

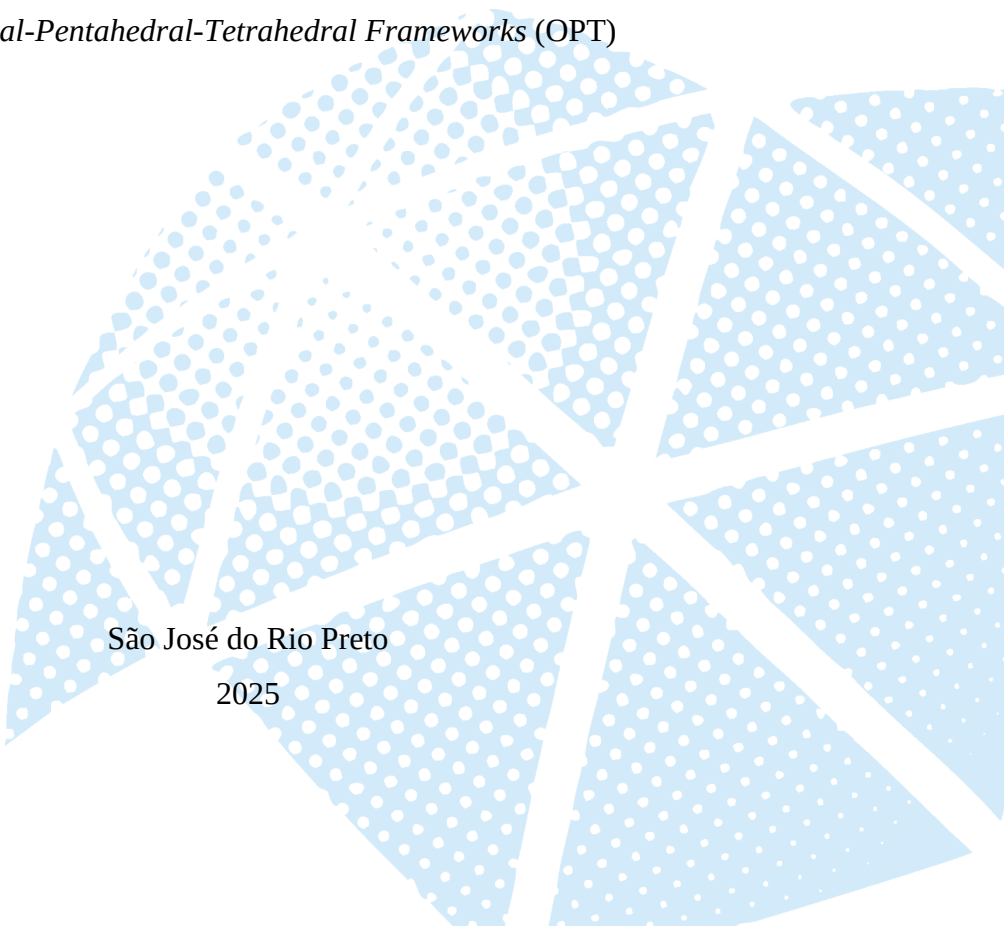
UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas – Campus de São José do Rio Preto

ARTHUR LIMA BARBOSA

PROPRIEDADES ANTIMICROBIANAS DE UM NOVO MATERIAL INORGÂNICO
Octahedral-Pentahedral-Tetrahedral Frameworks (OPT)

São José do Rio Preto

2025



ARTHUR LIMA BARBOSA

PROPRIEDADES ANTIMICROBIANAS DE UM NOVO MATERIAL INORGÂNICO

Octahedral-Pentahedral-Tetrahedral Frameworks (OPT)

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Microbiologia, junto ao Programa de Pós-Graduação de Microbiologia, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de São José do Rio Preto.

Área de Concentração: Microbiologia

Orientadora: Profa. Dra. Margarete Teresa Gottardo de Almeida

São José do Rio Preto

2025

B238p

Barbosa, Arthur Lima

Propriedades Aantimicrobianas de um Novo Material Inorgânico :
Octahedral-Pentahedral-Tetrahedral Frameworks (OPT) / Arthur Lima
Barbosa. -- São José do Rio Preto, 2025

49 p. : il., tabs.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de
Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto

Orientadora: Margarete Teresa Gottardo de Almeida

1. antibacterianos. 2. antifúngicos. 3. Galleria mellonella. 4.
octahedral-pentahedral-tetrahedral framework. 5. silicato de bismuto. I. Título.

IMPACTO POTENCIAL DESTA PESQUISA

Este trabalho investigou as propriedades antimicrobianas de um novo material inorgânico, portanto, os potenciais da pesquisa são tanto técnicos quanto sociais. Quanto ao potencial técnico, estão como principais o estabelecimento de padrões de comparação para futuros estudos com esse material e materiais semelhantes e a inovação da utilização desse material com a finalidade de utilizá-lo como agente antimicrobiano. Quanto ao potencial social, está principalmente o potencial para a saúde pública, tendo em vista a ação antimicrobiana comprovada e a não-toxicidade do material.

POTENCIAL IMPACT OF THIS RESEARCH

This work investigated the antimicrobial properties of a new inorganic material; therefore, the research's potential is both technical and social. Regarding its technical potential, the main aspects include establishing comparison standards for future studies with this material and similar materials, as well as innovating its use as an antimicrobial agent. As for social potential, the main aspect is its impact on public health, given the proven antimicrobial action and the material's non-toxicity.

ARTHUR LIMA BARBOSA

PROPRIEDADES ANTIMICROBIANAS DE UM NOVO MATERIAL INORGÂNICO

Octahedral-Pentahedral-Tetrahedral Frameworks (OPT)

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Microbiologia, junto ao Programa de Pós-Graduação de Microbiologia, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de São José do Rio Preto.

Área de Concentração: Microbiologia

Data da defesa: 26/02/2025

Banca Examinadora:

Profa. Dra. Margarete Teresa Gottardo de Almeida
UNESP – IBILCE – Câmpus de São José do Rio Preto
Orientadora

Prof. Dr. José Geraldo Nery
UNESP – IBILCE – Câmpus de São José do Rio Preto

Profa. Dra. Marcia Regina von Zeska Kress
FCFRP – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto

Dr. Thiago Henrique Lemes
UNIRP – Centro Universitário de Rio Preto

Dra. Mariela Domiciano Ribeiro Marques
FAMERP – Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto

Dedico este trabalho à minha família, meu pai Ricardo, minha mãe Elaine, e minha irmã Laura. Obrigado por sempre estarem ao meu lado.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço à minha família, Ricardo, Elaine e Laura, por sempre ter me apoiado em minha carreira acadêmica, por todos os conselhos dados e por todas as oportunidades apresentadas. Da mesma forma, agradeço a todos os meus amigos por sempre estarem ao meu lado me ajudando com tudo que precisava. Não conseguiria ter concluído esta etapa da minha vida sem vocês todos.

Agradeço à Profa. Dra. Margarete Teresa Gottardo de Almeida, minha orientadora, por ter me apresentado a proposta deste trabalho, por ter me ajudado na execução dos experimentos, por ter me orientado em que tipos de perspectivas deveria prestar atenção, e por ter ajudado muito ao redigir este trabalho. Suas contribuições são a principal razão deste trabalho estar tão completo como está agora.

Agradeço ao Prof. Dr. José Geraldo Nery, por ter me aconselhado quanto ao trabalho, especialmente nas áreas que eu não domino, e por participar nas bancas examinadoras da qualificação e da defesa da dissertação.

Agradeço à Profa. Dra. Marcia Regina von Zeska Kress por ter me ajudado com os testes *in vivo*, com certas colocações e correções tanto neste trabalho como na qualificação, e por participar nas bancas examinadoras da qualificação e da defesa da dissertação.

Agradeço ao Erick Paiva Cancelli, por ter sintetizado e me fornecido o material principal deste trabalho, por ter me auxiliado nas questões avançadas de como funciona e como interage. Além disso, gostaria de agradecer ao Guilherme de Paula Guarnieri e ao Guilherme Molinari Sacco, do mesmo laboratório, aos quais compartilhei uma disciplina de pós-graduação e que me ajudaram muito também. Vocês três me ajudaram a navegar no mundo da Física.

Agradeço ao Dr. Moacir Fernandes Godoy, por ter me ensinado os princípios estatísticos que deveria usar na execução do trabalho e depois me ajudado em sua aplicação. Parecia algo muito extenso no início, mas você explicou de uma maneira que deixou o processo simples e completo.

Agradeço ao Dr. Thiago Henrique Lemes, por me ajudar desde o início do trabalho, me mostrando o que eu deveria fazer, o que eu deveria usar, como deveria interpretar os resultados, como deveria escrevê-los, e muito mais. Você me ajudou a construir a fundação deste trabalho com maestria. Além disso, agradeço na participação nas bancas examinadoras da qualificação e da defesa da dissertação – mesmo como suplentes, fazem um importante papel.

Agradeço à Dra. Mariela Domiciano Ribeiro Marques, por ter me ajudado com muitos dos experimentos – tanto em como fazê-los como também os fazendo diretamente comigo. A ajuda que me deu quanto comecei a redigir este trabalho também foi de imensa ajuda, dando direção sobre os próximos passos a serem seguidos. Por fim, agradeço na participação nas bancas examinadoras da qualificação e da defesa da dissertação – mesmo como suplentes, fazem um importante papel.

Agradeço à Profa. Dra. Alessandra Vidotto, por ter me ajudado bastante com correções na minha defesa de dissertação, limpando a apresentação e dando dicas sobre como aprimorar os aspectos visuais dos *slides*.

Agradeço ao Laboratório de Microbiologia da FAMERP pela infraestrutura que proveu ao meu trabalho, mas o agradecimento principal vai às pessoas dele. Agradeço à Emília Cristina Gianizella, Luceli Ferreira de Souza, Bianca Gottardo de Almeida, Isabelle Cardoso Alves de Lima, Taiza Maschio de Lima, Maicon Henrique Caetano, Cleuzenir Toschi Gomes Barbieri e Elza Maria Castilho.

Agradeço ao Laboratório Multiusuário da FAMERP por ter provido a infraestrutura para as medições que precisei tomar durante a execução do trabalho.

Agradeço ao IBILCE, primeiro pela graduação, e agora pela pós-graduação. O conhecimentos que os professores deste instituto conferirão a mim é inigualável.

Agradeço ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia e ao Conselho por oferecer a oportunidade de uma pós-graduação, por sempre responderem minhas dúvidas e por estarem sempre dispostos a ajudar.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) – Código de Financiamento 001.

Por fim, agradeço a todos aqueles que não foram citados, mas ainda sim merecem reconhecimento pelo trabalho que fizeram a mim.

RESUMO

O aumento de casos de infecções por microrganismos multirresistentes é um problema cada vez mais presente. As opções atuais de tratamento são limitadas, pela resistência intrínseca e adquirida, além dos efeitos colaterais, portanto novas opções se mostram atrativas. Opções de agentes antimicrobianos emergentes são os materiais inorgânicos, como nanopartículas, especialmente quando combinados a íons metálicos. Um material ainda não estudado neste contexto é o *Octahedral-Pentahedral-Tetrahedral framework* (OPT), sendo promissor pela sua capacidade de ser composto por metais antimicrobianos e por conseguir armazenar íons metálicos. Os objetivos deste trabalho foram analisar, quantificar, e comparar a ação antimicrobiana de um OPT silicato de bismuto (denominado no trabalho OPTBi) e um OPT silicato de bismuto com íons de cobre (denominado no trabalho de OPTCu) contra *Candida albicans*, *Candida parapsilosis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*. Além disso, foi comparada a susceptibilidade antimicrobiana de cepas referência ATCC e isolados clínicos e avaliada a toxicidade dos OPTs em modelo vivo de *Galleria mellonella*. Os métodos empregados foram a microdiluição para determinar a concentração inibitória mínima (CIM), a cinética de morte utilizando 2x a CIM obtida, e injeção desta concentração em *G. mellonella*. Quanto aos resultados, o OPTBi possui ação contra as leveduras, porém sua ação é limitada contra bactérias. Em contrapartida, o OPTCu inibe leveduras e bactérias. No experimento de microdiluição, a CIM variou de 2000 a 500 µg/ml para leveduras com OPTBi, de 1000 a 250 µg/ml para leveduras com OPTCu; de >4000 a 2000 µg/ml para bactérias com OPTBi, e de >4000 a 250 µg/ml para bactérias com OPTCu. No experimento de cinética de morte, a redução do número de unidades formadoras de colônia de bactérias foi superior a 50% após 2 horas de exposição, e superior a 80% após 24 horas de exposição para todos os microrganismos. No experimento com o modelo vivo, nenhuma morte foi provocada pelos OPTs em larvas de *G. mellonella* nas concentrações específicas testadas, logo, tais concentrações não foram tóxicas. Estes resultados não só comprovam a ação antimicrobiana dos OPTs, como também abrem as portas para novos estudos usando estes materiais como alternativas terapêuticas. Mais estudos são necessários, levando em consideração interações com medicamentos e as interações físico-químicas do material com os microrganismos.

Palavras-chave: antibacterianos; antifúngicos; *Galleria mellonella*; *octahedral-pentahedral-tetrahedral framework*; silicato de bismuto.

ABSTRACT

The increasing rate of infections caused by multi-resistant microorganisms is a growing concern. Current treatment options are limited by intrinsic and acquired resistance, as well as side effects, so new options are appealing. Emerging antimicrobial agent options are inorganic materials such as nanoparticles, especially when combined with metal ions. A material that has not yet been studied in this context is the Octahedral-Pentahedral-Tetrahedral framework (OPT), which is promising for its ability to be composed of antimicrobial metals and for being able to carry metal ions. The objectives of this study were to analyze, quantify and compare the antimicrobial action of an OPT bismuth silicate (referred to as OPTBi in this study) and an OPT bismuth silicate with copper ions (referred to as OPTCu in this study) against *Candida albicans*, *Candida parapsilosis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*. In addition, the antimicrobial susceptibility of ATCC reference strains and clinical isolates was compared and the toxicity of OPTs was evaluated in a live model of *Galleria mellonella*. The methods used were microdilution assay, to determine the minimum inhibitory concentration (MIC), time-kill assay, using 2x the MIC obtained, and injection of this concentration into *G. mellonella*. As for the results, OPTBi was shown to be effective against yeasts, but its effectiveness against bacteria is limited. In contrast, OPTCu inhibits both yeasts and bacteria. In the microdilution assay, the MIC ranged from 2000 to 500 µg/ml for yeasts with OPTBi, from 1000 to 250 µg/ml for yeasts with OPTCu; from >4000 to 2000 µg/ml for bacteria with OPTBi, and from >4000 to 250 µg/ml for bacteria with OPTCu. In the time-kill assay, the reduction in the number of bacterial colony-forming units was greater than 50% after 2 hours of exposure, and greater than 80% after 24 hours of exposure for all microorganisms. In the live model experiment, no deaths were caused by the OPTs in *G. mellonella* larvae at the specific concentrations tested, so these concentrations were not toxic. These results not only prove the antimicrobial action of OPTs, but also open the door to new studies using these materials as therapeutic alternatives. More studies are needed, considering interactions with drugs and the physicochemical interactions of the material with microorganisms.

Key-words: antibacterial; antifungal; bismuth silicate; *Galleria mellonella*; octahedral-pentahedral-tetrahedral framework.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação de um silicato de titânio	18
Figura 2. <i>Time-kill assay of C. albicans</i>	24
Figura 3. <i>Time-kill assay of C. parapsilosis</i>	25
Figura 4. <i>Time-kill assay of K. pneumoniae</i>	25
Figura 5. <i>Time-kill assay of P. aeruginosa</i>	26
Figura 6. <i>Time-kill assay of S. aureus</i>	26
Figura 7. <i>In vivo experiment with Galleria mellonella larvae</i>	27
Figura 8. Gráfico de Cinética de Morte para <i>Candida albicans</i> usando somatória	46
Figura 9. Gráfico de Cinética de Morte para <i>Candida parapsilosis</i> usando somatória	46
Figura 10. Gráfico de Cinética de Morte para <i>Klebsiella pneumoniae</i> usando somatória	47
Figura 11. Gráfico de Cinética de Morte para <i>Pseudomonas aeruginosa</i> usando somatória	47
Figura 12. Gráfico de Cinética de Morte para <i>Staphylococcus aureus</i> usando somatória	48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. <i>Table of minimum inhibitory concentration</i>	22
Tabela 2. Ensaio de Cinética de Morte: contagem de UFC/ml, média	44
Tabela 3. Ensaio de Cinética de Morte: contagem de UFC/ml, somatória	45

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AgNP	Nanopartícula de Prata
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BiNP	Nanopartícula de Bismuto
CFU	<i>Colony-Forming Unit</i> (vide UFC)
CIM	Concentração Mínima Inibitória
CLSI	<i>Clinical Laboratory Standards Institute</i>
CuNP	Nanopartícula de Cobre
DMSO	Dimetilsulfóxido
FAMERP	Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto
MIC	<i>Minimal Inhibitory Concentration</i> (vide CIM)
OMS	Organização Mundial da Saúde
OPT	<i>Octahedral-Pentahedral-Tetrahedral framework</i>
OPTBi	OPT silicato de bismuto
OPTCu	OPT silicato de bismuto com íons de cobre
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
TTC	Cloreto de 2,3,5-Trifeniltetrazólio
UFC	Unidade Formadora de Colônia
WHO	<i>World Health Organization</i> (vide OMS)

LISTA DE SÍMBOLOS

°C	Grau Celsius
Bi	Bismuto
Cu	Cobre
mg	Miligramma
ml	Mililitro
mm	Milímetro
O	Oxigênio
Si	Silício
Sn	Estanho
Ti	Titânio
µg	Microgramma
µl	Microlitro

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	OBJETIVOS	19
2.1	OBJETIVO GERAL	19
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	19
3	MANUSCRITO: <i>OCTAHEDRAL-PENTAHEDRAL-TETRAHEDRAL FRAMEWORKS (OPT): ANTIMICROBIAL PROPERTIES AGAINST YEAST AND BACTERIA</i>	20
4	CONCLUSÃO	36
5	PERSPECTIVAS FUTURAS	37
5.1.	ANÁLISE DA SUSCETIBILIDADE COMPARADA ENTRE OPT E ANTIBIÓTICOS	37
5.2.	EFEITO DO OPT EM NÍVEL CELULAR E MOLECULAR	37
5.3.	EFEITO DOS OPTS NA ADERÊNCIA, FORMAÇÃO E DESTRUIÇÃO DE BIOFILMES	38
	REFERÊNCIAS	39
	APÊNDICE A – TABELAS E GRÁFICOS EXTRAS	45

1. INTRODUÇÃO

Doenças bacterianas e fúngicas afetam dezenas de milhões de pessoas anualmente no mundo todo, com milhões dessas infecções levando à morte, como registrado por Instituições como a Organização Mundial da Saúde (OMS) e diversos pesquisadores independentes (DENNING, 2024; IKUTA *et al.*, 2022; OMS, 2022, 2024). É estimado que cerca de 13,7 milhões de mortes tenham sido causadas por infecções bacterianas globalmente em 2019, com 30,9% dessas mortes causadas por apenas cinco espécies de bactérias: *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus pneumoniae* (IKUTA, *et al.*, 2022.). Enquanto isso, cerca de 2,5 milhões de mortes podem ser diretamente atribuídas a infecções fúngicas, com as infecções mais prevalentes a aspergilose e a candidíase (DENNING, 2024).

A opção atualmente difundida para o tratamento de infecções causadas por microrganismos é o uso de fármacos antibióticos. Para fungos do gênero *Candida*, por exemplo, os primeiros tratamentos com antifúngicos introduzidos na década de 50 dependiam da classe dos polienos, como anfotericina B, que atua extraindo ergosterol da membrana celular fúngica, rompendo-a e causando morte celular. Visto que a anfotericina B é tóxica dependendo da dose utilizada, tende a ser desfavorecida atualmente, com os tratamentos mais usados sendo os azóis, como fluconazol, e as equinocandinas; com o primeiro bloqueando a via de síntese do ergosterol e a segunda bloqueando (1,3)- β -D-Glucano Sintase, responsável pela síntese de (1,3)- β -D-Glucano, responsável pela manutenção da integridade da parede celular (LEE *et al.*, 2021). As possibilidades são mais amplas para o tratamento de infecções bacterianas, sendo os mais comuns os compostos que impedem a síntese da parede celular pela inibição da polimerização de peptidoglicano, como as famílias dos betalactâmicos e dos antibióticos glicopeptídicos; ou que rompem a membrana celular, como as famílias dos lipopeptídeos cíclicos e das polimixinas. Além desses, há outros tipos de antibacterianos disponíveis, como os que inibem síntese de ácidos nucleicos, os que inibem a síntese proteica e os que interferem em outras vias metabólicas (BARAN *et al.*, 2023).

Apesar da disponibilidade de antibióticos, seu uso indiscriminado pode resultar em uma pressão seletiva darwiniana e transmissão horizontal de genes que conferem resistência, levando a prevalência de cepas de microrganismos multirresistentes (HOLMES *et al.*, 2016; MANCUSO *et al.*, 2021).

Desde muito tempo, as bactérias *Enterococcus faecium*, *S. aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *P. aeruginosa* e *Enterobacter* sp., compondo o grupo

chamado ESKAPE, representam paradigmas de patogênese, transmissão e resistência (RICE, 2008). De modo geral, a resistência se deve à capacidade de inativar fármacos, modificar o sítio de ligação, bombear fármacos para o espaço extracelular, ou sua permanência em estruturas complexas como biofilmes, dificultando o controle e eliminação desses microrganismos (DENISSEN *et al.*, 2022; MANCUSO *et al.*, 2021; OLIVEIRA *et al.*, 2020; SANTAJIT, INDRAWATTANA, 2016). O arsenal de mecanismos de resistência observado nos fungos do gênero *Candida* é similar, sendo os principais: inativação de fármaco, modificação de estruturas alvos de ação e bomba de efluxo (DANESHNIA *et al.*, 2023; LEE *et al.*, 2021; PRISTOV, GHANNOUM, 2019). Por conta disso, a OMS coloca estes microrganismos em listas de observação, classificando-os como de importância crítica (OMS, 2022, 2024).

Com o aumento de casos de microrganismos patogênicos resistentes, novos compostos terapêuticos se mostram cada vez mais necessários (BARAN *et al.*, 2023; HOLMES *et al.*, 2016; MANCUSO *et al.*, 2021; TANG *et al.*, 2023; UDDIN *et al.*, 2021). O uso de materiais inorgânicos como agentes antimicrobianos tem ganhado destaque como uma alternativa, especialmente no uso de partículas associadas a metais como o cobre (HAVRYLIUK *et al.*, 2024, KHAIRY *et al.*, 2024) e prata (CORIOLANO *et al.*, 2021; GOTTARDO *et al.*, 2019). Partículas em tamanho nanométrico podem ser associadas a esses metais e, por conta de seu tamanho, circulam no sistema de seres vivos por mais tempo, oferecem maior contato entre a partícula e o patógeno – com maior absorção – e são mais biodisponíveis (CORIOLANO *et al.*, 2021). Nanopartículas podem ser sintetizadas a partir de metais, gerando nanopartículas de bismuto (BiNPs) (VAZQUEZ-MUNOZ *et al.*, 2020a; VAZQUEZ-MUNOZ *et al.*, 2020b), cobre (CuNPs) (HAVRYLIUK *et al.*, 2024) ou de prata (AgNPs) (CORIOLANO *et al.*, 2021; LARA *et al.*, 2021; VAZQUEZ-MUNOZ *et al.*, 2020c), por exemplo, todas com ação antimicrobiana.

As AgNPs, por exemplo, podem ser sintetizadas por diversos métodos – síntese química, fotoablação ou evaporação-condensação – e suas propriedades antimicrobianas são resultado de sua penetração pela parede e membrana celular, destruindo organelas, desnaturando proteínas e causando a produção de espécies reativas de oxigênio e estresse oxidativo (CORIOLANO *et al.*, 2021).

Além das nanopartículas contendo apenas metais, tais materiais podem estar associados a moléculas orgânicas ou não. O bismuto pode ser utilizado como terapêutico antimicrobiano na forma de Bi₂O₃ ou associado a antibióticos betalactâmicos, especialmente no tratamento de *Helicobacter pylori* e *Escherichia coli*, devido à inativação de enzimas que clivam esse antibiótico (WANG *et al.*, 2018). BiNPs têm sido estudadas pois podem desnaturar proteínas,

inibem enzimas e alterar a permeabilidade de membranas em sinergia com antibióticos (VAZQUEZ-MUNOZ *et al.*, 2020a; WANG *et al.*, 2018).

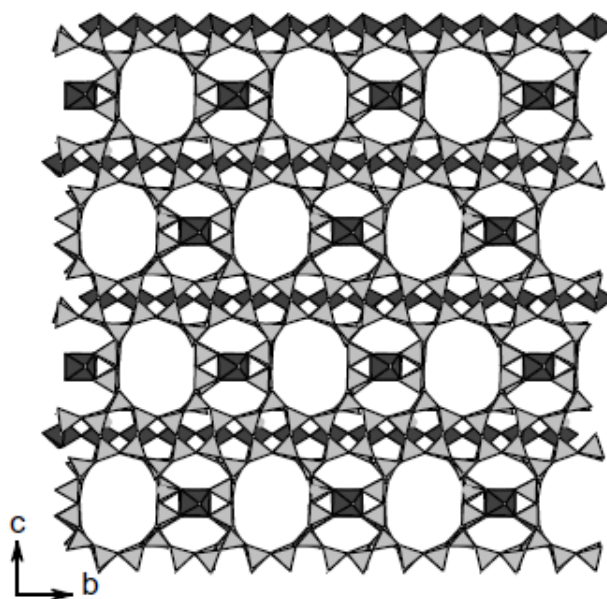
Neste sentido, o cobre também apresenta propriedades antimicrobianas, estando em ligas metálicas em superfícies de latão ou bronze (SALAH *et al.*, 2021), atuando em sinergia com fármacos como o dissulfiram (SHANHOLTZER *et al.*, 2022), ou com outros íons metálicos como ferro ou zinco (GIACHINO, WALDRON, 2020). O cobre em si é um metal essencial com potencial de causar estresse oxidativo em células patogênicas, controlando infecções (LADOMERSKY, PETRIS, 2015). Para melhor ação, os íons podem ser carregados por outros materiais inorgânicos na forma de nanopartículas com óxido de cobre, por exemplo. CuNPs, assim como BiNPs, possuem grande área superficial e pequeno volume, tornando-as altamente reativas e antimicrobianas (GARCIA-MARIN *et al.*, 2022; HAVRYLIUK *et al.*, 2024, KHAIRY *et al.*, 2024; MA *et al.*, 2022).

Outros exemplos de materiais inorgânicos são as zeólitas, silicatos de alumínio porosos conhecidas como peneiras moleculares. Possuem geometria tetraédrica de óxido de silício e óxido de alumínio, ligados entre si por oxigênio, formando uma estrutura cristalina. As zeólitas podem abrigar íons metálicos em suas cavidades ou em sua superfície por meio de troca iônica (BRECK, 1974), conferindo a elas potencial em diversas áreas de estudo. Com isso, tornaram-se materiais em destaque atualmente, pois podem ser usados como agentes antimicrobianos com a adição de íons metálicos. A capacidade de carrear grandes quantidades de íons é a característica mais relevante ao se tratar das propriedades antimicrobianas das zeólitas (AZIZI-LALABADI *et al.*, 2019; CHEN *et al.*, 2018; DAOU *et al.*, 2020; DEMIRCI *et al.*, 2014; MALIC *et al.*, 2019; YAO *et al.*, 2018). As zeólitas sem troca iônica não apresentam inibição do crescimento microbiano, enquanto as que carregam íons apresentam altos níveis de inibição (DAOU *et al.*, 2020). Em ordem decrescente de eficácia na inibição do crescimento microbiano, estão os íons de prata (DAOU *et al.*, 2020; DEMIRCI *et al.*, 2014), cobre (CHEN *et al.*, 2018; DEMIRCI *et al.*, 2014; YAO *et al.*, 2018), zinco (CHEN *et al.*, 2018; DEMIRCI *et al.*, 2014; YAO *et al.*, 2018) e ferro (CHEN *et al.*, 2018).

Outros materiais inorgânicos ainda pouco estudados quanto ao seu efeito antimicrobiano são os *Octahedral-Pentahedral-Tetrahedral frameworks* (OPT), silicatos porosos de geometria mista de octaedros, pentaedros e/ou tetraedros. Essa geometria mista se deve à geometria tetraédrica do silício na forma de SiO_4 junto à geometria octaédrica ou pentaédrica dos metais adicionados à sua estrutura, como o titânio na forma de TiO_6 – formando um silicato de titânio – ou o estanho na forma de SnO_6 – formando um silicato de estanho. A síntese de um OPT é feita a partir das reações de compostos químicos contendo esses metais, submetendo-os a

condições hidrotermais (ROCHA, LIN, 2005). A estrutura cristalina resultante de um OPT pode ser melhor visualizada por representações gráficas, exemplificada na Figura 1. Após a síntese, assim como em zeólitas, a adição de íons metálicos pode ser feita aos poros ou à superfície dos OPTs por meio de troca iônica (ROCHA, ANDERSON, 2000; ROCHA, LIN, 2005), conferindo-os propriedades antimicrobianas.

Figura 1. Representação de um silicato de titânio



Fonte: João Rocha e Zhi Lin, 2005.

Legenda: Octaedros de TiO_6 (em preto) ligados à tetraedros de SiO_4 (em cinza).

Tendo em vista as limitações dos tratamentos tradicionais com antibióticos, como a resistência intrínseca e a adquirida (HOLMES *et al.*, 2016; MANCUSO *et al.*, 2021; UDDIN *et al.*, 2021) e os efeitos colaterais indesejados (CUNHA, 2001), a busca por novas opções de controle antimicrobiano se faz necessária. Contudo, o uso de materiais inorgânicos para essa finalidade ainda está nos seus estágios iniciais de exploração, mas com o interesse crescente. Assim, devido ao ineditismo em pesquisas que utilizam OPTs como agentes antimicrobianos e a necessidade de novas abordagens para microrganismos patogênicos, o presente estudo investigou as propriedades antimicrobianas de dois OPTs – ambos silicatos de bismuto inicialmente idênticos, com um deles sendo adicionados íons de cobre – contra os microrganismos *Candida albicans*, *Candida parapsilosis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*. Com isso, este trabalho poderá ser usado como base para outros estudos sobre a ação de OPTs e materiais similares contra microrganismos patogênicos humanos.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

- Analisar, quantificar, e comparar a ação antimicrobiana de um silicato de bismuto (denominado no trabalho de OPTBi) e um silicato de bismuto com íons de cobre (denominado no trabalho de OPTCu).

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar a concentração inibitória mínima (CIM) dos OPTs contra bactérias e fungos leveduriformes;
- Avaliar a cinética de morte das bactérias e fungos após exposição aos OPTs em tempos pré-determinados;
- Comparar a susceptibilidade antimicrobiana de cepas referência ATCC e isolados clínicos aos OPTs;
- Avaliar a toxicidade dos OPTs em modelo vivo de *Galleria mellonella*.

3. MANUSCRITO: **OCTAHEDRAL-PENTAHEDRAL-TETRAHEDRAL FRAMEWORKS (OPT): ANTIMICROBIAL PROPERTIES AGAINST YEAST AND BACTERIA**

Periódico no qual o manuscrito será publicado: *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*

Arthur Lima Barbosa, Erick Paiva Cancelli, José Geraldo Nery, Marcia Regina von Zeska Kress, Margarete Teresa Gottardo de Almeida

Running Head: OPT antimicrobial properties

Abstract

The increasing rate of infections caused by multi-resistant microorganisms is a growing concern. Current treatment options are limited by intrinsic and acquired resistance, as well as side effects, therefore new options are needed. A material that has not yet been studied as an antimicrobial agent is the Octahedral-Pentahedral-Tetrahedral framework (OPT). The objectives achieved were to analyze, quantify and compare the antimicrobial action and toxicity of an OPT bismuth silicate (called “OPTBi” here) and an OPT bismuth silicate with copper ions (called “OPTCu” here) against *Candida albicans*, *Candida parapsilosis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*. The methods used were a microdilution assay; a time-kill assay, and injection of the OPT solution into *Galleria mellonella*. OPTBi was shown to be effective against yeasts, but its effectiveness against bacteria is limited. In contrast, OPTCu is effective against both. The minimum inhibitory concentration, from the microdilution assay, ranged from 2000 to 500 µg/ml with OPTBi and from 1000 to 250 µg/ml with OPTCu for yeasts; from >4000 to 2000 µg/ml with OPTBi and from >4000 to 250 µg/ml with OPTCu for bacteria. In the time-kill assay, the number of bacterial colonies were reduced by more than 50% after 2 hours of exposure, and more than 80% after 24 hours of exposure for all microorganisms in relation to control. In the live model experiment, the concentrations tested were not toxic, since no *G. mellonella* deaths were caused by the OPTs. These results open the door to new studies using these materials as therapeutic alternatives.

Key-words: Antibacterial agents, Antifungal agents, Bismuth silicate, *Galleria mellonella*, Octahedral-Pentahedral-Tetrahedral framework.

Bacterial and fungal diseases affect tens of millions of people worldwide every year, with millions of these infections leading to death, as recorded by institutions such as the World Health Organization (WHO) and various independent researchers. (1–4). It is estimated that around 13.7 million deaths were caused by bacterial infections globally in 2019, with 30.9% being caused by just five bacterial species: *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus pneumoniae* (1). Meanwhile, around 2.5 million deaths can be directly attributed to fungal infections, with the most prevalent infections being aspergillosis and candidiasis (2). The currently widespread option for treating infections caused by microorganisms is the use of antibiotic drugs (5, 6).

Despite the availability of antibiotics, their indiscriminate use can result in Darwinian selective pressure and horizontal transmission of genes that confer resistance, leading to the prevalence of strains of multidrug-resistant microorganisms. (7, 8). With the increase in cases of resistant pathogenic microorganisms (6–10), the limitations of traditional antibiotic treatments, such as intrinsic and acquired resistance (7–9) and undesirable side effects (11), new antimicrobial control options are needed. The use of inorganic materials as antimicrobial agents has gained prominence as an alternative, especially in the use of nanoparticles associated with metals such as copper (12, 13) and silver (14, 15).

Octahedral-Pentahedral-Tetrahedral frameworks (OPT) are innovative materials that have yet to be studied in the context of antimicrobial agents. They are porous silicates with a mixed geometry of octahedrons, pentahedrons and/or tetrahedrons. This mixed geometry is due to the tetrahedral geometry of the silicon in the form of SiO_4 together with the octahedral or pentahedral geometry of the metals added to its structure, such as titanium in the form of TiO_6 – forming a titanium silicate – or tin in the form of SnO_6 – forming a tin silicate (16). After synthesis, metal ions can be added to the OPT structure (16, 17), giving them antimicrobial properties.

Due to the novelty in research using OPTs as antimicrobial agents and the need for new approaches to pathogenic microorganisms, the present study investigated the antimicrobial properties of two OPTs – both bismuth silicates, one of them with copper ions, called OPTBi and OPTCu respectively – against fungi and bacteria of relevance as human pathogens. The pathogens used were *Candida albicans*, *Candida parapsilosis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, e *Staphylococcus aureus*. The objectives were to analyze, quantify and compare the antimicrobial action of OPTs; determine the minimum inhibitory concentration (MIC); kill kinetics with quantification of the number of colony-forming units (CFU); and the toxicity of the OPTs in a live model, *Galleria mellonella*.

RESULTS

Minimum inhibitory concentration (MIC). The antimicrobial activity assay using the microdilution method demonstrated that the MIC of both products against the yeasts and bacteria tested ranged from 4000 µg/ml to 250 µg/ml. In the antimicrobial effectiveness analysis, OPTCu proved to be more effective than OPTBi, requiring a lower concentration to inhibit microbial growth.

Comparing the inhibitory action of the OPTs against the yeast species, *C. parapsilosis* was more sensitive to lower concentrations of OPT compared to *C. albicans*. Regarding the difference between the ATCC strains and clinical isolates, CaATCC was less sensitive to OPTCu than CaC1 and CaC2, an effect not observed in the other microorganisms. Conversely, CpATCC was more sensitive to OPTBi than CpC1 and CpC2, as expected.

Among the bacterial species, the phenotypic susceptibility response varied, with diverse MIC values. In this regard, *K. pneumoniae* was less sensitive than *P. aeruginosa* and *S. aureus*, as its growth was not inhibited even at the maximum tested concentration of 4000 µg/ml. Additionally, clinical isolates of all bacterial species were not inhibited by the maximum tested concentration of OPTBi. Among the three bacterial species, considering both ATCC strains and clinical isolates, the Gram-positive *S. aureus* was the most sensitive. Observing all MIC values, it is evident that the values for both of the clinical isolates of each microorganism were identical to each other and, in turn, greater than or equal to those of the ATCC strain – except for *C. albicans* with OPTCu, in which the opposite is true. The results are presented in Table 1.

Species	Strain/Isolate	Designation	MIC (µg/ml)	
			OPTBi	OPTCu
<i>C. albicans</i>	ATCC strain	CaATCC	2000	1000
	Clinical isolate 1	CaC1	2000	500
	Clinical isolate 2	CaC2	2000	500
<i>C. parapsilosis</i>	ATCC strain	CpATCC	500	250
	Clinical isolate 1	CpC1	1000	250
	Clinical isolate 1	CpC2	1000	250
<i>K. pneumoniae</i>	ATCC strain	KpATCC	>4000	>4000
	Clinical isolate 1	KpC1	>4000	>4000
	Clinical isolate 2	KpC2	>4000	>4000

	ATCC strain	PaATCC	1000	250
<i>P. aeruginosa</i>	Clinical isolate 1	PaC1	>4000	4000
	Clinical isolate 2	PaC2	>4000	4000
	ATCC strain	SaATCC	2000	500
<i>S. aureus</i>	Clinical isolate 1	SaC1	>4000	500
	Clinical isolate 2	SaC2	>4000	500

Table 1. Table of minimum inhibitory concentration: MIC for each microorganism, sorted by OPT, strain and isolate. The MIC shown is the result of the geometric mean of the triplicate. The maximum tested concentration was 4000 µg/ml, therefore when no inhibition was observed it was considered as >4000 µg/ml. Source: Author, 2024.

Time-kill assay. The quantitative analysis of colony-forming unit (CFU/ml) counts, conducted in triplicate assays using a concentration of 2x the MIC, was expressed as the mean of the triplicate results for each microorganism. All tested strains and isolates, including bacteria and yeasts, exhibited a lower CFU count in solutions containing the OPTs compared to the control solution, with statistically significant differences according to the Chi-Squared statistic ($\chi^2 > 6.635$, $p < 0.01$).

After 24 hours of contact with the OPTs, the yeasts exhibited a reduction in CFU/ml compared to the control. The reduction percentages ranged from 99.71% to 100.00% with OPTBi and from 84.32% to 100.00% with OPTCu. Overall, ATCC strains and clinical isolates showed similar sensitivity to both OPTs. However, CpATCC demonstrated lower sensitivity to OPTCu, being the only strain with a CFU count higher than its initial inoculum count after 24 hours. Figures 2 and 3 illustrate the time-kill curves, considering the inoculum at time 0.

In contrast, the bacteria tested exhibited a reduction in CFU/ml dependent on the sampling time. Considering the minimum and maximum reduction percentages and the designations of the microorganisms, after 2 hours, the reduction percentage ranged from 52.63% for PaC2 to 82.12% for KpC1 with OPTBi, and from 59.48% for PaATCC to 99.71% for KpC1 with OPTCu. After 6 hours, the reduction percentage ranged from 87.07% for PaC1 to 97.00% for KpC1 with OPTBi, and from 80.23% for PaATCC to 99.97% for KpC1 with OPTCu. At the final time point of 24 hours, the reduction percentage ranged from 90.17% for PaATCC to 99.77% for PaC2 and SaC2 with OPTBi, and from 80.40% for PaATCC to 100.00% for KpATCC, KpC1 and SaC2 with OPTCu. It is evident that *P. aeruginosa*, especially PaATCC, showed lower sensitivity to the OPTs, whereas *K. pneumoniae*

demonstrated higher sensitivity. Overall, considering all three times and both products, OPTCu was more effective against bacteria than OPTBi. Interestingly, it was observed that the CFU/mL count of PaATCC and SaATCC increased after 6 to 24 hours with OPTBi, with an analogous increase observed for SaATCC and SaC1 with OPTCu during the same time period.

The graphs, illustrating CFU counts in the time-kill assay of bacteria, are presented in Figures 4, 5, and 6, considering the inoculum at time 0. The control groups are represented by red lines, and the experimental groups are represented by blue lines, both separated by strain and clinical isolate. The scale used was powers of 10.

Overall, considering all microorganisms, the ATCC strains were less sensitive to the OPTs compared to the clinical isolates. It is evident that the CFU count for the ATCC strains tended to be higher than that of the clinical isolates.

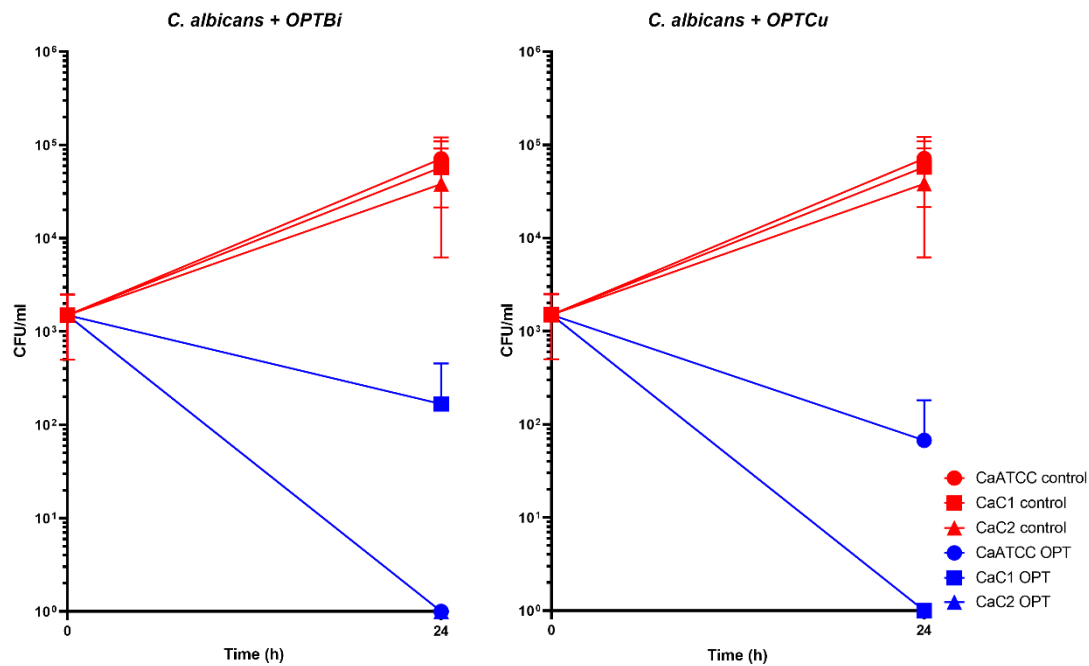


Figure 2. Time-kill assay of *C. albicans*.

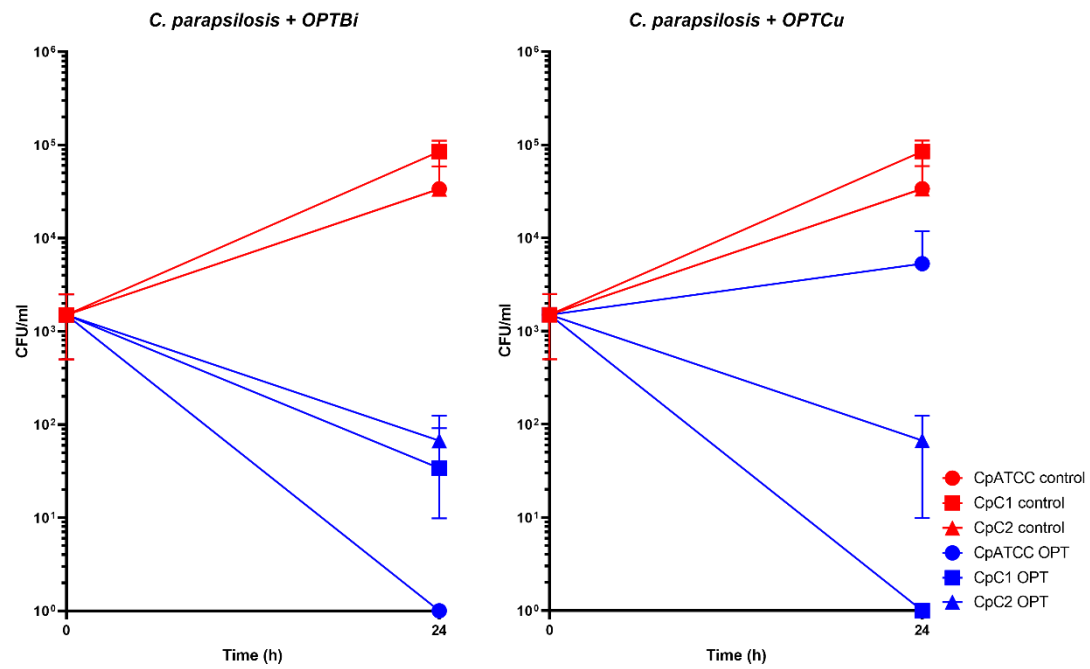


Figure 3. Time-kill assay of *C. parapsilosis*.

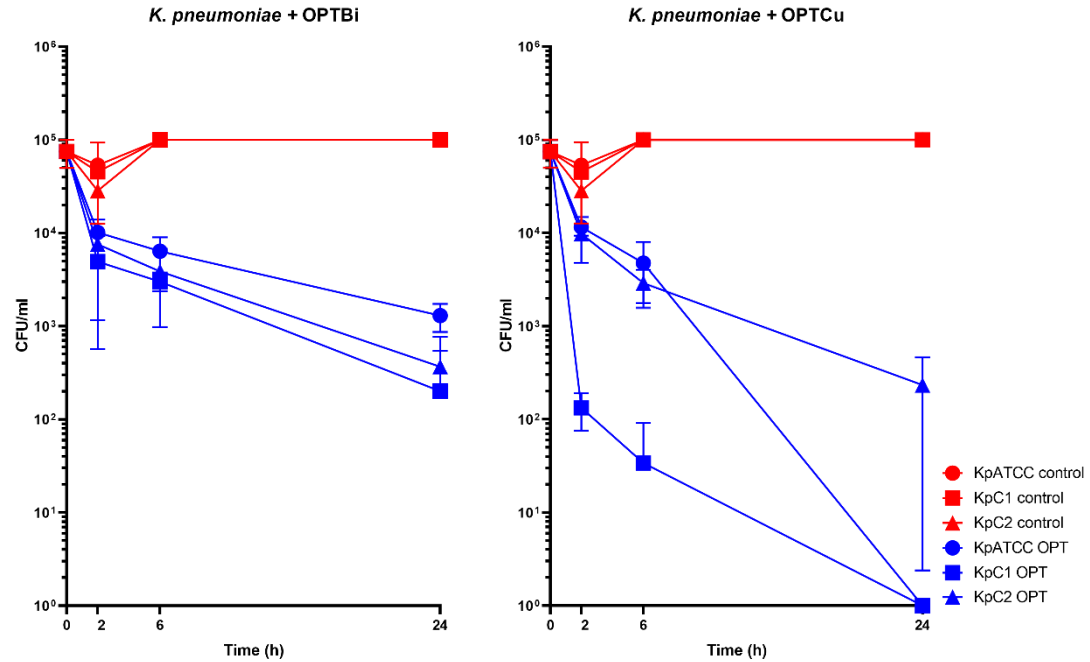


Figure 4. Time-kill assay of *K. pneumoniae*.

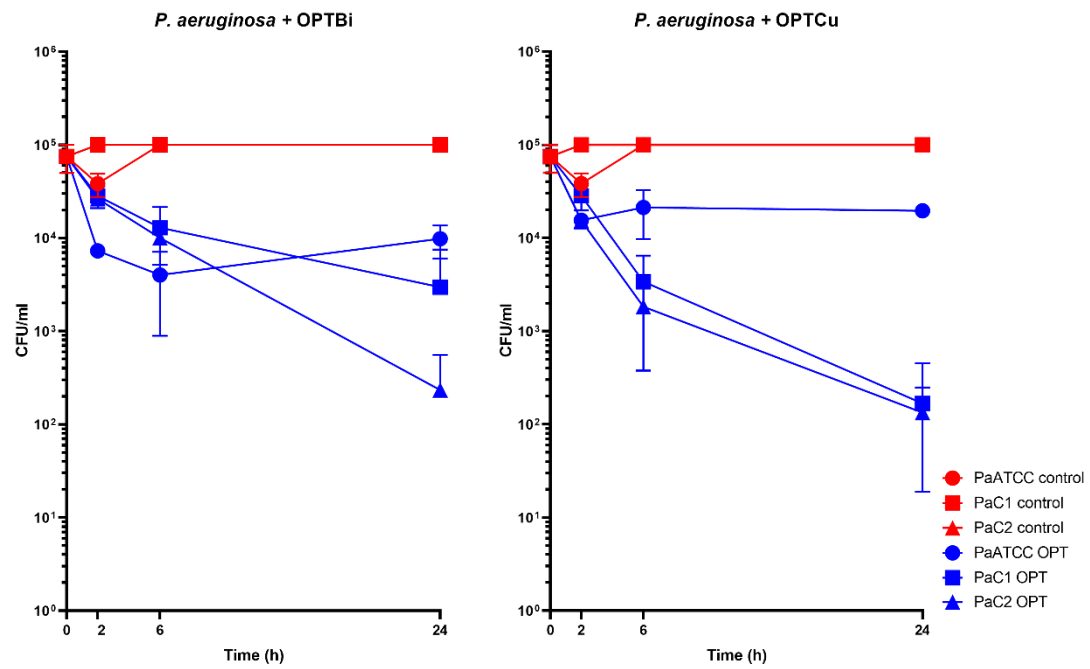


Figure 5. Time-kill assay of *P. aeruginosa*.

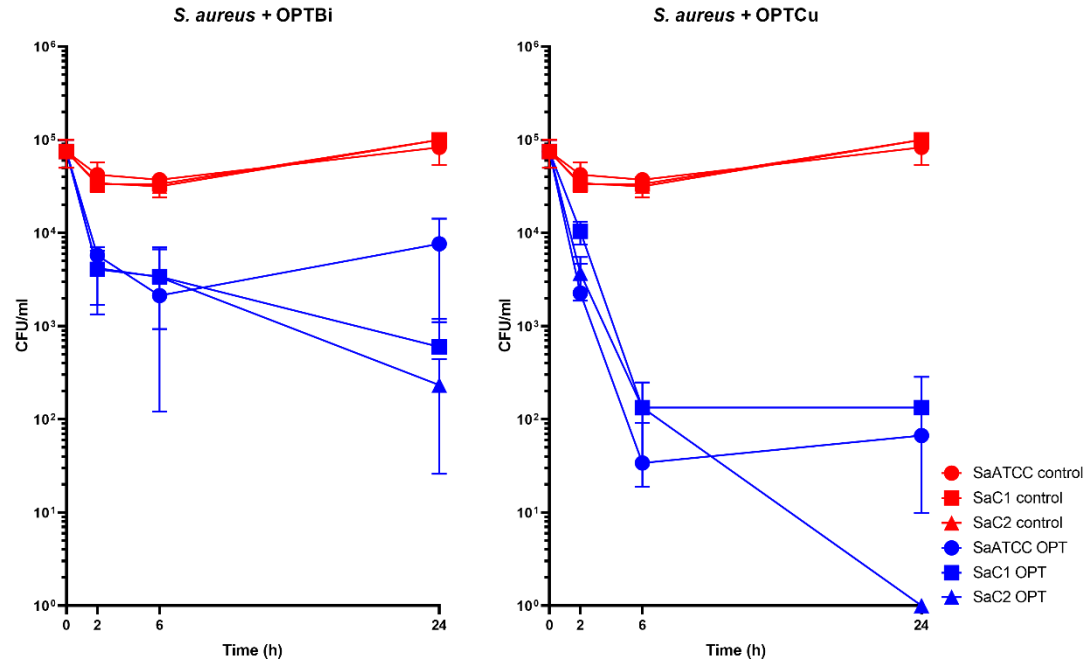


Figure 6. Time-kill assay of *S. aureus*.

The CFU count of the time-kill assay of both yeast and bacteria can be found at the appendix, as tables 2 and 3. The former uses the mean of the CFU counts in the triplicate, as well as the standard deviation; while the latter sums the counts of the triplicate. The figures 8, 9, 10, 11 and 12 are the graphical representations of table 3.

Toxicity in *G. mellonella*. No larval mortality was observed in the experimental groups, only the group injected with 99.9% ethanol exhibited mortality (100% mortality on the first day), as expected based on the experimental model by Ignasiak e Maxwell (18). The results are shown in Figure 7.

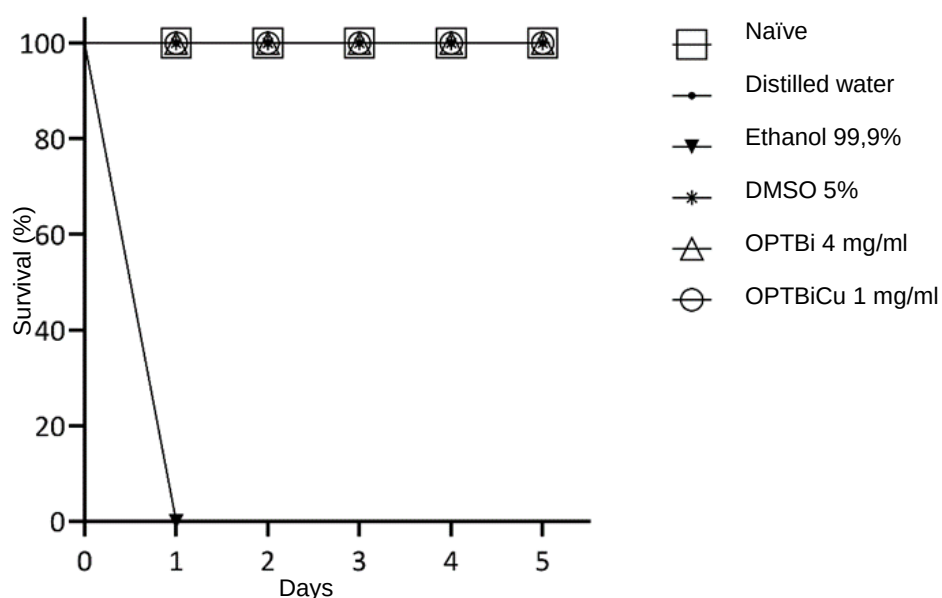


Figure 7. *In vivo* experiment with *Galleria mellonella* larvae. Source: Ribeirão Preto School of Pharmaceutical Sciences, 2023.

DISCUSSION

The application of inorganic materials as antimicrobial agents is still in its infancy, and they hold great potential as alternatives in the treatment of multidrug-resistant microorganisms. (12–15, 19–21). An efficient way to enhance the antimicrobial properties of a material is to synthesize it using materials with inherent antimicrobial qualities or by adding metal ions to its composition (22–27). The two OPTs used in this study aimed to explore the antimicrobial potential of the ions: initially identical, they are synthesized with bismuth, with copper ions being added to one of them later. According to the literature, both bismuth – an integral part of the material's structure – and copper – the later addition – possess antimicrobial properties (12, 13, 20, 21), a fact proven in this study.

The microdilution assay conducted quantified the susceptibility of the various strains used in the study. The yeasts tested were inhibited by both OPTBi and OPTCu, with a lower MIC observed for the latter. Supporting the obtained results, studies have shown that bismuth nanoparticles can be used as antimicrobial agents against *C. albicans* (28–30), as well as copper nanoparticles (21, 31). In contrast, few bacteria were inhibited by OPTBi. The Gram-negative *K. pneumoniae* was not inhibited by neither of the OPTs, while the Gram-negative *P. aeruginosa* was only inhibited by the maximum tested concentration of OPTCu. According to scientific literature, Gram-negative bacteria tend to be more resistant to copper ions (32, 33), mainly due to the presence of Cu⁺-ATPase, a copper ion transport pump (33), a mechanism not investigated by this study. The Gram-positive bacterium *S. aureus* was sensitive to OPTCu, as predicted by the literature: excess copper ions lead to alterations in its cell envelope and in carbon metabolism (34), and inhibit the function of certain enzymes (35). The susceptibility of *S. aureus* to copper was, therefore, expected and confirmed in both the microdilution assay and the time-kill assay.

In general, the behavior of the bacteria in the time-kill assay was similar to that observed in the microdilution assay and MIC determination. However, the PaATCC exhibited an unexpected response, as its growth was inhibited by both OPTs in the microdilution assay, while it showed a higher colony count than the clinical strains in the time-kill assay and CFU count. Furthermore, the CFU count increased between the 6- and 24-hour time samples. However, it is important to consider that the time-kill assay was performed with concentrations 2x the MIC. If the MICs between the clinical strains and the ATCC strain were originally different, the subsequent assays were performed with different doses of the OPTs. The concentration of OPTCu in the solution intended for the ATCC strain was much lower than the concentration

used for the clinical strains, thus it is not possible to definitively attribute the increased colony count to a resistance mechanism or the lower concentration of the product.

Another unexpected behavior observed during the CFU count was the higher CFU count of CpATCC when exposed to OPTCu, a behavior not seen in the clinical isolates and not demonstrated in the microdilution assay and MIC determination. Since all strains of this species were subjected to the same concentration of OPTCu, they can be compared in this way; however, the reason for this discrepancy could not be identified. The literature on *C. parapsilosis* regarding copper-based nanomaterials is scarce, with most studies focusing on the response of *Candida albicans* and *Candida auris* (36, 37). Therefore, a more in-depth investigation with a larger sample size is necessary.

Finally, for the time-kill experiments, it is possible to observe that the CFU count of two strains increased between the 6- and 24-hour time samples: PaATCC and SaATCC. The reason for this increase was not investigated but could be due to the lower concentration of OPTs compared to the clinical isolates, a bacteriostatic effect of the OPTs instead of a bactericidal effect, or the prevalence of a mutant resistant to the OPTs. For all results, both for microdilution and time-kill assays, biological events may modify specific targets of antimicrobial action, considering the diversity of environments the ATCC reference strains and clinical isolates originated from.

The toxicity assay in the *G. mellonella* *in vivo* model demonstrated that no mortality occurred in larvae injected with solutions of 4000 µg/ml of OPTBi or 1000 µg/ml of OPTCu. Thus, it can be stated that these tested concentrations were not toxic to *G. mellonella* larvae. The review by Junqueira *et al.* shows that *G. mellonella* larvae have been regularly used as an *in vivo* model for toxicity experiments in recent years, particularly in pioneering studies (38). These larvae have an immune system similar to that of mammals, making them suitable for initial testing of compounds intended for use in humans (18).

The results of this study confirm the antimicrobial activity of the tested OPTs against both clinical and ATCC microorganisms. However, the mechanism of action of these compounds on microorganisms is still not well understood, as in, do they act by interfering with metabolism, destroying cellular components, or through another pathway? Therefore, further experiments on the physicochemical interactions of these materials with microorganisms and possible synergies with commercial drugs are still needed.

MATERIALS AND METHODS

The microorganisms. Five ATCC reference microorganism species were used: *Candida albicans* ATCC 90028, *Candida parapsilosis* ATCC 22019, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 1025, and *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. In addition to the ATCC strains, two clinical isolates of each species were also used, originating from skin and appendages – yeasts – and from internal infections – bacteria. All strains and clinical isolates received a designation, matching its species and origin, such as CaATCC (*Candida albicans*, ATCC strain) or KpC1 (*Klebsiella pneumoniae*, clinical isolate number 1). All of the strains and clinical isolates belong to the collection of the Microbiology Laboratory of the São José do Rio Preto Medical School - FAMERP, São Paulo, Brazil. They have all been registered with the National System for the Management of Genetic Heritage and Associated Traditional Knowledge (SisGen), under protocol A2D9FC4.

The inoculum. The inoculum was adjusted to a final concentration at the start of each experiment of 5×10^2 to 2.5×10^3 CFU/ml for yeasts and 5×10^4 to 1×10^5 CFU/ml for bacteria, following the procedures established by the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) M27-A3 (39) and M07-A9 (40).

The OPTs. Two OPTs were used, designated OPTBi and OPTCu in this study. They were obtained as and remained as solid powder until the time of the experiments. In the tests, 16.0 mg of each was added to 0.2 ml of DMSO and 0.8 ml of RPMI 1640 medium for each milliliter of solution to be used. The concentration of OPTs was adjusted according to the needs of the experiments by adding RPMI.

Microdilution assay and MIC determination. MICs were determined in triplicate following procedures CLSI M27-A3 (39) e M07-A9 (40), adapted for the concentrations tested, and ran in triplicate. The maximum concentration of each OPT tested was 4000 µg/ml and the minimum concentration was 15.6 µg/ml. After 24 hours of incubation at 35°C, 20 µl of 2,3,5-Triphenyltetrazolium Chloride (TTC) solution at a concentration of 20 µg/ml diluted in RPMI was added to each well to visually determine the results. Then, a geometric mean calculation was applied to determine the MIC.

Time-kill assay and CFU count. The time-kill assay followed the protocol described by Klepser *et al.* (41), adapted for the predetermined times chosen, and ran in triplicate. The concentration of the solutions tested was 2x the MIC obtained in the microdilution test for each microorganism. A sample of 10 µl was taken after 24 hours of incubation for yeasts, and after 2, 6, and 24 hours of incubation for bacteria, with the samples being inoculated with a Drigalski loop onto culture medium plates. The single period of 24 hours for yeasts was chosen due to

the longer time required for their growth. The culture medium plates inoculated were incubated at 35°C for 24 hours. The CFU count was carried out after this period, using the program ImageJ 1.54g (42). The growth inhibition rate and the significance of the test using the Chi-squared (χ^2) statistic were calculated by comparing the average count of the triplicate with the average count of the control group. For the purposes of these statistical operations and due to the limitations of the counting method, the control groups of each strain and clinical isolate had a limit of 10^5 CFU/ml. Graphs with CFU counts were generated using the GraphPad Prism 9.3.0 for Windows (San Diego, California, USA).

Toxicity in *Galleria mellonella*. The toxicity experiment followed the protocol described by Ignasiak and Maxwell (18), adapted for the substances tested. *Galleria mellonella* larvae at the sixth stage of development were used, each weighing between 200 and 250 mg, separated into six groups of five individuals. Groups 1, 2 and 3 were called “control”, with group 1 not being subjected to any substance (naïve group) and the other two being injected with 5 µl of distilled water and 5 µl of 99.9% ethanol, respectively. Groups 4, 5 and 6 were called “experimental” and were injected with 5 µl of 5% DMSO, 5 µl of OPTBi solution at a concentration of 4000 µg/ml and 5 µl of OPTCu solution at a concentration of 1000 µg/ml, respectively. The larvae from each group were placed in 60 mm diameter Petri dishes and kept at 37°C deprived of food and observed every 24 hours for five days, with prepupae being removed daily to delay metamorphosis. Survival was analyzed using the Kaplan-Meier estimate, with significance determined by the Mantel-Cox test. The data was analyzed using GraphPad Prism 9.3.0 for Windows (San Diego, California, USA).

ACKNOWLEDGEMENTS

We would like to thank Dr. Moacir Fernandes Godoy for his support with the statistical analysis, the FAMERP Microbiology Laboratory and all of its members for the infrastructure and help with the experimental procedures, and the Coordination for the improvement of Higher Education Personnel – Brail (CAPES) for its financial support.

REFERENCES

1. Ikuta KS, 2022. Global mortality associated with 33 bacterial pathogens in 2019: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. *The Lancet* 400:2221–2248.
2. Denning DW. 2024. Global incidence and mortality of severe fungal disease. *Lancet Infect Dis* 24:e428–e438.
3. WHO. 2024. WHO Bacterial Priority Pathogens List 2024: Bacterial Pathogens of Public Health Importance, to Guide Research, Development, and Strategies to Prevent and Control Antimicrobial Resistance 1st ed. World Health Organization, Geneva.
4. WHO. 2022. WHO Fungal Priority Pathogens List to Guide Research, Development and Public Health Action 1st ed. World Health Organization, Geneva.
5. Lee Y, Puumala E, Robbins N, Cowen LE. 2021. Antifungal Drug Resistance: Molecular Mechanisms in *Candida albicans* and Beyond. *Chem Rev* 121:3390–3411.
6. Baran A, Kwiatkowska A, Potocki L. 2023. Antibiotics and Bacterial Resistance—A Short Story of an Endless Arms Race. *Int J Mol Sci* 24:5777.
7. Holmes AH, Moore LSP, Sundsfjord A, Steinbakk M, Regmi S, Karkey A, Guerin PJ, Piddock LJV. 2016. Understanding the mechanisms and drivers of antimicrobial resistance. *The Lancet* 387:176–187.
8. Mancuso G, Midiri A, Gerace E, Biondo C. 2021. Bacterial Antibiotic Resistance: The Most Critical Pathogens. *Pathogens* 10:1310.
9. Uddin TM, Chakraborty AJ, Khusro A, Zidan BRM, Mitra S, Emran TB, Dhama K, Ripon MdKH, Gajdács M, Sahibzada MUK, Hossain MdJ, Koirala N. 2021. Antibiotic resistance in microbes: History, mechanisms, therapeutic strategies and future prospects. *J Infect Public Health* 14:1750–1766.
10. Tang KWK, Millar BC, Moore JE. 2023. Antimicrobial Resistance (AMR). *Br J Biomed Sci* 80:11387.
11. Cunha BA. 2001. ANTIBIOTIC SIDE EFFECTS. *Med Clin North Am* 85:149–185.
12. Havryliuk O, Rathee G, Blair J, Hovorukha V, Tashyrev O, Morató J, Pérez LM, Tzanov T. 2024. Unveiling the Potential of CuO and Cu₂O Nanoparticles against Novel Copper-Resistant *Pseudomonas* Strains: An In-Depth Comparison. *Nanomaterials* 14:1644.
13. Khairy T, Amin DH, Salama HM, Elkholy IMA, Elnakib M, Gebreel HM, Sayed HAE. 2024. Antibacterial activity of green synthesized copper oxide nanoparticles against multidrug-resistant bacteria. *Sci Rep* 14:25020.
14. De Lacerda Coriolano D, De Souza JB, Bueno EV, Medeiros SMDFR, Cavalcanti IDL, Cavalcanti IMF. 2021. Antibacterial and antibiofilm potential of silver nanoparticles against antibiotic-sensitive and multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* strains. *Braz J Microbiol* 52:267–278.

15. Gottardo B, Lemes TH, Byzyski G, Paziani MH, von-Zeska-Kress MR, De Almeida MTG, Volanti DP. 2019. One-Pot Synthesis and Antifungal Activity of Nontoxic Silver-Loaded Hydroxyapatite Nanocomposites against *Candida* Species. *ACS Appl Nano Mater* 2:2112–2120.
16. Rocha J, Lin Z. 2005. Microporous Mixed Octahedral-Pentahedral-Tetrahedral Framework Silicates. *Rev Mineral Geochem* 57:173–201.
17. Rocha J, Anderson MW. 2000. Microporous Titanosilicates and other Novel Mixed Octahedral-Tetrahedral Framework Oxides. *Eur J Inorg Chem* 2000:801–818.
18. Ignasiak K, Maxwell A. 2017. *Galleria mellonella* (greater wax moth) larvae as a model for antibiotic susceptibility testing and acute toxicity trials. *BMC Res Notes* 10:428.
19. Wang R, Lai T-P, Gao P, Zhang H, Ho P-L, Woo PC-Y, Ma G, Kao RY-T, Li H, Sun H. 2018. Bismuth antimicrobial drugs serve as broad-spectrum metallo- β -lactamase inhibitors. *Nat Commun* 9:439.
20. Ma X, Zhou S, Xu X, Du Q. 2022. Copper-containing nanoparticles: Mechanism of antimicrobial effect and application in dentistry-a narrative review. *Front Surg* 9:905892.
21. Rani R. ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF COPPER OXIDE NANOPARTICLES AGAINST GRAM-NEGATIVE BACTERIAL STRAIN SYNTHESIZED BY REVERSE MICELLE TECHNIQUE.
22. Garcia-Marin LE, Juarez-Moreno K, Vilchis-Nestor AR, Castro-Longoria E. 2022. Highly Antifungal Activity of Biosynthesized Copper Oxide Nanoparticles against *Candida albicans*. *Nanomaterials* 12:3856.
23. Azizi-Lalabadi M, Alizadeh-Sani M, Khezerlou A, Mirzanajafi-Zanjani M, Zolfaghari H, Bagheri V, Divband B, Ehsani A. 2019. Nanoparticles and Zeolites: Antibacterial Effects and their Mechanism against Pathogens. *Curr Pharm Biotechnol* 20:1074–1086.
24. Chen S, Popovich J, Zhang W, Ganser C, Haydel SE, Seo D-K. 2018. Superior ion release properties and antibacterial efficacy of nanostructured zeolites ion-exchanged with zinc, copper, and iron. *RSC Adv* 8:37949–37957.
25. Daou TJ, Dos Santos T, Nouali H, Josien L, Michelin L, Pieuchot L, Dutournie P. 2020. Synthesis of FAU-Type Zeolite Membranes with Antimicrobial Activity. *Molecules* 25:3414.
26. Demirci S, Ustaoglu Z, Yilmazer GA, Sahin F, Baç N. 2014. Antimicrobial Properties of Zeolite-X and Zeolite-A Ion-Exchanged with Silver, Copper, and Zinc Against a Broad Range of Microorganisms. *Appl Biochem Biotechnol* 172:1652–1662.
27. Malic S, Rai S, Redfern J, Pritchett J, Liauw CM, Verran J, Tosheva L. 2019. Zeolite-embedded silver extends antimicrobial activity of dental acrylics. *Colloids Surf B Biointerfaces* 173:52–57.
28. Yao G, Lei J, Zhang W, Yu C, Sun Z, Zheng S, Komarneni S. 2019. Antimicrobial activity of X zeolite exchanged with Cu^{2+} and Zn^{2+} on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Environ Sci Pollut Res* 26:2782–2793.

29. Hernandez-Delgadillo R, Velasco-Arias D, Martinez-Sanmiguel JJ, Diaz D, Zumeta-Dube I, Arevalo-Niño K, Cabral-Romero C. 2013. Bismuth oxide aqueous colloidal nanoparticles inhibit *Candida albicans* growth and biofilm formation. *Int J Nanomedicine* 8:1645–1652.
30. Vazquez-Munoz R, Lopez FD, Lopez-Ribot JL. 2020. Bismuth Nanoantibiotics Display Anticandidal Activity and Disrupt the Biofilm and Cell Morphology of the Emergent Pathogenic Yeast *Candida auris*. *Antibiot Basel Switz* 9:461.
31. Vazquez-Munoz R, Arellano-Jimenez MJ, Lopez-Ribot JL. 2020. Bismuth nanoparticles obtained by a facile synthesis method exhibit antimicrobial activity against *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans*. *BMC Biomed Eng* 2:11.
32. Al-Enazi NM, Alsamhary K, Ameen F. 2023. Evaluation of citrus pectin capped copper sulfide nanoparticles against Candidiasis causing *Candida* biofilms. *Environ Res* 225:115599.
33. Bondarczuk K, Piotrowska-Seget Z. 2013. Molecular basis of active copper resistance mechanisms in Gram-negative bacteria. *Cell Biol Toxicol* 29:397–405.
34. González-Guerrero M, Raimunda D, Cheng X, Argüello JM. 2010. Distinct functional roles of homologous Cu⁺ efflux ATPases in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol* 78:1246–1258.
35. Tarrant E, P Riboldi G, McIlvin MR, Stevenson J, Barwinska-Sendra A, Stewart LJ, Saito MA, Waldron KJ. 2019. Copper stress in *Staphylococcus aureus* leads to adaptive changes in central carbon metabolism. *Met Integr Biometal Sci* 11:183–200.
36. Norambuena J, Al-Tameemi H, Bovermann H, Kim J, Beavers WN, Skaar EP, Parker D, Boyd JM. 2023. Copper ions inhibit pentose phosphate pathway function in *Staphylococcus aureus*. *PLoS Pathog* 19:e1011393.
37. Shanholtzer CN, Rice C, Watson K, Carreon H, Long TE. 2022. Effect of copper on the antifungal activity of disulfiram (Antabuse®) in fluconazole-resistant *Candida* strains. *Med Mycol* 60:myac016.
38. Muñoz-Escobar A, Reyes-López SY. 2020. Antifungal susceptibility of *Candida* species to copper oxide nanoparticles on polycaprolactone fibers (PCL-CuONPs). *PLOS ONE* 15:e0228864.
39. Junqueira JC, Mylonakis E, Borghi E. 2021. *Galleria mellonella* experimental model: advances and future directions. *Pathog Dis* 79:ftab021.
40. CLSI. 2008. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts 28:40.
41. CLSI. 2012. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically 32:88.
42. Klepser ME, Ernst EJ, Lewis RE, Ernst ME, Pfaller MA. 1998. Influence of Test Conditions on Antifungal Time-Kill Curve Results: Proposal for Standardized Methods. *Antimicrob Agents Chemother* 42:1207–1212.

43. Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW. 2012. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods* 9:671–675.

4. CONCLUSÃO

Ambos os OPTs são promissores como agentes antimicrobianos, visto que ambos apresentam ação contra as leveduras e bactérias escolhidas, tanto para o ensaio de microdiluição quanto para o ensaio de cinética de morte. Iniciando pela microdiluição, o OPTCu inibe o crescimento microbiano numa concentração menor do que o OPTBi – exceto contra *K. pneumoniae*, que não é inibida por nenhum dos OPTs na concentração máxima testada. Outros ensaios metodológicos em concentrações maiores podem exibir comportamento fenotípico diferente, com atividade antimicrobiana factível para controle desta espécie. Além disso, as cepas ATCC necessitam de uma concentração de OPTs igual ou menor do que as clínicas para terem seu crescimento inibido – exceto contra *C. albicans*, para qual o oposto é verdadeiro. Eventos biológicos podem modificar alvos específicos de ação antimicrobiana, considerando-se a diversidade de ambientes que os isolados clínicos têm como origem.

Os dados obtidos nos ensaios de microdiluição e de cinética de morte demonstram a diferença de concentração de OPTs utilizada. Generalizando os resultados e considerando o Qui-Quadrado ($\chi^2 > 6,635$, $p < 0.01$) aplicado sobre a contagem de UFC, é possível afirmar que há menor crescimento de UFC quando são submetidas ao OPTCu do que quando são submetidas ao OPTBi. Ainda assim, ambos os produtos demonstraram grande redução do crescimento de colônias, com a porcentagem de redução de colônias superior a 80% após 24 horas para todos os microrganismos, com redução de 100% sendo comum.

Por fim, tendo em vista o resultado do ensaio de toxicidade em modelo vivo de *G. mellonella*, é possível afirmar que há 0% de mortes de larvas injetadas com OPTBi ou OPTCu nas concentrações testadas, portanto as concentrações injetadas não são tóxicas às lavras. Este comportamento permite inferir que os OPTs poderão fazer parte de alternativas terapêuticas futuras.

Ainda assim, o futuro dos OPTs como agentes antimicrobianos comerciais é possível, porém há a necessidade de mais experimentos analisando outros aspectos de sua ação, especialmente sua interação físico-química com as células patogênicas alvo e com as células animais do hospedeiro.

5. PERSPECTIVAS FUTURAS

Este trabalho realizou experimentos seguindo protocolos e foi limitado pelo material disponível e, principalmente, pelo tempo. Com maior disponibilidade de material e mais tempo, os experimentos realizados poderiam ser mais aprofundados, por exemplo:

- Mais espécies microbianas poderiam ter sido escolhidas, como os fungos filamentosos do gênero *Tricophyton* e *Trichosporum* ou as bactérias *Streptococcus pneumoniae* e *Escherichia coli*.
- No ensaio de cinética de morte, mais concentrações poderiam ter sido testadas além das pedidas por protocolo. Por exemplo, CaATCC foi testada com solução de 4000 µg/ml de OPTCu, visto que sua CIM foi de 1000 µg/ml, porém as concentrações 500, 1000, 2000 e 4000 µg/ml poderiam ter sido testadas em conjunto para oferecer melhores parâmetros de comparação.

Por estes motivos, e com o objetivo de aprofundar os estudos e gerar mais dados a respeito do novo OPT e suas propriedades, este trabalho terá continuação no programa de doutorado. Como perspectivas para o futuro, é esperado realizar:

5.1. COMPARAÇÃO ENTRE OPT E ANTIBIÓTICOS

Apenas a ação antimicrobiana dos OPTs foi analisada neste trabalho, portanto uma comparação com antibióticos comerciais será de interesse. O método a ser utilizado será o de microdiluição, baseando-se nos protocolos do CLSI utilizados nos experimentos deste trabalho. Os objetivos de tais testes serão de detectar sinergias, efeitos antagônicos ou aditivos dos OPTs em conjunto com fármacos comerciais; comparar as concentrações inibitórias mínimas dos OPTs e dos fármacos; e traçar um perfil de resistência e susceptibilidade das cepas e isolados clínicos utilizados.

5.2. EFEITO DO OPT EM NÍVEL CELULAR E MOLECULAR

Uma série de experimentos serão realizados para analisar os efeitos dos OPTs em nível celular e molecular. Em primeiro lugar, a análise em nível celular será feita por meio de criomicroscopia eletrônica, uma técnica que permite a análise de células, seus componentes e proteínas numa maneira mais precisa do que a microscopia eletrônica de transmissão. Criomicroscopia eletrônica funciona pela transmissão de um feixe de elétrons através de uma amostra congelada por criogenia, permitindo o imageamento de estruturas e proteínas numa resolução quase atômica (LYUMKIS, 2019). Com essa técnica, será possível analisar o efeito dos OPTs sobre organelas, material genético, e a estrutura de membrana ou parede das células

(rompendo-a, distorcendo-a, ou mudando sua permeabilidade, por exemplo). Assim, os OPTs poderão ser modificados para serem mais eficientes nos seus alvos de ação, ou a metodologia de sua utilização poderá ser alterada para tirar melhor proveito de suas qualidades físico-químicas.

Em segundo lugar, a análise em nível molecular focará no metabolismo das células, procurando quantificar a absorção de certos compostos e correlacionar ao local de ação dos OPTs. Por exemplo, a quantificação da absorção de ergosterol e sorbitol por leveduras permite inferir o local de ação dos OPTs – a membrana celular ou a parede celular, respectivamente – como descrito no protocolo de Castro e colaboradores (CASTRO *et al.*, 2015). Em conjunto com a crio-microscopia eletrônica, que mostrará se os compostos absorvidos foram ou não metabolizados, essas duas técnicas permitirão descrever não só o efeito morfológico da ação dos OPTs, mas também as alterações metabólicas decorrentes de tal ação.

5.3. EFEITO DOS OPTS NA ADERÊNCIA, FORMAÇÃO E DESTRUIÇÃO DE BIOFILMES

Neste trabalho, apenas células planctônicas foram utilizadas, contudo tais células podem formar estruturas mais complexas ao se aderirem a superfícies. Biofilmes são estruturas formadas por microrganismos envoltos por uma matriz polimérica, atuando como uma barreira entre o micro-habitat interno e o externo. Dessa maneira, a atuação de agentes antimicrobianos fica dificultada (DAVIES, 2003; SHARMA *et al.* 2019; VENKATESAN *et al.* 2015). Tendo em vista o isolamento que os biofilmes propiciam, o efeito dos OPTs sobre essas estruturas será investigado, focando no seu efeito sobre a aderência de células na superfície, seu efeito em biofilmes em formação, e seu efeito em biofilmes maduros. Para tal, será utilizado o equipamento *parallel-plate fluid flow chamber*, que simula a ação de fluido contendo células planctônicas aderindo-se à uma superfície monitorada em tempo real, quantificando a aderência quando submetidas aos OPTs comparada ao controle.

REFERÊNCIAS

- AZIZI-LALABADI, M.; ALIZADEH-SANI, M.; KHEZERLOU, A.; MIRZANAJAFI-ZANJINI, M.; ZOLFAGHARI, H.; BAGHERI, V.; DIVBAND B.; EHSANI, A. Nanoparticles and Zeolites: Antibacterial Effects and their Mechanism against pathogens. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, v. 20, p. 1074 – 1086, 2019.
- BARAN, A.; KWIATKOWSKA, A.; POTOCKI, L. Antibiotics and Bacterial Resistance – A Short Story of an Endless Arms Race. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 6, p. 5777, 2023.
- BRECK, D. W. Recent Advances in Zeolite Science. **Advances in Chemistry**, v. 101, p. 1 – 19, 1974.
- CASTRO, R. D.; SOUZA, T. M. P. A.; BEZERRA, L. M. D.; FERREIRA, G. L. S.; COSTA, E. M. M. B.; CAVALCANTI, A. L. Antifungal activity and mode of action of thymol and its synergism with nystatin against *Candida* species involved with infections in the oral cavity: an *in vitro* study. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 15, n. 1, p. 417, 2015.
- CHEN, S.; POPOVICH, J.; ZHANG, W.; GANSER, C.; HAYDEL, S. E.; SEO, D. K. Superior ions release properties and antibacterial efficacy of nanostructured zeolites ion-exchanged with zinc, copper, and iron. **RCS Advances**, v. 8, n. 66, p. 37949 – 37957, 2018.
- CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard – Ninth Edition**. 9. ed. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2012, 88 p.
- CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; Approved Standard – Third Edition**. 3. ed. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2008, 40 p.
- CORIOLOANO, D. L.; SOUZA, J. B.; BUENO, E. V.; MEDEIROS, S. M. F. R. S.; CAVALCANTI, I. D. L.; CAVALCANTI, I. M. F. Antibacterial and antibiofilm potential of silver nanoparticles against antibiotic-sensitive and multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* strains. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 52, p. 267 – 278, 2021.
- CUNHA, B. A. Antibiotic Side Effects. **Antibiotic Therapy**, v. 85, n. 1, p. 149 – 185, 2001.
- DANESHNIA, F.; ALMEIDA JÚNIOR, J. N.; ILKIT, M.; LOMBARDI, L.; PERRY, A. M. GAO, M.; NOBILE, C. J.; EGGER, M.; PERLIN, D. S.; ZHAI, B.; HOHL, T. M.; GABALDÓN, T.; COLOMBO, A. L.; HOENIGL, M.; ARASTEHFAR, A. Worldwide emergence of fluconazole-resistant *Candida parapsilosis*: current framework and future research roadmap. **LANCET Microbe**, v. 4, n. 6, p. e470 – e480, 2023.
- DAOU, T. J.; SANTOS, T.; NOUALI, H.; JOSIEN, L.; MICHELIN, L.; PIEUCHOT, L.; DOUTOURNIE, P. Synthesis of FAU-Type Zeolite Membranes with Antimicrobial Activity. **Molecules**, v. 25, p. 3414, 2020.

- DAVIES, D. Understanding biofilm resistance to antibacterial agents. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 2, p. 114 – 122, 2003.
- DEMIRCI, S.; USTAOĞLU, Z.; YILMAZER, G. A.; SAHIN, F.; BAÇ, N. Antimicrobial Properties of Zeolite-X and Zeolite-A Ion-Exchanged with Silver, Copper, and Zinc Against a Broad Range of Microorganisms. **Applied Biochemical Biotechnology**, v. 172, p. 1652 – 1662, 2014.
- DENISSEN, J.; REYNEKE, B.; WASO-REYNEKE, M.; HAVENGA, B.; BARNARD, T.; KHAN, S.; KHAN, W. Prevalence of ESKAPE pathogens in the environment: Antibiotic resistance status, community-acquired infection and risk to human health. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, v. 244, p. 114006, 2022.
- DENNING, D. W. Global incidence and mortality of severe fungal disease. **LACET Infectious Diseases**, v. 24, n. 7, p. e428 – e438, 2024.
- GARCIA-MARIN, L. E.; JUAREZ-MORENO, K.; VILCHIS-NESTOR, A. R.; CASTR-LONGORIA, E. Highly Antifungal Activity of Biosynthesized Copper Oxide Nanoparticles against *Candida albicans*. **Nanoparticles**, v. 12, p. 3856, 2022.
- GIACHINO, A.; WALDRON, K. J. Copper tolerance in bacteria requires the activation of multiple accessory pathways. **Molecular Microbiology**, v. 144, n. 3, p. 377 – 390, 2020.
- GOTTARDO, B.; LEMES, T. H.; BYZYNSKI, G.; PAZIANI, M. H.; von-ZESKA-KRESS, M. R.; ALMEIDA, M. T. G.; VOLANTI, D. P. One-Pot Synthesis and Antifungal Activity of Nontoxic Silver-Loaded Hydroxyapatite Nanocomposites against *Candida* Species. **ACS Applied Nano Materials**, v. 2, n. 4, p. 2112 – 2120, 2019.
- HAVRYLIUK, O.; RATHEE, G.; BLAIR, J.; HOVORUKHA, V.; TASHYREV, O.; MORATÓ, J.; PÉREZ, L. M.; TZANOV, T. Unveiling the Potential of CuO and Cu₂O Nanoparticles against Novel Copper-Resistant *Pseudomonas* Strains: An In-Depth Comparison. **Nanomaterials**, v. 14, p. 1644, 2024.
- HOLMES, A. H.; MOORE, L. S. P.; SUNDSFJORD, A.; STEINBAKK, M.; REGMI, S.; KARKEY, A.; GUERIN, P. J.; PIDDOCK, L. J. V. Understanding the mechanisms and drivers of antimicrobial resistance. **LANCET**, v. 387, n. 10014, p. 176 – 187, 2016.
- IGNASIAK, K.; MAXWELL, A. *Galleria mellonella* (greater wax moth) larvae as a model for antibiotic susceptibility and acute toxicity trials. **BMC Research Notes**, v. 29, n. 10, p. 428, 2017.
- IKUTA, K. S. *et al.* Global mortality associated with 33 bacterial pathogens in 2019: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. **LANCET**, v. 400, n. 10369, p. 2221 – 2248, 2022.
- JUNQUEIRA, J. C.; MYLONAKIS, E.; BORGHI, E. *Galleria mellonella* experimental model: advances and future directions. **Pathogens and Disease**, v. 79, n. 5, p. ftab021, 2021.

KHAIRY, T.; AMIN, D. H.; SALAMA, H. M.; ELKHOLY, I. M. A.; ELNAKIB, M.; GEBREEL, H. M.; SAYED, H. A. E. Antibacterial activity of green synthesized copper oxide nanoparticles against multidrug-resistant bacteria. **Scientific Reports**, v. 14, p. 25020, 2024.

KLEPSER, M. E.; ERNST, E. J.; LEWIS, R. E.; ERNST, M. E.; PFALLER, M. A. Influence of test conditions on antifungal time-kill curve results: proposal for standardized methods. **Antimicrobials Agents and Chemotherapy**, v. 42, n. 5, p. 127 – 1212, 1998.

LADOMERSKY, E.; PETRIS, M. J. Copper tolerance and virulence in bacteria. **Metallomics**, v. 7, n. 6, p. 957 – 964, 2015.

LARA, H. H.; IXTEPAN-TURRENT, L.; YACAMAN, M. J.; LOPEZ-RIBOT, J. Inhibition of *Candida auris* Biofilm Formation on Medical and Environmental Surfaces by Silver Nanoparticles. **ACS Applied Materials & Interfaces**, v. 12, n. 19, p. 21183 – 21191, 2021.

LEE, Y.; PUUMALA, E.; ROBBINS, N.; COWEN, L. E. Antifungal Drug Resistance: Molecular Mechanisms in *Candida albicans* and Beyond. **Chemical Reviews**, v. 121, n. 6, p. 3390 – 3411, 2021.

LYUMKIS, D. Challenges and opportunities in cryo-EM single-particle analysis. **Journal of Biological Chemistry**, v. 294, n. 13, p. 5181 – 5197, 2019.

MA, X.; ZHOU, S.; XU, X.; DU, Q. Copper-containing nanoparticles: Mechanism of antimicrobial effect and application in dentistry-a narrative review. **Frontiers**, v. 9, p. 905892, 2022.

MALIC, S.; RAI, S.; REDFERN, J.; PRITCHETT, J.; LIAUW, C. M.; VERRAN, J.; TOSHEVA, L. Zeolite-embedded silver extends antimicrobial activity of dental acrylics. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 173, p. 52 – 57, 2019.

MANCUSO, G.; MIDIRI, A.; GERACE, E.; BIONDO, C. Bacterial Antibiotic Resistance: The Most Critical Pathogens. **Pathogens**, v. 10, n. 10, p. 1310, 2021.

OLIVEIRA, D. M. P.; FORDE, B. M.; KIDD, T. J.; HARRIS, P. N. A.; SCHEMBRI, M. A.; BEATSON, S. A.; PATERSON, D. L.; WALKER, M. J. Antimicrobial Resistance in ESKAPE Pathogens. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 33, n. 3, p. 00181-19, 2020.

OMS. **WHO Bacterial Priority Pathogens List, 2024**: bacterial pathogens of public health importance to guide research, development and strategies to prevent and control antimicrobial resistance. Geneva: World Health Organization, 2024, 72 p. Disponível em: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240093461>. Acesso em: 01/12/2024.

OMS. **WHO fungal priority pathogens list to guide research, development and public health action**. Geneva: World Health Organization, 2022, 48 p. Disponível em: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240060241>. Acesso em: 01/12/2024.

PRISTOV, K. E.; GHANNOUM, M. A. Resistance of *Candida* to azoles and echinocandins worldwide. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 25, p. 792 – 798, 2019.

RICE, L. B. Federal Funding for the Study of Antimicrobial Resistance in Nosocomial Pathogenesis: No ESKAPE. **The Journal of Infections Diseases**, v. 197, n. 8, p. 1079 – 1081, 2008.

ROCHA, J.; ANDERSON, M. W.; Microporous Titanosilicates and other Novel Mixed Octahedral-Tetrahedral Frameworks Oxides. **European Journal of Inorganic Chemistry**, v. 2000, n. 5, p. 801 – 818, 2000.

ROCHA, J.; Lin, Z. Microporous Nixed Octahedral-Pentahedral-Tetrahedral Framework Silicates. **Reviews in Mineralogy & Geochemistry**, v. 57, n. 1, p. 173 – 201, 2005.

SALAH, I.; PARKIN, I. P.; ALLAN, E. Copper as an antimicrobial agent: recent advances. **RCS Advances**, v. 11, p. 18179 – 18186, 2021.

SANTAJIT, S.; INDRAWATTANA, N. Mechanisms of Antimicrobial Resistance in ESKAPE Pathogens. **Biochemistry Research International**, v. 2016, p. 2475067, 2016.

SCHNEIDER, C. A.; RASBAND, W. S.; ELICEIRI, K. W. NIH Image to ImageJ: 25 years of Image Analysis. **Nature Methods**, v. 9, n. 7, p. 671 – 675, 2012.
SHANHOLTZER, C. N.; RICE, C.; WATSON, K.; CARREON, H.; LONG, T. E. Effects of copper on the antifungal activity of disulfiram (Antabuse®) in fluconazole-resistant *Candida* strains. **Medical Mycology**, v. 60, n. 4, p. myac016, 2022.

SHARMA, D.; MISBA, L.; KHAN A. U. Antibiotics versus biofilm: an emerging battleground in microbial communities. **Antimicrobial Resistance & Infection Control**, v. 8, p. 79, 2019.

TANG, K. W. K.; MILLAR, B. C.; MOORE, J. E. Antimicrobial Resistance (AMR). **British Journal of Biomedical Science**, v. 80, p. 11387, 2023.

UDDIN, T. M.; CHAKRABORTY, A. J.; KHUSRO, A.; ZIDAN, B. M. R. M.; MITRA, S.; EMRAN, T. B.; DHAMA, K.; RIPON, K. H.; GAJDÁCS, M.; SAHIBZADA, M. U. K.; HOSSAIN, J.; KOIRALA, N. Antibiotic resistance in microbes: History, mechanisms, therapeutic strategies and future prospects. **Journal of Infection and Public Health**, v. 14, n. 12, p. 1750 – 1766, 2021.

VAZQUEZ-MUNOZ, R.; ARELLANO-JIMENEZ, M. J.; LOPEZ-RIBOT, J. L. Bismuth nanoparticles obtained by a facile synthesis method exhibit antimicrobial activity against *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans*. **BMC Biomedical Engineering**, v. 2, p. 11, 2020a.

VAZQUEZ-MUNOZ, R.; LOPEZ, F. D.; LOPEZ-RIBOT, J. L. Bismuth Nanoantibiotics Display Anticandidal Activity and Disrupt the Biofilm and Cell Morphology of the Emergent Pathogenic Yeast *Candida auris*. **Antibiotics**, v. 9, n. 8, p. 461, 2020b.

VAZQUEZ-MUNOZ, R.; LOPEZ, F. D.; LOPEZ-RIBOT, J. L. Silver Nanoantibiotics Display Strong Antifungal Activity Against the Emergent Multidrug-Resistant Yeast *Candida auris* Under Both Planktonic and Biofilm Growing Conditions. **Frontiers Microbiology**, v. 11, p. 1673, 2020c.

VENKATESAN, N.; PERUMAL, G.; DOBLE, M. Bacterial resistance in biofilm-associated bacteria. **Future Microbiology**, v. 10, n. 11, p. 1743 – 1750, 2015.

WANG, R.; LAI, T. P.; GAO, P.; ZHANG, H.; HO, P. L.; WOO, P. C. Y.; MA, G.; KAO, R. Y. T.; LI, H.; SUN, H. Bismuth antimicrobial drugs serve as broad-spectrum metallo- β -lactamase inhibitors. **Nature Communications**, v. 9, n. 1, p. 439, 2018.

YAO, G.; LEI, J.; ZHANG, W.; YU, C.; SUN, Z.; ZHENG, S.; KOMARNENI, S. Antimicrobial activity of X zeolite exchanged with Cu^{2+} and Zn^{2+} on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 26, p. 2782 – 2793, 2019.

APÊNDICE A – TABELAS E GRÁFICOS EXTRAS

Tabela 2. Ensaio de Cinética de Morte: contagem de UFC/ml, média

Espécie	Cepa/Isolado	Designação	UFC/ml controle					
			Média 2 horas	DP	Média 6 horas	DP	Média 24 horas	DP
<i>C. albicans</i>	Cepa ATCC	CaATCC	Não testado		Não testado		71233	49825,33
	Isolado clínico 1	CaC1	Não testado		Não testado		57767	51566,11
	Isolado clínico 2	CaC2	Não testado		Não testado		38100	53672,43
<i>C. parapsilosis</i>	Cepa ATCC	CpATCC	Não testado		Não testado		33800	57332,28
	Isolado clínico 1	CpC1	Não testado		Não testado		85000	25980,76
	Isolado clínico 2	CpC2	Não testado		Não testado		33733	57390,79
<i>K. pneumoniae</i>	Cepa ATCC	KpATCC	53333	40722,64	100000	0	100000	0
	Isolado clínico 1	KpC1	45333	7505,55	100000	0	100000	0
	Isolado clínico 2	KpC2	28333	2886,75	100000	0	100000	0
<i>P. aeruginosa</i>	Cepa ATCC	PaATCC	38333	10858,33	100000	0	100000	0
	Isolado clínico 1	PaC1	100000	0	100000	0	100000	0
	Isolado clínico 2	PaC2	55667	6806,86	100000	0	100000	0
<i>S. aureus</i>	Cepa ATCC	SaATCC	42300	14918,78	37833	6757,47	83000	29444,86
	Isolado clínico 1	SaC1	33367	3496,19	33500	4968,90	100000	0
	Isolado clínico 2	SaC2	34267	4050,10	31600	7571,66	100000	0

Espécie	Cepa/Isolado	Designação	UFC/ml quando exposta a OPTBI								
			Média 2 horas	DP	Red.	Média 6 horas	DP	Red.	Média 24 horas	DP	Red.
<i>C. albicans</i>	Cepa ATCC	CaATCC	Não testado			Não testado			0	0	100%
	Isolado clínico 1	CaC1	Não testado			Não testado			167	288,68	99,71%
	Isolado clínico 2	CaC2	Não testado			Não testado			0	0	100%
<i>C. parapsilosis</i>	Cepa ATCC	CpATCC	Não testado			Não testado			0	0	100%
	Isolado clínico 1	CpC1	Não testado			Não testado			33	57,74	99,96%
	Isolado clínico 2	CpC2	Não testado			Não testado			67	57,74	99,80%
<i>K. pneumoniae</i>	Cepa ATCC	KpATCC	10133	1401,19	81,00%	6367	2608,32	93,63%	1300	435,89	98,70%
	Isolado clínico 1	KpC1	4933	4366,16	89,12%	3000	624,50	97,00%	200	346,41	99,80%
	Isolado clínico 2	KpC2	7567	6401,04	73,29%	3867	2888,48	96,13%	367	404,15	99,63%
<i>P. aeruginosa</i>	Cepa ATCC	PaATCC	7267	1150,36	81,04%	5800	1014,89	94,20%	9833	3808,32	90,17%
	Isolado clínico 1	PaC1	28300	7450,50	71,70%	12933	8674,29	87,07%	2967	4539,09	97,03%
	Isolado clínico 2	PaC2	26367	2212,09	82,63%	10000	4853,86	90,00%	233	321,46	99,77%
<i>S. aureus</i>	Cepa ATCC	SaATCC	5767	378,59	86,37%	2133	1201,39	94,36%	7667	6559,22	90,76%
	Isolado clínico 1	SaC1	4067	2369,25	87,81%	3400	3278,72	89,85%	600	600,00	99,40%
	Isolado clínico 2	SaC2	4200	2861,82	87,74%	3367	3666,52	89,34%	233	208,17	99,77%

Espécie	Cepa/Isolado	Designação	UFC/ml quando exposta a OPTCu								
			Média 2 horas	DP	Red.	Média 6 horas	DP	Red.	Média 24 horas	DP	Red.
<i>C. albicans</i>	Cepa ATCC	CaATCC	Não testado			Não testado			67	115,47	99,91%
	Isolado clínico 1	CaC1	Não testado			Não testado			0	0	100%
	Isolado clínico 2	CaC2	Não testado			Não testado			0	0	100%
<i>C. parapsilosis</i>	Cepa ATCC	CpATCC	Não testado			Não testado			5300	6605,30	84,32%
	Isolado clínico 1	CpC1	Não testado			Não testado			0	0	100%
	Isolado clínico 2	CpC2	Não testado			Não testado			67	57,74	99,80%
<i>K. pneumoniae</i>	Cepa ATCC	KpATCC	11567	2193,93	78,31%	4767	3197,39	95,23%	0	0	100%
	Isolado clínico 1	KpC1	133	57,74	99,71%	33	57,74	99,97%	0	0	100%
	Isolado clínico 2	KpC2	9833	5050,08	65,29%	2900	1126,94	97,10%	233	230,94	99,77%
<i>P. aeruginosa</i>	Cepa ATCC	PaATCC	15533	1069,27	59,48%	19767	12079,05	80,23%	19600	3218,70	80,40%
	Isolado clínico 1	PaC1	28333	8611,81	71,67%	3400	3019,93	96,60%	167	288,68	99,83%
	Isolado clínico 2	PaC2	15300	2749,55	72,52%	1833	1457,17	98,17%	133	115,47	99,87%
<i>S. aureus</i>	Cepa ATCC	SaATCC	2867	2400,69	93,22%	33	57,74	99,91%	67	57,74	99,92%
	Isolado clínico 1	SaC1	10400	2882,71	68,83%	133	115,47	99,60%	133	152,75	99,87%
	Isolado clínico 2	SaC2	3700	70,71	89,20%	133	115,47	99,58%	0	0	100%

Fonte: Autor (2025)

Legenda: DP = Desvio Padrão; Red. = Porcentagem de redução em relação ao controle.

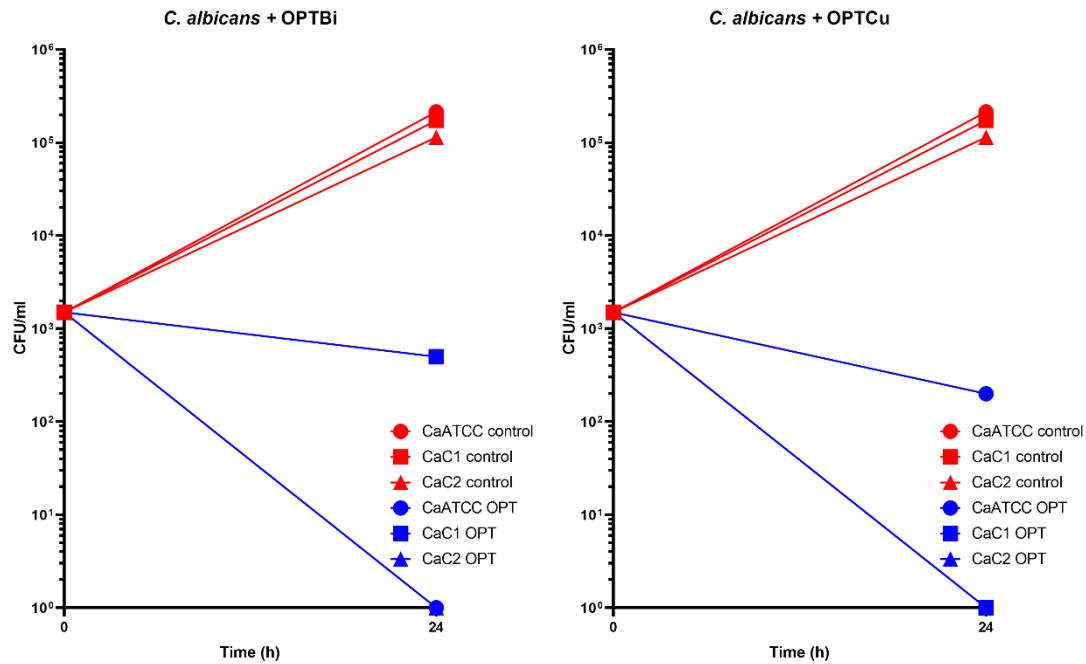
Tabela 3. Ensaio de Cinética de Morte: contagem de UFC/ml, somatória

Espécie	Cepa/Isolado	Designação	UFC/ml controle			UFC/ml quando exposta a OPTBi						UFC/ml quando exposta a OPTCu					
			Soma 2 horas	Soma 6 horas	Soma 24 horas	Soma 2 horas	Red.	Soma 6 horas	Red.	Soma 24 horas	Red.	Soma 2 horas	Red.	Soma 6 horas	Red.	Soma 24 horas	Red.
<i>C. albicans</i>	Cepa ATCC	CaATCC	Não testado	Não testado	213700	Não testado		Não testado		0	100%	Não testado		Não testado		200	99,91%
	Isolado clínico 1	CaC1	Não testado	Não testado	173300	Não testado		Não testado		500	99,71%	Não testado		Não testado		0	100%
	Isolado clínico 2	CaC2	Não testado	Não testado	114300	Não testado		Não testado		0	100%	Não testado		Não testado		0	100%
<i>C. parapsilosis</i>	Cepa ATCC	CpATCC	Não testado	Não testado	101400	Não testado		Não testado		0	100%	Não testado		Não testado		15900	84,32%
	Isolado clínico 1	CpC1	Não testado	Não testado	255000	Não testado		Não testado		100	99,96%	Não testado		Não testado		0	100%
	Isolado clínico 2	CpC2	Não testado	Não testado	101200	Não testado		Não testado		200	99,80%	Não testado		Não testado		200	99,80%
<i>K. pneumoniae</i>	Cepa ATCC	KpATCC	160000	300000	300000	30400	81,00%	19100	93,63%	3900	98,70%	34700	78,31%	14300	95,23%	0	100%
	Isolado clínico 1	KpC1	136000	300000	300000	14800	89,12%	9000	97,00%	600	99,80%	400	99,71%	100	99,97%	0	100%
	Isolado clínico 2	KpC2	85000	300000	300000	22700	73,29%	11600	96,13%	1100	99,63%	29500	65,29%	8700	97,10%	700	100%
<i>P. aeruginosa</i>	Cepa ATCC	PaATCC	115000	300000	300000	21800	81,04%	17400	94,20%	29500	90,17%	46600	59,48%	59300	80,23%	58800	80,40%
	Isolado clínico 1	PaC1	300000	300000	300000	84900	71,70%	38800	87,07%	8900	97,03%	85000	71,67%	10200	96,60%	500	99,83%
	Isolado clínico 2	PaC2	167000	300000	300000	45900	72,51%	30000	90,00%	700	99,77%	45900	72,51%	5500	98,17%	400	99,87%
<i>S. aureus</i>	Cepa ATCC	SaATCC	126900	113500	249000	12200	90,39%	6400	94,36%	23000	90,76%	6800	94,64%	100	99,91%	200	99,92%
	Isolado clínico 1	SaC1	100100	100500	300000	12600	87,41%	10200	89,85%	1800	99,40%	31200	68,83%	400	99,60%	400	99,87%
	Isolado clínico 2	SaC2	102800	94800	300000	11100	89,20%	10100	89,35%	700	99,77%	11100	89,20%	400	99,58%	0	100%

Fonte: Autor (2025).

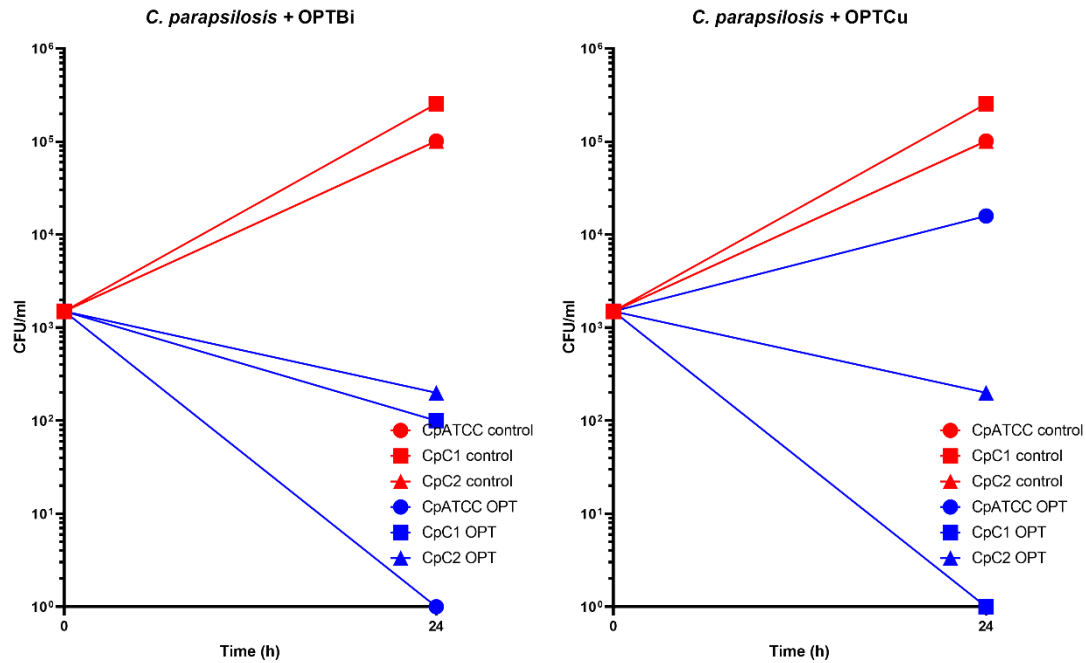
Legenda: Red. = Porcentagem de redução em relação ao controle.

Figura 8. Gráfico de Cinética de Morte para *Candida albicans* usando somatória



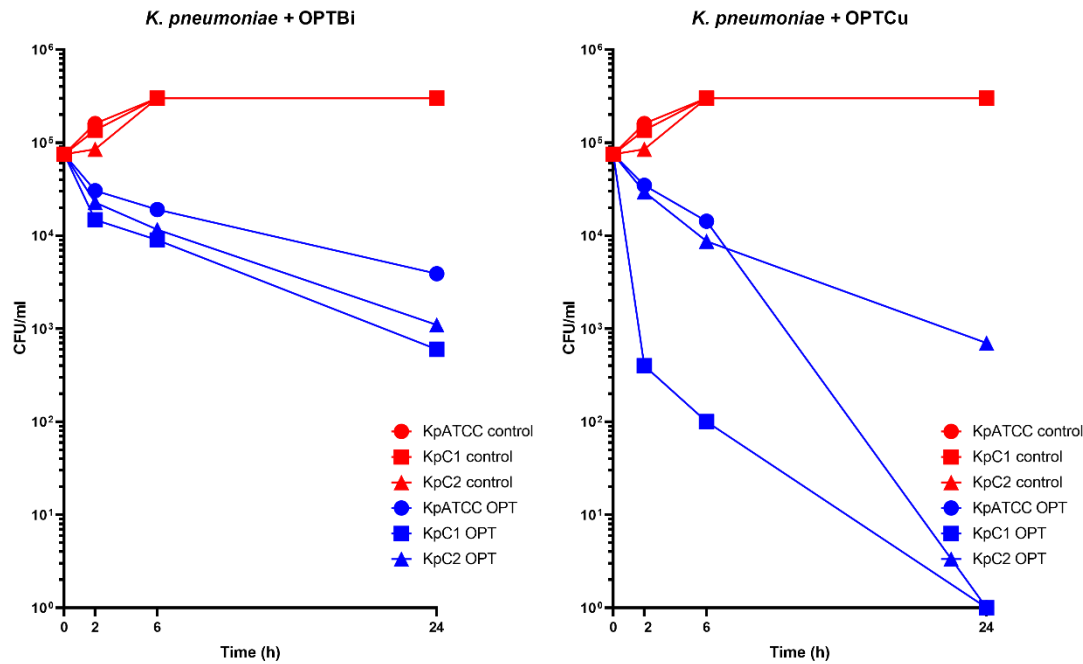
Fonte: Autor (2025).

Figura 9. Gráfico de Cinética de Morte para *Candida parapsilosis* usando somatostatin



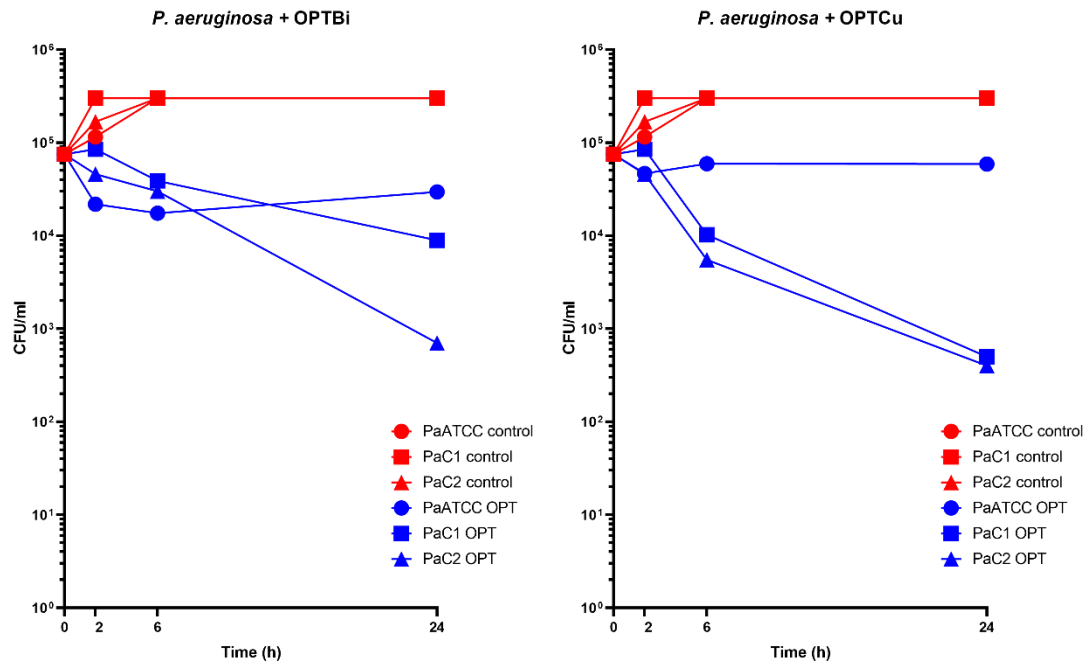
Fonte: Autor (2025).

Figura 10. Gráfico de Cinética de Morte para *Klebsiella pneumoniae* usando somatória



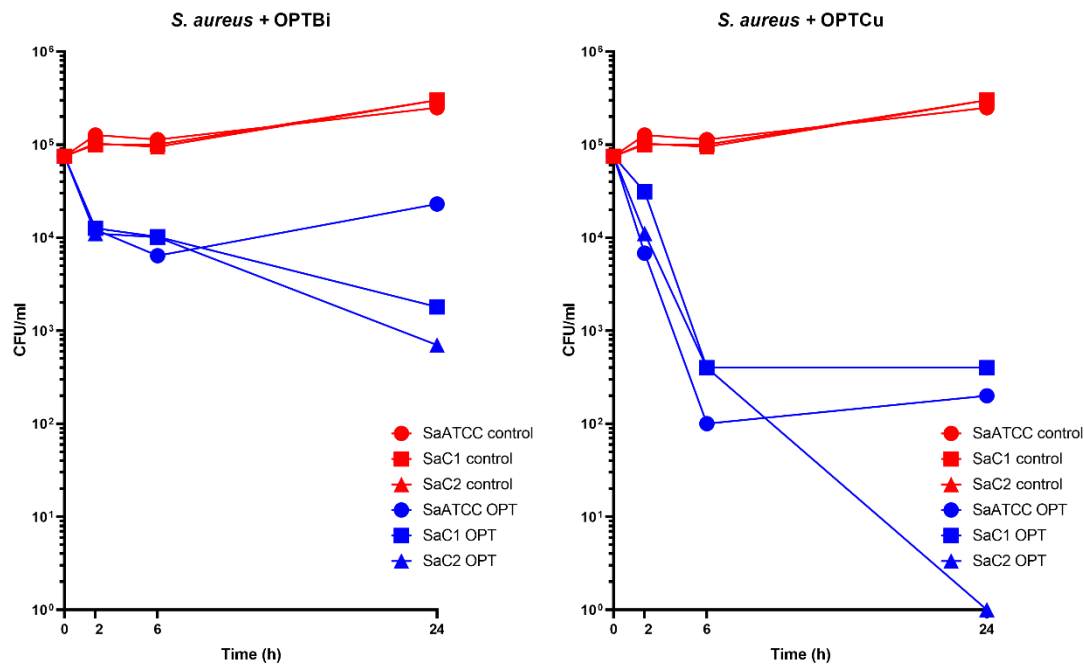
Fonte: Autor (2025).

Figura 11. Gráfico de Cinética de Morte para *Pseudomonas aeruginosa* usando somatória



Fonte: Autor (2025).

Figura 12. Gráfico de Cinética de Morte para *Staphylococcus aureus* usando somatória



Fonte: Autor (2025).