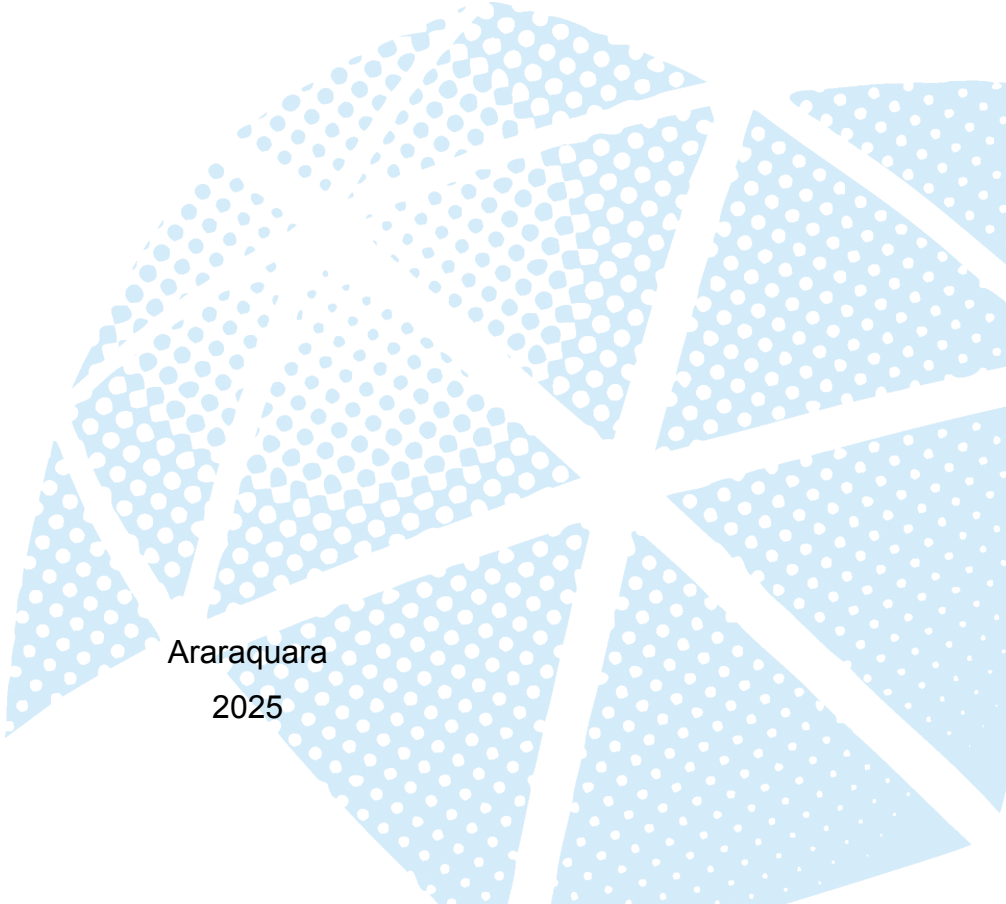


UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Campus de Araraquara

CAMILA RODRIGUES SANTANA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIVIRAL E ANTIFÚNGICA DE
NANOPARTÍCULAS DE ZnO DOPADAS COM Cu**



Araraquara
2025

CAMILA RODRIGUES SANTANA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIVIRAL E ANTIFÚNGICA DE
NANOPARTÍCULAS DE ZnO DOPADAS COM Cu**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado à Universidade Estadual
Paulista (UNESP), Faculdade de Ciências
Farmacêuticas, Araraquara, para
obtenção do título de Bacharela em
Farmácia.

Orientadora: Profa. Dra. Leila Aparecida
Chiavacci Favorin

Coorientadora: Profa. Dra. Rosemeire
Cristina Linhari Rodrigues Pietro

Araraquara
2025

S232a

Santana, Camila Rodrigues.
Avaliação da atividade antiviral e antifúngica de nanopartículas de ZnO dopadas com Cu / Camila Rodrigues Santana. – Araraquara, 2025.
42 f. : il.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação – Farmácia) – Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Araraquara.

Orientadora: Leila Aparecida Chiavacci Favorin. Coorientadora: Rosemeire Cristina Linhari Rodrigues Pietro.

1. Óxido de zinco. 2. Cobre. 3. Nanopartículas. 4. Dopagem. 5. Anti-infecciosos. I. Favorin, Leila Aparecida Chiavacci, orient. II. Pietro, Rosemeire Cristina Linhari Rodrigues, coorient. III. Título.

CAMILA RODRIGUES SANTANA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIVIRAL E ANTIFÚNGICA DE
NANOPARTÍCULAS DE ZnO DOPADAS COM Cu**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado à Universidade Estadual
Paulista (UNESP), Faculdade de Ciências
Farmacêuticas, Araraquara, para
obtenção do título de Bacharela em
Farmácia.

Data da defesa: 04/12/2025

Banca Examinadora:

Profa. Dra. Leila Aparecida Chiavacci Favorin
UNESP - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Campus de Araraquara

Profa. Dra. Rosemeire Cristina Linhari Rodrigues Pietro
UNESP - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Campus de Araraquara

Dra. Marina Paiva Abuçafy
UNESP - Instituto de Química - Campus de Araraquara

Me. Camila Cristina Baccetti Medeiros
UNESP - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Campus de Araraquara

Me. João Vitor Carvalho Constantini
UNESP - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Campus de Araraquara

Prof. Dr. Marlus Chorilli

UNESP - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Campus de Araraquara

Dedico este trabalho a Deus por ser meu suporte em todos os momentos e à minha família por sempre me apoiarem.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho só foi possível com a colaboração de muitas pessoas a quais gostaria de agradecer: À minha orientadora, Profa. Dra. Leila Aparecida Chiavacci Favorin, pela imensa contribuição na minha formação. À minha coorientadora, Profa. Dra. Rosemeire Cristina Linhari Rodrigues Pietro e seus alunos do laboratório de Biotecnologia Farmacêutica pelo apoio no trabalho. Aos meus pais e familiares pelo apoio e carinho ao longo da graduação. Às minhas amigas por passarem por todos os desafios do curso comigo. Aos meus professores, os quais nunca irei me esquecer, pela participação em minha capacitação profissional. Ao Prof. Dr. Paulo Inácio da Costa e seus alunos do laboratório de Imunologia Clínica e Biologia Molecular pela parceria. À Profa. Dra. Sandra Helena Pulcinelli e equipe pela contribuição com as análises de DRX. Aos meus colegas do CMAF por sempre me ajudarem quando precisei.

Por fim, ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão de bolsa de pesquisa (edital 9/2023 – PIBIC, projeto 9006) e a FAPESP pelo financiamento de parte do trabalho.

“Se a educação sozinha não transforma a sociedade, sem ela tampouco a sociedade muda.”

(Paulo Freire).

RESUMO

As nanopartículas são utilizadas em diferentes áreas da saúde por apresentarem boas propriedades que resultam de seu tamanho reduzido e sua grande área de superfície. As nanopartículas de óxido de zinco (ZnO) são conhecidas por sua atividade antimicrobiana, assim como o cobre (Cu) que apresenta atividades antimicrobianas, antifúngicas e antivirais. Tendo em vista essas características, o presente trabalho apresentou como finalidade sintetizar suspensões aquosas de nanopartículas, com superfície modificada, de ZnO não dopado e dopado com Cu em diferentes concentrações (0,1%, 0,5%, 1,0% e 5% mol [Cu]/[Cu+Zn]) para observar sua atividade fungicida e fungistática em *Candida albicans* e antiviral em Replicon SARS-CoV-2. A síntese das nanopartículas foi realizada pelo método sol-gel e a superfície modificada com (3-glicidiloxipropil) trimetoxisilano (GPTMS) para dispersão em meio aquoso. A caracterização das nanopartículas foi efetuada pelos métodos de difração de Raios-X (DRX), espectroscopia na região do UV-Vis e avaliação da fotoluminescência. A atividade antiviral foi avaliada pelo método de MTT, a fungistática pelo teste de difusão em ágar e por determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e fungicida por determinação da concentração fungicida mínima (CFM). Os resultados de DRX revelaram que as fases formadas eram condizentes com o ZnO enquanto as demais técnicas revelaram alterações no pico de absorção (UV-Vis) e no comprimento de onda de absorção e emissão das NPs em função do teor de Cu. No MTT foi possível observar diminuição da viabilidade de células BHK-21 tratadas com Replicon SARS-CoV-2 em concentrações maiores das suspensões de nanopartículas, o que indica que são promissoras para incorporação em materiais com atividade antiviral, mas não houve diferença significativa de viabilidade celular entre as células tratadas com as nanopartículas de ZnO não dopado e as tratadas com as nanopartículas dopadas. No CFM apenas as amostras dopadas com 0,5%, 1,0% e 5,0% se mostraram fungicidas. Já no teste de difusão em ágar todas as nanopartículas formaram halos de inibição em ágar-Müller Hinton e apresentaram capacidade fungistática na CIM, com destaque a amostra dopada com 5,0% de Cu que apresentou CIM de 312,5 µg/mL. Portanto, as nanopartículas de ZnO dopadas com Cu são promissoras para uso em materiais e fármacos com atividades antivirais e antifúngicas.

Palavras-chave: ZnO; Cu; nanopartículas; dopagem; antimicrobiano.

ABSTRACT

Nanoparticles are used in different healthcare areas due to their beneficial properties resulting from their small size and large surface area. Zinc oxide (ZnO) nanoparticles are known for antimicrobial activity, as well as copper (Cu), which exhibits antimicrobial, antifungal, and antiviral activities. Considering these characteristics, the present work aimed to synthesize aqueous suspensions of surface-modified ZnO nanoparticles, both undoped and doped with Cu at different concentrations (0.1%, 0.5%, 1.0%, and 5.0% mol [Cu]/[Cu+Zn]) to observe their fungicidal and fungistatic activity against *Candida albicans* and antiviral activity against Replicon SARS-CoV-2, aqueous suspensions of non-doped ZnO were also synthesized for comparison with the doped ones. The synthesis of the nanoparticles was achieved through the sol-gel method and the surface modified with (3-glycidyloxypropyl) trimethoxysilane (GPTMS) for dispersion in aqueous medium. The characterization of the nanoparticles was conducted by X-ray diffraction (XRD), UV-Vis spectroscopy, and photoluminescence evaluation. Antiviral activity was evaluated using the MTT assay, fungistatic activity by the agar diffusion test and by determining the minimum inhibitory concentration (MIC), and fungicidal activity by determining the minimum fungicidal concentration (MFC). XRD results revealed that the phases formed were consistent with ZnO, while the other techniques revealed alterations in the absorption peak (UV-Vis) and in the absorption and emission wavelengths of the nanoparticles as a function of the Cu content. In the MTT method, a decrease in the viability of BHK-21 cells treated with Replicon SARS-CoV-2 at higher concentrations of nanoparticle suspensions was observed, indicating that they are promising for incorporation into materials with antiviral activity. However, there was no significant difference in cell viability between cells treated with undoped ZnO nanoparticles and those treated with doped ones. In the MFC test, only the samples doped with 0.5%, 1.0%, and 5.0% showed fungicidal activity. In the agar diffusion test, all nanoparticles formed inhibition halos on Mueller-Hinton agar and exhibited fungistatic capacity in the MIC, with the sample doped with 5.0% of Cu standing out with a MIC of 312.5 µg/mL. Therefore, Cu-doped ZnO nanoparticles are promising for use in materials and drugs with antiviral and antifungal activities.

Keywords: ZnO; Cu; nanoparticles; doping; antimicrobial.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Representação esquemática da CIM	24
Figura 2 – Difratoograma de Raios-X das NPs de ZnO	25
Figura 3 – Difratoograma de Raios-X das NPs de ZnO/Cu 0,1%	26
Figura 4 – Difratoograma de Raios-X das NPs de ZnO/Cu 0,5%	26
Figura 5 – Difratoograma de Raios-X das NPs de ZnO/Cu 1,0%	27
Figura 6 – Difratoograma de Raios-X das NPs de ZnO/Cu 5,0%	27
Figura 7 – Espectros na região de UV-Vis das amostras de NPs	28
Figura 8 – Fotoluminescência em câmara UV das amostras de NPs	29
Figura 9 – Registro de placas de Difusão em Ágar após incubação	32
Figura 10 – Registro de placa de CIM após 2 horas da adição de resazurina	33
Figura 11 – Registro de placa de CFM após incubação	34

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Resultados de ensaio de MTT (em porcentagem) de viabilidade celular em células BHK-21. Média e desvio padrão da triplicata	30
Tabela 2 – Resultados de ensaio de MTT (em porcentagem) de viabilidade celular em células BHK-21 com Replicon SARS-CoV-2. Média e desvio padrão da triplicata	30
Tabela 3 – Média e desvio padrão do tamanho dos halos formados (mm) no teste de Difusão em Ágar	32
Tabela 4 – Resultados da moda do teste de Concentração Inibitória Mínima	33
Tabela 5 – Resultados da moda do teste de Concentração Fungicida Mínima	34

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BHK	Baby Hamster Kidney (fibroblastos renais de filhotes de hamster)
CFM	Concentração Fungicida Mínima
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CMAF	Ciências dos Materiais Aplicadas à Farmácia
DMSO	Dimetilsulfóxido
DRX	Difração de Raio-X
GPTMS	(3-Glycidyloxypropyl)trimethoxysilane
MFC	Minimum Fungicide Concentration
MIC	Minimum Inhibitory Concentration
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio
NPs	Nanopartículas
RNA	Ácido Ribonucleico
ROS	Espécies Reativas de Oxigênio
S	Proteína Spike
SARS-CoV-2	Coronavírus da síndrome respiratória aguda grave 2
UFC	Unidade Formadora de Colônia
Unesp	Universidade Estadual Paulista
UV	Ultravioleta
UVA	Ultravioleta A
UV-Vis	Ultravioleta-Visível
XRD	X-ray diffraction

LISTA DE SÍMBOLOS

ZnO	Óxido de Zinco
Cu	Cobre
Zn	Zinco
N_2	Nitrogênio
LiOH	Hidróxido de lítio
OH^-	Hidróxido
NADPH	Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 ESTADO DA ARTE	17
3 OBJETIVOS	19
4 DESENVOLVIMENTO	20
4.1 Metodologia	20
4.1.1 Síntese das nanopartículas de ZnO dopadas com Cu	20
4.1.2 Caracterização das nanopartículas	21
4.1.3 Ensaio de MTT	21
4.1.4 Teste de difusão em ágar:	22
4.1.5 Concentração Inibitória Mínima (CIM):	23
4.1.6 Concentração Fungicida Mínima (CFM):	24
4.2 Resultados e Discussões	25
4.2.1 Caracterização das nanopartículas	25
4.2.2 Ensaio de MTT	29
4.2.3 Teste de difusão em ágar	31
4.2.4 Concentração Inibitória Mínima (CIM)	32
4.2.5 Concentração Fungicida Mínima (CFM)	34
5 CONCLUSÃO	36
REFERÊNCIAS	37

1 INTRODUÇÃO

A maior parte das infecções fúngicas em humanos são causadas por espécies de *Candida*, sendo a causadora da maioria das infecções oportunistas a *Candida albicans* (Lopes; Lionakis, 2022). A *Candida albicans* é um fungo leveduriforme comensal que é facilmente encontrado em superfícies mucosas (oral, gastrointestinal, genital) e na pele, e em cerca de 50% da população esta faz parte da microbiota normal (Lopes; Lionakis, 2022; Talapko *et al.*, 2021). Esse fungo é um patógeno oportunista, ou seja, a *C. albicans* pode se tornar patogênica, causando doença nas mucosas do organismo e/ou infecções sistêmicas potencialmente fatais (Lopes; Lionakis, 2022).

O desenvolvimento da candidíase, a infecção causada por espécies do gênero *Candida*, ocorre quando há disbiose da microbiota do hospedeiro, quando as barreiras mucocutâneas são prejudicadas ou quando há uma baixa nos mecanismos de defesa do hospedeiro (Lopes; Lionakis, 2022; Talapko *et al.*, 2021).

O agente etiológico da Covid-19, responsável pela pandemia que se iniciou no ano de 2020, é o coronavírus da síndrome respiratória aguda grave 2 (SARS-CoV-2). Esse vírus apresenta fita simples positiva de RNA, pertence à família *Coronaviridae* e é envolto por cápsula lipoproteica que contém proteína Spike (S) (Nogueira *et al.*, 2020; Lamers; Haagmans, 2022). A maioria das pessoas infectadas com SARS-CoV-2 apresentam apenas uma doença respiratória de leve a moderada, porém em alguns quadros pode-se ter replicação do vírus no trato respiratório inferior, o que causa a síndrome da angústia respiratória aguda, que é potencialmente fatal (Lamers; Haagmans, 2022). Esse coronavírus é altamente contagioso, o que resultou em períodos com alta taxa de contaminação (Sironi *et al.*, 2020).

Na triagem antiviral contra SARS-CoV-2, há necessidade de instalações de alto nível de biossegurança, portanto para que esse nível de segurança não seja necessário, pode-se utilizar o Replicon SARS-CoV-2, que é um sistema não infeccioso que recapitula a replicação viral, porém sem produção de vírions (Zhang *et al.*, 2021). Para que isso aconteça, utiliza-se o vírus sem estruturas como a proteína Spike, a membrana e o envelope viral (Zhang *et al.*, 2021).

As nanopartículas (NPs) são partículas produzidas em nanoescala, que apresentam pelo menos uma das dimensões entre 1 a 100 nm e que possuem

propriedades físico-químicas únicas em função de seu tamanho reduzido e sua grande área de superfície, podendo ser utilizadas em diversas áreas, como em diagnóstico de doenças e liberação modificada de moléculas biologicamente ativas (Najahi-Missaoui *et al.*, 2020; Selmani *et al.*, 2022).

As NPs em função de suas propriedades únicas podem apresentar uma série de vantagens como condutividade elétrica e térmica otimizadas, boa estabilidade química, baixo custo de produção quando comparado a outros métodos e, dependendo do tipo de elemento estudado, podem apresentar propriedades como ação catalítica e ação antimicrobiana (Porto *et al.*, 2018; Cornu *et al.*, 2020). Seu tamanho e consequentemente sua alta relação superfície/volume são responsáveis por sua reatividade e por suas propriedades finais, como por exemplo, propriedades ópticas, magnéticas, químicas e eletrônicas (Selmani *et al.*, 2022).

As nanopartículas de óxido de zinco (ZnO) são amplamente estudadas em função de sua atividade antimicrobiana, tendo uso potencial no combate de infecções microbianas (Irede *et al.*, 2024). São utilizadas em aplicações biomédicas por sua biocompatibilidade e por baixa toxicidade (Islam *et al.*, 2022). Nanopartículas de ZnO apresentam características físico-químicas únicas, que as tornam eficazes contra microrganismos, como bactérias, vírus e fungos. Sua atividade antimicrobiana resulta de mecanismos como a ruptura das membranas celulares dos microrganismos e a geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) após exposição à luz (Irede *et al.*, 2024).

O cobre (Cu) apresenta excelentes propriedades antimicrobianas e vem sendo adicionado em fungicidas comerciais (Oussou-Azo *et al.*, 2020). Essa atividade antimicrobiana é fruto de sua toxicidade frente aos microrganismos, que pode resultar de sua capacidade de gerar espécies reativas de oxigênio (ROS). Muitos estudos comprovam que o Cu apresenta propriedades antivirais, porém sua comprovação ainda não é bem estabelecida (Govind *et al.*, 2021). Os efeitos antifúngicos do cobre são menos pesquisados do que os antibacterianos, mas acredita-se que a atividade fungicida se dá pela “morte por contato”, ocorrendo modificações na homeostase de cobre, com acúmulo intracelular do metal e consequente danos extensos à membrana citoplasmática fúngica após exposição ao Cu (Quaranta *et al.*, 2011; Vincent *et al.*, 2018).

A dopagem de ZnO com Cu consiste na incorporação de átomos de Cu nas redes de nanoestrutura de ZnO. O Cu é um bom dopante em nanopartículas de

ZnO, pois apresenta raios iônicos com 71 pm, que são semelhantes ao do zinco, que apresenta raio iônico de 74 pm (Khan *et al.*, 2020). A dopagem de nanopartículas de ZnO com metais, como o cobre, pode aumentar a atividade antimicrobiana dessas NPs (Khan *et al.*, 2020).

2 ESTADO DA ARTE

Nos últimos anos, as nanopartículas de ZnO têm sido consideravelmente estudadas por conta de sua atividade antimicrobiana, inclusive quando dopadas com metais como o cobre, também conhecido por sua capacidade de combater microrganismos.

Muitas dessas pesquisas têm como foco a sua atividade antibacteriana, tanto em bactérias Gram-positivas, como *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus pyogenes*, quanto Gram-negativas, como *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae*. Em estudo que utilizou o método de difusão em ágar, resultados apontam que essas NPs são um potencial nanoantibiótico contra cepas bacterianas Gram-positivas multirresistentes (Khalid *et al.*, 2021).

No entanto, quando se diz respeito a sua capacidade antiviral, os estudos são mais escassos. Fotocatalisadores semicondutores de óxidos metálicos como o ZnO são estudados pela sua capacidade de inativar vírus e outros microrganismos por radiação eletromagnética e produção de radicais oxidativos formados pelo próprio catalisador quando expostos à luz UV (Prakash *et al.*, 2022). Dessa forma, revestimentos de óxido de zinco e óxido de cobre apresentaram atividade antimicrobiana excelente contra a bactéria *Staphylococcus aureus* e contra o vírus HSV-2 (Mannai *et al.*, 2025).

Por conta de sua transmissão por gotículas, aerossóis e superfícies contaminadas, métodos alternativos para descontaminação de superfícies contaminadas com SARS-CoV-2 vem sendo avaliadas recentemente. Um desses métodos é o revestimento das superfícies com nanomateriais, como por exemplo, nanopartículas de ZnO. Nanopartículas de ZnO de 30 a 60 nm foram avaliadas e inativaram as variantes Delta e Ômicron do SARS-CoV-2, sendo consideradas para aplicações em revestimentos de filtros ou EPIs, reforçando assim a proteção do usuário (Wolfgruber *et al.*, 2023).

Estudos visando novos métodos para controles de fungos na agricultura são cada vez mais necessários. Sendo assim, NPs de óxido de zinco dopadas com cobre e dietilenoglicol apresentaram atividade fungistática contra *Botrytis cinerea* e *Sclerotinia sclerotiorum* (Tryfon *et al.*, 2022). Já nos fungos *Neofusicoccum arbuti*, *Alternaria alternata*, *Fusarium solani* e *Colletotrichum gloeosporioides*, o ZnO

dopado com 2% de Cu apresentou atividade fotocatalítica e antifúngica (Paraguay-Delgado *et al.*, 2022).

Na área da saúde, pesquisas relacionadas à capacidade antifúngicas das NPs de ZnO dopadas com Cu também são importantes. Essas NPs com 7% de dopagem foram testadas em *Fusarium graminearum*, reduzindo o fungo patogênico (Nan *et al.*, 2023). Em estudo avaliando a contaminação fúngica do ar, ZnO–Cu²⁺ diminui consideravelmente fungos que apresentam capacidade de invadir os pulmões e também em *Candida ciferrii* e *Candida parapsilosis* (Medina-Ramírez *et al.*, 2022).

Apesar dos progressos nos estudos investigando a capacidade antiviral e antifúngica das nanopartículas de óxido de zinco dopadas com diferentes concentrações de cobre, ainda é necessário expandir as análises destas em vírus, principalmente as dopadas, que apresentam estudos escassos, e também ampliar as pesquisas em fungos de importância médica, como *Candida albicans*, que é a principal causadora de infecções fúngicas no mundo.

3 OBJETIVOS

Reforçar as investigações da capacidade antiviral das NPs de ZnO, além de dopá-las com cobre e comparar os resultados das nanopartículas não dopadas e as dopadas no vírus SARS-CoV-2. Ademais, avaliar tanto a atividade fungicida quanto a fungistática das NPs citadas anteriormente, utilizando CFM, CIM e o método de difusão em ágar em *Candida albicans*.

4 DESENVOLVIMENTO

4.1 Metodologia

4.1.1 Síntese das nanopartículas de ZnO dopadas com Cu

A síntese das nanopartículas de óxido de zinco dopadas com cobre seguiu o método sol-gel descrito por Spanhel & Anderson (1991), com algumas modificações. A síntese sol-gel foi realizada em quatro etapas distintas:

a) Precursor de acetato de zinco: 2,8 g de acetato de zinco e 125 mL de etanol absoluto foram adicionados em um balão de 3 bocas sob um sistema de refluxo em uma temperatura de 98 °C sob atmosfera inerte com a utilização de N₂. Após a temperatura correta ter sido atingida, o sistema de refluxo foi mantido por duas horas. Depois que esta etapa foi finalizada, foi adicionado mais 125 mL de etanol absoluto para solução de concentração final de 0,05 mol L⁻¹ de acetato de zinco. Essa solução foi resfriada a 4 °C por pelo menos 1 hora;

b) Suspensão coloidal de óxido de zinco: em 40 mL de precursor de acetato de zinco foi adicionado 0,0839 g de LiOH, com proporção Zn²⁺/OH⁻ igual a 1:1. A solução foi mantida em ultrassom a 60 °C por uma hora, e depois resfriada até temperatura ambiente;

c) Síntese das nanopartículas de ZnO dopadas com Cu: uma solução etanólica de Cloreto de Cobre foi adicionada na suspensão coloidal de ZnO utilizando modificação pela síntese adotada por Spanhel e Anderson (1991), com concentração molar [Zn + Cu] constante. A razão molar [LiOH]/[Zn] também permaneceu constante. A concentração da solução precursora de Cu foi de 0,1%, 0,5%, 1% e 5% de molaridade final [Cu]/[Cu+Zn]. As soluções de cloreto de Cu foram adicionadas no início da reação anterior e também foram mantidas em ultrassom a 60 °C por uma hora, e depois resfriadas até temperatura ambiente;

d) Modificação da superfície com GPTMS para dispersão em meio aquoso: em 40 mL da suspensão coloidal foram adicionados 0,3425 g de LiOH e 0,902 mL de GPTMS. As amostras foram colocadas em ultrassom a 35 °C por 15 minutos. Depois foram centrifugadas por 10 minutos a 4000 rpm e o pó remanescente foi deixado em capela de fluxo laminar por até 24 horas para secar. Por fim, o pó foi coletado, pesado e disperso em água em concentração final de 40 mg/mL. As amostras foram mantidas em geladeira (<4 °C).

4.1.2 Caracterização das nanopartículas

A caracterização das nanopartículas é importante para prever o comportamento das NPs em diferentes interfaces e para determinar suas propriedades físico-químicas, como composição, propriedades ópticas e estrutura cristalina (Selmani *et al.*, 2022). Todas as nanopartículas sintetizadas foram caracterizadas pelas seguintes técnicas:

a) Difração de Raio-X (DRX): as análises foram realizadas em difratômetro Smartlab SE, fabricado pela Rigaku com detector de cintilação e radiação de Cu monocromatizada, proveniente de um tubo selado de grafite ($\text{CuK}\alpha$, $\lambda = 1,54186 \text{ \AA}$). As varreduras foram realizadas entre o intervalo de 5 a $80^\circ 2\theta$ utilizando fenda de 10 mm , à temperatura ambiente, com passo óptico de $0,02^\circ$ em 2θ , corrente de 20 mA , tensão de 40 kV e velocidade de varredura de $5^\circ 2\theta/\text{min}$. Essa análise foi realizada em parceria com o grupo de pesquisa coordenado pela Profa. Dra. Sandra Puccinelli do Instituto de Química da Unesp;

b) Espectroscopia na região do UV-Vis: as análises foram realizadas em um espectrômetro UV-Vis, modelo Cary 60 fabricado pela Agilent Technologies, no laboratório de Ciências dos Materiais Aplicadas à Farmácia (CMAF) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Unesp com avaliação do comprimento de onda de 200 a 500 nm ;

c) Avaliação da Fotoluminescência: as análises foram realizadas em câmara de UV, fabricada pela Boitton Instrumentos, no laboratório de Ciências dos Materiais Aplicadas à Farmácia (CMAF) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Unesp em 365 nm (UVA) para análise da coloração de emissão das nanopartículas.

4.1.3 Ensaio de MTT

Para realizar o teste, foi utilizado um kit de proliferação celular (MTT) que contém reagentes prontos, não necessitando de etapas de lavagem, como descrito no Protocolo do ensaio de MTT para viabilidade e proliferação celular da Merck®.

As seguintes etapas foram realizadas: primeiro houve a incubação das células com Replicon SARS-CoV-2 em meio de cultura (para o controle foram adicionadas células sem Replicon SARS-CoV-2), depois a semeadura das células foi feita nas placas de micropoços, posteriormente adicionou-se as suspensões de nanopartículas em diferentes concentrações, então as placas foram incubadas por 24 horas sob atmosfera umidificada. A próxima etapa consistiu na adição do

reagente de marcação de MTT em cada poço, para depois realizar a incubação por 4 horas sob atmosfera umidificada. Então, a solução de solubilização foi adicionada em cada poço e a placa foi deixada em repouso por 24 horas na incubadora sob atmosfera umidificada. Por fim, foi feita a leitura da absorbância em espectrofotômetro para placas multipoços. O ensaio foi realizado em parceria com o laboratório de Imunologia Clínica e Biologia Molecular coordenado pelo Prof. Dr. Paulo Inácio da Costa. O teste foi realizado em triplicatas independentes.

4.1.4 Teste de difusão em ágar:

O teste foi realizado pelas seguintes etapas:

a) Preparo da suspensão de levedura: cinco colônias com diâmetro de cerca de 1 mm, de cultura de 24h a 35 °C, foram suspensas em 5,0 mL de solução salina 0,9% esterilizada. A suspensão foi agitada em vortex por 15 segundos e ajustada para obtenção de suspensão de turvação na escala 0,5 de McFarland, relativa a 1×10^6 a 5×10^6 leveduras/mL em salina, com auxílio de contagem do número de células em câmara de Neubauer. Para o teste de difusão em ágar, foram aplicados 100 µL dessa suspensão sobre o meio de cultura sólido na placa, dispersando com alça de Drigalsky;

b) Preparo da anfotericina B: a partir da solução-mãe de anfotericina B com concentração de 1,6 mg/mL, foi feita diluição 1:25 (64 µg/mL) com água, colocando 0,2 mL (200 µ) de solução-mãe e 4,8 mL (4 mL e 800 µ) de água. Para chegar na concentração de 4 µg/mL, foi adicionada 0,31 mL (310 µ) da solução-filha (64 µg/mL) e 4,69 mL de água. Para chegar na concentração de 2 µg/mL, foi adicionada 0,15 mL (150 µ) da solução-filha (64 µg/mL) e 4,85 mL de água;

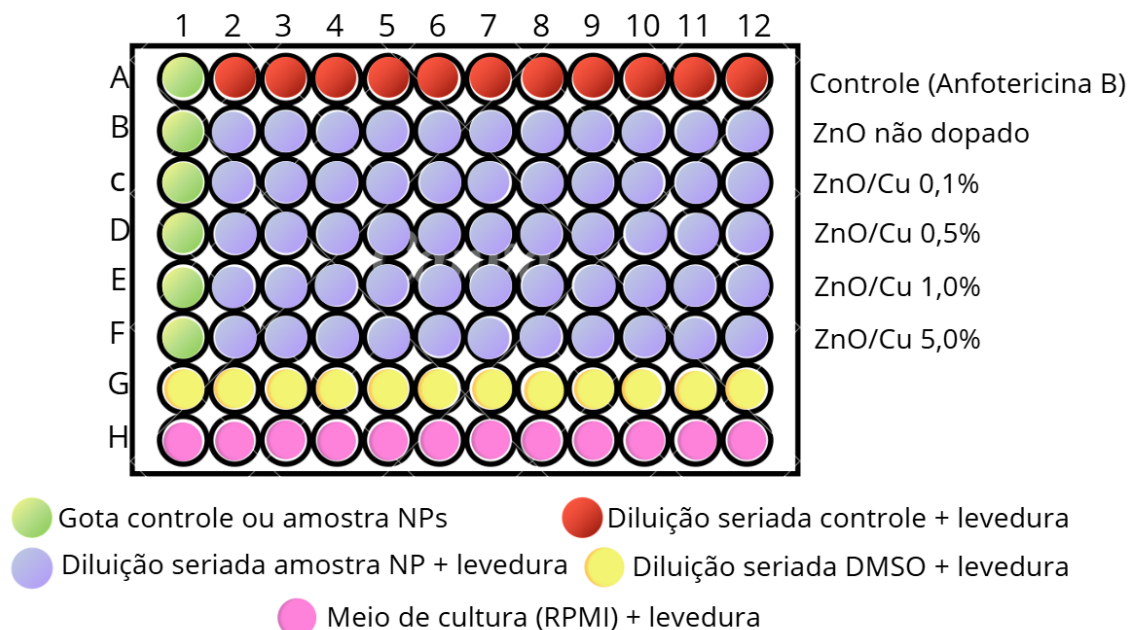
c) Teste de difusão em ágar: o teste foi realizado em placas de Petri de 9 cm de diâmetro contendo meio ágar-Müller Hinton, de acordo com a Norma M44-A2 de 2009 do Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). A aplicação das amostras foi feita individualmente nos poços de 6 mm de diâmetro interno de moldes de aço denominados “templates”. Antes de incubadas a 35 °C por 48h, as placas foram deixadas por 1h a 4 °C para permitir a difusão das amostras. Foram adicionados 50 µL de anfotericina B (4 e 2 µg/mL) como controle de inibição do crescimento das leveduras. A atividade antimicrobiana das amostras foi verificada pela medida do halo de inibição de crescimento e comparada com o halo formado pelo controle. O teste foi feito em triplicatas independentes.

4.1.5 Concentração Inibitória Mínima (CIM):

a) Preparo da suspensão de levedura: três colônias com diâmetro de cerca de 1 mm, de cultura de 24h a 35 °C, foram suspensas em 5,0 mL de solução salina 0,9% esterilizada. A suspensão foi agitada em vortex por 15 segundos e ajustada para obtenção de suspensão relativa a 2×10^4 UFC em salina, com auxílio de contagem do número de células na câmara de Neubauer;

b) Preparo da anfotericina B: a partir de solução-mãe de anfotericina B concentração de 1,6 mg/mL, foi feita diluição 1:25 com água, portanto para 2 mL de solução-mãe, usou-se 48 mL de água;

c) CIM (Concentração Inibitória Mínima): o teste foi realizado em Placas de Microtitulação de 96 poços de acordo com a Norma 22 M44-A2 de 2009 do Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (Figura 1). Em cada poço, 100 µL de RPMI-1640, o meio de cultura utilizado, foi adicionado. Na linha A, a partir da coluna 2, fez-se a diluição seriada de 100 µL do controle (anfotericina B), e nas linhas de B a F, também a partir da coluna 2, foram adicionadas 100 µL das amostras de nanopartículas, da não dopada até as dopadas com cobre (concentrações de 0,1%, 0,5%, 1,0% e 5,0%, respectivamente). Na coluna 1, linhas de A a F, uma gota das amostras ou do controle foram adicionados para garantir a ausência de contaminação. Na linha G, a diluição seriada foi feita com 100 µL de DMSO para garantir que este não era responsável pela inibição. E na linha H, mais 100 µL de RPMI foi adicionado como controle. Por fim, 100 µL da suspensão de levedura foi adicionada da linha A até a F a partir da coluna 2, nas linhas G e H foi adicionada a partir da coluna 1. A figura abaixo representa essa etapa do experimento:

Figura 1 - Representação esquemática da CIM

Fonte: autoria própria (2025).

Legenda: Representação dos reagentes e amostras adicionados em cada um dos 96 poços no teste de Concentração Inibitória Mínima.

Incubou-se em temperatura de 37 °C com agitação por 24 horas. Após incubação, 30 µL de resazurina diluída (0,01%) foi adicionada em cada poço, esperando duas horas para a leitura. O crescimento positivo da levedura foi considerado quando houve mudança da coloração azul para rosa, por conta da redução da resazurina causada pela presença de microrganismos. A concentração das nanopartículas foi de 40 mg/mL. Com a adição do caldo de RPMI e da suspensão de levedura, a concentração destas no primeiro poço onde está sendo analisado a inibição (poço 2) é de 10 mg/mL (10.000 µg/mL). A concentração de anfotericina B neste poço foi de 16 µg/mL. O teste foi feito em triplicatas independentes.

4.1.6 Concentração Fungicida Mínima (CFM):

a) Realização do teste: de acordo com a Norma 22 M44-A2 de 2009 do Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), em placas de Petri com ágar Sabouraud, foi realizada a transposição, via hastes estéreis de madeira, de cada orifício da placa de 96 poços para as placas de Petri, que depois foram incubadas a 37 °C por 24 horas. O teste foi feito em triplicatas independentes.

Os ensaios de difusão em ágar, CIM e CFM foram realizados em parceria com o laboratório de Biotecnologia Farmacêutica coordenado pela Profa. Dra. Rosemeire Cristina Linhari Rodrigues Pietro.

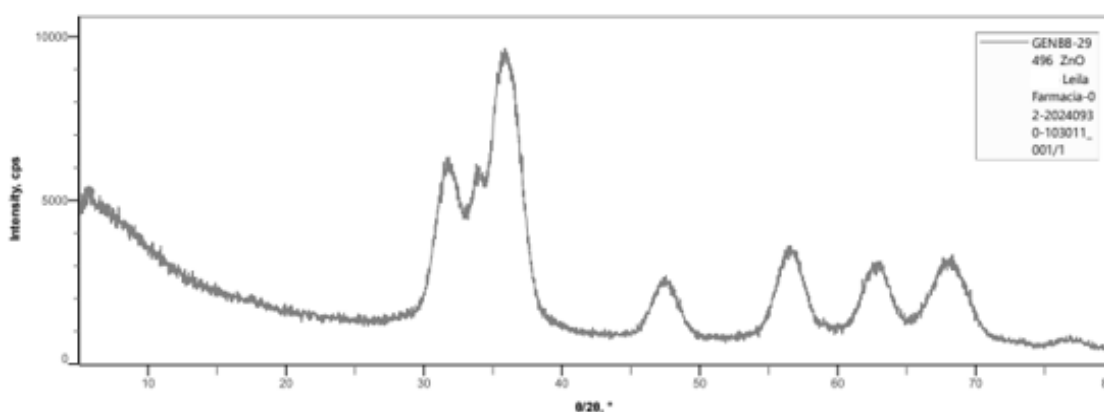
4.2 Resultados e Discussões

4.2.1 Caracterização das nanopartículas

a) Difração de Raios-X (DRX):

A análise de DRX foi utilizada para investigar os parâmetros estruturais das nanopartículas (Singhal *et al.*, 2012). O gráfico resultante dessa análise é de intensidade em função do ângulo de difração, e os picos observados correspondem à fase hexagonal do ZnO em sua estrutura wurtzita (Figuras 2, 3, 4, 5 e 6) (Yogamalar *et al.*, 2009; Marana *et al.*, 2010). O ZnO em fase wurtzita se encontra em uma estrutura hexagonal onde cada átomo de zinco (Zn) está no centro de um tetraedro distorcido coordenado a quatro átomos de oxigênio (Marana *et al.*, 2010). As posições dos picos aproximadamente em 31,5°; 34,0°; 35,5°; 47,0°; 56,0°; 62,5° e 67,5° observadas nos gráficos correspondem aos respectivos planos cristalográficos (001), (002), (101), (102), (110), (103) e (112) e podem indicar a estrutura hexagonal wurtzita do ZnO, de acordo com a ficha cristalográfica JCPDS 36-1451 (Scanferla *et al.*, 2022; Ragupathy *et al.*, 2022).

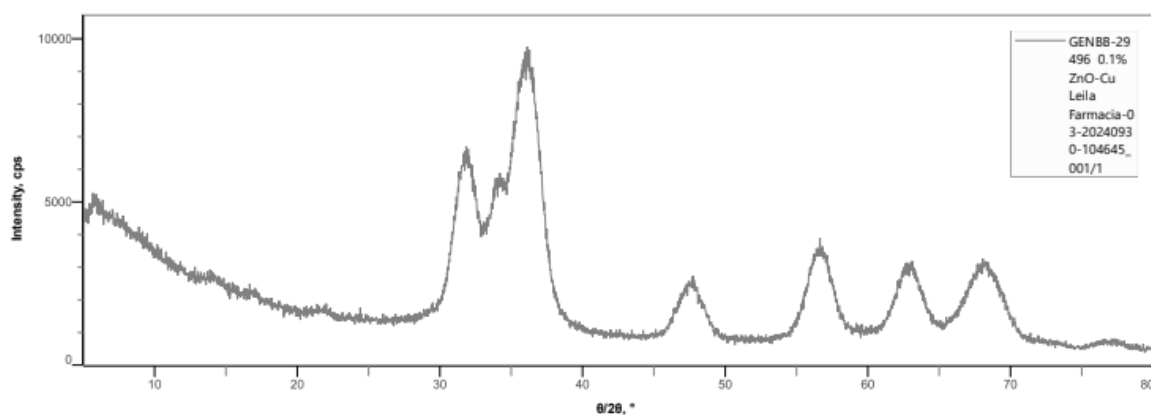
Figura 2 - Difratoograma de Raios-X das NPs de ZnO



Fonte: autoria própria (2024).

Legenda: Difratoograma de raios X das nanopartículas de ZnO não dopadas. Gráfico de intensidade por ângulo.

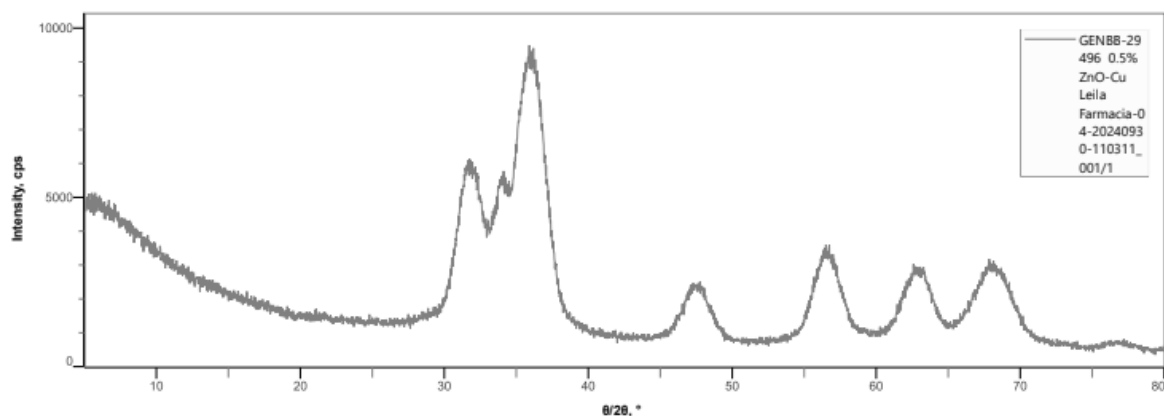
Figura 3 - Difratoograma de Raios-X das NPs de ZnO/Cu 0,1%



Fonte: autoria própria (2024).

Legenda: Difratoograma de raios X das nanopartículas de ZnO dopadas com 0,1% de Cu. Gráfico de intensidade por ângulo.

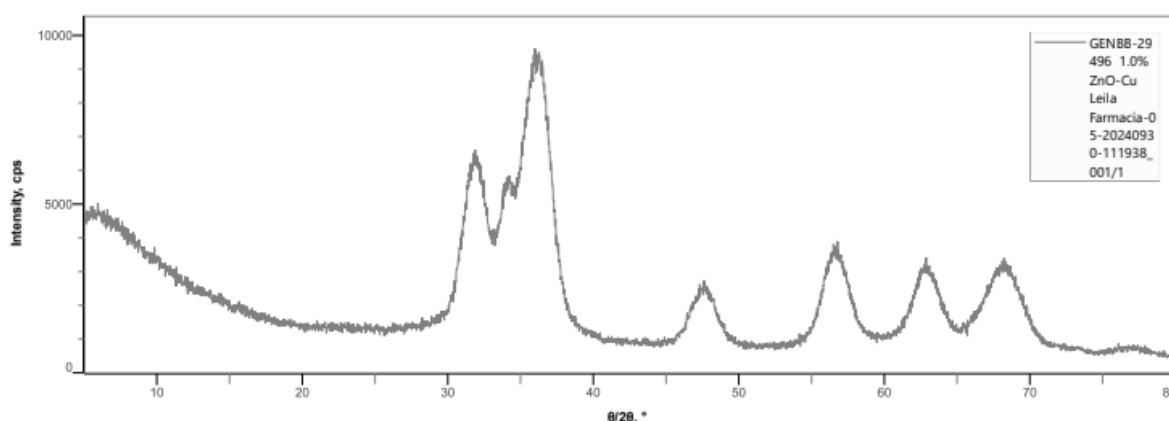
Figura 4 - Difratoograma de Raios-X das NPs de ZnO/Cu 0,5%



Fonte: autoria própria (2024).

Legenda: Difratoograma de raios X das nanopartículas de ZnO dopadas com 0,5% de Cu. Gráfico de intensidade por ângulo.

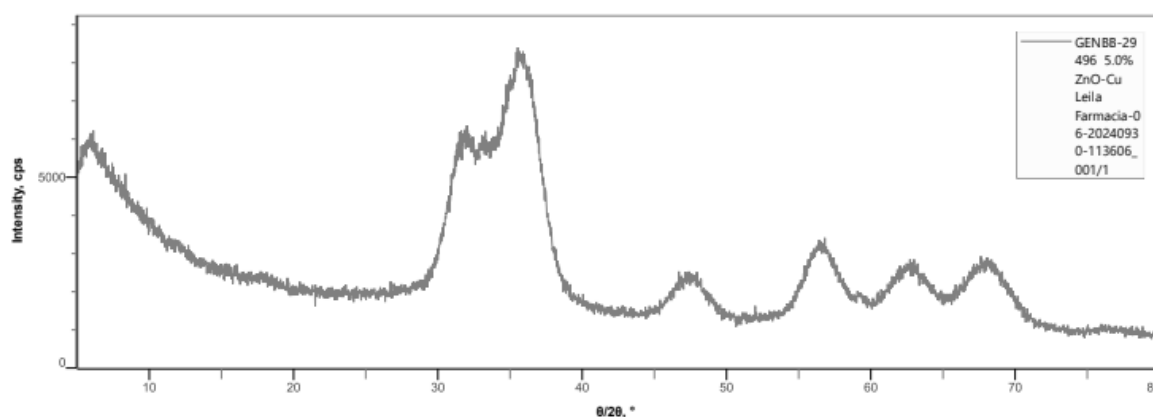
Figura 5 - Difratoograma de Raios-X das NPs de ZnO/Cu 1,0%



Fonte: autoria própria (2024).

Legenda: Difratoograma de raios X das nanopartículas de ZnO dopadas com 1,0% de Cu. Gráfico de intensidade por ângulo.

Figura 6 - Difratoograma de Raios-X das NPs de ZnO/Cu 5,0%



Fonte: autoria própria (2024).

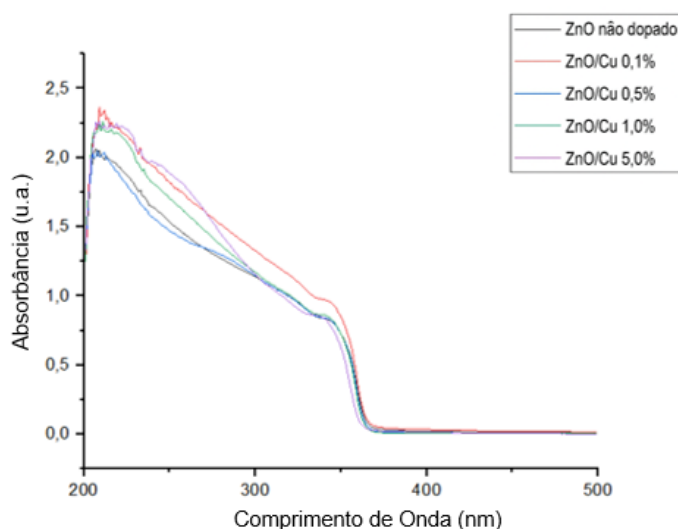
Legenda: Difratoograma de raios X das nanopartículas de ZnO dopadas com 5,0% de Cu. Gráfico de intensidade por ângulo.

Todas as amostras dopadas com Cu apresentaram os mesmos picos que os de ZnO não dopado, sugerindo que os íons de cobre substituíram os sítios de Zn sem a perda da estrutura cristalina de ZnO (Archana *et al.*, 2022; Singhal *et al.*, 2012). Observa-se ainda que os picos são alargados, o que é característico de um fenômeno estrutural associado à nanopartículas, com aumento desse alargamento nas maiores concentrações de dopagem, o que pode sugerir uma diminuição no tamanho da partícula (Liang *et al.*, 2021).

b) Espectroscopia na região de UV-Vis:

A espectroscopia na região de UV-Vis é uma técnica bastante utilizada em partículas nanométricas para examinar suas propriedades ópticas. A Figura 7 mostra os resultados referentes à capacidade de absorção das amostras na região UV-Vis do espectro eletromagnético.

Figura 7 - Espectros na região de UV-Vis das amostras de NPs



Fonte: autoria própria (2023).

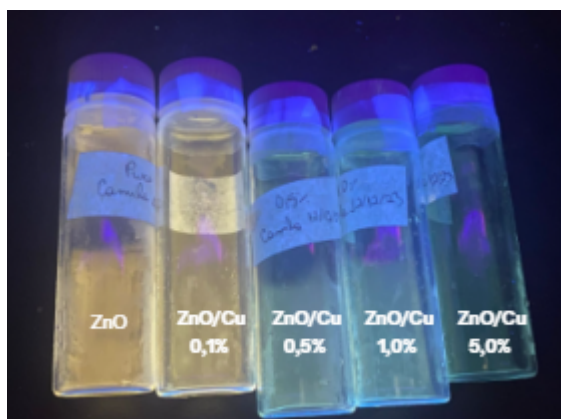
Legenda: Espectros na região de UV-Vis das amostras de nanopartículas dopadas em diferentes concentrações e da amostra de ZnO não dopado. Gráfico de absorbância (u.a.) por comprimento de onda (nm).

Pode-se observar uma banda em aproximadamente 355 nm no eixo X do gráfico (comprimento de onda), o qual indica a presença das NPs, pois esse pico se deve à transição intrínseca do gap de ZnO (Shamhari *et al.*, 2018; Veerabhadraiah *et al.*, 2022). Esses resultados associados aos de DRX revelam a formação do ZnO a partir do acetato de zinco. Em relação à dopagem, é possível observar na Figura 7 um ligeiro deslocamento para menor comprimento de onda nas amostras dopadas, principalmente na de 5,0% de ZnO/Cu, o que sugere um aumento do *bandgap* das amostras pela presença do dopante (Hammad *et al.*, 2013). Dessa forma, em corroboração com os resultados de DRX apresentados anteriormente, pode-se sugerir que os átomos de Cu estão fazendo parte da estrutura do ZnO em um processo de dopagem.

c) Avaliação da Fotoluminescência:

Na Figura 8 observa-se que as cores de emissão em UV-A das amostras vão do amarelo ao azul, resultado característico do ZnO. No ZnO não dopado, há uma coloração amarelo-esverdeada intensa, com essa intensidade sendo atenuada nas amostras dopadas com Cu, diminuindo cada vez mais com o aumento da concentração de dopagem, o que é característico de amostras de ZnO dopadas (Archana *et al.*, 2022). A emissão amarelo-esverdeada é consequência da recombinação de elétrons que estão presos em estados de vacância de oxigênio com carga ionizada simples, que se recombina com lacunas e liberam energia em forma de luz, processo comum em nanopartículas (Archana *et al.*, 2022). Como observado no resultado dos espectros na região de UV-Vis, essa alteração na cor sugere um deslocamento para uma região de menor comprimento de onda (Hammad *et al.*, 2013). Com esse resultado, infere-se que houve a formação do ZnO e a dopagem foi realizada com êxito.

Figura 8 - Fotoluminescência em câmara UV das amostras de NPs



Fonte: arquivo pessoal (2024).

Legenda: Fotoluminescência em câmara UV das amostras dopadas em diferentes concentrações em 365 nm (UV-A).

4.2.2 Ensaio de MTT

Para estimar a atividade metabólica de células ativas, foi executado o ensaio de MTT. MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio) é um sal de tetrazólio. A redução enzimática do sal de tetrazólio, que é amarelo, para cristais de formazan, que apresentam uma cor azul-púrpura intensa, é quantificada no espectrofotômetro para placas multipoços, sendo o valor da absorbância

observado diretamente proporcional ao número de células vivas, portanto quanto mais escura a solução, maior número de células metabolicamente ativas (Grela *et al.*, 2018). A redução acontece pois as células viáveis com enzimas oxidorreduções dependentes de NADPH reduzem o MTT em cristais de formazan insolúveis, que posteriormente são dissolvidos com a utilização de uma solução de solubilização (Grela *et al.*, 2018). A título de comparação, o método foi aplicado em células BHK-21 e em células BHK-21 com Replicon SARS-CoV-2, os resultados são encontrados na Tabela 1 e na Tabela 2, respectivamente.

Tabela 1 - Resultados de ensaio de MTT (em porcentagem) de viabilidade celular em células BHK-21. Média e desvio padrão da triplicata

CONC.	ZnO não dopado (%)	5% ZnO/Cu (%)	1% ZnO/Cu (%)	0,5% ZnO/Cu (%)	0,1% ZnO/Cu (%)
20 µg/mL	6,1 ± 4,6	6,9 ± 1,1	5,8 ± 0,7	7,0 ± 1,0	5,5 ± 4,4
6,6 µg/mL	63,1 ± 51,8	63,3 ± 38,9	56,3 ± 39,8	55,9 ± 43,6	65,4 ± 47,7
2,2 µg/mL	92,5 ± 12,9	86,4 ± 15,5	92,4 ± 11,8	95,1 ± 8,4	93,4 ± 9,3
0,75 µg/mL	98,7 ± 2,1	95,3 ± 4,1	94,8 ± 6,1	97,8 ± 3,8	99,7 ± 0,5
0,25 µg/mL	98,4 ± 2,8	99,0 ± 1,7	100,0 ± 0,0	98,3 ± 3,0	99,7 ± 0,5

Fonte: Elaborado pelo autor (2025)

Tabela 2 - Resultados de ensaio de MTT (em porcentagem) de viabilidade celular em células BHK-21 com Replicon SARS-CoV-2. Média e desvio padrão da triplicata

CONC.	ZnO não dopado (%)	5% ZnO/Cu (%)	1% ZnO/Cu (%)	0,5% ZnO/Cu (%)	0,1% ZnO/Cu (%)
20 µg/mL	5,4 ± 5,1	7,6 ± 6,3	8,5 ± 7,1	11,7 ± 9,7	5,1 ± 4,8
6,6 µg/mL	26,7 ± 40,4	25,4 ± 31,5	26,1 ± 3,8	26,3 ± 26,8	37,3 ± 31,9
2,2 µg/mL	83,2 ± 15,0	82,5 ± 10,4	86,5 ± 9,1	84,3 ± 9,2	79,6 ± 11,8
0,75 µg/mL	100,0 ± 0,0	95,8 ± 5,1	96,3 ± 3,6	100,0 ± 3,9	98,5 ± 2,5
0,25 µg/mL	100,0 ± 0,0	94,2 ± 6,1	96,2 ± 3,7	100,0 ± 3,5	100,0 ± 0,0

Fonte: Elaborado pelo autor (2025)

Com os resultados apresentados na Tabela 1 e na Tabela 2, nota-se que com o aumento da concentração das suspensões de nanopartículas, menor é a porcentagem de viabilidade celular, enquanto com a diminuição da concentração das

suspensões de nanopartículas, maior é a viabilidade celular. Tanto as células tratadas com Replicon quanto as não tratadas apresentaram esse comportamento, o que indica que o Replicon não influenciou significativamente na quantidade de células viáveis e na citotoxicidade. Ademais, as porcentagens apresentadas em ambas as tabelas não apresentaram diferenças significativas, o que contribui com a informação anterior.

Na Tabela 2, pode-se observar as porcentagens de viabilidade celular referentes às células tratadas com Replicon SARS-CoV-2. As porcentagens representam a avaliação da função mitocondrial das células, ou seja, sua funcionalidade celular, o que determina o número de células viáveis e efeitos citotóxicos (Ghasemi *et al.*, 2021). Portanto, em células infectadas pelo vírus, as amostras diminuíram a quantidade de células vivas, indicando potencial antiviral. Não foram demonstradas diferenças significativas de viabilidade celular entre as nanopartículas dopadas com Cu e as de ZnO não dopado neste teste. Dessa forma, como perspectiva futura, análise de citotoxicidade das NPs em células BHK-21 e estudos complementares da atividade antiviral das amostras, principalmente das dopadas, seriam importantes para melhor entendimento dos resultados.

4.2.3 Teste de difusão em ágar

Problemas de resistência à antifúngicos têm crescido nos últimos anos, causando problemas no tratamento de pacientes, fazendo com que tratamentos alternativos se façam cada vez mais necessários. Estudo referente a um efeito antifúngico sinérgico de fluconazol (medicamento antifúngico) combinado com nanopartículas de ZnO contra cepas de *Candida albicans* apresentou formação de halos em difusão em disco (Hajar *et al.*, 2020).

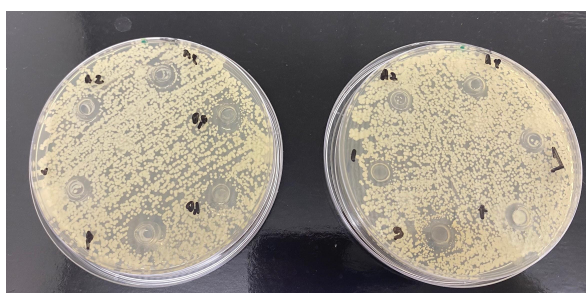
Sendo assim, resultados de tamanho dos halos formados por amostras de nanopartículas de ZnO e nanopartículas de ZnO dopadas com diferentes concentrações de cobre estão incluídos na Tabela 3, enquanto registros de placas do teste após incubação estão demonstradas na Figura 9.

Tabela 3 - Média e desvio padrão do tamanho dos halos formados (mm) no teste de Difusão em Ágar

Amostras	Tamanho do Halo (mm)
Anfotericina 2 µg/mL	5,7 ± 2,1
Anfotericina 4 µg/mL	6,3 ± 1,5
ZnO não dopado	9,7 ± 0,6
ZnO/Cu 0,1%	8,7 ± 2,3
ZnO/Cu 0,5%	9,7 ± 0,6
ZnO/Cu 1,0%	9,7 ± 1,2
ZnO/Cu 5,0%	9,0 ± 0,0

Fonte: Elaborado pelo autor (2025)

Figura 9 - Registro de placas de Difusão em Ágar após incubação



Fonte: arquivo pessoal (2024).

Legenda: Fotografia retirada das placas após o teste de Difusão em Ágar.

De acordo com a Tabela 3, pode-se inferir que os halos formados pelas amostras de nanopartículas são maiores do que os dos controles, sugerindo que as nanopartículas têm potencial fungistático. As amostras de ZnO não dopado e dopado com 0,5% e 1,0% de cobre apresentaram maiores halos, entretanto o teste de Concentração Inibitória Mínima (CIM), que é quantitativo, foi realizado para confirmar esses resultados.

4.2.4 Concentração Inibitória Mínima (CIM)

Com base nos dados apresentados na Tabela 4, todas as amostras demonstraram atividade fungistática. O crescimento da levedura é observado pela

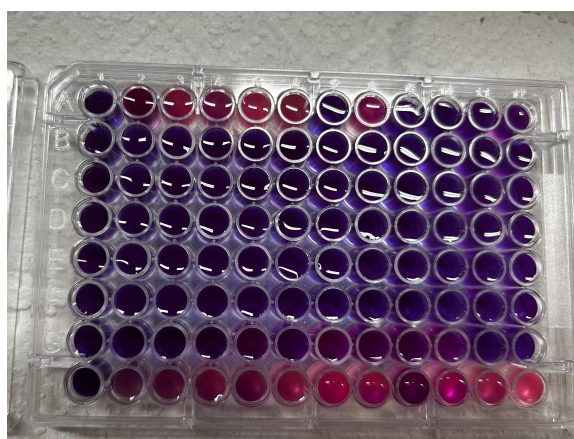
mudança de coloração, que passa de azul para rosa. Neste teste, houve uma melhora na atividade fungistática com o aumento da dopagem. Especificamente, as nanopartículas dopadas com 5,0% de cobre exibiram uma menor concentração de inibição mínima, indicando uma atividade mais pronunciada, sendo assim mais promissoras como material fungistático. A Figura 10 mostra o registro do CIM após adição de resazurina.

Tabela 4 - Resultados da moda do teste de Concentração Inibitória Mínima

Amostras	Conc. de Inibição (µg/mL)
Anfotericina	>16,0
ZnO não dopado	5000,0
ZnO/Cu 0,1%	5000,0
ZnO/Cu 0,5%	1250,0
ZnO/Cu 1,0%	625,0
ZnO/Cu 5,0%	312,5

Fonte: Elaborado pelo autor (2025)

Figura 10 - Registro de placa de CIM após 2 horas da adição de resazurina



Fonte: arquivo pessoal (2024).

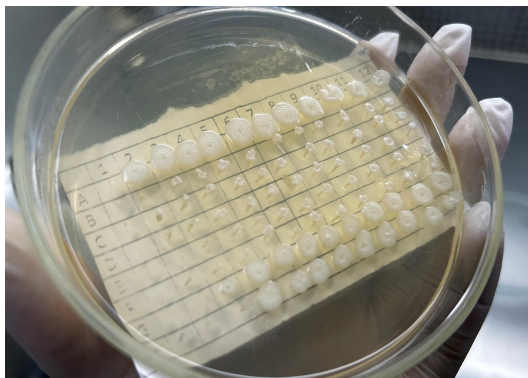
Legenda: Fotografia retirada da placa de 96 poços após o teste de Concentração Inibitória Mínima.

Portanto, no CIM os resultados obtidos corroboram com o esperado e a presença do cobre melhorou a atividade fungistática, sugerindo uma combinação dos mecanismos antimicrobianos do ZnO e do Cu.

4.2.5 Concentração Fungicida Mínima (CFM)

A Figura 11 apresenta registro da placa de petri com ágar Sabouraud após transposição do CIM e posterior incubação. O crescimento positivo da levedura foi considerado quando houve crescimento de colônias. Os resultados de moda das triplicatas independentes do CFM estão descritos na Tabela 5.

Figura 11 - Registro de placa de CFM
após incubação



Fonte: arquivo pessoal (2024).

Legenda: Fotografia retirada da placa de ágar Sabouraud após o teste de Concentração Fungicida Mínima.

Tabela 5 - Resultados da moda do
teste de Concentração Fungicida
Mínima

Amostras	Conc. Fungicida ($\mu\text{g/mL}$)
Anfotericina	>16,0
ZnO não dopado	>10000,0
ZnO/Cu 0,1%	>10000,0
ZnO/Cu 0,5%	10000,0
ZnO/Cu 1,0%	5000,0
ZnO/Cu 5,0%	10000,0

Fonte: Elaborado pelo autor (2025)

Baseando-se nos dados da Tabela 5, as amostras de 0,5%, 1,0% e 5,0% de dopagem com cobre das nanopartículas de ZnO demonstraram atividade fungicida, pois não houve crescimento da levedura nas placas nas concentrações de 10.000 µg/mL em 0,5% e 5,0% de ZnO/Cu e 5.000 µg/mL em 1,0% ZnO/Cu. Notavelmente, a de 1,0% mostrou menor concentração para atividade fungicida, indicando uma maior eficácia. A amostra de 0,1% ZnO/Cu, assim como a não dopada, não apresentaram atividade fungicida com a concentração mínima utilizada (10.000 µg/mL).

Sendo assim, os resultados referentes à análise das atividades fungicida e fungistática atendem ao objetivo do trabalho, tendo em vista que a substituição de alguns átomos de Zn na rede de nanoestrutura do ZnO pelo Cu modificou os efeitos antifúngicos das nanopartículas.

5 CONCLUSÃO

De acordo com os ensaios de caracterização (DRX, espectroscopia na região do UV-Vis e fotoluminescência), as suspensões aquosas de nanopartículas de ZnO dopadas com Cu, com a superfície modificada, apresentaram características estruturais condizentes com as nanopartículas a base de ZnO previamente estudadas na literatura científica. As nanopartículas estudadas reduziram a viabilidade das células BHK-21 com Replicon SARS-CoV-2, como mostra o ensaio de MTT, desta forma sendo promissoras para uso futuro em materiais com atividade antiviral. No entanto, neste ensaio, as dopagens com cobre não apresentaram diferenças significativas em comparação com o ZnO não dopado. Testes mais completos deverão ser realizados para confirmar a atividade antiviral das nanopartículas.

No que diz respeito à atividade antifúngica frente a *Candida albicans*, as amostras apresentaram halos de inibição maiores que os controles (anfotericina B de 4 e 2 µg/mL) no teste de difusão em ágar. No CIM, todas as suspensões de nanopartículas obtiveram atividade fungistática, com a concentração inibitória mínima diminuindo com o aumento da concentração de dopagem, sendo que a de 5,0% de ZnO/Cu apresentou a menor concentração inibitória, portanto sendo a mais fungistática. As amostras dopadas com 0,5%, 1,0% e 5,0% de cobre exibiram atividade fungicida, sendo que a de 1,0% apresentou a menor concentração fungicida.

Dessa forma, as suspensões de nanopartículas de ZnO não dopado e as dopadas com Cu em diferentes concentrações (0,1%, 0,5%, 1,0% e 5,0%) são promissoras em materiais e fármacos antimicrobianos, em destaque para suas atividades antivirais e antifúngicas.

REFERÊNCIAS

ARCHANA, K. J.; PREETHA, A. C.; BALASUBRAMANIAN, K.. Influence of Urbach energy in enhanced photocatalytic activity of Cu doped ZnO nanoparticles. **Optical Materials**, v. 127, p. 112245, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.optmat.2022.112245>. Acesso em: 12 mar. 2025.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). **Norma M44-A2** (Method for Antifungal Disk Diffusion Susceptibility Testing of Yeasts). Diretriz Aprovada - Segunda Edição: 2009. Acesso em: 15 jan. 2025.

CORNU, R.; BÉDUNEAU, A.; MARTIN, H. Influence of nanoparticles on liver tissue and hepatic functions: A review. **Toxicology**, v. 430, p. 1-13, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.tox.2019.152344>. Acesso em: 20 mar. 2025.

GHASEMI, M. *et al.* The MTT assay: utility, limitations, pitfalls, and interpretation in bulk and single-cell analysis. **International journal of molecular sciences**, v. 22, n. 23, p. 12827, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijms222312827>. Acesso em: 10 jan. 2025.

GOVIND, V. *et al.* Antiviral properties of copper and its alloys to inactivate covid-19 virus: a review. **Biomaterials**, v. 34, n. 6, p. 1217-1235, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10534-021-00339-4>. Acesso em: 20 mar. 2025.

GRELA, E.; KOZŁOWSKA, J.; GRABOWIECKA, A. Current methodology of MTT assay in bacteria—A review. **Acta histochemica**, v. 120, n. 4, p. 303-311, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.acthis.2018.03.007>. Acesso em: 16 jan. 2025.

HAJAR, A. A. *et al.* Synergistic antifungal effect of fluconazole combined with ZnO nanoparticles against Candida albicans Strains from vaginal candidiasis. **Medical Laboratory Journal**, v. 14, n. 3, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.29252/mlj.14.3.26>. Acesso em: 13 dez. 2025.

HAMMAD, T. M. *et al.* Optical and magnetic properties of Cu-doped ZnO nanoparticles. **Journal of Materials Science: Materials in Electronics**, v. 24, n. 8, p. 2846-2852, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10854-013-1181-7>. Acesso em: 13 dez. 2025.

IREDE, E. L. *et al.* Cutting-edge developments in zinc oxide nanoparticles: synthesis and applications for enhanced antimicrobial and UV protection in healthcare solutions. **RSC advances**, v. 14, n. 29, p. 20992-21034, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1039/D4RA02452D>. Acesso em: 18 jan. 2025.

ISLAM, F. *et al.* Exploring the journey of zinc oxide nanoparticles (ZnO-NPs) toward biomedical applications. **Materials**, v. 15, n. 6, p. 2160, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ma15062160>. Acesso em: 18 jan. 2025.

KHALID, A. *et al.* Synergistic effects of Cu-doped ZnO nanoantibiotic against Gram-positive bacterial strains. **Plos one**, v. 16, n. 5, p. e0251082, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0251082>. Acesso em: 11 mai. 2025.

KHAN, M. M. *et al.* Antibacterial studies of ZnO and Cu-doped ZnO nanoparticles synthesized using aqueous leaf extract of *Stachytarpheta jamaicensis*. **BioNanoScience**, v. 10, p. 1037-1048, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s12668-020-00775-5>. Acesso em: 18 jan. 2025.

LAMERS, M. M.; HAAGMANS, B. L. SARS-CoV-2 pathogenesis. **Nature reviews microbiology**, v. 20, n. 5, p. 270-284, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41579-022-00713-0>. Acesso em: 18 jan. 2025.

LIANG, S. *et al.* Design and perspective of amorphous metal nanoparticles from laser synthesis and processing. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 23, n. 19, p. 11121-11154, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1039/D1CP00701G>. Acesso em: 24 set. 2025.

LOPES, J. P.; LIONAKIS, M. S. Pathogenesis and virulence of *Candida albicans*. **Virulence**, v. 13, n. 1, p. 89-121, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/21505594.2021.2019950>. Acesso em: 27 jan. 2025.

MANNAI, Z. *et al.* Synthesis and characterization of ZnO and CuO coatings for antibacterial and antiviral applications. **Materials Chemistry and Physics**, v. 329, p. 130071, 2025. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.matchemphys.2024.130071>. Acesso em: 11 mai. 2025.

MARANA, N. L.; SAMBRANO, J. R.; SOUZA, A. R. de. Propriedades eletrônicas, estruturais e constantes elásticas do ZnO. **Química Nova**, v. 33, p. 810-815, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0100-40422010000400009>. Acesso em: 23 set. 2025.

MEDINA-RAMÍREZ, I. E. *et al.* Enhanced photocatalytic and antifungal activity of ZnO–Cu²⁺ and Ag@ ZnO–Cu²⁺ materials. **Ceramics International**, v. 48, n. 9, p. 12660-12674, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2022.01.136>. Acesso em: 12 mai. 2025.

MERCK®. Protocolo do ensaio de MTT para viabilidade e proliferação celular. Disponível em: <https://www.sigmaaldrich.com/BR/pt/applications/cell-culture-and-cell-culture-analysis/cell-analysis/cell-counting-and-health-analysis>. Acesso em: 14 fev. 2025.

NAJAH-MISSAOUI, W.; ARNOLD, R. D.; CUMMINGS, B. S. Safe nanoparticles: are we there yet?. **International journal of molecular sciences**, v. 22, n. 1, p. 385, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijms22010385>. Acesso em: 25 jan. 2025.

NAN, R. *et al.* Facile synthesis of Cu-doped ZnO nanoparticles for the enhanced photocatalytic disinfection of bacteria and fungi. **Molecules**, v. 28, n. 20, p. 7232, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/molecules28207232>. Acesso em: 12 mai. 2025.

NOGUEIRA, J. V. D. Conhecendo a origem do SARS-CoV-2 (COVID 19). **Revista Saúde e Meio Ambiente**, v. 11, n. 2, p. 115-124, 2020. Disponível em: <https://periodicos.ufms.br/index.php/sameamb/article/view/10321>. Acesso em: 18 jan. 2025.

OUSSOU-AZO, A. F. *et al.* Antifungal potential of nanostructured crystalline copper and its oxide forms. **Nanomaterials**, v. 10, n. 5, p. 1003, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/nano10051003>. Acesso em: 20 mar. 2025.

PARAGUAY-DELGADO, F. *et al.* Photocatalytic properties of Cu-containing ZnO nanoparticles and their antifungal activity against agriculture-pathogenic fungus. **RSC advances**, v. 12, n. 16, p. 9898-9908, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1039/D2RA00863G>. Acesso em: 12 mai. 2025.

PORTO, R. C. T. *et al.* Nanopartículas de óxido de zinco sintetizadas pelo método poliol: caracterização e avaliação da atividade antibacteriana. **Matéria (Rio de Janeiro)**, v. 22, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S1517-707620170005.0248>. Acesso em: 20 mar. 2025.

PRAKASH, J. *et al.* Recent advances on metal oxide based nano-photocatalysts as potential antibacterial and antiviral agents. **Catalysts**, v. 12, n. 9, p. 1047, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/catal12091047>. Acesso em: 11 mai. 2025.

QUARANTA, D. *et al.* Mechanisms of contact-mediated killing of yeast cells on dry metallic copper surfaces. **Applied and environmental microbiology**, v. 77, n. 2, p. 416-426, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/AEM.01704-10>. Acesso em: 21 mar. 2025.

RAGUPATHY, S. *et al.* Effect of doping and loading Parameters on photocatalytic degradation of brilliant green using Sn doped ZnO loaded CSAC. **Environmental Research**, v. 210, p. 112833, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.envres.2022.112833>. Acesso em: 23 set. 2025.

SCANFERLA, C. E. *et al.* Nanofibras de ZnO produzidas por eletrofiliação: síntese, caracterização e atividade fotocatalítica. **Brazilian Journal of Development**, v. 9, n. 4, p. 12874-12894, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.34117/bjdv9n4-022>. Acesso em: 23 set. 2025.

SELMANI, A.; KOVAČEVIĆ, D.; BOHINC, K. Nanoparticles: From synthesis to applications and beyond. **Advances in colloid and interface science**, v. 303, p. 102640, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cis.2022.102640>. Acesso em: 25 jan. 2025.

SHAMHARI, N. M. *et al.* Synthesis and Characterization of Zinc Oxide Nanoparticles with Small Particle Size Distribution. **Acta Chimica Slovenica**, v. 65, n. 3, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.17344/acsi.2018.4213>. Acesso em: 15 jan. 2025.

SINGHAL, S. *et al.* Cu-doped ZnO nanoparticles: synthesis, structural and electrical properties. **Physica B: Condensed Matter**, v. 407, n. 8, p. 1223-1226, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.physb.2012.01.103>. Acesso em: 23 set. 2025.

SIRONI, M. *et al.* SARS-CoV-2 and COVID-19: A genetic, epidemiological, and evolutionary perspective. **Infection, genetics and evolution**, v. 84, p. 104384, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2020.104384>. Acesso em: 19 jan. 2025.

SPANHEL, L.; ANDERSON, M. A. Semiconductor clusters in the sol-gel process: quantized aggregation, gelation, and crystal growth in concentrated zinc oxide colloids. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 113, n. 8, p. 2826-2833, 1991. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/ja00008a004>. Acesso em: 11 mar. 2025.

TALAPKO, J. *et al.* Candida albicans—the virulence factors and clinical manifestations of infection. **Journal of Fungi**, v. 7, n. 2, p. 79, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/jof7020079>. Acesso em: 27 jan. 2025.

TRYFON, P. *et al.* Coated Cu-doped ZnO and Cu nanoparticles as control agents against plant pathogenic fungi and nematodes. **NanoImpact**, v. 28, p. 100430, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.impact.2022.100430>. Acesso em: 12 mai. 2025.

VEERABHADRAIAH, S. R.; MAJI, S.; PANNEERSELVAM, A. Solvent influence on the formation of ZnO nanoparticles by sonochemical technique and evaluation of UV-blocking efficiency. **Journal of Crystal Growth**, v. 579, p. 126430, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jcrysgro.2021.126430>. Acesso em: 15 jan. 2025.

VINCENT, M. *et al.* Contact killing and antimicrobial properties of copper. **Journal of applied microbiology**, v. 124, n. 5, p. 1032-1046, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/jam.13681>. Acesso em: 21 mar. 2025.

WOLFGRUBER, S. *et al.* Antiviral activity of zinc oxide nanoparticles against SARS-CoV-2. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 9, p. 8425, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijms24098425>. Acesso em: 11 mai. 2025.

YOGAMALAR, R. *et al.* X-ray peak broadening analysis in ZnO nanoparticles. **Solid State Communications**, v. 149, n. 43-44, p. 1919-1923, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ssc.2009.07.043>. Acesso em: 23 set. 2025.

ZHANG, Y. *et al.* A bacterial artificial chromosome (BAC)-vectored noninfectious replicon of SARS-CoV-2. **Antiviral Research**, v. 185, p. 104974, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2020.104974>. Acesso em: 15 mar. 2025.