

Universidade do Minho
Escola de Ciências

Luís Paulo Teixeira Moreira Mendes

Avaliação da atividade antimicrobiana de antibióticos encapsulados em estruturas zeolíticas



Universidade do Minho
Escola de Ciências

Luís Paulo Teixeira Moreira Mendes

**Avaliação da atividade antimicrobiana de
antibióticos encapsulados em estruturaszeolíticas**

Dissertação de Mestrado

Mestrado em Técnicas de Caracterização e Análise Química

Trabalho efetuado sob a orientação das

Professora Doutora Isabel Correia Neves

Professora Doutora Fátima Baltazar

Outubro de 2019

DECLARAÇÃO

Nome: Luís Paulo Teixeira Moreira Mendes

Endereço eletrónico: luispaulo9_gna@hotmail.com Telefone: 913102832

Número do Bilhete de Identidade: 14792639

Título da dissertação: Avaliação da atividade antimicrobiana de antibióticos encapsulados em estruturas zeolíticas

Orientadoras:

Professora Doutora Isabel Correia Neves

Professora Doutora Fátima Baltazar

Ano de conclusão: 2019

Mestrado em Técnicas de Caracterização e Análise Química

DE ACORDO COM A LEGISLAÇÃO EM VIGOR, NÃO É PERMITIDA A REPRODUÇÃO DE QUALQUER PARTE DESTA TESE/TRABALHO.

Universidade do Minho, 18 / 12 / 2019

Assinatura:

Luís Paulo Teixeira Moreira Mendes

AGRADECIMENTOS

Às professoras Isabel Correia Neves, Fátima Baltazar e à Cristina Almeida Aguiar por me terem orientado durante toda esta etapa na minha vida académica. Tenho que agradecer toda a disponibilidade, boa disposição, otimismo e ensaiamentos que sempre me prestaram e transmitiram.

Aos meus colegas de laboratório André Moreira, Rui Sousa, Raquel Bertão e Ana Freitas por todo apoio, solidariedade e boa disposição.

A todos os meus colegas e professores pelos ensinamentos que me fizeram crescer tanto a nível pessoal como a nível académico.

À minha família, amigos e à Cláudia, por toda a paciência, incentivo durante esta longa caminhada.

O meu sincero obrigado a todos!

RESUMO

Recentemente, a nanotecnologia na medicina é um campo novo e empolgante e tem sido vista com um potencial grande no tratamento de doenças, permitindo desenvolver estratégias mais eficientes e eficazes nas infecções bacterianas. Os zeólitos como estruturas de dimensões muito reduzidas têm sido estudados recentemente como meios de transporte/libertação de agentes antimicrobianos, como por exemplo iões metálicos ou antibióticos.

Este trabalho teve como objetivo avaliar a atividade antimicrobiana de antibióticos encapsulados em zeólitos, comparando os valores obtidos para as concentrações mínimas inibitórias, MIC (do inglês *minimum inhibitory concentration*) dos antibióticos com os valores de MIC dos sistemas zeolíticos preparados com os mesmos antibióticos. Foram utilizados dois antibióticos com modos de ação diferente - Tetraciclina (TC) e Penicilina G (PG). Estes dois antibióticos foram encapsulados em dois zeólitos diferentes, o zeólito NaY e o zeólito ZSM5, formando assim cinco sistemas distintos: TC@NaY, TC_{3,3}@NaY, TC@ZSM5, PG@NaY e PG@ZSM5.

Os sistemas preparados foram caracterizados por Análise Termogravimétrica (TGA), Isotérmicas de adsorção N₂, Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR), Microscopia eletrônica de varrimento (SEM) e Espectroscopia de UV/Visível. Concluiu-se que os sistemas que utilizavam o zeólito NaY eram capazes de encapsular maior quantidade de antibiótico que os sistemas com o zeólito ZSM5 e, quando se realizou a encapsulação em meio ácido com o NaY, verificou-se uma maior retenção do antibiótico TC.

A atividade antibacteriana dos sistemas atrás referidos, bem como dos zeólitos e dos antibióticos, foi avaliada contra microrganismos Gram-positivos - *Staphylococcus aureus* sensível a Meticilina (MSSA, do inglês *Methicillin-sensitive Staphylococcus aureus*), *Staphylococcus aureus* resistente a Meticilina (MRSA, do inglês *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus*) e *Propionibacterium acnes* (*P. acnes*), e microrganismos Gram-Negativos, *Escherichia coli* (*E. coli*) e *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*). Constatou-se haver uma maior resistência de MRSA e de *P. aeruginosa* aos antibióticos do que dos restantes microrganismos. Apesar dos sistemas exibirem atividade, os valores de MIC obtidos para os sistemas foram superiores aos valores de MIC dos antibióticos isolados.

PALAVRAS-CHAVE

Zeólitos, Antibióticos, Atividade antimicrobiana, bactérias multirresistentes.

ABSTRACT

Recently, nanotechnology in medicine is a new and exciting field and has been seen with great potential for treating diseases effectively, developing more efficient strategies for bacterial infections. Zeolites as very small pore structures have recently been studied as means of transporting/releasing antimicrobial agents such as metal ions and antibiotics.

The objective of this work was to evaluate the antimicrobial activity of encapsulated antibiotics in zeolites by comparing the values obtained from the minimum inhibitory concentration (MIC) with the MIC values of the systems prepared with the same antibiotics. Two antibiotics with different modes of action were used, Tetracycline (TC) and Penicillin G (PG). These two antibiotics were encapsulated in two different zeolites, the NaY zeolite and the ZSM5 zeolite, thus forming five distinct systems: TC @ NaY, TC_{3.3}@ NaY, TC@ ZSM5, PG @ NaY and PG @ ZSM5. The prepared systems were characterized by Thermogravimetric Analysis (TGA), N₂ Adsorption Isotherms, Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR), Scanning Electron Microscopy (SEM) and UV/Visible Spectroscopy. It was concluded that systems using NaY zeolite were able to encapsulate more antibiotic than systems with ZSM5 zeolite, and when encapsulating in acid medium with NaY, there was a more retention of TC antibiotic.

The antimicrobial activity of the systems, as the zeolites and antibiotics, was evaluated against Gram-positive microorganisms Methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus* (MSSA), Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and *Propionibacterium acnes* (*P. acnes*), and Gram-negative microorganisms, *Escherichia coli* (*E. coli*) and *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*). A higher resistance of MRSA and *P. aeruginosa* to antibiotics was concluded than the other microorganisms. Although the systems exhibited activity, the MIC values obtained for the systems were higher than the MIC values of the antibiotics alone.

KEYWORDS

Zeolites, Antibiotics, Antimicrobial Activity, Multiresistant Bacteria.

ÍNDICE

Agradecimentos	v
Resumo	vii
Abstract	ix
Índice de Figuras.....	xiii
Índice de Tabelas	xvii
Lista de Abreviaturas, Siglas e Acrónimos.....	xix
Capítulo 1 – Revisão Bibliográfica	1
1- Revisão Bibliográfica	2
1.1- Antibióticos.....	2
1.1.1- Penicilina G	3
1.1.2- Tetraciclina	6
1.2- Zeólitos.....	12
1.2.1- Zeólito NaY.....	15
1.2.2- Zeólito ZSM5	16
Capítulo 2 – Parte Experimental	19
2- Parte Experimental	20
2.1- Preparação das Amostras	20
2.2- Caracterização dos Sistemas	20
2.2.1- Análise Termogravimétrica (TGA)	20
2.2.2- Isotérmicas de adsorção de N ₂	22
2.2.3- Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)	22
2.2.4- Microscopia eletrônica de varrimento (SEM).....	23
2.2.4- Espectroscopia UV/Visível	25
2.3- Avaliação da atividade antimicrobiana.....	27
2.3.1 Microrganismos	27
2.3.2 Meios de cultura e manutenção de culturas microbianas	27
2.3.3- Ensaio para avaliar a atividade antimicrobiana	28
Capítulo 3 – Apresentação e Discussão dos Resultados	32

3- Apresentação e Discussão dos Resultados	33
3.1- Caracterização das Amostras.....	33
3.1.1- Análise Termogravimétrica (TGA)	33
3.1.2- Isotérmicas de Adsorção N ₂	35
3.1.3- Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)	36
3.1.4- Microscopia eletrônica de varrimento (SEM).....	40
3.1.5- Espectroscopia UV/visível	44
3.2- Avaliação da atividade antimicrobiana.....	46
Capítulo 4 – Conclusões e Trabalho Futuro	49
Capítulo 5 – Referências Bibliográficas.....	52
5- Referências Bibliográficas.....	53

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura Química da Benzilpenicilina (PG). A Benzilpenicilina ($C_{16}H_{18}KN_2O_4S$) tem massa molar 372,48 g/mol (adaptado de Drugbank).....	4
Figura 2 - Mecanismo de ação da Penicilina G. A presença da PG na parede celular das bactérias faz com que as PBP não catalisem a formação de ligações entre os péptidos. A PG forma uma ligação covalente irreversível com a enzima (Imagem adaptada de Lobanovska & Pilla, 2017).....	5
Figura 3 - Estrutura Química da Tetraciclina (TC). A Tetraciclina ($C_{22}H_{24}N_2O_8$) tem massa molar 444,43 g/mol (adaptado de Drugbank)	6
Figura 4 - Mecanismo de ação da tetraciclina. A presença da TC dentro da célula bacteriana impede a ligação do tRNA aminoacil com o ribossoma bacteriano (adaptado do site "Mechanism of Action – Tetracycline").	7
Figura 5 - Mecanismos de resistência à Tetraciclina. A) Bactérias adquirem um gene resistente que faz com que a célula retire TC de forma mais rápida do que as moléculas de TC que entram para o interior da célula; B) A TC é modificada para uma forma inativada que faz com que a molécula seja retirada do interior da célula livremente; C) As bactérias adquirem um gene resistente que faz com que os ribossomas continuem a síntese proteica mesmo na presença de altas concentrações de TC no interior da célula. Imagem adaptada de Speer et al., 1992)	8
Figura 6 - Estrutura da parede celular das bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Imagem adaptada de Kapoor et al., 2017)	9
Figura 7 - Estrutura química do zeólito. A – Esquema da estrutura primária do zeólito (PBU) onde se observa a estrutura composta por TO_4 , em que T é um átomo de Silício ou de Alumínio ligado a quatro átomos de Oxigénio. B – Representação da ligação química entres os tetraedros nos zeólitos. Imagem adaptada de EMgbemere et al., 2017)	13
Figura 8 - Unidades secundárias dos zeólitos (SBU). Possíveis estruturas das unidades secundárias dos zeólitos. Imagem adaptada de Baerlocher et al., 2001)	14
Figura 9 - Estrutura do zeólito Y. O zeólito NaY é composto por unidades sodalite que, quando ligadas entre si, formam um poro de diâmetro 0,74 nm. Imagem adaptada de Weitkamp, 2000)	16
Figura 10 - Estrutura do zeólito ZSM5. O zeólito ZSM5 é composto por unidades pentasil que, quando ligadas entre si, formam dois tipos de canais: canais lineares (em que os poros possuem dimensões 0,56 x 0,53 nm) e canais sinusoidais (com poros de dimensões 0,55 x 0,51 nm). Imagem adaptada de Weitkamp, 2000).....	17

Figura 11 – Curva de TGA: variação da massa em função da Temperatura. Imagem adaptada de Ahmedzeki et al., 2016)	21
Figura 12 – Constituição de um microscópio eletrônico de varrimento. O microscópio eletrônico de varrimento é dividido em três secções: a coluna eletrónica, onde são gerado os eletrões, a câmara de amostra, onde se encontra a amostra e onde existe o contacto dos eletrões com amostra, e a secção do computador ou controlo eletrónico, responsável pelo controlo das condições de análise e da apresentação da imagem da análise. Imagem adaptada de Ul-Hamid, 2018).....	24
Figura 13 – Esquema de um espectrómetro de UV/Visível. É produzida radiação através da fonte luminosa. Essa radiação após ser difratada, atravessa o monocromador que seleciona o comprimento de onda a que esta radiação vai atravessar a amostra e o material utilizado como referência. Imagem adaptada de Nilapwar et al, 2011)	26
Figura 14 – Método de diluição em Agar. Após preparadas as placas com meio LBA e antibiótico, são adicionadas gotas de 5 µL de uma cultura de cada microrganismo, em duplicado. Após a incubação a 37 °C durante 24 h verifica-se a presença ou ausência de crescimento microbiano.....	29
Figura 15 – Termogramas obtido pela análise TGA. Termogramas obtidos para as amostras utilizadas durante este trabalho. As amostras foram aquecidas desde 50 até 700 °C com um aumento de temperatura de 10 °C/ min.....	33
Figura 16 – Espectros FTIR dos zeólitos. NaY (A) e ZSM5 (B)	37
Figura 17 – Espectros FTIR dos antibióticos: A) Tetraciclina e B) Penicilina G. Imagem adaptada de NIST).	38
Figura 18 - Espectros FTIR dos sistemas com o antibiótico TC: A) TC@ZSM5; B) TC _{3,3} @NaY e C) TC@NaY.	39
Figura 19 – Espectros FTIR dos sistemas com o antibiótico PG: A) PG@ZSM5 e B) PG@NaY.	39
Figura 20 – Imagens obtidas pela análise SEM dos zeólitos NaY e ZSM5	40
Figura 21 – Imagens obtidas pela análise SEM dos sistemas TC@NaY e TC_{3,3}@NaY: A) sistema TC@NaY onde se observa a presença dos cristais do antibiótico TC e B) sistema TC _{3,3} @NaY onde não se observa a presença dos cristais de TC	41
Figura 22 – Imagens obtidas pela análise SEM do sistema TC@ZSM5	41
Figura 23 – Imagens obtidas pela análise SEM dos sistemas: A) PG@NaY e B) PG@ZSM5	42
Figura 24 – Espectros de EDX para as várias amostras preparadas no presente trabalho: A) TC@NaY; B) TC _{3,3} @NaY; C) TC@ZSM5; D) PG@NaY e E) PG@ZSM5	43

Figura 25 – Curvas de saída do antibiótico TC in vitro do sistema TC_{3,3}@NaY medidas por espectroscopia UV/Vis a 276 nm A) solvente PBS ou B) H₂O Ultrapura. 45

Figura 26 – Curvas de saída nos estudos de liberação do antibiótico TC in vitro medidos por espectroscopia UV/Vis a 357 nm. A) do sistema TC_{3,3}@NaY utilizando o solvente PBS e B) do sistema TC_{3,3}@NaY utilizando H₂O Ultrapura. 46

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 – Tipos de mecanismos de ação dos antibióticos, alvo celular e alguns exemplos	2
Tabela 2 – Classificação dos zeólitos de acordo com o tamanho do poro	15
Tabela 3 – Características das estirpes utilizadas	27
Tabela 4 – Formulação do meio LBA por cada 1 litro de H ₂ O	28
Tabela 5 – Gamas de concentração, assim como os seus incrementos, utilizados nos ensaios antimicrobianos para os dois antibióticos	29
Tabela 6 – Gamas de concentração utilizadas na avaliação da atividade antimicrobiana dos antibióticos encapsulados nos zeólitos NaY e ZSM5. As gamas de concentração foram utilizadas para ambos os sistemas com o mesmo antibiótico.	30
Tabela 7 – Gamas de concentração utilizadas na avaliação da atividade antimicrobiana dos antibióticos encapsulados nos zeólitos NaY e ZSM5. As gamas de concentração com valores superiores ao MIC foram utilizadas para ambos os sistemas com o mesmo antibiótico.	31
Tabela 8 – Resultados da análise TGA, nomeadamente a perda de massa total (%) dos sistemas, a massa de antibiótico encapsulada por cada sistema (mg) e a percentagem de encapsulamento (%).	34
Tabela 9 – Propriedades estruturais dos zeólitos e das amostras com antibióticos encapsulados obtidas por análise de Isotérmicas de Adsorção	35
Tabela 10 – Análise de EDX das amostras estudadas dada em massa (%)	43
Tabela 11 – Valores de MIC obtidos para os antibióticos Tetraciclina e Penicilina G	47
Tabela 12 – Valores MIC obtidos para os sistemas preparados no presente trabalho	48

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E ACRÓNIMOS

BET (Brunauer, Emmett e Teller)

BJH (Barret-Joyner-Halenda)

DNA (do inglês, *deoxyribonucleic acid*)

DO (Densidade ótica)

E. coli (*Escherichia coli*)

EDX (do inglês, *energy dispersive X-ray*)

FAU (*Faujasite*)

FTIR (Especetroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier)

IZA (do inglês, *International Zeolite Association*)

LB (*Lysogeny Broth*)

MFI (do inglês *Mordenite Framework Inverted*)

MIC (do inglês, *minimum inhibitory concentration*)

MRSA (do inglês *Methicilin-Resistant Staphylococcus aureus*)

MSSA (do inglês, *Methicilin-Sensitive Staphylococcus aureus*)

NAG (N-acetilglucosamina)

NAM (ácido N-acetilmurânico)

OMS (Organização Mundial de Saúde)

P. acnes (*Propionibacterium acnes*)

P. aeruginosa (*Pseudomonas aeruginosa*)

PBP's (do inglês *penicillin binding proteins*)

PBS (do inglês *phosphate-buffered saline*)

PBU (do inglês *primary building units*)

PG (Penicilina G)

RNA (do inglês, *ribonucleic acid*)

S. aureus (*Staphylococcus aureus*)

S_{BET} (área total da superfície do zeólito)

SBU (do inglês *secondary building units*)

SEM (do inglês, *Scanning Electron Microscopy*)

S_{meso} (áreas superficiais mesoporosas)

TC (Tetraciclina)

TGA (Análise Termogravimétrica)

V_{micro} (volume dos microporos)

CAPÍTULO 1 - REVISÃO
BIBLIOGRÁFICA

1- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Neste capítulo, todos os conceitos teóricos necessários para uma compreensão do trabalho serão explicados com base nas informações disponíveis na literatura. Os antibióticos e as resistências ao seu modo de ação serão descritos. Serão abordados os zeólitos como estruturas cristalinas para a encapsulação dos antibióticos enquanto sistemas de transporte de medicamentos. Serão apresentados os conceitos gerais de zeólitos e suas aplicações, com mais ênfase no tipo de estrutura faujasite e MFI, estruturas específicas dos zeólitos selecionados, no presente trabalho, como hospedeiros para os sistemas de transporte de medicamentos.

1.1- Antibióticos

As doenças infecciosas têm afetado a humanidade desde os seus primórdios. A descoberta de antibióticos gerou um otimismo em relação ao combate às infecções, trazendo esperança na erradicação e prevenção das mesmas (Kapoor et al., 2017). O aparecimento dos antibióticos foi visto como um avanço crucial na primeira metade do século 20, pela sua eficácia no tratamento de infecções provocadas por bactérias. Antes da descoberta e desenvolvimento dos antibióticos, produtos naturais como cogumelos e leveduras de cerveja eram utilizados para o tratamento de infecções. Depois começaram a isolar-se compostos produzidos por microrganismos, utilizados pelos próprios para a sua sobrevivência, e que revelaram propriedades benéficas para o tratamento de infecções. O primeiro antibiótico a ser descoberto foi a penicilina, por Alexander Fleming (Mohr, 2012). A partir dessa descoberta iniciou-se a era dos antibióticos. A penicilina começou a ser produzida industrialmente. A penicilina começou também a ser modificada com a adição de compostos à molécula, fazendo com que surgissem assim os antibióticos sintéticos com uma eficácia superior aos antibióticos naturais. (Mohr, 2012; Nicolaou & Rigol, 2018) Com o seu rápido desenvolvimento, os antibióticos proporcionaram uma arma mais eficaz contra as infecções bacterianas, causando poucos efeitos secundários no paciente (Zaman et al., 2017).

Os antibióticos podem ser divididos em relação ao seu modo de ação sobre as bactérias: antibióticos que inibem a síntese da parede celular, antibióticos que atuam na síntese do ácido nucleico e por fim antibióticos que interferem com a síntese de proteínas (Kapoor et al., 2017). Dentro dos antibióticos que inibem a síntese da parede celular, existem antibióticos que atuam em diferentes modos. Os antibióticos Beta-lactams têm como principal alvo as PBP's (do inglês *penicillin binding proteins*) levando a que não exista a formação de novas moléculas peptidoglicano levando à lise da bactéria enquanto existem outros

antibióticos que atuam sobre a membrana celular. Relativamente aos antibióticos que interferem com a síntese dos ácidos nucleicos, existem antibióticos que atuam sobre a RNA (do inglês, *ribonucleic acid*) polimerase, assim como antibióticos que interferem na DNA (do inglês, *deoxyribonucleic acid*) girase impedindo que a mesma introduza superenrolamentos negativos na molécula de DNA. Quanto aos antibióticos que atuam sobre a síntese proteica, alguns atuam sobre as subunidades 50S e outros ao nível das subunidades 30S dos ribossomas, em ambos os casos causam erros de leitura da sequência causando uma interrupção prematura da tradução do RNA mensageiro (Kapoor et al., 2017). Na **Tabela 1**, apresentam-se os vários mecanismos de ação dos antibióticos assim como alguns exemplos.

Tabela 1 – Tipos de mecanismos de ação dos antibióticos, alvo celular e alguns exemplos.

Mecanismo de Ação	Alvo Celular	Antibiótico
Síntese da parede celular	Beta-lactams	Penicilina
		Polimixinas
	Membrana celular	Polimixinas
Síntese do ácido nucleico	RNA Polimerase	Rifanpicinia
	DNA Girase	Quinolones
	Síntese do Folato	Sulfonamidas
Síntese de proteínas	Subunidade 50S	Clindamicina
	Subunidade 30S	Tetraciclina

Antibióticos como a Penicilina G e a Tetraciclina são geralmente utilizados para o combate de infecções e doenças associadas a estes microrganismos. Neste trabalho utilizaram-se estes dois antibióticos para preparar sistemas de transporte de medicamentos.

1.1.1- Penicilina G

Um dos mais antigos e mais estudados antibióticos é a Penicilina. Este antibiótico foi descoberto por Alexander Fleming no início do Século XX. Fleming evidenciou que o fungo *Penicillium notatum* produzia uma substância capaz de inibir o crescimento de *S. aureus*. Apesar de ter sido descoberta em 1928, apenas após a segunda guerra mundial é que foi introduzida no mercado (Gaynes, 2017; Miller, 2002; Nathwani & Wood, 1993). A substância produzida por *Penicillium notatum* era constituída por uma mistura de vários tipos de Penicilina, como o tipo F, K, X e G. Este último tipo de Penicilina, Penicilina G

(PG) é o composto mais ativo dos produzidos pelo fungo e é também conhecido como Benzilpenicilina ($C_{16}H_{18}KN_2O_4S$) (**Figura 1**) (Nathwani & Wood, 1993).

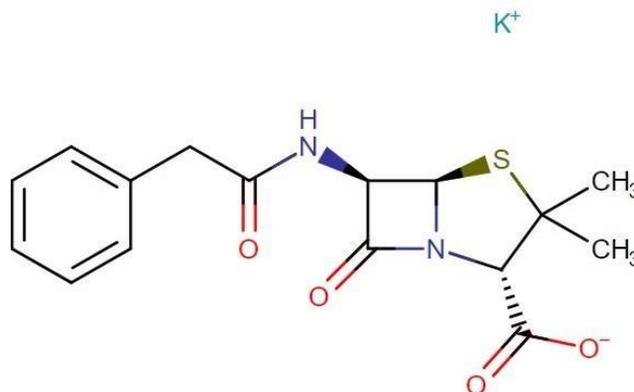


Figura 1 - Estrutura Química da Benzilpenicilina (PG). A Benzilpenicilina ($C_{16}H_{18}KN_2O_4S$) tem massa molar 372,48 g/mol (adaptado do site Drugbank).

O aparecimento deste fármaco foi considerado como o grande impulsionador da evolução da Ciência Farmacêutica no século XX (Gaynes, 2017; Miller, 2002). As penicilinas estão divididas em cinco categorias: as penicilinas naturais, penicilinas resistentes a penicilinase, aminopenicilinas, penicilinas de espectro alargado e combinações de inibidores de β -lactamase e aminopenicilinas (Doi & Chambers, 2014; Miller, 2002). As penicilinas resistentes à penicilinase são penicilinas produzidas sinteticamente, onde a molécula de penicilina é modificada com a adição de uma cadeia lateral que previne a penicilinase, produzida por exemplo por microrganismos do género *Staphylococcus*, de se ligar à molécula de penicilina e quebrar o anel beta-lactam (Miller, 2002). As aminopenicilinas são o grupo de penicilinas que começaram a ter atividade contra bactérias Gram-negativas. Estas penicilinas tem um grupo amino adicionado à Benzilpenicilina, o que produz a Ampicilina (Miller, 2002). As penicilinas de espectro alargado são moléculas de ampicilinas modificadas e são geralmente utilizadas para combater infeções de *P. aeruginosa* (Miller, 2002). O último grupo, as combinações de inibidores β -lactamase e as aminopenicilinas atuam de duas formas distintas, através da ligação do local ativo da enzima β -lactamase prevenindo que o anel β -lactam se ligue, ou aumentando a afinidade das PBP da bactéria para a molécula de penicilina facilitando assim a destruição da parede celular (Doi & Chambers, 2014; Miller, 2002).

A PG tem uma ação eficaz contra um grande espectro de microrganismos sendo altamente ativo contra bactérias Gram-positivas (Doi & Chambers, 2014; Nathwani & Wood, 1993). Nos seres humanos, este fármaco pode ser administrado intravenosamente ou através de injeções intramusculares (Doi &

Chambers, 2014; Nathwani & Wood, 1993), sendo usado pra infecções da garganta, de ouvido, infecções intestinais assim como meningite e pneumonia.

A PG é bastante eficaz contra patógenos Gram-positivos devido ao seu mecanismo de ação: a inibição da síntese da parede celular (Doi & Chambers, 2014; Yocum, Rasmussen, & Strominger, 1980) composta por peptidoglicano. O peptidoglicano é composto por um monômero dissacarídeo de N-acetilglucosamina (NAG) e ácido N-acetilmurâmico (NAM) (Doi & Chambers, 2014). Esta inibição ocorre quando a PG se liga às enzimas que produzem as proteínas PBP (**Figura 2**), impedindo a sua produção, o que leva a que a parede celular sofra a ação de enzimas autolíticas causando a lise da bactéria (Miller, 2002).

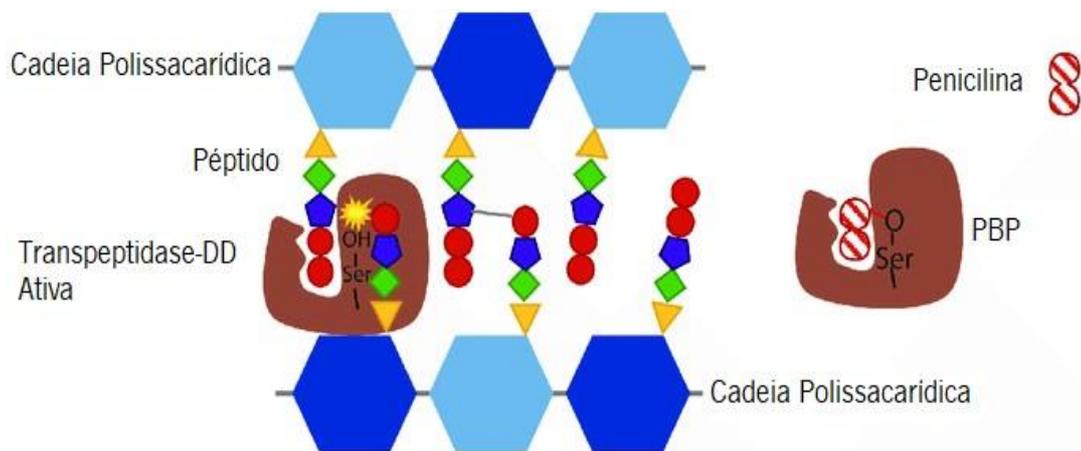


Figura 2 - Mecanismo de ação da Penicilina G. A presença da PG na parede celular das bactérias faz com que as PBP não catalisem a formação de ligações entre os péptidos. A PG forma uma ligação covalente irreversível com a enzima (Imagem adaptada de Lobanovska & Pilla, 2017).

Apesar da PG ser eficaz contra certos microrganismos, a sua elevada utilização quer em estudos quer como fármaco para o tratamento de infecções, induziu o aparecimento de resistência a este antibiótico. Surgiram estirpes de vários microrganismos mais resistentes à PG através da produção de penicilinases (Lobanovska & Pilla, 2017). Outro dos problemas que surgiu com o aumento da utilização da PG foi o aparecimento de reações alérgicas e respostas hipersensíveis por parte dos pacientes (Miller, 2002).

1.1.2- Tetraciclina

Um dos antibióticos utilizados para o combate a infecções de microrganismos Gram-negativos é a Tetraciclina (TC) (**Figura 3**). Este antibiótico surgiu nos anos 40 do século passado, tem um elevado espectro de ação e é bastante utilizado para tratar infecções nos seres humanos e em animais (Following & Therapy, 2001; Nelson & Levy, 2011). A TC é também utilizada no sector agrícola para eliminar microrganismos que possam perturbar o natural crescimento das culturas (Daghrir & Drogui, 2013). Uma das grandes vantagens deste antibiótico reside no seu reduzido custo de produção, tornando esta classe de antibióticos uma das mais acessíveis financeiramente (Daghrir & Drogui, 2013).

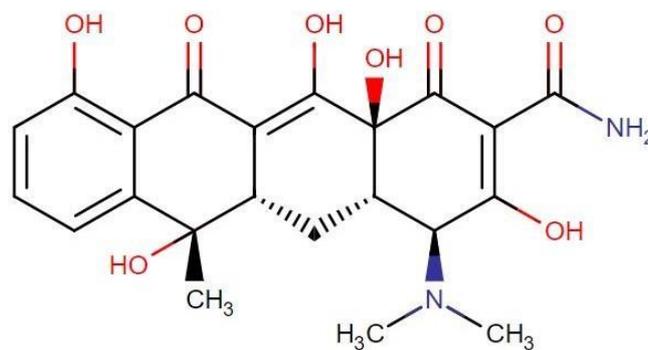


Figura 3 – Estrutura Química da Tetraciclina (TC). A Tetraciclina (C₂₂H₂₄N₂O₈) tem massa molar 444,43 g/mol (adaptado de Drugbank).

A TC é amplamente utilizada na medicina veterinária para tratar infecções gastrointestinais, respiratórias e de pele provocadas por bactérias. No ser humano, é mais utilizada para tratamento de infecções respiratórias como a pneumonia, mas na última década tem sido verificado um aumento da sua utilização para o combate da malária (Daghrir & Drogui, 2013; Following & Therapy, 2001).

A TC é responsável pela inibição da síntese proteica das bactérias. O antibiótico previne a associação do aminoacil-tRNA com o local A do ribossoma bacteriano (**Figura 4**) (Following & Therapy, 2001; Speer, Shoemaker, & Salyers, 1992).

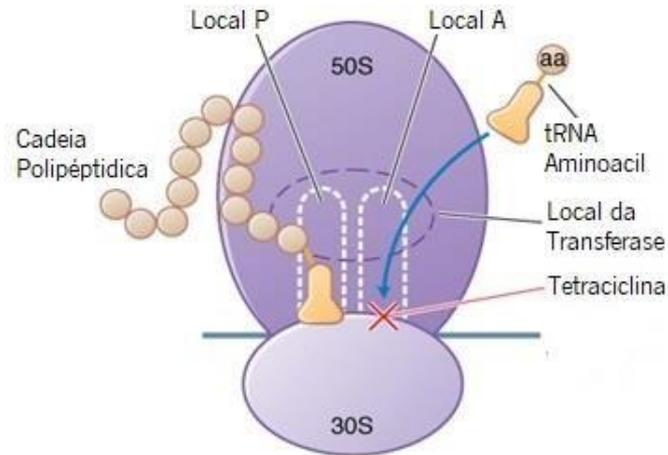


Figura 4 - Mecanismo de ação da tetraciclina. A presença da TC dentro da célula bacteriana impede a ligação do tRNA aminoacil com o ribossoma bacteriano (adaptado do site (“Mechanism of Action - Tetracycline”)).

Com o aumento da utilização da TC, os microrganismos começaram a adquirir resistência a este antibiótico. Esta resistência deve-se à aquisição genética dos genes *tet* (Following & Therapy, 2001). A resistência à TC pode surgir através de diferentes mecanismos como o efluxo de TC, proteção do local de ligação da tetraciclina com a ligação de proteínas citoplasmáticas específicas ao ribossoma e através da produção de enzimas inibidoras de TC, **Figura 5** (Li et al., 2013; Speer et al., 1992).

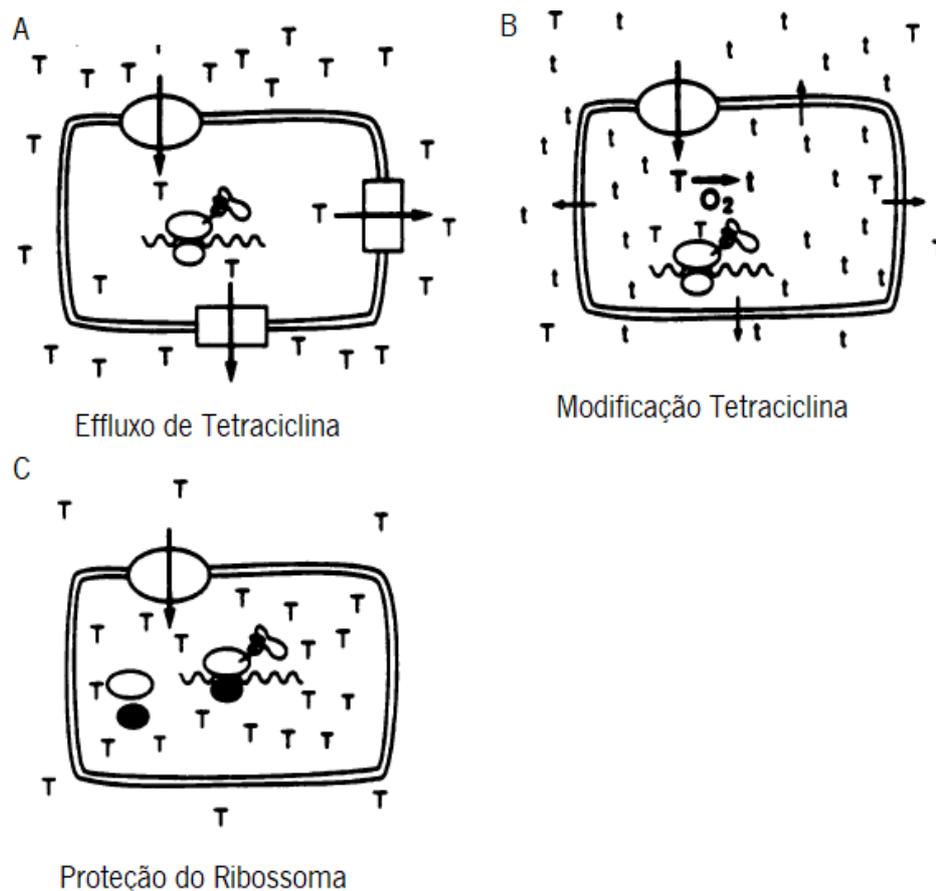


Figura 5 – Mecanismos de resistência à Tetraciclina. A) Bactérias adquirem um gene resistente que faz com que a célula retire TC de forma mais rápida do que as moléculas de TC que entram para o interior da célula; B) A TC é modificada para uma forma inativada que faz com que a molécula seja retirada do interior da célula livremente; C) As bactérias adquirem um gene resistente que faz com que os ribossomas continuem a síntese proteica mesmo na presença de altas concentrações de TC no interior da célula. Imagem adaptada de Speer et al., 1992).

Com o aumento da utilização de antibióticos, começaram a surgir complicações nos pacientes. Os antibióticos começaram a ser menos eficazes contra as bactérias responsáveis pelas infecções, devido a estas começarem a adquirir resistência aos fármacos (Aslam et al., 2018; Goleman, 2019; Mckee, 2019). Estas resistências que os microrganismos começaram a adquirir, e que podem surgir naturalmente nos microrganismos mas de um modo muito mais lento, deveu-se a vários fatores como, por exemplo, a facilidade de acesso aos fármacos nos países conhecidos como desenvolvidos, assim como más condições higiénicas que permitem a transmissão das estirpes resistentes com maior facilidade ou ausência de fundos disponíveis para o desenvolvimento da eficácia dos fármacos (Aslam et al., 2018). A má utilização dos antibióticos, interrupção do tratamento antes da data prevista pelo

médico, assim como o abuso da utilização dos mesmos levou a que algumas infecções como pneumonia, tuberculose e gonorreia, algumas até consideradas erradicadas, sejam cada vez mais difíceis de tratar e, em alguns casos até, causar a morte do paciente (World Health Organization, 2018).

A Organização Mundial de Saúde (OMS) acredita que a resistência a antibióticos pode ser atenuada se existir um comportamento correto dos diversos setores da sociedade. A população deve utilizar os antibióticos de forma correta para tratar as infecções, apenas como e quando prescritos por entidades médicas adequadas. A indústria farmacêutica - apesar de ter atravessado uma era dourada durante os anos 1930 e 1960, onde existiu uma grande evolução no desenvolvimento de uma vasta quantidade e diversidade de antibióticos - devia voltar a investir os seus recursos no desenvolvimento de novos antibióticos e vacinas, assim como em novos métodos de diagnóstico (Aslam et al., 2018; World Health Organization, 2018). A resistência das bactérias aos antibióticos tem sido um desafio para os cientistas no sentido de desenvolver novas estratégias para colmatar este problema.

As bactérias são divididas em dois grupos, as bactérias Gram-positivas e as bactérias Gram-negativas (**Figura 6**) tendo em conta a estrutura da sua parede celular.

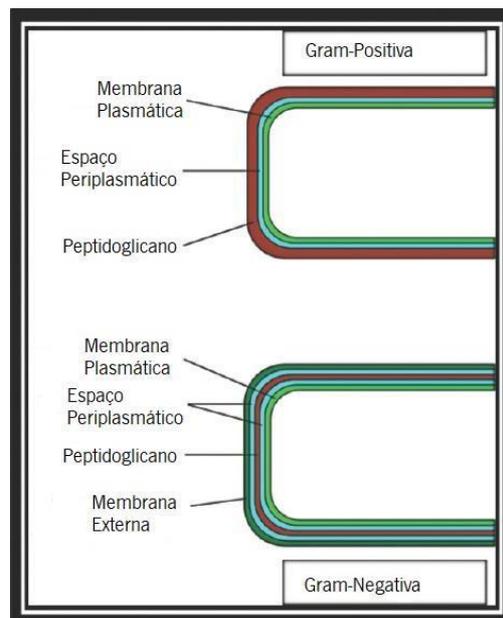


Figura 6 – Estrutura da parede celular das bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Imagem adaptada de Kapoor et al., 2017).

A principal distinção entre bactérias Gram-positivas e Gram-negativas está As bactérias Gram-positivas possuem uma camada mais espessa de peptidoglicano na sua parede celular, externamente à sua

membrana plasmática, comparativamente às bactérias Gram-negativas. No entanto, estas obtêm uma proteção extra em relação às bactérias Gram-positivas devido à presença, na sua parede celular, de uma membrana externa composta por lípidos, proteínas e polissacarídeos (Moon, 2019).

Staphylococcus aureus (*S. aureus*) e *Propionibacterium acnes* (*P. acnes*) são exemplos de bactérias Gram-positivas e foram utilizadas no presente trabalho. *S. aureus* é amplamente conhecido por provocar infecções em humanos assim como em animais. As infecções provocadas em animais, principalmente animais de consumo alimentar, fazem com que os microrganismos sejam transmitidos para os seres humanos independentemente do grupo etário (Matynia, et al., 2005; Rubin, et al., 2011). Este microrganismo é um patógeno oportunista com um complexo grau de virulência. Grande parte das doenças provocadas por *S. aureus* são provocadas por toxinas, e a vida de contaminação mais comum dá-se pela ingestão de comida contaminada (Foster & Geoghegan, 2015; Lowy, 1998). As infecções por *S. aureus* estão geralmente associadas a problemas de pele, respiratórios e a problemas na constituição óssea do hospedeiro (Lowy, 1998). Atualmente conhecem-se estirpes desta bactéria resistentes a vários antibióticos sendo a mais conhecida *Staphylococcus aureus* resistente a metilina (vulgarmente conhecido como MRSA, do inglês *Methicilin-Resistant Staphylococcus aureus*) (Knox, et al., 2015).

Um dos antibióticos amplamente utilizado para estas infecções é a penicilina. Apesar dos antibióticos derivados da penicilina serem bastante eficazes no tratamento de infecções provocadas por *S. aureus*, a estirpe MRSA faz com que esses mesmos antibióticos não tenham um efeito tão eficaz devido às propriedades multirresistentes do microrganismo (Han et al., 2016; Lowy, 1998). Este microrganismo adquiriu resistência devido à alteração das proteínas PBP. As proteínas PBP estão associadas ao gene *mecA* e alteração desse gene faz com que os antibióticos tenham menos afinidade às PBP (Peacock & Paterson, 2015).

P. acnes está geralmente presente na pele humana, cavidade oral, conjuntiva, trato intestinal e canal externo auditivo (Oprica et al., 2005; Perry & Lambert, 2011). As infecções provocadas por *P. acnes* surgem geralmente em indivíduos cujas defesas estão comprometidas e em recém-nascidos (Oprica et al., 2005). Tal como *S. aureus*, *P. acnes* é sensível a antibióticos derivados da penicilina, como a Penicilina G (benzilpenicilina) (Crane, et al., 2013; Oprica et al., 2005), que atuam na síntese da parede celular.

Para além das bactérias Gram-positivas, foram usadas também neste trabalho bactérias Gram-negativas como *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) e *Escherichia coli* (*E. coli*). *P. aeruginosa*, descoberta em 1882, é um dos microrganismos clínicos mais estudados nos últimos tempos. É responsável por cerca de 10 a 20% das infecções que surgem em hospitais (Jenny & Kingsbury, 2018; Rocha et al., 2019).

É considerado um microrganismo oportunista pois exprime-se facilmente em hospedeiros cujo sistema imunitário está em baixo, sendo capaz de causar infeções crónicas ou mesmo mortais (Moradali, et al., 2017).

E. coli, um dos microrganismos mais conhecidos, encontra-se naturalmente no aparelho digestivo do ser humano. É bastante utilizado em estudos biológicos pelo seu rápido crescimento. Existe uma variedade enorme de estirpes de *E. coli* que não são prejudiciais à saúde, no entanto, existem algumas estirpes que podem causar graves infeções como intoxicações alimentares (World Health Organization, 2018). Quando existem análises ao controlo de qualidade de águas, a presença de *E. coli* é um dos parâmetros avaliados (Jang et al., 2017). Quando causa infeção, geralmente há infeção sanguínea e infeção do aparelho urinário do hospedeiro (Vila et al., 2016). Este microrganismo começou a ganhar resistência a certos fármacos como é o caso da Ampicilina assim como da Tetraciclina (Poirel et al., 2018; Vila et al., 2016).

A OMS publicou em fevereiro de 2017 uma lista de bactérias consideradas altamente prejudiciais para o ser humano e para as quais há necessidade de desenvolvimento de novos antibióticos para combater as infeções que provocam. Dividiu a lista de bactérias em três grupos conforme a necessidade de aparecimento de novos antibióticos: crítica, alta e média prioridade. Dentro desses três grupos, duas bactérias foram utilizadas ao longo dos ensaios deste trabalho: *P. aeruginosa* - incluída na categoria da necessidade crítica de desenvolvimento de novos antibióticos - e *S. aureus* considerada como um dos patogénicos com alta prioridade para o desenvolvimento de antibióticos devido à sua resistência à metilina (World Health Organization, 2017).

Uma forma de combater a resistência que os microrganismos começaram a adquirir aos fármacos é a utilização de estruturas porosas que possam protegê-los, os nanomateriais. A utilização de nanomateriais pode complementar a eficácia dos fármacos podendo servir como meio de transporte para o interior da célula bacteriana e, também, como forma de controlar a libertação de fármacos nos locais de infeção (Gupta, et al., 2019; Hemeg, 2017; Wang, et al., 2017). Um dos exemplos da utilização de nanomateriais para tais fins é o trabalho realizado por Bhuvanewari Koneru (Koneru et al., 2015) que utilizou TC encapsulada num composto mesoporoso. Dentro destas estruturas porosas, os zeólitos também podem ser utilizados para o encapsulamento, devido à sua biocompatibilidade (Vilaça, 2013).

1.2- Zeólitos

Os zeólitos pertencem à classe de minerais porosos e foram descobertos pelo mineralogista sueco Crönstedt em 1756, que os descreveu inicialmente como “pedras efervescentes”(Zimmermann & Haranczyk, 2016). O termo zeólito surge como combinação, do grego, de *Zeo* (ferver) e *Lithos* (pedra) (Zimmermann & Haranczyk, 2016). Estes materiais são geralmente utilizados como adsorventes na troca iônica na indústria dos detergentes, são também utilizados no tratamento de desperdício líquido, responsáveis pela separação de produtos puros e são amplamente utilizados na indústria petroquímica como catalisadores. Recentemente, começaram também a ser utilizados na medicina como meios de transporte de agentes antimicrobianos para o interior das células bacterianas (Mgbemere, et al., 2017; Pavelić et al., 2018; Xu, et al., 2010). Uma das grandes vantagens da utilização dos zeólitos é a sua existência como materiais naturais e estáveis em diferentes ambientes (Pavelić, et al., 2018; Xu, et al., 2010). Adicionalmente, começaram a ser produzidos zeólitos sintéticos a partir dos anos 40-50 do século XX (Xu, et al., 2010; Zimmermann & Haranczyk, 2016), que devido a uma maior exigência por parte da indústria em ter zeólitos com uma maior capacidade de retenção, mas também para ajustar algumas das características que os zeólitos como, por exemplo, o tamanho do poro e a sua composição (Bogdanov, et al., 2009; Xu, et al., 2010).

Esta classe de materiais porosos são aluminossilicatos cristalinos. A estrutura dos aluminossilicatos é bem definida e é composta por tetraedros TO_4 , conhecidos como unidades primárias de zeólitos (PBU, do inglês *primary building units*), onde T representa átomos de Sílica (Si^{4+}) como Alumínio (Al^{3+}) e O_4 representa cada átomo de oxigênio partilhado pelos dois átomos T (**Figura 7**) (Mgbemere et al., 2017).

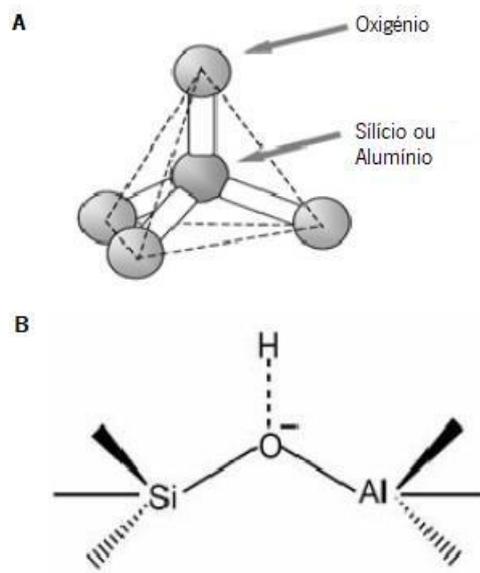


Figura 7 - Estrutura química do zeólito. A – Esquema da estrutura primária do zeólito (PBU) onde se observa a estrutura composta por TO_4 , em que T é um átomo de Silício ou de Alumínio ligado a quatro átomos de Oxigênio. B – Representação da ligação química entres os tetraedros nos zeólitos. Imagem adaptada de (Mgbemere et al., 2017).

As estruturas secundárias do zeólito (SBU, do inglês *secondary building units*) são as que definem o tamanho do zeólito, e estão geralmente associadas a uma quantidade de 16 átomos T (Baerlocher, Olson, & Meier, 2001). A organização destas estruturas gera uma multiplicidade de estruturas tetraédricas (**Figura 8**). A descoberta dos vários tipos de arranjo por parte das estruturas fez com que a *International Zeolite Association* (IZA) catalogasse mais de 150 espécies de zeólitos ("International Zeolite Association Data Base").

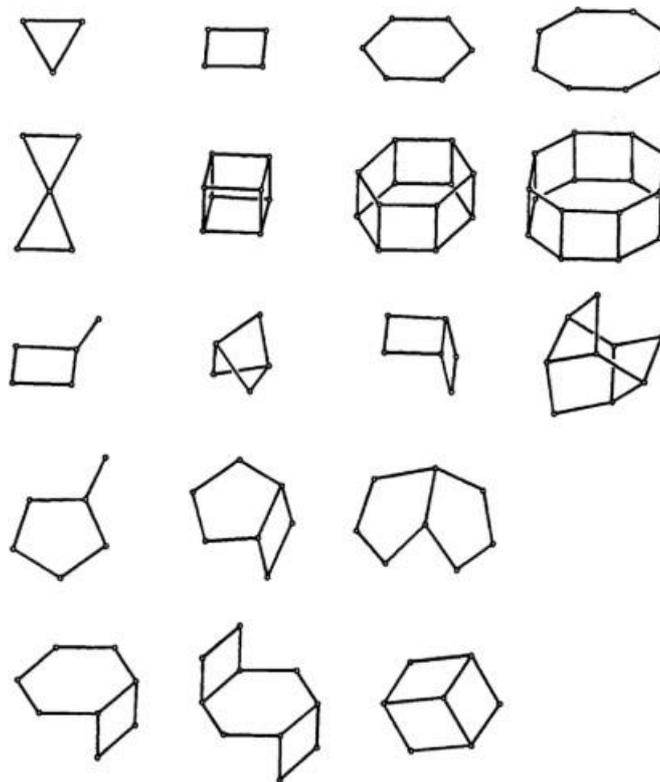


Figura 8 – Unidades secundárias dos zeólitos (SBU). Possíveis estruturas das unidades secundárias dos zeólitos. Imagem adaptada de (Baerlocher et al., 2001).

A fórmula estrutural é baseada na quantidade de óxidos de silício e alumínio presentes na molécula e é representada por:



onde M representa o catião, b representa a carga do catião, c é o número de moléculas de água, a e y representam o número total de unidades tetraédricas presentes no zeólito (E Mgbemere et al., 2017; Vinaches, Bernardo-Gusmão, & Pergher, 2017). O rácio de a e y, entenda-se $[SiO_4]^{4-}$ e $[AlO_4]^{5-}$, tem geralmente um valor entre 1 a 5 (Mgbemere et al., 2017). Os zeólitos podem ser classificados de acordo com a sua microporosidade, distinguindo-se entre zeólitos de poro pequeno, poro médio, poro largo e poro extralargo (**Tabela 2**) (Vinaches et al., 2017).

Tabela 2 – Classificação dos zeólitos de acordo com o tamanho do poro.

Tamanho do Poro	Número de Tetraedros	Diâmetro do Poro (Å)
Pequeno	8	4
Médio	10	5,5
Largo	12	7,5
Extralargo	>12	>7,5

A IZA utiliza um código composto por três letras para descrever a que família pertencem os zeólitos. Neste trabalho foram estudados zeólitos de dois tipos de famílias diferentes: o zeólito NaY da família de código FAU (*Faujasite*) e o zeólito ZSM5 da família de código MFI (do inglês *Mordenite Framework Inverted*).

1.2.1- Zeólito NaY

O zeólito NaY pertence à família de zeólitos *Faujasite* (FAU). Esta família apresenta geralmente uma estrutura química definida por $[(Ca,Mg,Na)_29(H_2O)_{240}][Al_{158}Si_{134}O_{384}]$ (Julbe, et al., 2016; McCusker & Baerlocher, 2005). Este zeólito é produzido sinteticamente e tem diversas aplicações na indústria (Ahmedzeki, et al., 2016), como na petroquímica, estando presente em processos catalíticos e petroquímicos como a transformação de petróleo em gasolina (Ahmedzeki et al., 2016; Taufiqurrahmi, et al., 2011).

Esta família de zeólitos apresenta poros característicos de abertura de 7,4 Å e apresenta uma estrutura tridimensional (Ahmedzeki et al., 2016; Taufiqurrahmi et al., 2011). O sistema de poros do zeólito NaY é composto por diferentes cavidades que consistem em espaços esféricos podendo ser referidos como supercavidades de 1,3 nm de diâmetro (**Figura 9**). Estes espaços estão geralmente ligados tetraedricamente com 4 espaços vizinhos formando geralmente 12 TO₄ tetraedros (Weitkamp, 2000).

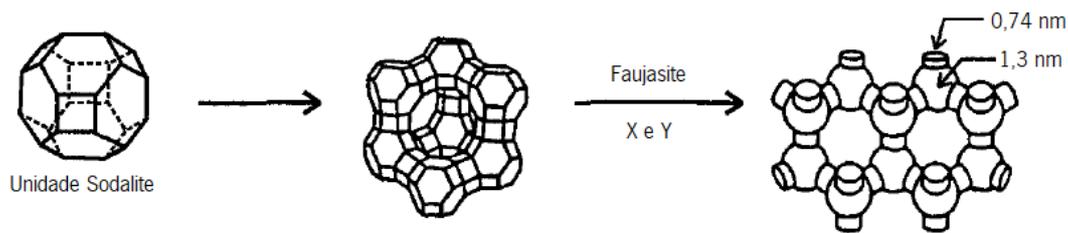


Figura 9 – Estrutura do zeólito Y. O zeólito NaY é composto por unidades sodalite que, quando ligadas entre si, formam um poro de diâmetro 0,74 nm. Imagem adaptada de (Weitkamp, 2000).

O zeólito NaY é considerado um zeólito de poro largo, o que fez com que alguns investigadores o vissem como um sistema com potencial para poder avaliar as suas propriedades antimicrobianas assim como para a remoção de antibióticos em águas (Boschetto, et al., 2012; Braschi et al., 2010). Estes zeólitos têm sido utilizados juntamente com iões de prata para verificar a sua atividade antimicrobiana (Ferreira, et al., 2012).

1.2.2- Zeólito ZSM5

O zeólito ZSM5 pertence à família de zeólitos *Modenite Framework Inverted* (MFI), que apresenta uma estrutura química $[\text{Na}_x(\text{H}_2\text{O})_{16}][\text{Al}_x\text{Si}_{96-x}\text{O}_{192}]$ (McCusker & Baerlocher, 2005). Este zeólito também é produzido sinteticamente sendo estável a temperaturas superiores a 1000 °C e possui propriedades hidrofóbicas e organofílicas que fazem com que seja um adsorvente e catalisador de eleição (Zoubida & Hichem, 2018).

Este zeólito apresenta poros característicos entre 5,0x5,5 Å, sendo considerado um zeólito de poro médio. A sua estrutura possui dois canais de canais lineares (em que os poros possuem dimensões 5,6 x 5,3 Å) e canais sinusoidais (com poros de dimensões 5,5 x 5,1 Å) (**Figura 10**) (Baerlocher et al., 2001; McCusker & Baerlocher, 2005; Weitkamp, 2000).

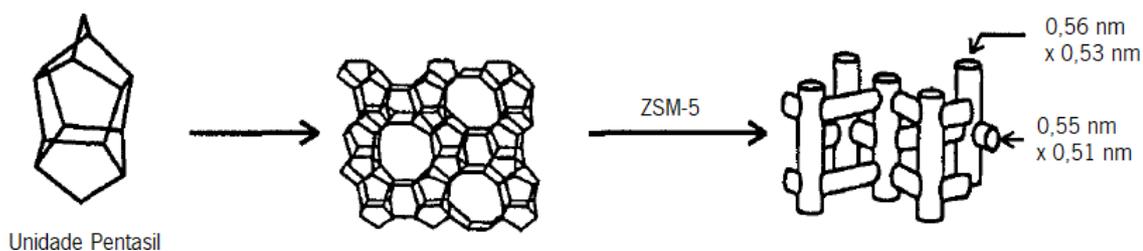


Figura 10 – Estrutura do zeólito ZSM5. O zeólito ZSM5 é composto por unidades pentasil que, quando ligadas entre si, formam dois tipos de canais: canais lineares (em que os poros possuem dimensões 0,56 x 0,53 nm) e canais sinusoidais (com poros de dimensões 0,55 x 0,51 nm). Imagem adaptada de (Weitkamp, 2000).

Este trabalho tem como objetivo avaliar a atividade antimicrobiana dos antibióticos TC e PG quando encapsulados em zeólitos, especificamente em NaY e ZSM5. Primeiramente foram preparados os sistemas com os antibióticos encapsulados e posteriormente caracterizados através de técnicas analíticas como Análise Termogravimétrica (TGA), Adsorção de N_2 , Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR), Microscopia eletrónica de varrimento (SEM) e Espectroscopia UV/Visível. Após uma rigorosa caracterização, avaliou-se a atividade antimicrobiana dos fármacos isoladamente, para determinar quais as suas concentrações mínimas inibitórias MIC (do inglês *minimum inhibitory concentration*) e dos zeólitos. Posteriormente, procedeu-se à avaliação do efeito antimicrobiano dos antibióticos PG e TC quando se encontravam encapsulados com os zeólitos. Com os valores de MIC obtidos para os antibióticos isoladamente e os valores dos sistemas, o objetivo era verificar se existia um benefício na utilização dos sistemas em relação à utilização dos antibióticos isoladamente, isto é, se os valores MIC para os sistemas eram inferiores aos valores MIC dos antibióticos.

CAPÍTULO 2 - PARTE EXPERIMENTAL

2- PARTE EXPERIMENTAL

Neste capítulo vão ser abordados os procedimentos de preparação das amostras (zeólitos) com os antibióticos encapsulados, as várias técnicas utilizadas para a sua caracterização, assim como os testes para avaliação da atividade antimicrobiana realizados durante o trabalho.

2.1- Preparação das Amostras

Neste trabalho foram utilizados diferentes materiais: dois antibióticos - a Tetraciclina (TC, Sigma-Aldrich) e a Penicilina G (PG, Sigma-Aldrich) - e duas estruturas zeolíticas - o Zeólito ZSM5 (Zeolyst International) e o Zeólito NaY (Zeolyst International). Com estas estruturas e os dois antibióticos foram preparadas várias amostras, duas com o ZSM5 e duas com o NaY. Foi também preparada uma amostra com o Zeólito NaY e o antibiótico TC em meio ácido com vista a obter uma melhor eficiência na encapsulação do antibiótico (Gao et al., 2012; Zhang, et al., 2015).

Para a preparação dos sistemas com os antibióticos indicados, pesaram-se 200 mg de antibiótico que foram dissolvidos em 50 mL de água (H₂O) ultrapura, sob agitação (150 rpm/h), à temperatura ambiente. A solução de 50 mL foi dividida em 2 novas soluções de 25 mL às quais foram adicionados 525 mg de cada Zeólito. De seguida procedeu-se ao período de encapsulamento, e as soluções foram deixadas a agitar à temperatura ambiente durante um período de 48 h. Após este período, os sistemas foram filtrados e lavados duas vezes utilizando H₂O ultrapura e posteriormente secos na estufa (50 °C) durante um período de 24 h.

Para o sistema preparado com o meio ácido, apenas foi acertado o valor de pH da solução que continha o antibiótico TC e o Zeólito NaY para 3,3. Todo o restante procedimento foi realizado nas mesmas condições que para os outros sistemas, sendo que foi utilizado neste caso uma solução de 25 mL para 525 mg de zeólito. Os referidos sistemas foram identificados como: TC@ZSM5, TC@NaY, TC_{3.3}@NaY; PG@ZSM5 e PG@NaY.

2.2- Caracterização dos Sistemas

2.2.1- Análise Termogravimétrica (TGA)

Desde os primórdios da civilização que se começou a utilizar o fogo como forma de produzir e/ou modificar os materiais. Com o avançar dos anos, existiu a necessidade de estudar quais os efeitos causados pelo calor nos materiais. Tal como em outras áreas da ciência, as análises térmicas tiveram uma evolução rápida na última metade do século passado.

A Análise Termogravimétrica foi uma das primeiras análises a surgir para o estudo do efeito do calor nos materiais. Esta técnica permite-nos monitorizar a variação da massa do objeto a analisar com o aumento ou diminuição da temperatura durante um determinado intervalo de tempo. As variações de massa podem surgir devido a ruturas de ligações químicas com libertação de produtos voláteis, formação de ligações químicas originando a fixação de produtos permitindo assim retirar informações quantitativas. Os resultados obtidos por Análise Termogravimétrica são apresentados em forma de gráfico, onde é possível observar a variação da massa através das curvas ao longo da variação da temperatura/tempo (**Figura 11**).

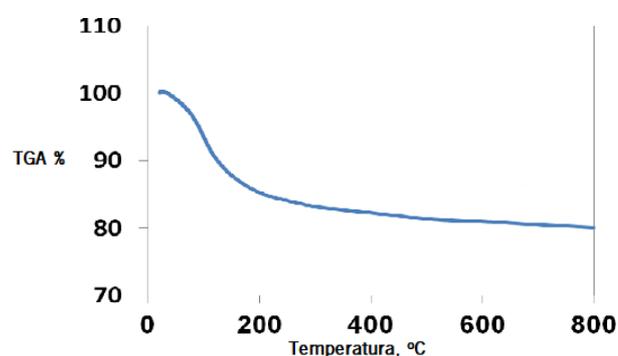


Figura 11 – Curva de TGA: variação da massa em função da Temperatura. Imagem adaptada de (Ahmedzeki et al., 2016).

Os resultados obtidos através das curvas de TGA podem ser afetados por fatores instrumentais ou devido às características da amostra. Os fatores instrumentais devem-se à velocidade de aquecimento do forno onde estão inseridas as amostras a analisar, assim como a sua atmosfera. A massa da amostra e o seu tamanho também têm influência nos resultados obtidos pela análise. Geralmente são utilizadas quantidades pequenas de amostra pois quanto maior for a massa do objeto maior será a temperatura inicial e a temperatura final.

A Análise Termogravimétrica (TGA) dos sistemas constituídos pelo zeólito e os antibióticos foi realizada num analisador térmico STA 409 PC/4/H Luxx Netzsch, com um fluxo de 50 cm³/min, numa gama de temperatura de 50 e 700 °C a 10 °C/min. O suporte da amostra, mais conhecido por cadinho, era de óxido de alumínio (Netzsch).

2.2.2- Isotérmicas de adsorção de N₂

A adsorção de gases tem sido uma técnica utilizada para a caracterização de materiais porosos. Permite obter informação sobre o tamanho do poro e a distribuição de áreas superficiais de amostras porosas. Apesar de existir uma variedade de gases e vapores que podem ser utilizados na adsorção de gases, o azoto (N₂) é o gás mais utilizado (Liu & Chen, 2014; Sing, 2001). A distribuição do tamanho do poro pode ser calculada pela quantidade de gás adsorvida a uma pressão e temperatura específica. O gás é adsorvido a uma temperatura específica e, com o aumento da pressão, a espessura da camada de gás adsorvido no poro também aumenta. No entanto, na preparação da amostra deve existir uma degaseificação para remover a adsorção física existente na superfície da amostra, onde deve ser evitada uma alteração irreversível na superfície, o que pode levar a uma má análise da amostra (Liu & Chen, 2014). A capacidade de uma monocamada de gás pode ser obtida a partir da equação de Brunauer, Emmett e Teller (BET) (equação 1),

$$v = \frac{v_m c p}{(p - p_0) [1 + (c - 1) \frac{p}{p_0}]} \quad \text{equação 1}$$

onde v é o volume total de gás adsorvido, v_m o volume de gás adsorvido quando a superfície do sólido está completamente coberta por uma monocamada, c é a constante BET, p a pressão medida no estado de equilíbrio e p_0 é a pressão inicial do sistema.

A distribuição do tamanho do poro pode ser obtida a partir da teoria de Barret-Joyner-Halenda (BJH) juntamente com a equação de Kelvin (equação 2):

$$r_K = \frac{2\sigma V_m}{RT \ln\left(\frac{p}{p_0}\right)} \quad \text{equação 2}$$

onde σ é a tensão da superfície do gás quando este chega ao ponto de ebulição (em N/m), R a constante do gás, V_m o volume molar do líquido adsorvente (neste caso para o N₂ é 3,47x10⁻⁵ m³/mol), T é a temperatura de ebulição do líquido adsorvente (77 K para o azoto líquido), p a pressão do gás em equilíbrio entre a adsorção e a dessorção e p_0 a pressão de vapor do adsorvente saturado à temperatura de ebulição.

Para a análise por adsorção N₂, as amostras foram colocadas em vácuo a 150 °C. Os ensaios de adsorção por azoto foram feitos a -196 °C recorrendo ao aparelho NOVA 4200e e de seguida procedeu-se à determinação das suas áreas BET.

2.2.3- Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

A espectroscopia de Infravermelho com transformada de Fourier, conhecida por FTIR, é uma técnica proveniente da categoria das espectroscopias de Infravermelho. Este grupo de técnicas começou a ser

desenvolvido nos inícios do ano 1900. A região do Infravermelho está dividida em 3 zonas distintas: a região do Infravermelho afastado situada entre 100 e 25 μm , a região do Infravermelho médio entre 25 e 2,5 μm e o Infravermelho próximo entre 2,5 e 1 μm . (Duygu, et al., 2009). Ao utilizar radiação Infravermelho, apenas são detetadas as transições vibracionais devido à radiação não ter energia suficiente para que possam existir transições eletrónicas (Berthomieu, et al., 2009; Duygu et al., 2009). Ao detetar as diferentes transições vibracionais provocadas pela radiação, a espectroscopia de infravermelho permite obter informações dos grupos funcionais de moléculas que estão presentes na amostra, assim como a sua concentração (Duygu et al., 2009).

Os espectros de FTIR foram obtidos em modo de transmitância num espectrómetro Bomem MB104, a uma média de 20 scans com a resolução máxima de 4 cm^{-1} . O espectro obtido tinha uma resolução entre 4000 e 700 cm^{-1} . Para a análise foram preparadas pastilhas com 0,15 g de Brometo de Potássio (KBr, Merck) e 0,05 g de cada sistema.

2.2.4- Microscopia eletrónica de varrimento (SEM)

A microscopia é um grupo de técnicas muito utilizadas para a observação de objetos que geralmente não são perceptíveis ao olho humano. Apesar de ter surgido há alguns séculos, por volta dos anos 1590, o seu desenvolvimento foi quase nulo até ao século XX, altura em que teve um desenvolvimento exponencial. (Slayter & Slayter, 1992). A microscopia pode ser dividida em dois ramos diferentes: a microscopia que utiliza feixes de luz e a microscopia que utiliza feixes de eletrões para obter imagem do objeto em análise. Ambas as microscopias se baseiam na interação dos feixes com a amostra, podendo existir difração, reflexão e refração (Slayter & Slayter, 1992). Em qualquer microscopia, a preparação da amostra é o passo mais importante para que seja possível formar uma imagem de qualidade dessa amostra.

Neste trabalho, foi utilizada a microscopia eletrónica de varrimento, conhecida por SEM (do inglês, *Scanning Electron Microscopy*), uma técnica muito utilizada para a caracterização da superfície de materiais (Inkson, 2016; Joy, 1997). Esta técnica utiliza eletrões como fonte, o que permite ter um maior poder de resolução comparativamente às técnicas que utilizam a luz como fonte. A técnica SEM forma imagens da superfície da amostra apenas, não a conseguindo atravessar (Inkson, 2016; Ul-Hamid, 2018). O microscópio utilizado pelo SEM está dividido em três secções a coluna eletrónica, a câmara da amostra e o computador ou controlo eletrónico como mostra a **Figura 12**.

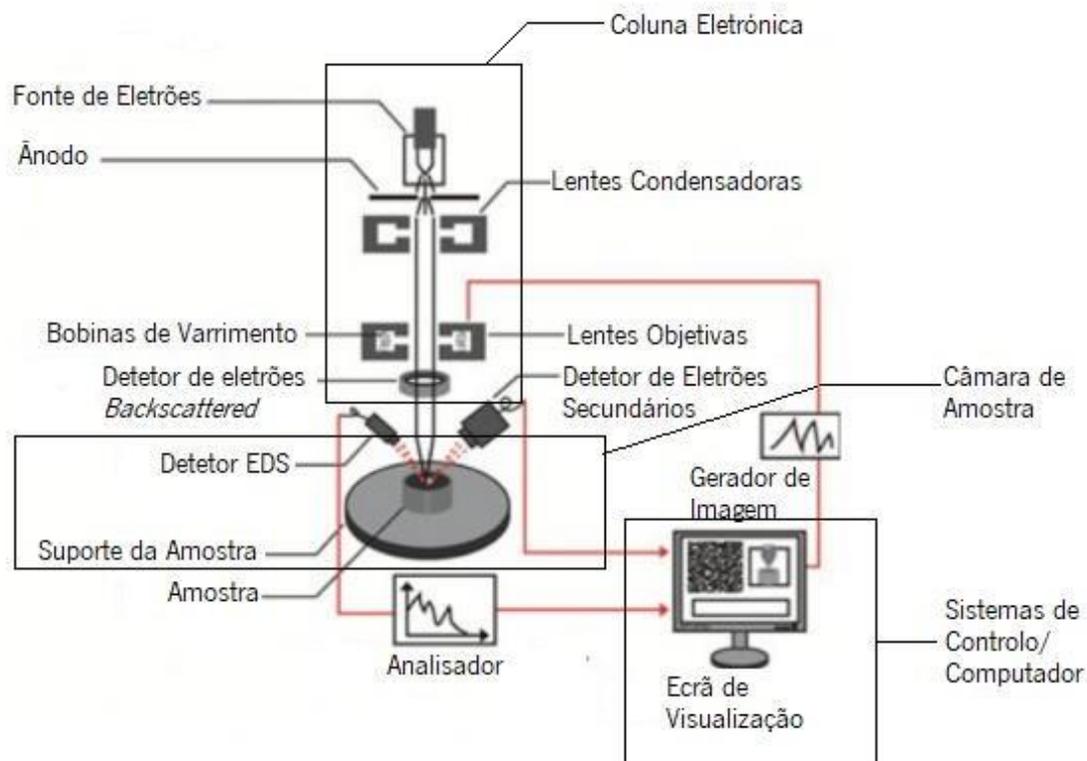


Figura 12 – Constituição de um microscópio eletrônico de varrimento. O microscópio eletrônico de varrimento é dividido em três secções: a coluna eletrónica, onde são gerado os eletrões, a câmara de amostra, onde se encontra a amostra e onde existe o contacto dos eletrões com amostra, e a secção do computador ou controlo eletrónico, responsável pelo controlo das condições de análise e da apresentação da imagem da análise. Imagem adaptada de (Ul-Hamid, 2018).

A fonte de eletrões, geralmente um filamento de tungsténio, liberta eletrões devido à passagem de corrente eléctrica originada por uma diferença de potencial. Os eletrões, após serem libertados da sua fonte, saem direccionados para o ânodo, onde a maior parte dos eletrões são captados e não chegam a ser utilizados na formação da imagem. Apenas uma parte dos eletrões atravessa o orifício do ânodo e, ao alcançar as lentes condensadoras ou lentes eletromagnéticas, é gerado um feixe único bastante estreito. O feixe de eletrões, com o auxílio das bobinas de varrimento, é projetado sobre a amostra ponto por ponto permitindo assim obter uma imagem ponto por ponto de toda a sua superfície. Para a formação da imagem são analisados os eletrões secundários e os eletrões *backscattered* que são formados pela interação do feixe de luz com a amostra. Estes eletrões são captados pelos seus detetores que transmitem o sinal para o gerador de imagem, permitindo assim obter contrastes da imagem. Todo o

sistema se encontra sob vácuo (Goldstein et al., 2012; Inkson, 2016; Slayter & Slayter, 1992; Ul-Hamid, 2018).

As amostras foram analisadas por SEM para verificar se havia alguma alteração na sua estrutura. As imagens obtidas pelo aparelho foram recolhidas num microscópio de varrimento LEICA Cambridge S360 equipado também com o sistema EDX. Antes de serem analisadas, as amostras foram revestidas por uma pequena camada de ouro para ser possível obter uma imagem mais clara da morfologia do sistema. Este revestimento foi realizado com o auxílio do aparelho Fisons Instruments SC502.

2.2.4- Espectroscopia UV/Visível

A espectroscopia UV/Visível é bastante utilizada em diversas áreas da ciência como a Química e a Biologia. Esta técnica permite obter informação sobre a quantidade de composto alvo que se encontra na solução a ser analisada. É considerada uma técnica analítica quantitativa e baseia-se na absorção de radiação, na região do ultravioleta (180-390 nm) ou na região do visível (390-780 nm), pelas espécies químicas presentes na solução a ser analisada (Worsfold, et al., 2017). Esta técnica apenas fornece informação sobre compostos orgânicos que possuem eletrões n e não ligantes.

A radiação proveniente da região do ultravioleta e da região do visível possui energia compreendida entre 36 e 286 kcal/mol. Os eletrões absorvem esta energia e passam dos estados fundamentais para estados de maior energia, ou estados excitados, se a energia absorvida for igual ou superior à diferença de energia entre os dois estados.

O aparelho que é utilizado em espectroscopia UV/Visível é composto por uma fonte de radiação e um monocromador com função de separar os vários comprimentos de onda da radiação incidente. A radiação incidente é dividida em dois feixes, um que atravessa a solução a ser estudada e outro feixe que atravessa o solvente utilizado para preparar a solução. Estes feixes são captados pelo detetor que faz a análise da informação e origina um espectro, idêntico ao que se pode observar na **Figura 13** (Verma & Mishra, 2018; Worsfold et al., 2017).

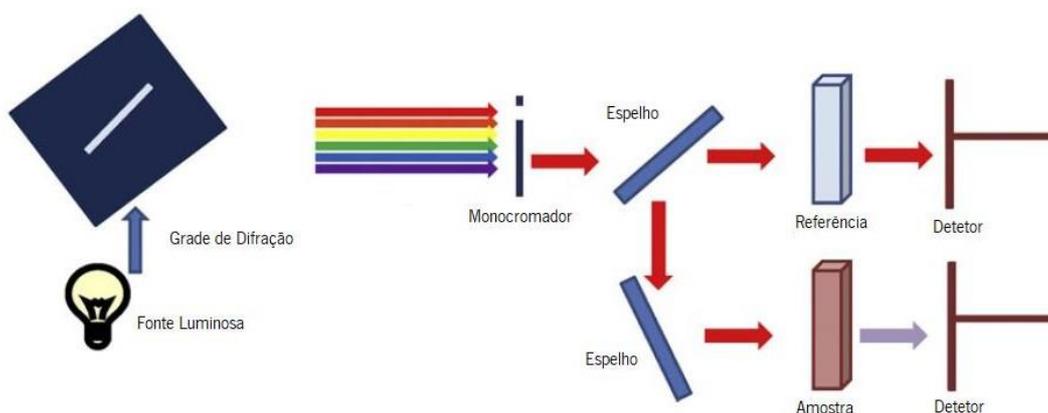


Figura 13 – Esquema de um espectrômetro de UV/Visível. É produzida radiação através da fonte luminosa. Essa radiação após ser difratada, atravessa o monocromador que seleciona o comprimento de onda a que esta radiação vai atravessar a amostra e o material utilizado como referência. Imagem adaptada de Nilapwar, et al., 2011).

A análise quantitativa da espectroscopia de UV/Visível é baseada na lei de Lambert-Beer (equação 3):

$$A = \varepsilon * b * C$$

Equação 3,

onde A corresponde à absorvância da solução, ε é a absortividade molar expressa em L/mol.cm e caracteriza a espécie absorvente em estudo. Os parâmetros b e C correspondem ao percurso óptico percorrido pelos feixes e à concentração da solução expressa em mol/L, respetivamente.

Foram realizados estudos da libertação *in vitro* dos antibióticos da estrutura dos zeólitos. Foram adicionadas 25 mg do sistema zeólito e antibiótico a 25 mL de solução tampão fosfato-salino (PBS, do inglês *phosphate-buffered saline*: 0,8 % (p/v) Cloreto de Sódio (NaCl), 0,02 % (p/v) Cloreto de Potássio (KCl), 0,144 % (p/v) de Hidrogenofosfato de Sódio (Na_2HPO_4) e 0,024 % (p/v) de Dihidrogenofosfato de Potássio (KH_2PO_4), pH 7,4), a uma temperatura de 37 °C. Foram retiradas alíquotas de 2 mL da solução em determinados intervalos de tempo pré-estabelecidos e foram adicionados novamente 2 mL de solução PBS. Os testes de saída foram realizados durante 6 h. As alíquotas foram recolhidas e de seguida foram filtradas utilizando filtros descartáveis (filtros Whatman, GE Healthcare UK) compostos por uma membrana de nylon de 0,20 μm . As alíquotas retiradas foram analisadas e obteve-se o espectro de absorção UV/Visível em que o comprimento de onda era de 276 e 357 nm (λ_{max}) e em que as alíquotas foram diluídas numa proporção de 1:100. Durante a análise foi também utilizada como "branco" 3 mL de solução PBS. Foi realizado também outro ensaio onde foi utilizado H_2O ultrapura. Para as análises

foram utilizadas cuvetes de quartzo. Os espectros foram obtidos através da utilização de um espectrofotómetro UV-2501PC (Shimadzu, Japão).

2.3- Avaliação da atividade antimicrobiana

2.3.1 Microrganismos

Como referido, este trabalho tem como objetivo avaliar a atividade antimicrobiana dos antibióticos Tetraciclina (TC) e Penicilina G (PG) após encapsulação nos zeólitos NaY e ZSM5. Nesse sentido foram escolhidas bactérias de dois grupos distintos: bactérias Gram-positivas e bactérias Gram-negativas (**Tabela 3**), provenientes da coleção de estirpes do Departamento de Biologia da Universidade do Minho, onde foram realizados os estudos da avaliação da atividade antimicrobiana.

Tabela 3 - Características das estirpes utilizadas.

Estirpe	Tipo	Código da Estirpe	Origem
<i>Staphylococcus aureus</i> sensível a Meticilina (MSSA)	Gram-Positiva	ATTC 6538	Isolado Clínico (Lesão Humana)
<i>Staphylococcus aureus</i> resistente a Meticilina (MRSA)	Gram-Positiva	MRSA U800746	Isolado Clínico
<i>Propionibacterium acnes</i>	Gram-Positiva	H60803(2961351)	Isolado Clínico
<i>Escherichia coli</i>	Gram-Negativa	CECT 423	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Gram-Negativa	7697099	Isolado clínico (urina)

2.3.2 Meios de cultura e manutenção de culturas microbianas

Durante este trabalho, todas as estirpes foram cultivadas e mantidas em condições assépticas, utilizando meios de cultura apropriados. As estirpes foram cultivadas em meio *Lysogeny Broth* (LB), suplementado ou não com Agar 2% (p/v) (Oxoid) (**Tabela 4**) caso se tratasse de meio líquido (LB) ou sólido (LBA) respetivamente. O crescimento foi normalmente promovido durante 24 h a uma temperatura de 37 °C, para obter culturas frescas. Todos os meios de cultura foram previamente esterilizados em autoclave, utilizando as condições 120 °C e 1 atm.

Tabela 4 – Formulação do meio LBA por cada 1 litro de H₂O

Constituinte	Quantidade (g)	Fornecedor
Triptona	10	Becton, Dickinson and Company
Extrato de levedura	5	ACROS Organics
NaCl	5	Panreac

2.3.3- Ensaio para avaliar a atividade antimicrobiana

Como foi descrito anteriormente, foram preparados cinco sistemas diferentes: dois sistemas utilizando o Zeólito NaY e os antibióticos TC e PG, dois sistemas utilizando o Zeólito ZSM5 com os mesmos antibióticos e um sistema formado por NaY e TC em meio ácido. Estes sistemas bem como os zeólitos de partida foram testados para averiguar as suas propriedades antimicrobianas contra os microrganismos selecionados para indicadores de suscetibilidade procedendo-se à incorporação dos zeólitos e/ou dos zeólitos com os antibióticos encapsulados em meio LBA.

Paralelamente, foi avaliada a atividade antimicrobiana dos antibióticos isoladamente para verificar qual a sua concentração mínima inibitória (MIC, do inglês *minimum inhibitory concentration*), isto é, a concentração a partir da qual se não observa crescimento dos microrganismos. As placas de meio LBA suplementadas com os antibióticos (ou com os zeólitos e as amostras) foram preparadas da mesma forma que as placas utilizadas para o crescimento das culturas dos microrganismos exceto a etapa da adição do antibiótico (ou dos zeólitos e das amostras), realizada após a esterilização do meio em autoclave a 120 °C e 1 atm. Foi preparada uma solução mãe de 60 e de 200 µg/mL de cada antibiótico retirando-se o volume necessário para obter as concentrações utilizadas nos ensaios (**Tabela 5**). Estas gamas de concentração foram escolhidas com base na informação recolhida na literatura. No entanto, no primeiro ensaio realizado, as gamas de concentração utilizadas foram 1000x superiores às gamas de concentração previstas inicialmente devido a uma má pesagem da massa de antibiótico.

Tabela 5 – Gamas de concentração, assim como os seus incrementos, utilizados nos ensaios antimicrobianos para os dois antibióticos.

[Gamas de Concentração ($\mu\text{g/mL}$)]	Incrementos ($\mu\text{g/mL}$)
0,01 a 0,1	0,05
0,1 a 1,0	0,1
1,0 a 3,0	0,2
3,0 a 10	0,5

As placas foram incubadas a 37° C durante 24h, após o que se verificou se existia crescimento ou inibição de crescimento dos microrganismos por parte dos antibióticos.

2.3.3.1 – Determinação das Concentrações Mínimas Inibitórias

Primeiramente foram determinadas as MIC dos antibióticos contra as bactérias estudadas. As culturas dos microrganismos deverão estar frescas para garantir a melhor viabilidade possível. Para isso, é preparado um pré-inóculo de cada estirpe em tubos Falcon contendo 5 mL de meio LB incubando-se durante a noite a 37 °C e 200 rpm. A partir desta cultura microbiana, foi depois preparado o inóculo em 5 mL de LB num tubo Falcon de modo a que a densidade ótica (DO) inicial fosse 0,1, medida a um comprimento de onda de 600 nm. As culturas foram novamente incubadas a 37 °C e 200 rpm até atingirem uma DO_{600} entre 0,4 – 0,6, garantindo assim que se encontravam a meio da fase exponencial, passando por duas gerações de crescimento. Foram retiradas alíquotas, em duplicado, de 5 μL de cada cultura microbiana e colocadas sobre placas com meio LBA suplementado com os antibióticos (**Figura 14.**).

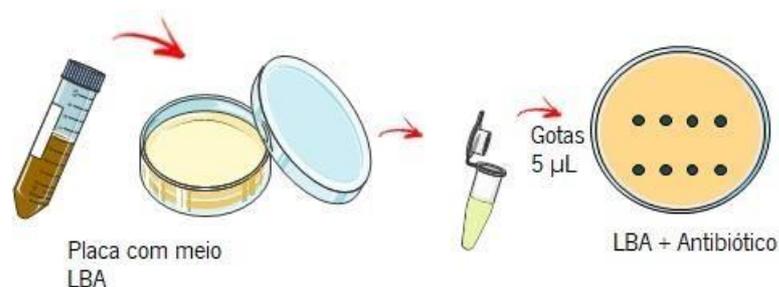


Figura 14 – Método de diluição em Agar. Após preparadas as placas com meio LBA e antibiótico, são adicionadas gotas de 5 μL de uma cultura de cada microrganismo, em duplicado. Após a incubação a 37 °C durante 24 h verifica-se a presença ou ausência de crescimento microbiano.

2.3.3.2 – Ensaio para Avaliação da Atividade Antimicrobiana

Após a determinação dos valores de MIC para os antibióticos, procedeu-se à avaliação da atividade antimicrobiana dos sistemas previamente preparados. Num primeiro ensaio foi utilizada a gama de concentrações utilizada no estudo anterior (**Tabela 5**), para realizar uma análise global da atividade antimicrobiana dos sistemas. A partir dos valores de MIC obtidos para os antibióticos, as gamas de concentração testadas com os sistemas incluíram concentrações inferiores a esses valores de MIC, com o objetivo de verificar se os sistemas trariam vantagem em relação à utilização dos antibióticos isolados. As gamas de concentração utilizadas para os sistemas com os dois antibióticos variavam entre os vários microrganismos e estão representadas na **Tabela 6**.

Tabela 6 – Gamas de concentração utilizadas na avaliação da atividade antimicrobiana dos antibióticos encapsulados nos zeólitos NaY e ZSM5. As gamas de concentração foram utilizadas para ambos os sistemas com o mesmo antibiótico.

Microrganismo	Sistemas	Sistemas
	TC@NaY, TC _{3,3} @NaY, TC@ZSM5 [µg/mL]	PG@NaY, PG@ZSM5 [µg/mL]
MSSA	0,2 – 0,4	0,01 – 0,05
MRSA	60,0 – 80,0	-
<i>Propionibacterium acnes</i>	0,2 – 0,4	3,0 – 4,0
<i>Escherichia coli</i>	1,4 – 1,8	3,0 – 5,0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	18,0 – 20,0	-

O procedimento realizado foi o referido na secção anterior, exceto a utilização dos cinco sistemas em vez de apenas os antibióticos. No entanto, para os sistemas com Penicilina G, não foi avaliada a atividade antimicrobiana contra MRSA e *P. aeruginosa* devido a requererem gamas de concentração muito elevadas comparativamente aos outros microrganismos.

Posteriormente, por não ter sido observada inibição do crescimento nas concentrações testadas, procedeu-se a novo ensaio utilizando uma gama de concentrações superior aos MIC obtidos no estudo com os antibióticos (**Tabela 7**). Neste ensaio apenas foram testados os microrganismos MSSA, *P. acnes* e *E. coli*.

Tabela 7 – Gamas de concentração utilizadas na avaliação da atividade antimicrobiana dos antibióticos encapsulados nos zeólitos NaY e ZSM5. As gamas de concentração com valores superiores ao MIC foram utilizadas para ambos os sistemas com o mesmo antibiótico.

Microrganismo	Sistemas TC@NaY, TC_{3,3}@NaY, TC@ZSM5 [µg/mL]	Sistemas PG@NaY, PG@ZSM5 [µg/mL]
MSSA	1,2 – 2,0	3,0 – 5,0
<i>Propionibacterium acnes</i>	1,2 – 2,0	3,0 – 5,0
<i>Escherichia coli</i>	1,2 – 2,0	3,0 – 5,0

CAPÍTULO 3 – APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

3- APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

Neste capítulo, vão ser apresentados e discutidos todos os resultados obtidos durante o trabalho experimental. Em primeiro lugar vão ser apresentados os resultados obtidos da caracterização dos sistemas preparados por SEM, TGA e adsorção N_2 . De seguida, são apresentados e discutidos os resultados da libertação *in vitro* dos antibióticos da estrutura dos zeólitos. Por último, vão ser apresentados os resultados dos ensaios antimicrobianos, primeiro dos antibióticos e de seguida dos sistemas.

3.1- Caracterização das Amostras

3.1.1- Análise Termogravimétrica (TGA)

Uma das formas para quantificar compostos encapsulados por parte dos zeólitos, é através de uma análise Termogravimétrica (TGA). Esta foi realizada num intervalo de temperaturas de 50 a 700 °C, numa atmosfera de oxigénio. Na **Figura 15** estão representados os termogramas das diferentes amostras preparadas: TC@NaY, TC_{3,3}@NaY, PG@NaY; PG@ZSM5, TC@ZSM5.

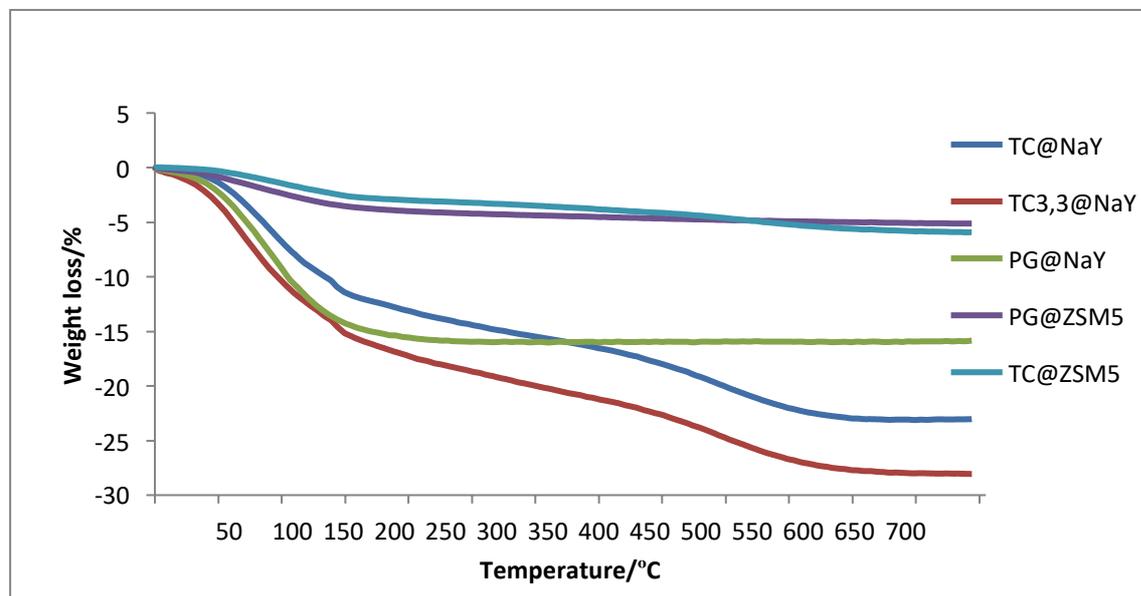


Figura 15 - Termogramas obtido pela análise TGA. Termogramas obtidos para as amostras utilizadas durante este trabalho. As amostras foram aquecidas desde 50 até 700 °C com um aumento de temperatura de 10 °C/ min.

Os termogramas do zeólito ZSM5 são muito semelhantes, independente do antibiótico. Já os termogramas do NaY apresentam diferenças de acordo com os antibióticos. Entretanto, em todos os termogramas se identificam diferentes perdas de massa. Até 180 °C, a primeira perda de massa foi atribuída à perda de H₂O presente no sistema. Os sistemas que foram preparados com o zeólito ZSM5 apresentaram uma perda de massa inferior à apresentada pelos sistemas preparados com o zeólito NaY. A partir de 180 °C existe uma segunda perda de massa acentuada para os sistemas com o zeólito NaY, sendo que a partir de 200 °C não se verifica mais perda de massa no sistema PG@NaY, comparativamente aos sistemas com o mesmo zeólito, mas com o antibiótico TC. Em concordância com a literatura, o sistema preparado em meio ácido, TC_{3,3}@NaY, tem maior perda de massa do que o sistema TC@NaY, traduzindo uma maior encapsulação do antibiótico no sistema (Gao et al., 2012).

Em termogramas disponíveis na literatura, o antibiótico TC é termicamente estável até à temperatura de 205,5 °C, sendo que a TC começa a degradar-se a 235,5 °C (Cervini, et al., 2016). Os resultados obtidos no termograma de TGA coincidem com as curvas características de TC descritas na literatura. Para o antibiótico PG, os termogramas disponíveis na literatura (Fontes, et al., 2013) indicam que a PG começa a degradar-se a partir dos 200 °C. As amostras preparadas com o antibiótico PG começaram a exibir perda de massa perto de 200 °C sendo que o sistema com o zeólito NaY começou a ter perdas de massa pouco significativas a partir de 250 °C.

Na **Tabela 8**, estão representados os resultados da quantidade de encapsulamento dos antibióticos em cada sistema de acordo com a análise de TGA.

Tabela 8 – Resultados da análise TGA, nomeadamente a perda de massa total (%) dos sistemas, a massa de antibiótico encapsulada por cada sistema (mg) e a percentagem de encapsulamento (%).

	TC@NaY	TC_{3,3}@NaY	PG@NaY	TC@ZSM5	PG@ZSM5
Perda de massa total (%)	23	28,1	15,9	5,9	5,1
Massa de antibiótico presente no sistema (mg)	78,79	88,89	64,09	28,33	19,37
Encapsulamento (%)	39,4	44,4	32,0	14,2	9,7

Pode constatar-se que existe uma maior quantidade de antibiótico encapsulado no zeólito NaY do que no zeólito ZSM5. Esta maior capacidade de encapsulamento é devido ao NaY apresentar uma estrutura mais aberta. Além disso, a utilização de meio ácido na preparação da amostra garante uma maior

quantidade de antibiótico TC no interior do zeólito. Independente do antibiótico, a percentagem de antibiótico encapsulado no ZSM5 é na ordem de 9,5 a 14,5%.

3.1.2- Isotérmicas de Adsorção N₂

As análises de Isotérmicas de Adsorção são bastante utilizadas para a análise de materiais porosos, como os zeólitos por exemplo. Neste trabalho, foi avaliado o comportamento físico de adsorção do gás azoto (N₂) nos sistemas preparados. Este tipo de adsorção pode ser revertida facilmente com a diminuição da pressão devido às forças atrativas entre o gás e a superfície serem relativamente fracas (ligações de van der Waals).

O volume dos microporos (V_{micro}) e as áreas superficiais mesoporosas (S_{meso}) foram calculadas pelo método T enquanto que a área total da superfície do zeólito (S_{BET}) foi calculada pelo método de Brunauer-Emmett-Teller (BET). Na **Tabela 9** estão representados os resultados obtidos pela análise de Isotérmica de Adsorção N₂ para os zeólitos de partida e as amostras preparadas no presente trabalho.

Tabela 9 – Propriedades estruturais dos zeólitos e das amostras com antibióticos encapsulados obtidas por análise de Isotérmicas de Adsorção N₂.

Amostra	S_{BET} (m²/g)	S_{meso} (m²/g)	V_{micro} (cm³/g)	V_{meso} (cm³/g)
NaY (Vilaça et al., 2013)	792	19	0,340	0,038
TC@NaY	663	48	0,255	0,053
TC_{3,3}@NaY	580	52	0,220	0,051
PG@NaY	761	39	0,303	0,044
ZSM5 (Freitas et al., 2015)	395	182	0,100	0,160
TC@ZSM5	372	45	0,142	0,110
PG@ZSM5	375	39	0,148	0,060

Quando comparados os resultados obtidos, verifica-se uma diminuição nos valores S_{BET} e V_{micro} para todos os sistemas. No parâmetro S_{meso} há um aumento para os sistemas que utilizam o zeólito NaY e uma diminuição nos sistemas baseados no zeólito ZSM5, o mesmo acontecendo para o parâmetro V_{meso} . Pode confirmar-se o encapsulamento dos antibióticos nos zeólitos: os dados da S_{BET} indicam-nos que houve encapsulamento dos antibióticos nos zeólitos pelo facto dos valores serem menores nos sistemas do que nos zeólitos sozinhos. Para os sistemas com o zeólito NaY, o aumento dos valores de S_{meso} e a diminuição dos valores V_{micro} sugerem que o antibiótico esteja no interior da estrutura do zeólito enquanto que para

os sistemas com o ZSM5, a diminuição dos valores S_{meso} e aumento dos valores V_{micro} sugere que o antibiótico esteja mais na superfície externa do zeólito.

3.1.3- Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

Uma forma para determinar a presença dos antibióticos no sistema é através da análise de FTIR. Foram analisados os sistemas assim como os zeólitos isoladamente. Na **Figura 16** apresentam-se os espectros obtidos para os zeólitos. Na Figura 16A pode observar-se o espectro FTIR do zeólito NaY, encontrando-se três bandas características deste zeólito: entre os 650 e 500 cm^{-1} podemos observar as vibrações de deformação do anel duplo, por volta da frequência 1000 cm^{-1} são visíveis as vibrações de estiramento simétrico e assimétrico das ligações T-O-T (tetraedros SiO_4 e AlO_4) e a frequências entre os 3700 e 3500 cm^{-1} pode observar-se as bandas características das vibrações dos grupos hidroxilo (T-OH) (Ferreira et al., 2012). No espectro FTIR do zeólito ZSM5 (Figura 16B) observa-se a presença de H_2O devido à banda $\nu(\text{O-H})$ e $\delta(\text{O-H})$ que surgem a vibrações de 3500 cm^{-1} e 1650 cm^{-1} , respetivamente. São também possíveis observar as bandas correspondentes às vibrações de rede a frequências entre 1250 e 500 cm^{-1} (Freitas et al., 2015).

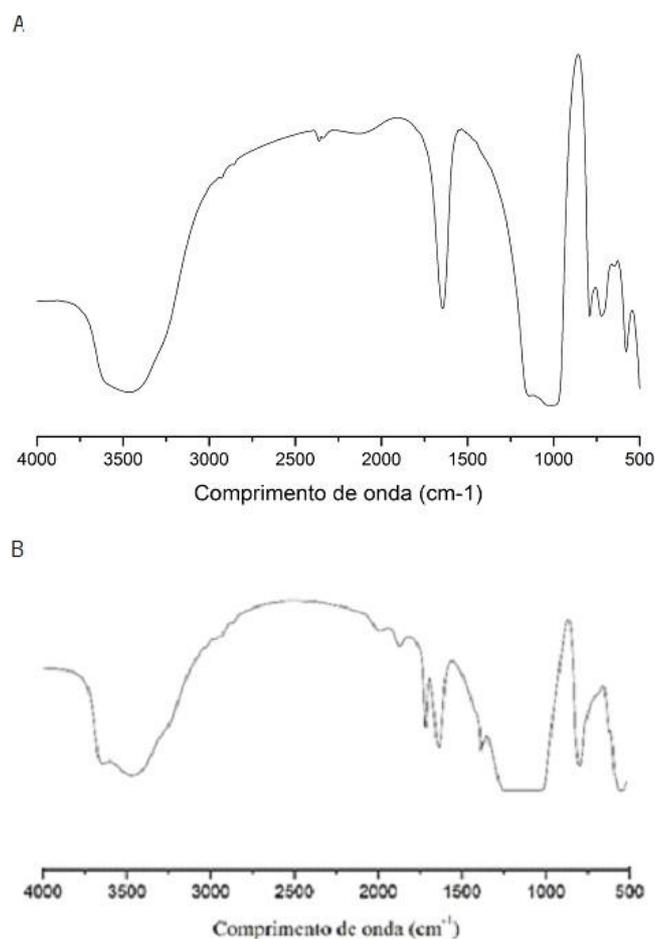


Figura 16 – Espectros FTIR dos zeólitos. NaY (A) e ZSM5 (B).

Na **Figura 17** estão representados os espectros FTIR dos antibióticos TC e PG. No espectro do antibiótico TC (Figura 17A), podem observar-se as suas principais bandas características como as ligações de alongamento N-H e O-H, as ligações aromáticas de alongamento C-H, a frequências entre os 3350 e 3000 cm^{-1} . Por volta das frequências 2900 e 1600 cm^{-1} observa-se as vibrações das ligações de alongamento CH_3 e $\text{C}=\text{C}$, respetivamente. As vibrações de deformação das ligações aromáticas C-H surgem por volta dos 1400 cm^{-1} e as vibrações de deformação das ligações CH_3 surgem por volta dos 1300 cm^{-1} . No espectro da PG, Figura 17B), as principais bandas geralmente são as vibrações de alongamento das ligações duplas $\text{C}=\text{O}$ e $\text{C}=\text{C}$ a frequências de 1700 e 1609 cm^{-1} , respetivamente. As vibrações de alongamento das ligações $\text{C}-\text{C}$ apresentam bandas de intensidade média alta a frequências de 1485 cm^{-1} . As vibrações de alongamento das ligações simétricas N-H e as ligações simples N-H surgem a frequências de 3300 e 1396 cm^{-1} .

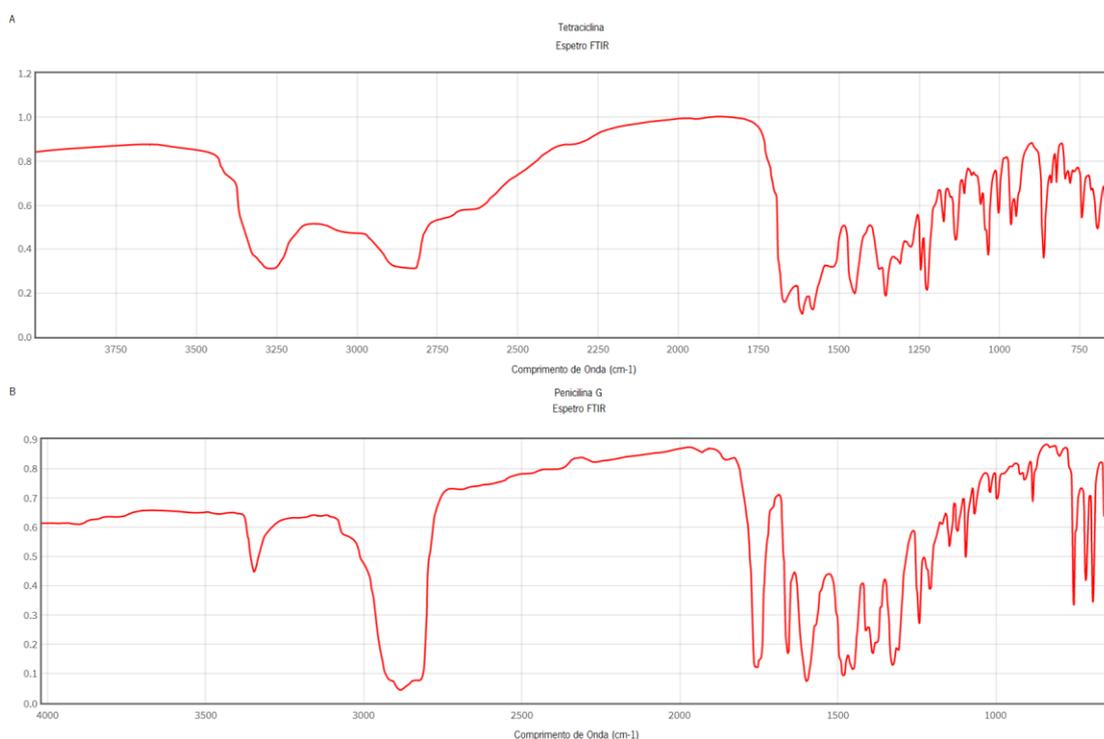


Figura 17 – Espectros FTIR dos antibióticos: A) Tetraciclina e B) Penicilina G. Imagem adaptada de (NIST).

Na **Figura 18** estão representados os espectros FTIR dos sistemas com o antibiótico TC: TC@NaY, TC_{3,3}@NaY e TC@ZSM5. Não foi detetada nenhuma banda característica do antibiótico TC no sistema TC@ZSM5 (Figura 18A), enquanto nos sistemas TC_{3,3}@NaY (Figura 18B) e TC@NaY (Figura 18C) observa-se a presença de duas bandas na região de frequências de 1500 cm⁻¹. As observações descritas anteriormente podem ser explicadas devido a ter existido pouco encapsulamento do antibiótico nos sistemas, principalmente no sistema TC@ZSM5. Nos sistemas com o zeólito NaY existe a formação de bandas a 1500 cm⁻¹ mas a intensidade das bandas é menor do que a intensidade produzida pelas bandas características do zeólito. Estas bandas são responsáveis pelas vibrações das ligações simples de alongamento de Carbono (C) (C-C) e ligações duplas de alongamento de C (C=C).

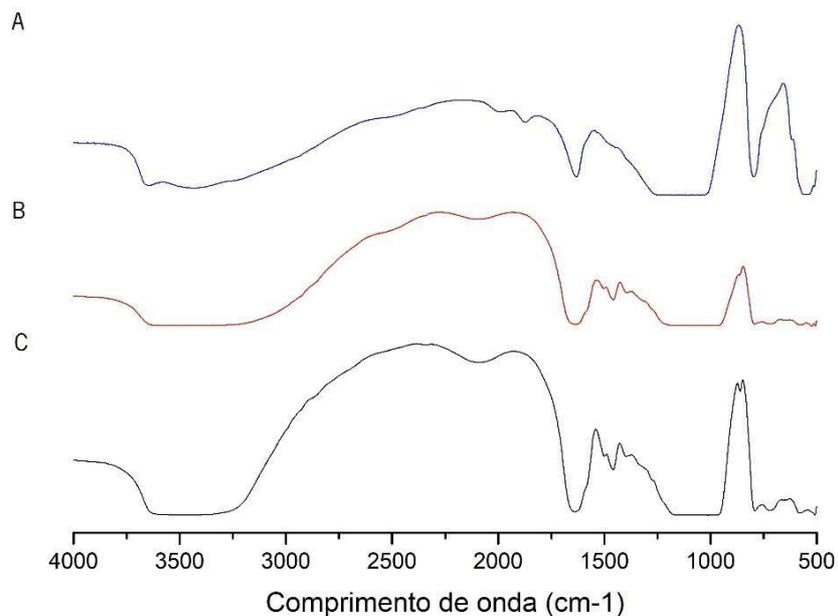


Figura 18 - Espectros FTIR dos sistemas com o antibiótico TC: A) TC@ZSM5; B) TC_{3.3}@NaY e C) TC@NaY.

Na **Figura 19** estão representados os espectros dos sistemas com o antibiótico PG. Tanto no espectro do sistema PG@ZSM5 (Figura 19A) como no de PG@NaY (Figura 19B), não se verificam as bandas características do antibiótico PG. Isto deve-se ao facto da quantidade de antibiótico presente no sistema ser muito reduzida e as bandas características do antibiótico estarem sobrepostas às bandas intensas do zeólito.

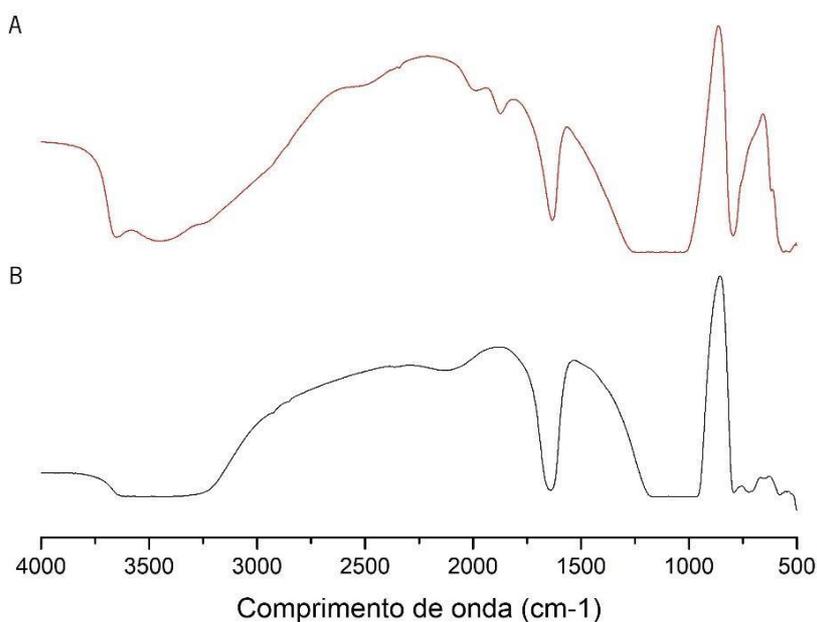


Figura 19 – Espectros FTIR dos sistemas com o antibiótico PG: A) PG@ZSM5 e B) PG@NaY.

3.1.4- Microscopia eletrónica de varrimento (SEM)

A morfologia dos vários sistemas utilizados neste trabalho foi observada através de SEM e foram comparados os sistemas que continham o mesmo antibiótico, mas zeólitos diferentes. Juntamente com a análise por SEM, foi feita uma análise por EDX (do inglês *energy dispersive X-ray*) que nos permite obter informação sobre os elementos que se encontram na superfície da amostra. Os valores obtidos pelas análises de EDX não representam a generalidade da amostra, mas sim o local de interação do feixe com a amostra.

Na **Figura 20** estão representadas as imagens obtidas por SEM dos zeólitos NaY e ZSM5 com a mesma ampliação (5000x).

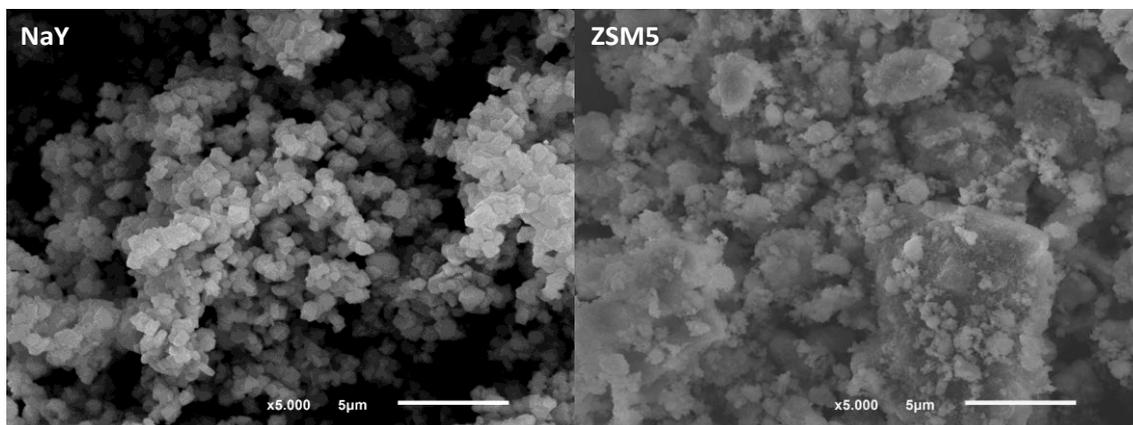


Figura 20 – Imagens obtidas pela análise SEM dos zeólitos NaY e ZSM5.

A análise das imagens dos zeólitos mostra que estes apresentam morfologias diferentes. NaY possui uma morfologia típica de zeólito aluminosilicato microcristalino, apresentando partículas de forma geométrica bem definidas e pequenas. Já o zeólito ZSM5 é caracterizado por morfologia irregular com partículas de tamanhos diferentes.

Na **Figura 21** estão representadas as imagens obtidas por SEM das amostras TC@NaY (ampliação 4400x) e TC_{3,3}@NaY (ampliação 7400x), sendo possível observar partículas do antibiótico TC na superfície do sistema TC@NaY (Figura 21A) enquanto no sistema TC_{3,3}@NaY (Figura 21B) essas mesmas partículas não são visíveis. Isto deve-se à presença da utilização de pH ácido durante a encapsulação do antibiótico que dissolve a TC e faz com que o antibiótico seja encapsulado mais no interior do zeólito do que na superfície do mesmo. É possível também observar que as partículas mantêm a mesma morfologia e tamanho.

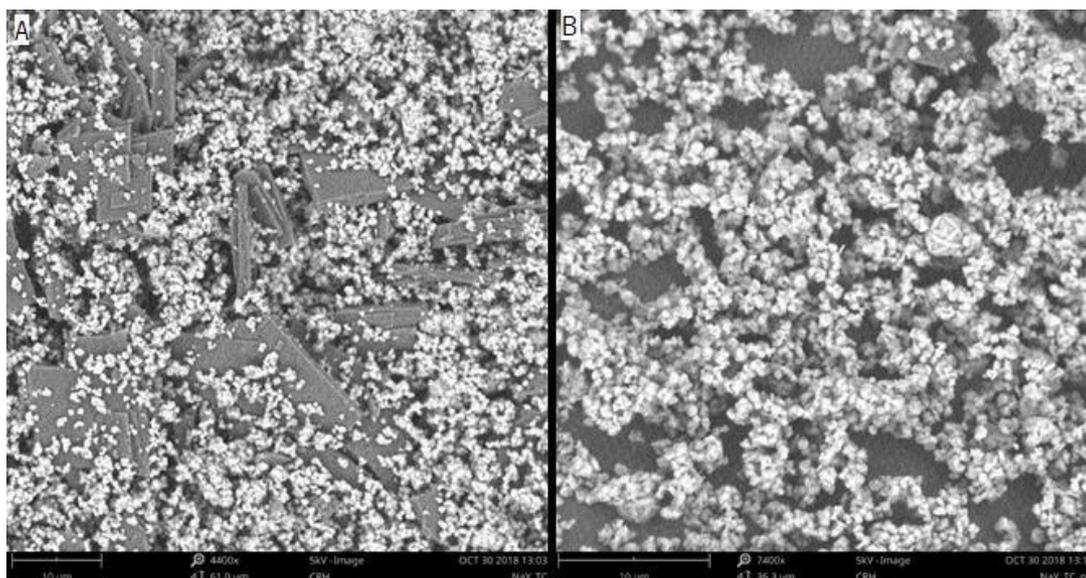


Figura 21 – Imagens obtidas pela análise SEM dos sistemas TC@NaY e TC_{3,3}@NaY: A) sistema TC@NaY onde se observa a presença dos cristais do antibiótico TC e B) sistema TC_{3,3}@NaY onde não se observa a presença dos cristais de TC.

Na **Figura 22** está representado o sistema TC@ZSM5 (ampliação 7400x). Tal como para os sistemas apresentados anteriormente, neste sistema também é possível observar que as partículas mantêm o mesmo tamanho e morfologia que o zeólito de partida.

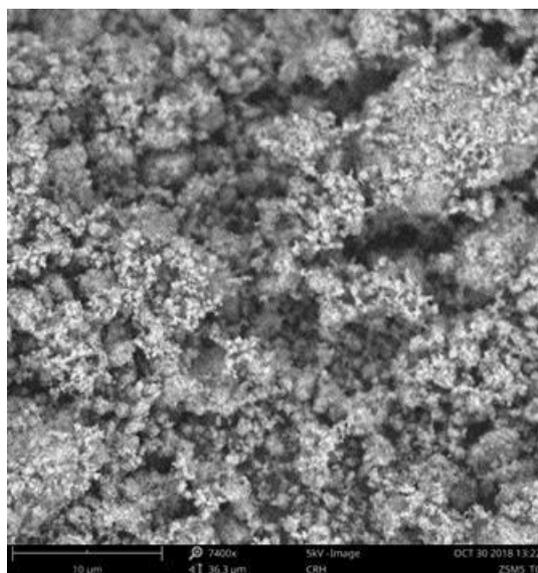


Figura 22 – Imagens obtidas pela análise SEM do sistema TC@ZSM5.

Na análise das imagens obtidas pela análise SEM dos sistemas PG@NaY (ampliação 7500x) (Figura 23A) e PG@ZSM5 (ampliação 5000x) (Figura 23B) não se observam alterações à morfologia do zeólito, observando-se que as partículas mantem o mesmo tamanho. Estas observações podem indicar que os antibióticos se encontram no interior dos zeólitos e não à sua superfície.

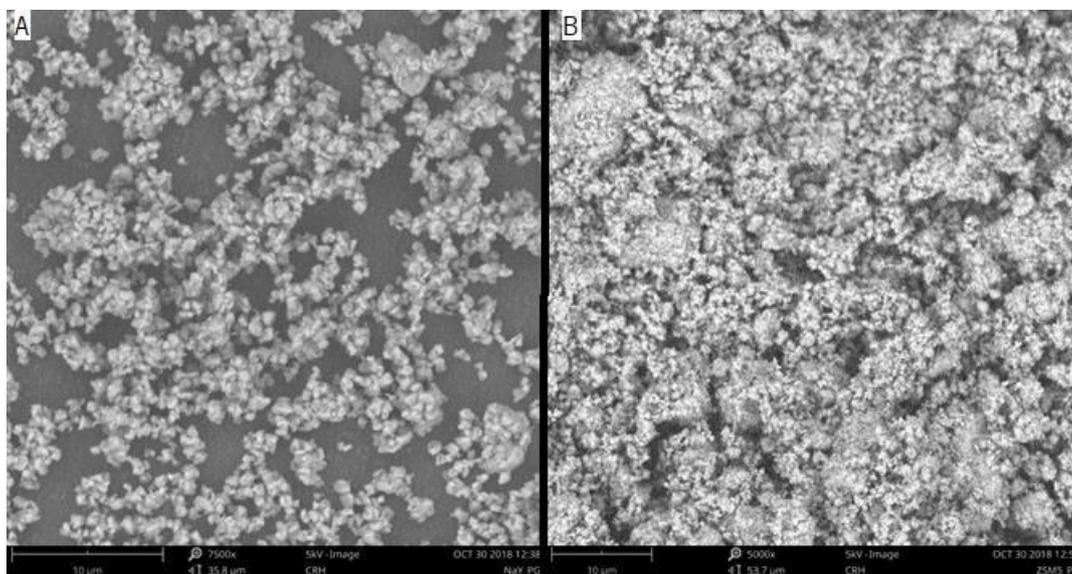


Figura 23 – Imagens obtidas pela análise SEM dos sistemas: A) PG@NaY e B) PG@ZSM5.

Os sistemas preparados apresentam a mesma morfologia e a introdução dos antibióticos não alterou o tamanho das partículas dos zeólitos, apenas se observando cristais de TC no sistema TC@NaY. Nas análises EDX realizadas em simultâneo com as análises SEM, são encontrados os elementos característicos dos zeólitos como o Oxigénio (O), Silício (Si), Alumínio (Al) e Sódio (Na), este último identificado no zeólito NaY. É também encontrado o Azoto (N) que está presente na composição dos antibióticos como se pode observar na **Figura 24**, onde estão representadas os espectros obtidos na análise EDX referentes aos elementos encontrados.

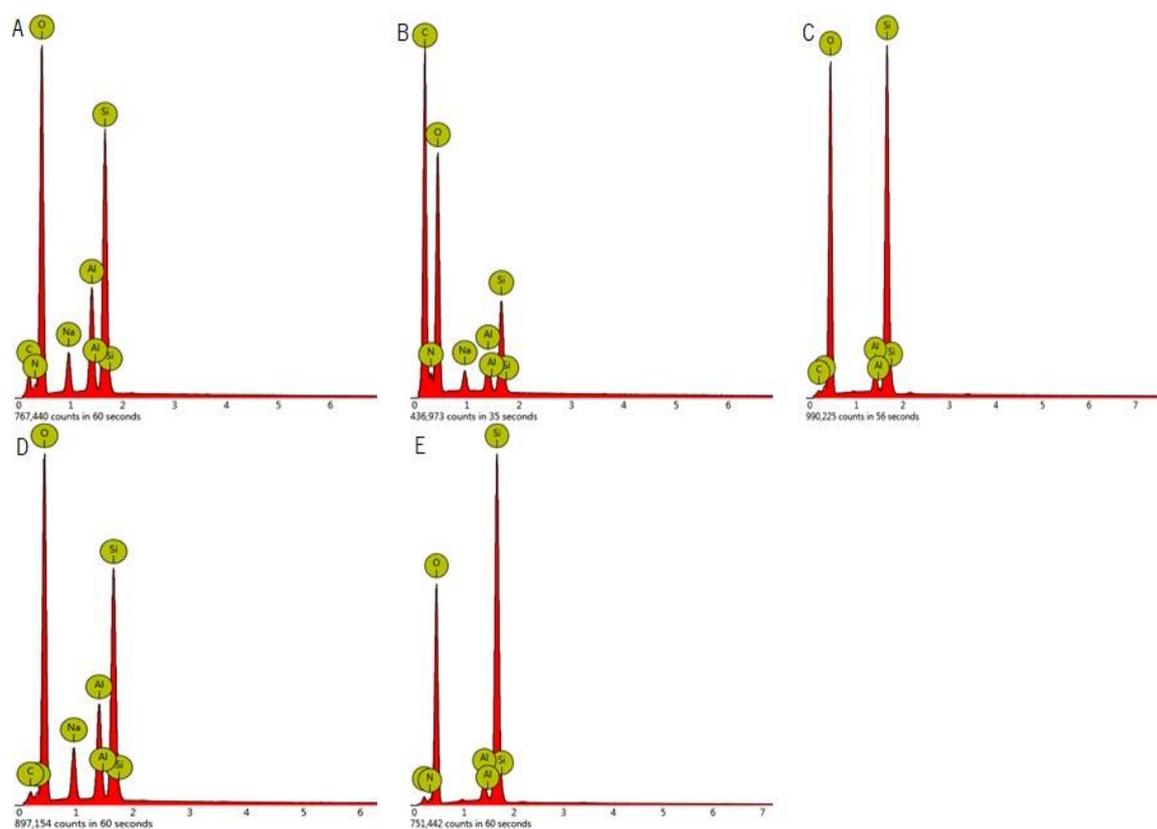


Figura 24 – Espectros de EDX para as várias amostras preparadas no presente trabalho: A) TC@NaY; B) TC_{3,3}@NaY; C) TC@ZSM5; D) PG@NaY e E) PG@ZSM5.

Na **Tabela 10** estão apresentadas as quantidades determinadas por EDX para as diferentes amostras, assim como a razão Si/Al.

Tabela 10 – Análise de EDX das amostras estudadas dada em massa (%).

Elementos	NaY	TC@NaY	TC _{3,3} @NaY	PG@NaY	ZSM5	TC@ZSM5	PG@ZSM5
O	51,3	49,54	51,71	58,93	54,3	72,83	58,13
Si	28,6	13,34	10,48	15,43	42,6	19,69	28,28
Al	11	5,76	4,70	6,99	2,8	1,47	2,15
Na	9,1	3,45	2,47	5,52	nd	nd	nd
N	-	5,14	6,48	4,30	-	4,19	3,93
Si/Al	2.51	2.23	2.15	2.13	14.67	12.92	12.68

nd- não determinado

De todos os sistemas preparados, o que apresenta maior quantidade de azoto é o sistema TC_{3,3}@NaY (6,48 %), como esperado devido à presença do ácido durante a sua preparação. Segue-seo TC@NaY com 5,14 % e o TC@ZSM5 com 4,19 %. O mesmo é observado para os sistemas com a penicilina, sendo que o NaY apresenta maior quantidade de azoto. Estes resultados estão de acordo com o obtido com as análises térmicas (Tabela 8). Independente do sistema, a razão Si/Al diminuí, provavelmente porque ocorre uma desaluminação dos zeólitos durante a sua preparação.

3.1.5- Espectroscopia UV/visível

Foram realizados estudos da libertação *in vitro* do antibiótico TC da estrutura dos zeólitos. Apenas foram realizados os estudos da libertação *in vitro* do antibiótico TC dos sistemas por serem os que obtiveram maior quantidade de antibiótico encapsulado, contrariamente ao observado no caso do antibiótico PG, de acordo com os resultados obtidos pelas análises de TGA e EDX (**Tabelas 8 e 10**). Dos sistemas preparados com a TC, foi escolhido o sistema TC_{3,3}@NaY por ter uma maior quantidade de antibiótico. Nos estudos realizados, foram utilizados dois comprimentos de onda diferentes, 276 e 357 nm, assim como dois solventes diferentes, PBS e H₂O ultrapura.

Na **Figura 25** estão representadas as curvas de saída do fármaco nos estudos de libertação medidos a comprimentos de onda de 276 nm nos dois solventes utilizados. Tanto no solvente PBS e H₂O ultrapura

(Figuras 25A e 25B, respetivamente) há uma libertação elevada do fármaco nos primeiros 45 min da experiência tendo depois sido constante.

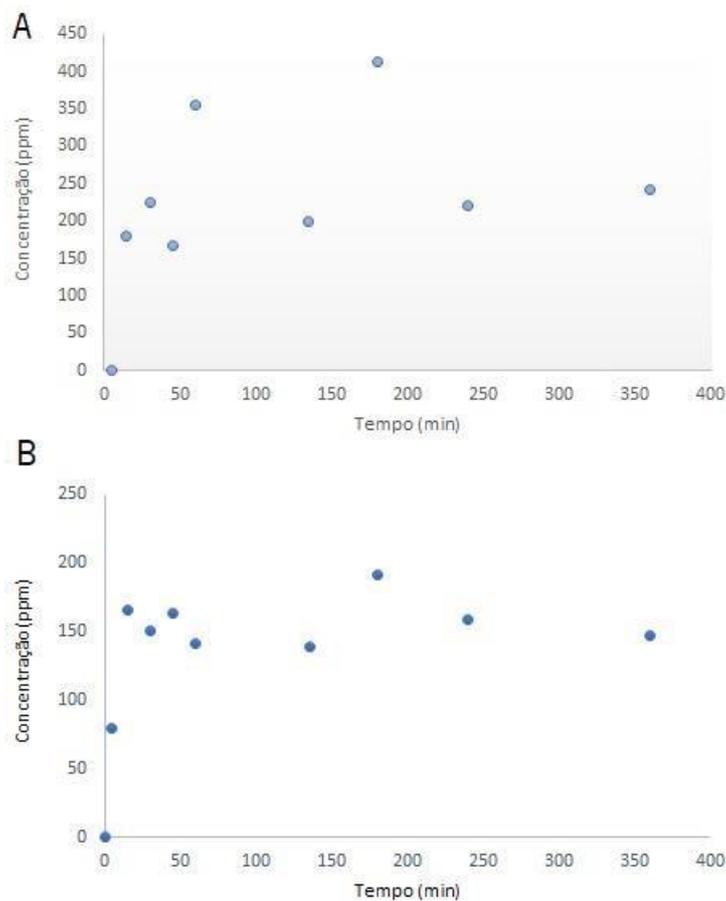


Figura 25 – Curvas de saída do antibiótico TC *in vitro* do sistema TC_{3,3}@NaY medidas por espectroscopia UV/Vis a 276 nm A) solvente PBS ou B) H₂O Ultrapura.

Na **Figura 26** estão representadas as curvas de saída do fármaco nos estudos de libertação medidos a comprimentos de onda de 357 nm nos dois solventes utilizados. Tal como verificado, tanto nas experiências com PBS como com H₂O ultrapura (Figuras 26A e 26B), há uma libertação rápida da TC nos primeiros minutos estabilizando até ao fim da experiência.

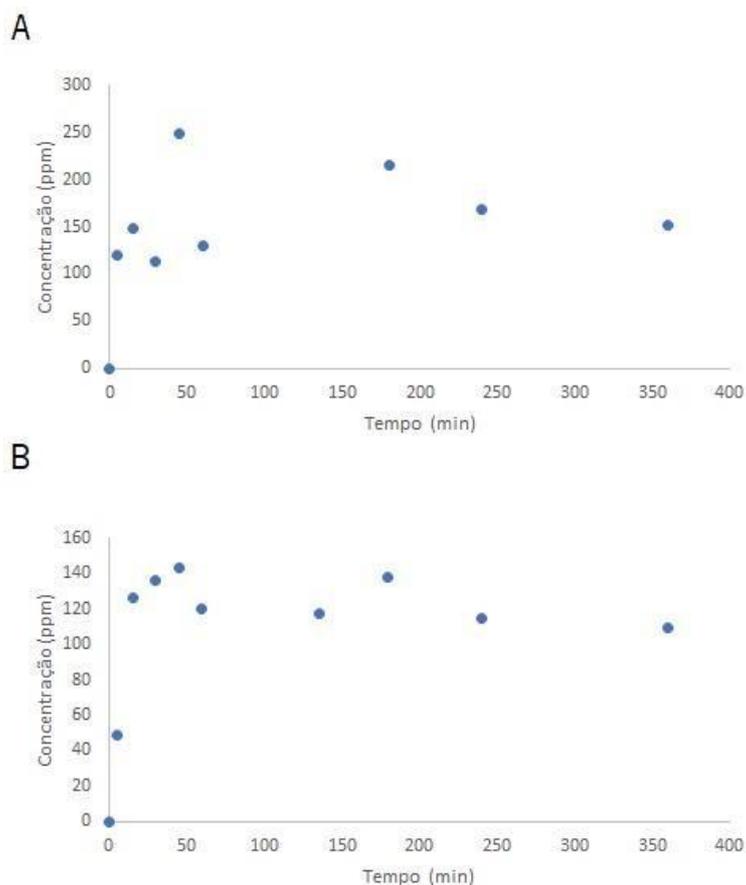


Figura 26 – Curvas de saída nos estudos de liberação do antibiótico TC *in vitro* medidos por espectroscopia UV/Vis a 357 nm. A) do sistema TC_{3,3}@NaY utilizando o solvente PBS e B) do sistema TC_{3,3}@NaY utilizando o solvente H₂O Ultrapura.

Estes resultados vão encontro aos resultados de experiências similares descritas na literatura, apesar de serem utilizados outros sistemas para a encapsulação do antibiótico como o caso de materiais mesoporosos como o SBA-15 e o MCM-41 (Hashemikia, Hemmatinejad, Ahmadi, & Montazer, 2015; Koneru et al., 2015).

3.2- Avaliação da atividade antimicrobiana

Após uma extensa caracterização dos sistemas e estudo da liberação *in vitro* dos antibióticos dos zeólitos, foi avaliada a atividade antimicrobiana dos cinco sistemas preparados - TC@NaY, TC_{3,3}@NaY, TC@ZSM5, PG@NaY e PG@ZSM5 - assim como dos antibióticos TC e PG contra as bactérias Gram-positivas *Staphylococcus aureus* sensível a Meticilina (MSSA), *Staphylococcus aureus* resistente a Meticilina (MRSA) e *Propionibacterium acnes* (*P. acnes*) e as Gram-negativas *Escherichia coli* (*E. coli*) e

Pseudomonas aeruginosa (*P. aeruginosa*). Estes microrganismos foram escolhidos por estarem associados a doenças de pele ou, como o MRSA e *P. aeruginosa*, estarem classificados como microrganismos para os quais o desenvolvimento de novos métodos de combate tem sido considerado críticos. Os valores de MIC obtidos para os antibióticos estão descritos na **Tabela 11**.

Tabela 11 – Valores de MIC obtidos para os antibióticos Tetraciclina e Penicilina G.

Microrganismos	Antibióticos (µg/mL)	
	TC	PG
MSSA	0,4	0,05
MRSA	80	>3000
<i>P. acnes</i>	0,4	4,0
<i>E. coli</i>	1,8	5,0
<i>P. aeruginosa</i>	20	>500

MSSA é mais sensível para o antibiótico PG do que para o antibiótico TC. Isto deve-se ao facto de ser um microrganismo Gram-positivo e o mecanismo da ação da PG está associado à inibição da síntese da parede celular. Já *E. coli* apresenta uma maior sensibilidade para o antibiótico TC do que para o antibiótico PG devido a ser um microrganismo Gram-negativo: para além de possuir menor quantidade de peptidoglicano na sua parede celular (associado ao mecanismo de ação da PG, **Figura 6**). Também é possível observar que MRSA e *P. aeruginosa* são realmente muito mais resistentes comparativamente aos outros microrganismos utilizados.

Os resultados obtidos para as estirpes MSSA e *P. aeruginosa* estão de acordo com os valores obtidos na literatura. Para a estirpe *E. coli* apenas os MIC obtidos para o antibiótico TC é que são condizentes com o descrito na literatura enquanto o valor obtido para a PG é inferior ao valor da literatura (Reimer, et al., 1981). Para *P. acnes* constatou-se que o valor de MIC da PG é superior ao de TC enquanto na literatura é descrito o contrário (Biswal et al., 2016). Para MRSA, o valor obtido para o antibiótico TC foi inferior ao valor descrito na literatura (Matymia, et al., 2005).

Após determinados os valores MIC dos antibióticos sozinhos, procedeu-se aos ensaios da avaliação da atividade antimicrobiana dos sistemas. Nos vários ensaios realizados foram verificadas dificuldades na preparação das placas de LBA com os sistemas devido à dificuldade de dissolução deste tipo de material, estruturas zeolíticas, em meios líquidos. Numa fase inicial, foi testada toda a gama de concentrações como nos ensaios de determinação dos valores de MIC para os antibióticos. Nesses primeiros ensaios,

verificou-se que as concentrações eram superiores aos valores MIC obtidos para os ensaios com os antibióticos. Nesse sentido, decidiu-se não continuar os testes para os microrganismos MRSA e *P. aeruginosa*. Verificou-se também que os valores MIC eram iguais tanto para os sistemas NaY como para os sistemas com o zeólito ZSM5. Na **Tabela 12** estão representados os resultados finais obtidos após as diferentes experiências de otimização.

Tabela 12 – Valores MIC obtidos para os sistemas preparados no presente trabalho.

Microrganismos	Sistemas				
	TC@NaY	TC3,3@NaY	TC@ZSM5	PG@NaY	PG@ZSM5
MSSA		1,4		>5,0	
<i>P. acnes</i>		1,4		>5,0	
<i>E. coli</i>		>2,0		>5,0	

Os resultados obtidos não foram ao encontro dos resultados obtidos com os valores obtidos para os antibióticos, tendo sido determinados valores de MIC superiores aos dos antibióticos. Devido aos resultados obtidos pelos estudos da libertação *in vitro* do antibiótico TC da estrutura dos zeólitos, era expectável que os valores dos MIC obtidos para os sistemas fossem pelo menos iguais aos valores de MIC obtidos para os antibióticos, já que existe quase uma libertação total do antibiótico dos sistemas. Por outro lado, os sistemas com o antibiótico exibem atividade, significando que o antibiótico depois de libertado encontra-se ativo; no entanto esta atividade necessita de uma concentração de antibiótico três vezes superior à concentração demonstrada pelo antibiótico sozinho. Estudos realizados com a utilização da TC com materiais mesoporosos indicam que existe uma maior eficácia da TC quando se encontra encapsulada do que quando se encontra sozinha (Koneru et al., 2015).

Devido a estes resultados, não foi possível testar a atividade antitumoral dos sistemas preparados.

CAPÍTULO 4 – CONCLUSÕES E TRABALHO FUTURO

4 CONCLUSÕES E TRABALHO FUTURO

Este trabalho teve como objetivo avaliar a atividade antimicrobiana de antibióticos encapsulados em zeólitos a fim de prevenir infecções bacterianas. Para tal, foram utilizados dois antibióticos com modos de ação diferentes, Tetraciclina (TC) e Penicilina G (PG). Estes dois antibióticos foram encapsulados em dois zeólitos diferentes, o zeólito NaY e o zeólito ZSM5, formando assim cinco sistemas distintos: TC@NaY, TC_{3,3}@NaY, TC@ZSM5, PG@NaY e PG@ZSM5.

Os sistemas preparados foram caracterizados por Análise Termogravimétrica (TGA), Isotérmicas de adsorção N₂, Espetroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR), Microscopia eletrônica de varrimento (SEM) e Espetroscopia de UV/Visível. Concluiu-se que os sistemas que utilizavam o zeólito NaY eram capazes de encapsular maior quantidade de antibiótico que os sistemas com o zeólito ZSM5, e quando se realizava a encapsulação em meio ácido com o NaY, verificou-se uma maior retenção do antibiótico TC.

Foi avaliada a atividade antimicrobiana dos sistemas preparados, comparando-se os valores obtidos das concentrações mínimas inibitórias MIC, (do inglês *minimum inhibitory concentration*) dos antibióticos com os valores MIC dos sistemas. As propriedades antibacterinas foram avaliadas contra microrganismos Gram-Positivos - MSSA, MRSAe *Propionibacterium acnes*- e microrganismos Gram-Negativos- *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*.

Concluiu-se uma maior resistência de MRSA e *P. aeruginosa* aos antibióticos do que os restantes microrganismos. Os MIC apresentados dos antibióticos foram 80 e 20 µg/mL para a TC, e >3000 e >500 µg/mL para PG, contra MRSA e *P. aeruginosa*, respetivamente. Os sistemas preparados com o zeólito NaY apresentaram resultados mais promissores, os MIC foram três vezes superiores para os sistemas com TC no NaY enquanto para os sistemas com PG não foram detetados valores de MIC para ambos os zeólitos. Apesar dos sistemas exibirem atividade antimicrobiana, os valores de MIC obtidos para os sistemas foram superiores aos valores de MIC dos antibióticos sozinhos.

Os resultados obtidos neste trabalho experimental deixaram em aberto algumas linhas de investigação para o aperfeiçoamento de sistemas com propriedades antimicrobianas, com antibióticos encapsulados em zeólitos. Assim, de seguida, apresentam-se algumas sugestões de trabalho futuro.

O zeólito NaY foi selecionado como recetor de antibióticos com propriedades antimicrobianas tendo em consideração os resultados de caracterização das diferentes análises químicas e também de ensaios de

avaliação da atividade antimicrobiana. Apesar desta estrutura se ter demonstrado mais eficiente na sua função do que o zeólito ZSM5, seria interessante testar estruturas porosas diferentes, como por exemplo as estruturas mesoporosas MCM-41 e SBA-15, pois estas permitiriam uma maior capacidade de encapsulamento do antibiótico.

Uma vez que estas moléculas se encontram encapsuladas, provavelmente necessitam de tempo para a sua libertação. Nesse sentido era importante utilizar testes antimicrobianos que permitissem a saída dos antibióticos, como por exemplo os testes em fase líquida.

Era também relevante verificar a atividade antitumoral dos sistemas, uma vez que é conhecido os efeitos benéficos dos antibióticos no cancro.

CAPÍTULO 5 – REFERÊNCIAS

BIBLIOGRÁFICAS

5- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ahmedzeki, N., Yilmaz, S., & Al-Tabbakh, B. (2016). Nanocrystalline zeolite Y: Synthesis and characterization. *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*, 12(1). <https://doi.org/10.1088/1757-899X/17/1/012030>
- Aslam, B., Wang, W., Arshad, M. I., Khurshid, M., Muzammil, S., Rasool, M. H., Baloch, Z. (2018). Antibiotic resistance: a rundown of a global crisis. *Infection and Drug Resistance*, 11, 1645–1658. <https://doi.org/10.2147/IDR.S173867>
- Baerlocher, C., Olson, D., & Meier, W. (2001). *Atlas of Zeolite Framework Types* (5th ed.; Elsevier, ed.).
- Berthomieu, C., Ae, C. B., & Hienerwadel, R. (2009). *Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy Molecular mechanisms of uranium tolerance View project Radionuclide-protein interactions View project Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy*. (December), 157–170. <https://doi.org/10.1007/s11120-009-9439-x>
- Biswal, I., Gaiind, R., Kumar, N., Mohanty, S., Manchanda, V., Khunger, N., Deb, M. (2016). In vitro antimicrobial susceptibility patterns of propionibacterium acnes isolated from patients with acne vulgaris. *Journal of Infection in Developing Countries*, 10(10), 1140–1145. <https://doi.org/10.3855/jidc.6862>
- Bogdanov, B., Georgiev, D., Angelova, K., & Hristov, Y. (2009). Synthetic Zeolites and their Industrial and Environmental Applications. *Science*, IV(June), 1–5.
- Boschetto, D. L., Lerin, L., Cansian, R., Pergher, S. B. C., & Di Luccio, M. (2012). Preparation and antimicrobial activity of polyethylene composite films with silver exchanged zeolite-Y. *Chemical Engineering Journal*, 204–205, 210–216. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2012.07.111>
- Braschi, I., Blasioli, S., Gigli, L., Gessa, C. E., Alberti, A., & Martucci, A. (2010). Removal of sulfonamide antibiotics from water: Evidence of adsorption into an organophilic zeolite Y by its structural modifications. *Journal of Hazardous Materials*, 178(1–3), 218–225. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2010.01.066>
- Cervini, P., MacHado, L. C. M., Ferreira, A. P. G., Ambrozini, B., & Cavalheiro, É. T. G. (2016). Thermal decomposition of tetracycline and chlortetracycline. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, 118, 317–324. <https://doi.org/10.1016/j.jaap.2016.02.015>
- Crane, J. K., Hohman, D. W., Nodzo, S. R., & Duquin, T. R. (2013). Antimicrobial susceptibility of Propionibacterium acnes isolates from shoulder surgery. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 57(7), 3424–3426. <https://doi.org/10.1128/AAC.00463-13>
- Daghrir, R., & Drogui, P. (2013). Tetracycline antibiotics in the environment: A review. *Environmental Chemistry Letters*, 11(3), 209–227. <https://doi.org/10.1007/s10311-013-0404-8>
- Doi, Y., & Chambers, H. F. (2014). Penicillins and B-Lactamase Inhibitors. In *Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases* (Eighth Edi, Vol. 1). <https://doi.org/10.1016/B978-1-4557-4801-3.00020-5>
- Drugbank. (n.d.-a). Benzypenicillin. Retrieved October 27, 2019, from <https://www.drugbank.ca/drugs/DB01053>.
- Drugbank. (n.d.-b). Tetracycline. Retrieved October 27, 2019, from <https://www.drugbank.ca/drugs/DB00759>.
- Duygu, D., Baykal, T., Açikgöz, I., & Yildiz, K. (2009). Fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopy for biological studies. *Gazi University Journal of Science*, 22(3), 117–121.
- E Mgbemere, H., C. Ekpa, I., & I. Lawal, G. (2017). Zeolite Synthesis, Characterisation and Application Areas: A Review. *International Research Journal of Environmental Sciences*, 6(October), 45–59. <https://doi.org/10.1002/bit.20704>
- Ferreira, L., Fonseca, A. M., Botelho, G., Aguiar, C. A., & Neves, I. C. (2012). Antimicrobial activity of faujasite zeolites doped with silver. *Microporous and Mesoporous Materials*, 160, 126–132. <https://doi.org/10.1016/j.micromeso.2012.05.006>
- Following, R., & Therapy, H. (2001). Tetracycline Antibiotics : Mode of Action , Applications , Molecular Biology , and Epidemiology of Bacterial Resistance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 65(2), 232–260. <https://doi.org/10.1128/MMBR.65.2.232>
- Fontes, G. C., Calado, V. M. A., Rossi, A. M., & Rocha-Leão, M. H. M. Da. (2013). Characterization of antibiotic-loaded alginate-osa starch microbeads produced by ionotropic pregelation. *BioMed Research International*, 2013. <https://doi.org/10.1155/2013/472626>
- Foster, T. J., & Geoghegan, J. A. (2015). Chapter 37 – Staphylococcus aureus. In *Molecular Medical Microbiology*.

- <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-397169-2.00037-8>
- Freitas, C. M. A. S., Soares, O. S. G. P., Órfão, J. J. M., Fonseca, A. M., Pereira, M. F. R., & Neves, I. C. (2015). Highly efficient reduction of bromate to bromide over mono and bimetallic ZSM5 catalysts. *Green Chemistry*, *17*(8), 4247–4254. <https://doi.org/10.1039/c5gc00777a>
- Gao, Y., Li, Y., Zhang, L., Huang, H., Hu, J., Shah, S. M., & Su, X. (2012). Adsorption and removal of tetracycline antibiotics from aqueous solution by graphene oxide. *Journal of Colloid and Interface Science*, *368*(1), 540–546. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2011.11.015>
- Gaynes, R. (2017). The discovery of penicillin—new insights after more than 75 years of clinical use. *Emerging Infectious Diseases*, *23*(5), 849–853. <https://doi.org/10.3201/eid2305.161556>
- Goldstein, J., Newbury, D., Joy, D., Lyman, C., Echlin, P., Lifshin, E., ... Michael, J. (2012). *Scanning Electron Microscopy and X-Ray Microanalysis* (3rd ed.). Springer Science & Business Media.
- Goleman, daniel; boyatzis, Richard; Mckee, A. (2019). <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Gupta, A., Mumtaz, S., Li, C. H., Hussain, I., & Rotello, V. M. (2019). Combatting antibiotic-resistant bacteria using nanomaterials. *Chemical Society Reviews*, *48*(2), 415–427. <https://doi.org/10.1039/c7cs00748e>
- Han, S. M., Kim, J. M., Hong, I. P., Woo, S. O., Kim, S. G., Jang, H. R., & Pak, S. C. (2016). Antibacterial activity and antibiotic-enhancing effects of honeybee venom against methicillin-resistant staphylococcus aureus. *Molecules*, *21*(1), 1–9. <https://doi.org/10.3390/molecules21010079>
- Hashemikia, S., Hemmatinejad, N., Ahmadi, E., & Montazer, M. (2015). Optimization of tetracycline hydrochloride adsorption on amino modified SBA-15 using response surface methodology. *Journal of Colloid and Interface Science*, *443*, 105–114. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2014.11.020>
- Hemeg, H. A. (2017). Nanomaterials for alternative antibacterial therapy. *International Journal of Nanomedicine*, *12*, 8211–8225. <https://doi.org/10.2147/IJN.S132163>
- Inkson, B. J. (2016). Scanning Electron Microscopy (SEM) and Transmission Electron Microscopy (TEM) for Materials Characterization. In *Materials Characterization Using Nondestructive Evaluation (NDE) Methods*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100040-3.00002-X>
- International Zeolite Association DataBase. (n.d.). Retrieved October 22, 2019, from <http://www.iza-structure.org/databases/>
- Jang, J., Hur, H. G., Sadowsky, M. J., Byappanahalli, M. N., Yan, T., & Ishii, S. (2017). Environmental Escherichia coli: ecology and public health implications—a review. *Journal of Applied Microbiology*, *123*(3), 570–581. <https://doi.org/10.1111/jam.13468>
- Jenny, M., & Kingsbury, J. (2018). Properties and Prevention: A Review of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Biology and Medical Research*, *2*(3), 1–8. Retrieved from <http://www.imedpub.com/articles/properties-and-prevention-a-review-ofpseudomonas-aeruginosa.php?aid=23355>
- Joy, D. (1997). Scanning electron microscopy for materials characterization. *Current Opinion in Solid State and Materials Science*, *2*(4), 465–468. [https://doi.org/10.1016/s1359-0286\(97\)80091-5](https://doi.org/10.1016/s1359-0286(97)80091-5)
- Julbe, A., Drobek, M., Européen, I., & De, U. (2016). Encyclopedia of Membranes. *Encyclopedia of Membranes*. <https://doi.org/10.1007/978-3-662-44324-8>
- Kapoor, G., Saigal, S., & Elongavan, A. (2017). Action and resistance mechanisms of antibiotics: A guide for clinicians. *Journal of Anaesthesiology Clinical Pharmacology, Volume 33*(Issue 3), 300–305. <https://doi.org/10.4103/joacp.JOACP>
- Knox, J., Uhlemann, A. C., & Lowy, F. D. (2015). Staphylococcus aureus infections: Transmission within households and the community. *Trends in Microbiology*, *23*(7), 437–444. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2015.03.007>
- Koneru, B., Shi, Y., Wang, Y. C., Chavala, S. H., Miller, M. L., Holbert, B., Di Pasqua, A. J. (2015). Tetracycline-containing MCM-41 mesoporous silica nanoparticles for the treatment of Escherichia coli. *Molecules*, *20*(11), 19690–19698. <https://doi.org/10.3390/molecules201119650>
- Li, W., Atkinson, G. C., Thakor, N. S., Lu, C., Tenson, T., Schulten, K., Biophysics, M. (2013). *Mechanism of Tetracycline Resistance by Ribosomal Protection Protein Tet(O)*. <https://doi.org/10.1038/ncomms2470>. Mechanism
- Liu, P. S., & Chen, G. F. (2014). Characterization methods: basic factors. *Porous Materials*, 411–492. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-407788-1.00009-5>
- Lobanovska, M., & Pilla, G. (2017). Penicillin's discovery and antibiotic resistance: Lessons for the future? *Yale Journal of Biology and Medicine*, *90*(1), 135–145.

- Lowy, F. (1998). the chromosome, as well as the extrachromosomal elements. 6 These genes are transferred between staphylococcal strains, species, or other gram-positive bacterial species through the extrachromosomal elements. 7. *New England Journal of Medicine*, 339, 520–532. <https://doi.org/10.1056/NEJM199808203390806>
- Matymia, B., Młodzinska, E., & Hryniewicz, W. (2005). Antimicrobial susceptibility patterns of *Staphylococcus aureus* in Poland obtained by the National Quality Assurance Programme. *Clinical Microbiology and Infection*, 11(5), 379–385. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2005.01105.x>
- Matynia, B., Młodzinska, E., & Hryniewicz, W. (2005). Antimicrobial susceptibility patterns of *Staphylococcus aureus* in Poland obtained by the National Quality Assurance Programme. *Clinical Microbiology and Infection*, 11(5), 379–385. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2005.01105.x>
- McCusker, L. B., & Baerlocher, C. (2005). Zeolite structures. *Studies in Surface Science and Catalysis*, 157, 41–64. https://doi.org/10.1007/978-94-009-6128-9_2
- Mechanism of Action - Tetracycline. (n.d.). Retrieved October 21, 2019, from <http://www.antibiotics-info.org/tetracycline.html>
- Miller, E. L. (2002). The penicillins: A review and update. *Journal of Midwifery and Women's Health*, 47(6), 426–434. [https://doi.org/10.1016/S1526-9523\(02\)00330-6](https://doi.org/10.1016/S1526-9523(02)00330-6)
- Mohr, K. (2012). History of Antibiotics Research. *Henipavirus Membrane Fusion and Viral Entry*, 359(March), 79–94. <https://doi.org/10.1007/82>
- Moon, M. (2019). Essential Basic Bacteriology in Managing Musculoarticular Infection: Bacterial Anatomy, Their Behavior, Host Phagocytic Activity, Immune System, Nutrition, And Antibiotics. *Asian Spine Journal*, 13(2), 343–356. <https://doi.org/https://doi.org/10.31616/asj.2017.0239>
- Moradali, M. F., Ghods, S., & Rehm, B. H. A. (2017). *Pseudomonas aeruginosa* lifestyle: A paradigm for adaptation, survival, and persistence. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 7(FEB). <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00039>
- Nathwani, D., & Wood, M. J. (1993). Penicillins: A Current Review of their Clinical Pharmacology and Therapeutic Use. *Drugs*, 45(6), 866–894. <https://doi.org/10.2165/00003495-199345060-00002>
- Nelson, M. L., & Levy, S. B. (2011). The history of the tetracyclines. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1241(1), 17–32. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2011.06354.x>
- Nicolaou, K. C., & Rigol, S. (2018). A brief history of antibiotics and select advances in their synthesis. *Journal of Antibiotics*, 71(2), 153–184. <https://doi.org/10.1038/ja.2017.62>
- Nilapwar, S. M., Nardelli, M., Westerhoff, H. V., & Verma, M. (2011). Picosecond relaxation of mlct excited states of Re by TRR, UV-Vis and IR. In *J. Phys. Chem. A* (1st ed., Vol. 500). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385118-5.00004-9>
- NIST. (n.d.-a). Benzylpenicillin. Retrieved October 27, 2019, from <https://webbook.nist.gov/cgi/formula?ID=B6005399&Mask=80>
- NIST. (n.d.-b). Tetracycline hydrochloride. Retrieved October 27, 2019, from <https://webbook.nist.gov/cgi/cbook.cgi?ID=C64755&Type=IR-SPEC&Index=0>
- Oprica, C., Nord, C. E., Kalenic, S., Chmelar, D., Lundgren, B., Könönen, E., ... Lund, B. (2005). European surveillance study on the antibiotic susceptibility of *Propionibacterium acnes*. *Clinical Microbiology and Infection*, 11(3), 204–213. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2004.01055.x>
- Pavelić, S. K., Medica, J. S., Gumbarević, D., Filošević, A., Pržulj, N., & Pavelić, K. (2018). Critical review on zeolite clinoptilolite safety and medical applications in vivo. *Frontiers in Pharmacology*, 9(NOV), 1–15. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.01350>
- Peacock, S. J., & Paterson, G. K. (2015). Mechanisms of Methicillin Resistance in *Staphylococcus aureus*. *Annual Review of Biochemistry*, 84(1), 577–601. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-060614-034516>
- Perry, A., & Lambert, P. (2011). *Propionibacterium acnes*: Infection beyond the skin. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, 9(12), 1149–1156. <https://doi.org/10.1586/eri.11.137>
- Poirel, L., Madec, J., Lupo, A., Schink, A., Kieffer, N., Nordmann, P., & Schwarz, S. (2018). Antimicrobial Resistance in *Escherichia coli*. *Microbiology Spectrum*, 6(4). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.arba-0026-2017>
- Reimer, L. G., Stratton, C. W., & Reller, L. B. (1981). Minimum inhibitory and bactericidal concentrations of 44 antimicrobial agents against three standard control strains in broth with and without human serum. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 19(6), 1050–1055. <https://doi.org/10.1128/AAC.19.6.1050>

- Rocha, A. J., Barsottini, M. R. de O., Rocha, R. R., Laurindo, M. V., Moraes, F. L. L. de, & Rocha, S. L. da. (2019). Pseudomonas Aeruginosa: Virulence Factors and Antibiotic Resistance Genes. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 62. <https://doi.org/10.1590/1678-4324-2019180503>
- Rubin, J., Ball, K., & Chirino-Trejo, M. (2011). Antimicrobial susceptibility of Staphylococcus aureus and Staphylococcus pseudintermedius isolated from various animals. *The Canadian Veterinary Journal*, 52(2), 153–157.
- Sing, K. (2001). The use of nitrogen adsorption for the characterisation of porous materials. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 187–188, 3–9. [https://doi.org/10.1016/S0927-7757\(01\)00612-4](https://doi.org/10.1016/S0927-7757(01)00612-4)
- Slayter, E., & Slayter, H. (1992). *Light and Electron Microscopy*. Cambridge University Press.
- Speer, B. S., Shoemaker, N. B., & Salyers, A. A. (1992). Bacterial resistance to tetracycline: Mechanisms, transfer, and clinical significance. *Clinical Microbiology Reviews*, 5(4), 387–399. <https://doi.org/10.1128/CMR.5.4.387>
- Taufiqurrahmi, N., Mohamed, A. R., & Bhatia, S. (2011). Nanocrystalline zeolite Y: Synthesis and characterization. *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*, 17(1). <https://doi.org/10.1088/1757-899X/17/1/012030>
- Ul-Hamid, A. (2018). *A Beginners' Guide to Scanning Electron Microscopy*. Springer.
- Verma, G., & Mishra, M. (2018). Development and Optimization of UV-Vis Spectroscopy - A Review. *World Journal of Pharmaceutical Research*, 7(11), 1170–1180. <https://doi.org/10.20959/wjpr201811-12333>
- Vila, J., Sáez-López, E., Johnson, J. R., Römling, U., Dobrindt, U., Cantón, R., ... Soto, S. M. (2016). Escherichia coli: An old friend with new tidings. *FEMS Microbiology Reviews*, 40(4), 437–463. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuw005>
- Vilaça, N. (2013). Potentiation of 5-fluorouracil encapsulated in zeolites as drug delivery systems for in vitro models of colorectal carcinoma. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 112, 237–244. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2013.07.042>
- Vinaches, P., Bernardo-Gusmão, K., & Pergher, S. B. C. (2017). An introduction to zeolite synthesis using imidazolium-based cations as organic structure-directing agents. *Molecules*, 22(8). <https://doi.org/10.3390/molecules22081307>
- Wang, Linlin; Hu, C. S. L. (2017). The-antimicrobial-activity-of-nanoparticles--present-situati. *International Journal of Nanomedicine*, 12, 1227–1249. <https://doi.org/10.2147/IJN.S121956>
- Weitkamp, J. (2000). Defense Technical Information Center Compilation Part Notice solid Zeolites and catalysis. *Solid State Ionics*, (131), 175–188. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0167-2738\(00\)00632-9](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0167-2738(00)00632-9)
- World Health Organization. (2017). WHO publishes list of bacteria for which new antibiotics are urgently needed. Retrieved October 27, 2019, from <https://www.who.int/news-room/detail/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>
- World Health Organization. (2018). Antimicrobial resistance. Retrieved October 27, 2019, from <https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance>
- Worsfold, P. J., Plymouth, U. De, Unido, R., Zagatto, E. A. G., & Paulo, U. D. S. (2017). Espectrofotometria : Visión general ☆. In *Encyclopedia of Analytical Science 3rd edition* (3rd ed., Vol. 9). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-409547-2.14265-9>
- Xu, R., Pang, W., Yu, J., Huo, Q., & Chen, J. (2010). Chemistry of Zeolites and Related Porous Materials: Synthesis and Structure. *Chemistry of Zeolites and Related Porous Materials: Synthesis and Structure*. <https://doi.org/10.1002/9780470822371>
- Yocum, R. R., Rasmussen, J. R., & Strominger, J. L. (1980). " E). 255(9), 3977–3986.
- Zaman, S. Bin, Hussain, M. A., Nye, R., Mehta, V., Mamun, K. T., & Hossain, N. (2017). A Review on Antibiotic Resistance: Alarm Bells are Ringing. *Cureus*, 9(6). <https://doi.org/10.7759/cureus.1403>
- Zhang, D., Yin, J., Zhao, J., Zhu, H., & Wang, C. (2015). Adsorption and removal of tetracycline from water by petroleum coke-derived highly porous activated carbon. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 3(3), 1504–1512. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2015.05.014>
- Zimmermann, N. E. R., & Haranczyk, M. (2016). History and Utility of Zeolite Framework-Type Discovery from a Data-Science Perspective. *Crystal Growth and Design*, 16(6), 3043–3048. <https://doi.org/10.1021/acs.cgd.6b00272>

Zoubida, L., & Hichem, B. (2018). The Nanostructure Zeolites MFI-Type ZSM5. *Nanocrystals and Nanostructures*.
<https://doi.org/10.5772/intechopen.77020>