and genotype in *Cryptococcus neoformans* disease. *Bioscience Reports*, 40(10). <https://doi.org/10.1042/bsr20190337>
- Alves, M. J., Nascimento, I. S., Cruz, K. S., Menescal, V. V. F., Menescal, L. S. F., Silva, L. S. C., Pinheiro, S. B., Gómez, A. S. P., Souza, J. V. B., Lazera, M. dos S., & Matsuura, A. B. J. (2022). 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*, 27(4), 387–396. <https://doi.org/10.1111/tmi.13737>
- Ambrose, P. G., Bhavnani, S. M., Rubino, C. M., Louie, A., Gumbo, T., Forrest, A., & Drusano, G. L. (2007). Antimicrobial resistance: pharmacokinetics-pharmacodynamics of antimicrobial therapy: It's not just for mice anymore. *Clinical Infectious Diseases*, 44(1), 79–86. <https://doi.org/10.1086/510079>

- Andrejević, T. P., Waržajtis, B., Glišić, B. Đ., Vojnovic, S., Mojicevic, M., Stevanović, N. Lj., Nikodinovic-Runic, J., Rychlewska, U., & Djuran, M. I. (2020). Zinc(II) complexes with aromatic nitrogen-containing heterocycles as antifungal agents: Synergistic activity with clinically used drug nystatin. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 208, 111089–111089. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2020.111089>
- Arechavala, A. I., Ochiuzzi, M. E., Borgnia, M. D., & Santiso, G. M. (2009). Fluconazole and amphotericin B susceptibility testing of *Cryptococcus neoformans*: Results of minimal inhibitory concentrations against 265 isolates from HIV-positive patients before and after two or more months of antifungal therapy. *Revista Iberoamericana de Micología*, 26(3), 194–197. <https://doi.org/10.1016/j.riam.2009.02.001>
- Arora, S., Hernandez, Y., Erb-Downward, J. R., McDonald, R. A., Toews, G. B., & Huffnagle, G. B. (2005). Role of IFN- γ in regulating T2 immunity and the development of alternatively activated macrophages during allergic bronchopulmonary mycosis. *The Journal of Immunology*, 174(10), 6346–6356. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.174.10.6346>
- Arteaga Blanco, L. A., Crispim, J. S., Fernandes, K. M., de Oliveira, L. L., Pereira, M. F., Bazzolli, D. M. S., & Martins, G. F. (2017). Differential cellular immune response of *Galleria mellonella* to *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Cell and Tissue Research*, 370(1), 153–168. <https://doi.org/10.1007/s00441-017-2653-5>
- Assress, H. A., Nyoni, H., Mamba, B. B., & Msagati, T. A. M. (2020). Occurrence and risk assessment of azole antifungal drugs in water and wastewater. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 187, 109868. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.109868>
- Ayón-Núñez, D. A., Fragoso, G., Bobes, R. J., & Laclette, J. P. (2018). Plasminogen-binding proteins as an evasion mechanism of the host's innate immunity in infectious diseases. *Bioscience Reports*, 38(5), BSR20180705. <https://doi.org/10.1042/BSR20180705>
- Baker, R. P., & Casadevall, A. (2023). Reciprocal modulation of ammonia and melanin production has implications for cryptococcal virulence. *Nature Communications*, 14(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-023-36552-7>
- Ball, B., Sukumaran, A., Pladwig, S., Kazi, S., Chan, N., Modrakova, M., & McAlister, J. G. (2023). Integration of homeostatic and adaptive oxidative responses by a putative co-chaperone, Wos2, drives fungal virulence in cryptococcosis. *BioRxiv (Cold Spring Harbor Laboratory)*. <https://doi.org/10.1101/2023.04.03.535320>
- Barbosa, F.M., Fonseca, F.L., Holandino, C., Alviano, C.S., Nimrichter, L. & Rodrigues, M.L. (2006). Glucuronoxylomannan-mediated interaction of *Cryptococcus neoformans* with human alveolar cell results in fungal internalization and host cell damage. *Microbes. Infect.*, 8(2): 493–502, 2006.
- Barros, A. M. C., Pinto, A. C. S., Simplicio, F. G., Chaves, F. C. M., Silva, N. G., Oliveira, K. M. T., Lima, E. S., & Franco, A. M. R. (2023). Antileishmanial and cytotoxic activity of dillapiole n-butyl ether. *Acta Amazonica*, 53(4), 285–293. <https://doi.org/10.1590/1809-4392202300281>
- Bastos, A. L., Manrique, E. J. C., Trilles, L., Lazéra, M. S., Melhem, M. S. C., Oliveira, G. C., Silva, K. O. G., Furtado, A. C. S., Rodrigues, D. X., Soares, A. J., & Costa, P. S. S. (2022). Perfil clínico-epidemiológico da criptococose associada e não associada à infecção pelo HIV na região Centro-Oeste do Brasil / Clinical and epidemiological aspects of cryptococcosis associated and non-associated to HIV infection in Central Western region of Brazil. *Brazilian Journal of Development*, 8(3), 18214–18230. <https://doi.org/10.34117/bjdv8n3-183>
- Bedimo, R. J., & Skiest, D. J. (2008). Cryptococcosis and other fungal infections of the central nervous system. *The Spectrum of Neuro-AIDS Disorders*, 347–361. <https://doi.org/10.1128/9781555815691.ch24>
- Benaducci, T., Sardi, J. de C. O., Lourencetti, N. M. S., Scorzoni, L., Gullo, F. P., Rossi, S. A., Derissi, J. B., de Azevedo Prata, M. C., Fusco-Almeida, A. M., & Mendes-Giannini, M. J. S. (2016). Virulence of *Cryptococcus* sp. biofilms *in vitro* and *in vivo* using *Galleria mellonella* as an alternative model. *Frontiers in Microbiology*, 7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00290>
- Blindauer, C. A., Harrison, M. D., Parkinson, J. A., Robinson, A. K., Cavet, J. S., Robinson, N. J., & Sadler, P. J. (2001). A metallothionein containing a zinc finger within a four-metal cluster protects a bacterium from zinc toxicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(17), 9593–9598. <https://doi.org/10.1073/pnas.171120098>
- Bongomin, F., Oladele, R. O., Gago, S., Moore, C. B., & Richardson, M. D. (2018). A systematic review of fluconazole resistance in clinical isolates of *Cryptococcus* species. *Mycoses*, 61(5), 290–297. <https://doi.org/10.1111/myc.12747>
- Browne, N., Heelan, M., & Kavanagh, K. (2013). An analysis of the structural and functional similarities of insect hemocytes and mammalian phagocytes. *Virulence*, 4(7), 597–603. <https://doi.org/10.4161/viru.25906>

- Browne, N., Surlis, C., & Kavanagh, K. (2014). Thermal and physical stresses induce a short-term immune priming effect in *Galleria mellonella* larvae. *Journal of Insect Physiology*, 63, 21–26. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2014.02.006>
- Bunting, L. A., Neilson, J. B., & Bulmer, G. S. (1979). *Cryptococcus neoformans*: gastronomic delight of a soil ameba. *Sabouraudia*, 17(3), 225–232. <https://doi.org/10.1080/00362177985380341>
- Burry, J., Casas, C. P., & Ford, N. (2022). Access to medicines for treating people with cryptococcal meningitis. *Clinical Infectious Diseases*, 76(3), e773–e775. <https://doi.org/10.1093/cid/ciac689>
- Burry, J., Casas, C. P., & Ford, N. (2023). Access to Medicines for Treating People With Cryptococcal Meningitis. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 76(3), e773–e775. <https://doi.org/10.1093/cid/ciac689>
- Butterfield, J., Lodise Jr., T. P., & Pai, M. P. (2012). Applications of pharmacokinetic and pharmacodynamic principles to optimize drug dosage selection: Example of antibiotic therapy management. In *Therapeutic Drug Monitoring* (pp. 175–196). Academic Press.
- Calderazzo F, Marchetti F, Pampaloni G, Passarelli V. 1999 Coordination properties of 1,10-phenanthroline-5,6-dione towards group 4 and 5 metals in low and high oxidation states. *J Chem Soc Dalton Trans* 4389–4396. <https://doi.org/10.1039/A906016B>
- Cardoso, J., Jesus, A., & Almeida, I. F. (2024). Tissue-based *in vitro* and *ex vivo* models for dermal permeability studies. *Elsevier EBooks*, 479–500. <https://doi.org/10.1016/b978-0-443-15510-9.00015-3>
- Casadevall, A., Coelho, C., Cordero, R. J. B., Dragotakes, Q., Jung, E., Vij, R., & Wear, M. P. (2018). The capsule of *Cryptococcus neoformans*. *Virulence*, 10(1), 822–831. <https://doi.org/10.1080/21505594.2018.1431087>
- Cavani J. S, S. R., Pappalardo, M. C. S. M., Perez, G. S., Sanches-Giraud, C., & Melhem, M. S. C. (2012). *Monitoring amphotericin b and fluconazole concentrations in the plasma and cerebrospinal fluid of patients with cryptococcal meningitis*. 4(4), 15–18. <https://doi.org/10.25756/RPF.V4I4.61>
- Cavassin, F. B., Vidal, J. E., Godoy, C. S. M., Soares, R. B. A., Magri, M. M. C., Falci, D. R., Oliveira, C. S., Mendes, A. V. A., Carneiro, J. L. B., & Telles, F. Q. (2022). P485 Hiv-positive, solid organ transplant (SOT), and non-Hiv-positive/non-transplant (NHNT) associated with cryptococciosis in Brazil: First national multicenter cohort study. *Medical Mycology*, 60(Supplement_1). <https://doi.org/10.1093/mmy/myac072.p485>
- Cavassin, F. B., Vidal, J. E., Carneiro, J. L. B., Godoy, C. S. M., Soares, R. B. A., Magri, M., Falci, D. R., Oliveira, C. S., Mendes, A. V., Breda, G. L., Rego, C. M., Félix, M. A., Katopodis, P. P., Ó, J. R. S., Abrão, M. P. L., Taborda, M., Pereira, T. T. T., & Telles, F. Q. (2023). Characteristics, mortality, associated variables with death, and therapeutic response among HIV-positive, solid organ transplant (SOT), and non-HIV-positive/non-transplant (NHNT) patients with cryptococciosis: First multicenter cohort study in Brazil. *Medical Mycology*, 61(2). <https://doi.org/10.1093/mmy/myad011>
- Champion, O. L., Wagley, S., & Titball, R. W. (2016). *Galleria mellonella* as a model host for microbiological and toxin research. *Virulence*, 7(7), 840–845. <https://doi.org/10.1080/21505594.2016.1203486>
- Chander, J., Singh, H., & Joshi, D. (2022). 5-Flucytosine. In Reference Module in Biomedical Sciences (pp. 384–392). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-820472-6.00190-0>
- Chandra, J., & Ghannoum, M. A. (2017). Flucytosine treatment and resistance mechanisms. *Antimicrobial Drug Resistance*, 407–413. https://doi.org/10.1007/978-3-319-46718-4_28
- Chen, S. C.-A., Meyer, W., & Sorrell, T. C. (2014). *Cryptococcus gattii* Infections. *Clinical Microbiology Reviews*, 27(4), 980–1024. <https://doi.org/10.1128/cmrr.00126-13>
- Chen, Y., Shi, Z. W., Strickland, A. B., & Shi, M. (2022). *Cryptococcus neoformans* Infection in the Central Nervous System: The battle between host and pathogen. *Journal of Fungi*, 8(10), 1069. <https://doi.org/10.3390/jof8101069>
- Cherkasova, T. G., Tikhomirova, A. V., Zolotukhina, N. A., Cherkasova, E. V., Tatarinova, E. S., & Barantsev, D. A. (2020). Molecular complexes of the first transition metals: Synthesis and structure. *Vestnik of Kuzbass State Technical University*, 6, 32–39. <https://doi.org/10.26730/1999-4125-2020-6-32-39>
- Chen, S. H., & Williamson, P. R. (2011). Lessons from cryptococcal laccase: From environmental saprophyte to pathogen. *Current Fungal Infection Reports*, 5(4), 233–244. <https://doi.org/10.1007/s12281-011-0069-3>

- Chung, K. Y., & Brown, J. C. S. (2020). Biology and function of exo-polysaccharides from human fungal pathogens. *Current Clinical Microbiology Reports*, 7(1), 1–11. <https://doi.org/10.1007/s40588-020-00137-5>
- Chrétien, F., Lortholary, O., Kansau, I., Neuville, S., Gray, F., & Dromer, F. (2002). Pathogenesis of cerebral *Cryptococcus neoformans* infection after fungemia. *The Journal of Infectious Diseases*, 186(4), 522–530. <https://doi.org/10.1086/341564>
- CLSI. Epidemiological cutoff values for antifungal susceptibility testing. 3rd ed. CLSI supplement M59. Wayne, PA: *Clinical and Laboratory Standards Institute*; 2020.
- CLSI. Method for antifungal disk diffusion susceptibility testing of yeasts. 3rd ed. CLSI guideline M44. Wayne, PA: *Clinical and Laboratory Standards Institute*; 2018.
- CLSI. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of Yeasts. 4th ed. CLSI standard M27. Wayne, PA: *Clinical and Laboratory Standards Institute*; 2017.
- Coelho, C., Souza, A. C. O., Derengowski, L. S., Leon-Rodriguez, C., Wang, B., Leon-Rivera, R., Bocca, A. L., Gonçalves, T., & Casadevall, A. (2015). Macrophage mitochondrial and stress response to ingestion of *Cryptococcus neoformans*. *The Journal of Immunology*, 194(5), 2345–2357. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1402350>
- Cogliati, M. (2021). Global warming impact on the expansion of fundamental niche of *Cryptococcus gattii* VGI in Europe. *Environmental Microbiology Reports*, 13(3), 375–383. <https://doi.org/10.1111/1758-2229.12945>
- Colafrancesco, S., Agmon-Levin, N., Perricone, C., & Shoenfeld, Y. (2013). Unraveling the soul of autoimmune diseases: pathogenesis, diagnosis and treatment adding dowels to the puzzle. *Immunologic Research*, 56(2-3), 200–205. <https://doi.org/10.1007/s12026-013-8429-4>
- Colberg, L., Schmidt-Petersen, L., Hansen, M. K., Larsen, B. S., & Otnes, S. (2017). Incorrect storage of medicines and potential for cost savings. *European Journal of Hospital Pharmacy : Science and Practice*, 24(3), 167–169. <https://doi.org/10.1136/ejhp pharm-2015-000744>
- Cox, G. M., McDade, H. C., Chen, S. C. A., Tucker, S. C., Gottfredsson, M., Wright, L. C., Sorrell, T. C., Leidich, S. D., Casadevall, A., Ghannoum, M. A., & Perfect, J. R. (2001). Extracellular phospholipase activity is a virulence factor for *Cryptococcus neoformans*. *Molecular Microbiology*, 39(1), 166–175. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2001.02236.x>
- Crawford, L. A., Watkins, H. C., Wayne, E., & Putnam, D. (2019). Altered biodistribution and tissue retention of nanoparticles targeted with p-glycoprotein substrates. *Regenerative Engineering and Translational Medicine*, 5(3), 308–318. <https://doi.org/10.1007/s40883-019-00111-8>
- Cui, N., & Zhao, J. (2024). Application and evaluation of topical amphotericin B for the treatment of respiratory fungal infections. *BMC Infectious Diseases*, 24(1). <https://doi.org/10.1186/s12879-024-09342-9>
- Curtis, A., Binder, U., & Kavanagh, K. (2022). *Galleria mellonella* larvae as a model for investigating fungal—host interactions. *Frontiers in Fungal Biology*, 3. <https://doi.org/10.3389/ffunb.2022.893494>
- Cytryńska, M., Zdybicka-Barabas, A., & Jakubowicz, T. (2007). Protein kinase A activity and protein phosphorylation in the haemocytes of immune-challenged *Galleria mellonella* larvae. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B Biochemistry and Molecular Biology*, 148(1), 74–83. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2007.04.020>
- d'Agostino, S., Macchietti, L., Turner, R. J., & Grepioni, F. (2024). From 0D-complex to 3D-MOF: Changing the antimicrobial activity of zinc (II) via reaction with aminocinnamic acids. *Frontiers in Chemistry*, 12. <https://doi.org/10.3389/fchem.2024.1430457>
- Daina, A., Michelin, O., & Zoete, V. (2017). Swiss ADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, druglikeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. *Scientific Reports*, 7, 42717. <https://doi.org/10.1038/srep42717>
- Daina, A., & Zoete, V. (2016). A BOILED-Egg to predict gastrointestinal absorption and brain penetration of small molecules. *ChemMedChem*, 11(11), 1117–1121. <https://doi.org/10.1002/cmdc.201600182>
- Daneman, R., & Prat, A. (2015). The Blood–Brain Barrier. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 7(1). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a020412>
- Davis, M. J., Martin, R. E., Pinheiro, G. M., Hoke, E. S., Moyer, S., Ueno, K., Rodriguez-Gil, J. L., Mallett, M. A., Khillan, J. S., Pavan, W. J., Chang, Y. C., & Kwon-Chung, K. J. (2023). Inbred SJL mice recapitulate human

resistance to *Cryptococcus* infection due to differential immune activation. *MBio*, 14(5). <https://doi.org/10.1128/mbio.02123-23>

Decken, K., KöhlerG., Palmer-Lehmann, K., Wunderlin, A., Mattner, F., Magram, J., Gately, M. K., & Alber, G. (1998). Interleukin-12 is essential for a protective Th1 response in mice infected with *Cryptococcus neoformans*. *Infection and Immunity*, 66(10), 4994–5000. <https://doi.org/10.1128/iai.66.10.4994-5000.1998>

Denning, D. W. (2024). Global incidence and mortality of severe fungal disease. *The Lancet Infectious Diseases*. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(23\)00692-8](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(23)00692-8)

Dennis, E. K., Kim, J. H., Parkin, S., Awuah, S. G., & Garneau-Tsodikova, S. (2019). Distorted Gold(I)-phosphine complexes as antifungal agents. *Journal of Medicinal Chemistry*, 63(5), 2455–2469. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.9b01436>

Deray, G. (2002). Amphotericin B nephrotoxicity. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 49(suppl_1), 37–41. https://doi.org/10.1093/jac/49.suppl_1.37

Desalermos, A., Kourkoumpetis, T. K., & Mylonakis, E. (2012). Update on the epidemiology and management of cryptococcal meningitis. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, 13(6), 783–789. <https://doi.org/10.1517/14656566.2012.658773>

Dettloff, M., Wittwer, D., Weise, C., & Wiesner, A. (2001). Lipophorin of lower density is formed during immune responses in the lepidopteran insect *Galleria mellonella*. *Cell and Tissue Research*, 306(3), 449–458. <https://doi.org/10.1007/s00441-001-0468-9>

Devi, S. B., Navi, R. A., Suraj, T., Reema, N., Singh, T. G., Kuotsu, M. M., & Konyak, N. (2021). A Study of clearance of infection in HIV-associated cryptococcal meningitis after amphotericin-based induction and fluconazole-based consolidation therapy. *International Journal of Recent Surgical and Medical Sciences*, 07(01), 023–033. <https://doi.org/10.1055/s-0041-1723920>

Diamond, R. D., & Bennett, J. E. (1973). Growth of *Cryptococcus neoformans* within human macrophages *In vitro*. *Infection and Immunity*, 7(2), 231–236. <https://doi.org/10.1128/iai.7.2.231-236.1973>

Diaz, J. H. (2019). The Disease ecology, epidemiology, clinical manifestations, and management of emerging *Cryptococcus gattii* complex infections. *Wilderness & Environmental Medicine*. <https://doi.org/10.1016/j.wem.2019.10.004>

Dimmitt, S. B. (2011). Lower drug dose may improve outcomes. *Canadian Medical Association Journal*, 183(5), 586–586. <https://doi.org/10.1503/cmaj.111-2030>

Dobrek, L. (2023). A synopsis of current theories on drug-induced nephrotoxicity. *Life*, 13(2), 325. <https://doi.org/10.3390/life13020325>

Dores, M., Munzen, M., Enriquez, V., Charles-Nino, C., Mathew, C., Mishra, A., Patel, J., & Martinez, L. (2024). *Cryptococcus neoformans* capsule glucuronoxylomannan stimulates brain endothelial barrier disruption via RhoA signaling. *Journal of Biological Chemistry*, 300(3), 106783–106783. <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2024.106783>

Dragotakes, Q., Casadevall, A. (2018). Automated Measurement of Cryptococcal Species Polysaccharide Capsule and Cell Body. *J. Vis. Exp.* (131), e56957, doi:10.3791/56957.

Du, R., Niu, W., Hong, H., & Huo, S. (2020). Chapter 7 - Nanotoxicity and regulatory aspects in musculoskeletal regeneration. In *Nanoengineering in Musculoskeletal Regeneration* (pp. 197–235). Academic Press. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/B9780128202623000074#preview-section-cited-by>

Duan, M., Li, T., Liu, B., Yin, S., Zang, J., Lv, C., Zhao, G., & Zhang, T. (2021). Zinc nutrition and dietary zinc supplements. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 63(9), 1–16. <https://doi.org/10.1080/10408398.2021.1963664>

Dutra, F. F., Albuquerque, P. C., Rodrigues, M. L., & Fonseca, F. L. (2018). Warfare and defense: The host response to *Cryptococcus* infection. *Fungal Biology Reviews*, 32(2), 35–51. <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2017.09.002>

Dutt, C., Chauthaiwale, V., Gupta, R., Zambad, S., Deshpande, S., Kotecha, J., Gupta, R., Srivastava, S., Chhipa, L., & Abraham, J. (2017, February 22). US20170157129A1 - Low dose pharmaceutical composition. Patents Google; Google. <https://patents.google.com/patent/US20170157129A1/en>

Eckert TS, Bruice TC. 1983 Chemical properties of phenanthrolinequinones and the mechanism of amine oxidation by o-quinones of medium redox potentials. *J Am Chem Soc* 105, 4431–4441. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(87\)80002-3](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(87)80002-3)

- Egan, W. J., Merz, K. M., Jr, & Baldwin, J. J. (2000). Prediction of drug absorption using multivariate statistics. *Journal of Medicinal Chemistry*, 43(21), 3867–3877. <https://doi.org/10.1021/jm000292e>
- Eisenman, H. C., Mues, M., Weber, S. E., Frases, S., Chaskes, S., Gerfen, G., & Casadevall, A. (2007). *Cryptococcus neoformans* laccase catalyses melanin synthesis from both d- and l-DOPA. *Microbiology*, 153(12), 3954–3962. <https://doi.org/10.1099/mic.0.2007/011049-0>
- Eisenman, H. C., Chow, S.-K., Tsé, K. K., McClelland, E., & Casadevall, A. (2011). The effect of L-DOPA on *Cryptococcus neoformans* growth and gene expression. *Virulence*, 2(4), 329–336. <https://doi.org/10.4161/viru.2.4.16136>
- Er, A., Aşkun, T., Güner, P., & Şengül, S. M. (2024). Determination of antimicrobial activity and total hemocyte count in the larval hemolymph of *Galleria mellonella* (L.) (Lepidoptera: Pyralidae) following application with
- Erives, V. H., Munzen, M. E., Zamith-Miranda, D., Hernandez, H., Manepalli, S., Nguyen, L. N., Hamed, M. F., Nosanchuk, J. D., & Martinez, L. R. (2022). Methamphetamine enhances *Cryptococcus neoformans* melanization, antifungal resistance, and pathogenesis in a murine model of drug administration and systemic infection. *Infection and Immunity*, 90(4). <https://doi.org/10.1128/iai.00091-22>
- Erives, V. H., Munzen, M. E., Zamith-Miranda, D., Hernandez, H., Manepalli, S., Nguyen, L. N., Hamed, M. F., Nosanchuk, J. D., & Martinez, L. R. (2022). Methamphetamine enhances *Cryptococcus neoformans* melanization, antifungal resistance, and pathogenesis in a murine model of drug administration and systemic infection. *Infection and Immunity*, 90(4). <https://doi.org/10.1128/iai.00091-22>
- Fallon, J. P., Troy, N., & Kavanagh, K. (2011). Pre-exposure of *Galleria mellonella* larvae to different doses of Aspergillus fumigatus conidia causes differential activation of cellular and humoral immune responses. *Virulence*, 2(5), 413–421. <https://doi.org/10.4161/viru.2.5.17811>
- Faustino, C., & Pinheiro, L. (2020). Lipid systems for the delivery of amphotericin B in antifungal therapy. *Pharmaceutics*, 12(1), 29. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12010029>
- Fernández-García, R., Pablo, E., Ballesteros, M. P., & Serrano, D. R. (2017). Unmet clinical needs in the treatment of systemic fungal infections: The role of amphotericin B and drug targeting. *International Journal of Pharmaceutics*, 525(1), 139–148. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2017.04.013>
- Ferreira, M. F., Santos, F. B., Trilles, L., Almeida, M. A., Wanke, B., Veloso, V. G., Nunes, E. P., & Lazéra, M. S. (2019). Cryptococcal antigenemia prevalence and clinical data in HIV-infected patients from the reference centre at INI-FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Southeast of Brazil. *Mycoses*, 63(2), 145–150. <https://doi.org/10.1111/myc.13032>
- Ferreira-Paim, K., Andrade-Silva, L., Fonseca, F. M., Ferreira, T. B., Mora, D. J., Andrade-Silva, J., Khan, A., Dao, A., Reis, E. C., Almeida, M. T. G., Maltos, A., Junior, V. R., Trilles, L., Rickerts, V., Chindamporn, A., Sykes, J. E., Cogliati, M., Nielsen, K., Boekhout, T., & Fisher, M. (2017). MLST-Based population genetic analysis in a global context reveals clonality amongst *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* VNI isolates from HIV patients in southeastern Brazil. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 11(1), e0005223. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005223>
- Ferreira Ventura, R., Galdino, A. C. M., Viganor, L., Pinto Schuenck, R., Devereux, M., McCann, M., Souza, L., & Paula, A. (2020). Antimicrobial action of 1,10-phenanthroline-based compounds on carbapenemase-producing *Acinetobacter baumannii* clinical strains: efficacy against planktonic- and biofilm-growing cells. *Clinical Microbiology*, 51(4), 1703–1710. <https://doi.org/10.1007/s42770-020-00351-9>
- Fernandes, C. M., Fonseca, F. L., Goldman, G. H., Pereira, M. D., & Kurtenbach, E. (2017). A reliable assay to evaluate the virulence of *Aspergillus nidulans* using the alternative animal model *Galleria mellonella* (Lepidoptera). *Bio-protocol* 7 (11): e2329. DOI: 10.21769/BioProtoc.2329.
- Firacative, C., Khan, A., Duan, S., Ferreira-Paim, K., Leemon, D., & Meyer, W. (2020). Rearing and maintenance of *Galleria mellonella* and its application to study fungal virulence. *Journal of Fungi*, 6(3), 130. <https://doi.org/10.3390/jof6030130>
- Folk, A., Cotoraci, C., Balta, C., Suciu, M., Herman, H., Maria Boldura, O., Dinescu, S., Paiusan, L., Ardelean, A., & Hermenean, A. (2016). Evaluation of hepatotoxicity with treatment doses of Flucytosine and Amphotericin B for invasive fungal infections. *BioMed Research International*, 2016, 1–9. <https://doi.org/10.1155/2016/5398730>
- Foti, R. S., & Dalvie, D. K. (2016). Cytochrome P450 and non-cytochrome P450 oxidative metabolism: Contributions to the pharmacokinetics, safety, and efficacy of xenobiotics. *Drug Metabolism and Disposition*, 44(8), 1229–1245. <https://doi.org/10.1124/dmd.116.071753>

- França, J. A. A., Borba-Santos, L. P., Pimentel, G. A., Franco, C. H. J., Souza, C., Celestino, J. A., Menezes, E. F., Santos, N. P., Vieira, E. G., Ferreira, A. M. C., Souza, W., Rozental, S., & Navarro, M. (2021). Antifungal promising agents of zinc(II) and copper(II) derivatives based on azole drug. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 219, 111401–111401. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2021.111401>
- Franco, A. M. R., Grafova, I., Soares, F. V., Gentile, G., Wyrepkowska, C. D. C., Bolson, M. A., Sargentini, E. J., Carfagna, C., Leskelä, M., & Grafov, A. (2016). Nanoscaled hydrated antimony (V) oxide as a new approach to first-line antileishmanial drugs. *International Journal of Nanomedicine*, Volume 11, 6771–6780. <https://doi.org/10.2147/ijn.s121096>
- Franconi, I., & Lupetti, A. (2023). *In vitro* susceptibility tests in the context of antifungal resistance: beyond minimum inhibitory concentration in *Candida* spp. *Journal of Fungi*, 9(12), 1188. <https://doi.org/10.3390/jof9121188>
- Frases, S., Nimrichter, L., Viana, N. B., Nakouzi, A., & Casadevall, A. (2008). *Cryptococcus neoformans* capsular polysaccharide and exopolysaccharide fractions manifest physical, chemical, and antigenic differences. *Eukaryotic Cell*, 7(2), 319–327. <https://doi.org/10.1128/ec.00378-07>
- Frazão, S. O., Sousa, H. R., Silva, L. G., Folha, J. S., Gorgonha, K. C. M., Oliveira, G. P., Felipe, M. S. S., Pereira, I. S., Casadevall, A., Nicola, A. M., & Albuquerque, P. (2020). Laccase affects the rate of *Cryptococcus neoformans* nonlytic exocytosis from macrophages. *MBio*, 11(5). <https://doi.org/10.1128/mbio.02085-20>
- Frei, A., King, A. P., Lowe, G. J., Cain, A. K., Short, F. L., Dinh, H., Elliott, A. G., Zuegg, J., Wilson, J. J., & Blaskovich, M. A. T. (2020). Nontoxic Cobalt(III) schiff base complexes with broad-spectrum antifungal activity. *Chemistry – a European Journal*, 27(6), 2021–2029. <https://doi.org/10.1002/chem.202003545>
- Freitas, G. J. C., & Santos, D. A. (2021). *Cryptococcus gattii* polysaccharide capsule: An insight on fungal-host interactions and vaccine studies. *European Journal of Immunology*, 51(9), 2206–2209. <https://doi.org/10.1002/eji.202149349>
- Frézard, F., Demicheli, C., & Ribeiro, R. R. (2009). Pentavalent Antimonials: New Perspectives for Old Drugs. *Molecules*, 14(7), 2317–2336. <https://doi.org/10.3390/molecules14072317> Frota, H. F., Barbosa, P. F., Lorentino, C. M. A., Affonso, L. R. F., Ramos, L. S., Oliveira, S. S. C., Souza, L. O. P., Abosede, O. O., Ogunlaja, A. S., Branquinha, M. H., & Santos, A. L. S. (2024A). Unveiling the antifungal mechanisms of CTP, a new copper(II)-theophylline/1,10-phenanthroline complex, on drug-resistant non-albicans *Candida* species. *Biometals: An International Journal on the Role of Metal Ions in Biology, Biochemistry, and Medicine*, 10.1007/s10534-024-00605-1. Advance online publication. <https://doi.org/10.1007/s10534-024-00605-1>
- Frota, H. F., Lorentino, C. M. A., Barbosa, P. F., Ramos, L. S., Barcellos, I. C., Giovanini, L., Souza, L. O. P., Oliveira, S. S. C., Abosede, O. O., Ogunlaja, A. S., Pereira, M. M., Branquinha, M. H., & Santos, A. L. S. (2024A). Antifungal potential of the new copper (II)-theophylline/1,10-phenanthroline complex against drug-resistant *Candida* species. *Biometals: An International Journal on the Role of Metal Ions in Biology, Biochemistry, and Medicine*, 37(2), 321–336. <https://doi.org/10.1007/s10534-023-00549-y>
- Frota, H. F., Barbosa, P. F., Lorentino, C. M. A., Affonso, L. R. F., Ramos, L. S., Oliveira, S. S. C., Souza, L. O. P., Abosede, O. O., Ogunlaja, A. S., Branquinha, M. H., & Santos, A. L. S. (2024B). Unveiling the antifungal mechanisms of CTP, a new copper(II)-theophylline/1,10-phenanthroline complex, on drug-resistant non-albicans *Candida* species. *BioMetals*. <https://doi.org/10.1007/s10534-024-00605-1>
- Fuchs, B. B., & Mylonakis, E. (2006). Using non-mammalian hosts to study fungal virulence and host defense. *Current Opinion in Microbiology*, 9(4), 346–351. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2006.06.004>
- Galdino, A. C. M., Viganor, L., Pereira, M. M., Devereux, M., McCann, M., Branquinha, M. H., Molphy, Z., O'Carroll, S., Bain, C., Menounou, G., Kellett, A., & Santos, A. L. S. (2022). Copper(II) and silver(I)-1,10-phenanthroline-5,6-dione complexes interact with double-stranded DNA: Further evidence of their apparent multi-modal activity towards *Pseudomonas aeruginosa*. *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 27(1), 201–213. <https://doi.org/10.1007/s00775-021-01922-3>
- Gallorini, M., Marinacci, B., Pellegrini, B., Cataldi, A., Dindo, M. L., Carradori, S., & Grande, R. (2024). Immunophenotyping of hemocytes from infected *Galleria mellonella* larvae as an innovative tool for immune profiling, infection studies and drug screening. *Scientific Reports*, 14(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-024-51316-z>
- Gandra, R. M., McCarron, P., Viganor, L., Fernandes, M. F., Kavanagh, K., McCann, M., Branquinha, M. H., Santos, A. L. S., Howe, O., & Devereux, M. (2020). *In vivo* activity of copper (II), manganese (II), and silver (I)

- 1,10-phenanthroline chelates against *Candida haemulonii* using the *Galleria mellonella* model. *Frontiers in Microbiology*, 11, 470. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00470>
- Gandra, R. M., Pacheco, C. A., Sangenito, L. S., Ramos, L. S., Souza, L. O., McCarron, P., McCann, M., Devereux, M., Branquinha, M. H., & Santos, A. L. (2024). Manganese (II), copper (II) and silver (I) complexes containing 1,10-phenanthroline/1,10-phenanthroline-5,6-dione against *Candida* species. *Future Microbiology*, 19, 385–395. <https://doi.org/10.2217/fmb-2023-0212>
- Gandra, R. M., Carron, P. M., Fernandes, M. F., Ramos, L. S., Mello, T. P., Aor, A. C., Branquinha, M. H., McCann, M., Devereux, M., & Santos, A. L. (2017). Antifungal potential of copper(II), manganese(II) and silver(I) 1,10-phenanthroline chelates against multidrug-resistant fungal species forming the *Candida haemulonii* complex: Impact on the planktonic and biofilm lifestyles. *Frontiers in Microbiology*, 8(1257). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01257>
- Garcia-Hermoso, D., Janbon, G., & DromerF. (1999). Epidemiological evidence for dormant *Cryptococcus neoformans* infection. *Journal of Clinical Microbiology*, 37(10), 3204–3209. <https://doi.org/10.1128/jcm.37.10.3204-3209.1999>
- Garcia-Bustos, V., Pemán, J., Ruiz-Gaitán, A., Cabañero-Navalon, M. D., Cabanilles-Boronat, A., Fernández-Calduch, M., Marcilla-Barreda, L., Sigona-Giangreco, I. A., Salavert, M., Tormo-Mas, M. Á., & Ruiz-Saurí, A. (2022). Host-pathogen interactions upon *Candida auris* infection: fungal behaviour and immune response in *Galleria mellonella*. *Emerging Microbes & Infections*, 11(1), 136–146. <https://doi.org/10.1080/22221751.2021.2017756>
- Ghose, A. K., Viswanadhan, V. N., & Wendoloski, J. J. (1999). A knowledge-based approach in designing combinatorial or medicinal chemistry libraries for drug discovery. 1. A qualitative and quantitative characterization of known drug databases. *Journal of Combinatorial Chemistry*, 1(1), 55–68. <https://doi.org/10.1021/cc9800071>
- Gill, C. M., Asempa, T. E., & Nicolau, D. P. (2020). Human-simulated antimicrobial regimens in animal models: transparency and validation are imperative. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 64(8). <https://doi.org/10.1128/aac.00594-20>
- Giovanini, L. (2024). *Compostos de coordenação contendo 1,10-fenantrolina- 5,6-diona complexados à prata e cobre: potenciais Antifúngicos contra Cryptococcus neoformans e Cryptococcus gattii* [Dissertação].
- Giovanini, L., Casemiro, A. L., Corrêa, L. S., Mendes, M., Mello, T. P., Souza, L. O. P., Wagner, L. G., Fernandes, C., Pereira, M. M., Souza, L. C. S. V., Baptista, A. R. S., Moraes, J., McCann, M., Branquinha, M. H., & Santos, A. L. S. (2025). Toxicity assessment and antifungal potential of copper(ii) and silver(i) complexes with 1,10-phenanthroline-5,6-dione against drug-resistant clinical isolates of *Cryptococcus gattii* and *Cryptococcus neoformans*. *Journal of Fungi*, 11(6), 436. <https://doi.org/10.3390/jof11060436>
- Gniazdo, D., Sasal, W., Omelaniuk, A., Brudz, W., & Kaca, W. (2023). *Galleria mellonella* larvae as an *in vitro* model for testing microbial pathogenicity. *Postępy Mikrobiologii - Advancements of Microbiology*, 62(3-4), 173–182. <https://doi.org/10.2478/am-2023-0015>
- González-Maldonado, P., Alvarenga, N., Burgos-Edwards, A., Flores-Giubi, Ma. E., Barúa, J. E., Romero-Rodríguez, Ma. C., Soto-Rifo, R., Valiente-Echeverría, F., Langjahr, P., Cantero-González, G., & Sotelo, P. H. (2022). Screening of natural products inhibitors of SARS-CoV-2 entry. *Molecules*, 27(5), 1743. <https://doi.org/10.3390/molecules27051743>
- Gougis, P., Hilmi, M., Geraud, A., Mir, O., & Funck-Brentano, C. (2021). Potential cytochrome P450-mediated pharmacokinetic interactions between herbs, food, and dietary supplements and cancer treatments. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 166, 103342. <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2021.103342>
- Granato, M. Q., Mello, T. P., Nascimento, R. S., Pereira, M. D., Rosa, T. L. S. A., Pessolani, M. C. V., McCann, M., Devereux, M., Branquinha, M. H., Santos, A. L. S., & Kneipp, L. F. (2021). Silver(I) and copper(II) complexes of 1,10-phenanthroline-5,6-dione against *Phialophora verrucosa*: A focus on the interaction with human macrophages and *Galleria mellonella* larvae. *Frontiers in Microbiology*, 12, 641258. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.641258>
- Guengerich, F. P. (2021). Inhibition of cytochrome P450 enzymes by drugs—molecular basis and practical applications. *Biomolecules & Therapeutics*. <https://doi.org/10.4062/biomolther.2021.102>
- Haddad, N., Bechwati, M., Ayoub, H., Zeenny, R. M., & Kanj, S. S. (2022). Amphotericin-B. In *Comprehensive Pharmacology* (pp. 322–342). Elsevier.

- Hagen, F., Khayhan, K., Theelen, B., Kolecka, A., Polacheck, I., Sionov, E., Falk, R., Parnmen, S., Lumbsch, H. T., & Boekhout, T. (2015). Recognition of seven species in the *Cryptococcus gattii/Cryptococcus neoformans* species complex. *Fungal Genetics and Biology*, 78, 16–48. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2015.02.009>
- Hakkola, J., Hukkanen, J., Turpeinen, M., & Pelkonen, O. (2020). Inhibition and induction of CYP enzymes in humans: An update. *Archives of Toxicology*, 94(11), 3671–3722. <https://doi.org/10.1007/s00204-020-02936-7>
- Hansakon, A., Ngamskulrungroj, P., & Angkasekwinai, P. (2020). Contribution of laccase expression to immune response against *Cryptococcus gattii* infection. *Infection and Immunity*, 88(3). <https://doi.org/10.1128/iai.00712-19>
- Hapid, M. H., & Setiadhi, R. (2022). A review: zinc as an antivirus alternative treatment for *herpes simplex* virus infection. *International Journal of Applied Pharmaceutics*, 1–6. <https://doi.org/10.22159/ijap.2022.v14s4.op04>
- Hardison, S. E., Ravi, S., Wozniak, K. L., Young, M. L., Olszewski, M. A., & Wormley, F. L. (2010). Pulmonary infection with an Interferon- γ -producing *Cryptococcus neoformans* strain results in classical macrophage activation and protection. *American Journal of Pathology*, 176(2), 774–785. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2010.090634>
- Hawkins, A. N., Determann, B. F., Nelson, B. N., & Wozniak, K. L. (2021). Transcriptional changes in pulmonary phagocyte subsets dictate the outcome following interaction with the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. *Frontiers in Immunology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.722500>
- Hazarika, D., Christian, Y., & Ramakrishnan, V. (2023). Hemolytic Activity. In *Biophysical Characterization of Functional Peptides* (pp. 97–102). Humana Press. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-3405-9_14
- Hendy, A., & Hall, R. (2019). Cardiac surgery and the blood-brain barrier. *Anesthesiology Clinics*, 37(4), 787–800. <https://doi.org/10.1016/j.anclin.2019.08.009>
- Herring, A. C. (2002). Induction of Interleukin-12 and Gamma Interferon requires Tumor Necrosis Factor Alpha for protective T1-Cell-mediated immunity to pulmonary *Cryptococcus neoformans* infection. *Infection and Immunity*, 70(6), 2959–2964. <https://doi.org/10.1128/iai.70.6.2959-2964.2002>
- Herwaldt, B. L., & Berman, J. D. (1992). Recommendations for treating leishmaniasis with sodium Stibogluconate (Pentostam) and review of pertinent clinical studies. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 46(3), 296–306. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1992.46.296>
- Hill, L., Veli, N., & Coote, P. J. (2014). Evaluation of *Galleria mellonella* larvae for measuring the efficacy and pharmacokinetics of antibiotic therapies against *Pseudomonas aeruginosa* infection. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 43(3), 254–261. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2013.11.001>
- Hilt G, Farbawi T, Heineman WR, Steckhan E. 1997 An analytical study of the redox behaviour of 1,10-phenanthroline-5,6-dione, its transition-metal complexes, and its N-monomethylated derivative with regard to their efficiency as mediators of NAD(P)+ regeneration. *Chem Eur J* 3, 79–88. <https://doi.org/10.1002/chem.19970030114>
- House, J. E., & House, K. A. (2010). Synthesis and reactions of coordination compounds. *Elsevier EBooks*, 479–515. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-088755-2.00020-3>
- Hubrecht, R. C., & Carter, E. (2019). The 3Rs and humane experimental technique: implementing change. *Animals*, 9(10), 754. <https://doi.org/10.3390/ani9100754>
- Huffnagle, G. B., Toews, G. B., Burdick, M. D., Boyd, M. B., McAllister, K. S., McDonald, R. A., Kunkel, S. L., & Strieter, R. M. (1996). Afferent phase production of TNF-alpha is required for the development of protective T cell immunity to *Cryptococcus neoformans*. *Journal of Immunology*, 157(10), 4529–4536. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.157.10.4529>
- Hutchings, C., Rajasekharan, S. K., Reifen, R., & Shemesh, M. (2020). Mitigating milk-associated bacteria through inducing zinc ions antibiofilm activity. *Foods*, 9(8), 1094. <https://doi.org/10.3390/foods9081094>
- Ibe, C., Okoye, C. A., Innocent Nweze, E., & Otu, A. (2023). Cryptococcosis in Africa: What the data tell us. *Medical Mycology*, 61(6). <https://doi.org/10.1093/mmy/myad049>
- Ikeda, R., & Ichikawa, T. (2014). Interaction of surface molecules on *Cryptococcus neoformans* with plasminogen. *FEMS Yeast Research*, 14(3), 445–450. <https://doi.org/10.1111/1567-1364.12131>

- Indrayanto, G., Satrio Putra, G., & Suhud, F. (2021). Validation of in-vitro bioassay methods: Application in herbal drug research. In *Profiles of Drug Substances, Excipients and Related Methodology* (pp. 273–307). Academic Press.
- Ishida, T. (2020). Zinc ions-induced immunology for SARS-CoV-2 infectious prevention and severe acute COVID-19 defenses. *Archives of Immunology and Allergy*, 3(2), 1–15. <https://doi.org/10.22259/2639-1848.0302001>
- Iwański, B., Mizerska-Kowalska, M., & Andrejko, M. (2022). *Pseudomonas Aeruginosa* exotoxin a induces apoptosis in *Galleria Mellonella* hemocytes. *SSRN Electronic Journal*. <https://doi.org/10.2139/ssrn.4258751>
- Iyer, K. R., Revie, N. M., Fu, C., Robbins, N., & Cowen, L. E. (2021). Treatment strategies for cryptococcal infection: challenges, advances and future outlook. *Nature Reviews Microbiology*, 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41579-021-00511-0>
- Jemal, M., Deress, T., Belachew, T., & Adem, Y. (2021). Prevalence of Cryptococcal antigenemia and associated factors among HIV/AIDS patients at Felege-Hiwot referral hospital, Bahir Dar, northwest Ethiopia. *International Journal of Microbiology*, 2021, 1–6. <https://doi.org/10.1155/2021/8839238>
- Jong, A., Wu, C.-H., Chen, H.-M., Luo, F., Kwon-Chung, K. J., Chang, Y. C., LaMunyon, C. W., Plaas, A., & Huang, S.-H. (2007). Identification and characterization of CPS as a hyaluronic acid synthase contributing to the pathogenesis of *Cryptococcus neoformans* infection. *Eukaryotic Cell*, 6(8), 1486–1496. <https://doi.org/10.1128/ec.00120-07>
- Julian, J., Adawiyah, R., & Wahdini, S. (2023). Biomolecular activity of *Cryptococcus* during cryptococcosis: Focus on review of molecular interaction *Cryptococcus* with human immune system and blood-brain barrier. *African Journal of Infectious Diseases*, 18(1), 11–22. <https://doi.org/10.21010/ajidv18i1.3>
- Jung, E. H., Park, Y.-D., Dragotakes, Q., Ramirez, L. S., Smith, D. Q., Reis, F. C. G., Dziedzic, A., Rodrigues, M. L., Baker, R. P., Williamson, P. R., Jedlicka, A., Casadevall, A., & Coelho, C. (2022). *Cryptococcus neoformans* releases proteins during intracellular residence that affect the outcome of the fungal–macrophage interaction. *MicroLife*, 3. <https://doi.org/10.1093/femsml/uqac015>
- Jung, J., Kang, Y. S., Brown, H., Mateusiak, C., Doering, T. L., & Brent, M. R. (2023). How host-like signals drive gene expression and gene expression drives capsule expansion in *Cryptococcus neoformans*. *The Preprint Server for Biology*, 2023.04.19.537239. <https://doi.org/10.1101/2023.04.19.537239>
- Kalem, M. C., Subbiah, H., Leipheimer, J., Glazier, V. E., & Panepinto, J. C. (2021). Puf4 mediates post-transcriptional regulation of cell wall biosynthesis and Caspofungin resistance in *Cryptococcus neoformans*. *MBio*, 12(1). <https://doi.org/10.1128/mbio.03225-20>
- Kawakami, K., Zhang, T., Qureshi, M. H., & Saito, A. (1997). *Cryptococcus neoformans* inhibits nitric oxide production by murine peritoneal macrophages stimulated with Interferon- γ and lipopolysaccharide. *Cellular Immunology*, 180(1), 47–54. <https://doi.org/10.1006/cimm.1997.1166>
- Kelly, J., & Kavanagh, K. (2011). Caspofungin primes the immune response of the larvae of *Galleria mellonella* and induces a non-specific antimicrobial response. *Journal of Medical Microbiology*, 60(Pt 2), 189–196. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.025494-0>
- Kietrungruang, K., Sookkree, S., Sangboonruang, S., Semakul, N., Poomanee, W., Kitidee, K., Tragoolpua, Y., & Tragoolpua, K. (2023). Ethanolic extract propolis-loaded niosomes diminish Phospholipase B1, biofilm formation, and intracellular replication of *Cryptococcus neoformans* in macrophages. *Molecules/Molecules Online/Molecules Annual*, 28(17), 6224–6224. <https://doi.org/10.3390/molecules28176224>
- Kim, J.-C., Crary, B., Chang, Y. C., Kwon-Chung, K. J., & Kim, K. J. (2012). *Cryptococcus neoformans* Activates RhoGTPase proteins followed by protein Kinase C, focal adhesion kinase, and Ezrin to promote traversal across the Blood-Brain Barrier. *Journal of Biological Chemistry*, 287(43), 36147–36157. <https://doi.org/10.1074/jbc.m112.389676>
- Kindermann, M., Knipfer, L., Obermeyer, S., Müller, U., Alber, G., Bogdan, C., Schleicher, U., Neurath, M. F., & Wirtz, S. (2020). Group 2 Innate Lymphoid Cells (ILC2) suppress beneficial type 1 immune responses during pulmonary cryptococcosis. *Frontiers in Immunology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00209>
- Kompaniyets, L. (2021). Underlying medical conditions and severe illness among 540,667 adults hospitalized with COVID-19, March 2020–March 2021. *Preventing Chronic Disease*, 18. <https://doi.org/10.5888/pcd18.210123>

- Krasnovskaya, O., Naumov, A., Guk, D., Gorelkin, P., Erofeev, A., Beloglazkina, E., & Majouga, A. (2020). Copper coordination compounds as biologically active agents. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(11). <https://doi.org/10.3390/ijms21113965>
- Ksenia, Alikova. (2022). Access to medicines for treating people with cryptococcal meningitis. *Clinical Infectious Diseases*, 76(3):e773-e775. doi: 10.1093/cid/ciac689
- Kurstak, E., & Vega, C. E. (1968). Infection bactérienne à *Salmonella typhimurium* chez un invertébré, *Galleria mellonella* L. *Canadian Journal of Microbiology*, 14(3), 233–237. <https://doi.org/10.1139/m68-039>
- Kyriakidis, I., Tragiannidis, A., Munchen, S., & Groll, A. H. (2017). Clinical hepatotoxicity associated with antifungal agents. *Expert Opinion on Drug Safety*, 16(2), 149–165. <https://doi.org/10.1080/14740338.2017.1270264>
- Kwon-Chung, K. J., & Varma, A. (2006). Do major species concepts support one, two or more species within *Cryptococcus neoformans*? *FEMS Yeast Research*, 6(4), 574–587. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2006.00088.x>
- Laborclin. (2018). CGB AGAR. <https://www.laborclin.com.br/wp-content/uploads/2023/04/172259-02-AGAR-CGB-Rev-01-042018.pdf>
- Lahiri, S., & Chandrashekhar, N. (2022). Advanced approach for antifungal susceptibility and characterization of resistance properties in clinical and environmental isolates of *Cryptococcus* species complex. *Infectious Medicine*, 1(3), 147–153. <https://doi.org/10.1016/j.imj.2022.08.006>
- La Hoz, R. M., & Pappas, P. G. (2013). Cryptococcal Infections: changing epidemiology and implications for therapy. *Drugs*, 73(6), 495–504. <https://doi.org/10.1007/s40265-013-0037-z>
- Laniado-Laborín, R., & Cabrales-Vargas, M. N. (2009). Amphotericin B: side effects and toxicity. *Revista Iberoamericana de Micología*, 26(4), 223–227. <https://doi.org/10.1016/j.riam.2009.06.003>
- LaRocque-de-Freitas, I. F., Barbosa, E., Paixão Gemieski, L., Beatriz, Diniz-Lima, I., de, A., Lopes, U. G., Freire-de-Lima, L., Morrot, A., Osvaldo Previato, J., Mendonça-Previato, L., Pinto-da-Silva, L. H., Freire-de-Lima, C. G., & Decote-Ricardo, D. (2024). Inhibition of microbicidal activity of canine macrophages DH82 cell line by capsular polysaccharides from *Cryptococcus neoformans*. *Journal of Fungi*, 10(5), 339–339. <https://doi.org/10.3390/jof10050339>
- Lee, C. A., Cook, J. A., Reyner, E. L., & Smith, D. A. (2010). P-glycoprotein related drug interactions: clinical importance and a consideration of disease states. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*, 6(5), 603–619. <https://doi.org/10.1517/17425251003610640>
- Lee, T. D., Lee, O. W., Brimacombe, K. R., Chen, L., Guha, R., Lusvarghi, S., Tebase, B. G., Klumpp-Thomas, C., Robey, R. W., Ambudkar, S. V., Shen, M., Gottesman, M. M., & Hall, M. D. (2019). A high-throughput screen of a library of therapeutics identifies cytotoxic substrates of p-glycoprotein. *Molecular Pharmacology*, 96(5), 629–640. <https://doi.org/10.1124/mol.119.115964>
- Leon-Rodriguez, C. M. D., Fu, M. S., Çorbali, M. O., Cordero, R. J. B., & Casadevall, A. (2018). The capsule of *Cryptococcus neoformans* modulates phagosomal pH through its acid-base properties. *MSphere*, 3(5). <https://doi.org/10.1128/mSphere.00437-18>
- Levitz, S. M. (1991). The Ecology of *Cryptococcus neoformans* and the Epidemiology of Cryptococcosis. *Clinical Infectious Diseases*, 13(6), 1163–1169. <https://doi.org/10.1093/clinids/13.6.1163>
- Levitz, S. M., Nong, S.-H., Seetoo, K. F., Harrison, T. S., Speizer, R. A., & Simons, E. R. (1999). *Cryptococcus neoformans* resides in an acidic phagolysosome of human macrophages. *Infection and Immunity*, 67(2), 885–890. <https://doi.org/10.1128/iai.67.2.885-890.1999>
- Li, Y., Liao, C., & Tjong, S. C. (2020). Recent advances in zinc oxide nanostructures with antimicrobial activities. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(22), 8836. <https://doi.org/10.3390/ijms21228836>
- Li, J., Cao, D., Huang, Y., Chen, B., Chen, Z., Wang, R., Dong, Q., Wei, Q., & Liu, L. (2022). Zinc intakes and health outcomes: An umbrella review. *Frontiers in Nutrition*, 9. <https://doi.org/10.3389/fnut.2022.798078>
- Lin, J. H., & Lu, A. Y. H. (1997). Role of Pharmacokinetics and Metabolism in Drug Discovery and Development. *Pharmacological Reviews*, 49(4), 403–449. <https://farmacologiaefs.files.wordpress.com/2011/04/403.pdf>
- Lin, X. (2009). *Cryptococcus neoformans*: Morphogenesis, infection, and evolution. *Infection, Genetics and Evolution*, 9(4), 401–416. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2009.01.013>

- Ling, J., Du, Y., Sheng, Y., Wang, W., Wu, H., Chen, G., & Lv, H. (2023). Influence of cryopreservation methods of *ex vivo* rat and pig skin on the results of *in vitro* permeation test. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 189, 109–121. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2023.06.004>
- Lipinski, C. A., Lombardo, F., Dominy, B. W., & Feeney, P. J. (2001). Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 46(1-3), 3-26. [https://doi.org/10.1016/s0169-409x\(00\)00129-0](https://doi.org/10.1016/s0169-409x(00)00129-0)
- Littman, M. L., Horowitz, P. L., & Swadey, J. G. (1958). Coccidioidomycosis and its treatment with amphotericin B. *The American Journal of Medicine*, 24(4), 568–592. [https://doi.org/10.1016/0002-9343\(58\)90297-3](https://doi.org/10.1016/0002-9343(58)90297-3)
- Liu, Y., Zhang, Y., Zhao, X., Lu, W., Zhong, Y., & Fu, Y. (2023). Antifungal peptide SP1 damages polysaccharide capsule of *Cryptococcus neoformans* and enhances phagocytosis of macrophages. *Microbiology Spectrum*, 11(2). <https://doi.org/10.1128/spectrum.04562-22>
- Liu, S., Cao, X., Guo, H., & Wei, W. (2021). Zinc influx restricts *Enterovirus D68* replication. *Frontiers in Microbiology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.748546>
- Lizarazo, J., Linares, M., De Bedout, C., Restrepo, Á., Agudelo, C. I., Castañeda, E., & Grupo Colombiano para el Estudio de la Criptococosis. (2007). Estudio clínico y epidemiológico de la criptococcosis en Colombia: Resultados de nueve años de la encuesta nacional, 1997-2005. *Biomédica*, 27(1), 94. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v27i1.236>
- Lohar, S., Kumar Prajapati, D., Kunwar Chouhan, J., Vijay, A., & Bhardwaj, S. (2004). Coordination compounds of chromium, molybdenum and tungsten. *Elsevier EBooks*, 98(8), 1271–1283. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-824493-7.00001-0>
- Lone, S. A., & Ahmad, A. (2020). Inhibitory effect of novel Eugenol Tosylate congeners on pathogenicity of *Candida albicans*. *BMC Complementary Medicine and Therapies*, 20(1). <https://doi.org/10.1186/s12906-020-02929-0>
- Lopes, W., Vainstein, M. H., Araújo, G. R. S., Frases, S., Staats, C. C., Almeida, R. M. C., Schrank, A., Kmetzsch, L., & Vainstein, M. H. (2017). Geometrical distribution of *Cryptococcus neoformans* mediates flower-like biofilm development. *Frontiers in Microbiology*, 8. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02534>
- Loyse, A., Burry, J., Cohn, J., Ford, N., Chiller, T., Ribeiro, I., Koulla-Shiro, S., Mghamba, J., Ramadhani, A., Nyirenda, R., Aliyu, S. H., Wilson, D., Le, T., Oladele, R., Lesikari, S., Muzaora, C., Kalata, N., Temfack, E., Mapoure, Y., & Sini, V. (2019). Leave no one behind: response to new evidence and guidelines for the management of cryptococcal meningitis in low-income and middle-income countries. *The Lancet Infectious Diseases*, 19(4), e143–e147. [https://doi.org/10.1016/s1473-3099\(18\)30493-6](https://doi.org/10.1016/s1473-3099(18)30493-6)
- Lipinski, C. A., Lombardo, F., Dominy, B. W., & Feeney, P. J. (2001). Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 46(1-3), 3-26. [https://doi.org/10.1016/s0169-409x\(00\)00129-0](https://doi.org/10.1016/s0169-409x(00)00129-0)
- Ma, H., Qian, A., Zheng, Y., Meng, X., Wang, T., Zhang, Y., Sun, L., Zou, F., Zhao, B., Zhang, S., Zhang, D., & Yang, Y. (2022). Design, synthesis, and structure–activity relationship studies of bisamide derivatives of Amphotericin B with potent efficacy and low toxicity. *Journal of Medicinal Chemistry*, 65(13), 8897–8913. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.1c02227>
- Madaan, K., & Kumar Bari, V. (2023). Emerging role of sphingolipids in Amphotericin B drug resistance. *Microbial Drug Resistance*, 29(8), 319–332. <https://doi.org/10.1089/mdr.2022.0353>
- Madu, U. L., & Sebolai, O. M. (2019). Complementary use of microscopic techniques and fluorescence reading in studying *Cryptococcus-Amoeba* interactions. *Journal of Visualized Experiments*, 148. <https://doi.org/10.3791/58698>
- Mahapatra, D. K., Bharti, S. K., Asati, V., & Singh, S. K. (2019). Perspectives of medicinally privileged chalcone based metal coordination compounds for biomedical applications. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 174, 142–158. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2019.04.032>
- Mangmee, S., Reamtong, O., Kalambaheti, T., Roytrakul, S., & Sonthayanon, P. (2021). Antimicrobial peptide modifications against clinically isolated antibiotic-resistant *Salmonella*. *Molecules*, 26(4654), 1–15. <https://doi.org/10.3390/molecules26154654>
- Marchetti, F., Tombesi, A., Nicola, C. D., Pettinari, R., Verdicchio, F., Crispini, A., Scarpelli, F., Baldassarri, C., Marangoni, E., Hofer, A., Galindo, A., & Petrelli, R. (2022). Zinc(II) complex with pyrazolone-based hydrazones

- is strongly effective against *Trypanosoma brucei* which causes African sleeping sickness. *Inorganic Chemistry*, 61(34), 13561–13575. <https://doi.org/10.1021/acs.inorgchem.2c02201>
- Martin, J. E., Edmonds, K. A., Bruce, K. E., Campanello, G. C., Eijkelkamp, B. A., Brazel, E. B., McDevitt, C. A., Winkler, M. E., & Giedroc, D. P. (2017). The zinc efflux activator S cz A protects *Streptococcus pneumoniae* serotype 2 D 39 from intracellular zinc toxicity. *Molecular Microbiology*, 104(4), 636–651. <https://doi.org/10.1111/mmi.13654>
- Maruvada, R., Zhu, L., Pearce, D., Zheng, Y., Perfect, J., Kwon-Chung, K. J., & Kim, K. S. (2012). *Cryptococcus neoformans* phospholipase B1 activates host cell Rac1 for traversal across the blood-brain barrier. *Cellular Microbiology*, 14(10), 1544–1553. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2012.01819.x>
- Mashau, R. C., Meiring, S. T., Quan, V. C., Nel, J., Greene, G. S., Garcia, A., Menezes, C., Reddy, D. L., Venter, M., Stacey, S., Madua, M., Boretti, L., Harrison, T. S., Meintjes, G., Shroufi, A., Trivino-Duran, L., Black, J., Govender, N. P., Abrahams, S., & Pearce, V. (2022). Outcomes of flucytosine-containing combination treatment for cryptococcal meningitis in a South African national access programme: a cross-sectional observational study. *The Lancet Infectious Diseases*, 22(9), 1365–1373. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(22\)00234-1](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(22)00234-1)
- Maurer, E., Hörtnagl, C., Lackner, M., Grässle, D., Naschberger, V., Moser, P., Segal, E., Semis, M., Lass-Flörl, C., & Binder, U. (2019). *Galleria mellonella* as a model system to study virulence potential of mucormycetes and evaluation of antifungal treatment. *Medical Mycology*, 57(3), 351–362. <https://doi.org/10.1093/mmy/myy042>
- May, R. C., Stone, N. R. H., Wiesner, D. L., Bicanic, T., & Nielsen, K. (2016). *Cryptococcus*: from environmental saprophyte to global pathogen. *Nature Reviews Microbiology*, 14(2), 106–117. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2015.6>
- Maxson, M. E., Cook, E., Casadevall, A., & Zaragoza, O. (2007). The volume and hydration of the *Cryptococcus neoformans* polysaccharide capsule. *Fungal Genetics and Biology*, 44(3), 180–186. <https://doi:10.1016/j.fgb.2006.07.010>
- McCann, M., Coyle, B., McKay, S., McCormack, P., Kavanagh, K., Devereux, M., McKee, V., Kinsella, P., O'Connor, R., & Clynes, M. (2004). Synthesis and X-ray crystal structure of [Ag(phendio)2]ClO₄ (phendio = 1,10-phenanthroline-5,6-dione) and its effects on fungal and mammalian cells. *Biometals: An International Journal on the Role of Metal Ions in Biology, Biochemistry, and Medicine*, 17(6), 635–645. <https://doi.org/10.1007/s10534-004-1229-5>
- McCann, M., Santos, A. L. S., Silva, B. A., Romanos, M. T. V., Pyrrho, A. S., Devereux, M., et al. (2012). *In vitro* and *in vivo* studies into the biological activities of 1,10-phenanthroline, 1,10-phenanthroline-5,6-dione and its copper(II) and silver(I) complexes. *Toxicology Research*, 1, 47–54. doi: 10.1039/c2tx00010e
- McCormick, J. W., Vogel, P. D., & Wise, J. G. (2015). Multiple drug transport pathways through human P-glycoprotein. *Biochemistry*, 54(28), 4374–4390. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.5b00018>
- McFadden, D., Zaragoza, O., & Casadevall, A. (2006). The capsular dynamics of *Cryptococcus neoformans*. *Trends in Microbiology*, 14(11), 497–505. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2006.09.003>
- Mecheri, Y., & Soundous Malek, B. (2024). Fundamentals of blood-brain barrier anatomy and global functions. *CRC Press EBooks*, 1–14. <https://doi.org/10.1201/9781003383376-1>
- Medici, S., Peana, M., Crispini, G., Nurchi, V. M., Lachowicz, J. I., Remelli, M., & Zoroddu, M. A. (2016). Silver coordination compounds: A new horizon in medicine. *Coordination Chemistry Reviews*, 327–328, 349–359. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2016.05.015>
- Mello, T. P., Aor, A. C., Barcellos, I. C., Pereira, M. M., McCann, M., Devereux, M., Branquinha, M. H., & Santos, A. L. (2023). Active Cu(II), Mn(II) and Ag(I) 1,10-phenanthroline/1,10-phenanthroline-5,6-dione/dicarboxylate chelates: Effects on *Scedosporium*. *Future Microbiology*, 18(15), 1049–1059. <https://doi.org/10.2217/fmb-2022-0202>
- Miller, M. A., Askevold, B., Yang, K. S., Kohler, R. H., & Weissleder, R. (2014). Platinum compounds for high-resolution *in vivo* cancer imaging. *ChemMedChem*, 9(6), 1131–1135. <https://doi.org/10.1002/cmdc.201300502>
- Missall, T. A., Pusateri, M. E., & Lodge, J. K. (2004). Thiol peroxidase is critical for virulence and resistance to nitric oxide and peroxide in the fungal pathogen, *Cryptococcus neoformans*. *Molecular Microbiology*, 51(5), 1447–1458. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2004.03921.x>
- Mohammed, H. S., & Tripathi, V. D. (2020). Medicinal applications of coordination complexes. *Journal of Physics: Conference Series*, 1664(1), 012070. <https://doi.org/10.1088/1742-6596/1664/1/012070>

- Moretti, M. L., Ribeiro Resende, M., dos Santos Lazéra, M., Lopes Colombo, A., & Shikanai-Yasuda, M. A. (2008). Consenso em criptococose: 2008. *Revista Da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 41(5), 524–544. <https://doi.org/10.1590/s0037-86822008000500022>
- Mourad, A., & Perfect, J. (2018). Present and future therapy of *Cryptococcus* infections. *Journal of Fungi*, 4(3), 79. <https://doi.org/10.3390/jof4030079>
- Muegge, I., Heald, S. L., & Brittelli, D. (2001). Simple selection criteria for drug-like chemical matter. *Journal of Medicinal Chemistry*, 44(12), 1841–1846. <https://doi.org/10.1021/jm015507e>
- Na Pombejra, S., Jamklang, M., Uhrig, J. P., Vu, K., & Gelli, A. (2018). The structure-function analysis of the Mpml metalloprotease determinants of activity during migration of fungal cells across the blood-brain barrier. *PLOS ONE*, 13(8), e0203020. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0203020>
- Nascimento, M. A., Santos, E. C. M., Carvalho, V. M., Borges, M. S., Ederli, J. P. B., Albuquerque, C. A. N., Silva, S. F. S., Ederli, R. B., Soto, B. A. S., Filho, A. M. P., & Moris, D. V. (2020). Perfil de pacientes com criptococose em hospital regional do interior de São Paulo. *Research, Society and Development*. <https://doi.org/10.33448/rsd-v9i9.7642>
- Nascimento, E., Barião, P. H. G., Kress, M. R. von Z., Vilar, F. C., Santana, R. de C., Gaspar, G. G., & Martinez, R. (2021). Cryptococcosis by *Cryptococcus neoformans/Cryptococcus gattii* Species Complexes in non-HIV-Infected Patients in Southeastern Brazil. *Revista Da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 54. <https://doi.org/10.1590/0037-8682-0169-2021>
- Naslund, P. K., Miller, W. C., & Granger, D. L. (1995). *Cryptococcus neoformans* fails to induce nitric oxide synthase in primed murine macrophage-like cells. *Infection and Immunity*, 63(4), 1298–1304. <https://doi.org/10.1128/iai.63.4.1298-1304.1995>
- Nelson, D. L., & Cox, M. M. (2017). Lehninger principles of biochemistry (7th ed.). *W. H. Freeman and Company*.
- Nielson, J., Jezewski, A., Wellington, M., & Davis, J. M. (2023). Survival in macrophages induces an enhanced virulence in *Cryptococcus*. *BioRxiv (Cold Spring Harbor Laboratory)*. <https://doi.org/10.1101/2023.09.03.556094>
- Ngamskulrungroj, P., Gilgado, F., Faganello, J., Litvintseva, A. P., Leal, A. L., Tsui, K. M., Mitchell, T. G., Vainstein, M. H., & Meyer, W. (2009). genetic diversity of the *Cryptococcus* species complex suggests that *Cryptococcus gattii* deserves to have varieties. *PLOS ONE*, 4(6), e5862. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0005862>
- Nguyen, S., Truong, J. Q., & Bruning, J. B. (2021). Targeting Unconventional Pathways in Pursuit of Novel Antifungals. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 7. <https://doi.org/10.3389/fmoleb.2020.621366>
- Nxumalo, K. A., Adeyemi, J. O., Leta, T. B., Pfukwa, T. M., Okafor, S. N., & Fawole, O. A. (2024). Antifungal properties and molecular docking of ZnO NPs mediated using medicinal plant extracts. *Scientific Reports*, 14(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-024-68979-3>
- Oh, L., Yi, S., Zhang, D., Hyeon Shin, S., & Bashaw, E. (2020). *In vitro* skin permeation methodology for over-the-counter topical dermatologic products. *Therapeutic Innovation & Regulatory Science*, 54(3), 693–700. <https://doi.org/10.1007/s43441-019-00104-3>
- O'Meara, T. R., & Alspaugh, J. A. (2012). The *Cryptococcus neoformans* capsule: a sword and a shield. *Clinical Microbiology Reviews*, 25(3), 387–408. <https://doi.org/10.1128/CMR.00001-12>
- Okagaki, L. H., & Nielsen, K. (2012). Titan cells confer protection from phagocytosis in *Cryptococcus neoformans* infections. *Eukaryotic Cell*, 11(6), 820–826. <https://doi.org/10.1128/EC.00121-12>
- Oliveira, S. S. C., Santos, V. S., Devereux, M., McCann, M., Santos, A. L. S., & Branquinha, M. H. (2023). the anti-*Leishmania amazonensis* and anti-*Leishmania chagasi* action of copper (II) and silver (I) 1,10-phenanthroline-5,6-dione coordination compounds. *Pathogens*, 12(1), 70. <https://doi.org/10.3390/pathogens12010070>
- Oliveira, L. R., Trein, M. R., Assis, L. R., Rigo, G. V., Simões, L. P. M., Batista, V. S., Macedo, A. J., Trentin, D. S., Nascimento-Júnior, N. M., Tasca, T., & Regasini, L. O. (2023B). Phenolic chalcones as agents against *Trichomonas vaginalis*. *Bioorganic Chemistry*, 141, 106888–106888. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2023.106888>
- Olszewski, M. A., Noverr, M. C., Chen, G.-H., Toews, G. B., Cox, G. M., Perfect, J. R., & Huffnagle, G. B. (2004). Urease expression by *Cryptococcus neoformans* promotes microvascular sequestration, thereby enhancing central nervous system invasion. *The American Journal of Pathology*, 164(5), 1761–1771. [https://doi.org/10.1016/s0002-9440\(10\)63734-0](https://doi.org/10.1016/s0002-9440(10)63734-0)

- Omer, P. K., Aziz, N. M., & Omer, R. A. (2024). Comprehensive review of metal-based coordination compounds in cancer therapy: from design to biochemical reactivity. *Reviews in Inorganic Chemistry*, 0(0). <https://doi.org/10.1515/revic-2024-0030>
- Onyishi, C. U., & May, R. C. (2021). Human immune polymorphisms associated with the risk of cryptococcal disease. *Immunology*, 165(2), 143–157. <https://doi.org/10.1111/imm.13425>
- Panchariya, L., Khan, W. A., Kuila, S., Sonkar, K., Sahoo, S., Ghoshal, A., Kumar, A., Verma, D., Hasan, A., Das, S., Thakur, J., Halder, R., Sunil, S., & Arockiasamy, A. (2021). Zinc²⁺ ion inhibits SARS-CoV-2 main protease and viral replication *in vitro*. *BioRxiv (Cold Spring Harbor Laboratory)*. <https://doi.org/10.1101/2021.06.15.448551>
- Papon, N., & Goldman, G. H. (2021). Unraveling Caspofungin resistance in *Cryptococcus neoformans*. *MBio*, 12(2). <https://doi.org/10.1128/mbio.00156-21>
- Pasquet, J., Chevalier, Y., Pelletier, J., Couval, E., Bouvier, D., & Bolzinger, M.-A. (2014). The contribution of zinc ions to the antimicrobial activity of zinc oxide. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 457, 263–274. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2014.05.057>
- Patiño-Márquez, I. A., Patiño-González, E., Hernández-Villa, L., Ortíz-Reyes, B., & Manrique-Moreno, M. (2018). Identification and evaluation of *Galleria mellonella* peptides with antileishmanial activity. *Analytical Biochemistry*, 546, 35–42. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2018.01.029>
- Peng, Y., Cheng, Z., & Xie, F. (2021). Evaluation of pharmacokinetic drug–drug interactions: A review of the mechanisms, *in vitro* and *in silico* approaches. *Metabolites*, 11(2), 75. <https://doi.org/10.3390/metabo11020075>
- Perazzoni, A. R. G., Guimarães, G., & Silva, R. A. (2024). Criptocose como problema de saúde pública no Distrito Federal. *Programa de Iniciação Científica - PIC/UniCEUB*. <https://doi.org/10.5102/pic.n0.2022.9557>
- Perfect, J. R., & Cox, G. M. (1999). Drug resistance in *Cryptococcus neoformans*. *Drug Resistance Updates*, 2(4), 259–269. <https://doi.org/10.1054/drup.1999.0090>
- Petraitis, V., Petraitiene, R., Valdez, J. M., Pyrgos, V., Lizak, M. J., Klaunberg, B. A., Kalasauskas, D., Basevicius, A., Bacher, J. D., Benjamin, D. K., Hope, W. W., & Walsh, T. J. (2019). Amphotericin B penetrates into the central nervous system through focal disruption of the blood-brain barrier in experimental hematogenous *Candida* meningoencephalitis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 63(12), e01626-19. <https://doi.org/10.1128/AAC.01626-19>
- Pinheiro, P. A., Pereira, G. F. M., Cunha, L. O., Leal, J. P. S. C., Alvarenga, M. E., Martins, F. T., Silva, H., Milani, J. L. S., & Tasso, T. T. (2024). Modulating the phototoxicity and selectivity of a porphyrazine towards epidermal tumor cells by coordination with metal ions. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 23(9), 1757–1769. <https://doi.org/10.1007/s43630-024-00629-z>
- Plewes, K., Khonputsa, P., Day, N. P. J., & Lubell, Y. (2023). Cost, health impacts and cost effectiveness of iceless refrigeration in India's last-mile vaccine cold chain delivery. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 117(4), 310–312. <https://doi.org/10.1093/trstmh/trac115>
- Plum, L. M., Rink, L., & Haase, H. (2010). The essential toxin: impact of zinc on human health. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 7(4), 1342–1365. <https://doi.org/10.3390/ijerph7041342>
- Poder, T. G., Nonkani, W. G., & Tsakeu Leponkou, É. (2015). Blood Warming and Hemolysis: A Systematic Review With Meta-Analysis. *Transfusion Medicine Reviews*, 29(3), 172–180. <https://doi.org/10.1016/j.tmrv.2015.03.002>
- Potts, R. O., & Guy, R. H. (1992). Predicting skin permeability. *Pharmaceutical Research: An Official Journal of the American Association of Pharmaceutical Scientists*, 9(5), 663–669.
- Prakoso, D., Zhu, X., & Rajeev, S. (2022). *Galleria mellonella* infection model to evaluate pathogenic and nonpathogenic *Leptospira* strains. *Veterinary Microbiology*, 264, 109295. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2021.109295>
- Qiu, Y., Davis, M. J., Dayrit, J. K., Hadd, Z., Meister, D. L., Osterholzer, J. J., Williamson, P. R., & Olszewski, M. A. (2012). Immune modulation mediated by cryptococcal laccase promotes pulmonary growth and brain dissemination of virulent *Cryptococcus neoformans* in mice. *PLOS ONE*, 7(10), e47853. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0047853>

- Qureshi, Z. A., Ghazanfar, H., Altaf, F., Ghazanfar, A., Hasan, K. Z., Kandhi, S., Fortuzi, K., Dileep, A., & Shrivastava, S. (2024). Cryptococcosis and cryptococcal meningitis: a narrative review and the up-to-date management approach. *Cureus*. <https://doi.org/10.7759/cureus.55498>
- Rajasingham, R., Smith, R. M., Park, B. J., Jarvis, J. N., Govender, N. P., Chiller, T. M., Denning, D. W., Loyse, A., & Boulware, D. R. (2017). Global burden of disease of HIV-associated cryptococcal meningitis: an updated analysis. *The Lancet Infectious Diseases*, 17(8), 873–881. [https://doi.org/10.1016/s1473-3099\(17\)30243-8](https://doi.org/10.1016/s1473-3099(17)30243-8)
- Rajasingham, R., Wake, R. M., Beyene, T., Katende, A., Letang, E., & Boulware, D. R. (2018). Cryptococcal meningitis diagnostics and screening in the era of point-of-care laboratory testing. *Journal of Clinical Microbiology*, 57(1). <https://doi.org/10.1128/jcm.01238-18>
- Rajasingham, R., Govender, N. P., Jordan, A., Loyse, A., Shroufi, A., Denning, D. W., Meya, D. B., Chiller, T. M., & Boulware, D. R. (2022). The global burden of HIV-associated cryptococcal infection in adults in 2020: a modelling analysis. *The Lancet Infectious Diseases*, 22(12). [https://doi.org/10.1016/s1473-3099\(22\)00499-6](https://doi.org/10.1016/s1473-3099(22)00499-6)
- Rathore, S. S., Raman, T., Lalitha, C., Ramar, M., Munusamy, A., & Ramakrishnan, J. (2020). Anti-Cryptococcal activity of a furanone derivative—antibiofilm and opsonophagocytic potential. *Journal de Mycologie Médicale*, 30(2), 100924. <https://doi.org/10.1016/j.mycmed.2020.100924>
- Rathore, S. S., Sathyamoorthy, J., Lalitha, C., & Ramakrishnan, J. (2022). A holistic review on *Cryptococcus neoformans*. *Microbial Pathogenesis*, 166, 105521. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2022.105521>
- Reales-Calderón, J. A., Molero, G., Gil, C., & Martínez, J. L. (2016). The fungal resistome: a risk and an opportunity for the development of novel antifungal therapies. *Future Medicinal Chemistry*, 8(12), 1503–1520. <https://doi.org/10.4155/fmc-2016-0051>
- Reddy, A., Sangenito, L. S., Guedes, A. de A., Branquinha, M. H., Kavanagh, K., McGinley, J., Santos, A. L. S., & Velasco-Torrijos, T. (2017). Glycosylated metal chelators as anti-parasitic agents with tunable selectivity. *Dalton Transactions* (Cambridge, England: 2003), 46(16), 5297–5307. <https://doi.org/10.1039/c6dt04615k>
- Reis, F. C. G., Borges, B. S., Jozefowicz, L. J., Sena, B. A. G., Garcia, A. W. A., Medeiros, L. C., Martins, S. T., Honorato, L., Schrank, A., Vainstein, M. H., Kmetzsch, L., Nimrichter, L., Alves, L. R., Staats, C. C., & Rodrigues, M. L. (2019). A novel protocol for the isolation of fungal extracellular vesicles reveals the participation of a putative scramblase in polysaccharide export and capsule construction in *Cryptococcus gattii*. *mSphere*, 4(2), e00080-19. <https://doi.org/10.1128/mSphere.00080-19>
- Reis, N. F., Jesus, M. C. S., Souza, L. C. S. V., Alcântara, L. M., Rodrigues, J. A. C., Brito, S. C. P., Penna, P. de A., Vieira, C. S., Silva, J. R. S., Penna, B. A., Machado, R. L. D., Mora-Montes, H. M., & Baptista, A. R. S. (2023). *Sporothrix brasiliensis* infection modulates antimicrobial peptides and stress management gene expression in the invertebrate biomodel *Galleria mellonella*. *Journal of Fungi*, 9(11), 1053. <https://doi.org/10.3390/jof9111053>
- Rickerts, V. (2019). Klimawandel und epidemiologie systemischer Pilzinfektionen. *Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforschung - Gesundheitsschutz*, 62(5), 646–651. <https://doi.org/10.1007/s00103-019-02931-z>
- Rivera, J., Mukherjee, J., Weiss, L. M., & Casadevall, A. (2002). Antibody Efficacy in Murine Pulmonary *Cryptococcus neoformans* Infection: A Role for Nitric Oxide. *The Journal of Immunology*, 168(7), 3419–3427. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.168.7.3419>
- Robertson, E. J., & Casadevall, A. (2009). Antibody-Mediated immobilization of *Cryptococcus neoformans* promotes biofilm formation. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(8), 2528–2533. <https://doi.org/10.1128/aem.02846-08>
- Ronconi, L., & Sadler, P. J. (2007). Using coordination chemistry to design new medicines. *Coordination Chemistry Reviews*, 251(13-14), 1633–1648. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2006.11.017>
- Ruela, A. L. M., Perissinato, A. G., Lino, M. E. S., Mudrik, P. S., & Pereira, G. R. (2022). Evaluation of skin absorption of drugs from topical and transdermal formulations. *Figshare*. <https://doi.org/10.6084/m9.figshare.20039048>
- Sabiiti, W., Robertson, E., Beale, M. A., Johnston, S. A., Brouwer, A. E., Loyse, A., Jarvis, J. N., Gilbert, A. S., Fisher, M. C., Harrison, T. S., May, R. C., & Bicanic, T. (2014). Efficient phagocytosis and laccase activity affect the outcome of HIV-associated cryptococcosis. *Journal of Clinical Investigation*, 124(5), 2000–2008. <https://doi.org/10.1172/jci72950>
- Sabyasachi Maiti. (2017). Nanometric biopolymer devices for oral delivery of macromolecules with clinical significance. *Elsevier EBooks*, 109–138. <https://doi.org/10.1016/b978-0-323-52725-5.00006-x>

- Salih, A. A., Obaid, H. M., & Jasim, W. M. (2022). An *in vitro* study of zinc effect on *Trichomonas vaginalis* isolated from infected women. *NTU Journal of Pure Sciences*, 1(4), 44–53. <https://doi.org/10.56286/ntujps.v1i4.356>
- Santiago-Burgos, E. J., Stuckey, P. V., & Santiago-Tirado, F. H. (2022). Real-time visualization of phagosomal pH manipulation by *Cryptococcus neoformans* in an immune signal-dependent way. *BioRxiv (Cold Spring Harbor Laboratory)*. <https://doi.org/10.1101/2022.09.08.507177>
- Saple, D. G., Save, S., Kumar, D., & Sood, S. (2022). An open label, single arm, pilot study to evaluate the safety, tolerability, and efficacy of daily fluconazole 150 mg in subjects suffering from *Tinea cruris* and *Tinea corporis*. *F1000Research*, 11, 1446. <https://doi.org/10.12688/f1000research.127138.1>
- Sato, K., & Kawakami, K. (2022). PAMPs and host immune response in cryptococcal infection. *Medical Mycology Journal*, 63(4), 133–138. <https://doi.org/10.3314/mmj.22.005>
- Sauters, T. J., Roth, C., Murray, D., Sun, S., Averette, A. F., Onyishi, C. U., May, R. C., Heitman, J., & Magwene, P. M. (2023). Amoeba predation of *Cryptococcus*: A quantitative and population genomic evaluation of the accidental pathogen hypothesis. *PLOS Pathogens*, 19(11), e1011763–e1011763. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1011763>
- Serrano, I., Verdial, C., Tavares, L., & Oliveira, M. (2023). The virtuous *Galleria mellonella* model for scientific experimentation. *Antibiotics*, 12(3), 505. <https://doi.org/10.3390/antibiotics12030505>
- Siagian, F. E. (2021). Interaction between phagocytic cells with antiphagocytic properties of *Cryptococcus neoformans*: When love and hate collide. *International Blood Research & Reviews*, 41–51. <https://doi.org/10.9734/ibrr/2021/v12i130144>
- Silva, L. B., Bock, D., Klafke, G. B., Sanchotene, K. O., Basso, R. P., Benelli, J. L., Poester, V. R., Silva, F. A., Trilles, L., Severo, C. B., Stevens, D. A., & Xavier, M. O. (2020). Cryptococcosis in HIV-AIDS patients from Southern Brazil: Still a major problem. *Journal de Mycologie Médicale*, 30(4), 101044. <https://doi.org/10.1016/j.mycmed.2020.101044>
- Sharma, A. B., & Sidhu, A. (2019). Antifungal potential of zinc ion coated copper sulfide nanoforms against *Fusarium verticillioides*. *Indian Phytopathology*, 72(3), 489–496. <https://doi.org/10.1007/s42360-019-00155-4>
- Sheehan, G., Garvey, A., Croke, M., & Kavanagh, K. (2018). Innate humoral immune defenses in mammals and insects: The same, with differences? *Virulence*, 9(1), 1625–1639. <https://doi.org/10.1080/21505594.2018.1526531>
- Sheehan, G., Margalit, A., Sheehan, D., & Kavanagh, K. (2021). Proteomic profiling of bacterial and fungal induced immune priming in *Galleria mellonella* larvae. *Journal of Insect Physiology*, 131, 104213. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2021.104213>
- Shi, M., Li, S. S., Zheng, C., Jones, G. J., Kim, K. S., Zhou, H., Kubes, P., & Mody, C. H. (2010). Real-time imaging of trapping and urease-dependent transmigration of *Cryptococcus neoformans* in mouse brain. *Journal of Clinical Investigation*, 120(5), 1683–1693. <https://doi.org/10.1172/jci41963>
- Shi, M., Calaruso, P., & Mody, C. H. (2012). Real-time *in vivo* imaging of fungal migration to the central nervous system. *Cellular Microbiology*, 14(12), 1819–1827. <https://doi.org/10.1111/cmi.12027>
- Shotaro Michinaga, & Koyama, Y. (2022). Angiopoietin-1/Tie-2 signaling in traumatic brain injury. *Elsevier EBooks*, 219–230. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-823036-7.00031-1>
- Singh Chauhan, A., Kumar, A., & N, T. (2023). Metal ion containing anti-bacterial gel: An overview. *International Journal of Indigenous Herbs and Drugs*, 1–5. <https://doi.org/10.46956/ijihd.v8i3.449>
- Singhal, L., Singh, C., & Gautam, V. (2022). Colistin. *Comprehensive Pharmacology*, 123–135. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-820472-6.00199-7>
- Sinkó, B., Bárdos, V., Vesztergombi, D., Kádár, S., Malcsiner, P., Moustie, A., Jouy, C., Takács-Novák, K., & Grégoire, S. (2021). Use of an *in vitro* skin parallel artificial membrane assay (Skin-PAMPA) as a screening tool to compare transdermal permeability of model compound 4-Phenylethyl-Resorcinol dissolved in different solvents. *Pharmaceutics*, 13(11), 1758–1758. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13111758>
- Smissman, E. E., Beck, S. D., & Boots, M. R. (1961). Growth inhibition of insects and a fungus by indole-3-acetonitrile. *Science*, 133(3451), 462–462. <https://doi.org/10.1126/science.133.3451.462>
- Smith, L. M., Dixon, E. F., & May, R. C. (2014). The fungal pathogen *Cryptococcus neoformans* manipulates macrophage phagosome maturation. *Cellular Microbiology*, 17(5), 702–713. <https://doi.org/10.1111/cmi.12394>

- Song, M.-H., Lee, J.-W., Kim, M. S., Yoon, J.-K., White, T. C., Floyd, A., Heitman, J., Strain, A. K., Nielsen, J. N., Nielsen, K., & Bahn, Y.-S. (2012). A flucytosine-responsive Mbp1/Swi4-like protein, Mbs1, plays pleiotropic roles in antifungal drug resistance, stress response, and virulence of *Cryptococcus neoformans*. *Eukaryotic Cell*, 11(1), 53–67. <https://doi.org/10.1128/ec.05236-11>
- Spadari, C. de C., Wirth, F., Lopes, L. B., & Ishida, K. (2020). New approaches for cryptococcosis treatment. *Microorganisms*, 8(4). <https://doi.org/10.3390/microorganisms8040613>
- Srichatrapimuk, S., & Sungkanuparph, S. (2016). Integrated therapy for HIV and cryptococcosis. *AIDS Research and Therapy*, 13(1). <https://doi.org/10.1186/s12981-016-0126-7>
- Stamm, A. M., Diasio, R. B., Dismukes, W. E., Shadomy, S., Cloud, G. A., Bowles, C. A., Karam, G. H., & Espinel-Ingraff, A. (1987). Toxicity of amphotericin B plus flucytosine in 194 patients with cryptococcal meningitis. *The American Journal of Medicine*, 83(2), 236–242. [https://doi.org/10.1016/0002-9343\(87\)90691-7](https://doi.org/10.1016/0002-9343(87)90691-7)
- Stempinski, P., Smith, D., & Casadevall, A. (2022). *Cryptococcus neoformans* virulence assay using a *Galleria mellonella* larvae model system. *BIO-PROTOCOL*, 12(15). <https://doi.org/10.21769/bioprotoc.4480>
- Steenbergen, J. N., Shuman, H. A., & Casadevall, A. (2001). *Cryptococcus neoformans* interactions with *amoebae* suggest an explanation for its virulence and intracellular pathogenic strategy in macrophages. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(26), 15245–15250. <https://doi.org/10.1073/pnas.261418798>
- Stie, J., & Fox, D. (2012). Induction of brain microvascular endothelial cell Urokinase expression by *Cryptococcus neoformans* facilitates blood-brain barrier invasion. *PLoS ONE*, 7(11), e49402. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0049402>
- Subramanian, N., Schumann-Gillett, A., Mark, A. E., & O'Mara, M. L. (2018). Probing the pharmacological binding sites of p-glycoprotein using umbrella sampling simulations. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 59(5), 2287–2298. <https://doi.org/10.1021/acs.jcim.8b00624>
- Szarszoń, K., Mikołajczyk, A., Grelich-Mucha, M., Wieczorek, R., Matera-Witkiewicz, A., Olesiak-Bańska, J., Rowińska-Żyrek, M., & Wątły, J. (2024). Bioinorganic chemistry of sheperdin II complexes helps to fight *Candida albicans*? *Journal of Inorganic Biochemistry*, 253, 112476. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2023.112476>
- Takemoto, K., Yamamoto, Y., & Ueda, Y. (2006). Influence of the progression of cryptococcal meningitis on brain penetration and efficacy of ambisome in a murine model. *Chemotherapy*, 52(6), 271–278. <https://doi.org/10.1159/000095820>
- Thomaz, L., García-Rodas, R., Guimarães, A. J., Taborda, C. P., Zaragoza, O., & Nosanchuk, J. D. (2013). *Galleria mellonella* as a model host to study *Paracoccidioides lutzii* and *Histoplasma capsulatum*. *Virulence*, 4(2), 139–146. <https://doi.org/10.4161/viru.23047>
- Tramer, F., Da Ros, T., & Passamonti, S. (2012). Screening of fullerene toxicity by hemolysis assay. In *Nanotoxicity: Methods and Protocols* (Vol. 926, pp. 203–217). Humana Totowa. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-002-1_15
- Trudu, F., Amato, F., Vaňhara, P., Pivetta, T., Peña-Méndez, E. M., & Havel, J. (2015). Coordination compounds in cancer: Past, present and perspectives. *Journal of Applied Biomedicine*, 13(2), 79–103. <https://doi.org/10.1016/j.jab.2015.03.003>
- Tsai, C. J.-Y., Loh, J. M. S., & Proft, T. (2016). *Galleria mellonella* infection models for the study of bacterial diseases and for antimicrobial drug testing. *Virulence*, 7(3), 214–229. <https://doi.org/10.1080/21505594.2015.1135289>
- Tseng, H.-K., Huang, T.-Y., Wu, A. Y.-J., Chen, H.-H., Liu, C.-P., & Jong, A. (2015). How *Cryptococcus* interacts with the blood–brain barrier. *Future Microbiology*, 10(10), 1669–1682. <https://doi.org/10.2217/fmb.15.83>
- Uejio, C. K., Mak, S., Manangan, A., Luber, G., & Bartlett, K. H. (2015). Climatic influences on *Cryptococcus gattii* populations, Vancouver island, Canada, 2002–2004. *Emerging Infectious Diseases*, 21(11), 1989–1996. <https://doi.org/10.3201/eid2111.141161>
- Ugwu, D. I., & Conradie, J. (2023). Anticancer properties of complexes derived from bidentate ligands. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 246, 112268–112268. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2023.112268>
- Universidade Federal do Espírito Santo. (2013). Princípio dos 3 R's | Comissão de Ética no Uso de Animais. Ceua.ufes.br. <https://ceua.ufes.br/principio-dos-3-rs>

- Upadhyay, P. K., Jain, V. K., Sharma, K., & Sharma, R. (2020). Synthesis and applications of ZnO nanoparticles in biomedicine. *Research Journal of Pharmacy and Technology*, 13(4), 1636. <https://doi.org/10.5958/0974-360x.2020.00297.8>
- Vargas Rigo, G., Petró-Silveira, B., Devereux, M., McCann, M., Santos, A. L. S., & Tasca, T. (2018). Anti-*Trichomonas vaginalis* activity of 1,10-phenanthroline-5,6-dione-based metallodrugs and synergistic effect with metronidazole. *Parasitology*, 146(9), 1179–1183. <https://doi.org/10.1017/s003118201800152x>
- Vanhoffelen, E., Michiels, L., Brock, M., Lagrou, K., Reséndiz-Sharpe, A., & Velde, G. V. (2023). Powerful and real-time quantification of antifungal efficacy against triazole-resistant and susceptible *Aspergillus fumigatus* infections in *Galleria mellonella* by longitudinal bioluminescence imaging. *Microbiology Spectrum*, 11(4). <https://doi.org/10.1128/spectrum.00825-23>
- Vanhoffelen, E., Vermoesen, L., Michiels, L., Lagrou, K., Reséndiz-Sharpe, A., & Velde, G. V. (2024). Sensitive bioluminescence imaging of cryptococcosis in *Galleria mellonella* improves antifungal screening under *in vivo* conditions. *Virulence*. <https://doi.org/10.1080/21505594.2024.2327883>
- Vanhove, M., Beale, M. A., Rhodes, J., Chanda, D., Lakhi, S., Kwenda, G., Molloy, S., Karunaharan, N., Stone, N., Harrison, T. S., Bicanic, T., & Fisher, M. C. (2017). Genomic epidemiology of *Cryptococcus* yeasts identifies adaptation to environmental niches underpinning infection across an African HIV/AIDS cohort. *Molecular Ecology*, 26(7), 1991–2005. <https://doi.org/10.1111/mec.13891>
- Vargas Rigo, G., Petro-Silveira, B., Devereux, M., McCann, M., Souza Dos Santos, A. L., & Tasca, T. (2019). Anti-*Trichomonas vaginalis* activity of 1,10-phenanthroline-5,6-dione-based metallodrugs and synergistic effect with metronidazole. *Parasitology*, 146(9), 1179–1183. <https://doi.org/10.1017/S003118201800152X>
- Vargas Rigo, G., Biz Willig, J., Devereux, M., McCann, M., Souza, L., & Tasca, T. (2023). Oxidative damage by 1,10-phenanthroline-5,6-dione and its silver and copper complexes lead to apoptotic-like death in *Trichomonas vaginalis*. *Research in Microbiology*, 174(4), 104015–104015. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2022.104015>
- Veber, D. F., Johnson, S. R., Cheng, H. Y., Smith, B. R., Ward, K. W., & Kopple, K. D. (2002). Molecular properties that influence the oral bioavailability of drug candidates. *Journal of Medicinal Chemistry*, 45(12), 2615–2623. <https://doi.org/10.1021/jm020017n>
- Vianez Peregrino, I., Ferreira Ventura, R., Borghi, M., Pinto Schuenck, R., Devereux, M., McCann, M., Souza dos Santos, A. L., & Ferreira Nunes, A. P. (2021). Antibacterial activity and carbapenem re-sensitizing ability of 1,10-phenanthroline-5,6-dione and its metal complexes against KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* clinical strains. *Letters in Applied Microbiology*, 73(2), 139–148. <https://doi.org/10.1111/lam.13485>
- Vitasovic, T., Caniglia, G., Eightesadi, N., Ceccato, M., BojesenE. D., Gosewinkel, U., Neusser, G., Rupp, U., Walther, P., Kranz, C., & Ferapontova, E. E. (2024). Antibacterial action of Zn²⁺ ions driven by the *in vivo* formed ZnO nanoparticles. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 16(24), 30847–30859. <https://doi.org/10.1021/acsami.4c04682>
- Vu, K., Tham, R., Uhrig, J. P., Thompson, G. R., Na Pombejra, S., Jamklang, M., Bautos, J. M., & Gelli, A. (2014 A). Invasion of the central nervous system by *Cryptococcus neoformans* requires a secreted fungal metalloprotease. *MBio*, 5(3). <https://doi.org/10.1128/mbio.01101-14>
- Vu, K., Tham, R., Uhrig, J. P., Thompson, G. R., Na Pombejra, S., Jamklang, M., Bautos, J. M., & Gelli, A. (2014 B). Invasion of the central nervous system by *Cryptococcus neoformans* requires a secreted fungal metalloprotease. *MBio*, 5(3). <https://doi.org/10.1128/mbio.01101-14>
- Xiao, G., Miyazato, A., Inden, K., Nakamura, K., Kohei Shiratori, Nakagawa, K., Miyazawa, T., Suzuki, K., Kaku, M., & Kawakami, K. (2008). *Cryptococcus neoformans* inhibits nitric oxide synthesis caused by CpG-oligodeoxynucleotide-stimulated macrophages in a fashion independent of capsular polysaccharides. *Microbiology and Immunology*, 52(3), 171–179. <https://doi.org/10.1111/j.1348-0421.2008.00019.x>
- Xie, J., Zeng, J., & Zheng, S. (2023). The efficacy and safety of fluconazole in preventing invasive fungal infection in very low birth weight infants: A systematic review and meta-analysis. *The Italian Journal of Pediatrics/Italian Journal of Pediatrics*, 49(1). <https://doi.org/10.1186/s13052-023-01460-5>
- Xu, J., Eastman, A. J., Flaczyk, A., Neal, L. M., Zhao, G., Carolan, J., Malachowski, A. N., Stolberg, V. R., Yosri, M., Chensue, S. W., Curtis, J. L., Osterholzer, J. J., & Olszewski, M. A. (2016). Disruption of early tumor necrosis factor alpha signaling prevents classical activation of dendritic cells in lung-associated lymph nodes and development of protective immunity against cryptococcal infection. *MBio*, 7(4). <https://doi.org/10.1128/mbio.00510-16>

- Wang, Y., Pawar, S., Dutta, O., Wang, K., Rivera, A., & Xue, C. (2022). Macrophage mediated immunomodulation during *Cryptococcus* pulmonary infection. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.859049>
- Wang, S., Yin, Y., Zai, X., Gu, Y., Guo, F., Shao, F., Zhang, Y., Li, Y., Li, R., Zhang, J., Xu, J., & Chen, W. (2023). A novel *Galleria mellonella* experimental model for zoonotic pathogen *Brucella*. *Virulence*, 14(1). <https://doi.org/10.1080/21505594.2023.2268496>
- Wang, K., Espinosa, V., Wang, Y., Lemenze, A., Kumamoto, Y., Xue, C., & Rivera, A. (2024). Innate cells and STAT1-dependent signals orchestrate vaccine-induced protection against invasive *Cryptococcus* infection. *MBio*. <https://doi.org/10.1128/mbio.01944-24>
- Wiesmann, N., Tremel, W., & Brieger, J. (2020). Zinc oxide nanoparticles for therapeutic purposes in cancer medicine. *Journal of Materials Chemistry B*, 8(23), 4973–4989. <https://doi.org/10.1039/D0TB00739K>
- WHO. (2022A) Fungal priority pathogens list to guide research, development and public health action. Geneva: World Health Organization; 2022. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.
- WHO. (2022B). Guidelines for Diagnosing, Preventing and Managing Cryptococcal Disease Among Adults, Adolescents and Children Living with HIV.
- Yang, C., Huang, Y., Zhou, Y., Zang, X., Deng, H., Liu, Y., Shen, D., & Xue, X. (2022). *Cryptococcus* escapes host immunity: What do we know?. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.1041036>
- Ying, S., Hao, R., Gao, W., Gao, L., & Yang, J. (2024). Dietary zinc supplements: Beneficial health effects and application in food, medicine and animals. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. <https://doi.org/10.1002/jsfa.13325>
- Yassin, M. T., Al-Otibi, F. O., Maniah, K., Mohamed, S., Hasan, K. A., Negi, A., & AbdelGawwad, M. R. (2024). Synergistic antifungal efficiency of eco-friendly synthesized zinc oxide nanoparticles in combination with fluconazole against drug-resistant Candidal strains. *Polish Journal of Environmental Studies*. <https://doi.org/10.15244/pjoes/188144>
- Yoo, K., Bhattacharya, S., Kronbauer Oliveira, N., Pereira, N., Soares Matos, G., Del Poeta, M., & Fries, B. C. (2024). With age comes resilience: how mitochondrial modulation drives age-associated fluconazole tolerance in *Cryptococcus neoformans*. *MBio*. <https://doi.org/10.1128/mbio.01847-24>
- Zanger, U. M., & Schwab, M. (2013). Cytochrome P450 enzymes in drug metabolism: Regulation of gene expression, enzyme activities, and impact of genetic variation. *Pharmacology & Therapeutics*, 138(1), 103–141. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2012.12.007>
- Zavala, S., & Baddley, J. W. (2020). Cryptococcosis. *Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine*, 41(01), 069–079. <https://doi.org/10.1055/s-0039-3400280>
- Zhao, Y., Lin, J., Fan, Y., & Lin, X. (2019). Life cycle of *Cryptococcus neoformans*. *Annual Review of Microbiology*, 73(1), 17–42. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-020518-120210>
- Zhao, M., Ma, J., Li, M., Zhang, Y., Jiang, B., Zhao, X., Huai, C., Shen, L., Zhang, N., He, L., & Qin, S. (2021). Cytochrome P450 enzymes and drug metabolism in humans. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(23), 12808. <https://doi.org/10.3390/ijms222312808>
- Zhao, Y., Ye, L., Zhao, F., Zhang, L., Lu, Z., Chu, T., Wang, S., Liu, Z., Sun, Y., Chen, M., Liao, G., Ding, C., Xu, Y., Liao, W., & Wang, L. (2023). *Cryptococcus neoformans*, a global threat to human health. *Infectious Diseases of Poverty*, 12(1). <https://doi.org/10.1186/s40249-023-01073-4>
- Zono, B. B., Kasumba, D. M., Situakibanza Nani-Tuma, H., Bepouka Izizag, B., Yambayamba Kapenga, M., Nsuka Yanga, R., Tshimanga Yona, T., Kamangu Ntambwe, E., Hayette, M., & Mvumbi Lelo, G. (2022). Cryptococcosis in the democratic republic of congo from 1953 to 2021: A systematic review and meta-analysis. *Mycoses*, 65(6), 580–589. <https://doi.org/10.1111/myc.13440>

9. PRODUÇÃO E PARTICIPAÇÃO CIENTÍFICA

- 1 apresentação em congresso como primeira autora

Corrêa, L. S., Giovanini, L., Casemiro, A. L., Branquinha, M. H., dos Santos, A. L. S., Fernandes, C. (2024) ATIVIDADE ANTI-*Cryptococcus* spp. DE COMPOSTOS DE COORDENAÇÃO À BASE DE ZINCO COMPLEXADO A 1,10-FENANTROLINA-5,6-DIONA (**MEDTROP 2024**)

- 4 apresentações em eventos acadêmicos

Larissa dos Santos Corrêa, Antônio Braga Lima, Marta Helena Branquinha de Sá, André Luis Souza dos Santos. (2022) IDENTIFICAÇÃO DE ESPÉCIES DO GÊNERO *CANDIDA* spp. ISOLADAS DO PEIXE *Colossoma macropomum* (TAMBAQUI) (**XXVIII Semana de Microbiologia e Imunologia**)

Larissa dos Santos Corrêa, Lucas Giovanini, Ana Lúcia Casemiro, Cristiane Fernandes, Luis Gabriel Wagner, Marta Helena Branquinha de Sá, André Luis Souza dos Santos. (2024) ATIVIDADE ANTI-*Cryptococcus* DE COMPOSTO DE COORDENAÇÃO À BASE DE ZINCO COMPLEXADO A 1,10-FENANTROLINA—5,6-DIONA (**XXX Semana de Microbiologia e Imunologia**)

Larissa dos Santos Corrêa; Lucas Giovanini; Ana Lúcia Casemiro; Malachy McCann; Michel Devereux; Marta Helena Branquinha de Sá; André Luis Souza dos Santos. (2024) COMPOSTOS DE COORDENAÇÃO CONTENDO 1,10-FENANTROLINA-5,6-DIONA COMPLEXADA COM PRATA E COBRE: POTENCIAIS AGENTES ANTIFÚNGICOS (CONTRA ISOLADOS CLÍNICOS DE *Cryptococcus neoformans* E *Cryptococcus gattii*) (**XLV Jornada Giulio Massarani de Iniciação Científica, Tecnológica, Artística e Cultural**)

Larissa dos Santos Corrêa, Lucas Giovanini, Ana Lúcia Casemiro, Cristiane Fernandes, Marta Helena Branquinha, André Luis Souza dos Santos. (2024) ATIVIDADE ANTI-*Cryptococcus* DE COMPOSTO DE COORDENAÇÃO À BASE DE ZINCO COMPLEXADO A 1,10-FENANTROLINA-5,6-DIONA (**13ª Semana de Integração Acadêmica da UFRJ**)

Larissa dos Santos Corrêa, Lucas Giovanini, Ana Lúcia Casemiro, Luiz Gabriel Wagner, Cristiane Fernandes, Marta Helena Branquinha, André Luis Souza dos Santos (2025) ATIVIDADE ANTI-*Cryptococcus* DE UM NOVO COMPOSTO DE COORDENAÇÃO À BASE DE ZINCO E FENDIONA (**14ª Semana de Integração Acadêmica da UFRJ**)

- 1 capítulo de livro publicado como coautora

BARBOSA, P. F., GIOVANINI, L., CASEMIRO, A. L., LORENTINO, C. M. A., LIMA, R.V., BRAGA, A. L., SIQUEIRA, N. L. M., FRAGATA, M. M., SCAFFO, J., CORREA, L. S., AFFONSO, L. R. F., SILVA, G. C., MIRANDA, C. F., SILVA, M. M., SOUZA, L. O. P., RAMOS, L. S., BRANQUINHA, M. H., SANTOS, A. L. S., MELLO, T. (2024). Fungal infection treatment: spotlight on drug repurposing as a new therapeutic strategy. *Nova Science Publishers*

- 1 artigo como coautora publicado

Giovanini, L., Casemiro, A. L., **Corrêa, L. S.**, Mendes, M., Mello, T. P., Souza, L. O. P., Wagner, L. G., Fernandes, C., Pereira, M. M., Souza, L. C. S. V., Baptista, A. R. S., Moraes, J., McCann, M., Branquinha, M. H., & Santos, A. L. S. (2025). Toxicity assessment and antifungal potential of copper(II) and silver(I) complexes with 1,10-phenanthroline-5,6-dione against drug-resistant clinical isolates of *Cryptococcus gattii* and *Cryptococcus neoformans*. *Journal of Fungi*, 11(6), 436. <https://doi.org/10.3390/jof11060436>