



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE ARARAQUARA
DEPARTAMENTO DE ANÁLISES CLÍNICAS



ANA CERREJÓN PALANCO

**“DESENVOLVIMENTO DE PROTÓTIPOS ANTIFÚNGICOS CONTRA
CRYPTOCOCCUS GATTII
UTILIZANDO MODELOS ALTERNATIVOS ANIMAIS”**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

ORIENTADORA: Profa. Dra. Ana Marisa Fusco Almeida

COORIENTADOR: Dr. Paulo César Gomes

Araraquara

2016

ANA CERREJÓN PALANCO

DESENVOLVIMENTO DE PROTÓTIPOS ANTIFÚNGICOS CONTRA
Cryptococcus gattii UTILIZANDO MODELOS ALTERNATIVOS ANIMAIS

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, como um dos pré-requisitos para a obtenção do grau de Mestre em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia.

ORIENTADORA: Profa. Dra. Ana Marisa Fusco
Almeida

CO-ORIENTADOR: Dr. Paulo César Gomes

Araraquara

2016

Ficha Catalográfica

Elaborada Por Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP – Campus de Araraquara

C417d Cerrejón Palanco, Ana
Desenvolvimento de protótipos antifúngicos contra *Cryptococcus gattii* utilizando modelos alternativos animais / Ana Cerrejón Palanco. – Araraquara, 2016.
108 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista. "Júlio de Mesquita Filho". Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Biociências e Biotecnologia Aplicada à Farmácia.

Orientadora: Ana Marisa Fusco Almeida.
Coorientador: Paulo César Gomes.

1. *Cryptococcus gattii*, 3'. 2. Chalcone, alternative models. 3. Chalcona, modelos alternativos. 4. Zebrafish. I. Almeida, Ana Marisa Fusco, orient. II. Gomes, Paulo César, coorient. III. Título.

CAPES: 40500005

ANA CERREJÓN PALANCO

DESENVOLVIMENTO DE PROTÓTIPOS ANTIFÚNGICOS CONTRA
Cryptococcus gattii UTILIZANDO MODELOS ALTERNATIVOS ANIMAIS

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, como um dos pré-requisitos para a obtenção do grau de Mestre em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia.

Araraquara, 16 de setembro de 2016.

BANCA EXAMINADORA



ANA MARISA FUSCO ALMEIDA



CLAUDIA VIANNA MAURER MORELLI



VALERIA VALENTE

Aos meus pais, Sebastián e Juana, e a minha querida irmã María.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha família por me permitir essa experiência na vida de fazer um mestrado, e mesmo na distância, não deixaram me sentir sozinha nem um só instante e confiarem sempre em mim, porque me deram força até quando eu não a tinha. Os amo.

À Profa. Dra. Ana Marisa Fusco Almeida, por me dar a oportunidade de começar meu desenvolvimento profissional num país tão maravilhoso, pela orientação e atenção recebida.

À Profa. Dra. Maria José Soares Mendes Giannini por me abrir também as portas do laboratório e ter sempre um sorriso e amabilidade para mostrar.

Ao Dr. Paulo César Gomes por ser amigo antes que co-orientador, pela orientação, tempo, conselhos, conversas e até brigas quando foram necessárias para meu crescimento no caminho da pesquisa.

A todo o laboratório de micologia, pela ajuda, conselhos e o carinho recebido sempre por parte de todos. Aos que continuam com nós e aos que estão presentes na distância, Suelén Rossi, Luana Rossi, Liliana Scorzoni, Haroldo Oliveira, Nayla Pitangui, Natália Sthrohmayr, Fernanda Gullo, Mariana Galeane, Caroline Marcos, Ana Carolina Silva, Patrícia Akemi, Rosana Conçolaro, Rodrigo Almeida, Mônica Yonashiro, Priscila Lacerda, Kaila Medina, Caroline Orlandi, Jaqueline Derissi, Junya de Lacorte, Wanessa Melo, Cláudia Tavares. Venham me visitar, sempre bem-vindos!

Em especial agradeço a Junya de Lacorte pela ajuda continua, conselhos, risadas, amizade e bancada compartilhada. A Carol Orlandi pela parceria, ensino e super paciência com o meu amado biofilme. A minha querida amiga Mariana Galeane, pela conexão amistosa desde o começo, por ser brother e por todos nossos momentos de risadas e carinhos.

Não posso deixar de agradecer a minha família brasileira, república Dah! Nada!. Por tudo o que essas meninas me ensinaram da cultura brasileira, pensamentos, reflexões, apoio e amor. Nunca imaginei que viver com nove meninas brasileiras fosse tão fácil! A vocês, Marrom, Lilo, Debu, Kids, Coala, China, Valente, Potira, Werneck, Minaj, Responça, e minha argentina Noelia.

Aos meus amigos da Espanha, por viver comigo a ilusão de morar num país tropical, porque em cada volta sempre me fazem sentir como se não tivesse ido embora. Em especial meus amigos de graduação em Biologia e minha Reunión “Las Uxitas”, amo vocês com loucura. A Carmelo, por sempre me animar a realizar meus sonhos, pelo apoio e força.

Por último, aos meus amigos com os que compartilhei minha vida no Brasil. A meu querido Pablito por começar comigo esta insuperável experiência, pela amizade e carinho que temos. A Bryan por ter estado sempre e me motivar para continuar vivendo essa experiência. A Bahia por me suportar nas boas e nas más e me cuidar até quando ficava doente. A meu Bro Abraham, pelo super carinho e apoio dedicado. A minha querida amiga Fer, por aparecer na minha vida desse jeito e todos os momentos, todos os que vivemos e os que temos por viver, obrigada por todo o ensino e a sua família por me acolher sempre tão bem. Às minhas amigas argentinas, em especial a Juli e Fer Venturi. A Felipe pelo carinho e ensino, por crer em mim. A minha amada amiga Anna, pelo resgate, amizade e serenidade compartilhada, a sua família tão carinhosa comigo. Meus super amigos Ruben, Amber, Bea, pela superação de inteligência em pessoa e por serem especiais comigo. A Juan, porque mesmo chegando na minha etapa final, houve uma grande amizade e sobre tudo pelos momentos e risadas compartilhadas. A minhas parceiras colombianas, Aura e Marión, por todos os momentos juntas, pelas choradas, risadas, viagens, brigas e amor compartilhado. A meus amigos Luis, Vania, Alán, Iuna, Andrés, Teddy, Pedro, pelo tempo juntos. Obrigada a todos vocês que entrarem na minha vida para me aportar e reforçar alguma parte de vocês, por me ensinar que a amizade e integridade não depende de um país e sim das pessoas que vocês são. Amo todos vocês.

Obrigada ao meu país de corazón, Brasil.

RESUMO

A criptococose é uma infecção fúngica sistêmica e oportunista, causada pelas leveduras capsuladas das espécies *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii*, afetando tanto pacientes imunocompetentes quanto imunocomprometidos. Uma propriedade importante do gênero *Cryptococcus* é a capacidade de formação de biofilmes. A resistência dos biofilmes aos agentes antifúngicos traz a necessidade da busca de novas terapias. Desta forma, o nosso grupo vem trabalhando com moléculas antifúngicas derivadas de fontes naturais, como as chalconas, onde foi verificado que *C. neoformans* é sensível a algumas destas moléculas. Assim, o objetivo desse trabalho foi testar a 3'- chalcona como antifúngico contra *C. gattii* em situação planctônica e biofilme, como também a eficiência e toxicidade em modelos animais alternativos como *Danio rerio* (Zebrafish) e *Galleria mellonella*, propondo uma nova alternativa para o tratamento. *In vitro*, os resultados para a forma planctônica do fungo mostraram que a 3'- chalcona foi mais eficaz para a cepa 118, com concentração inibitória mínima (CIM) de 0,96 µg/mL e para a cepa 56990 de *C. gattii*, a molécula mostrou ação potente com CIM entre 1,95 e 3,90 µg/mL. No ensaio de formação do biofilme com as duas cepas, observou-se uma atividade metabólica crescente até 72 horas e uma biomassa e matriz extracelular que alcançou seu máximo nas 48 horas. Em seguida, foi feita a avaliação da atividade da 3'- chalcona contra a formação do biofilme maduro após 48 horas, apresentando uma inibição a uma concentração de 62,5 µg/mL para cepa ATCC e de 31,2 µg/mL frente ao isolado 118. Também foi avaliado o crescimento do biofilme frente à anfotericina B (AmB), obtendo como resultado, inibição em todas as concentrações por parte das duas cepas e, frente ao fluconazol, apresentaram-se resistentes. *In vivo*, os resultados de toxicidade em embriões de Zebrafish revelaram uma concentração letal 50% (CL50) de 3,42±0,6 µg/mL em 48 horas pós-fertilização (hpf). No modelo *G. mellonella* as doses testadas de 3'- chalcona (2 a 160 mg/Kg) não foram tóxicas. Entretanto, nas larvas infectadas com as duas cepas de *C. gattii*, a molécula não apresentou eficácia antifúngica. Assim, considerando o potencial antifúngico *in vitro*, inclusive contra o biofilme de *C. gattii*, a 3'- chalcona pode passar por modificações moleculares que aumentem sua distribuição e eficácia *in vivo*.

Palavras-chave: *Cryptococcus gattii*; 3'- chalcone, zebrafish; *Galleria mellonella*

ABSTRACT

Cryptococose is a fungal, systemic and opportunistic infection mainly caused by capsulated yeast of the species *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii*, affecting immunocompetent and immunocompromised patients. An important property of the genus *Cryptococcus* is the biofilm formation, which can be considered a virulence factor and resistance. The resistance of biofilms to antifungal agents brings the need to search new therapies. Thus, our group has been working with antifungal molecules derived from natural sources such as chalcones, where it was found that *C. neoformans* is sensitive to some of these molecules. For this fact, the objective of this study was to test the 3'-chalcone as antifungal against *C. gattii* in planktonic and biofilm forms, as well as efficiency and toxicity in alternative animal models like *Danio rerio* (Zebrafish) and *Galleria mellonella*, proposing a new alternative for treatment. *In vitro*, the results for the planktonic form of the fungus showed that the 3'-chalcone was more effective for the 118 strain, the minimum inhibitory concentration (MIC) was 0.96 µg/mL. For the strain 56990 of *C. gattii* the molecule showed potent activity with MIC values between 1.95 and 3.90 µg/mL. Biofilm formation assay for both strains had an increased metabolic activity within 72 hours and a biomass and extracellular matrix which reached its maximum in 48 hours. Then, the evaluation of the activity of the 3'-chalcone against the formation of mature biofilm was made after 48 hours, showing inhibition at a concentration of 62.5 µg/mL for ATCC strain and 31.2 µg/mL against the isolated 118. Also, the growth of biofilm against to amphotericin B (AmB) was evaluated, obtained as a result of inhibition at all concentrations for the two strains and against fluconazole were resistant. *In vivo*, the results of toxicity in zebrafish embryos revealed a lethal concentration 50% (LC50) of 3.42 ± 0.6 µg/mL at 48 hours post-fertilization (hpf). In the model *G. mellonella* tested doses of 3'- chalcona (2 to 160 mg/kg) were not toxic. However, in larvae infected with the two strains of *C. gattii*, the molecule did not show efficacy of antifungal agents. Thus, considering the potential antifungal *in vitro*, including against biofilms of *C. gattii*, 3'- chalcone can experiment molecular changes that increase their distribution and efficacy *in vivo*.

Keywords: *Cryptococcus gattii*; 3' - chalcone, zebrafish; *Galleria mellonella*

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E UNIDADES

AIDS	<i>Acquired Immune Deficiency Syndrome</i>
AmB	Anfotericina B
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BHI	<i>Brain Heart Infusion</i>
°C	Graus Celsius
CANBEFs	4-chloro-6-aryl amino-7-nitro-benzofurazane
CFM	Concentração fungicida mínima
CIM	Concentração inibitória mínima
Chalc	Chalcona
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
CL50	Concentração letal 50%
DMSO	Dimetilsulfóxido
DO	Densidade óptica
EDTA	Iron chelators ethylenediaminetetraacetic acid
ELISA	<i>Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay</i>
ETH	Ethionamida
FCZ	Fluconazol
INH	Antituberculoses isoniazida
h	Hora(s)
hpf	Horas pós fertilização
HIV	<i>Human Immunodeficiency Virus</i>

IC50	Concentração inibitória média (50%)
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
µg	Micrograma
mg	Miligrama
mL	Mililitro
MOPS	Tampão [ácido 3-(n- morfolino)-propanossulfônico]
MTT	Brometo de (3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio)
NOK	Célula oral normal imortalizada com o gene <i>h-tert</i>
nm	Nanômetro
OECD	Organisation for Economic Cooperation and Development test guideline
PBS	Tampão fosfato/salina
pH	Potencial hidrogeniônico
rpm	Rotação por minuto
RPMI	Meio de Cultura de Tecido Animal Desidratado
RSZ	Resazurina
SIDA	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
SOD1p	Superóxido dismutase
SOD2p	Superóxido dismutase mitocondrial
UFCs	Unidades formadoras de colônias
V87	Células de glioma humano

XTT	2,3-bis (2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-5-[carbonilo (fenilamino)]-2H-tetrazólio-hidróxido
ZFET	Zebrafish embryo acute toxicity test

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Resultados do teste de sensibilidade das cepas de *C. gattii* 38 testadas com 3'- chalcona. Concentração inibitória mínima e concentração fungicida mínima em µg/mL

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Estrutura química da 3'- chalcona. 23
- Figura 2.** Cinética de formação de biofilme de *C. gattii* ATCC 56990 39
(esquerda) e o isolado 118 (direita) em placas de microtitulação de poliestireno, conforme determinado pela redução colorimétrica do ensaio XTT. Dados expressos com média $\pm$ desvio padrão. Este experimento foi realizado seis vezes, com resultados similares cada vez.
- Figura 3.** Quantificação da biomassa pela coloração com cristal violeta 40
das cepas de *C. gattii* ATCC 56990 e o isolado 118. Dados expressos com média $\pm$ desvio padrão. Foram realizados três experimentos independentes, com resultados similares. Os asteriscos denotam redução significativa (** $p < 0,01$).
- Figura 4.** Quantificação da matriz extracelular pela coloração com 41
safranina. Dados expressos com média $\pm$ desvio padrão. Este experimento foi realizado três vezes, com resultados similares cada vez. Os asteriscos denotam redução significativa (** $p < 0,01$).
- Figura 5.** Biofilmes de *C. gattii* tratados com diversas concentrações (1; 43
2; 4; 8; 16; 32; 64; 128; 256; 512 $\mu\text{g/mL}$) de fluconazol durante 48 h. Dados expressos com média $\pm$ desvio padrão. Este ensaio foi realizado três vezes para a cepa ATCC 56990 e o isolado 118. Os asteriscos denotam redução significativa (** $p < 0,001$). Em ambos gráficos pode se ver que em todas as concentrações do fluconazol, as cepas mostram-se resistentes, exceto a 512 $\mu\text{g/mL}$ com a ATCC 56990 que inibe o biofilme em mais de 50%.
- Figura 6.** Biofilmes de *C. gattii* expostos a diversas concentrações (0,5; 44
1; 2; 4; 8; 16; 32; 64; 128; 256 $\mu\text{g/mL}$) de AmB durante 48 h. O efeito foi comparado com a produção das células de fungos incubadas em PBS através do ANOVA com pós teste de Bonferroni. Dados expressos com média $\pm$ desvio. Os asteriscos denotam redução significativa (* $p < 0,001$). Este ensaio foi realizado três vezes para as duas cepas de *C. gattii*. Neste caso, é possível ver uma inibição do biofilme em mais de 80%

para todas as concentrações usadas de AmB.

Figura 7. Biofilmes de *C. gattii* expostos a diversas concentrações (0,48; 0,97; 1,95; 3,9; 7,8; 15,6; 31,25; 62,5; 125; 250 µg / mL) de 3'-chalcona durante 48 h. O efeito foi comparado com a produção das células de fungos incubadas em PBS através do ANOVA com pós teste de Bonferroni. Dados expressos com média ± desvio padrão. Os asteriscos denotam redução significativa (**p<0,001). Este ensaio foi realizado três vezes para as duas cepas de *C. gattii*. A 3'-chalcona mostrou atividade de mais de 80% numa concentração de 62,5 µg/mL para ATCC 56990 e de 31,25 µg/mL para o isolado 118.

Figura 8. Microscopia eletrônica de varredura da formação do biofilme de *C. gattii* ATCC 56990 e *C. gattii* 118 após 48h de incubação (Figura 8A e 8D) e com tratamento de mais 48h (Figura 8B, 8C, 8E, 8F). Esse experimento foi realizado duas vezes, com resultados similares cada vez. As setas vermelhas apontam a matriz extracelular. Posteriormente são mostrados os biofilmes maduros de *C. gattii* ATCC 56990 (B) e o biofilme *C. gattii* 118 (D) tratados com AmB a 0,5 µg/mL. Por último, de *C. gattii* ATCC (C) tratados com 3'-chalcona a 62,5 µg/mL e *C. gattii* 118 (F) tratados com 3'-chalcona a 31,2 µg/mL. Nesses casos, as setas vermelhas apontam o dano do causado pelo fármaco.

Figura 9. (A) Curva de sobrevivência de embriões de Zebrafish em contato com diferentes concentrações de 3'-chalcona em 6, 24 e 48 hpf (horas pós fertilização). **(B)** Porcentagens de sobrevivência dos embriões segundo as concentrações testadas nas 48h.

Figura 10. Imagens de embriões de Zebrafish capturadas através da lupa Zeiss (Discovery. V12) com um objetivo de 40x. Embriões com desenvolvimentos normais (A-D) e embriões com efeitos teratogênicos em contato com a 3'-chalcona com concentrações de 16, 2 e 1 µg/mL no tempo de 6, 24, 48 e 120 horas pós fertilização (E-H).

Figura 11. Curva de sobrevivência de larvas de *Galleria mellonella* não infectadas e tratadas com 3'-chalcona (160, 80 e 2 mg/kg).

Figura 12. Curva de sobrevivência de larvas de *Galleria mellonella* infectadas com a cepa *C. gattii* ATCC 59660 e tratadas com 3'-

chalcona (160, 80 e 2 mg/kg).

Figura 13. Curva de sobrevivência de larvas de *Galleria mellonella* 52 infectadas com a cepa *C. gattii* 118 e tratadas com 3' Chalcona (160, 80 e 2 mg/kg).

Figura 14. Efeito do tratamento antifúngico na carga fúngica de *Galleria* 54 *mellonella* infectadas com 1×10^6 ufc/larva de *C. gattii*.

SUMÁRIO

Capítulo I	19
1. INTRODUÇÃO	20
1.1. CRIPTOCOCOSE	20
1.2. MODELOS ANIMAIS ALTERNATIVOS	26
2. OBJETIVOS	30
2.1. OBJETIVOS GERAIS.....	30
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	30
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	31
3.1. SELEÇÃO E CULTIVO DE ISOLADOS DE <i>C. GATTII</i>	31
3.2. COMPOSTO	31
3.3. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA.....	31
3.3.1. Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)	31
3.3.2. Concentração fungicida mínima (CFM)	32
3.4. ENSAIO DE FORMAÇÃO DO BIOFILME DE <i>C. GATTII</i>	33
3.4.1. Formação dos biofilmes.....	33
3.4.2. Atividade metabólica dos biofilmes	33
3.4.3. Quantificação do biofilme.....	34
3.4.3.1. <i>Quantificação da massa biofilme por coloração com cristal violeta</i>	34
3.4.3.2. <i>Quantificação da matriz extracelular pela coloração com safranina</i>	34
3.4.4. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	35
3.4.5. Efeito da 3'- chalcona frente aos biofilmes maduros.....	35
3.4.6. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) biofilme tratado.....	36
3.5. ENSAIOS DE TOXICIDADE DA 3'- CHALCONA EM EMBRIÕES DE ZEBRAFISH.....	36
3.6. ESTUDO DA ATIVIDADE DA 3' CHALCONA EM <i>G. MELLONELLA</i>	37
3.6.1. Infecção e tratamento das larvas com <i>C. gattii</i>	37
3.6.2. Determinação da carga fúngica em <i>G. mellonella</i>	37
3.7. ANÁLISES ESTATÍSTICAS	38
4. RESULTADOS	39
4.1. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA.....	39

4.1.1. Teste para determinação da concentração inibitória mínima (CIM) .	39
4.2. ESTUDO DO BIOFILME DE <i>C. GATTII</i>	40
4.2.1. Atividade metabólica dos biofilmes	40
4.2.2. Quantificação do biofilme.....	42
4.2.4.1. <i>Quantificação da massa biofilme por coloração com cristal violeta</i>	42
4.2.4.2. <i>Quantificação da matriz extracelular pela coloração com safranina</i>	43
4.2.3. Efeito antifúngico dos fármacos nos biofilmes	44
4.2.4. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	47
4.3. TESTE DE TOXICIDADE DA 3'- CHALCONA EM EMBRIÕES DE ZEBRAFISH	49
4.4. ESTUDO DA ATIVIDADE DA 3'- CHALCONA EM <i>G. MELLONELLA</i> ...	52
4.4.1. Toxicidade.....	52
4.4.2. Infecção e tratamento das larvas com <i>Cryptococcus gattii</i>	52
4.4.3. Determinação da carga fúngica em <i>G. mellonella</i>	54
5. DISCUSSÃO	56
6. CONCLUSÃO.....	65
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	66
Capítulo II	82

Capítulo 1

1. INTRODUÇÃO

1.1. CRIPTOCOCOSE

As doenças infecciosas causam um impacto significativo na saúde humana e animal, na agricultura, e na economia mundial. Entre os patógenos microbianos que causam doenças infecciosas no mundo, os fungos representam uma classe importante (COHEN, 2000; MORENS *et al.*, 2004). Entre eles, *Cryptococcus neoformans* é atualmente o principal patógeno fúngico invasivo líder, a nível mundial pelas taxas de incidência e mortalidade (TENOR *et al.*, 2015). A criptococose vem assumindo um papel relevante na história do SIDA (Síndrome da Imunodeficiência Humana Adquirida), e vem sendo considerada uma das micoses oportunistas mais comuns diagnosticadas entre os pacientes infectados pelo HIV (vírus da imunodeficiência humana) (FAVALESSA *et al.*, 2009). A criptococose é causada, principalmente, pelas leveduras capsuladas das espécies *C. neoformans* e *Cryptococcus gattii* (MAK *et al.*, 2010). *C. gattii* é uma levedura basidiomiceta e estima-se que divergiu de *C. neoformans* há 37,5 milhões de anos (BYRNES *et al.*, 2011).

C. neoformans é comumente encontrado na natureza e, essa espécie é frequentemente associada a fezes de pombos urbanos e outras aves, assim como vegetais e madeira (MITCHELL E PERFECT, 1995; SORRELL E ELLIS, 1997; REOLON, 2004; KOBAYASHI *et al.*, 2005). Em indivíduos imunocomprometidos, a espécie mais prevalente é *C. neoformans* (FERNANDES, 200; RUIZ *et al.*, 1981; CHANDENIER *et al.*, 2004; KOBAYASHI *et al.*, 2005). Já o *C. gattii* acomete indivíduos imunocompetentes (RUIZ *et al.*, 1981; CHANDENIER *et al.*, 2004; LINDENBERG *et al.*, 2008). Ambos, *C. neoformans* e *C. gattii* são abundantes em materiais em decomposição dentro de cavidades de várias espécies de árvores (CHOWDHARY *et al.*, 2012; SPRINGER *et al.*, 2014). O primeiro isolamento no meio ambiente de *C. gattii* foi descrito em 1990 na árvore *Eucalyptus camadulensis* (ELLIS E PFEIFFER, 1990b; a; SORRELL E ELLIS, 1997).

Além disso, *C. neoformans* é distribuído globalmente, enquanto *C. gattii* classicamente tem sido visto como um fungo tropical ou subtropical (KWON-

CHUNG E BENNETT, 1984). No entanto, agora com o aumento dos estudos epidemiológicos tem identificado reservatórios ambientais de *C. gattii* na Ásia, África, Austrália, América do Sul e alguns lugares da América do Norte (STEENBERGEN *et al.*, 2001; STEPHEN *et al.*, 2002; MEYER *et al.*, 2003; CHATURVEDI *et al.*, 2005; LITVINTSEVA *et al.*, 2005; MORGAN *et al.*, 2006; CHEN *et al.*, 2008; SANTOS *et al.*, 2008; BYRNES *et al.*, 2010). Também, ambos *C. neoformans* e *C. gattii* podem sobreviver e se replicar em amebas de vida livre, solo e nemátodos, e é possível que esses hospedeiros alternativos possam ter um papel importante na determinação da distribuição e virulência das diferentes linhagens criptocócicas ao redor do mundo (STEENBERGEN *et al.*, 2001).

A transmissão natural humano–humano não tem sido observada. A infecção por *Cryptococcus* spp ocorre através da inalação das formas infectantes da levedura, os basidiósporos, os quais são encontrados no meio ambiente (MARTINEZ; CASADEVALL, 2006; CHATURVEDI; CHATURVEDI, 2011; HARRIS *et al.*, 2012; NEGRONI, 2012; STIE; FOX, 2012; ZHU *et al.*, 2012). Em decorrência da infecção, as manifestações geralmente ocorrem na forma pulmonar onde as leveduras colonizam o tecido alveolar, caracterizando a infecção como aguda, subaguda ou crônica (STIE; FOX, 2012; ZHAI *et al.*, 2013). Nos tecidos pulmonares, a levedura pode causar pneumonia em pacientes imunocomprometidos, mas em hospedeiros imunocompetentes, as células fúngicas são eliminadas pelo sistema imune ou se estabelecem como uma infecção latente assintomática. Com a depressão do sistema imunológico do hospedeiro, a levedura pode desenvolver pneumonia grave e insuficiência respiratória, podendo acometer o sistema nervoso central, causando sérios quadros de meningite e meningoencefalite, os quais caracterizam a fase mais importante e grave da infecção (BRIZENDINE *et al.*, 2011). Além disso, causa lesões disseminadas na pele (DORA *et al.*, 2006).

Diferentes estruturas e elementos reguladores são cruciais para a virulência de *C. neoformans*: cápsula polissacarídica, pigmento de melanina, tolerância térmica, vias de sinalização celular, estratégias para parasitar os fagócitos do hospedeiro e os mecanismos para quebrar a barreira hematoencefálica. É seguro extrapolar que esses atributos são igualmente cruciais para a virulência

em *C. gattii* devido à proximidade dessas espécies. Contudo, devem existir distinções nestas características ou alguns fatores de virulência ainda não reconhecidos para explicar características únicas da criptococose causada por *C. gattii*.

O descobrimento de que *C. gattii* tem a capacidade de parar a migração dos neutrófilos em condições de laboratório e na infecção em animais poderia explicar o porquê pessoas saudáveis podem ser vítimas dessa infecção (DONG E MURPHY, 1995). Outras investigações em modelos animais revelaram que metabólitos de *C. gattii*, especialmente acetoína e dihidroxiacetona, provocam menores respostas pró-inflamatórias do que os metabólitos de *C. neoformans*, promovendo assim, a sobrevivência dos fungos e multiplicação no hospedeiro infectado (WRIGHT *et al.*, 2002; CHENG *et al.*, 2009). Uma superóxido dismutase (SOD1p) em *C. gattii* protege a integridade funcional de vários fatores de virulência, que é necessária para a infecção num modelo animal e para a proteção de morte frente a fagócitos humanos. Algumas destas funções celulares diferem de forma remarcada das proteínas homólogas em *C. neoformans* (COX *et al.*, 2003; NARASIPURA *et al.*, 2003). A superóxido dismutase mitocondrial (SOD2p) foi igualmente crucial para o crescimento a 37 °C e a virulência (modelo de inalação) para ambos *C. gattii* e *C. neoformans* (GILES *et al.*, 2005; NARASIPURA *et al.*, 2005). A trealose é outro antioxidante importante e protetor de estresse em fungos. Dois genes essenciais para codificar a enzima trealose-6- fosfato (T6P) sintase (TPS1p e TPS2p), são importantes para a termotolerância, virulência e integridade de vários fatores de virulência como a cápsula e a melanina de *C. gattii*. A proteína homóloga em *C. neoformans* era essencial para a termotolerância, mas não para a expressão da cápsula e a melanina (PETZOLD *et al.*, 2006; NGAMSKULRUNGROJ *et al.*, 2009). Divergência funcional pode ser vista no fator de transcrição Ste12a, que regula o acasalamento, melanina, virulência e atitude ecológica em *C. gattii*, mas só o acasalamento e tamanho da cápsula em *C. neoformans* (YUE *et al.*, 1999; REN *et al.*, 2006). Portanto, existe uma relação estreita entre alguns processos celulares importantes e a virulência em *C. gattii*, que não é o caso de processos similares em *C. neoformans*.

Uma propriedade importante do gênero *Cryptococcus* é a capacidade de formação de biofilmes, o que pode ser considerado um fator de virulência e resistência, uma vez que genes reguladores dessa formação são cruciais na patogênese e adaptação da levedura no tecido hospedeiro (ROBERTSON E CASADEVALL, 2009; ALBUQUERQUE E CASADEVALL, 2012). O biofilme pode ser definido como uma comunidade complexa estruturada de microrganismos, rodeada por uma matriz extracelular de polissacáridos, aderidos uns aos outros numa superfície ou interface (COSTERTON *et al.*, 1999). Esses podem se formar no ambiente natural, bem como em cateteres ventriculares no interior do hospedeiro humano (WALSH *et al.*, 1986), e podem ser considerados como complexas comunidades de microrganismos que interagem cooperativamente de forma altruísta (COGHLAN, 1996). As vantagens de um organismo na formação de um biofilme incluem a proteção no ambiente, à resistência frente à remoção física e química das células, cooperação metabólica e um regulamento baseado na comunidade da expressão gênica (JABRA-RIZK *et al.*, 2004).

A formação dos biofilmes envolve uma sequência de eventos. Na fase de adesão ou a fase inicial de formação de biofilmes (2 a 4 horas) *in vitro*, as células criptocócicas metabolicamente tornam-se ativas e ficam firmemente ligadas à superfície de plástico da placa de microtitulação em monocamada. É sabido que as células criptocócicas estão aderidas na superfície pela presença de muitas células em brotamento. Na fase intermédia (4-16 horas), a população fúngica aumenta significativamente e consiste em células espalhadas uniformemente no plástico, formando microcolônias. A proximidade das células dentro da microcolônia pode apresentar um ambiente formidável para o estabelecimento de gradientes de nutrientes, troca genética e quorum sensing. Durante a fase maturação (24 a 48 horas), a atividade metabólica das células permanece alta e constante (MARTINEZ E CASADEVALL, 2015).

Nos últimos anos tem havido um aumento da valorização do papel que os biofilmes microbianos desempenham na medicina humana, especialmente porque os micróbios que crescem dentro dos biofilmes apresentam características fenotípicas únicas em comparação com as células planctônicas, incluindo o aumento da resistência aos agentes antimicrobianos e proteção

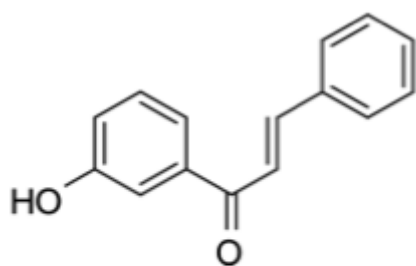
contra as defesas do hospedeiro (KUHN E GHANNOUM, 2004; MOWAT *et al.*, 2007). Portanto, eles representam um grande problema na terapia, pois a dose necessária para erradicar o biofilme pode exceder as mais altas concentrações terapeuticamente atingíveis de antibióticos (RASMUSSEN E GIVSKOV, 2006).

O fármaco usado para o tratamento inicial da criptococose é a anfotericina B (AmB). A AmB é um derivado poliênico produzido pelo actinomiceto *Streptomyces nodosus*. Apesar da sua elevada toxicidade e do surgimento de outros fármacos antifúngicos de amplo espectro, a AmB e suas formulações lipídicas continuam sendo consideradas o “*padrão ouro*” dos fármacos antimicóticos disponíveis para uso clínico (LARRU E ZAOUTIS, 2013). O fluconazol é um composto azólico e tem ação inibitória sobre a lanosterol-14 α desmetilase, a qual é responsável pela conversão do lanosterol em ergosterol; desta forma, interrompe a biossíntese do ergosterol, componente fúngico essencial para a formação da membrana plasmática celular. É utilizado no tratamento de micoses superficiais e invasivas, no tratamento profilático e é bem tolerado pelo paciente, quando administrado em altas doses. Porém, o grande problema do uso deste fármaco, assim como, o uso dos demais azóis, é o desenvolvimento de resistência das leveduras a essa classe de fármacos. A terapia da criptococose é iniciada com uma dose intravenosa de 0,7-1 mg/Kg/dia durante 14 dias (ANDES, 2006) e posteriormente fluconazol numa dose de 400-800 mg por dia no mínimo durante 8 semanas na fase de manutenção, o que pode gerar problemas de resistência pelo longo tempo de uso (SCHAARS *et al.*, 2006). Devido à dificuldade na erradicação da criptococose e os problemas como a toxicidade, resistência e arsenal limitado dos antifúngicos usados hoje em dia na terapia, existe uma necessidade emergencial de se descobrir novas terapias uma vez que estas infecções são letais.

Recentemente, estudos que envolvem a prospecção de novas moléculas antifúngicas, têm-se focado nos biofilmes (GULLO *et al.*, 2013). Nosso grupo colabora na prospecção de moléculas antifúngicas derivadas de fontes naturais e atualmente muitas destas são sintetizadas de maneira bio-guiada pela atividade antifúngica e toxicidade em geral. As chalconas (trans-1,3-diaril-2-propen-1-onas) pertencem à família dos flavonóides e são precursores dos

flavonóides de cadeia aberta e isoflavonas, que são abundantes em plantas comestíveis. As chalconas e seus derivados têm atraído cada vez mais a atenção devido a inúmeras aplicações farmacológicas. Propriedades anticancerígenas foram observadas em estudos como os de Echeverria e colaboradores (2009) com chalconas sintéticas. Um estudo executado por Lunardi e colaboradores (2003) relatou a atividade antiprotzoária *in vitro* contra o crescimento de *Leishmania braziliensis* e *Trypanosoma cruzi*. Yadav (2009) sintetizou uma série de derivados de chalconas com as quais observaram atividades anti-inflamatórias usando camundongos com um modelo de edema. Outros estudos demonstram propriedades antioxidantes, antimicrobiana e atividade larvívora contra mosquito (NURETTIN, 2006; HAMDI, 2010; BEGUM, 2011). Por último, as chalconas apresentam atividades antifúngicas contra espécies de *Candida*, *Saccharomyces cerevisiae*, *C. gattii* e *Paracoccidioides brasiliensis* (DE CARVALHO TAVARES *et al.*, 2011). Recentemente também foi descrita atividade contra *C. neoformans* e *Mycobacterium tuberculosis* (ALWAN *et al.*, 2015). Assim, se faz necessário ensaios para verificação da atividade antifúngica e antibiofilmes frente à espécie *C. gattii*. Nesse trabalho foi avaliada a atividade da 3'-chalcona (Figura 1).

Figura 1. Estrutura química da 3'-chalcona.



3' chalc

1.2. MODELOS ANIMAIS ALTERNATIVOS

Ao longo da história da pesquisa biomédica, tem se realizado os experimentos usando modelos animais mamíferos. Mas desde o ano 1953, foi fomentado os princípios dos 3Rs (*Replacement, Reduction and Refinement*) por Russel e Burch foi um marco para o uso de animais em experimentação e no desenvolvimento de métodos alternativos ao uso de animais. No Brasil, em 2008 com a lei Arouca e no ano 2012 o projeto RENAMA (Rede Nacional de Métodos Alternativos ao uso de animais) também fomentam esses princípios.

Esses princípios são a Redução (*Reduction*) significa a obtenção de nível equiparável de informação com o uso de menos animais em experimentação; o Refinamento (*Refinement*) promove o alívio ou a minimização da dor, sofrimento ou estresse do animal utilizado na experimentação e a Substituição (*Replacement*) significa que o nível equiparável de informação é alcançado sem o uso de animais mamíferos.

A utilização de modelos experimentais com animais não mamíferos como *Galleria mellonella* e *Danio rerio*, os quais são objetos de estudo do presente projeto, tem crescido nos últimos anos e são importantes estratégias para a predição da atividade antifúngica e toxicológica in vivo.

Por esse motivo, dentro do campo de estudo, o primeiro modelo alternativo empregado é o Zebrafish (*Danio rerio*). Em muitas vias apresenta-se como um intermediário entre camundongos e modelos invertebrados de infecção aplicados para investigar interações patógeno-hospedeiro. O tempo de geração é de apenas 3-4 meses; uma fêmea madura de Zebrafish pode gerar várias centenas de embriões por semana os quais se desenvolvem rapidamente fora da mãe o que é uma vantagem frente a modelos mamíferos nos que os embriões precisam ser extraídos da fêmea. Os peixes maduros são de pequeno tamanho, resistentes e fáceis de criar e manter. Estas características juntamente com a transparência nas fases iniciais e a disponibilidade de obtenção de embriões no acasalamento, bem como a pouca quantidade de substâncias químicas necessárias para realizar testes, fazem esta espécie biológica ótima para o desenvolvimento dos estudos. Comparações genômicas demonstram que o 71,4% dos genes humanos são ortólogos com os de Zebrafish, e genes potencialmente relacionados com doenças humanas estão relacionados em 82% (HOWE *et al.*, 2013). O Zebrafish tem sido descrito como

um modelo animal "conveniente e preditivo o qual pode servir como um passo intermédio para a avaliação entre células e teste de mamíferos" (HE *et al.*, 2014).

Portanto, as fases iniciais de vida de Zebrafish têm sido propostas como modelo eficaz para estudos de toxicidade (SIPES *et al.*, 2011) e existem guias de testes que tem sido desenvolvidas e validadas para o uso dos embriões de Zebrafish como organismo modelo (zebrafish embryo acute toxicity test (ZFET), OECD test guideline 236) (BUSQUET *et al.*, 2014). O uso de Zebrafish como modelo para testes de toxicidade reduz o tempo de ensaio e os custos substancialmente em comparação com testes de roedores e coelhos, os quais apresentam como requisito animais com uma idade de 8-12 semanas (camundongos) ou, pelo menos, 12 semanas (coelhos) e a observação dos animais por um período mínimo de 14 dias (DUCHARME *et al.*, 2015). Além disso, o embrião de Zebrafish é muito pequeno e os adultos possuem uma elevada fecundidade, tornando-os receptivos para um screening de alto rendimento de toxicidade (DUCHARME *et al.*, 2015). Sendo assim um dos principais tópicos dos ensaios com embriões de peixes é determinar a toxicidade aguda, o que inclui uma triagem dos compostos que levam a transtornos de desenvolvimento como um indicador de efeitos teratogênicos (KOBAYASHI *et al.*, 2005). Maes e colaboradores (2012) fizeram um estudo toxicológico com quatorze dos solventes mais comumente usados com fármacos apolares. Ahmad e colaboradores (2015) estudaram a toxicidade da nanopartícula CoFe_2O_4 e avaliaram como risco o uso desta partícula em aplicações biológicas. Outros ensaios toxicológicos foram realizados com alvo na pesquisa de novos fármacos (RIZZO *et al.*, 2013; CARLSSON *et al.*, 2014; LEE E FREEMAN, 2014; LANTZ-MCPEAK *et al.*, 2015).

Nosso outro modelo alternativo, *G. mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae) está emergindo no mercado como fácil modelo para interação parasita-hospedeiro. Há numerosos benefícios no uso das larvas como modelo hospedeiro que não são facilmente alcançados com outros hospedeiros invertebrados. Por exemplo, as larvas podem ser mantidas numa faixa de temperatura entre 25°C e 37°C, facilitando numerosas condições nas quais os fungos podem existir em ambientes naturais e hospedeiros mamíferos. *G. mellonella* é um hospedeiro interessante para o estudo de patogêneses microbiais como *Pseudomonas*

aeruginosa, *Proteus mirabilis* e *Escherichia coli* (MORTON *et al.*, 1984; MIYATA *et al.*, 2003; CYTRYŃSKA *et al.*, 2007) e fungos como *Paracoccidioides spp*, *Aspergillus spp* e *Cryptococcus gattii* (REEVES *et al.*, 2004; FIRACATIVE *et al.*, 2014; SCORZONI *et al.*, 2015). O modelo também é usado para avaliar a eficácia de antifúngicos atualmente usados na terapia como a AmB e itraconazol (MYLONAKIS *et al.*, 2005; DE LACORTE SINGULANI *et al.*, 2016) e novas moléculas antifúngicas como rapamicina e haemofungina (BASTIDAS *et al.*, 2012; BEN YAAKOV *et al.*, 2016).

As larvas de *G. mellonella* são alojadas em placas de petri e são mantidas numa incubadora pós-infecção. Elas podem ser inoculadas com o micróbio através de três métodos: aplicação tópica, administração oral ou injeção (Scully e Bidochka, 2005). O método de injeção oferece o benefício de que o fungo é injetado diretamente na larva e, portanto, é sabida a quantidade de inóculo que elas recebem.

Uma vez inoculadas com o fungo de interesse a mortalidade das larvas pode ser monitorizada para determinar a patogenicidade do fungo. Comparações iniciais entre o modelo *G. mellonella* e o modelo murino tem demonstrado que os genes gerados pelos fungos relacionados com a virulência estão conservados nos dois animais (BRENNAN *et al.*, 2002; FUCHS E MYLONAKIS, 2006). Por comparação, os métodos utilizados para infectar as larvas são muito mais simples do que os empregados nos mamíferos e exigem menos treinamento. *G. mellonella* também não exige instalações especializadas como as necessárias para modelos de mamíferos. Além disso, o tempo de uma infecção letal em *G. mellonella* é mais rápido do que as infecções fúngicas em hospedeiros mamíferos. Embora o modelo *G. mellonella* não elimine completamente a necessidade de modelos hospedeiros mamíferos, o modelo proporciona inicialmente os meios para rastrear um número maior de linhagens de fungos para os efeitos de patogenicidade, a fim de identificar estirpes de identidade relevante, o que poderia ser levado depois para estudos mais aprofundados em modelos de mamíferos (FUCHS *et al.*, 2010).

O modelo *G. mellonella* não é somente restrito ao estudo de aspectos patogênicos de infecções fúngicas, também serve para avaliar a defesa deste frente ao fungo. Embora as larvas não apresentem resposta imune adaptativa, tem um sistema imunológico inato composto por seis tipos de células

fagocíticas: pró-hemócitos, coagulócitos, esferócitos, pinócitos, plasmatócitos e granulócitos. A densidade global do hemócito das larvas reflete na patogenicidade dos fungos. Conforme aumenta o tempo com larvas infectadas com fungos patogênicos, elas exibem alterações na densidade dos hemócitos, enquanto que as larvas infectadas com fungos não patogênicos apresentam uma densidade de hemócitos comparável às larvas não infectadas (BERGIN *et al.*, 2003). A resposta no aumento do número de células imunes em resposta à invasão de um agente patogênico é remanescente da resposta humana aos agentes patogênicos porque o número de células do sistema imunológico aumenta para combater o patógeno.

Dessa forma, tendo em vista a problemática da resistência das leveduras aos fármacos usuais, foi pretendido avaliar o uso da 3'- chalcona como antifúngico contra *C. gattii* em situação planctônica e biofilme, como também avaliar a eficiência e toxicidade em *G. mellonella* e Zebrafish, propondo uma nova alternativa para o tratamento de infecções causadas por *C. gattii*.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVOS GERAIS

Este trabalho tem como objetivo verificar as propriedades antifúngicas da 3'-chalcona contra *Cryptococcus gattii in vitro* e avaliar sua eficácia e toxicidade *in vivo* em diferentes modelos animais alternativos.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a atividade da 3'-chalcona contra *C. gattii in vitro*;
- Caracterizar o biofilme de *C. gattii*;
- Avaliar a atividade da 3'-chalcona no biofilme consolidado;
- Realizar ensaios de toxicidade da chalcona em embriões de Zebrafish;
- Verificar a toxicidade da chalcona em *G. mellonella*;
- Verificar a atividade antifúngica da chalcona em *G. mellonella* infectada com *C. gattii*;

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. SELEÇÃO E CULTIVO DE ISOLADOS DE *C. GATTII*

Para a realização dos ensaios foi selecionado um isolado ambiental de *C. gattii*, o qual possui sensibilidade reduzida ao fluconazol (118R) (Raso *et al.*, 2004) e como cepa padrão foi utilizada a ATCC (*The American Type Culture Collection*) de *C. gattii* 56990, pertencentes à micoteca do Laboratório de Micologia Clínica do Departamento de Análises Clínicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, Araraquara e o Instituto Adolfo Lutz, cedidos em colaboração.

3.2. COMPOSTO

O derivado 3'- chalcona foi cedido em colaboração com o grupo de pesquisa do Prof. Dr. Luís Octávio Regasini do Instituto Biociências, Letras e Ciências Exatas da UNESP- São José do Rio Preto, SP.

3.3. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA

3.3.1. Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)

Os testes de sensibilidade de *C. gattii* foram realizados frente à substância 3'- chalcona tendo como controle positivo fluconazol e AmB. Estes ensaios foram realizados segundo o documento CLSI com algumas adaptações. Para o desenvolvimento da metodologia, foi utilizado o meio RPMI 1640 com L - glutamina, sem bicarbonato e com indicador vermelho de fenol, tamponado com MOPS [ácido 3-(N-morfolina) propanosulfônico], pH 7,0 acrescido com 2% de glicose, esterilizado por filtração e conservado a 4° C.

Como controle do ensaio foi utilizada a cepa *Candida parapsilosis* ATCC 22019, conforme recomendado pelos documentos normativos do CLSI (M38-A2, 2008). Os fármacos antifúngicos padrões foram utilizados seguindo o documento. A solução de fluconazol (Sigma), foi preparada em meio RPMI, as concentrações variaram entre 512 e 1 µg/mL. Para o controle com AmB

(Sigma) foi realizada as dissoluções também em meio RPMI, as concentrações foram usadas numa faixa de 256 até 0,5 µg/mL. A 3'-chalcona foi diluída assepticamente em quantidade adequada de DMSO e solubilizada por agitação com o auxílio do vórtex. A faixa de concentração da molécula na avaliação da atividade antifúngica foi calculada, visando obter a variação das concentrações com o meio RPMI, entre 250 e 0,48 µg/mL (SCORZONI, 2007).

As cepas para o ensaio foram mantidas em ágar Sabouraud, a temperatura ambiente por 48 horas, a partir dessas culturas foram preparados os inóculos em PBS (tampão salina fosfato) estéril em concentrações de $2,5$ a 5×10^6 UFC/mL. Todos os inóculos foram conferidos através da contagem de células na câmara de Neubauer. Em seguida, o inóculo foi diluído em meio RPMI e distribuído em placas de 96 poços, sendo um volume de 100 µL nas fileiras de 2 a 11 onde está a substância que se deseja avaliar a atividade antifúngica em concentrações a partir de diluição seriada. Desta forma, a concentração do inóculo passou a ser 10^3 células/mL. O controle positivo do teste foi adicionado na fileira 12 com adição de 100 µL do meio RPMI livre de fármaco e 100 µL da suspensão de levedura. Também foi utilizado o controle de esterilidade do meio ou branco para a leitura, na fileira 1, onde foi adicionado somente 200 µL do meio RPMI. As placas foram incubadas a uma temperatura entre 35 e 37°C sob agitação constante de 150 rpm e a leitura ocorreu após um período de 48 horas, por meio de leitura visual e com o revelador resazurina (0,01%).

3.3.2. Concentração fungicida mínima (CFM)

A determinação da Concentração Fungicida Mínima foi realizada conforme descrito por Soares e colaboradores (2014). Placas de Petri contendo ágar Sabouraud dextrose foram previamente demarcadas de acordo com as posições das diluições dos compostos e controles positivos na placa de 96 poços. Uma alíquota do conteúdo dos poços foi transferida para o respectivo local na placa de Petri com auxílio de um palito de madeira estéril e as placas foram incubadas a temperatura ambiente por 48 horas. A concentração

fungicida mínima é definida como a menor concentração do composto ou fármaco onde não ocorre o desenvolvimento de microrganismos.

3.4. ENSAIO DE FORMAÇÃO DO BIOFILME DE *C. GATTII*

3.4.1. Formação dos biofilmes

A formação dos biofilmes foi realizada de acordo com o descrito por Martinez e Casadevall (2006), para os biofilmes de *C. neoformans*, com algumas modificações. As cepas de *C. gattii* foram cultivadas em caldo Sabouraud dextrose por 24 horas sob agitação de 150 rpm a 37 °C e o inóculo foi preparado na concentração de 1×10^8 células/mL em PBS. Posteriormente foram adicionados 100 µL do inóculo em placas de poliestireno de 96 poços. As placas foram incubadas a 37 °C por 5 horas para que fosse realizada a pré-adesão do biofilme. Após esse período, o sobrenadante foi gentilmente removido dos poços e os mesmos foram lavados de 2 a 3 vezes com PBS para a remoção das células não aderidas. Em seguida, foram adicionados 200 µL dos meios de cultura BHI e RPMI 1640 com L - glutamina, sem bicarbonato de sódio. As placas foram incubadas a 37°C a 100 rpm por 24, 48 e 72 horas (uma placa por cada hora).

3.4.2. Atividade metabólica dos biofilmes

As atividades metabólicas dos biofilmes formados em meio RPMI e caldo BHI, foram verificadas através do ensaio de redução de XTT (2,3-bis (2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil) -5 - [carbonilo (fenilamino)]-2H-tetrazólio-hidróxido). Após a maturação, foi adicionado, em cada poço, 50µL da solução de XTT (1 mg de sal/mL de PBS) e 4µL de solução de menadiona. Finalmente, as placas foram incubadas a 37 °C por 3 horas para então realizar a leitura espectrofotométrica através de leitor de microplacas, a 492 nm. Os meios RPMI 1640 e BHI isentos da formação de biofilme foram incluídos como controle negativo (MARTINEZ E CASADEVALL, 2006; COSTA-ORLANDI *et al.*, 2014).

3.4.3. Quantificação do biofilme

3.4.3.1. *Quantificação da massa biofilme por coloração com cristal violeta*

A quantificação dos biofilmes através da coloração por cristal violeta foi realizada conforme descrito por Mowat e colaboradores (2007) e Costa-Orlandi e colaboradores (2014). O biofilme foi formado em meio RPMI 1640 em placas de 96 poços. Depois de 24, 48 e 72 horas de formação, o meio de cultura foi retirado de cada poço e as células aderidas lavadas três vezes com PBS. Após a secagem em temperatura ambiente, foram adicionados a cada poço, 100 μ L de solução de cristal violeta a 0,5% por 5 minutos. Em seguida, os poços foram novamente lavados com água até que o excesso de coloração fosse removido e os biofilmes foram descorados pela adição de 100 μ L de etanol a 95% em cada poço. O etanol foi então gentilmente homogeneizado com a pipeta até que o restante do cristal violeta fosse completamente solubilizado (aproximadamente 1 minuto). Por fim, as soluções de cada poço foram transferidas para uma nova placa de 96 poços, que foi lida no espectrofotômetro a 570 nm. Os valores da absorbância foram proporcionais à quantidade de biomassa do biofilme, compreendida pelo material extracelular (quanto maior a quantidade de material biológico, maior a coloração e o valor da absorbância).

3.4.3.2. *Quantificação da matriz extracelular pela coloração com safranina*

As matrizes extracelulares produzidas pelos biofilmes foram quantificadas pela coloração com safranina, como descrito por Seidler, Salvenmoser e Müller (2008) e Costa-Orlandi e colaboradores (2014). Os biofilmes maduros formados com RPMI 1640 nas placas de 96 poços tiveram suas matrizes extracelulares coradas através da adição de 50 μ L de solução de safranina a 1%, por 5 minutos. Em seguida, as placas foram lavadas cuidadosamente com a adição de 200 μ L de PBS, até que os sobrenadantes ficassem límpidos. Por fim, as placas foram lidas no espectrofotômetro a 492 nm.

3.4.4. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Para a MEV, os biofilmes foram formados no fundo de placas de 24 poços e foi processado conforme descrito por Martinez e colaboradores (2010) com algumas modificações. As amostras foram lavadas três vezes com PBS para remoção das células planctônicas e fixadas com 1000 µL de solução de glutaraldeído (Sigma-Aldrich) a 2,5%, por 3 horas a temperatura ambiente. Em seguida, foram realizadas três lavagens com água destilada estéril. As amostras foram então desidratadas com concentrações crescentes de álcool etílico, de 50% a etanol absoluto à temperatura ambiente. Por último, realizou-se a secagem em temperatura ambiente. Antes da análise ao microscópio, as amostras foram montadas em cilindros de alumínio com prata (stubs) e colocadas em um evaporador de alto vácuo (Denton Vacuum Desk V, Jeol USA) para o revestimento de ouro. As características topográficas dos biofilmes foram analisadas em microscópio eletrônico de varredura (Jeol JSM-6610LV).

3.4.5. Efeito da 3'- chalcona frente aos biofilmes maduros

A capacidade do composto contra as duas cepas de *C. gattii*, ATCC 56990 e o isolado 118, de causar danos aos biofilmes maduros foi verificada. As formações dos biofilmes de *C. gattii* ATCC 56990 e o isolado 118 foram realizadas como descrito no item 3.3.1. Os biofilmes foram formados em placas de 96 poços e o composto foi testado no intervalo de concentração de 250 – 0,48 µg/mL. As placas foram incubadas a 37°C, sob agitação de 100 rpm, por 24 e 48h. Após esse período, o meio foi retirado, as células foram lavadas e a atividade metabólica dos biofilmes tratados foi quantificada através do ensaio de redução do XTT, conforme descrito por Martinez e Casadevall (2006).

3.4.6. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) biofilme tratado

Para uma visualização mais detalhada da ação do composto sobre biofilme *in vitro* de *C. gattii*, foi realizada a microscopia eletrônica de varredura (MEV). O biofilme foi formado em placa de 24 poços e após sua maturação, foi colocado em contato com o composto nas concentrações que causaram maior redução da atividade metabólica no item 3.4.5. Após o tratamento, foi realizada a microscopia eletrônica de varredura (MEV) como descrita no item 3.4.3.

3.5. ENSAIOS DE TOXICIDADE DA 3'- CHALCONA EM EMBRIÕES DE ZEBRAFISH

Os embriões de Zebrafish (wild type) foram obtidos segundo a criação por casais em criadeiras próprias para assim terem as mesmas horas pós-fertilização (hpf). Esses embriões foram examinados sob uma lupa e aqueles que tinham se desenvolvido sem alterações, foram selecionados para os subsequentes experimentos de determinação da concentração letal 50% (CL50) pós-fertilização. Aproximadamente no estágio 1-2 hpf, 128 ovos fertilizados foram transferidos para placas de 96 poços (dois embriões por poço). Tendo as duas primeiras filas horizontais da placa como controles com meio embriônico (NaCl; KCl; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; H_2O e azul de metileno 0,03%), as três seguintes filas (triplicata) com DMSO como controle do solvente da chalcona em diferentes concentrações (0,0625; 0,125; 0,25; 0,375; 0,5; 0,625; 0,75; 1 $\mu\text{L/mL}$) (MAES *et al.*, 2012); e outra placa com 16 embriões por concentração da 3'- chalcona, também triplicata (1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 16 $\mu\text{g/mL}$). As leituras realizadas destes experimentos foram às 6, 24 e 48 hpf, e as observações foram até 120 hpf. Foram observados parâmetros como a formação de coagulação, atraso no desenvolvimento embrionário, malformações, pigmentação nos olhos e no corpo e a taxa de mortalidade. As imagens foram tomadas através da lupa Zeiss (Discovery. V12). A metodologia foi seguida segundo Busquet e colaboradores (2014).

3.6. ESTUDO DA ATIVIDADE DA 3' CHALCONA EM *G. MELLONELLA*

3.6.1. Infecção e tratamento das larvas com *C. gattii*

Grupos de 16 larvas com peso entre 0,1 e 0,2 g foram colocados em placas de Petri e incubados a 37°C, na noite anterior aos experimentos. Suspensões fúngicas de *C. gattii* (ATCC 56990 e o isolado ambiental 118) foram preparadas em PBS com ampicilina 20 mg/L para que a concentração na larva fosse 1×10^6 células. A última pró-pata esquerda das larvas foi limpa com etanol 70% e 10 µL das suspensões fúngicas foram injetadas com auxílio de uma seringa Hamilton. As larvas infectadas com os fungos foram tratadas com 10 µL na última pró-pata direita com diferentes doses da 3'- chalcona para a inoculação; também foi empregado como controle o fármaco AmB. Grupos de larvas não infectadas foram tratados com o composto para testar a toxicidade. As placas foram incubadas a 37°C por 7 dias. A morte das larvas foi avaliada diariamente por inspeção visual da falta de movimento. No mínimo três experimentos independentes foram realizados. Antes de começar estes experimentos, foram reativadas as duas cepas em camundongos, pelo reisolamento no pulmão.

3.6.2. Determinação da carga fúngica em *G. mellonella*

Do experimento do item anterior, quatro larvas de cada grupo infetado com o fungo foram coletadas nas 48h. Após coleta, as larvas foram lavadas com etanol 70% e cortadas em pequenos pedaços com um bisturi. Os tecidos foram macerados em 1 mL de PBS-ampicilina e plaqueados em meio Sabouraud. As placas foram colocadas durante 2 dias a temperatura ambiente. Após esse período, as unidades formadoras de colônias (UFCs) foram contadas.

3.7. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Todos os ensaios foram realizados no software GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA). O análises do biofilme foi realizado com o t teste ou ANOVA seguido pela correção do Bonferroni. A curva de sobrevivência foi analisada usando log-rank (Mantel – Cox) teste. A carga fúngica foi analisada usando o análises de variância (ANOVA) com pôs teste de Bonferroni. A avaliação do $P < 0,005$ foi considerada estatisticamente significativa.

4. RESULTADOS

4.1. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA

4.1.1. Teste para determinação da concentração inibitória mínima (CIM)

Com a análise da atividade da substância, a 3'-chalcona apresentou os melhores resultados para a cepa 118, com CIM de 0,96 µg/mL; enquanto que para a cepa ATCC 56990 de *C.gattii*, a chalcona mostrou ação potente com CIM entre 1,95 e 3,90 µg/mL, mas não mostrou atividade significativa frente a *Candida parapsilosis* ATCC 22019, 125 µg/mL. Foi observado que os valores da CFM e da CIM das substâncias foram os mesmos, portanto foi constatada atividade fungicida da 3'-chalcona para as cepas de *C. gattii*. Em relação ao fluconazol, a cepa ATCC e *C. parapsilosis* mostraram-se sensíveis e o isolado resistente 118 mostrou-se resistente a esse fármaco, como esperado. Já para à AmB todas as cepas mostraram-se sensíveis, com CIMs que variaram entre 0,031 e 0,5 µg/mL. Os valores do CIM encontrados para a 3'-chalcona foram bem inferiores aos valores de CIM observados frente ao fluconazol, o que indica maior atividade dessas moléculas quando comparada ao agente terapêutico utilizado na clínica. Por outro lado, em comparação com a AmB, esta apresentou melhores valores que a substância. A leitura realizada com a resazurina foi outro método de confirmação dos métodos da CIM e da CFM (Tabela 1).

Tabela 1. Resultados do teste de sensibilidade das cepas de *C. gattii* testadas com 3'- chalcona. Concentração inibitória mínima e concentração fungicida mínima em µg/mL e resazurina.

	3'- CHALCONA			FLUCONAZOL			ANFOTERICINA B		
	CIM	CFM	RSZ	CIM	CFM	RSZ	CIM	CFM	RSZ
ATCC 56990	3,875	3,875	1,930	8	16	8	0,031	0,031	0,125
118	0,960	0,960	0,960	32	32	32	0,0625	0,0625	0,0625
<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019	125	125	125	8	8	8	0,5	0,5	1

CIM: concentração inibitória mínima; CFM: concentração fungicida mínima; RSZ: resazurina

4.2. ESTUDO DO BIOFILME DE *C. GATTII*

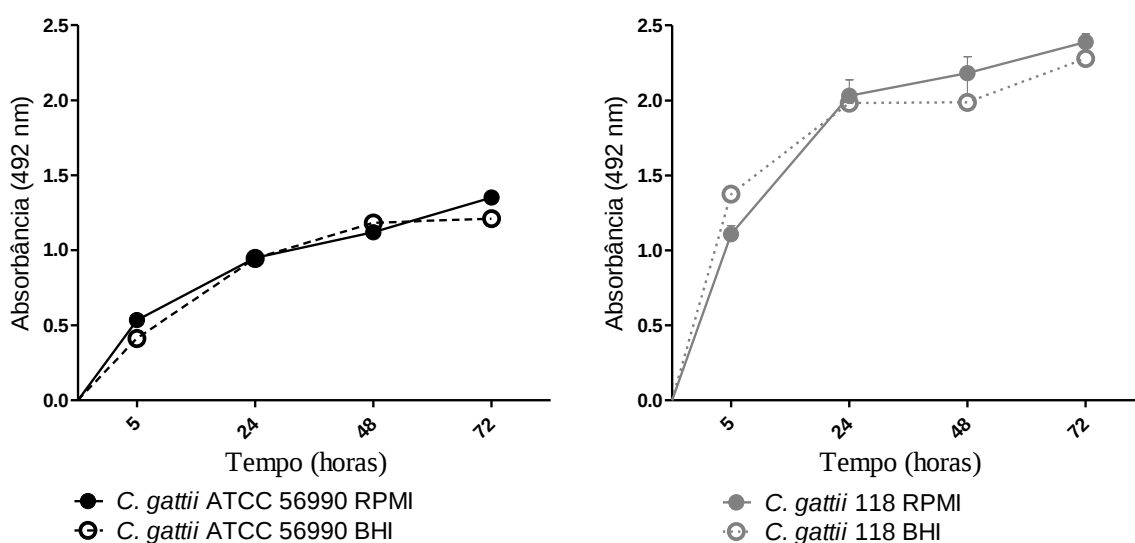
4.2.1. Atividade metabólica dos biofilmes

A cinética de formação de biofilme pela cepa de *C. gattii* ATCC 56990 e o isolado 118 foi verificada pelo ensaio de redução de XTT. Os resultados das atividades metabólicas dos biofilmes estão dispostos na **Figura 2**. Nesse ensaio, a atividade da enzima desidrogenase mitocondrial reduz o sal de tetrazólio a sal de formazana, mudando assim a coloração (Martinez e Casadevall, 2006). Tanto no biofilme da cepa ATCC quanto no biofilme do isolado ambiental, formados nos diferentes meios, pôde-se observar que a atividade metabólica inicial ocorreu após as 5 horas de incubação, correspondendo ao período de pré-adesão. Na cepa ATCC 56990 houve um aumento significativo da atividade metabólica até 48 horas. Após esse período, houve a tendência de atingir um *plateau*. Nos biofilmes formados pelo isolado ambiental, observou-se um comportamento diferente, nos quais as atividades metabólicas, em ambos os meios, exibiram valores maiores que os biofilmes formados pela cepa ATCC, com crescimento considerável até 24 horas. Após esse período, houve ligeiro aumento da atividade, com a tendência de

formação de um *plateau*, seguido por outro ligeiro aumento da atividade metabólica após as 48h de incubação. Foram realizados pelo menos 6 experimentos independentes.

Não houve significância estatística entre os valores da atividade metabólica nos biofilmes formados nos diferentes meios e, devido à tendência de formação de um *plateau* após as 48 h, nos biofilmes formados pela cepa ATCC, esse período foi considerado o tempo ideal para a maturação dos biofilmes de *C. gattii*.

Figura 2. Cinética de formação de biofilme de *C. gattii* ATCC 56990 (esquerda) e o isolado 118 (direita) em placas de poliestireno de microtitulação, conforme determinado pela redução colorimétrica do ensaio XTT. Dados expressos com média $\pm$ desvio padrão. Este experimento foi realizado seis vezes, com resultados similares cada vez.

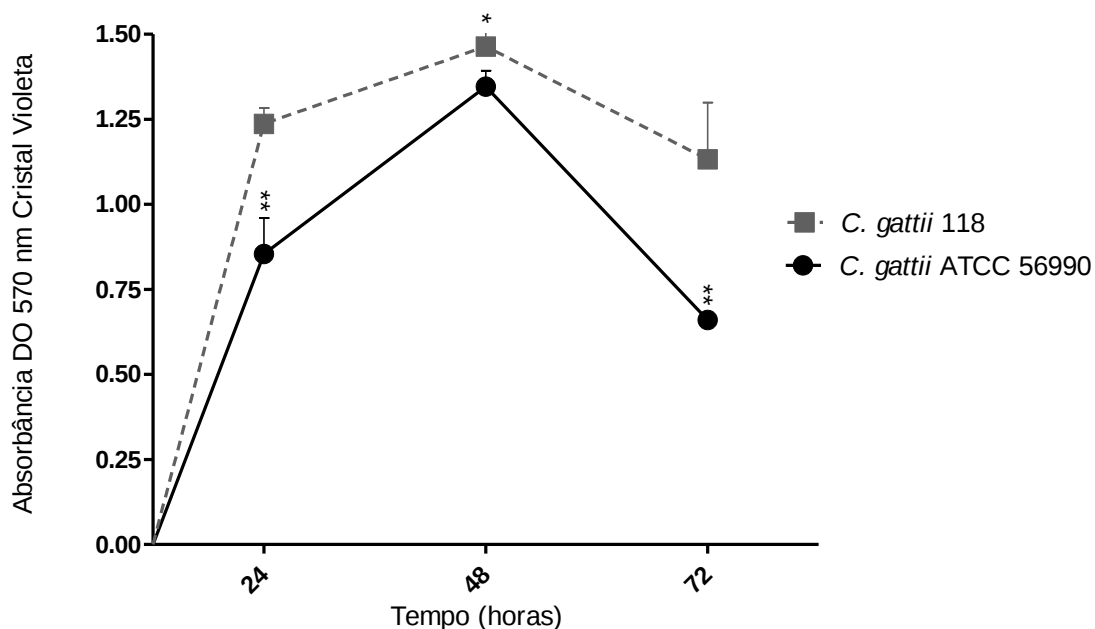


4.2.2. Quantificação do biofilme

4.2.2.1. Quantificação da massa do biofilme por coloração com cristal violeta

A massa do biofilme formado em meio RPMI, em função do tempo, foi quantificada pela coloração com cristal violeta. Os resultados dispostos na **Figura 3** mostraram que os valores das absorbâncias cresceram com tempo, indicando um valor máximo nas 48 horas de incubação. Após as 48 horas, observou-se um decréscimo nos valores de absorbância, reforçando que esse período é o ideal para a maturação dos biofilmes de *C. gattii*. Os biofilmes formados pela cepa 118 formaram mais biomassa que os biofilmes da cepa ATCC nos tempos de 24 horas e 72 horas, pois são os tempos que mostram diferença significativa.

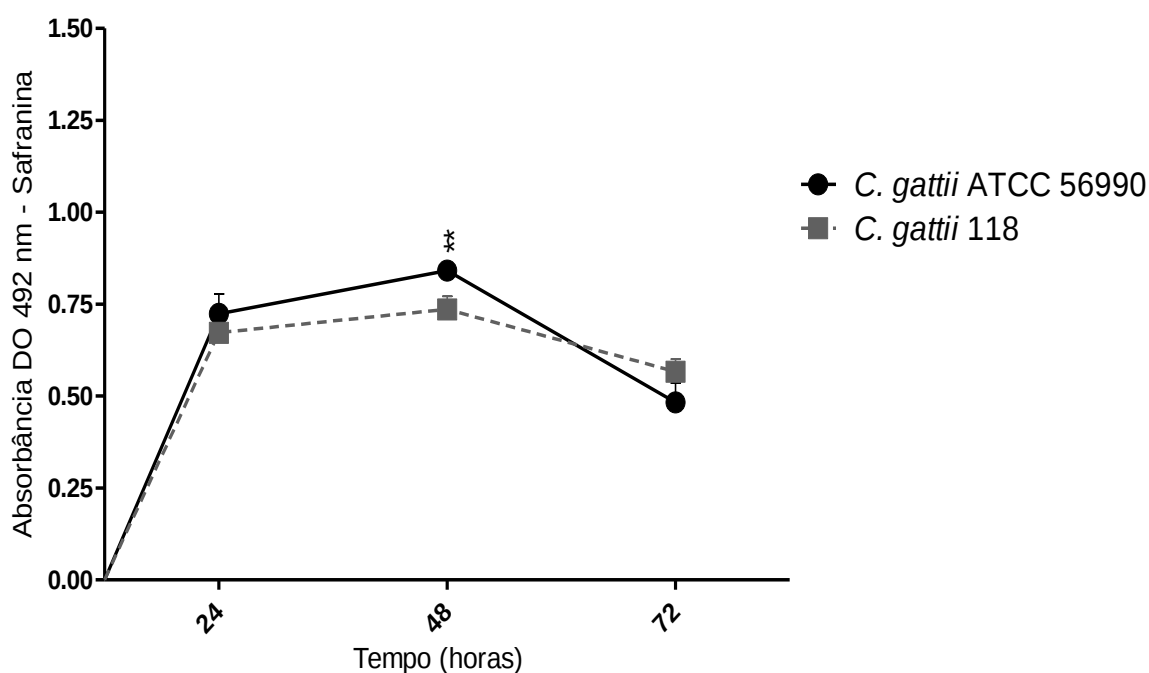
Figura 3. Quantificação da biomassa pela coloração com cristal violeta das cepas de *C. gattii* ATCC 56990 e o isolado 118. Dados expressos com média $\pm$ desvio padrão. Foram realizados três experimentos independentes, com resultados similares. Os asteriscos denotam redução significativa (** $p < 0,01$).



4.2.2.2. Quantificação da matriz extracelular pela coloração com safranina

A quantificação da matriz extracelular e do material polissacarídico foi feita pela coloração com safranina em diferentes tempos de formação do biofilme. Os resultados estão dispostos na **Figura 4**, onde tanto a cepa *C. gattii* ATCC 56990 quanto o isolado 118, apresentaram um comportamento similar, alcançando um valor máximo em 48 horas, seguido de decréscimo após esse período. Neste caso, cepa ATCC parece ter uma maior absorbância estatisticamente significativa nas 48h e, portanto, maior formação de biomassa que o isolado 118.

Figura 4. Quantificação da matriz extracelular pela coloração com safranina. Dados expressos com média $\pm$ desvio padrão. Este experimento foi realizado três vezes, com resultados similares cada vez. Os asteriscos denotam redução significativa (** $p < 0,01$).



4.2.3. Efeito antifúngico dos fármacos nos biofilmes

A 3'- chalcona foi empregada para a avaliação dos efeitos dos compostos nos biofilmes pré-formados de *C. gattii*, ATCC 56990 e o isolado 118, preparados em meio RPMI 1640 e incubados por 24 e 48 horas com as soluções trabalho da 3'- chalcona e dos fármacos fluconazol e AmB nas seguintes concentrações: 3'- chalcona: 250 – 0,48 µg/mL; fluconazol: 512 - 1 µg/mL e AmB: 256 - 0,5 µg/mL. Também foram incluídos no ensaio os controles de esterilidade (controle negativo) e os biofilmes sem tratamento (controle positivo). Após esse período de incubação, as atividades metabólicas dos biofilmes tratados foram quantificadas através do ensaio de redução do XTT e as placas foram lidas no leitor de Elisa, no comprimento de onda de 492 nm. Os dados foram analisados através da medida da densidade óptica, conforme previamente descrito por Martinez e Casadevall (2006) para os biofilmes de *C. neoformans*. Para o fluconazol, estimado um fármaco fungistático, foi considerado efetivo numa inibição de pelo menos 50% da atividade metabólica quando comparada ao controle sem tratamento. Para a AmB e a chalcona, considerados fungicidas, foi considerada efetiva a inibição de pelo menos 80% da atividade metabólica quando comparado ao controle sem tratamento.

Para o fluconazol, a concentração de 512 µg/mL reduziu em mais de 50% a atividade metabólica dos biofilmes de *C. gattii* ATCC 56990, em comparação com a atividade metabólica obtida no controle sem o fármaco. Com respeito ao efeito do fluconazol frente ao isolado 118, o isolado mostrou-se resistente ao fármaco em todas as concentrações como o esperado segundo a sensibilidade reduzida que apresenta (**Figura 5**). Para a AmB, todas as concentrações testadas foram capazes de reduzir em mais de 80% as atividades metabólicas dos biofilmes formados pela cepa ATCC e pelo isolado 118 (**Figura 6**).

Figura 5. Biofilmes de *C. gattii* tratados com diversas concentrações (1; 2; 4; 8; 16; 32; 64; 128; 256; 512 µg/mL) de fluconazol durante 48 h. Dados expressos com média ± desvio padrão. Este ensaio foi realizado três vezes para a cepa ATCC 56990 e o isolado 118. Os asteriscos denotam redução significativa (**p<0,001). Em ambos gráficos pode se ver que em todas as concentrações do fluconazol, as cepas mostram-se resistentes, exceto a 512 µg/mL com a ATCC 56990 que inibe o biofilme em mais de 50%.

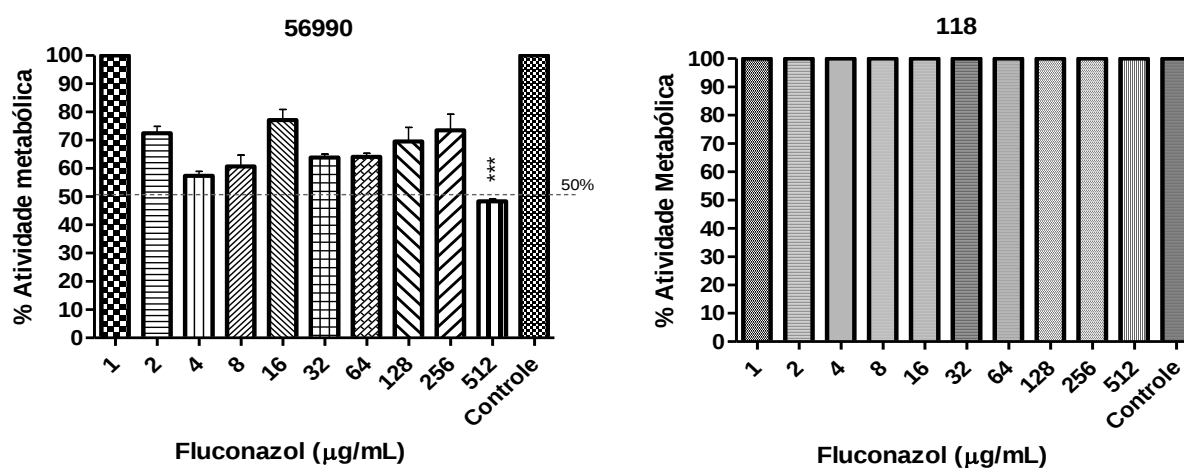
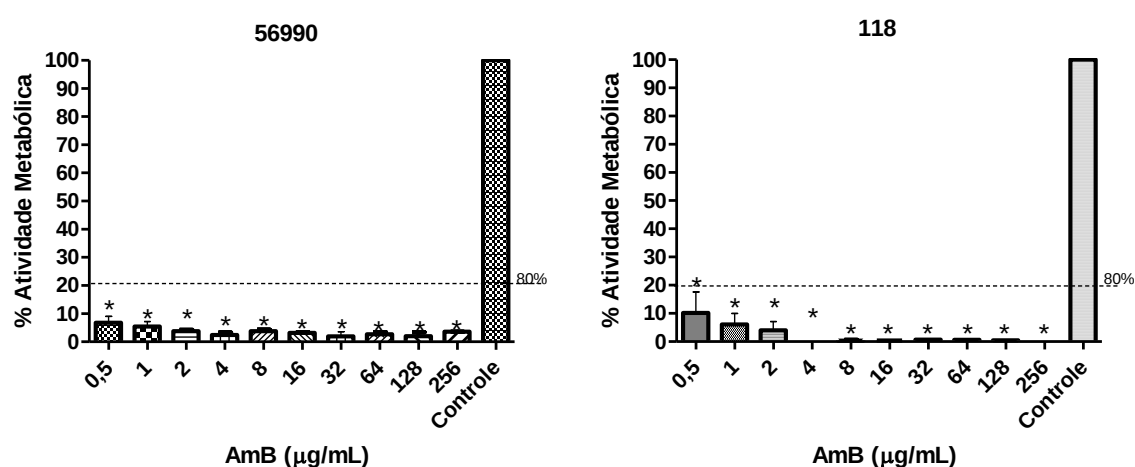
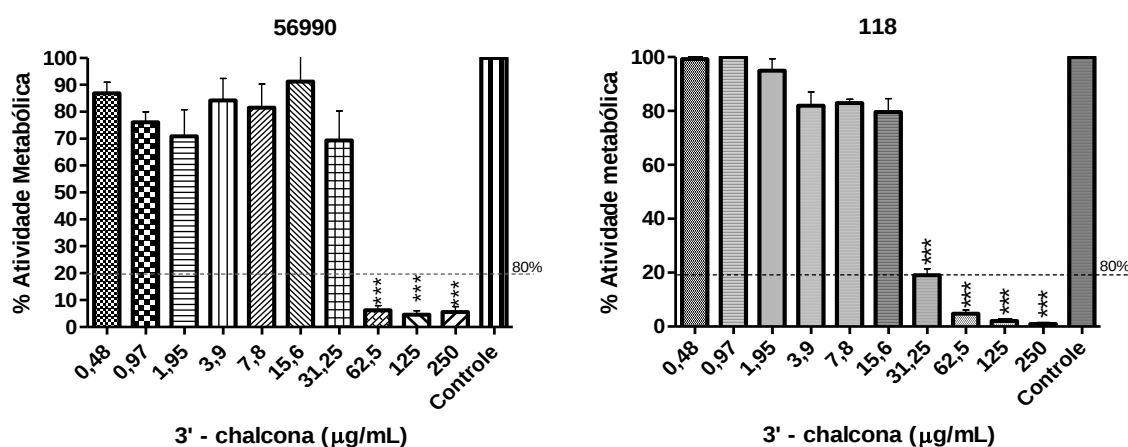


Figura 6. Biofilmes de *C. gattii* expostos a diversas concentrações (0,5; 1; 2; 4; 8; 16; 32; 64; 128; 256 $\mu\text{g/mL}$) de AmB durante 48 h. O efeito foi comparado com a produção das células de fungos incubadas em PBS através do ANOVA com pós teste de Bonferroni. Dados expressos com média $\pm$ desvio. Os asteriscos denotam redução significativa (* $p < 0,001$). Este ensaio foi realizado três vezes para as duas cepas de *C. gattii*. Neste caso, é possível ver uma inibição do biofilme em mais de 80% para todas as concentrações usadas de AmB.



Para a 3'- chalcona as concentrações acima ou iguais a 62,5 $\mu\text{g/mL}$ inibiram o biofilme por *C. gattii* ATCC 56990. Para o isolado 118 as concentrações maiores ou iguais a 31,25 $\mu\text{g/mL}$ preveniram a formação dos biofilmes (**Figura 7**). De acordo com o demonstrado, a 3'- chalcona foi capaz de inibir os biofilmes das cepas de *C. gattii* ATCC 56990 e o isolado ambiental 118.

Figura 7. Biofilmes de *C. gattii* expostos a diversas concentrações (0,48; 0,97; 1,95; 3,9; 7,8; 15,6; 31,25; 62,5; 125; 250 µg/mL) de 3'- chalcona durante 48 h. O efeito foi comparado com a produção das células de fungos incubadas em PBS através do ANOVA com pós teste de Bonferroni. Dados expressos com média $\pm$ desvio padrão. Os asteriscos denotam redução significativa (**p<0,001). Este ensaio foi realizado três vezes para as duas cepas de *C. gattii*. A 3'- chalcona mostrou atividade de mais de 80% numa concentração de 62,5 µg/mL para ATCC 56990 e de 31,25 µg/mL para o isolado 118.



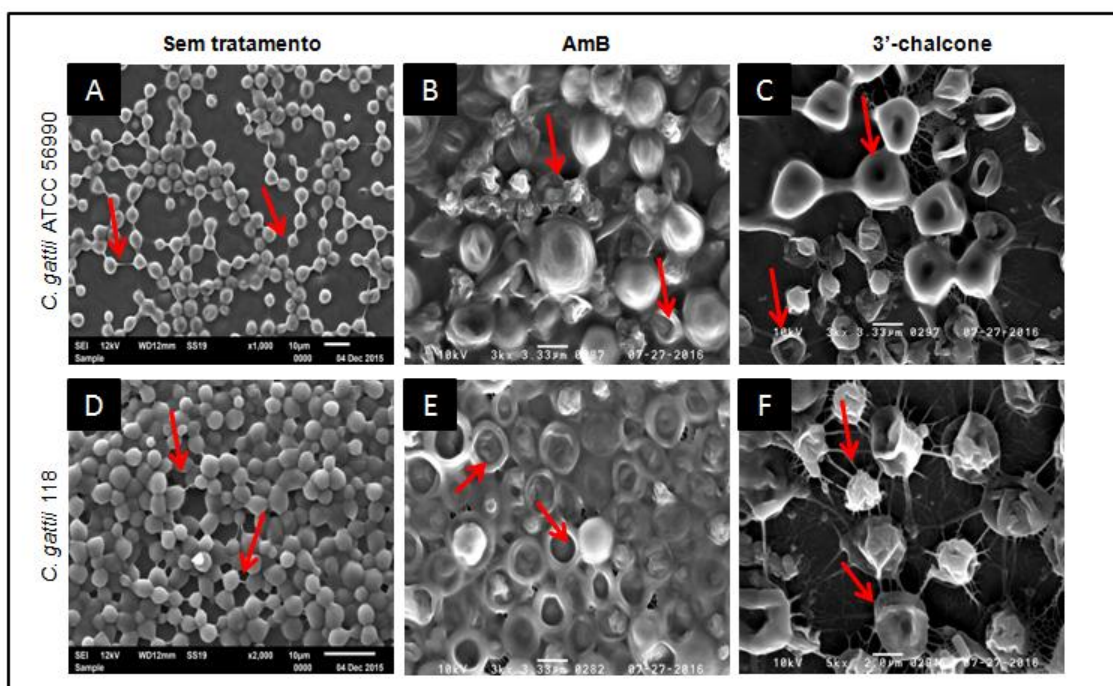
4.2.4. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

As topografias dos biofilmes maduros e tratados de *C. gattii* ATCC 56990 e o isolado 118 foram verificados através de microscopia eletrônica de varredura na **Figura 8**. No caso do biofilme maduro, é possível perceber um grupo condensado de células na conformação tridimensional ligado por uma matriz extracelular que elas produzem (**Figura 8A e 8D**). Observou-se uma biomassa mais compacta no biofilme do isolado 118, correspondente ao biofilme maduro, com as células conectadas através de uma matriz extracelular polimérica.

Por outro lado, com o tratamento, ainda foi possível observar uma grande quantidade de matriz extracelular cobrindo os biofilmes danificados. O biofilme foi formado após 48 h de incubação e colocado em contato por outras 48 h com AmB a 0,5 µg/mL pode ser visto na **Figura 8 (B e E)**, observou-se graves

danos em toda a extensão dos biofilmes. A concentração de 62,5 µg/mL da 3' chalcona foi testada contra a cepa ATCC como pode ser observado na **Figura 8C**. Já para o biofilme da cepa 118 foi usado um tratamento de 31,2 µg/mL da chalcona, **Figura 8F**. Além do dano celular, foi observada uma pequena quantidade de matriz extracelular (ECM), indicando que o composto poderia também ter atuado na destruição do material de polissacarídeo.

Figura 8. Microscopia eletrônica de varredura da formação do biofilme de *C. gattii* ATCC 56990 e *C. gattii* 118 após 48h de incubação (Figura 8A e 8D) e com tratamento de mais 48h (Figura 8B, 8C, 8E, 8F). Esse experimento foi realizado duas vezes, com resultados similares cada vez. As setas vermelhas apontam a matriz extracelular. Posteriormente são mostrados os biofilmes maduros de *C. gattii* ATCC 56990 (B) e o biofilme *C. gattii* 118 (D) tratados com AmB a 0,5 µg/mL. Por último, de *C. gattii* ATCC (C) tratados com 3'- chalcona a 62,5 µg/mL e *C. gattii* 118 (F) tratados com 3'- chalcona a 31,2 µg/mL. Nesses casos, as setas vermelhas apontam o dano do causado pelo fármaco.



4.3. TESTE DE TOXICIDADE DA 3'- CHALCONA EM EMBRIÕES DE ZEBRAFISH

A avaliação dos embriões de Zebrafish foi realizada nos tempos de 6, 24 e 48 hpf (horas pós fertilização), nos quais observou-se diferentes fases do desenvolvimento embrionário. O controle do solvente da chalcona, DMSO não apresentou toxicidade para nenhuma das concentrações testadas pelo que verificou que as possíveis toxicidades não foram causadas por dito composto. Diferentes concentrações de 3'- chalcona foram testadas desde 16 a 1 µg/mL e é possível notar na **Figura 9A** que o efeito tóxico sobre o desenvolvimento embrionário aumenta de forma proporcional ao aumento da concentração da substância. Além disso, os resultados revelaram uma CL50 (concentração letal 50%) de $3,42 \pm 0,46$ µg/mL em 48 hpf. A **Figura 9B** apresenta as porcentagens de sobrevivência segundo os valores nas concentrações empregadas após 48 hpf. Na **Figura 10 (A-D)** apresentam-se embriões nas diferentes fases com desenvolvimentos normais (controle), período de gástrula, segmentação, faríngula, eclosão e larva formada. Na **Figura 10E**, é possível observar um embrião com um efeito denominado coagulação em consequência da não formação devido ao contato com a 3'-chalcona em uma concentração de 16 µg/mL. Nas outras figuras podem ser vistos desenvolvimentos tardios ou/e malformações em comparação com seus controles, como na **Figura 10F** na que o embrião teria que estar na fase de faríngula, mas não passou da fase de segmentação (3'-chalcona 2 µg/mL). A **Figura 10G** com ausência de pigmentação na pele e nos olhos (3'-chalcona 1 µg/mL) e na **Figura 10H** onde ainda permanece dentro do córion e com um grande saco vitelino (3'-chalcona 2 µg/mL).

Figura 9. (A) Curva de sobrevivência de embriões de Zebrafish em contato com diferentes concentrações de 3'-Chalcona em 6, 24 e 48 hpf (horas pós fertilização). **(B)** Porcentagens de sobrevivência dos embriões segundo as concentrações testadas nas 48h.

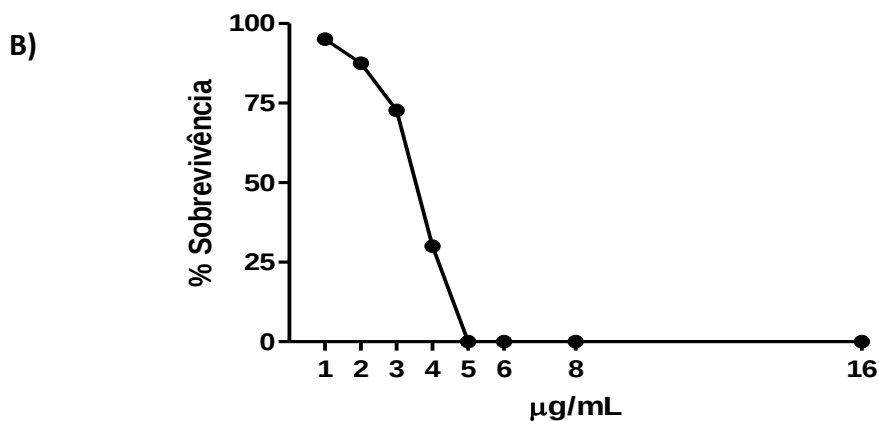
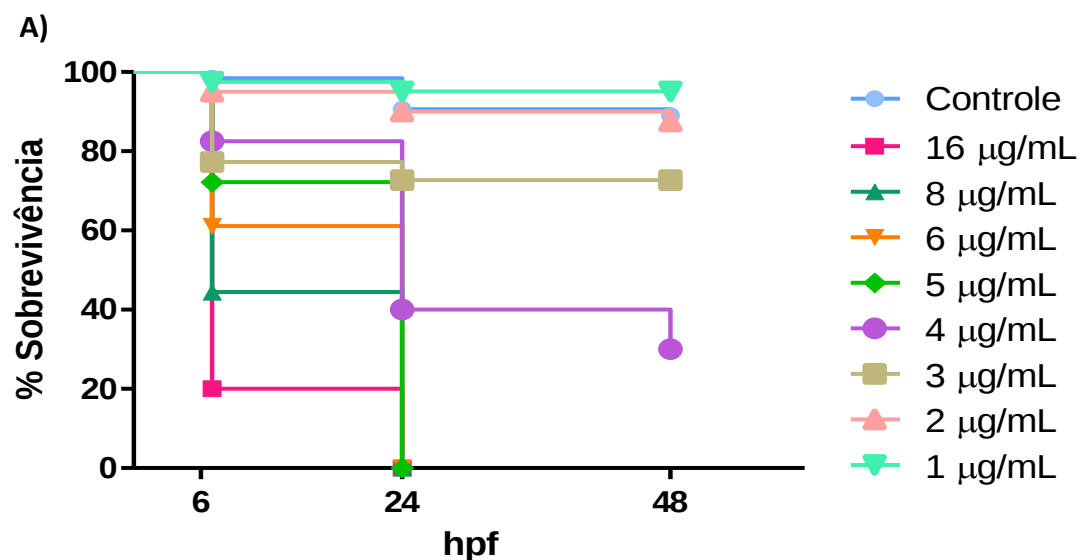
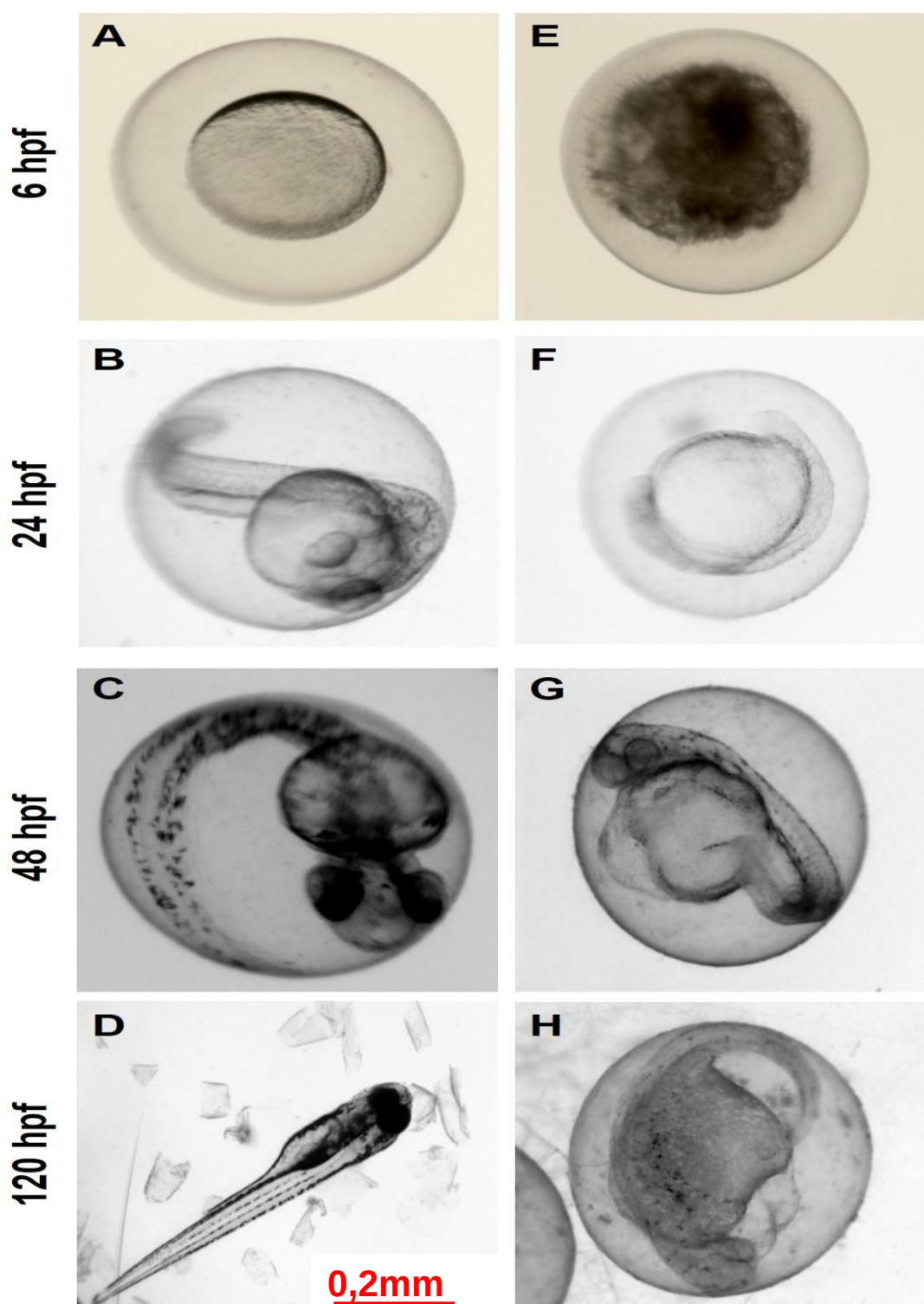


Figura 10. Imagens de embriões de Zebrafish capturadas através da lupa Zeiss (Discovery. V12) com um objetivo de 40x. Embriões com desenvolvimentos normais como controle (A-D) e embriões com efeitos teratogênicos em contato com a 3'- chalcona com concentrações de 16 $\mu\text{g/mL}$ na figura E, 2 $\mu\text{g/mL}$ na figura F e H e 1 $\mu\text{g/mL}$ na figura G no tempo de 6, 24, 48 e 120 horas pós fertilização (E-H).

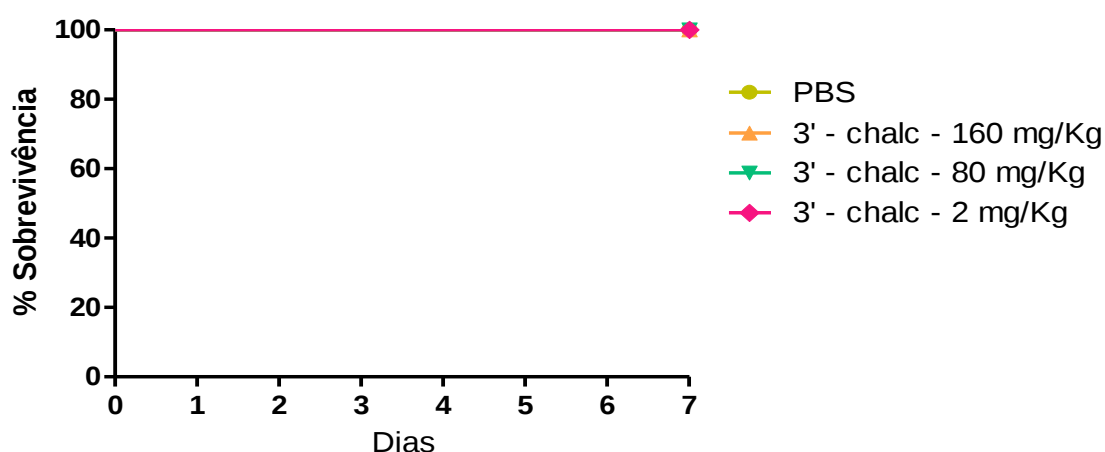


4.4. ESTUDO DA ATIVIDADE DA 3'- CHALCONA EM *G. MELLONELLA*

4.4.1. Toxicidade

As larvas foram tratadas com a 3'- chalcona nas doses de 160, 80 e 2 mg/kg, sem infecção com *C. gattii*. Na **Figura 11** é possível observar que a 3'- chalcona não foi tóxica em nenhuma das doses utilizadas, visto que não houve mortalidade das larvas.

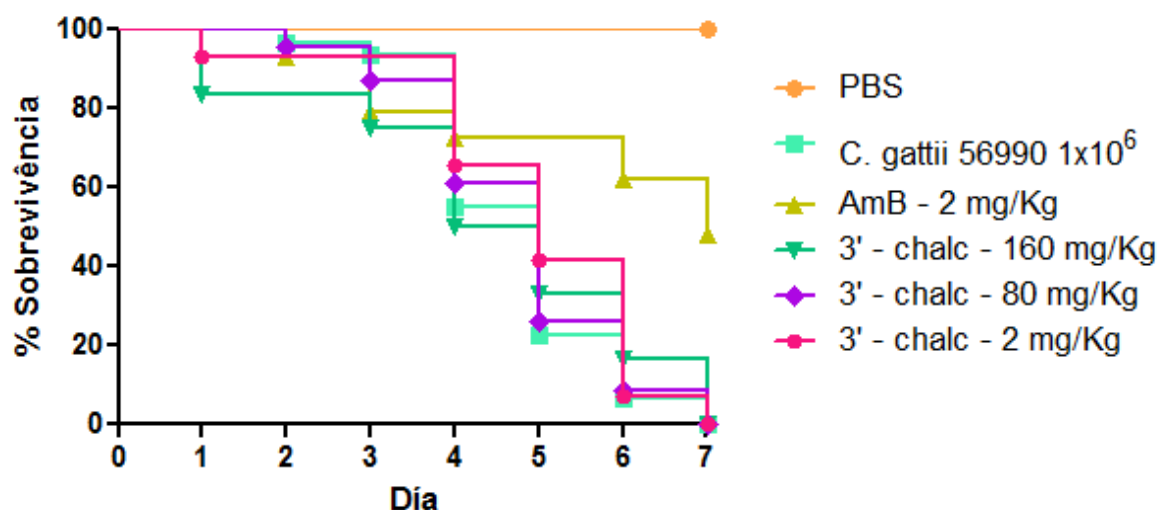
Figura 11. Curva de sobrevivência de larvas de *Galleria mellonella* não infectadas e tratadas com 3'- chalcona (160, 80 e 2 mg/kg)



4.4.2. Infecção e tratamento das larvas com *Cryptococcus gattii*

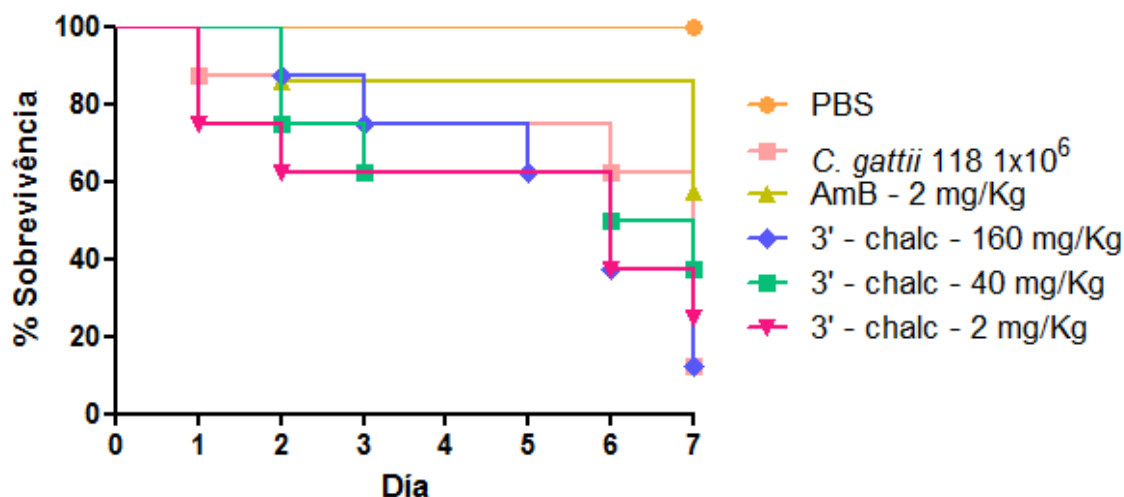
- *C. gattii* ATCC 59660: larvas infectadas com 1×10^6 células/larva *C. gattii* foram tratadas com AmB na dose de 2 mg/kg e 3'- chalcona com 160, 80 e 2 mg/kg. Como é possível notar na **Figura 12**, a cepa *C. gattii* ATCC 59660 foi virulenta para as larvas, pois a maioria das larvas morreram ao final de 7 dias de observação. O tratamento com AmB aumentou significativamente a sobrevivência das larvas ($p < 0,05$). Já o tratamento com a 3'- chalcona não mostrou eficácia contra *C. gattii* ATCC 59660 no modelo *G. mellonella* em nenhuma das doses testadas.

Figura 12. Curva de sobrevivência de larvas de *Galleria mellonella* infectadas com a cepa *C. gattii* ATCC 59660 e tratadas com 3'- chalcona (160, 80 e 2 mg/kg).



- *C. gattii* 118: foram empregadas as mesmas condições que no experimento anterior, mas com o isolado 118. Na **Figura 13** é observado que o isolado 118 de *C. gattii* mostrou-se menos virulento que a cepa ATCC, pois não morreram todos os indivíduos ao final de 7 dias. Além disso, não foi observada diferença estatística entre o grupo tratado com AmB e o grupo não tratado, embora possa ser notada uma tendência no aumento da sobrevivência das larvas com este tratamento. Por outro lado, a 3'- chalcona não mostrou eficácia antifúngica contra *C. gattii* 118 nas larvas.

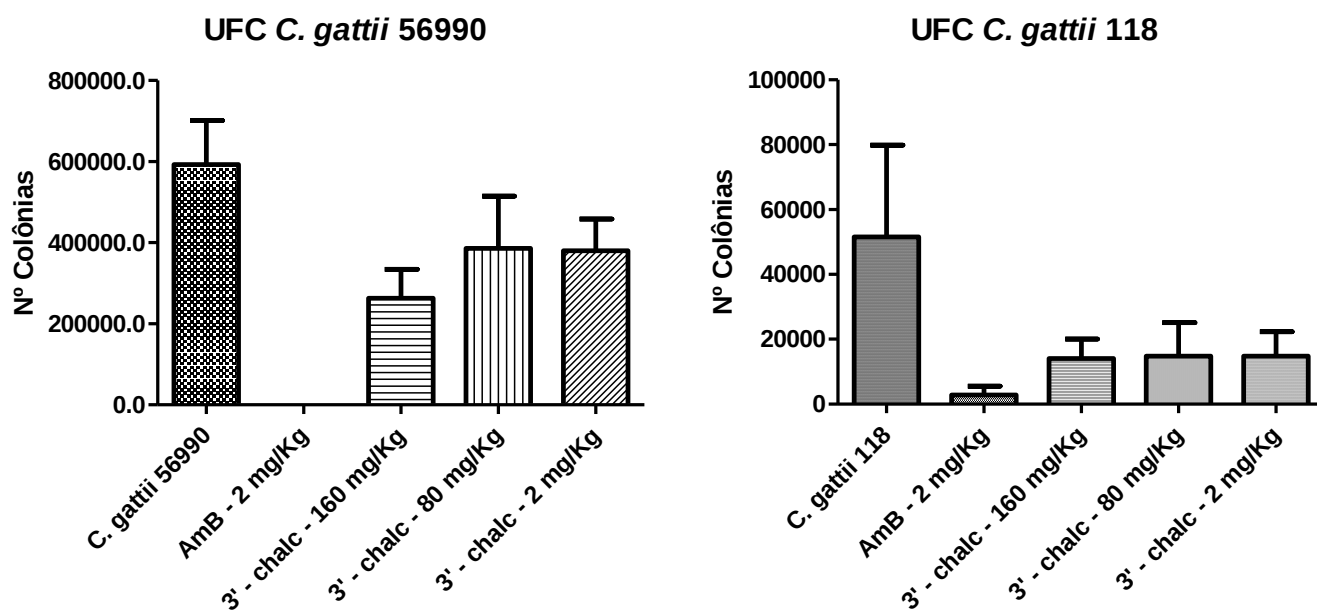
Figura 13. Curva de sobrevivência de larvas de *Galleria mellonella* infectadas com a cepa *C. gattii* 118 e tratadas com 3'- chalcona (160, 80 e 2 mg/kg).



4.4.3. Determinação da carga fúngica em *G. mellonella*

A carga fúngica foi determinada pela recuperação das leveduras infectadas com *C. gattii* e tratadas com AmB (2 mg/kg) e 3' chalcona (160, 80 e 2 mg/kg) na **Figura 14**. Observou-se grande diminuição no número de UFCs de *C. gattii* tratadas com AmB (2 mg/kg). Por outro lado, no tratamento com a 3'- chalcona não teve diferença, pois com a cepa ATCC, parece que diminui a formação de colônias, mas pela margem de erro não tem diferença um grupo do outro. Já para o isolado 118, teve uma menor formação no número de colônias em comparação com a primeira cepa, mas também a margem de erro não apresentou diferença entre as distintas condições. Pela análise estatística, só houve diferença com o tratamento da AmB e *C. gattii* ATCC 56990.

Figura 14. Efeito do tratamento antifúngico na carga fúngica de *Galleria mellonella* infectadas com 1×10^6 ufc/larva de *C. gattii*.



5. DISCUSSÃO

Das doenças fúngicas, as causadas por leveduras apresentam-se em destaque quando se considera a população imunocomprometida ou exposta a algum tratamento que interfira sobre a integridade funcional dos mecanismos de defesa destes pacientes (SILVA *et al.*, 2012). Em geral, nestes pacientes, microrganismos antes em comensalismo passam a se apresentar como parasitas resultando no desenvolvimento das micoses oportunistas (HUBE, 2004; ROMANI, 2004; HOHL *et al.*, 2006; ROMANI E PUC CETTI, 2006; GOW *et al.*, 2012). Por esse motivo, a criptococose representa expressiva porcentagem dos casos.

A dificuldade de tratamento das infecções fúngicas representa um problema importante a ser sanado. Os antifúngicos disponíveis mostram-se tóxicos, de alto custo e predispostos a permitir a recorrência de infecção (CHEN E SORRELL, 2007; KANAFANI E PERFECT, 2008; LIPP, 2008). Por serem eucariotas como os mamíferos, os fungos tornam-se dispendiosos e arriscados desafios para a indústria farmacêutica no estabelecimento de alvos farmacológicos para os medicamentos antimicrobianos (LUNA *et al.*, 2000; CHEN E SORRELL, 2007; LIPP, 2008). Apesar de seu amplo espectro e elevada capacidade antifúngica, atuando no ergosterol presente nas células fúngicas, o poliênico anfotericina B apresenta intensa toxicidade o que restringe seu uso além de implicar em cuidados especiais no período de sua utilização. Os derivados azólicos apresentam-se como opções nem sempre utilizáveis para algumas micoses sistêmicas e oportunistas. As peculiaridades farmacocinéticas e o alto custo no tratamento com azólicos em muitos casos tornam-se fatores limitantes ao pleno uso destes medicamentos (CHEN E SORRELL, 2007; LIPP, 2008).

Nesse cenário, estudos que envolvem a prospecção de novas moléculas antifúngicas surgem como fontes alternativas de novos fármacos, buscando maior eficiência, acessibilidade e menor toxicidade. No presente estudo foi empregada a substância 3'- chalcona (derivado sintético das chalconas) para

avaliar a sua ação antifúngica contra as cepas ATCC 56990 e o isolado 118 de *C. gattii*.

A molécula apresentou forte atividade anti-*Cryptococcus*, sendo os valores da CIM 1,95 µg/mL para a cepa ATCC 56990 de *C. gattii* e 0,96 µg/mL para o isolado 118. Mas não apresentou atividade frente à cepa controle, *Candida*, parecendo assim, que a 3'-chalcona apresenta atividade seletiva por *C. gattii*. Tendo em vista os mesmos resultados apresentados na CFM, foi sabida a atividade fungicida desta molécula.

Em outros estudos como os de Tavares e colaboradores (2011) avaliaram a atividade antifúngica de um grupo de 21 chalconas quinolínicas contra espécies do gênero *Candida*, *C. gattii* e *Paracoccidioides brasiliensis*. Os resultados mostraram os melhores resultados para *P. brasiliensis* e não apresentaram atividade significativa para *Candida*. Porém, grande parte dos compostos teve atividade contra *C. gattii*, obtendo como melhor CIM 7,80 µg/mL. Num estudo que obtém chalconas procedentes de frutas da árvore *Kamala*, avaliaram seus efeitos frente a várias espécies dos gêneros *Cryptococcus*, *Aspergillus* e *Candida*. As substâncias não apresentaram ação contra *Candida*, mas sim com *Aspergillus* (16 µg/mL) e *C. neoformans* (4-8 µg/mL) (KULKARNI *et al.*, 2014). Em outro estudo recente pesquisaram a atividade de 25 compostos derivados de chalconas e flavonóides contra bactérias, fungos como *Candida*, *C. neoformans*, dermatófitos e espécies do gênero *Aspergillus* resultando atividades diferentes segundo a molécula e bactéria/fungo, sendo pra os fungos um CIM entre 12,5 e 6 µg/mL (KANT *et al.*, 2016). Um estudo no que usaram uma serie de chalconas procedentes da planta *Myrica serrata*, avaliaram o mecanismo de ação das moléculas frente a fungo. Eles expõem que afetam às enzimas que catalisam a biossínteses dos polímeros de β (1,3)-glucano e de quitina da parede celular fúngica (KLIS, 1994; CID *et al.*, 1995). Finalmente, empregaram as três chalconas mais efetivas para ver a inibição *in vitro* frente às enzimas β (1,3)-glucano e quitina sintetases de *Saccharomyces cerevisiae*, verificando dita atividade frente aos respectivos polímeros, mas mostrando maior inibição frente a quitina sintetase que frente à glucano sintetase (LÓPEZ *et al.*, 2001).

Além disso, muitos outros estudos partem de extratos brutos de plantas em busca de mais possíveis tratamentos contra a criptococose. Cardoso e colaboradores (2016) estudaram a atividade antifúngica de óleos essenciais (nos quais os maiores componentes são linalool e geraniol) procedentes da planta *Ocimum basilicum* (var. Maria Bonita), considerada uma erva medicinal usada para combater dores de cabeça, tosse, vermes intestinal, desordens de rim e como um agente anti-espasmódico, sendo avaliados contra *C. neoformans* e cepas de *C. albicans* sensíveis e resistentes ao fluconazol. Geraniol apresentou os melhores resultados com CIM de 76 µg/mL contra *C. neoformans* e 152 µg/mL contra as duas cepas de *C. albicans*. No último estudo, Abu-Darwish e colaboradores (2016) utilizaram os óleos essenciais da planta *Artemisia judaica* (empregada para tratar infecções fúngicas, diabetes, aterosclerose, câncer e artrites) para validar seu uso tradicional antifúngico contra espécies de *Candida* e *C. neoformans*, dermatófitos e *Aspergillus*. A maior atividade antifúngica observada foi contra *C. neoformans* com uma CIM de 0,16 µg/mL e tiveram efeitos similares contra dermatófitos e *Aspergillus*, CIMs 0,64 µg/mL. O óleo essencial foi menos efetivo ante *Candida* spp.

Com o intuito de saber se a 3'- chalcona é uma candidata boa para o tratamento da criptococose, buscou-se avaliar também a capacidade da mesma para inibir o biofilme consolidado de ambas cepas em questão. Para isso, primeiramente foi necessário caracterizar a formação do biofilme maduro de ambas as cepas.

A análise dos resultados do desenvolvimento do biofilme no ensaio de redução do XTT mostrou que houve uma diferença nas atividades metabólicas dos biofilmes formados pela cepa ATCC e o isolado 118. Ambos apresentam atividades metabólicas com um pico após 24 horas, depois houve um pequeno crescimento até o final da leitura, mas os valores do isolado 118 foram maiores em comparação com a cepa ATCC. De acordo com Kuhn e colaboradores (2003), o ensaio de redução do XTT tem um valor importante na quantificação dos biofilmes formados por leveduras, mas não é possível supor que haja uma relação linear entre o número de organismos viáveis e a sinalização colorimétrica. Além disso, os autores relatam que diferentes cepas podem metabolizar o substrato de forma diferente e, muitas vezes, podem reter

intracelularmente os sais de formazana, prejudicando a leitura espectrofotométrica. Já em relação aos resultados da quantificação da biomassa e da matriz extracelular, foi observado que há um crescimento da produção de biomassa e material polissacarídico até às 48 horas de incubação, o que corresponde à etapa do biofilme maduro. Após as 48 horas, houve um decréscimo na produção de ambos, o que pode acontecer devido à fase de dispersão do biofilme.

Com respeito à avaliação dos antifúngicos, os resultados neste trabalho mostram que a AmB é capaz de inibir a formação do biofilme em mais de um 80%, o que corrobora com estudos realizados com *Cryptococcus* spp (MARTINEZ E CASADEVALL, 2006; BRILHANTE *et al.*, 2015), porém o fármaco fluconazol não apresentou atividade significativa ante a cepa ATCC e o isolado 118 mostrou-se resistente como foi reportado por outros autores (MARTINEZ E CASADEVALL, 2006; IÑIGO *et al.*, 2012). Neste estudo, a 3'-chalcona apresentou uma inibição contra a cepa ATCC 56990 de mais de 80% a uma concentração de 62,5 µg/mL e de 31,25 µg/mL frente ao isolado 118, o que verifica a propriedade fungicida desta substância. Além do ensaio do XTT, esses danos no biofilme podem ser constatados através das imagens obtidas pelo MEV.

Outros estudos têm sido executados tentando achar novas formas de combater o biofilme de *Cryptococcus* spp. Como o estudo de Martinez e colaboradores (2010), em que empregam quitosana, um polímero isolado do exoesqueleto de um crustáceo. A quitosana cria uma redução na atividade metabólica e viabilidade celular de *C. neoformans* a uma concentração maior de 0,04 mg/mL. Outros grupos estão avaliando a modulação e efeitos sinérgicos de compostos químicos com antimicrobianos tradicionais. Por exemplo, o EDTA inibe o crescimento do biofilme de *C. neoformans*, e essa inibição poderia ser reversada pela adição de magnésio ou cálcio, o que implica que o efeito inibitório é pela inanição do cátion bivalente. O EDTA reduz a liberação da glucuronoxilomanana (componente da cápsula do fungo) dentro da matriz exopolimérica, promovendo assim um potencial mecanismo para o efeito inibitório do componente catiônico. Porém, a adição de EDTA não faz que o biofilme seja mais suscetível frente a fármacos como o fluconazol

(ROBERTSON *et al.*, 2012). Estudos como os de De Aguiar Cordeiro e colaboradores (2013) nos quais combinam antifolatos como sulfamethoxazol–trimethoprim (SMX/TMP) e sulfadiazine–pyrimethamine (SDZ/PYR) mostram a inibição dos biofilmes maduros de várias espécies de *C. neoformans* e *C. gattii*, mas as concentrações testadas no estudo são superiores as doses administradas de cada fármaco na terapia. Brilhante e colaboradores (2015) usaram estatinas, descritas como metabólitos de microrganismos com a habilidade de baixar o colesterol e posteriormente foi demonstrado que reduz o crescimento de fungos como *Candida spp.*, *C. neoformans*, *Mucor spp.* e *Rhizopus spp.* Eles testaram várias dessas moléculas, obtendo o melhor resultado para a sinvastatina, a qual conseguia de forma isolada e combinada com os clássicos antifúngicos, inibir o crescimento e o biofilme maduro de *Candida spp.* e *Cryptococcus spp.* Cordeiro e colaboradores (2015) investigaram o efeito inibitório dos fármacos antituberculose isoniazida (INH) e ethionamida (ETH) isoladas ou combinadas com itraconazol e fluconazol. Eles demonstraram que INH e ETH isolados somente inibem os biofilmes de *C. neoformans* e *C. gattii* em altas concentrações, mas quando combinado com itraconazol, tem uma significativa redução da viabilidade e atividade metabólica.

É de grande importância o estudo da citotoxicidade das moléculas que se pretende apresentar como novos fármacos anti-*Cryptococcus*. Desta forma, em estudos anteriores no nosso laboratório, foi verificada a toxicidade da 3'-chalcona através da metodologia do MTT em diversas linhagens celulares relacionadas com tecidos humanos e atividades metabólicas relevantes para o processo infeccioso. Nesses resultados mostraram que a chalcona testada não apresentava citotoxicidade nas linhagens celulares ensaiadas (células da mucosa oral, NOK; células pulmonares normais, MRC-5; células de glioma humano, V87), somente na linhagem A549 (tumoral) quando são tratadas. A citotoxicidade é expressa como a concentração do composto inibidor do crescimento por 50% (IC50). Nesse estudo o IC50 foi maior ou igual a 31,25 µg/mL para a maioria de células testadas (GULLO F.P, 2012). Em outro estudo de Batovska e colaboradores (2010) por meio de ensaios clínicos mostraram que as chalconas atingem concentrações plasmáticas razoáveis e não apresentam toxicidade.

Ensaio de toxicidade eficientes e de alto rendimento em sistemas significativamente mais complexos que a cultura celular, que ao mesmo tempo reduzem o sofrimento potencial de organismos “mais” complexos, como camundongos e ratos, são necessários. Experimentos *in vivo* que envolvem o *Danio rerio* (e seus embriões) estão ganhando popularidade. Com esse objetivo, foi avaliada a possível toxicidade em embriões de zebrafish. Foi possível observar que nas primeiras 6 hpf somente as duas maiores concentrações da 3'-chalcona afetam em mais de um 50% aos embriões. Já em 24 hpf, além dessas concentrações, as de 6 e 5 µg/mL alcançam o 100% da mortalidade, parecendo desse modo, que às 24 hpf é o ponto mais pronunciado. Essa observação é encontrada no estudo de Tyl e colaboradores (2000) onde é dito que o ponto de vulnerabilidade das malformações teratogênicas é altamente dependente dos estágios do embrião. É sugerido que o estágio de desenvolvimento mais sensível e crítico acontece um dia após a fertilização (24 hpf), quando ocorre a organogênese. Nesta etapa, ocorre a rápida diferenciação de órgãos e a extensiva proliferação celular, as quais criam particulares fatores teratogênicos permitindo malformações estruturais. Os efeitos da 3'-chalcona sobre o desenvolvimento dos embriões de Zebrafish foram examinados em concentrações em torno da CIM como agente antifúngico. Assim, o valor obtido na CL50 está próximo da concentração necessária para a inibição da cepa ATCC de *C. gattii* (CIM 3,875 µg/mL), porém acima do valor usado contra o isolado 118 (CIM 0,96 µg/mL). Mas como foi visto anteriormente, a CIM não excede os valores da IC50 nos resultados da citotoxicidade. Os resultados de citotoxicidade não inviabilizam o uso da chalcona futuramente na clínica, porém os resultados em zebrafish mostram que deveria ser evitado em pacientes grávidas.

Outros estudos também empregaram os testes *in vitro* (cultura celular) – *in vivo* (Zebrafish) para o estudo de toxicidade de diversas moléculas. Em um estudo recente, foram empregados vários derivados de hidrazonas, as quais apresentaram potentes propriedades antifúngicas dentro dos valores de IC50 de citotoxicidade, mas provocaram algum tipo de malformação em embriões de Zebrafish (AJDACIC, 2016). No estudo de Rizzo e colaboradores (2013), foi testada a toxicidade em cultura celular e embriões de Zebrafish com

transportadores de fármacos poliméricos, nanopartículas de ouro e nanopartículas de ferro. Esses transportadores e nanopartículas de ouro apresentaram boas correlações entre os ensaios *in vitro* VS. *in vivo* em quanto a parâmetros tóxicos. Em contraste, as nanopartículas de ferro não foram tóxicas nos ensaios *in vitro*, mas apresentaram significativa toxicidade nos embriões de Zebrafish *in vivo*. Assim, o teste *in vivo*, fornece uma informação importante da teratogenicidade de um organismo, mas também pode apresentar potenciais discrepâncias. Outro estudo mostrou o efeito de diferentes azóis, como o flusilazol e hexaconazol, os quais provocaram malformações no embrião de Zebrafish. Tal efeito foi comparável aos resultados obtidos em testes de embriotoxicidade em mamíferos, no entanto, as concentrações efetivas foram diferentes. Estas variações poderiam ser explicadas por diferenças na absorção, distribuição e eliminação entre os modelos (HERMSEN *et al.*, 2011). Visto que existem várias vias de desenvolvimento conservadas entre vertebrados inferiores e superiores, o efeito teratogênico no Zebrafish serve como um indicador necessário para avaliar mais profundamente os efeitos teratogênicos dos compostos em vertebrados superiores (DUCHARME *et al.*, 2015).

De acordo com a guia do Centro Europeu de Validação de Métodos Alternativos, estudos de toxicidade de químicos e (nano) partículas em embriões de Zebrafish revelam um nível bastante aceitável de previsibilidade de toxicidade, variando desde “suficiente” (65-75%) até “bom” (75-85%) de previsibilidade. Esta discrepância está relacionada principalmente à não padronização das metodologias entre os diferentes instituições de investigação, bem como a falta de sistemática e definição de parâmetros para permitir uma boa comparação e validação de resultados (EIMON E RUBINSTEIN, 2009).

Os últimos objetivos do presente trabalho foram realizados no modelo alternativo *G. mellonella*. Antes de iniciar o tratamento em larvas infectadas, foi realizado o ensaio de toxicidade das substâncias para verificação de sobrevivência das larvas após contato, assim, garante-se que as larvas morrem devido à infecção e não pela toxicidade das substâncias. As dosagens utilizadas foram: 3'- chalcona 2, 80, 160 mg/kg, e foi comprovado pela ausência de morte, que a substância não é tóxica para esse modelo.

Após a verificação da toxicidade, as larvas foram infectadas com 10^6 UFC/larva de *C. gattii* ATCC 56990 e o isolado 118, e tratadas com anfotericina B (2 mg/kg) e 3'-chalcona (2, 80, 160 mg/kg). Se observarmos os grupos das larvas infectadas e não tratadas das diferentes cepas, podemos constatar que a cepa ATCC apresentou-se mais virulenta que o isolado 118, pois na mesma, no último dia de experimento morreram todas as larvas enquanto que as larvas infectadas com o isolado 118 tiveram uma sobrevivência de 15%. Estudos com diferentes cepas de *C. gattii* e o modelo alternativo *G. mellonella*, mostram que a virulência não é especificamente associada com um tipo molecular de *C. gattii*, mas que depende bastante dos atributos individuais da cepa (FIRACATIVE, DUAN E MEYER, 2014).

Com respeito ao tratamento, foi visto que nenhuma das doses tratadas com a 3'- chalcona foram efetivas na infecção, pois não houve aumento da sobrevivência das larvas tratadas e não tratadas. Analisando os resultados obtidos na carga fúngica também é possível comprovar que o número de unidades formadoras de colônias não apresenta diferenças significativas entre os diversos grupos testados. O uso de modelos animais alternativos é uma opção na busca de novos compostos antifúngicos naturais que permitem a triagem em relação a sua toxicidade e atividade. Estudos demonstram a correlação entre a virulência de fungos em *G. mellonella* e modelos mamíferos, sugerindo que o sistema *G. mellonella* – *C. neoformans* pode ser usado também para a avaliação *in vivo* de novos agentes antifúngicos e que poderia substituir o uso de modelos mamíferos. Nesse estudo, cepas de *C. neoformans* foram avaliadas com os tratamentos com anfotericina B e flucitosina os quais prolongaram a sobrevivência e diminuíram a carga fúngica nos tecidos (MYLONAKIS *et al.*, 2005). De Lacorte Singulani e colaboradores (2016) avaliaram a eficácia de AmB e itraconazol contra as cepas *Paracoccidioides brasiliensis* and *P. lutzii*, o que aumentou a sobrevivência das larvas e redução da carga fúngica. O pré-tratamento e tratamento com caspofungina para larvas infectadas com *C. albicans* apresentou sucesso aumentando a sobrevivência das larvas (KELLY E KAVANAGH, 2011). Em estudos adicionais, o modelo *Galleria-C. albicans* foi otimizado e utilizado para avaliar a eficácia de fluconazol, anfotericina B e flucitosina (LI *et al.*, 2013). Tratamentos

antifúngicos contra outras espécies de *Candida* foram testados e tiveram correlação com ensaios *in vitro* e eficácia com modelos de camundongos (MESA-ARANGO *et al.*, 2013; SCORZONI *et al.*, 2013).

Em relação ao efeito da 3' chalcona, parece não haver uma correlação entre a atividade *in vitro* e a atividade *in vivo* neste modelo de estudo. Tal fato poderia ser justificado pela natureza apolar da molécula que impede uma distribuição adequada no modelo animal para tratá-lo. Como é o caso de outros compostos propostos como antifúngicos em alguns estudos. No estudo de Favre-Godal e colaboradores (2014), quiseram identificar novos compostos antifúngicos procedentes da planta Rubiaceae. De todos os componentes que isolaram, somente dois exibiram notáveis atividades ante as células planctônicas e biofilmes de cepas de *C. albicans*. Esses compostos, antraquinonas 9 e 14, foram selecionados para uma investigação mais profunda na *G. mellonella*. Enquanto que o fluconazol, causava um dramático incremento na sobrevivência das larvas comparadas com o controle, as antraquinonas 9 e 14 mostraram limitados ou não significantes efeitos na sobrevivência. Concluiu-se que as propriedades químicas hidrofóbicas das moléculas podem ter um impacto sobre a solubilidade e reduzida biodisponibilidade, propondo alterações químicas para melhorar a biodisponibilidade. No estudo de Mircus e colaboradores (2015), estudaram umas moléculas chamadas CANBEFs, sendo a número 24 a que mostrava maior inibição ante espécies dos gêneros *Aspergillus*, *Candida*, *Fusarium*, e *Rhizopus*. CANBEFs não foram tóxicas em insetos (*G. mellonella*, *D. melanogaster*) e modelos de rato de infecção fúngica. Posteriormente, *G. mellonella* e *D. melanogaster* foram infectadas com *A. fumigatus* e os camundongos com *C. albicans*. O composto CANBEF-24 não reduziu a mortalidade de nenhum dos modelos animais, pelo que mais ciclos de otimização para aumentar a biodisponibilidade dos CANBEFs foram garantidos. No entanto, eles sugeriram que os CANBEFs poderiam ser úteis no tratamento de infecções fúngicas da pele ou como fungicidas de plantas, onde a questão da biodisponibilidade não se aplica.

6. CONCLUSÃO

1. A 3'-chalcona apresentou atividade antifúngica potente *in vitro* contra *C. gattii*, no seu formato planctônico e biofilme.
2. O uso do modelo Zebrafish demonstrou eficiência para ensaios de toxicidade frente a 3'- chalcona, entretanto a substância demonstrou toxicidade nos embriões.
3. No modelo *G. mellonella*, a 3'- chalcona não foi tóxica, entretanto também não foi capaz de inibir o fungo de forma que as larvas apresentaram o mesmo perfil da curva de sobrevivência do que o grupo infectado e sem tratamento.
4. A 3'- chalcona tem excelente efeito *in vitro*, porém não apresenta atividade antifúngica *in vivo* o que pode ser devido a pouca distribuição do composto no animal. Assim, modificações na formulação ou na molécula podem contribuir para uma melhor distribuição e eficácia antifúngica *in vivo*.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABU-DARWISH, M. S. et al. Chemical Composition and Biological Activities of *Artemisia judaica* Essential Oil from Southern Desert of Jordan. **J Ethnopharmacol**, Jun 2016. ISSN 1872-7573. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27318275> >.

AHMAD, F. et al. An in vivo evaluation of acute toxicity of cobalt ferrite (CoFe₂O₄) nanoparticles in larval-embryo Zebrafish (*Danio rerio*). **Aquat Toxicol**, v. 166, p. 21-8, Sep 2015. ISSN 1879-1514. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26197244> >.

AJDACIC, V. **Synthesis and evaluation of thiophene-based guanylhyazones (iminoguanidines) efficient against panel of voriconazole-resistant fungal isolates.** LIDIJA SENEROVIC, M. V., MARINA PEKMEZOVIC, VALENTINA ARSIC-ARSNJEVIC, e ALEKSANDAR VESELINOVIC, J. V., BOGDAN A. ŠOLAJA, JASMINA NIKODINOVIC-RUNIC, IGOR M. OPSENICA. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 24: 1277-91 p. 2016.

ALBUQUERQUE, P.; CASADEVALL, A. Quorum sensing in fungi--a review. **Med Mycol**, v. 50, n. 4, p. 337-45, May 2012. ISSN 1460-2709. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22268493> >.

ALWAN, W. S. et al. Novel imidazo[2,1-b]-1,3,4-thiadiazoles as promising antifungal agents against clinical isolate of *Cryptococcus neoformans*. **Eur J Med Chem**, v. 95, p. 514-25, May 2015. ISSN 1768-3254. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25847769> >.

ANDES, D. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of antifungals. **Infect Dis Clin North Am**, v. 20, n. 3, p. 679-97, Sep 2006. ISSN 0891-5520. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16984875> >.

BASTIDAS, R. J. et al. Rapamycin exerts antifungal activity in vitro and in vivo against *Mucor circinelloides* via FKBP12-dependent inhibition of Tor. **Eukaryot Cell**, v. 11, n. 3, p. 270-81, Mar 2012. ISSN 1535-9786. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22210828> >.

BATOVSKA, D. I.; TODOROVA, I. T. Trends in utilization of the pharmacological potential of chalcones. **Curr Clin Pharmacol**, v. 5, n. 1, p. 1-29, Feb 2010. ISSN 2212-3938. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19891604> >.

BEGUM, N. A. **Mosquito larvicidal studies of some chalcone analogues and their derived products: structure-activity relationship analysis**. ROY, N.: Medicinal Chemistry Research. 20: 184-191 p. 2011.

BEN YAAKOV, D. et al. Identification and characterization of haemofungin, a novel antifungal compound that inhibits the final step of haem biosynthesis. **J Antimicrob Chemother**, v. 71, n. 4, p. 946-52, Apr 2016. ISSN 1460-2091. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26747101> >.

BERGIN, D.; BRENNAN, M.; KAVANAGH, K. Fluctuations in haemocyte density and microbial load may be used as indicators of fungal pathogenicity in larvae of *Galleria mellonella*. **Microbes Infect**, v. 5, n. 15, p. 1389-95, Dec 2003. ISSN 1286-4579. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14670452> >.

BRENNAN, M. et al. Correlation between virulence of *Candida albicans* mutants in mice and *Galleria mellonella* larvae. **FEMS Immunol Med Microbiol**, v. 34, n. 2, p. 153-7, Oct 2002. ISSN 0928-8244. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12381467> >.

BRILHANTE, R. S. et al. Simvastatin inhibits planktonic cells and biofilms of *Candida* and *Cryptococcus* species. **Braz J Infect Dis**, v. 19, n. 5, p. 459-65, 2015 Sep-Oct 2015. ISSN 1678-4391. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26119850> >.

BRIZENDINE, K. D.; BADDLEY, J. W.; PAPPAS, P. G. Pulmonary cryptococcosis. **Semin Respir Crit Care Med**, v. 32, n. 6, p. 727-34, Dec 2011. ISSN 1098-9048. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22167400> >.

BUSQUET, F. et al. OECD validation study to assess intra- and inter-laboratory reproducibility of the zebrafish embryo toxicity test for acute aquatic toxicity testing. **Regul Toxicol Pharmacol**, v. 69, n. 3, p. 496-511, Aug 2014. ISSN 1096-0295. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24874798> >.

BYRNES, E. J. et al. *Cryptococcus gattii*: an emerging fungal pathogen infecting humans and animals. **Microbes Infect**, v. 13, n. 11, p. 895-907, Oct 2011. ISSN 1769-714X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21684347> >.

_____. Emergence and pathogenicity of highly virulent *Cryptococcus gattii* genotypes in the northwest United States. **PLoS Pathog**, v. 6, n. 4, p. e1000850, Apr 2010. ISSN 1553-7374. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20421942> >.

CARDOSO, N. N. et al. Synergism Effect of the Essential Oil from *Ocimum basilicum* var. Maria Bonita and Its Major Components with Fluconazole and Its Influence on Ergosterol Biosynthesis. **Evid Based Complement Alternat Med**, v. 2016, p. 5647182, 2016. ISSN 1741-427X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27274752> >.

CARLSSON, G. et al. Toxicity screening of produced water extracts in a zebrafish embryo assay. **J Toxicol Environ Health A**, v. 77, n. 9-11, p. 600-15, 2014. ISSN 1528-7394. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24754395> >.

CHANDENIER, J. et al. In vitro activity of amphotericin B, fluconazole and voriconazole against 162 *Cryptococcus neoformans* isolates from Africa and Cambodia. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**, v. 23, n. 6, p. 506-8, Jun 2004. ISSN 0934-9723. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15141336> >.

CHATURVEDI, S. et al. *Cryptococcus gattii* in AIDS patients, southern California. **Emerg Infect Dis**, v. 11, n. 11, p. 1686-92, Nov 2005. ISSN 1080-6040. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16318719> >.

CHATURVEDI, V.; CHATURVEDI, S. *Cryptococcus gattii*: a resurgent fungal pathogen. **Trends Microbiol**, v. 19, n. 11, p. 564-71, Nov 2011. ISSN 1878-4380. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21880492> >.

CHEN, J. et al. *Cryptococcus neoformans* strains and infection in apparently immunocompetent patients, China. **Emerg Infect Dis**, v. 14, n. 5, p. 755-62, May 2008. ISSN 1080-6059. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18439357> >.

CHEN, S. C.; SORRELL, T. C. Antifungal agents. **Med J Aust**, v. 187, n. 7, p. 404-9, Oct 2007. ISSN 0025-729X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17908006> >.

CHENG, P. Y.; SHAM, A.; KRONSTAD, J. W. *Cryptococcus gattii* isolates from the British Columbia cryptococcosis outbreak induce less protective inflammation in a murine model of infection than *Cryptococcus neoformans*. **Infect Immun**, v. 77, n. 10, p. 4284-94, Oct 2009. ISSN 1098-5522. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19635827> >.

CHOWDHARY, A. et al. Environmental prevalence of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* in India: an update. **Crit Rev Microbiol**, v. 38, n. 1, p. 1-16, Feb 2012. ISSN 1549-7828. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22133016> >.

CID, V. J. et al. Molecular basis of cell integrity and morphogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbiol Rev**, v. 59, n. 3, p. 345-86, Sep 1995. ISSN 0146-0749. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7565410> >.

COGHLAN, A. Pioneers cut out animal experiments. **New Sci**, v. 151, n. 2045, p. 4, Aug 1996. ISSN 0262-4079. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11656551> >.

COHEN, M. L. Changing patterns of infectious disease. **Nature**, v. 406, n. 6797, p. 762-7, Aug 2000. ISSN 0028-0836. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10963605> >.

CORDEIRO, R. E. A. et al. Inhibitory activity of isoniazid and ethionamide against *Cryptococcus* biofilms. **Can J Microbiol**, v. 61, n. 11, p. 827-36, Nov 2015. ISSN 1480-3275. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26362025> >.

COSTA-ORLANDI, C. B. et al. In vitro characterization of *Trichophyton rubrum* and *T. mentagrophytes* biofilms. **Biofouling**, v. 30, n. 6, p. 719-27, 2014. ISSN 1029-2454. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24856309> >.

COSTERTON, J. W.; STEWART, P. S.; GREENBERG, E. P. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. **Science**, v. 284, n. 5418, p. 1318-22, May 1999. ISSN 0036-8075. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10334980> >.

COX, G. M. et al. Superoxide dismutase influences the virulence of *Cryptococcus neoformans* by affecting growth within macrophages. **Infect Immun**, v. 71, n. 1, p. 173-80, Jan 2003. ISSN 0019-9567. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12496163> >.

CYTRYŃSKA, M.; ZDYBICKA-BARABAS, A.; JAKUBOWICZ, T. The involvement of protein kinase A in the immune response of *Galleria mellonella* larvae to bacteria. **Acta Biochim Pol**, v. 54, n. 1, p. 167-74, 2007. ISSN 0001-527X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17311109> >.

DE CARVALHO TAVARES, L. et al. Quinolinyln and quinolinyln N-oxide chalcones: synthesis, antifungal and cytotoxic activities. **Eur J Med Chem**, v. 46, n. 9, p. 4448-56, Sep 2011. ISSN 1768-3254. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21816519> >.

DE LACORTE SINGULANI, J. et al. Evaluation of the efficacy of antifungal drugs against *Paracoccidioides brasiliensis* and *Paracoccidioides lutzii* in a *Galleria mellonella* model. **Int J Antimicrob Agents**, Jul 2016. ISSN 1872-7913. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27444116> >.

DONG, Z. M.; MURPHY, J. W. Effects of the two varieties of *Cryptococcus neoformans* cells and culture filtrate antigens on neutrophil locomotion. **Infect Immun**, v. 63, n. 7, p. 2632-44, Jul 1995. ISSN 0019-9567. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7790079> >.

DORA, J. M. et al. Cutaneous cryptococcosis due to *Cryptococcus gattii* in immunocompetent hosts: case report and review. **Mycopathologia**, v. 161, n. 4, p. 235-8, Apr 2006. ISSN 0301-486X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16552487> >.

DUCHARME, N. A. et al. Comparison of toxicity values across zebrafish early life stages and mammalian studies: Implications for chemical testing. **Reprod Toxicol**, v. 55, p. 3-10, Aug 2015. ISSN 1873-1708. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25261610> >.

ECHEVERRIA, C. et al. Structural antitumoral activity relationships of synthetic chalcones. **Int J Mol Sci**, v. 10, n. 1, p. 221-31, Jan 2009. ISSN 1422-0067. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19333443> >.

EIMON, P. M.; RUBINSTEIN, A. L. The use of in vivo zebrafish assays in drug toxicity screening. **Expert Opin Drug Metab Toxicol**, v. 5, n. 4, p. 393-401, Apr 2009. ISSN 1744-7607. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19368493> >.

ELLIS, D. H.; PFEIFFER, T. J. Ecology, life cycle, and infectious propagule of *Cryptococcus neoformans*. **Lancet**, v. 336, n. 8720, p. 923-5, Oct 1990a. ISSN 0140-6736. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1976940> >.

_____. Natural habitat of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*. **J Clin Microbiol**, v. 28, n. 7, p. 1642-4, Jul 1990b. ISSN 0095-1137. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2199524> >.

FAVALESSA, O. C. et al. [First description of phenotypic profile and in vitro drug susceptibility of *Cryptococcus* spp yeast isolated from HIV-positive and HIV-negative patients in State of Mato Grosso]. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 42, n. 6, p. 661-5, 2009 Nov-Dec 2009. ISSN 1678-9849. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20209351> >.

FAVRE-GODAL, Q. et al. Comprehensive approach for the detection of antifungal compounds using a susceptible strain of *Candida albicans* and confirmation of in vivo activity with the *Galleria mellonella* model. **Phytochemistry**, v. 105, p. 68-78, Sep 2014. ISSN 1873-3700. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24984572> >.

FERNANDES, O. D. F. L. ***Cryptococcus neoformans* isolados de pacientes com AIDS**. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. 33: 75-78 p. 200.

FIRACATIVE, C.; DUAN, S.; MEYER, W. *Galleria mellonella* model identifies highly virulent strains among all major molecular types of *Cryptococcus gattii*. **PLoS One**, v. 9, n. 8, p. e105076, 2014. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25133687> >.

FUCHS, B. B.; MYLONAKIS, E. Using non-mammalian hosts to study fungal virulence and host defense. **Curr Opin Microbiol**, v. 9, n. 4, p. 346-51, Aug 2006. ISSN 1369-5274. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16814595> >.

FUCHS, B. B. et al. Methods for using *Galleria mellonella* as a model host to study fungal pathogenesis. **Virulence**, v. 1, n. 6, p. 475-82, 2010 Nov-Dec 2010. ISSN 2150-5608. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21178491> >.

GILES, S. S. et al. *Cryptococcus neoformans* mitochondrial superoxide dismutase: an essential link between antioxidant function and high-temperature growth. **Eukaryot Cell**, v. 4, n. 1, p. 46-54, Jan 2005. ISSN 1535-9778. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15643059> >.

GOW, N. A. et al. *Candida albicans* morphogenesis and host defence: discriminating invasion from colonization. **Nat Rev Microbiol**, v. 10, n. 2, p. 112-22, Feb 2012. ISSN 1740-1534. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22158429> >.

GULLO, F. P. et al. Cryptococcosis: epidemiology, fungal resistance, and new alternatives for treatment. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**, v. 32, n. 11, p. 1377-91, Nov 2013. ISSN 1435-4373. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24141976> >.

HAMDI, N. **A rapid access to new coumarinyl chalcone and substituted chromeno[4,3-c]pyrazol-4(1H)-ones and their antibacterial and DPPH radical scavenging activities**. FISCHMEISTER, C. Medicinal Chemistry Research. 20: 522-530 p. 2010.

HARRIS, J. R. et al. High prevalence of cryptococcal infection among HIV-infected patients hospitalized with pneumonia in Thailand. **Clin Infect Dis**, v. 54, n. 5, p. e43-50, Mar 2012. ISSN 1537-6591. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22198791> >.

HE, J. H. et al. Zebrafish models for assessing developmental and reproductive toxicity. **Neurotoxicol Teratol**, v. 42, p. 35-42, 2014 Mar-Apr 2014. ISSN 1872-9738. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24503215> >.

HERMSEN, S. A. et al. Relative embryotoxicity of two classes of chemicals in a modified zebrafish embryotoxicity test and comparison with their in vivo potencies. **Toxicol In Vitro**, v. 25, n. 3, p. 745-53, Apr 2011. ISSN 1879-3177. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21238576> >.

HOHL, T. M.; RIVERA, A.; PAMER, E. G. Immunity to fungi. **Curr Opin Immunol**, v. 18, n. 4, p. 465-72, Aug 2006. ISSN 0952-7915. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16765580> >.

HOWE, K. et al. The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. **Nature**, v. 496, n. 7446, p. 498-503, Apr 2013. ISSN 1476-4687. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23594743> >.

HUBE, B. From commensal to pathogen: stage- and tissue-specific gene expression of *Candida albicans*. **Curr Opin Microbiol**, v. 7, n. 4, p. 336-41, Aug 2004. ISSN 1369-5274. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15288621> >.

IÑIGO, M.; PEMÁN, J.; DEL POZO, J. L. Antifungal activity against *Candida* biofilms. **Int J Artif Organs**, v. 35, n. 10, p. 780-91, Oct 2012. ISSN 1724-6040. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23138707> >.

JABRA-RIZK, M. A.; FALKLER, W. A.; MEILLER, T. F. Fungal biofilms and drug resistance. **Emerg Infect Dis**, v. 10, n. 1, p. 14-9, Jan 2004. ISSN 1080-6040. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15078591> >.

KANAFANI, Z. A.; PERFECT, J. R. Antimicrobial resistance: resistance to antifungal agents: mechanisms and clinical impact. **Clin Infect Dis**, v. 46, n. 1, p. 120-8, Jan 2008. ISSN 1537-6591. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18171227> >.

KANT, R. et al. Synthesis of newer 1,2,3-triazole linked chalcone and flavone hybrid compounds and evaluation of their antimicrobial and cytotoxic activities. **Eur J Med Chem**, v. 113, p. 34-49, May 2016. ISSN 1768-3254. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26922227> >.

KELLY, J.; KAVANAGH, K. Caspofungin primes the immune response of the larvae of *Galleria mellonella* and induces a non-specific antimicrobial response. **J Med Microbiol**, v. 60, n. Pt 2, p. 189-96, Feb 2011. ISSN 1473-5644. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20947665> >.

KLIS, F. M. Review: cell wall assembly in yeast. **Yeast**, v. 10, n. 7, p. 851-69, Jul 1994. ISSN 0749-503X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7985414> >.

KOBAYASHI, C. C. et al. Characterization of *Cryptococcus neoformans* isolated from urban environmental sources in Goiânia, Goiás State, Brazil. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, v. 47, n. 4, p. 203-7, 2005 Jul-Aug 2005. ISSN 0036-4665. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16138201> >.

KUHN, D. M.; GHANNOUM, M. A. *Candida* biofilms: antifungal resistance and emerging therapeutic options. **Curr Opin Investig Drugs**, v. 5, n. 2, p. 186-97, Feb 2004. ISSN 1472-4472. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15043393> >.

KULKARNI, R. R. et al. Antifungal dimeric chalcone derivative kamalachalcone E from *Mallotus philippinensis*. **Nat Prod Res**, v. 28, n. 4, p. 245-50, 2014. ISSN 1478-6427. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24099509> >.

KWON-CHUNG, K. J.; BENNETT, J. E. Epidemiologic differences between the two varieties of *Cryptococcus neoformans*. **Am J Epidemiol**, v. 120, n. 1, p. 123-30, Jul 1984. ISSN 0002-9262. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6377880> >.

LANTZ-MCPEAK, S. et al. Developmental toxicity assay using high content screening of zebrafish embryos. **J Appl Toxicol**, v. 35, n. 3, p. 261-72, Mar 2015. ISSN 1099-1263. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24871937> >.

LARRU, B.; ZAOUTIS, T. E. Newer antifungal agents. **Curr Opin Pediatr**, v. 25, n. 1, p. 110-5, Feb 2013. ISSN 1531-698X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23263025> >.

LEE, J.; FREEMAN, J. L. Zebrafish as a model for investigating developmental lead (Pb) neurotoxicity as a risk factor in adult neurodegenerative disease: a mini-review. **Neurotoxicology**, v. 43, p. 57-64, Jul 2014. ISSN 1872-9711. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24698670> >.

LI, D. D. et al. Using *Galleria mellonella*-*Candida albicans* infection model to evaluate antifungal agents. **Biol Pharm Bull**, v. 36, n. 9, p. 1482-7, 2013. ISSN 1347-5215. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23995660> >.

LINDENBERG, A. E. S. et al. Clinical and epidemiological features of 123 cases of cryptococcosis in Mato Grosso do Sul, Brazil. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, v. 50, n. 2, p. 75-8, 2008 Mar-Apr 2008. ISSN 0036-4665. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18488084> >.

LIPP, H. P. Antifungal agents--clinical pharmacokinetics and drug interactions. **Mycoses**, v. 51 Suppl 1, p. 7-18, 2008. ISSN 1439-0507. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18471156> >.

LITVINTSEVA, A. P. et al. Prevalence of clinical isolates of *Cryptococcus gattii* serotype C among patients with AIDS in Sub-Saharan Africa. **J Infect Dis**, v. 192, n. 5, p. 888-92, Sep 2005. ISSN 0022-1899. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16088839> >.

LUNA, B.; DREW, R. H.; PERFECT, J. R. Agents for treatment of invasive fungal infections. **Otolaryngol Clin North Am**, v. 33, n. 2, p. 277-99, Apr 2000. ISSN 0030-6665. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10736404> >.

LUNARDI, F. et al. Trypanocidal and leishmanicidal properties of substitution-containing chalcones. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 47, n. 4, p. 1449-51, Apr 2003. ISSN 0066-4804. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12654691> >.

LÓPEZ, S. N. et al. In vitro antifungal evaluation and structure-activity relationships of a new series of chalcone derivatives and synthetic analogues, with inhibitory properties against polymers of the fungal cell wall. **Bioorg Med Chem**, v. 9, n. 8, p. 1999-2013, Aug 2001. ISSN 0968-0896. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11504637> >.

MAES, J. et al. Evaluation of 14 organic solvents and carriers for screening applications in zebrafish embryos and larvae. **PLoS One**, v. 7, n. 10, p. e43850, 2012. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23082109> >.

MAK, S. et al. Ecological niche modeling of *Cryptococcus gattii* in British Columbia, Canada. **Environ Health Perspect**, v. 118, n. 5, p. 653-8, May 2010. ISSN 1552-9924. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20439176> >.

MARTINEZ, L. R.; CASADEVALL, A. Susceptibility of *Cryptococcus neoformans* biofilms to antifungal agents in vitro. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 50, n. 3, p. 1021-33, Mar 2006. ISSN 0066-4804. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16495265> >.

_____. Biofilm Formation by *Cryptococcus neoformans*. **Microbiol Spectr**, v. 3, n. 3, Jun 2015. ISSN 2165-0497. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26185073> >.

MARTINEZ, L. R. et al. The use of chitosan to damage *Cryptococcus neoformans* biofilms. **Biomaterials**, v. 31, n. 4, p. 669-79, Feb 2010. ISSN 1878-5905. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19819009> >.

MESA-ARANGO, A. C. et al. The non-mammalian host *Galleria mellonella* can be used to study the virulence of the fungal pathogen *Candida tropicalis* and the efficacy of antifungal drugs during infection by this pathogenic yeast. **Med Mycol**, v. 51, n. 5, p. 461-72, Jul 2013. ISSN 1460-2709. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23170962> >.

MEYER, W. et al. Molecular typing of IberoAmerican *Cryptococcus neoformans* isolates. **Emerg Infect Dis**, v. 9, n. 2, p. 189-95, Feb 2003. ISSN 1080-6040. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12603989> >.

MIRCUS, G. et al. Identification and characterization of a novel family of selective antifungal compounds (CANBEFs) that interfere with fungal protein synthesis. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 59, n. 9, p. 5631-40, Sep 2015. ISSN 1098-6596. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26149982> >.

MITCHELL, T. G.; PERFECT, J. R. Cryptococcosis in the era of AIDS--100 years after the discovery of *Cryptococcus neoformans*. **Clin Microbiol Rev**, v. 8, n. 4, p. 515-48, Oct 1995. ISSN 0893-8512. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8665468> >.

MIYATA, S. et al. Use of the *Galleria mellonella* caterpillar as a model host to study the role of the type III secretion system in *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis. **Infect Immun**, v. 71, n. 5, p. 2404-13, May 2003. ISSN 0019-9567. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12704110> >.

MORENS, D. M.; FOLKERS, G. K.; FAUCI, A. S. The challenge of emerging and re-emerging infectious diseases. **Nature**, v. 430, n. 6996, p. 242-9, Jul 2004. ISSN 1476-4687. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15241422> >.

_____. Emerging infections: a perpetual challenge. **Lancet Infect Dis**, v. 8, n. 11, p. 710-9, Nov 2008. ISSN 1473-3099. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18992407> >.

MORGAN, J. et al. Cryptococcus gattii infection: characteristics and epidemiology of cases identified in a South African province with high HIV seroprevalence, 2002-2004. **Clin Infect Dis**, v. 43, n. 8, p. 1077-80, Oct 2006. ISSN 1537-6591. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16983624> >.

MORTON, D. B.; BARNETT, R. I.; CHADWICK, J. S. Structural alterations to Proteus mirabilis as a result of exposure to haemolymph from the larvae of Galleria mellonella. **Microbios**, v. 39, n. 157-158, p. 177-85, 1984. ISSN 0026-2633. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6374385> >.

MOWAT, E. et al. Development of a simple model for studying the effects of antifungal agents on multicellular communities of Aspergillus fumigatus. **J Med Microbiol**, v. 56, n. Pt 9, p. 1205-12, Sep 2007. ISSN 0022-2615. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17761484> >.

MYLONAKIS, E. et al. Galleria mellonella as a model system to study Cryptococcus neoformans pathogenesis. **Infect Immun**, v. 73, n. 7, p. 3842-50, Jul 2005. ISSN 0019-9567. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15972469> >.

NARASIPURA, S. D. et al. Characterization of Cu,Zn superoxide dismutase (SOD1) gene knock-out mutant of Cryptococcus neoformans var. gattii: role in biology and virulence. **Mol Microbiol**, v. 47, n. 6, p. 1681-94, Mar 2003. ISSN 0950-382X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12622821> >.

NARASIPURA, S. D.; CHATURVEDI, V.; CHATURVEDI, S. Characterization of Cryptococcus neoformans variety gattii SOD2 reveals distinct roles of the two superoxide dismutases in fungal biology and virulence. **Mol Microbiol**, v. 55, n. 6, p. 1782-800, Mar 2005. ISSN 0950-382X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15752200> >.

NEGRONI, R. Cryptococcosis. **Clin Dermatol**, v. 30, n. 6, p. 599-609, 2012 Nov-Dec 2012. ISSN 1879-1131. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23068147> >.

NGAMSKULRUNGROJ, P. et al. The trehalose synthesis pathway is an integral part of the virulence composite for *Cryptococcus gattii*. **Infect Immun**, v. 77, n. 10, p. 4584-96, Oct 2009. ISSN 1098-5522. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19651856> >.

NURETTIN, Y. **Synthesis and Biological Activities of N-Alkyl Derivatives of o-, m-, and p-Nitro (E)-4-Azachalcones and Stereoselective Photochemistry in Solution, with Theoretical Calculations**. Turkish Journal of Chemistr. 30: 505 p. 2006.

PETZOLD, E. W. et al. Characterization and regulation of the trehalose synthesis pathway and its importance in the pathogenicity of *Cryptococcus neoformans*. **Infect Immun**, v. 74, n. 10, p. 5877-87, Oct 2006. ISSN 0019-9567. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16988267> >.

RASMUSSEN, T. B.; GIVSKOV, M. Quorum sensing inhibitors: a bargain of effects. **Microbiology**, v. 152, n. Pt 4, p. 895-904, Apr 2006. ISSN 1350-0872. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16549654> >.

RASO, T. F. et al. Cryptococcosis outbreak in psittacine birds in Brazil. **Med Mycol**, v. 42, n. 4, p. 355-62, Aug 2004. ISSN 1369-3786. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15473361> >.

REEVES, E. P. et al. Correlation between gliotoxin production and virulence of *Aspergillus fumigatus* in *Galleria mellonella*. **Mycopathologia**, v. 158, n. 1, p. 73-9, Jul 2004. ISSN 0301-486X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15487324> >.

REN, P. et al. Transcription factor STE12alpha has distinct roles in morphogenesis, virulence, and ecological fitness of the primary pathogenic yeast *Cryptococcus gattii*. **Eukaryot Cell**, v. 5, n. 7, p. 1065-80, Jul 2006. ISSN 1535-9778. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16835451> >.

REOLON, A. **Prevalência de *Cryptococcus neoformans* nos pombos urbanos da cidade de Porto Alegre, Rio Grande do Sul**. PEREZ, L. R. R. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**. 40: 293-8 p. 2004.

RIZZO, L. Y. et al. In Vivo Nanotoxicity Testing using the Zebrafish Embryo Assay. **J Mater Chem B Mater Biol Med**, v. 1, Jun 2013. ISSN 2050-750X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24179674> >.

ROBERTSON, E. J.; CASADEVALL, A. Antibody-mediated immobilization of *Cryptococcus neoformans* promotes biofilm formation. **Appl Environ Microbiol**, v. 75, n. 8, p. 2528-33, Apr 2009. ISSN 1098-5336. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19251903> >.

ROBERTSON, E. J.; WOLF, J. M.; CASADEVALL, A. EDTA inhibits biofilm formation, extracellular vesicular secretion, and shedding of the capsular polysaccharide glucuronoxylomannan by *Cryptococcus neoformans*. **Appl Environ Microbiol**, v. 78, n. 22, p. 7977-84, Nov 2012. ISSN 1098-5336. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22941091> >.

ROMANI, L. Immunity to fungal infections. **Nat Rev Immunol**, v. 4, n. 1, p. 1-23, Jan 2004. ISSN 1474-1733. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14661066> >.

ROMANI, L.; PUC CETTI, P. Protective tolerance to fungi: the role of IL-10 and tryptophan catabolism. **Trends Microbiol**, v. 14, n. 4, p. 183-9, Apr 2006. ISSN 0966-842X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16517165> >.

RUIZ, A.; FROMTLING, R. A.; BULMER, G. S. Distribution of *Cryptococcus neoformans* in a natural site. **Infect Immun**, v. 31, n. 2, p. 560-3, Feb 1981. ISSN 0019-9567. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7012011> >.

SANTOS, W. R. et al. Primary endemic *Cryptococcosis gattii* by molecular type VGII in the state of Pará, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 103, n. 8, p. 813-8, Dec 2008. ISSN 1678-8060. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19148422> >.

SCHAARS, C. F. et al. Outcome of AIDS-associated cryptococcal meningitis initially treated with 200 mg/day or 400 mg/day of fluconazole. **BMC Infect Dis**, v. 6, p. 118, 2006. ISSN 1471-2334. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16846523> >.

SCORZONI, L. **The use of standard methodology for determination of antifungal activity of natural products against medical yeasts *Candida* sp and *Cryptococcus* sp.** Brazilian Journal of Microbiology. 38 2007.

SCORZONI, L. et al. Antifungal efficacy during *Candida krusei* infection in non-conventional models correlates with the yeast in vitro susceptibility profile. **PLoS One**, v. 8, n. 3, p. e60047, 2013. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23555877> >.

_____. Comparison of virulence between *Paracoccidioides brasiliensis* and *Paracoccidioides lutzii* using *Galleria mellonella* as a host model. **Virulence**, v. 6, n. 8, p. 766-76, Nov 2015. ISSN 2150-5608. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26552324> >.

SCULLY, L. R.; BIDOCHKA, M. J. Serial passage of the opportunistic pathogen *Aspergillus flavus* through an insect host yields decreased saprobic capacity. **Can J Microbiol**, v. 51, n. 2, p. 185-9, Feb 2005. ISSN 0008-4166. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16091778> >.

SEIDLER, M. J.; SALVENMOSER, S.; MÜLLER, F. M. *Aspergillus fumigatus* forms biofilms with reduced antifungal drug susceptibility on bronchial epithelial cells. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 52, n. 11, p. 4130-6, Nov 2008. ISSN 1098-6596. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18710910> >.

SILVA, S. et al. *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*: biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance. **FEMS Microbiol Rev**, v. 36, n. 2, p. 288-305, Mar 2012. ISSN 1574-6976. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21569057> >.

SIPEs, N. S.; PADILLA, S.; KNUDSEN, T. B. Zebrafish: as an integrative model for twenty-first century toxicity testing. **Birth Defects Res C Embryo Today**, v. 93, n. 3, p. 256-67, Sep 2011. ISSN 1542-9768. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21932434> >.

SOARES, L. A. et al. Anti-trichophyton activity of protocatechuates and their synergism with fluconazole. **Evid Based Complement Alternat Med**, v. 2014, p. 957860, 2014. ISSN 1741-427X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25136374> >.

SORRELL, T. C.; ELLIS, D. H. Ecology of *Cryptococcus neoformans*. **Rev Iberoam Micol**, v. 14, n. 2, p. 42-3, Jun 1997. ISSN 1130-1406. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16854168> >.

SPRINGER, D. J. et al. *Cryptococcus gattii* VGIII isolates causing infections in HIV/AIDS patients in Southern California: identification of the local environmental source as arboreal. **PLoS Pathog**, v. 10, n. 8, p. e1004285, Aug 2014. ISSN 1553-7374. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25144534> >.

STEENBERGEN, J. N.; SHUMAN, H. A.; CASADEVALL, A. *Cryptococcus neoformans* interactions with amoebae suggest an explanation for its virulence and intracellular pathogenic strategy in macrophages. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 98, n. 26, p. 15245-50, Dec 2001. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11742090> >.

STEPHEN, C. et al. Multispecies outbreak of cryptococcosis on southern Vancouver Island, British Columbia. **Can Vet J**, v. 43, n. 10, p. 792-4, Oct 2002. ISSN 0008-5286. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12395765> >.

STIE, J.; FOX, D. Induction of brain microvascular endothelial cell urokinase expression by *Cryptococcus neoformans* facilitates blood-brain barrier invasion. **PLoS One**, v. 7, n. 11, p. e49402, 2012. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23145170> >.

TENOR, J. L. et al. Live Imaging of Host-Parasite Interactions in a Zebrafish Infection Model Reveals Cryptococcal Determinants of Virulence and Central Nervous System Invasion. **MBio**, v. 6, n. 5, p. e01425-15, 2015. ISSN 2150-7511. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26419880> >.

TYL RW. GENERAL AND APPLIED TOXICOLOGY. 2000; 2:1167–1201.

WALSH, T. J. et al. Ventriculoatrial shunt infection due to *Cryptococcus neoformans*: an ultrastructural and quantitative microbiological study. **Neurosurgery**, v. 18, n. 3, p. 373-5, Mar 1986. ISSN 0148-396X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3517675> >.

WRIGHT, L. et al. Metabolites released by *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* and var. *gattii* differentially affect human neutrophil function. **Microbes Infect**, v. 4, n. 14, p. 1427-38, Nov 2002. ISSN 1286-4579. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12475633> >.

YADAV, H. L. **Synthesis and biological evaluation of antiinflammatory activity of 1,3-diphenyl propenone derivatives**. GUPTA, P. Medicinal Chemistry Research 2009.

YUE, C. et al. The STE12alpha homolog is required for haploid filamentation but largely dispensable for mating and virulence in *Cryptococcus neoformans*. **Genetics**, v. 153, n. 4, p. 1601-15, Dec 1999. ISSN 0016-6731. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10581270> >.

ZHAI, B. et al. Congenic strains of the filamentous form of *Cryptococcus neoformans* for studies of fungal morphogenesis and virulence. **Infect Immun**, v. 81, n. 7, p. 2626-37, Jul 2013. ISSN 1098-5522. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23670559> >.

ZHU, F. et al. Drug discovery prospect from untapped species: indications from approved natural product drugs. **PLoS One**, v. 7, n. 7, p. e39782, 2012. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22808057> >.

Capítulo 11

Anti-biofilm activity of 3'- chalcone against *Cryptococcus gattii* and toxicity and efficacy in alternative models.

MEDICAL MYCOLOGY - ISSN 1369-3786

Ana Cerrejón Palanco¹, Junya de Lacorte Singulani¹, Caroline Barcelos Costa Orlandi¹, Fernanda Patrícia Gullo¹, Natália Manuela Strohmayr Lourencetti¹, Paulo César Gomes¹, Luiz Antônio Dutra², Luis Octávio Regasini², Maria José Soares Mendes Giannini¹, Ana Marisa Fusco Almeida^{1*}.

¹Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Araraquara, São Paulo, Brazil; ²Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas (IBILCE - UNESP), São José do Rio Preto, São Paulo, Brazil.

*Corresponding authors: Ana Marisa Fusco Almeida

Laboratório de Micologia Clínica (Núcleo de Proteômica)

Departamento de Análises Clínicas

Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade Estadual Paulista (UNESP)

Rodovia Araraquara-Jaú, Km 01 – Araraquara, SP, Brazil.

Tel: +55 (16) 3301-4640; 4641 Fax: +55 (16) 3322-0073

E-mail: ana.marisa@uol.com.br

Keywords: *Cryptococcus gattii*; biofilms; 3'- chalcone, alternative models; zebrafish; *Galleria mellonella*

Abstract

Purpose: Cryptococcosis is a mycosis caused by *Cryptococcus neoformans* and *C. gattii*. One of the main virulence factors of *Cryptococcus* genera is the biofilm formation and its resistance to antifungal treatment brings the need of new therapies. This work aims to evaluate the activity of a new chalcone against *C. gattii* in planktonic and biofilm forms, as well as to verify the efficacy and toxicity in alternative models.

Methods: The minimum inhibitory and fungicidal concentrations were determined according to CLSI method. Biofilm formation and the susceptibility tests were performed by the XTT reduction assay. The damage on the topographies after treatment was observed by Scanning electron microscopy and the toxicity and efficacy of the compound were checked in Zebrafish and *Galleria mellonella* models.

Results: The compound showed active and fungicide against *C. gattii*, with MIC values ranging from 0.96 to 3.95 µg/mL. It was also active against the biofilms in the concentrations ranging from 31.25 to 62.5 µg/mL. The results of toxicity in zebrafish embryos revealed a lethal concentration 50% (LC50) in the concentrations 3.42 ± 0.6 µg/mL. In *G. mellonella*, 3'-chalcone produced no toxicity, however, did not show efficacy.

Conclusions: In *in vitro* tests, the compound showed to be potent against *C. gattii* in their planktonic and biofilm format. In *in vivo* tests with zebrafish embryos, the compound was teratogenic, however, this model demonstrated efficacy for toxicity testing. Furthermore, the compound showed no toxicity in *G. mellonella*, although not proven to be suitable for efficacy trials in this model.

Introduction

Cryptococcosis is an emerging disease caused by species *Cryptococcus neoformans* and *C. gattii*. *C. neoformans* is associated mainly with immunosuppressed patients who has infected with human immunodeficiency virus (HIV) or other immunosuppressed such as cancer and transplant population [1]. Besides this, *C. gattii* affects immunocompetent individuals [2]. The yeast can develop severe pneumonia and respiratory failure, and may affect the central nervous system, causing serious frame of meningitis and meningoencephalitis, which feature the most important and serious stage of infection [3]. *C. gattii* has the ability to stop the migration of neutrophils in laboratory conditions and in infections in animals [4]. The fungi produce metabolites, especially dihydroxyacetone and acetoin that can cause lower pro-inflammatory responses when compared to the metabolites produced by *C. neoformans*, promoting the survival and multiplication of fungi in the infected host [5, 6]. This fact could explain why healthy people are more susceptible to this infection. In addition, *Cryptococcus* spp. have the ability to form biofilms, what is considered as virulence factor [7].

The treatment of cryptococcal meningitis is initiated with the administration intravenously of Amphotericin B (AmB) which binds the ergosterol of fungal membrane, leading to cell lysis. Flucytosine can be used together with AmB during the induction therapy with intravenous or oral dose. Unfortunately, AmB and flucytosine are not generally available in regions where resources are limited and where the burden of disease is highest [8]. In the case of absence of flucytosine, fluconazole (FLZ) is the alternative agent to be used in combination with AmB. FLZ has inhibitory action on lanosterol 14 α -demethylase, which is responsible for the conversion of lanosterol to ergosterol, interrupting the ergosterol biosynthesis [9]. These medications have resistance problems, a narrow spectrum of activity and toxicity. In this context, the

bioprospecting of natural molecules has become necessary in the search for new antifungal prototypes [10].

Chalcones (*trans*-1, 3-diaryl-2-propen-1-ones) are precursors of the open chain flavonoids and isoflavones, which are abundant in plants. Chalcones and their derivatives have increasingly attracted attention due to numerous pharmacological applications. Pharmacological activities as anti-cancer [11], anti-oxidant [12], anti-leishmaniasis [13], anti-inflammatory [14] and antifungal activities [15]. It was described that the mechanism of action of chalcones in fungal enzymes acts on β (1,3)-glucan or chitin synthase, enzymes that catalyzes the synthesis of the major polymers of the fungal cell wall, β (1,3)-glucan and chitin respectively [16].

Therefore, this study aimed, to verify the activity of the 3'-chalcone against two species of *C. gattii* in planktonic and biofilm form as well as to check its *in vivo* toxicity and efficacy in alternative models.

Materials and Methods

Microorganisms

In this work were used one environmental isolate of *C. gattii* (*C. gattii* 118; isolated from a psittacine bird; AFLP6/VGII) previously tested with reduced susceptibility to FLZ [17] and the strain *C. gattii* ATCC 56990 (AFLP4/VGI; from The American Type Culture Collection). All species were obtained from the collection of the Laboratory of Clinical Mycology, of the Department of Clinical Analysis of the School of Pharmaceutical Sciences, UNESP, Araraquara.

***In vitro* assays**

Compound and antifungal drugs acquisition

The compound 3'-chalcone (**Fig.1**) was synthesized and obtained in collaboration with Dr.Luis Regasini's group from Universidade Estadual Paulista (UNESP), Sao Jose do Rio Preto, SP, Brazil. AmB and FLZ were obtained from the manufacturer (*Sigma-Aldrich*, St. Louis, MO, USA), and prepared according to what was described in the document M-27A3, proposed by CLSI (2008).

Minimum Inhibitory Concentration (MIC)

Susceptibility tests of *C. gattii* (ATCC and isolated 118) against the compound 3'-chalcone, AmB and FLZ were performed according to the document M-27-A3, with minor modifications [18]. Inocula were prepared in RPMI-1640 medium (*Sigma-Aldrich*, St. Louis, MO, USA) with L-glutamine, without sodium bicarbonate, supplemented with 2% glucose, and buffered to a pH of 7.0 using 0.165M MOPS, (*Sigma-Aldrich*, St. Louis, MO, USA), in order to achieve a final concentration in microdilution plates of 2.5×10^3 CFU/mL. As a quality control, *Candida parapsilosis* ATCC 22019 tested in the same concentration. Work solutions of FLZ, prepared in RPMI, were tested in concentrations ranged from 64 to 0.0625 µg/mL. The work solutions of AmB were tested in the concentrations ranged from 16 to 0.03 µg/mL. For the 3'-chalcone, stock solution were prepared in dimethylsulfoxide (DMSO) and work solutions in RPMI medium. The range of concentration tested was from 250 to 0.48 µg/mL [19]. The plates were incubated at 37°C under agitation of 150 rpm for up to 48 hours. The readings were performed visually and confirmed using Alamar Blue (*Sigma-Aldrich*, St. Louis, MO, USA).

Minimum Fungicide Concentration (MFC)

A qualitative analysis of fungal viability was performed, by transferring a portion of the wells to a plate with Sabouraud ágar (Difco Laboratories, Detroit, MI, USA) and incubated at 37°C during 48h. The MFC was determined as the lowest concentration of the compound that did not allow the growth of any fungal colony on the solid medium after the incubation period. A visual reading was performed [20].

Biofilm formation

The biofilm formation was performed according to what was described by Martinez and Casadevall (2006) [21] for the *C. neoformans*, with modifications. The ATCC strain and the environment isolate of *C. gattii* were cultivated in Sabouraud dextrose broth (Difco Laboratories, Detroit, MI, USA) at 37°C, during 24 hours with shaking at 150 rpm. The cells were collected by centrifugation, washed twice with phosphate-buffered saline (PBS), counted at haemocytometer, in order to obtain a final concentration of 1×10^8 cells/mL in PBS. A hundred microliters of the suspension were added into each well of 96-well plates (TPP Trasadingen, Switzerland), and the plates were incubated at 37°C without shaking for 5 h for the pre-adhesion stage. After this period, the wells were washed three times with PBS to remove non-adhered cells and 200 μ L of RPMI were added. The plates were incubated until 72h in order to verify the ideal maturation time. All assays were carried out in triplicate.

Biofilm metabolic activity

The metabolic activity of the biofilms in RPMI medium were checked by the XTT reduction assay (2, 3-bis (2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl) -5 - [carbonyl (phenylamino)] -2H-tetrazolium hydroxide). After maturation, 50mL of XTT solution

(1 mg salt / mL in PBS) and 4 μ L of menadione solution (1 mM in acetone; Sigma) were added to each well. The plates were incubated at 37°C for 3 hours. In this assay, the mitochondrial dehydrogenase enzyme activity reduces the tetrazolium salt to formazan salt, thus changing the color of medium. Finally performing spectrophotometric reading was performed at the wavelength of 492 nm. The RPMI 1640 medium free of biofilm formation were included as negative control [21].

Susceptibilities of *C. gattii* biofilms to 3'- chalcone and antifungal drugs

For the susceptibility tests, *C. gattii* biofilms were formed in 96-well plates. The biofilms were washed and 200 μ L of the work solutions of 3'- chalcone, AmB and fluconazole in RPMI medium were tested in the following concentrations: 250 – 0.48 μ g/mL; 256 – 0.5 μ g/mL; 512 – 1 μ g/mL, respectively. The plates were incubated at 37°C under shaking of 100 rpm for more 48h. After this period, the supernatant was removed, the cells were washed with PBS and the metabolic activities of the treated biofilms were measured by the XTT reduction assay as described by Martinez & Casadevall (2006)[21].

Scanning Electron Mycroscopy (SEM)

For SEM, biofilms were formed in 24 well plates and were processed as described by Martinez *et al* (2010) [22] with some modifications. The plates were washed three times with PBS to remove the planktonic cells and fixed with 1 mL of 2,5% glutaraldehyde solution (*Sigma-Aldrich*), for 3 hours. Then, the samples were then dehydrated with increasing concentrations of ethanol from 50% to absolute ethanol at room temperature. Finally, drying was performed at room temperature. Before microscopic analysis, the samples were mounted on aluminum cylinders with silver

(stubs) and placed on a high vacuum evaporator (Denton Vacuum Desk V JEOL USA) to gold plating. The topographical characteristics of biofilms were analyzed by scanning electron microscope (JEOL JSM-6610LV) [22, 23].

***In vivo* assays**

Embryotoxicity of 3'-chalcone in Zebrafish

Zebrafish were raised according to standard breeding protocols ($28 \pm 0.5^\circ\text{C}$ with 14:10 day/night photoperiod) in a recirculation system. Zebrafish were fed once daily with live *Artemia* and a dry flake diet. The development status of Zebrafish embryos and larvae were observed with a loupe Zeiss (Discovery. V12). Zebrafish embryos used for chemical exposure were obtained from spawning adults in tanks overnight with the sex ratio of 1:1. Embryos were collected within 1 h after the light switched on in embryonic medium (NaCl; KCl; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; H_2O and blue methylene 0,03%). The fertilized and normal embryos were inspected and staged for the following experiment under the same loupe. The Zebrafish embryos were exposed to different concentrations (1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 16 $\mu\text{g/mL}$) of 3'- chalcone, (0.0625; 0.125; 0.25; 0.375; 0.5; 0.625; 0.75; 1 $\mu\text{L/mL}$) of DMSO and embryonic medium as control for a period of 48 h [24] and Busquet et al. 2014 with some modifications [25].

Infection, toxicity and efficacy in *G. mellonella* model

Groups of 16 larvae weighing between 0.1 and 0.2 g were placed in plastic boxes and incubated at 37°C in the night before the experiments. Fungal suspensions of *C. gattii* (ATCC 56990 and isolated 118) were prepared in PBS with 20 mg/L ampicillin in order to obtain a final concentration of 1×10^6 cells. The last left pro-paw of the larvae was cleaned with 70% ethanol and 10 μL of fungal suspensions were injected with a

Hamilton syringe. Larvae infected with fungi were treated with 10 μ L in the last right pro-paw with different doses of 3'-chalcone in concentrations of 160, 40 and 2 mg/Kg. As a control was used 2mg/kg of AmB (Sigma-Aldrich). Also, uninfected larvae were treated with the compound to test the toxicity. All groups were incubated at 37°C for 7 days. The death of the larvae was assessed daily by visual inspection of the lack of movement. At least three independent experiments were performed [26].

Fungal burden

Four larvae of each group infected with the fungi were collected in 48 hours. After collection, larvae were washed with 70% ethanol and cut into small pieces with a scalpel. Tissues were macerated in 1 mL of PBS and plated on Sabouraud agar containing ampicilin. Each sample was diluted in 100X PBS and then, the plates were incubated for 2 days at room temperature. After this period, the colony forming units (CFUs) were counted [26].

Statistical Analysis

All data analysis were performed with GraphPad Prism 5.0 software (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA). The biofilm analysis were performed with t test or one way ANOVA tests following by Bonferroni correction. Survival curves were analysed using the log-rank (Mantel–Cox) test. Fungal burden was analysed using analysis of variance (ANOVA) with the Bonferroni post-test. A *P*-value of <0.05 was considered statistically significant.

Results

Evaluation of antifungal activity

The results of the antifungal activity of 3'-chalcone are shown in **Table 1**. The compound 3'-chalcone showed the best results for both ATCC strain (MIC= 1.9 µg/mL) and environmental isolate (MIC = 0,96 µg/mL) of *C. gattii* when compared to fluconazole (8 and >64 µg/mL, respectively). The environmental isolate showed resistant to fluconazole. AmB had a potent activity in *C. gattii*, with MICs ranging from 0.125 to 0.06 µg/mL. Regarding to test quality control, MIC values of FLZ and AmB in *C. parapsilosis* were as expected, and the results corroborated to what was preconized in the document M27-A3. Regarding the minimal fungicidal concentration, it was observed that 3'-chalcone had a fungicidal effect in both strains tested.

Susceptibilities of *C. gattii* biofilms to 3'- chalcone and antifungal drugs

As fluconazole is fungistatic with *C. gattii*, for this drug was considered activity, the reduction of 50% of the metabolic activities when compared to untreated controls. For AmB and 3'-chalcone, for being fungicidal, was considered activity the reduction of at least 80% of the metabolic activities when compared to the controls. The metabolic activities of the environmental isolate biofilms treated with FLZ had no reduction when compared to untreated controls (**Fig. 2B**). For the mature biofilms of *C. gattii* ATCC 56990, only the concentration of 512 µg/mL was able to reduce more than 50% the metabolic activity when compared to untreated control (**Fig. 2A**). For AmB, all concentrations tested were able to damage the biofilms formed by ATCC strain (**Fig. 2C**) and the isolated 118 (**Fig. 2D**). The concentrations of 3'-chalcone ≥ 62.5 µg/mL, were able to reduce in 90% the metabolic activities of the *C. gattii* ATCC 56990

biofilms (**Fig. 2E**). For the 118 isolate, the concentrations ≥ 31.25 $\mu\text{g/mL}$ reduced the metabolic activities of the biofilms in at least 80% (**Fig. 2F**).

SEM

SEM was used to verify the damage of the treatment in the topography of the mature biofilms. **Figures 3A** and **3D** represent the untreated mature biofilms of *C.gattii* ATCC 56990 and *C. gattii* 118. It is possible to observe a condensed group of cells in three-dimensional conformation bound by one extracellular matrix that they produce. **Figures 3B** and **3E** represent the biofilms of the ATCC strain and the environment isolate treated with AmB, respectively. It was observed severe damage in all the extension of the biofilms. Even with the treatment it was still possible to observe a great amount of extracellular matrix covering the damaged biofilms. **Figures 3C** and **3F** show the same biofilms treated with 3'-chalcone. Besides cell damage, it was observed a small amount of extracellular matrix (ECM), indicating that the compound may also have acted in the destruction in the polysaccharide material.

Toxicity of 3'-chalcone in Zebrafish embryos

The evaluation of effects of 3'- chalcone on the development of Zebrafish embryos was performed on days 6, 24 and 48 hpf (hours post fertilization), which was observed in different phases of embryonic development. Control of the compound solvent, DMSO showed to be nontoxic in all concentrations tested. Different concentrations of 3'-chalcone were tested in the range from 16 to 1 $\mu\text{g/mL}$. The toxic effect on embryonic development increases proportionally to the increase in concentration of the compound (**Fig. 4**). In addition, the results revealed a LC50 (lethal concentration 50%) 3.42 ± 0.46 $\mu\text{g/mL}$ in 48 hpf. In **Figure 5 (A-D)** are shown at

different stages embryos with normal development (control), gastrula period, targeting, and faríngula formed larvae. In **Figure 5E**, it is possible to observe an embryo with an effect called coagulation as a result of not training due to contact with the 3'-chalcone in a concentration 16 µg/mL. In the other figures can be seen later developments and/or defects in comparison to their controls, as in **Fig. 5F** in the embryo would have to be in faríngula phase, but did not pass the segmentation phase (3'-chalcone 2 µg/mL). **Figure 5G** with no pigmentation on the skin and eyes (3'-chalcone µg/mL) and **Fig. 5H** which still remain within the chorion and a large yolk sac (3'-chalcone 2 µg/mL).

Toxicity and efficacy in *G. mellonella* model

Larvae infected with 1×10^6 cells/larvae of *C. gattii* ATCC and the isolated 118. After that, they were treated with AmB at a dose of 2 mg/kg and 3'-chalcone at the doses of 160, 80 and 2 mg/kg. The same doses were used to evaluate toxicity in larvae. The results showed that none of the compound concentrations tested were toxic, since there was a 100% of survival (data not shown). In **Fig. 6**, it was observed that *C. gattii* ATCC 59660 was more virulent than the isolated 118 for the larvae, since most of the larvae infected with the ATCC strain died after 7 days of observation. The AmB treatment significantly increased the survival of larvae ($p < 0.05$) for the ATCC strain, but not for the isolated 118. The treatment with 3'-chalcone showed no efficacy in the treatment against *C. gattii* ATCC 59660 and the isolate 118 infection in *G. mellonella* model in any of the tested doses.

Fungal burden

The fungal burden was determined by plating the larvae infected with *C. gattii* (ATCC and isolated 118) non treated and treated with AmB (2 mg/kg) and 3'-chalcone (160, 80

and 2 mg/kg) (**Fig. 7**). The treatment with the 3'-chalcone had no statistical significance when compared to the untreated group. There was just statistical significance between the groups treated with AmB and the untreated control of *C. gattii* ATCC 56990.

Discussion

For being eukaryotes like mammals, there is a challenge for the pharmaceutical industry to establish pharmacological targets for antimicrobial drugs, besides their high cost and risk [27-29]. In this scenario, studies involving the exploration of new antifungal molecules emerge as alternative sources of new drugs, because of their greater efficiency, accessibility and lower toxicity. In this study we used the compound 3'- chalcone to evaluate its antifungal activity against the ATCC 56990 strain and the environmental isolate *C. gattii* 118.

Our results showed that the compound had a strong activity anti-*Cryptococcus* with fungicide effect, like amphotericin B. Other studies evaluated the antifungal activity of a group of 21 chalcones against *Candida* spp, *C. gattii* and *P. brasiliensis*. The results showed the best results for *P. brasiliensis* and no significant activity for *Candida* [30]. Other study tested chalcones isolated from the fruits of Kamala tree against several species of *Cryptococcus*, *Aspergillus* and *Candida*. The compounds didn't show activity against *Candida* but had a good activity against *Aspergillus* (16 µg/mL) and *C. neoformans* (4-8 µg/mL) [31].

The anti-biofilm activity of 3'-chalcone and the antifungal drugs fluconazole and amphotericin B was also verified. The results showed that *C. gattii* biofilms were resistant to fluconazole, however, AmB and 3'-chalcone were able to reduce in more than 80% the metabolic activity of the treated biofilms in all concentrations tested of

AmB and in concentrations higher or equal of 31,25 for the compound. A study conducted by Martinez & Casadevall (2006), confirmed the resistance of *C. neoformans* biofilms to azoles and the high susceptibility to amphotericin B [21, 32]. But fluconazole had no significant activity at the ATCC strain and isolated 118 was resistant as reported by other authors [21, 33]. Other studies have been performed trying to find new ways to combat biofilms of *Cryptococcus* spp, such as Chitosan [22], EDTA [34], antifolate drugs [35] and antituberculosis drugs, isoniazid and ethionamide alone and combined with itraconazole and fluconazole [32].

In vivo experiments involving zebrafish (and their embryos) are gaining popularity. In this context, the possible toxicity of the compound was evaluated in zebrafish embryos. It was observed that the first 6 hpf only the two highest concentrations of 3'-chalcone affect more than 50% of the embryos. In 24 hpf, besides these concentrations, the concentrations of 6 and 5 µg/mL caused 100% of mortality. So, it was concluded that 24 hpf is the most pronounced point, more susceptible to damage. This observation was also described in the study conducted by Tyl (2000) [36] who concluded that the point of vulnerability of teratogenic malformations is dependent on the embryo stage. It was suggested that the most critical stage of development in 24 hpf, when organogenesis occurs. In this step, there is the rapid differentiation of organs and extensive cell proliferation, which create particular teratogenic factors enabling structural defects [37]. The effects of 3'-chalcone on the development of zebrafish embryos were examined at concentrations around the MIC. For the ATCC strain, the value of LC50 obtained is close to the concentration required for inhibition of the *C. gattii* ATCC strain (MIC = 3.875 µg/mL), but it is higher than the ideal concentration ideal used to isolate 118 (MIC 0.96 µg/mL). Cytotoxicity results do not preclude the use

of chalcone future in the clinic, but the results in zebrafish show that should be avoided in pregnant patients.

Regarding to the alternative model *G. mellonella*, before starting the treatment of infected larvae, the toxicity assay of the compound was performed in order to check the larvae survival. The dosages of the compound used were 2, 80 and 160 mg/kg, and it was confirmed by the absence of death, the 3'-chalcone was not toxic to the model. After checking the toxicity, the larvae were infected with 10^6 CFU/larvae of *C. gattii* ATCC 56990 and *C. gattii* 118, following by the treatment with amphotericin B (2 mg/kg) and 3'-chalcone (2, 80, 160 mg/kg). It was conclude that the ATCC strain was more virulent than *C. gattii* 118. These result contradicts what has been seen in the tests with biofilms, which showed that the environmental strain was more virulent than the ATCC strain. Studies of different strains of *C. gattii* in *G. mellonella* have shown that virulence is not specifically associated with a type of molecular *C. gattii*, but relies heavily on individual attributes of the strain [38]. Regarding the effect of 3'- chalcone, there is no correlation between the *in vitro* and *in vivo* activity in this study. This fact could be explained by the non-polar nature of the molecule that difficult its distribution in the animal model. The same occurred with other compounds proposed as antifungal agents in other studies [39, 40].

Conclusions

In *in vitro* tests, the compound 3'-chalcone showed to be potent against *C. gattii* in their planktonic and biofilm format. In *in vivo* tests with zebrafish embryos, the compound showed to be teratogenic, however, the zebrafish model demonstrated efficacy for toxicity testing. Furthermore, the compound showed no toxicity in *G. mellonella*, although not proven to be suitable for efficacy trials in this model.

Acknowledgments

The authors declare that they have no conflict of interest.

We thank Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and PADC-UNESP, FAPESP and RENAMA - Cnpq the financial support.

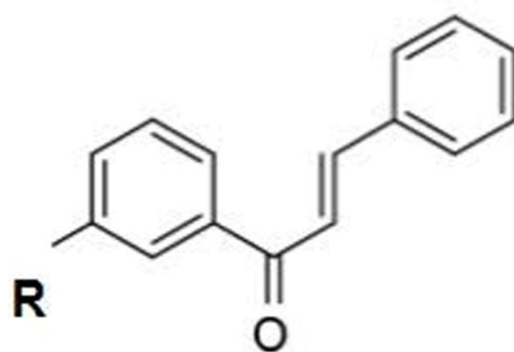
References

- [1] Park BJ, Wannemuehler KA, Marston BJ, Govender N, Pappas PG, Chiller TM (2009) Estimation of the current global burden of cryptococcal meningitis among persons living with HIV/AIDS. *AIDS* 23 (4):525-530
- [2] MacDougall L, Fyfe M, Romney M, Starr M, Galanis E (2011) Risk factors for *Cryptococcus gattii* infection, British Columbia, Canada. *Emerg Infect Dis* 17 (2):193-199
- [3] Brizendine KD, Baddley JW, Pappas PG (2011) Pulmonary cryptococcosis. *Semin Respir Crit Care Med* 32 (6):727-734
- [4] Dong ZM, Murphy JW (1995) Effects of the two varieties of *Cryptococcus neoformans* cells and culture filtrate antigens on neutrophil locomotion. *Infect Immun* 63 (7):2632-2644
- [5] Wright L, Bubbs W, Davidson J, Santangelo R, Krockenberger M, Himmelreich U, Sorrell T (2002) Metabolites released by *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* and var. *gattii* differentially affect human neutrophil function. *Microbes Infect* 4 (14):1427-1438
- [6] Cheng PY, Sham A, Kronstad JW (2009) *Cryptococcus gattii* isolates from the British Columbia cryptococcosis outbreak induce less protective inflammation in a murine model of infection than *Cryptococcus neoformans*. *Infect Immun* 77 (10):4284-4294
- [7] Martinez LR, Casadevall A (2015) Biofilm Formation by *Cryptococcus neoformans*. *Microbiol Spectr* 3 (3)
- [8] Sloan DJ, Dedicoat MJ, Lalloo DG (2009) Treatment of cryptococcal meningitis in resource limited settings. *Curr Opin Infect Dis* 22 (5):455-463
- [9] Sloan DJ, Parris V (2014) Cryptococcal meningitis: epidemiology and therapeutic options. *Clin Epidemiol* 6:169-182
- [10] Gullo FP, Rossi SA, Sardi JeC, Teodoro VL, Mendes-Giannini MJ, Fusco-Almeida AM (2013) Cryptococcosis: epidemiology, fungal resistance, and new alternatives for treatment. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 32 (11):1377-1391
- [11] Boumendjel A, Ronot X, Boutonnat J (2009) Chalcones derivatives acting as cell cycle blockers: potential anti cancer drugs? *Curr Drug Targets* 10 (4):363-371
- [12] Vogel S, Barbic M, Jürgenliemk G, Heilmann J (2010) Synthesis, cytotoxicity, anti-oxidative and anti-inflammatory activity of chalcones and influence of A-ring modifications on the pharmacological effect. *Eur J Med Chem* 45 (6):2206-2213
- [13] de Mattos CB, Argenta DF, Melchiades GeL, Cordeiro MN, Tonini ML, Moraes MH, Weber TB, Roman SS, Nunes RJ, Teixeira HF, Steindel M, Koester LS (2015) Nanoemulsions containing a synthetic chalcone as an alternative for treating cutaneous leishmaniasis: optimization using a full factorial design. *Int J Nanomedicine* 10:5529-5542

- [14] Singh H, Sidhu S, Chopra K, Khan MU (2016) Hepatoprotective effect of trans-Chalcone on experimentally induced hepatic injury in rats: inhibition of hepatic inflammation and fibrosis. *Can J Physiol Pharmacol* 94 (8):879-887
- [15] Wang YH, Dong HH, Zhao F, Wang J, Yan F, Jiang YY, Jin YS (2016) The synthesis and synergistic antifungal effects of chalcones against drug resistant *Candida albicans*. *Bioorg Med Chem Lett* 26 (13):3098-3102
- [16] López SN, Castelli MV, Zacchino SA, Domínguez JN, Lobo G, Charris-Charris J, Cortés JC, Ribas JC, Devia C, Rodríguez AM, Enriz RD (2001) In vitro antifungal evaluation and structure-activity relationships of a new series of chalcone derivatives and synthetic analogues, with inhibitory properties against polymers of the fungal cell wall. *Bioorg Med Chem* 9 (8):1999-2013
- [17] Raso TF, Werther K, Miranda ET, Mendes-Giannini MJ (2004) Cryptococcosis outbreak in psittacine birds in Brazil. *Med Mycol* 42 (4):355-362
- [18] CLSI (2008) Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; aproved standard - third edition. CLSI document M27-A3 (ISBN-1-56238-666-2). Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, USA
- [19] Scorzoni L (2007) The use of standard methodology for determination of antifungal activity of natural products against medical yeasts *Candida* sp and *Cryptococcus* sp. *Brazilian Journal of Microbiology*
- [20] Soares L, Gullo F, Sardi J, Pitangui N, Costa-Orlandi C, Sangalli-Leite F, Scorzoni L, Regasini L, Petônio M, Souza F, Silva D, Mendes-Giannini M, Fusco-Almeida A (2014) Anti-Trichophyton Activity of Protocatechuates and Their Synergism with Fluconazole. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2014
- [21] Martinez LR, Casadevall A (2006) Susceptibility of *Cryptococcus neoformans* biofilms to antifungal agents in vitro. *Antimicrob Agents Chemother* 50 (3):1021-1033
- [22] Martinez LR, Mihu MR, Han G, Frases S, Cordero RJ, Casadevall A, Friedman AJ, Friedman JM, Nosanchuk JD (2010) The use of chitosan to damage *Cryptococcus neoformans* biofilms. *Biomaterials* 31 (4):669-679
- [23] Costa-Orlandi CB, Sardi JC, Santos CT, Fusco-Almeida AM, Mendes-Giannini MJ (2014) In vitro characterization of *Trichophyton rubrum* and *T. mentagrophytes* biofilms. *Biofouling* 30 (6):719-727
- [24] Maes J, Verlooy L, Buenafe OE, de Witte PA, Esguerra CV, Crawford AD (2012) Evaluation of 14 organic solvents and carriers for screening applications in zebrafish embryos and larvae. *PLoS One* 7 (10):e43850
- [25] Busquet F, Strecker R, Rawlings JM, Belanger SE, Braunbeck T, Carr GJ, Cenijn P, Fochtman P, Gourmelon A, Hubler N, Kleensang A, Knobel M, Kussatz C, Legler J, Lillicrap A, Martinez-Jeronimo F, Polleichtner C, Rzodeczko H, Salinas E, Schneider KE, Scholz S, van den Brandhof EJ, van der Ven LT, Walter-Rohde S, Weigt S, Witters H, Halder M (2014) OECD validation study to assess intra- and inter-laboratory reproducibility of the zebrafish embryo toxicity test for acute aquatic toxicity testing. *Regul Toxicol Pharmacol* 69 (3):496-511
- [26] de Lacorte Singulani J, Scorzoni L, de Paula ESAC, Fusco-Almeida AM, Mendes-Giannini MJ (2016) Evaluation of the efficacy of antifungal drugs against *Paracoccidioides brasiliensis* and *Paracoccidioides lutzii* in a *Galleria mellonella* model. *Int J Antimicrob Agents*
- [27] Luna B, Drew RH, Perfect JR (2000) Agents for treatment of invasive fungal infections. *Otolaryngol Clin North Am* 33 (2):277-299
- [28] Chen SC, Sorrell TC (2007) Antifungal agents. *Med J Aust* 187 (7):404-409

- [29] Lipp HP (2008) Antifungal agents--clinical pharmacokinetics and drug interactions. *Mycoses* 51 Suppl 1:7-18
- [30] de Carvalho Tavares L, Johann S, Maria de Almeida Alves T, Guerra JC, Maria de Souza-Fagundes E, Cisalpino PS, Bortoluzzi AJ, Caramori GF, de Mattos Piccoli R, Braibante HT, Braibante ME, Pizzolatti MG (2011) Quinolinylnyl and quinolinylnyl N-oxide chalcones: synthesis, antifungal and cytotoxic activities. *Eur J Med Chem* 46 (9):4448-4456
- [31] Kulkarni RR, Tupe SG, Gamble SP, Chandgude MG, Sarkar D, Deshpande MV, Joshi SP (2014) Antifungal dimeric chalcone derivative kamalachalcone E from *Mallotus philippinensis*. *Nat Prod Res* 28 (4):245-250
- [32] Brilhante RS, Caetano EP, Oliveira JS, Castelo-Branco DeS, Souza ER, Alencar LP, Cordeiro ReA, Bandeira TeJ, Sidrim JJ, Rocha MF (2015) Simvastatin inhibits planktonic cells and biofilms of *Candida* and *Cryptococcus* species. *Braz J Infect Dis* 19 (5):459-465
- [33] Iñigo M, Pemán J, Del Pozo JL (2012) Antifungal activity against *Candida* biofilms. *Int J Artif Organs* 35 (10):780-791
- [34] Robertson EJ, Wolf JM, Casadevall A (2012) EDTA inhibits biofilm formation, extracellular vesicular secretion, and shedding of the capsular polysaccharide glucuronoxylomannan by *Cryptococcus neoformans*. *Appl Environ Microbiol* 78 (22):7977-7984
- [35] de Aguiar Cordeiro R, Mourão CI, Rocha MF, de Farias Marques FJ, Teixeira CE, de Oliveira Miranda DF, Neto LV, Brilhante RS, de Jesus Pinheiro Gomes Bandeira T, Sidrim JJ (2013) Antifolates inhibit *Cryptococcus* biofilms and enhance susceptibility of planktonic cells to amphotericin B. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 32 (4):557-564
- [36] RW T (2000) *General and Applied Toxicology*. pp 1167-1201
- [37] Rizzo LY, Golombek SK, Mertens ME, Pan Y, Laaf D, Broda J, Jayapaul J, Mockel D, Subr V, Hennink WE, Storm G, Simon U, Jahnen-Dechent W, Kiessling F, Lammers T (2013) In Vivo Nanotoxicity Testing using the Zebrafish Embryo Assay. *J Mater Chem B Mater Biol Med* 1
- [38] Firacative C, Duan S, Meyer W (2014) *Galleria mellonella* model identifies highly virulent strains among all major molecular types of *Cryptococcus gattii*. *PLoS One* 9 (8):e105076
- [39] Favre-Godal Q, Dorsaz S, Queiroz EF, Conan C, Marcourt L, Wardojo BP, Voinesco F, Buchwalder A, Gindro K, Sanglard D, Wolfender JL (2014) Comprehensive approach for the detection of antifungal compounds using a susceptible strain of *Candida albicans* and confirmation of in vivo activity with the *Galleria mellonella* model. *Phytochemistry* 105:68-78
- [40] Mircus G, Albert N, Ben-Yaakov D, Chikvashvili D, Shadkchan Y, Kontoyiannis DP, Osherov N (2015) Identification and characterization of a novel family of selective antifungal compounds (CANBEFs) that interfere with fungal protein synthesis. *Antimicrob Agents Chemother* 59 (9):5631-5640

FIGURE 1. Molecular structure of 3'-chalcone



3'- chalcone

FIGURE 2. Susceptibilities of *C. gattii* biofilms to fluconazole, Amphotericin B and 3'- chalcone.

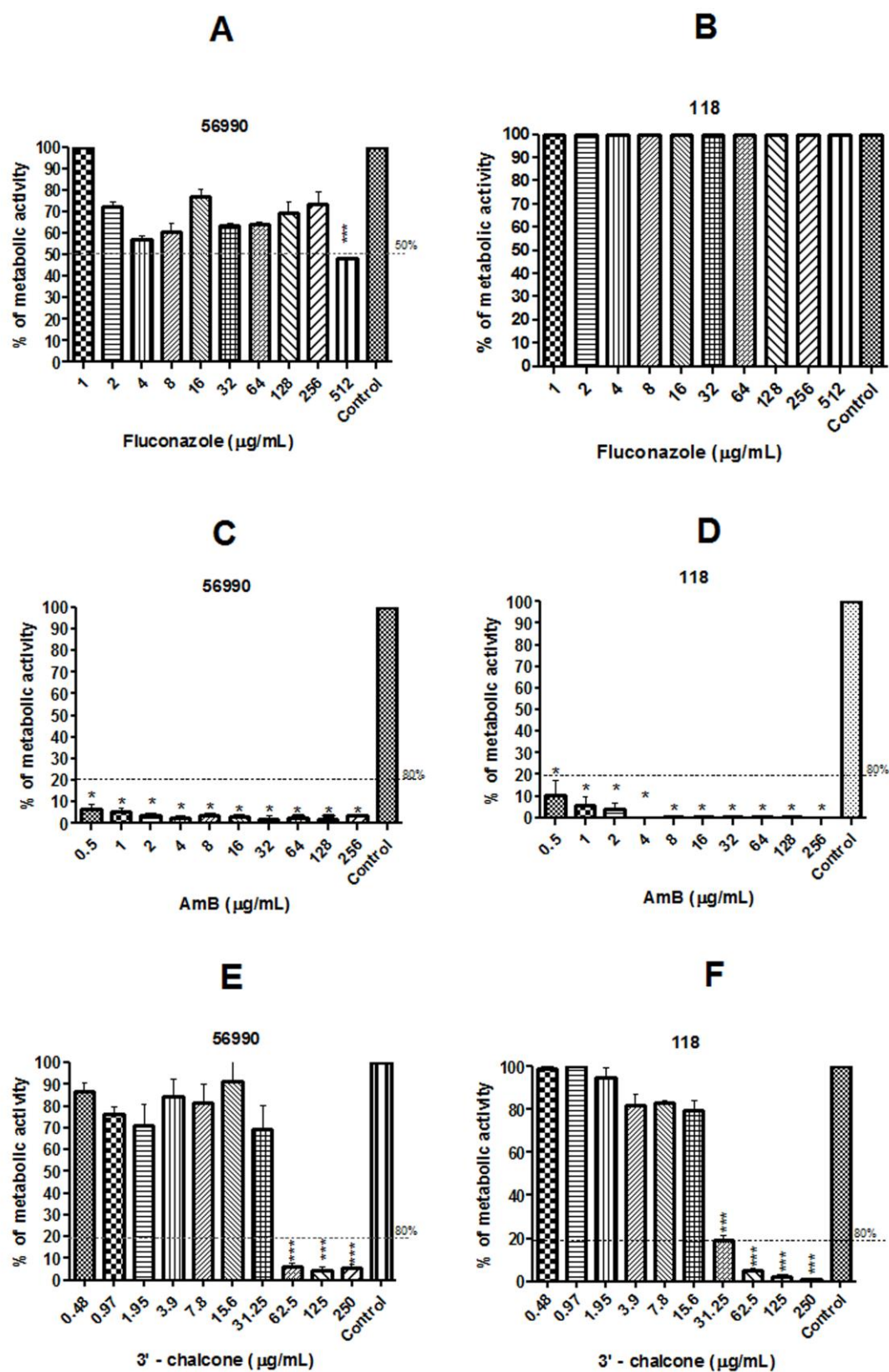


FIGURE 3. Scanning Electron Microscopy of *C. gattii* mature biofilms non treated and treated with AmB and 3'-chalcone.

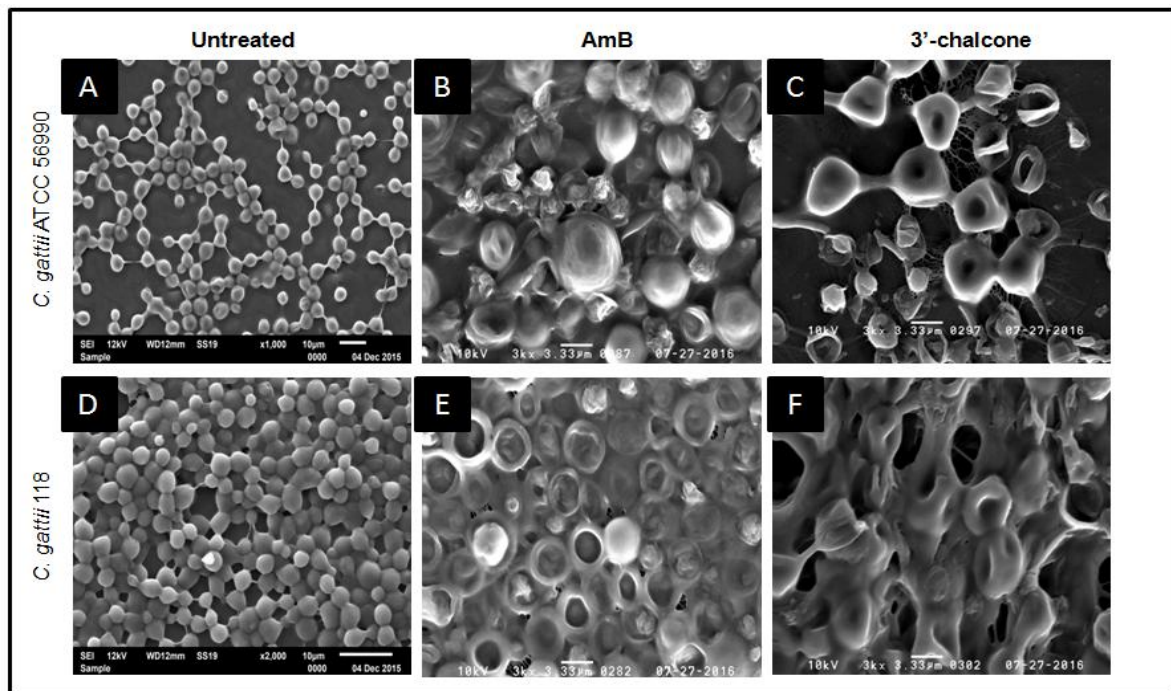


FIGURE 4. Survival curve zebrafish embryos in contact with different concentrations of 3'-chalcone 6, 24 and 48 hpf (hours post fertilization).

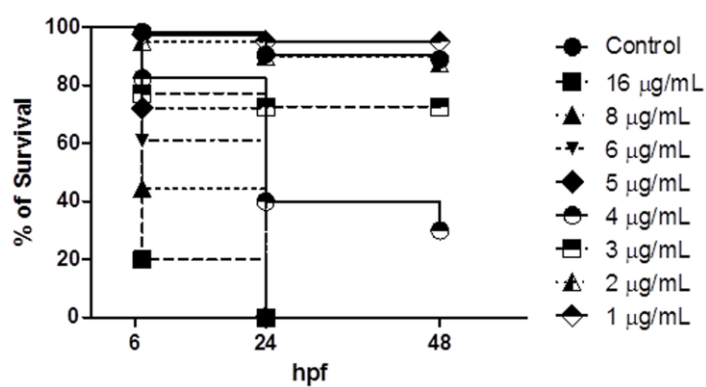


FIGURE 5. Toxicity of 3'-chalcone in Zebrafish embryos.

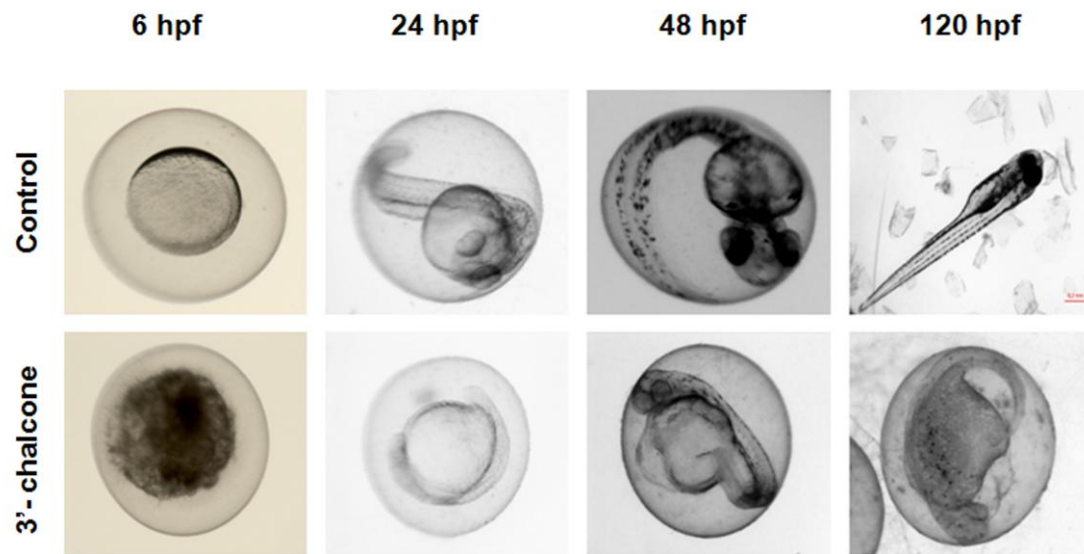


FIGURE 6. Survival curve of *Galleria mellonella* larvae infected with strain *C. gattii* 56990 (A) and *C. gattii* 118 (B) and treated with 3'-chalcone (160, 80 and 2 mg / kg).

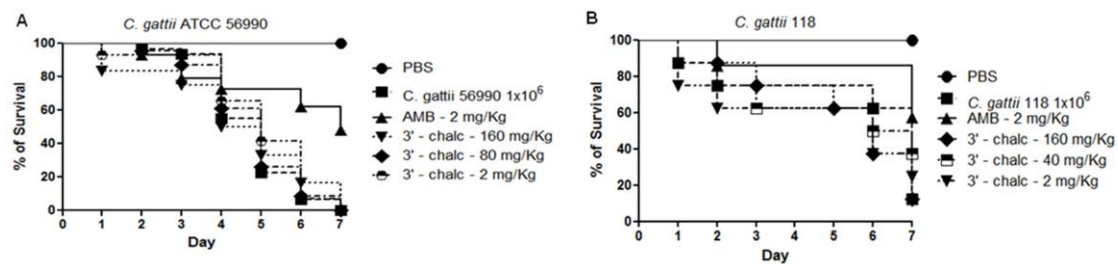


FIGURE 7. Effect of antifungal treatment in fungal load *Galleria mellonella* infected with 1×10^6 cfu / larvae of *C. gattii*.

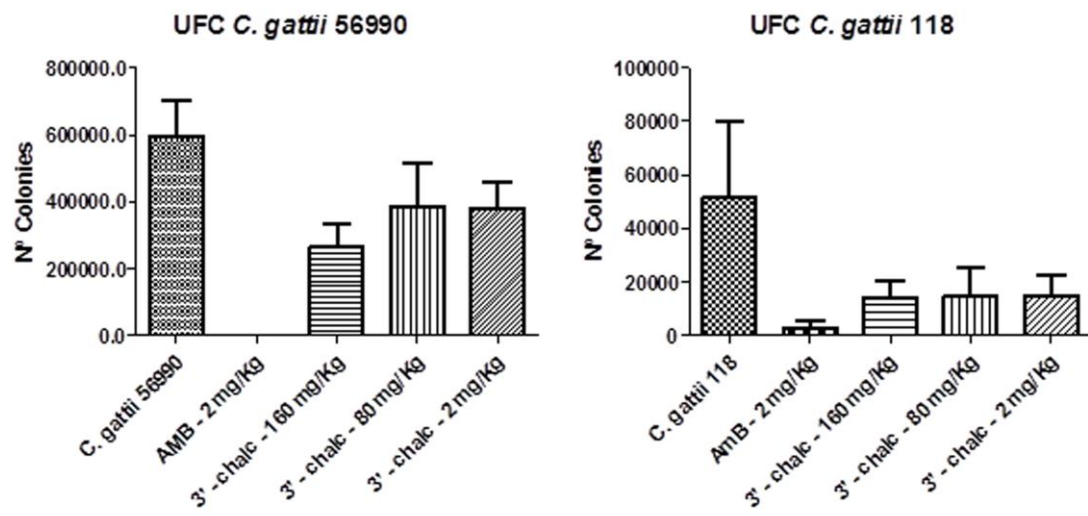


Table 1. Susceptibilities of *C. gattii* to 3'- chalcone, fluconazole and amphotericin B.

	3'- CHALCONe		FLZ		AMB	
	MIC	MFC	MIC	MFC	MIC	MFC
<i>C. gattii</i> ATCC 56990	1,930	3,875	8	16	0,125	0,031
<i>C. gattii</i> 118	0,960	0,960	>64	>64	0,0625	0,0625
<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019	125	125	8	8	1	0,5

MIC: mininum inhibitory concentration; MFC: minimum fungicidal concentration; FLZ: fluconazole; AMB: amphotericin B.