



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de São José do Rio Preto

Juliana Bergamasco Laurenti

SÍNTESE DE AGENTES HEMOSTÁTICOS COAGULANTES E
ANTIMICROBIANOS BASEADOS EM MATERIAIS ZEOLÍTICOS

São José do Rio Preto
2017

Juliana Bergamasco Laurenti

SÍNTESE DE AGENTES HEMOSTÁTICOS COAGULANTES E
ANTIMICROBIANOS BASEADOS EM MATERIAIS ZEOLITÍCOS

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

Financiadora: FAPESP – Proc: 2013/16754-4

Orientador: Prof. Dr. José Geraldo Nery

São José do Rio Preto
2017

Laurenti, Juliana Bergamasco.

Síntese de agentes hemostáticos coagulantes e antimicrobianos baseados em materiais zeolíticos / Juliana Bergamasco Laurenti. – São José do Rio Preto, 2017

191 f. : il.

Orientador: José Geraldo Nery

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Microbiologia. 2. Sangue – Coagulação. 3. Hemorragia. 4. Nanotecnologia . 5. Zeólita. I. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. II. Título.

CDU – 612.115

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca do IBILCE
UNESP - Câmpus de São José do Rio Preto

Juliana Bergamasco Laurenti

SÍNTESE DE AGENTES HEMOSTÁTICOS COAGULANTES E
ANTIMICROBIANOS BASEADOS EM MATERIAIS ZEOLÍTICOS

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

Financiadora: FAPESP – Proc: 2013/16754-4

Comissão Examinadora

Prof. Dr. José Geraldo Nery
UNESP São José do Rio Preto
Orientador

Prof^a. Dr^a. Marília de Freitas Calmon
UNESP São José do Rio Preto

Prof^a. Dr^a. Margarete Teresa Gottardo de Almeida
Famerp - São José do Rio Preto

Prof. Dr. Moacir Fernandes de Godoy
Famerp - São José do Rio Preto

Prof^a. Dr^a. Marcia Perez dos Santos Cabrera
UNESP São José do Rio Preto

São José do Rio Preto
14 de julho de 2017

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha amada família (Sandra, Paulo e Drieli) e ao meu marido Carlos.

AGRADECIMENTOS

Ao meu Deus por tudo que Ele representa na minha vida.

Ao meu orientador, Prof. Dr. José Geraldo Nery, pela orientação, sugestões, ensinamentos e, sobretudo pela oportunidade e confiança.

Ao programa de pós-graduação em Microbiologia, em especial aos professores e funcionários.

À agência FAPESP pela concessão da bolsa de doutorado (proc. 2013/16754-4) e o financiamento da pesquisa.

Aos amigos do Lacet, Adriano, Alex Silva, Alex Miller, Aninha, Davi, Danilo, Gabriel, Glaucia, Janine, Roberto, Suhelen, Vinicius Litrenta, Vinicius Semenzim, Erick, Kenneth, Guilherme e todos que passaram pelo Lacet durante esses 4 anos, a eles que sempre me ajudaram em tudo que precisei e me ensinaram muito, meu muito obrigada.

Agradeço imensamente a toda minha família, especialmente aos meus pais e minha irmã que sempre me deram todo apoio e motivação.

Ao meu marido Carlos, pelos momentos em que me ajudou na correção, pela amizade, pela paciência, pelo carinho e pelo amor.

Ao Prof. Dr. Elbio D'amico e Dr^a. Tania Rubia Flores da Rocha do Laboratório de Hemostasia do Hospital das Clínicas HC-USP pela oportunidade de utilizar o TEG para as primeiras análises utilizando a técnica de tromboelastografia.

À Prof. Dr^a. Márcia Cabrera por abrir as portas do seu laboratório para a utilização do aparelho de potencial zeta.

À Prof. Dr^a. Margarete Teresa Gottardo de Almeida e toda sua equipe e alunos de laboratório pela parceria, por me ensinarem várias metodologias microbiológicas e por me acolher tão bem.

Ao Prof. Dr. Moacir Fernandes de Godoy por toda a contribuição e ensinamento durante esses anos.

Aos técnicos do Laboratório Nacional de Nanotecnologia LNNano (CNPEM – Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais) Campinas – SP, por todos os treinamentos e análises realizadas.

Ao Prof. Dr. Sebastião Taboga e técnicos do Centro Multiusuário de Microscopia e Microanálises Ibilce/Unesp pela ajuda na microscopia de contraste de fase.

Ao Centro de Revestimento Cerâmicos (CRC) São Carlos – SP pelas análises de BET.

Aos professores presentes nesta banca, que farão orientações para a melhoria do meu trabalho.

RESUMO

Apesar dos avanços na intervenção médica, hemorragia traumática fatal continua a ser uma das principais causas de morte no mundo. Nesse sentido muitos esforços têm sido dedicados à pesquisa e ao desenvolvimento de novos agentes hemostáticos que possam atuar mais efetivamente no controle de hemorragias. Embora a maior parte dos agentes hemostáticos seja de natureza orgânica, recentemente estudos envolvendo a utilização de zeólitas como agentes hemostáticos têm demonstrado resultados promissores para o controle de sangramento. Estes estudos revelam que quando em contato com o sangue, as zeólitas adsorvem rapidamente as moléculas de água, com isso, concentrando as proteínas e elementos celulares essenciais para a formação do coágulo. Além disso, a superfície da zeólita que contém cargas negativas fornece um ambiente químico favorável que funciona como um ativador de contato do padrão intrínseco do processo de coagulação. Neste contexto, os objetivos deste trabalho são as sínteses, caracterização e modulação de diferentes materiais zeolíticos nas escalas nanométricas e micrométricas (Faujasita (FAU), Gismondina (GIS), Mordenita (MOR), zeólita A (LTA), zeólita Beta (BEA), Titânio Silicato (TS-1)) juntamente com seus derivados de troca iônica para que os mesmos possam ser utilizados como agentes hemostáticos coagulantes no controle de sangramentos através da aceleração do processo de coagulação. As caracterizações físico-química (DRX, MEV, AFM, Microscopia de contraste de fase, BET, RMN-MAS, FT-IR) mostraram que os materiais sintetizados estão de acordo com os dados reportados na literatura. Através da análise de EDS para quantificação de elementos químicos presente na estrutura zeolítica, foi possível observar que o processo de troca iônica foi satisfatório. A troca iônica com íons Ag^+ mostrou-se mais eficaz, devido a substituição total dos íons Na^+ pelos íons Ag^+ presentes tanto nas zeólitas de escala micrométrica quanto na nanométrica. A determinação do ponto isoelétrico foi útil para prever sua natureza pro-coagulante, devido ao fato de que todos os materiais zeolíticos em ambas escalas, juntamente com os derivados de troca iônica da zeólita faujasita (troca iônica com os íons Ag^+ , Ba^{+2} , Ca^{+2} , e Mg^{+2}) apresentaram ponto isoelétrico (p.i.) abaixo do pH sanguíneo (pH=7.0). Embora todos os materiais acima preparados tenham potencial de atuarem como agentes hemostáticos coagulantes, o estudo hemostático detalhado foi feito com as zeólitas faujasitas na escala nanométrica e micrométrica e seus derivados de troca iônica. Os melhores parâmetros tromboelastográficos (TEG) foram obtidos para a amostra Fau_Ca (zeólita faujasita micrométrica trocada com Ca^{2+}) e NanoFau_Ca (zeólita faujasita nanométrica trocada com Ca^{2+}). Os parâmetros R (tempo de formação do coágulo com aproximadamente 2mm), K (tempo para o coágulo atingir 20 mm) e MA

(propriedade elástica da fibrina e agregação plaquetária) para o material Fau_Ca foram: R (2,3 min), K (1,2 min) e MA (55,5 mm). Os parâmetros para NanoFau_Ca foram: R (1,1 min), K (1,2 min) e MA (60,3 mm). Comparação entre os dois materiais comprovam a superioridade do material nanométrico no caso da zeólita faujasita. Dados experimentais de análises térmicas (TGA/DSC) indicaram uma diminuição da quantidade de energia liberada dos materiais zeolíticos quando esses são submetidos ao processo de troca iônica. No caso da Fau_Ca e NanoFau_Ca, a análise de DSC foi de 65,8 J.g⁻¹ e 78,21 J.g⁻¹, respectivamente; o que é uma diminuição acentuada em relação a zeólita faujasita em suas formas sódicas: Fau (105.6 J.g⁻¹) e a NanoFau (85.48 J.g⁻¹). Análises qualitativas do efeito antimicrobiano das zeólitas NanoFau, NanoFau_Ca e NanoFau_Ag, NanoFau_Mg, NanoFau_Zn e NanoFau_Cu para os microrganismos *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Candida albicans* ATCC 90028 e *Candida parapsilosis* ATCC 22019 foram estudadas. NanoFau_Ag foi capaz de inibir o crescimento de todos os microrganismos estudados.

Palavras chaves: agente hemostático; coagulação; hemorragia; antimicrobiano; zeolitas; nanotecnologia.

ABSTRACT

Despite the advances in medical intervention, traumatic fatal hemorrhage remains a major cause of death worldwide. In this direction, many efforts have been dedicated to the research and development of new hemostatic agents that can act more effectively to control hemorrhages. Although the majority of hemostatic agents is of an organic nature recently studies involving the use of zeolites as hemostatic agents have shown encouraging results for the control of bleeding. These studies shows that when in contact with the blood, zeolites adsorbs rapidly the water molecules in their pores, thereby concentrating the proteins and cellular elements to clot formation. Moreover, the surface of the zeolite containing negative charge provides a chemical environment favorable which acts as an activator of the contact pattern of the intrinsic coagulation cascade. In this context, the main of this research are the synthesis, characterization and modulation of different zeolitic materials in both micrometric and nanometric scales (Faujasite (FAU), Gismondine (GIS), Mordenite (MOR), zeolite A (LTA), Beta zeolite (BEA), Titanium-Silicate (TS-1)) with their derivate ion exchange, so that they can be used as hemostatic agents to control bleeding by accelerating the clotting process. The physico-chemical characterizations (XRD, SEM, AFM, Phase Contrast Microscopy, BET, MAS-NRM, FTIR) showed that the synthesized materials are in agreement with data reported in the literature for these materials. Through the X-ray energy spectroscopy analysis for quantification of chemical elements present in the zeolitic structure, it was observed that the ion exchange process was effective. The ion exchange with Ag^+ ions was the most efficient due to the total substitution of the Na^+ ions by the Ag^+ ions present for both zeolites in the micrometric and nanometric scales. The determination of the isoelectric point was useful to predict its procoagulant nature, due to the fact that zeolitic materials in both scales with ion exchange derivatives of faujasite zeolites (ion exchange with Ag^+ , Ba^{+2} , Ca^{+2} and Mg^{+2}) presented isoelectric point (p_i) below the blood pH ($\text{pH}=7.0$). Although all the above materials have the potential to act as haemostatic coagulating agents, the detailed hemostatic study was done with faujasite zeolites in the nanometric and micrometric scale and its derivatives of ionic exchange. The best thromboelastographic parameters (TEG) were obtained for the sample Fau_Ca (micrometric faujasite zeolite exchanged with Ca^{2+}) and NanoFau_Ca (nanometric faujasite zeolite exchanged with Ca^{2+}). The R parameters (clot formation time of approximately 2 mm), K (time for clot to reach 20 mm) and MA (elastic property of fibrin and platelet aggregation) for the material Fau_Ca were: R (2.3 min), K (1.2 min) and MA (55.5 mm). The parameters

for NanoFau_Ca were: R (1.1 min), K (1.2 min) and MA (60.3 mm). Comparison between the two materials confirms the superiority of the nanometric material. Experimental data from thermal analysis (TGA/DSC) indicated a decrease in the amount of energy released from the zeolitic materials when they are submitted to the ion exchange process. In the case of Fau_Ca and NanoFau_Ca the DSC analysis was 65.8 J.g^{-1} and 78.21 J.g^{-1} , respectively; which is a accentuated decrease in relation to sodium faujasite zeolite in the micrometric scale (105.6 J.g^{-1}) and sodium faujasite zeolite in nanometer scale (85.48 J.g^{-1}). Qualitative analysis of the antimicrobial effect of the zeolites NanoFau, NanoFau_Ca and NanoFau_Ag, NanoFau_Mg, NanoFau_Zn and NanoFau_Cu for the microorganisms *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Candida albicans* ATCC 90028 and *Candida parapsilosis* ATCC 22019 were studied. NanoFau_Ag was able to inhibit the growth of all microorganisms studied.

Keywords: hemostatic agent; coagulation; haemorrhage; antimicrobial; zeolites; nanotechnology.

Índice de Figuras

Figura 1 Sínteses hidrotérmicas de zeólitas, Cundy et al. ⁵⁰	30
Figura 2 Etapas da cascata de coagulação (via extrínseca, via acessória (intrínseca) e via comum). Fonte: Franco, 2001 ⁸³	35
Figura 3 Etapas da nova cascata de coagulação (O modelo celular). Fonte: Galvez e Cortes, 2012 ⁸⁷	37
Figura 4 Monitor de coagulação ativada MCA 2000 – Fundação Adib Jatene Bioengenharia. Fonte: http://www.fajbio.com.br/Default.aspx , Acesso em 15 de mai de 2016.....	39
Figura 5 TEG [®] 5000 Thrombelastograph [®] Sistema de análise hemostática. Fonte: http://www.haemonetics.com/default.aspx , Acesso em 16 de abr de 2016	40
Figura 6 Rotem [®] delta sistema de análise hemostática. Fonte: https://www.rotenu.com/products/rotem-delta/ , Acesso em 03 de abr de 2016	41
Figura 7 Imagem ilustrativa do princípio de funcionamento do equipamento TEG [®] . Fonte: Peng e Rhind, 2015 ⁹⁷	42
Figura 8 Esquema do tromboelastograma ilustrando os parâmetros R, K, α e MA. Fonte: Galvez e Cortes, 2012 ⁸⁷	43
Figura 9 Os quatro tipos de adsorção isotérmica geralmente encontrada por adsorção de nitrogênio. Fonte: Leofanti et al., 1998 ¹¹⁴	46
Figura 10 As quatro formas de histerese de adsorção isotérmica geralmente encontrada por adsorção de nitrogênio. Fonte: Leofanti et al., 1998 ¹¹⁴	48
Figura 11 Imagem fotográfica da placa de microdiluição com as seguintes zeólitas testadas: NanoFau, NanoFau_Ca, NanoFau_Ag e NanoFau_Ca e NanoFau_Ag para a avaliação do crescimento dos microrganismos <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Candida albicans</i> e <i>Candida parapsilosis</i> em triplicata.....	64
Figura 12 Padrões de difração de Raios-X da amostra GIS (Gismondina micrométrica) na forma sódica e seus derivados de trocas iônicas.....	69
Figura 13 Padrões de difração de raios-X da amostra NanoGIS (Gismondina nanométrica) forma sódica e seus derivados de trocas iônicas. A inserção mostra a mudança na intensidade dos picos na faixa 2 θ de 25-30°.....	70
Figura 14 Padrões de difração de Raios-X da amostra FAU (faujasita micrométrica) forma sódica e seus derivados de trocas iônicas.....	71
Figura 15 Padrões de difração de Raios-X da amostra NanoFAU (Faujasita nanométrica) forma sódica e seus derivados de trocas iônicas.....	72

Figura 16 Padrões de difração de Raios-X da amostra LTA (LTA micrométrica) forma sódica e seus derivados de trocas iônicas.....	73
Figura 17 Padrões de difração de Raios-X da amostra NanoLTA (LTA nanométrica) forma sódica e seus derivados de trocas iônicas.....	74
Figura 18 Padrões de difração de Raios-X da amostra MOR (Mordenita micrométrica) forma sódica e seus derivados de trocas iônicas.....	75
Figura 19 Padrões de difração de Raios-X da amostra NanoMOR (Mordenita nanométrica) na forma sódica e seus derivados de trocas iônicas.....	76
Figura 20 Padrões de difração de Raios-X da amostra TS-1 (titânio-silicato micrométrica) na forma sódica e seus derivados de trocas iônicas.....	77
Figura 21 Padrões de difração de Raios-X da amostra NanoTS-1 (titânio-silicato nanométrica) na forma sódica e seus derivados de trocas iônicas.....	78
Figura 22 Padrões de difração de Raios-X da amostra BEA (escala micrométrica) na forma sódica e seus derivados de trocas iônicas.....	79
Figura 23 Padrões de difração de Raios-X da amostra NanoBEA (escala nanométrica) na forma sódica e seus derivados de trocas iônicas.....	80
Figura 24 Micrografia eletrônica de varredura da amostra de zeólita Gismondina na escala nanométrica.....	81
Figura 25 Micrografia eletrônica de varredura da amostra de Gismondina na escala micrométrica na forma sódica (item A) e trocada com íons Cálcio (item B).....	81
Figura 26 Micrografia eletrônica de varredura da amostra de Faujasita na escala micrométrica na forma sódica (item A) e trocada com íons Cálcio (item B).....	82
Figura 27 Micrografia eletrônica de varredura da amostra de Faujasita na escala nanométrica em sua forma sódica (NanoFAU).....	82
Figura 28 Micrografia eletrônica de varredura da amostra de LTA na escala nanométrica em sua forma sódica (NanoLTA).....	83
Figura 29 Micrografia eletrônica de varredura da amostra de Mordenita na escala micrométrica na forma sódica (item A) e trocada com íons Cálcio (item B).....	83
Figura 30 Micrografia eletrônica de varredura da amostra de Mordenita na escala nanométrica na forma sódica (NanoMOR).....	84
Figura 31 Micrografia eletrônica de varredura da amostra de BEA na escala nanométrica na forma sódica (NanoBEA).....	84
Figura 32 Micrografia eletrônica de varredura da amostra de TS-1 na escala nanométrica na forma sódica (NanoTS-1).....	85

Figura 33 Imagens de Microscopia de Força Atômica das amostras de zeólitas A) FAU B) FAU_Ca	86
Figura 34 Imagens de Microscopia de Força Atômica das amostras de zeólitas A) NanoFAU B) NanoFAU_Ca	86
Figura 35 Imagens do sangue total antes da adição de zeólitas obtidas por microscopia de contraste de fase.....	87
Figura 36 Imagens do sangue total após adição de zeólitas BEA obtidas por microscopia de contraste de fase.....	88
Figura 37 Imagens do sangue total após adição de zeólitas FAU obtidas por microscopia de contraste de fase.....	89
Figura 38 Imagens do sangue total após adição de zeólitas GIS obtidas por microscopia de contraste de fase.....	89
Figura 39 Imagens do sangue total após adição de zeólitas LTA obtidas por microscopia de contraste de fase.....	90
Figura 40 Imagens do sangue total após adição de zeólitas MOR obtidas por microscopia de contraste de fase.....	90
Figura 41 Imagens do sangue total após adição de zeólitas TS1 obtidas por microscopia de contraste de fase.....	91
Figura 42 Imagens do sangue total após adição de zeólitas NanoBEA obtidas por microscopia de contraste de fase	91
Figura 43 Imagens do sangue total após adição de zeólitas NanoFAU obtidas por microscopia de contraste de fase	92
Figura 44 Imagens do sangue total após adição de zeólitas NanoGIS obtidas por microscopia de contraste de fase	92
Figura 45 Imagens do sangue total após adição de zeólitas NanoLTA obtidas por microscopia de contraste de fase	93
Figura 46 Imagens do sangue total após adição de zeólitas NanoMOR obtidas por microscopia de contraste de fase	93
Figura 47 Imagens do sangue total após adição de zeólitas NanoTS1 obtidas por microscopia de contraste de fase	94
Figura 48 Imagens do sangue total após adição de zeólitas FAU_Ca obtidas por microscopia de contraste de fase.....	94
Figura 49 Imagens do sangue total após adição de zeólitas NanoFAU_Ca obtidas por microscopia de contraste de fase	95

Figura 50 Quantificação em porcentagem em peso dos elementos constituintes da zeólita Faujasita na forma sódica e seus derivados de troca iônica por espectroscopia de energia dispersiva (EDS) para área analisada.....	96
Figura 51 Quantificação em porcentagem em peso dos elementos constituintes da nanozeólita Faujasita na forma sódica e seus derivados de troca iônica por espectroscopia de energia dispersiva (EDS) para área analisada.....	97
Figura 52 Quantificação em porcentagem em peso dos elementos constituintes da zeólita A (LTA) na forma sódica e seus derivados de troca iônica por espectroscopia de energia dispersiva (EDS) para área analisada	97
Figura 53 Quantificação em porcentagem em peso dos elementos constituintes da Nanozeólita A (LTA) na forma sódica e seus derivados de troca iônica por espectroscopia de energia dispersiva (EDS) para área analisada.....	97
Figura 54 Quantificação em porcentagem em peso dos elementos constituintes da zeólita Mordenita na forma sódica e seus derivados de troca iônica por espectroscopia de energia dispersiva (EDS) para área analisada.....	98
Figura 55 Quantificação em porcentagem em peso dos elementos constituintes da nanozeólita Mordenita na forma sódica e seus derivados de troca iônica por espectroscopia de energia dispersiva (EDS) para área analisada.....	98
Figura 56 Quantificação em porcentagem em peso dos elementos constituintes da zeólita Gismondina na forma sódica e seus derivados de troca iônica por espectroscopia de energia dispersiva (EDS) para área analisada.....	98
Figura 57 Quantificação em porcentagem em peso dos elementos constituintes da nanozeólita Gismondina na forma sódica e seus derivados de troca iônica por espectroscopia de energia dispersiva (EDS) para área analisada.....	99
Figura 58 Quantificação em porcentagem em peso dos elementos constituintes da zeólita BEA na escala nanométrica e micrométrica por espectroscopia de energia dispersiva (EDS) para área analisada.....	100
Figura 59 Quantificação em porcentagem em peso dos elementos constituintes da zeólita TS-1 na escala nanométrica e micrométrica por espectroscopia de energia dispersiva (EDS) para área analisada.....	100
Figura 60 Isotermas de adsorção e desorção da zeólita faujasita na escala nanométrica NanoFAU	102
Figura 61 Isotermas de adsorção e desorção da zeólita faujasita na escala nanométrica trocada com íons cálcio NanoFAU_Ca	103
Figura 62 Isotermas de adsorção e desorção da zeólita faujasita na escala nanométrica trocada com íons prata NanoFAU_Ag	104
Figura 63 Curva de distribuição de tamanho de poros do material NanoFAU	106

Figura 64 Curva de distribuição de tamanho de poros do material NanoFAU_Ca.....	106
Figura 65 Curva de distribuição de tamanho de poros do material NanoFAU_Ag.....	107
Figura 66 Espectros de RMN-MAS de ²⁹ Si das amostras das zeólitas em suas formas sódicas Titânio-silicato (NanoTS1), Gismondina (NanoGIS), A (NanoLTA), NanoBEA e Faujasita (NanoFAU) na escala nanométrica.....	109
Figura 67 Espectros de RMN-MAS de ²⁹ Si das amostras de zeólitas faujasitas na escala nanométrica em sua forma sódica e trocadas com íons cálcio, magnésio, bário e prata.	111
Figura 68 Espectro de infravermelho FT-IR das diferentes zeólitas MOR, FAU, TS1, LTA, GIS, BEA	115
Figura 69 Espectro de infravermelho FT-IR das diferentes nanozeólitas NanoMOR, NanoFAU, NanoTS1, NanoLTA, NanoGIS e NanoBEA.....	115
Figura 70 Espectro de infravermelho FT-IR das nanozeólitas faujasita em sua forma sódica (NanoFAU) e seus derivados de troca iônica NanoFAU_Ca; NanoFAU_Mg; NanoFAU_Ba e NanoFAU_Ag.....	116
Figura 71 Espectro de infravermelho FT-IR das zeólitas faujasita em sua forma sódica (FAU) e seus derivados de troca iônica FAU_Ca; FAU_Mg; FAU_Ba e FAU_Ag.....	117
Figura 72 Potencial zeta das zeólitas micrométricas em sua forma sódica: faujasita, gismondina, zeólita A (LTA), mordenita, titânio-silicato (TS1) e beta (BEA) em função do pH em solução de CaCl ₂ juntamente com seus respectivos pontos isoelétricos.....	120
Figura 73 Potencial zeta das nanozeólitas em sua forma sódica: faujasita (NanoFAU), gismondina (NanoGIS), zeólita A (NanoLTA), mordenita (NanoMOR), titânio-silicato (NanoTS1) e NanoBEA em função do pH em solução de CaCl ₂ juntamente com seus respectivos pontos isoelétricos	120
Figura 74 Potencial zeta das zeólitas faujasita na forma sódica e seus derivados de troca iônica (FAU_Ca; FAU_Mg; FAU_Ba e FAU_Ag) em função do pH em solução de CaCl ₂ juntamente com seus respectivos pontos isoelétricos	121
Figura 75 Potencial zeta das zeólitas faujasita na forma sódica e seus derivados de troca iônica (NanoFAU_Ca; NanoFAU_Mg; NanoFAU_Ba e NanoFAU_Ag) em função do pH em solução de CaCl ₂ juntamente com seus respectivos pontos isoelétricos.....	122
Figura 76 Termograma de DSC e TG das amostras de zeólita A (LTA) na escala micrométrica e nanométrica A) DSC da zeólita LTA; B) DSC da nanozeólita NanoLTA; C) TG da zeólita LTA; D) TG da nanozeólita NanoLTA.....	124
Figura 77 Termograma de DSC e TG/DTG das amostras de zeólita BEA na escala micrométrica e nanométrica A) DSC da zeólita BEA; B) DSC da nanozeólita NanoBEA; C) TG da zeólita BEA; D) TG da nanozeólita NanoBEA	125

Figura 78 Termograma de DSC e TG/DTG das amostras de zeólita TS1 na escala micrométrica e nanométrica A) DSC da zeólita TS1; B) DSC da nanozeólita NanoTS1; C) TG da zeólita TS1; D) TG da nanozeólita NanoTS1	126
Figura 79 Termograma de DSC e TG/DTG das amostras de zeólita MOR na escala micrométrica e nanométrica A) DSC da zeólita MOR; B) DSC da nanozeólita NanoMOR; C) TG da zeólita MOR; D) TG da nanozeólita NanoMOR	127
Figura 80 Termograma de DSC e TG/DTG das amostras de zeólita GIS na escala micrométrica e nanométrica A) DSC da zeólita GIS; B) DSC da nanozeólita NanoGIS; C) TG da zeólita GIS; D) TG da nanozeólita NanoGIS	128
Figura 81 Termograma de DSC e TG/DTG das amostras de faujasita na escala nanométrica juntamente com seus derivados de troca iônica A) NanoFAU; B) NanoFAU_Ca; C) NanoFAU_Mg; D) NanoFAU_Ba; E) NanoFAU_Ag.....	130
Figura 82 Termograma de DSC e TG/DTG das amostras de faujasita na escala micrométrica juntamente com seus derivados de troca iônica A) FAU; B) FAU_Ca; C) FAU_Mg; D) FAU_Ba; E) FAU_Ag	132
Figura 83 Curvas de tromboelastograma da amostra de sangue antes da adição de zeólita e após a adição de zeólitas na escala micrométrica (FAU, GIS, LTA, BEA, TS-1 e MOR).....	135
Figura 84 Curvas de tromboelastograma da amostra de sangue antes da adição de zeólita e após a adição de zeólitas na escala nanométrica (NanoFAU, NanoGIS, NanoLTA, NanoBEA, NanoTS-1 e NanoMOR)	137
Figura 85 Curvas de tromboelastograma da amostra de sangue antes da adição de zeólita e após a adição de zeólitas Faujasita na escala micrométrica (FAU) juntamente com seus derivados de troca iônica (FAU_Ca; FAU_Mg; FAU_Ba e FAU_Ag)	139
Figura 86 Curvas de tromboelastograma da amostra de sangue antes da adição de zeólita e após a adição de zeólitas Faujasita na escala nanométrica (NanoFAU) juntamente com seus derivados de troca iônica (NanoFAU_Ca; NanoFAU_Mg; NanoFAU_Ba e NanoFAU_Ag)	141
Figura 87 Análise do crescimento de microrganismos frente a presença de zeólitas A) NanoFau_Ca, B) NanoFau_Ag, D) Controle, F) NanoFau e H) NanoFau_Ag+NanoFau_Ca frente aos microrganismos Staphylococcus aureus, Candida albicans e Candida parapsilosis	144
Figura 88 Imagem fotográfica dos halos de inibição formados por difusão de solução de zeólitas (0,001g) NanoFau, NanoFau_Ca, NanoFau_Ag, NanoFau_Ca +NanoFau_Ag frente ao crescimento de Staphylococcus aureus	145
Figura 89 Imagem fotográfica dos halos de inibição formados por difusão de solução de zeólitas (0,002g) NanoFau, NanoFau_Ca, NanoFau_Ag, NanoFau_Ca +NanoFau_Ag frente ao crescimento de Staphylococcus aureus	145

Figura 90 Imagem fotográfica dos halos de inibição formados por difusão de solução de zeólitas NanoFau_Zn, NanoFau_Mg, NanoFau_Ag, NanoFau_Cu e Controle frente ao crescimento de <i>Candida albicans</i>	146
Figura 91 Imagem fotográfica dos halos de inibição formados por difusão de solução de zeólitas NanoFau_Zn, NanoFau_Mg, NanoFau_Ag, NanoFau_Cu e Controle frente ao crescimento de <i>Candida parapsilosis</i>	147
Figura 92 Imagem fotográfica dos halos de inibição formados por difusão de solução de zeólitas NanoFau_Zn, NanoFau_Mg, NanoFau_Ag, NanoFau_Cu e Controle frente ao crescimento de <i>Staphylococcus aureus</i>	148
Figura 93 Imagem fotográfica das placas de Elisa contendo zeólitas NanoFAU frente ao microrganismo <i>Staphylococcus aureus</i>	149
Figura 94 Imagem fotográfica das colônias de crescimento de microrganismos <i>Staphylococcus aureus</i> em ágar Mueller-Hinton replicada da placa de elisa contendo diluições de NanoFau	150
Figura 95 Imagem fotográfica das placas de Elisa contendo zeólitas NanoFAU_Ag frente ao microrganismo <i>Staphylococcus aureus</i>	151
Figura 96 Imagem fotográfica das colônias de crescimento de microrganismos <i>Staphylococcus aureus</i> em ágar Mueller-Hinton repicada da placa de elisa contendo diluições de NanoFau_Ag	152
Figura 97 Imagem fotográfica das placas de Elisa contendo zeólitas NanoFAU frente ao microrganismo <i>Candida albicans</i>	153
Figura 98 Imagem fotográfica das colônias de crescimento de microrganismos <i>Candida albicans</i> em ágar Mueller-Hinton repicada da placa de elisa contendo diluições de NanoFau_Ag	154
Figura 99 Imagem fotográfica da placa de Elisa contendo zeólitas NanoFAU_Ag frente ao microrganismo <i>Candida albicans</i>	155
Figura 100 Imagem fotográfica das colônias de crescimento de microrganismos <i>Candida albicans</i> em ágar Mueller-Hinton repicada da placa de elisa contendo diluições de NanoFau_Ag	156

Índice de Tabelas

Tabela 1 Dados obtidos a partir do experimento de adsorção/dessorção de N ₂ das amostras NanoFAU, NanoFAU_Ca e NanoFAU_Ag.....	104
Tabela 2 Principais bandas de absorção do FT-IR presente nas amostras sintetizadas de acordo com os dados presentes na literatura.....	113
Tabela 3 pH do ponto isoelétrico das zeólitas na escala micrométrica.....	120
Tabela 4 pH do ponto isoelétrico das zeólitas na escala nanométrica	121
Tabela 5 DSC (J/g), TG (%) para as zeólitas estudadas na escala micrométrica e nanométrica	123
Tabela 6 DSC (J/g), TG/DTG, número de moléculas de água adsorvida e raio iônico dos cátions para as nanozeólitas faujasita na forma sódica e seus derivados de troca iônica	129
Tabela 7 DSC (J/g), TG/DTG, número de moléculas de água adsorvida e raio iônico dos cátions para as zeólitas faujasita na forma sódica e seus derivados de troca iônica.....	131
Tabela 8 Parâmetros tromboelastográficos das amostras de sangue antes da adição de zeólitas e após a adição de zeólitas na escala micrométrica (FAU, GIS, LTA, BEA, TS-1 e MOR).	135
Tabela 9 Parâmetros tromboelastográficos das amostras de sangue antes da adição de zeólitas e após a adição de zeólitas na escala nanométrica (NanoFAU, NanoGIS, NanoLTA, NanoBEA, NanoTS-1 e NanoMOR)	137
Tabela 10 Parâmetros tromboelastográficos das amostras de sangue antes da adição de zeólitas e após a adição de zeólitas Faujasita na escala micrométrica (FAU) juntamente com seus derivados de troca iônica (FAU_Ca; FAU_Mg; FAU_Ba e FAU_Ag)	139
Tabela 11 Parâmetros tromboelastográficos das amostras de sangue antes da adição de zeólitas e após a adição de zeólitas Faujasita na escala nanométrica (NanoFAU) juntamente com seus derivados de troca iônica (NanoFAU_Ca; NanoFAU_Mg; NanoFAU_Ba e NanoFAU_Ag)	141

Índice de Quadros

Quadro 1 Composição molar das zeólitas sintetizadas	57
Quadro 2 Derivados de troca iônica originados a partir dos materiais zeolíticos	58
Quadro 3 Diluições propostas para a determinação da concentração mínima inibitória da zeólita NanoFau	67
Quadro 4 Diluições propostas para a determinação da concentração mínima inibitória da zeólita NanoFau_Ag.....	67

Lista de Abreviaturas e Símbolos

ABS	Ankaferd blood stopper
AFM	Microscopia de força atômica
Al	Alumínio
AlO ₂	Óxido de Alumínio
ATCC	American Type Culture Collection
BEA	Zeólita Beta na escala micrométrica
BET	Brunauer-Emmett-Teller
BHI	Infusão de cérebro e coração
BJH	Barret-Joyer-Halenda
CAPM	Cininogênio de alto peso molecular
CNPEM	Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais
DRX	Difração de Raios-X
DSC	Calorimetria diferencial de varredura
EDS	Espectrometria de Energia Dispersiva de Raios-X
FAU	Zeólita faujasita na escala micrométrica
FDA	Food and Drug Administration
FT-IR	Espectroscopia na região do infravermelho
GIS	Zeólita gismondina na escala micrométrica
H ₂ O	Fórmula molecular água
LTA	Zeólita A (LTA) na escala micrométrica
MCA	Monitor de coagulação ativada
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
MOR	Zeólita mordenita na escala micrométrica
NanoBEA	Zeólita Beta na escala nanométrica
NanoFAU	Zeólita faujasita na escala nanométrica
NanoGIS	Zeólita gismondina na escala nanométrica
NanoLTA	Zeólita A (LTA) na escala nanométrica
NanoMOR	Zeólita mordenita na escala nanométrica
NanoTS1	Zeólita Titânio-silicato na escala nanométrica
NHS-1	Nanohemostat-1
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
RMN-MAS	Ressonância magnética nuclear no ângulo mágico

SF	Saito-faley
Si	Silício
SiO ₂	Óxido de sílicio
TCA	Tempo de coagulação ativada
TEG	Tromboelastografia
TFPI	Complexo inibidor do fato tecidual
TG	Análise termogravimétrica
TP	Tempo de protrombina
TPAOH	Hidróxido de tetrapropilamônio
TS1	Zeólita Titânio-silicato na escala micrométrica
TTC	Corante cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio
TTPA	Tempo de tromboplastina parcial ativada

Sumário

DEDICATÓRIA	V
AGRADECIMENTOS	VI
RESUMO	VII
ABSTRACT	IX
Índice de Figuras	XI
Índice de Tabelas	XVIII
Índice de Quadros.....	XIX
Lista de Abreviaturas e Símbolos	XX
1 Introdução.....	26
2 Fundamentação Teórica	29
2.1 <i>Zeólitas e Nanozeólitas</i>	29
2.2 <i>Zeólitas como trocadores iônicos.....</i>	31
2.3 <i>Zeólitas utilizadas como agentes hemostáticos e seus antecedentes.....</i>	32
2.4 <i>Princípios teóricos do Processo de Coagulação e técnicas in vitro de avaliação da hemostasia.</i>	34
2.5 <i>Metodologia para estudos da coagulação sanguínea</i>	38
2.5.1 Estudos da atividade hemostática por Tromboelastografia (TEG)	41
2.6 <i>Métodos de caracterização</i>	43
2.6.1 Determinação de cargas de superfície e do ponto isoelétrico pela técnica de potencial zeta.....	43
2.6.2 Estudos térmicos das zeólitas pelas técnicas de TG (Análise Termogravimétrica) e DSC (Calorimetria Diferencial de Varredura)	44

2.6.3	Análise textural por adsorção de nitrogênio para determinação da área superficial (BET).....	45
2.7	<i>Análise qualitativa do efeito antimicrobiano de zeólitas na inibição do crescimento de microrganismos.....</i>	48
3	Objetivos	50
3.1	<i>Geral</i>	50
3.2	<i>Específico</i>	50
4	Procedimentos experimentais.....	51
4.1	<i>Sínteses das zeólitas na escala micrométrica.....</i>	51
4.1.1	Síntese de zeólita Gismondina (GIS) na escala micrométrica.....	51
4.1.2	Síntese de Zeólita A (LTA) na escala micrométrica	51
4.1.3	Síntese de zeólita Mordenita (MOR) na escala micrométrica	52
4.1.4	Síntese de zeólita Faujasita (FAU) na escala micrométrica	52
4.1.5	Síntese de zeólita Titânio-silicato (TS1) na escala micrométrica	52
4.1.6	Síntese de zeólita Beta (BEA) na escala micrométrica	53
4.2	<i>Síntese de zeólitas na escala nanométrica.....</i>	54
4.2.1	Síntese da zeólita Gismondina na escala nanométrica (NanoGIS)	54
4.2.2	Síntese de zeólita A LTA na escala nanométrica (NanoLTA)	54
4.2.3	Síntese de zeólita Mordenita na escala nanométrica (NanoMOR)	55
4.2.4	Síntese de zeólita Faujasita na escala nanométrica (NanoFAU)	56
4.2.5	Síntese de zeólita Titânio-silicato na escala nanométrica (NanoTS-1)....	56
4.2.6	Síntese de zeólita Beta na escala nanométrica (NanoBEA)	56
4.3	<i>Experimentos de troca iônica com as zeólitas na escala micrométrica e nanométrica.....</i>	57
4.4	<i>Caracterização físico-química das zeólitas sintetizadas</i>	58
4.4.1	Difração de Raios X (DRX)	58
4.4.2	Microscopia eletrônica de varredura (MeV)	59
4.4.3	Microscopia de força atômica (AFM)	59

4.4.4	Microscopia de Contraste de fase	59
4.4.5	Determinação da composição por Espectroscopia de Energia Dispersiva de Raios-X (EDS).....	60
4.4.6	Estudo de adsorção de nitrogênio para determinação da área superficial (BET).....	60
4.4.7	Ressonância Magnética Nuclear do Estado Sólido rotação em torno do Ângulo Mágico (²⁹ Si RMN-MAS).....	60
4.4.8	Espectroscopia no infravermelho FT-IR	61
4.4.9	Determinação do ponto isoelétrico por potencial zeta	61
4.4.10	Análise Termogravimétrica (TG) e Calorimetria diferencial de varredura (DSC).....	62
4.4.11	Tromboelastografia utilizando zeólitas na escala micrométrica e nanométrica.....	62
4.4.12	Análise da atividade antimicrobiano de zeólitas.....	63
5	Resultados e Discussões	68
5.1	<i>Análises de difração de Raios-X das zeólitas micrométrica e nanométrica na forma sódica e dos seus derivados de troca iônica</i>	<i>68</i>
5.2	<i>Microscopia eletrônica de varredura (MEV) das zeólitas nas escalas nanométricas e micrométricas.....</i>	<i>80</i>
5.3	<i>Microscopia de força atômica (AFM) das zeólitas FAU e NanoFAU e seu derivado de troca iônica com cálcio.....</i>	<i>85</i>
5.4	<i>Microscopia de contraste de fase</i>	<i>86</i>
5.5	<i>Análise de EDS para quantificação da porcentagem em peso dos elementos químicos presentes nas zeólitas.....</i>	<i>95</i>
5.6	<i>Análise textural por adsorção de nitrogênio pelo método de BET para NanoFau, NanoFau_Ca e NanoFau_Ag.....</i>	<i>100</i>
5.7	<i>Ressonância Magnética Nuclear do Estado Sólido (NMR-MAS) das amostras de zeólitas Faujasita, A (LTA), BEA, Gismondina e Titânio-silicato (TS1) na escala nanométrica e derivados de troca iônica da nanozeólita Faujasita.....</i>	<i>107</i>
5.8	<i>Espectroscopia no infravermelho FT-IR com as amostras zeólitas</i>	<i>111</i>
5.9	<i>Determinação do ponto isoelétrico e medidas de mobilidade eletroforética (Potencial Zeta)</i>	<i>118</i>

5.10	<i>Análise Termogravimétrica (TG) e Calorimetria diferencial de varredura (DSC)</i>	122
5.11	<i>Estudos tromboelastográficos (TEG) com zeólitas na escala micrométrica e nanométrica</i>	134
5.12	<i>Atividade antimicrobiana de zeólitas</i>	143
	5.12.1 Determinação da atividade microbiana por microdiluição.....	143
	5.12.2 Determinação da atividade microbiana por difusão.....	144
	5.12.3 Determinação da concentração mínima inibitória das zeólitas NanoFau, NanoFau_Ag frente aos microrganismos Staphylococcus aureus ATCC 25923, Candida albicans ATCC 90028	149
6	Conclusões	157
7	Perspectivas	159
8	Referências	160
	ANEXO I – Patente depositada	176
	ANEXO II – Paper publicado	179
	ANEXO III – Parecer Consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa	188
	Termo de consentimento livre e esclarecido - TCLE	191

1 Introdução

Zeólitas são uma classe de aluminossilicatos cristalinos caracterizados por estruturas abertas, com elevada área superficial (200-1000 m²/g), cargas negativas e contendo cátions alcalinos e alcalinos terrosos em sua composição ^{1;2}. As propriedades das zeólitas, tais como troca iônica, poros intercrystalinos que selecionam moléculas de dimensões diferentes, sítios ácidos e reservatórios ativos para reações catalisadas por metais têm alcançado amplos usos industriais. Consequentemente, nos últimos anos, a pesquisa com zeólitas tem se tornado uma área de grande interesse ^{3;4}. A aplicação de materiais zeolíticos variam desde o uso em reações bioquímicas, agroindústrias, fabricação de detergentes, melhorias de solo, armazenamento de energia, indústria têxtil, até em aplicações médicas ⁵. Na área médica, podem ser citadas, as seguintes aplicações: agentes antibacterianos ⁶, agentes anti-diarréicos ⁷, adjuvantes antitumorais ⁸, biosensores ⁹, agentes de formação óssea ¹⁰, contrastantes em ressonância magnética ¹¹, *drug delivery* ¹², diabetes mellitus ¹³, mimetismo enzimático ¹⁴, hemodiálise e aplicações externas ¹⁵. No caso de aplicações externas, zeólitas podem ser utilizadas como agentes hemostáticos ^{16; 17; 18; 19; 20; 21}.

Agentes hemostáticos são substâncias derivadas de vários tipos de materiais capazes de reduzir a hemorragia por mecanismo mecânico ou causando um aumento no processo de coagulação sanguínea. Estes materiais quando utilizados para este fim, são muito eficazes e abriram novas possibilidades para o controle de sangramentos. Além disso, zeólitas apresentam vantagens em termos de estabilidade, acessibilidade e custos, com nenhuma toxicidade biológica ou risco de transmissão de doenças ²².

Aproximadamente 234 milhões de cirurgias são feitas anualmente no mundo ²³. O controle do sangramento em procedimentos cirúrgicos é essencial para diminuir o tempo do procedimento e os riscos de complicações, reduzindo os custos para pacientes e médicos e melhorando o resultado como um todo. Por isso, a busca por novos materiais zeolíticos que possam ser eficazes no controle de sangramentos e hemorragias de alto risco é extremamente importante.

O agente hemostático produzido a partir de materiais zeolíticos mais comumente utilizado é o produto Quikclot[®] (Z-Medica, Wallingford, CT) ^{17; 24; 25}. Este produto mineral inerte é composto por zeólitas tipo 5A (LTA), óxidos de silício, alumínio, sódio, magnésio e pequenas quantidades de quartzo. Quikclot[®] atua como uma peneira molecular e adsorve água no local da ferida, aumentando a concentração de fatores de coagulação, plaquetas e eritrócitos para

estimular a hemostasia ^{19; 20}. Por possuir excelentes propriedades hemostáticas, inúmeras pesquisas têm sido realizadas para o estudo do controle de hemorragia em modelos animais e clínicos ^{2; 17; 26; 27; 28}.

Outros agentes hemostáticos baseados em materiais zeolíticos foram desenvolvidos. Gerlach *et al.* ²⁹, desenvolveram o agente hemostático *WoundStat (WS)*, uma argila esmectita granular baseada em filosilicato de alumínio. Este material tem grande capacidade superabsorvente, e concentra fatores de coagulação e plaquetas, resultando na formação do trombo. Além disso, acredita-se que as cargas negativas inerentes dos grânulos de esmectita ativa a cascata de coagulação, auxiliando assim na formação do trombo. *WoundStat (WS)* mostrou-se ser um agente hemostático eficaz em estudos de casos de animais em choque hemorrágico. Zhang *et al.* ³⁰ desenvolveram um composto formado por zeólitas/polímeros carregados com antibióticos para aplicação como hemostático e antimicrobiano. Além de apresentar uma capacidade de adsorção de água, facilitando a formação do trombo, também exibiu um período prolongado de liberação de droga. Mortazavi *et al.* ³¹ mostraram que uma mistura de minerais e zeólitas bentonita reduziram drasticamente o volume de perda de sangue e o tempo de coagulação. Observou-se também um controle das reações exotérmicas que eliminaram o risco de queimaduras no local da ferida hemorrágica. Alavi *et al.* ³² estudaram o efeito de uma nova gaze estéril impregnada com bentonita e minerais haloisita sobre a coagulação do sangue em feridas e a taxa de cura em ratos machos Wistar. De acordo com os resultados, a aplicação tópica deste material diminuiu significativamente o tempo de coagulação e aumentou a taxa de cicatrização da ferida.

A utilização de nanopartículas em aplicação de coagulação foi observada com o aparecimento do produto *Ankaferd Blood Stopper Nanohemostat* ³³. Este produto é uma evolução do *Ankaferd blood stopper (ABS)* e a sua eficácia é comparável à eficácia hemostática do tradicional *Ankaferd* em modelos experimentais; contudo, a sua escala nanométrica permite um maior contato com a superfície, melhorando a ativação hemostática. *Ankaferd Blood Stopper* é um agente hemostático tópico que consiste em extratos de ervas hemostáticas e não contém aditivos sintéticos ou inorgânicos. Este produto acelera a formação de uma rede de proteínas encapsuladas pela interação com proteínas do sangue e partículas de fibrinogênio, facilitando a formação do trombo ^{34; 35}. Outro tipo de agente hemostático de escala nanométrica é o produto *Nanohemostat*, o qual tem a capacidade de diminuir a hemorragia, em menos de 15 segundos, utilizando (RADA)4, denominado *nanohemostat-1 (NHS-1)*, um material biológico sintético que resulta na formação de uma barreira de nanofibras integradas que diminuíram o

sangramento em uma variedade de tipos de tecidos ³⁶. Em relação à utilização de zeólitas na escala nanométrica, Laurenti *et al.* ³⁷ observou uma melhor eficiência na aceleração da coagulação sanguínea quando utilizou a zeólita faujasita na escala nanométrica em comparação à escala micrométrica.

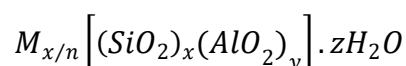
As zeólitas em escalas nanométricas, possuem um tamanho inferior a 1000 nm. A redução do tamanho das partículas para a escala nanométrica leva a mudanças substanciais nas propriedades dos materiais, que têm um impacto sobre o desempenho de zeólitas tradicionais em áreas de aplicação tais como a catálise e separação. Assim, a razão entre números de átomos internos e externos aumentam rapidamente à medida que diminui o tamanho das partículas de zeólitas, tornando assim as nanopartículas com grandes áreas de superfícies externas e atividade superficial ³⁸. Além disso, a utilização dos nanomateriais em medicina envolve as aplicações das nanopartículas e dos nanosistemas fabricados para proporcionar a regeneração nos níveis celulares e teciduais ³³. Adicionalmente, diminuindo o tamanho do cristal, os caminhos de difusão dos reagentes, produtos e moléculas dentro dos poros se tornam mais curtos e isto pode resultar numa redução ou eliminação das limitações difusionais indesejadas da velocidade da reação ³⁹. Apesar do efeito na aceleração da coagulação do sangue e redução do tempo na formação do coágulo, as zeólitas exibem um importante efeito adverso. A reação exotérmica subsequente à administração da zeólita na ferida pode atingir temperaturas superiores a 100°C (212° F) e pode causar danos nos tecidos em toda a espessura ^{40;41}. A troca iônica tem um papel importante para atenuar este efeito adverso. De acordo com Ostomel *et al.* ², os cátions pertencentes ao agente hemostático originais à base de zeólita são trocados pelo processo de troca iônica por outros cátions que tem a função de atenuar o grande calor liberado quando este material adsorve água. O processo de troca iônica também pode ser bastante útil para acrescentar alguma característica adicional para zeólita. A incorporação de cátions com características antimicrobianas, por exemplo, faz com que a zeólita se transforme em um doador de íons com potencial de inibir o crescimento microbiano.

Desta maneira, este trabalho tem como foco principal as sínteses, caracterização e modulação de diversas zeólitas nas escalas nanométricas e micrométricas (Gismondina (GIS), Beta (BEA), Mordenita (MOR), Titânio-silicato (TS1), Faujasita (FAU), Zeólita A (LTA)) para em seguida serem utilizadas como possíveis agentes hemostáticos coagulantes e antimicrobianos no controle de sangramentos, através da aceleração do processo de coagulação.

2 Fundamentação Teórica

2.1 Zeólitas e Nanozeólitas

Zeólitas são uma classe de aluminossilicatos caracterizadas por suas estruturas abertas. São cristalinas, microporosas e geralmente contêm cátions alcalinos e alcalinos terrosos em sua composição ⁴². Sua fórmula molecular típica pode ser escrita como:



Onde,

M = cátion de compensação, que pode ser alcalino ou alcalino terroso.

n = número de valência do cátion de compensação.

x = número de alumínio por fórmula unitária.

y = número de silício por fórmula unitária.

z = número de moléculas de água no sistema de cavidades.

Os tetraedros são constituídos por unidades do tipo $[SiO_4]^-$ ou $[AlO_4]^-$ que se ligam entre si, através do compartilhamento de átomos de oxigênio para formar as unidades secundárias de construção ^{43;44}. A diversidade e a complexidade dos materiais zeolíticos se devem às diferentes maneiras pelas quais essas unidades secundárias de construção podem se ligar para formar uma estrutura tridimensional ⁴⁴.

Quando a estrutura da zeólita é composta apenas por puro silicato de $[SiO_4]^-$, a carga total da rede cristalina é neutra, no entanto quando a estrutura é composta por tetraedros mistos de aluminossilicatos, a carga da rede cristalina é negativa devido aos tetraedros de $[AlO_4]^{-1}$ e essa carga negativa é compensada por cátions de metais alcalinos e alcalinos terrosos, mono e/ou bivalentes, dentro das cavidades ⁴⁵.

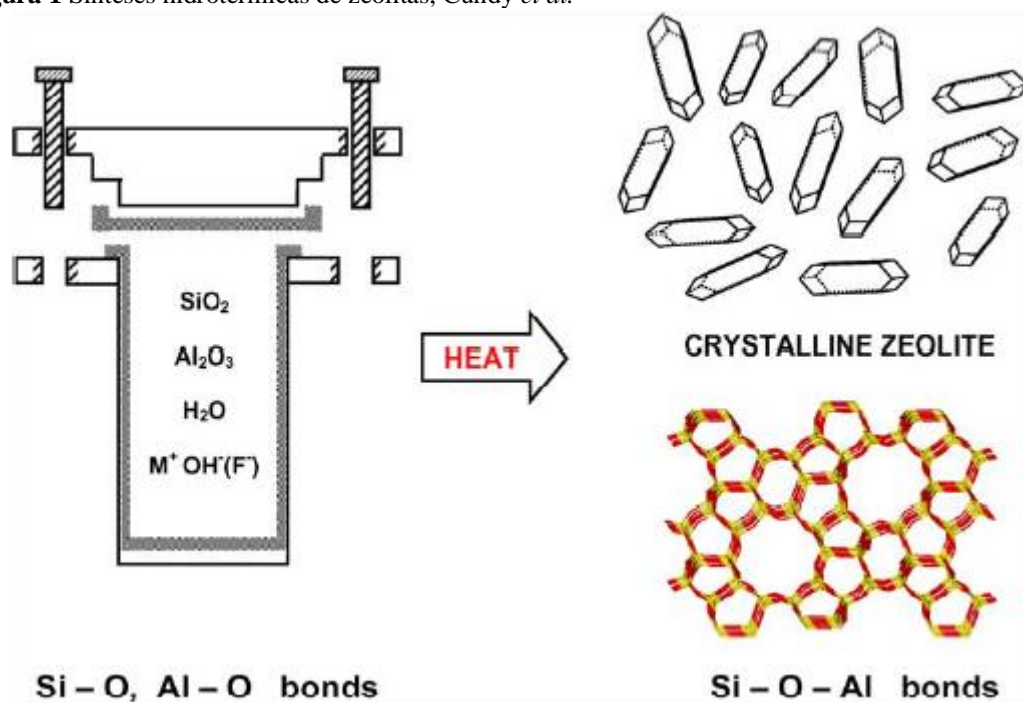
Devido a suas características estruturais, as zeólitas possuem algumas propriedades únicas que as tornam úteis em diversas aplicações, como: área superficial específica elevada; dimensões moleculares dos poros, canais e cavidades, que lhes conferem diferentes tipos de seletividade de forma; capacidade de adsorção elevada; facilidade na separação de reagentes e produtos; possibilidade de modelar as propriedades eletrônicas dos sítios ativos; possibilidade

de pré-ativar as moléculas dentro dos poros, pela existência de campos elétricos elevados e do confinamento molecular e; propriedades ácidas e básicas ^{44; 46; 47}.

As zeólitas são, em geral, preparadas sob condições hidrotérmicas porque a estrutura aberta desses aluminossilicatos deve ser estabilizada durante o seu crescimento, através da ocupação dos canais e das cavidades formadas por moléculas hospedeiras ^{44; 48; 49}. A síntese hidrotérmica de uma zeólita consiste na mistura das fontes contendo silício e alumínio, geralmente em meio básico (meio mineralizante), com uma fonte do cátion de compensação. Em seguida, a mistura reacional é aquecida em uma autoclave sob pressão autógena (no caso de temperaturas de reação acima de 100 °C). Após o período de indução, podem-se detectar cristais do produto zeolítico, que são recuperados por filtração, lavagem e secagem ^{44; 50}. A

Figura 1 mostra uma representação esquemática do processo de síntese de materiais zeolíticos.

Figura 1 Sínteses hidrotérmicas de zeólitas, Cundy *et al.* ⁵⁰



As sínteses de novas estruturas zeolíticas, com propriedades características diferentes, podem ser obtidas ajustando-se variáveis que participam do processo de síntese, como temperatura, pressão, pH, fontes de alumínio, silício e contra-íons catiônicos. Para formar diferentes espécies zeolíticas, usam-se direcionadores orgânicos e também cátions na interação com a rede negativa formada nas ligações tetraédricas entre Si e Al. O tipo de cátion presente

pode dirigir a estrutura a ser formada agindo como um molde (“template”). Assim, cátions orgânicos maiores podem levar a um aumento do volume dos canais ⁵¹.

Zeólitas também podem ser obtidas na escala nanométrica, e quando obtidas nessa escala, suas propriedades físico-químicas apresentam propriedades bem distintas das quais apresentam na escala micrométrica. Conceitualmente nanozeólitas possuem um tamanho menor que 1000 nm ³⁸. A diminuição dos materiais zeolíticos da escala micrométrica para a escala nanométrica acarreta mudanças nas propriedades físico-químicas desses materiais. Nesse caso, observa-se que a proporção entre o número de átomos (externos/internos) aumenta rapidamente com a redução do tamanho das partículas, assim nanozeólitas possuem uma ampla área de superfície externa em comparação com as zeólitas na escala micrométrica. Além disso, os nanocristais de zeólitas têm reduzida limitação de difusão em comparação com os cristais de zeólitas de tamanho micrométrico ⁵².

Nanozeólitas oferecem amplas vantagens em aplicações catalíticas e adsorptivas. Entre suas utilizações, podemos citar seu uso em sensores, filmes, diagnósticos médicos e separação de materiais. Também, elas também podem ser utilizadas na construção de materiais estruturados e na síntese de sólidos porosos ³⁸.

2.2 Zeólitas como trocadores iônicos

Devido a suas características de sistemas de poros tridimensionais e pela grande abertura destes poros, as zeólitas permitem de forma relativamente fácil a troca de certos cátions entre soluções aquosas e sítios de trocas inter cristalinos ⁵³. A grande capacidade de troca catiônica das zeólitas deve-se ao desequilíbrio de cargas que atrairão o cátion mais próximo, de maneira a manter a neutralidade. A propriedade de troca catiônica da zeólita é uma função da relação silício e alumínio. A capacidade é expressa em número de cátions por unidade de massa ou volume, disponível para troca ^{53;54}.

Sua estrutura negativamente carregada atrai cátions para que venham residir dentro dos seus poros e canais. Tal estrutura possui grandes espaços vazios, ou cargas, que podem acomodar cátions tais como Na⁺, K⁺, Br⁺ e Ca²⁺, e até mesmo moléculas relativamente grandes e grupos catiônicos como: água, amônia, íons de carbonato e íons de nitrato. O processo de troca iônica é reversível, permitindo a adsorção de íons e moléculas, fazendo das zeólitas ferramentas úteis para serem usadas como filtros para poeira, absorção de toxinas e como peneiras moleculares. As zeólitas podem conter água como parte de sua estrutura; após a liberação da água por aquecimento, a estrutura básica da zeólita permanece intacta;

subsequentemente outras soluções podem ser adicionadas a estrutura e a zeólita age como um sistema de entrega por um novo fluido; este processo pode ser empregado e aplicado amplamente na medicina, alimentação animal, e outros tipos de pesquisa ⁵⁵.

O processo de troca iônica envolve o contato de uma fase fluida livre (líquida), com uma fase rígida (sólida), granulada, que tem a propriedade de reter e guardar seletivamente uma, ou mais espécies contidas inicialmente na fase fluida. Nas zeólitas, a troca iônica ocorre ao colocá-la em contato com uma solução aquosa das espécies de interesse a uma temperatura selecionada. Os cátions presentes na solução difundem-se para o interior da estrutura da zeólita e substituem os cátions de compensação, até se atingir o equilíbrio ⁵⁶.

2.3 Zeólitas utilizadas como agentes hemostáticos e seus antecedentes

Zeólitas têm sido tradicionalmente utilizadas como catalisadores, agente de adsorção e trocadores iônicos ⁵⁷. Todavia a partir da década de 80, o potencial e eficácia do uso de materiais zeolíticos como eficientes agentes hemostáticos ficaram evidenciados quando a empresa norte-americana Z-Médica depositou a primeira patente (US4822349) ⁵⁸ descrevendo a invenção e o desenvolvimento de agentes hemostáticos a base de zeólitas. Trata-se então do agente hemostático chamado comercialmente de Quikclot[®], produto esse elaborado a partir da zeólitas e outros sólidos inorgânicos. Em 2002, a *Food and Drug Administration* (FDA), aprovou o uso desse agente hemostático, e o mesmo foi usado para cuidados de sangramento em vítimas de guerra. O Quikclot foi amplamente aceito e usado pelas forças de combate norte-americanas durante a guerra do Iraque (2003-2010) e Afeganistão (2001-2013) ^{16; 25; 59; 60; 61}.

O mecanismo proposto para a ação desse agente hemostáticos a base de materiais zeolíticos ocorre através do aumento da adsorção das moléculas de água presentes no sangue: no momento do contato entre a zeólita e o sangue, a grande área superficial da zeólita desidratada (200-800 m²/g) adsorve as moléculas de água, concentrando assim fatores de coagulação e plaquetas do sangue e conseqüentemente acelerando a coagulação ^{57; 59}. Adicionalmente, a superfície de carga negativa das zeólitas fornece um ambiente químico favorável que funciona como um ativador de contato do padrão intrínseco da cascata de coagulação ativando proteínas e fatores, que iniciam uma série de mecanismos em cadeia responsáveis pela associação da enzima trombina e a polimerização da fibrina ^{27; 60}.

Embora fosse efetivo, o agente hemostático Quikclot[®] apresentou um efeito colateral bastante sério na sua aplicação; a adsorção das moléculas de água do sangue no material zeolítico induzia uma reação forte reação exotérmica na superfície do tecido, ou seja, liberava

energia, nesse caso na forma de calor, gerando um aquecimento localizado e causando queimaduras ^{22; 60}. Wright *et al.* ⁴⁰ em seus experimentos com porcos anestesiados, aplicou o agente hemostático Quikclot[®] e observou uma elevação da temperatura na superfície do tecido em torno de 95^oC , enquanto a temperatura interna do tecido atingiu temperaturas superiores a 50^oC, a 3mm de profundidade.

A primeira geração do produto Quikclot[®] foi retirada do mercado, dando lugar aos produtos da segunda geração. Desde então, o laboratório Z-Médica tem desenvolvido variações do uso destes agentes. Em 2005, foi introduzido no mercado a segunda geração destes agentes hemostáticos: Quikclot ACS+ e Quikclot Sport. Estes tiveram como objetivo, suprir algumas deficiências relacionadas aos produtos da geração anterior, bem como reparar efeitos colaterais ocasionados com o uso dos agentes hemostáticos da primeira geração. Em 2006, foi introduzida a terceira geração com o desenvolvimento de agentes hemostáticos à base de caolin. À partir de 2009, outras variações desses agentes hemostáticos foram inseridas no mercado, destinada a vários tipos de segmentos como cirúrgica, civil, militar, veterinário, sendo muito eficazes no combate à hemorragias de várias naturezas.

Desde o ano de 2006, uma série de agentes hemostáticos a base de zeólitas e argilas foram patenteadas. Dentre as zeólitas mais utilizadas para este fim, pode-se citar a zeólita 5A, ZSM-5, VPI-5, X, Y, AIPO, SAPO, beta, chabazita, mordenita, bentonita, esmectina, haloisita, caolin entre outras classes ^{2; 26; 62; 63; 64; 65; 66}. Além disso, foi utilizada uma série de íons no processo de troca iônica destes materiais, como por exemplo: Ca, Zn, Ag, K, Ba, Sr, NH₄, Fe, Cu, Mg, que teve como objetivo favorecer a coagulação sanguínea ou atribuir alguma característica adicional ao material, como a capacidade antimicrobiana na inibição do crescimento de microrganismos ^{9; 10; 67; 68}.

Estes produtos apesar de serem comercializados em alguns países além dos Estados Unidos, não são comercializados no Brasil. Embora a fabricação e venda de agentes hemostáticos à base de zeólita ainda não esteja regulamentada no nosso país, devido à suas características, este tipo de produto se enquadraria na classificação da Anvisa como produto médico para saúde.

De acordo com a Anvisa, produtos médicos são produtos para a saúde, tal como equipamento, aparelho, material, artigo ou sistema de uso ou aplicação médica, odontológica ou laboratorial, destinado à prevenção, diagnóstico, tratamento, reabilitação ou anticoncepção e que não utiliza meio farmacológico, imunológico ou metabólico para realizar sua principal função em seres humanos, podendo entretanto ser auxiliado em suas funções por tais meios ⁶⁹.

Produtos com esta classificação devem apresentar algumas características fundamentais para sua aplicação. Primeiramente o material deve ser biocompatível, ou seja, deve possuir uma resposta apropriada, com o mínimo de reações alérgicas, inflamatórias ou tóxicas quando em contato com o tecido vivo. Além disso, deve apresentar biofuncionalidade, ou seja, deve ter a capacidade de desempenhar a função desejada. Adicionalmente, o material deve apresentar estabilidade, que é referente à capacidade do material em manter suas propriedades elementares no tempo previsto da sua aplicação. De maneira secundária, o material deve apresentar processabilidade, ou seja, o material deve ter a capacidade de ser submetido à um processo industrial, e também a capacidade de ser submetido ao processo de esterilização sem alterar sua funcionalidade ⁷⁰.

Conforme a literatura, as zeólitas utilizadas como agentes hemostáticos podem ser incorporados em vários tipos de materiais como bandagens, curativos, esponjas, tecidos, swabs, gazes, dispositivos, pastilhas, malhas, adesivos, entre outros tipos, tal como descrito nos documentos: US2006/0211971 ⁷¹, US2006/0211965 ⁷², US2007/0004995 ⁷³, US2007/0167971 ⁷⁴, US2008/0206134 ⁷⁵, US2008/0085300, US2008/0125686 ⁷⁶, US8277837 ⁷⁷, para então serem utilizadas de uma forma mais eficiente e segura.

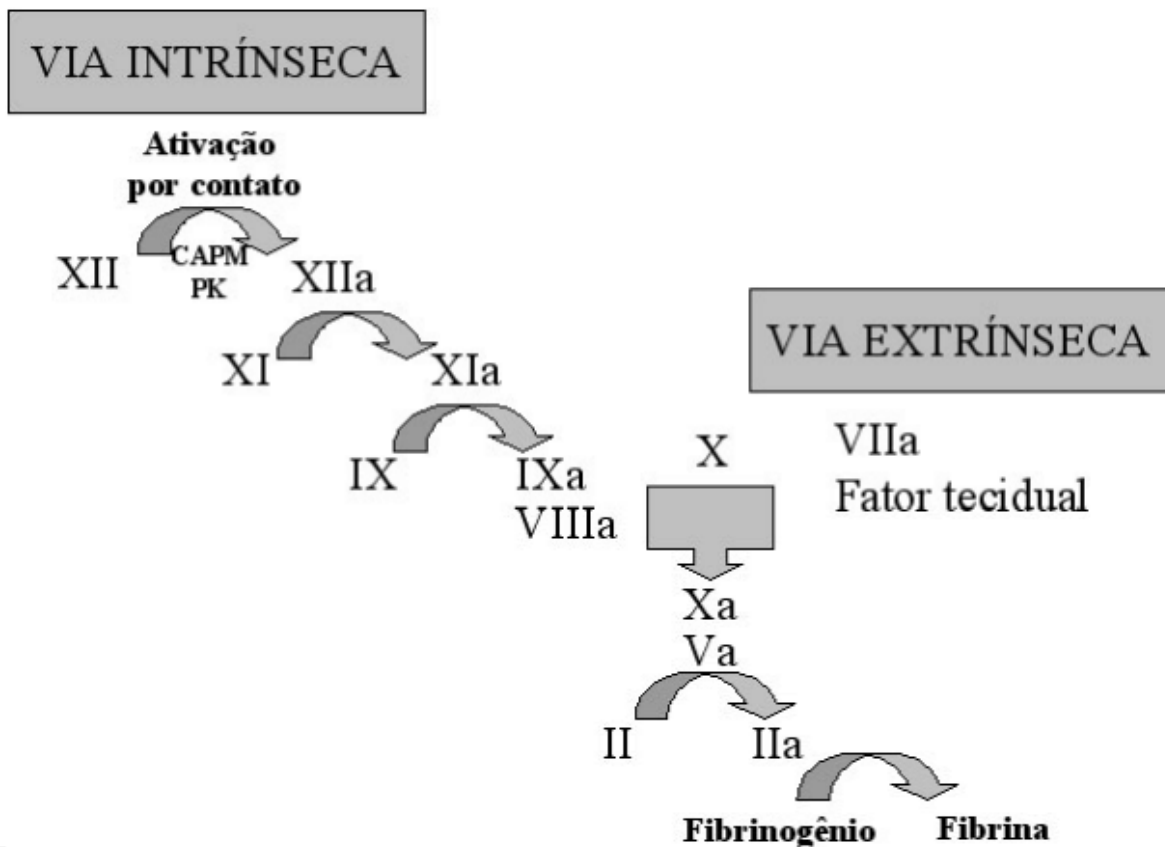
Assim sendo, zeólitas quando incorporadas em curativos ou bandagens, ou qualquer outro tipo de material compatível com seu mecanismo de ação, são classificados como produtos para saúde e de classe de risco II, de acordo com a RDC nº 85/2001 ⁶⁹. A partir daí são necessárias uma série de análises e experimentos para o enquadramento desses agentes hemostáticos à base de zeólitas como produto para saúde.

2.4 Princípios teóricos do Processo de Coagulação e técnicas *in vitro* de avaliação da hemostasia

A base do modelo de coagulação sanguínea foi desenvolvida no início do século XX, descrevendo apenas porções terminais da coagulação. Porém, a descoberta dos componentes específicos da coagulação responsáveis pela geração de trombina ocorreu somente após as décadas de 40 e 50 ⁷⁸. Foi somente na década de 60 que dois grupos independentes introduziram um modelo de coagulação sanguínea. Trata-se de uma série de etapas em que a ativação de cada um dos fatores de coagulação leva à ativação de outro, culminando com uma explosão de geração de trombina. O modelo de cascata foi proposto por Macfarlane (1964) ⁷⁹ e publicado pela revista Nature e logo em seguida, o modelo em cascata relatado por Davie e Ratnoff (1964) ⁸⁰ foi publicado pela revista Science ⁸¹.

A cascata de coagulação envolve uma sequência de reações interligadas, dividido na via extrínseca em resposta ao contato do sangue com os tecidos extravasculares e na via intrínseca ou acessória pelo contato do sangue com uma superfície diferente do endotélio normal e das células sanguíneas ⁸² (Figura 2).

Figura 2 Etapas da cascata de coagulação (via extrínseca, via acessória (intrínseca) e via comum). Fonte: Franco, 2001 ⁸³



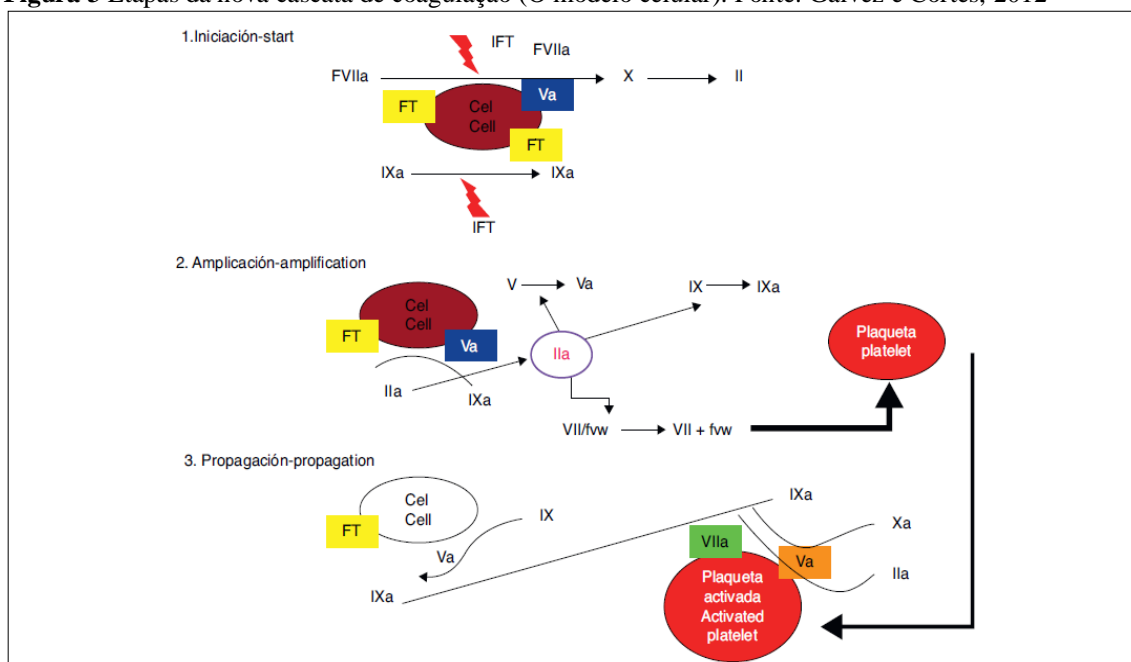
O sistema extrínseco ocorre quando a ativação do fator VII, pelo fator tecidual, produz a ativação do fator X. O tecido traumatizado libera um complexo de vários fatores, denominado fator tecidual. O fator III, o cálcio e fator VII formam um complexo que age enzimaticamente na presença de fosfolipídios para converter o fator X para fator X ativado (FXa) ⁷⁸. O sistema intrínseco é localizado nos componentes do sangue e é iniciado através da ativação por contato do fator XII em superfícies carregadas negativamente, e posteriormente, ativando outros componentes de contato ⁷⁸. A calicreína e o cininogênio de alto peso molecular (CAPM) podem modular a ativação do fator XII. A calicreína então acelera a conversão do fator XII para fator XII ativado (FXIIa). O FXIIa atua enzimaticamente sobre o fator XI para ativá-lo. O FXIa atua

sobre o fator IX ativando-o. Por sua vez, o FIXa, ao atuar com o FVIIIa, fosfolipídios plaquetários (FP3), ativa o fato X ⁸².

Estas duas vias convergem, formando o caminho comum, o que resulta na ativação do Fator X convertendo-o em fator X ativado (FXa), formando uma pequena quantidade de trombina. A trombina, por sua vez, atua na conversão do fibrinogênio (fator I) em monômeros de fibrina, que são interligados pelo fator XIII ativado (FXIIIa), formando polímeros insolúveis de fibrina. A transformação ou “estabilização” da fibrina solúvel em um coágulo de fibrina insolúvel é catalisada pelo fator XIII, na presença de cálcio, onde o fator XIII normalmente circula no plasma sob a forma de pro-enzima inativa e é convertido em sua forma ativa pela trombina ^{82; 84}.

O último modelo de coagulação proposto é baseado em superfícies celulares, no qual a hemostasia requer substâncias pro-coagulantes ativadas que permaneçam localizadas no sítio da lesão para a formação de tampão plaquetário e de fibrina. Neste novo modelo, o processo de coagulação sanguínea é iniciado pela exposição de fatores de coagulação localizados na corrente sanguínea ⁸⁵. O Modelo Celular de Coagulação foi proposto por Hoffman e Monroe ⁸⁶ e sugere que a coagulação não ocorre como uma "cascata", mas em três fases que se sobrepõem: 1) **de iniciação**, que ocorre no tecido na presença de um fator celular; 2) **amplificação**, em que as plaquetas e co-fatores são ativadas para definir o cenário para a geração de trombina em grande escala; e 3) **de propagação**, em que grandes quantidades de trombina são gerados sobre a superfície de plaquetas ⁸⁶.

Figura 3 Etapas da nova cascata de coagulação (O modelo celular). Fonte: Galvez e Cortes, 2012 ⁸⁷



O processo de coagulação sanguínea é iniciado por exposição de células que expressam o fator tecidual na corrente sanguínea. O fator tecidual está presente nas membranas das células vizinhas do leito vascular, mas não se encontra, normalmente, em contato com o sangue ^{85; 88}.

Na fase da iniciação, o complexo TF/FVIIa (fator tecidual/fator VII ativado) ativa o FX diretamente e indiretamente através do FIX, transformando pequenas quantidades de protrombina em trombina, que são ainda insuficientes para a realização do processo de formação da trombina. A interação entre o TF e o FVIIa é um passo fundamental para o início da coagulação ^{87; 89}.

Na fase de amplificação, a trombina, em conjunto com o cálcio do sangue e o fosfolípido derivados das plaquetas, participam ativamente no processo de feedback positivo na ativação dos fatores XI, IX, VIII e V, e, especialmente, para acelerar a ativação plaquetária. Simultaneamente os fatores mencionados são atraídos através de mecanismos quimiostáticos para a superfície das plaquetas, onde um processo muito importante da ativação e multiplicação ocorrem rapidamente ⁸⁹. Uma pequena quantidade de trombina produzida pelo complexo TF-FVIIa é essencial para a amplificação, embora seja insuficiente para a formação do coágulo. A trombina é um agente de recrutamento plaquetário muito ativo, e por feedback positivo pode também ativar os fatores V, VIII e XII. A amplificação é também caracterizada pelo sistema de feedback negativo através de anticoagulantes naturais: TFPI (do inglês complexo inibidor de TF), antitrombina e proteína C, que desempenha um importante papel na regulação da procoagulação ⁸⁷.

A fase de propagação é caracterizada pelo recrutamento de um grande número de plaquetas para o sítio da lesão e pela produção dos complexos tenase e protrombinase na superfície das plaquetas ativadas ^{85; 90}. O FIXa ativado durante a fase de iniciação se liga ao FVIIIa na superfície das plaquetas formando o complexo tenase. Como o FXa não pode se mover efetivamente das células que expressam FT para a plaqueta ativada, maior quantidade de FXa deve ser produzida diretamente na superfície da plaqueta pelo complexo FIXa/FVIIIa ^{85; 86}.

Finalmente, o FXa rapidamente se associa ao FVa ligado à plaqueta durante a fase de amplificação, resultando na formação do complexo protrombinase, o qual converte grande quantidade de protrombina em trombina. Esta é responsável pela clivagem do fibrinogênio em monômeros de fibrina, que polimerizam para consolidar o tampão plaquetário ⁸⁵. O processo final, sempre ocorrendo na superfície da plaqueta, acelera e leva a uma explosão na geração de grandes quantidade de trombina em fibrina ⁸⁹. Trombina simultaneamente ativa o FXIII e o inibidor da via do fator tecidual (TFPI) que positivamente adiciona efeitos de estabilização e resistência à plasmina ⁸⁷. A ativação plaquetária altera a permeabilidade da membrana, permitindo a entrada de cálcio e a liberação de substâncias quimioestáticas que atraem os fatores de coagulação. O fator V e os fosfolípidos são liberados ao mesmo tempo, fornecendo o complemento necessário a coagulação ⁸⁷.

2.5 Metodologia para estudos da coagulação sanguínea

Alguns parâmetros descritos pelos modelos de coagulação podem ser medidos através de certas análises laboratoriais de coagulação *in vitro*, como é o caso da via intrínseca, em que se mede o tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPA) e da via extrínseca, em que se mede o tempo de protrombina (TP). Essas técnicas têm limitações principalmente quando comparadas a hemostasia que ocorre *in vivo* ⁹¹.

O teste TP fornece uma indicação sobre a quantidade total de protrombina presente no sangue. Este teste é usado para identificar as anormalidades dos fatores envolvidos no sistema extrínseco (protrombina e fatores V, VII e X). O teste TP é realizado rotineiramente nos laboratórios para a determinação da concentração de fibrinogênio no plasma. Para se determinar a quantidade de fibrinogênio adiciona-se uma quantidade de trombina ao plasma sanguíneo e mede-se imediatamente a velocidade/tempo de formação da fibrina ⁸².

O teste mais comumente empregado para verificação do mecanismo intrínseco da coagulação é o tempo tromboplastina parcial ativado (TTPA). Esse teste é utilizado para o

diagnóstico de anomalias dos fatores da coagulação XII, XI, IX, VIII, X, protrombina e fibrinogênio. O teste TTPA é realizado através da adição de cálcio e de um composto particulado de carga superficial negativa como o caulim ou silicato de alumínio, o que acarreta na ativação dos fatores XII e XI por essas substâncias, sendo possível determinar diretamente o TTPA ⁸².

O tempo de coagulação ativado (TCA) é geralmente utilizado para monitorizar o efeito da heparina, antes, durante e após cirurgias que requerem procedimentos de anticoagulação intensas, tais como a cirurgias cardíacas, angioplastia cardíaca, e diálise ⁹². O teste TCA é sensível às variações ocorridas na hemostasia pela via intrínseca, e mede o tempo necessário para que as amostras de sangue total (entende-se por sangue total o sangue com todos os seus componentes antes do fracionamento) coagular após a ativação de contato por caulim ou de celite ^{93;94}. Na Figura 4 é possível observar o monitor de coagulação ativada (MCA 2000), no qual é possível analisar o tempo de coagulação ativado.

Figura 4 Monitor de coagulação ativada MCA 2000 – Fundação Adib Jatene Bioengenharia. Fonte: <http://www.fajbio.com.br/Default.aspx>, Acesso em 15 de mai de 2016



Existem outros testes disponíveis na rotina médico-laboratorial que monitoram a hemostasia, como por exemplo, determinação de fibrinogênio, teste de geração de trombina, dosagem de fatores de coagulação, contagem de plaquetas, teste de agregação e adesão plaquetária, entre outros.

Outra técnica muito eficiente disponível para a avaliação da coagulação é a tromboelastografia (TEG) elaborada por Hellmut Hartet em 1948. Esta técnica fornece uma

avaliação global da hemostasia quantitativamente por medição das alterações das condições viscoelásticas do sangue total, desde o início da coagulação até a fibrinólise. O teste inclui o início da formação do coágulo, o seu progresso, a sua máxima força e estabilidade, que fornecem informações importantes sobre a coagulação, fibrinólise e função plaquetária ^{95; 96; 97}. Este equipamento fornece informações adicionais em comparação com testes de laboratório padrão (por exemplo, TP, TTPA, e tempo de geração de trombina). A tromboelastografia pode também identificar as contribuições relativas aos fatores de coagulação, tais como fibrinogênio e plaquetas, para o processo global de coagulação ⁹⁷. Embora a Tromboelastografia (TEG) tenha sido desenvolvida por Hellmut Hartet em 1948, apenas em 1996 a trademark TEG[®] foi registrado e patenteado pela Haemoscope Corporation (Figura 5).

Figura 5 TEG[®] 5000 Thrombelastograph[®] Sistema de análise hemostática. Fonte: <http://www.haemonetics.com/default.aspx>, Acesso em 16 de abr de 2016



Outro aparelho que utiliza a técnica de tromboelastometria e é utilizado para avaliação da coagulação sanguínea é denominado ROTEM[®]. Tanto o TEG quanto o ROTEM fornece uma representação gráfica da formação e lise (quebra) do coágulo, porém enquanto o sistema de detecção do TEG é um fio de torção, no ROTEM é um detector óptico ⁹⁸ (Figura 6).

Figura 6 Rotem[®] delta sistema de análise hemostática. Fonte: <https://www.rottem-usa.com/products/rotem-delta/>, Acesso em 03 de abr de 2016



É importante notar que nenhum teste de coagulação clínica reflete totalmente a complexidade da hemostasia *in vivo*. Apesar disso, os testes de coagulação disponíveis possuem alta sensibilidade para a detecção de deficiência de um ou mais fatores da coagulação, sendo, portanto, testes eficientes e confiáveis para a detecção das alterações dos fatores da coagulação em pacientes com tendência a sangramento ⁸⁵.

2.5.1 Estudos da atividade hemostática por Tromboelastografia (TEG)

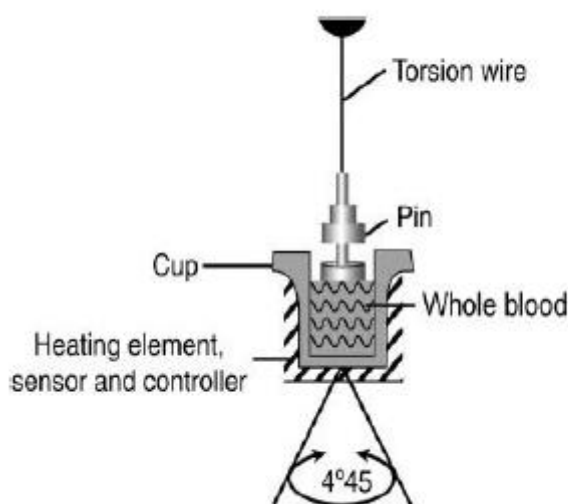
Como já foi dito anteriormente, a tromboelastografia (TEG) é uma técnica experimental que permite uma avaliação global do processo de iniciação, formação, estabilização e lise do coágulo, documentando a interação das plaquetas, e outras células sanguíneas, como as proteínas da coagulação. São avaliadas as propriedades elásticas do sangue que fornece uma avaliação global da função hemostática. As alterações que ocorrem durante a coagulação são registradas, fornecendo uma representação gráfica do processo de polimerização da fibrina e também da força do coágulo ⁹⁹.

Um dos diferenciais deste teste em relação aos ensaios de coagulação de rotina, tais como TTPA (tempo de tromboplastina parcial ativada) e TP (tempo de protombina) é que o TTPA e o TP não são executados em sangue total; em vez disso, estes testes são realizados apenas no plasma. Assim, a contribuição de plaquetas para a resistência e formação do coágulo não são considerados. Enquanto TP e o TTPA são frequentemente testes adequados para distúrbios de coagulação do sangue e medicações utilizados para tratar estas desordens de

monitoramento, eles fornecem uma visão simplista das características globais da coagulação¹⁰⁰.

A Figura 7 mostra o princípio de funcionamento do instrumento TEG. O equipamento possui 2 canais; para cada canal, um pino suspenso por um fio de torção é imerso no sangue total em um recipiente de plástico (cup). O cup oscila a uma velocidade constante em um ângulo de $4^{\circ} 45'$, seis vezes por minuto para imitar o fluxo venoso lento e ativar a coagulação¹⁰⁰. O torque do cup é transmitido para o pino através da formação das cadeias de fibrina dos coágulos conforme a coagulação prossegue, e transmitido para o fio de torção para a conversão de um transdutor elétrico-mecânico num sinal elétrico, que pode ser monitorado por um computador^{97; 101}.

Figura 7 Imagem ilustrativa do princípio de funcionamento do equipamento TEG[®]. Fonte: Peng e Rhind, 2015⁹⁷

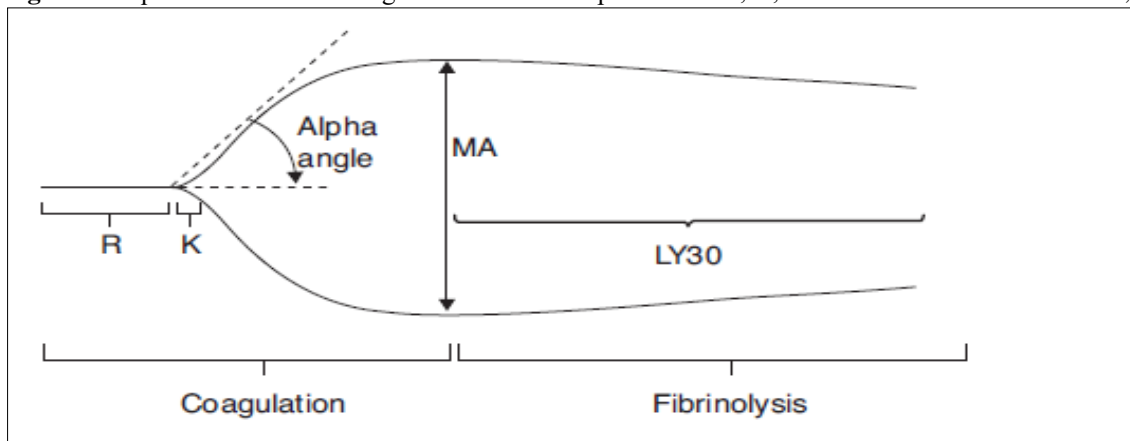


O equipamento irá fornecer os seguintes parâmetros de coagulação^{2; 97}:

- 1) tempo de reação: caracterizado como R, é o tempo de formação de um coágulo reconhecível com tamanho de aproximadamente 2 mm, início da produção de fibrina;
- 2) tempo de coagulação: caracterizado como K, este parâmetro equivale ao tempo que se inicia a partir de R e se prolonga até o coágulo atingir 20 mm, este parâmetro mostra a formação de um coágulo relativamente firme;
- 3) ângulo α (alfa): inclinação entre R e K, representa a taxa de geração de trombina e a conversão de fibrinogênio em fibrina;
- 4) MA, maior amplitude ou amplitude máxima, reflete a máxima propriedade elástica da fibrina e adesão plaquetária.

A Figura 8 mostra um típico tromboelastograma geralmente obtido em estudos de coagulação sanguínea utilizando o TEG.

Figura 8 Esquema do tromboelastograma ilustrando os parâmetros R, K, α e MA. Fonte: Galvez e Cortes, 2012 ⁸⁷



A aplicação e o desenvolvimento deste método de análise de sangue evoluíram fortemente baseados nas necessidades do anestesista moderna. Assim sendo, este equipamento apresenta muitas aplicações, como por exemplo: controle de parâmetros da coagulação sanguínea no transplante de fígado, cirurgia de *bypass* cardiopulmonar, obstetrícia, cardiologia e pediatria sendo que a aplicação na área de trauma é muito importante devido a sua capacidade de avaliar o sangue total. O TEG é ideal para identificar rapidamente os pacientes com coagulopatias aguda traumática e posteriormente, ativar os protocolos de transfusão maciça para estes pacientes mais rapidamente ^{100; 102}.

2.6 Métodos de caracterização

2.6.1 Determinação de cargas de superfície e do ponto isoelétrico pela técnica de potencial zeta

Zeólitas quando em contato com o sangue são capazes de funcionar como um ativador de contato do padrão intrínseco da cascata de coagulação ativando proteínas e fatores de coagulação ^{60; 103}. Este fenômeno é possível devido às cargas negativas de superfície das zeólitas. Sendo assim, é de extrema importância o estudo das cargas superficiais destes materiais.

Um estudo importante destas cargas de superfície foi demonstrado no trabalho de Ostomel *et al.* ¹⁰³. Foi observado que a carga efetiva de óxidos metálicos influencia na resposta

hemostática do material, sendo possível selecionar certos materiais que induzem uma resposta biológica previsível e sintonizável quando eles estão em contato com o sangue. Neste estudo, foi demonstrado que a partir do pH onde se encontra o ponto isoelétrico do material (pH no qual há equilíbrio entre as cargas negativas e positivas), é possível prever se o material é pro-coagulante ou anticoagulante em concentrações de cálcio semelhantes aos níveis séricos. Óxidos metálicos que exibem um ponto isoelétrico abaixo do pH fisiológico do sangue são considerados pro-coagulantes, enquanto que materiais que apresentam ponto isoelétrico com pH acima do pH fisiológico do sangue são considerados anticoagulantes ¹⁰³.

Outro exemplo da importância da carga de superfície das partículas no processo de coagulação sanguínea é demonstrado no trabalho de Li *et al.* ¹⁰⁴. Materiais inorgânicos ligados a proteínas coronas podem produzir mudanças fisiológicas e patológicas, incluindo a coagulação do sangue, absorção pelos macrófagos, agregação de proteínas e ativação do complemento ^{104; 105; 106; 107}. Diante disso, a superfície de um nanomaterial torna-se rapidamente coberta por proteínas plasmáticas (proteínas coronas) ao entrar em um fluido biológico ^{104; 108}. Este estudo sugere a existência de proteínas coronas na superfície de zeólitas que modificam a sua bio-funcionalidade. Neste caso, foi observado que zeólitas revestidas com essas proteínas tem uma atividade pro-coagulante superior a zeólita sem o revestimento das proteínas coronas. A interação existente entre as zeólitas e essas proteínas são possíveis devido à existência de cargas em ambos os materiais ¹⁰⁴.

2.6.2 Estudos térmicos das zeólitas pelas técnicas de TG (Análise Termogravimétrica) e DSC (Calorimetria Diferencial de Varredura)

A calorimetria exploratória diferencial (DSC) é uma técnica termo-analítica na qual se acompanha a variação da energia (entalpia) entre uma amostra e a referência durante o processo de aquecimento/resfriamento. Quando ocorre um processo de absorção de calor (processo endotérmico) surge um pico positivo (já que o aquecedor da amostra deve dissipar calor para manter a temperatura igual à referência), enquanto no processo de emissão de calor (processo exotérmico) o pico é negativo. O DSC permite determinações quantitativas, estando a área dos picos relacionada com a energia envolvida no processo, sendo utilizados padrões para calibração do equipamento ¹⁰⁹. Já a análise termogravimétrica (TG) é uma técnica termo analítica que acompanha a variação de massa da amostra, ou seja, a ganha ou perda de massa devido a alterações da temperatura provocadas na amostra. O experimento consiste em utilizar uma termobalança, que após variação da temperatura do material, faz uma nova leitura da massa

para quantificar o material retirado ¹⁰⁹. Estas duas técnicas conjuntamente são ideais para a avaliação do calor de dessorção e capacidade de hidratação das zeólitas.

Entre 40 a 50 % do volume do cristal de zeólitas é composto por poros e canais, por isso esses materiais são amplamente utilizados como adsorventes ¹¹⁰. Assim sendo, estes materiais são conhecidos por exibirem uma significativa reação exotérmica, e essa propriedade é principalmente dependente da área superficial, porosidade e da umidade residual das zeólitas ^{17; 24; 60}. No caso de aplicação biomédica de zeólitas, a reação exotérmica resultante da adsorção de água produz aumento de temperatura que poderia ser prejudicial aos tecidos próximos à aplicação da zeólita ⁶⁰, por essa razão, devem ser realizados estudos térmicos sistemáticos com esses materiais.

Segundo Stucky *et al.* ¹¹¹ a pré-hidratação e a troca iônica são duas estratégias eficazes para a atenuação do efeito colateral associado a queimadura nos tecidos adjacentes à ferida, provocado devido a grande liberação de calor mediante hidratação sem afetar as propriedades do material zeolítico.

De acordo com Ahuja *et al.* ²⁸ a alteração da composição química da zeólita pode diminuir a geração de calor. A adsorção de água pelas zeólitas é devido à atração eletrostática entre água e os íons que residem dentro dos poros do material. Para atenuar o calor de hidratação, os íons podem ser substituídos por outros íons que possuem uma energia livre padrão mais baixos do que a energia livre padrão de formação de água, amenizando assim o efeito colateral das zeólitas.

2.6.3 Análise textural por adsorção de nitrogênio para determinação da área superficial (BET)

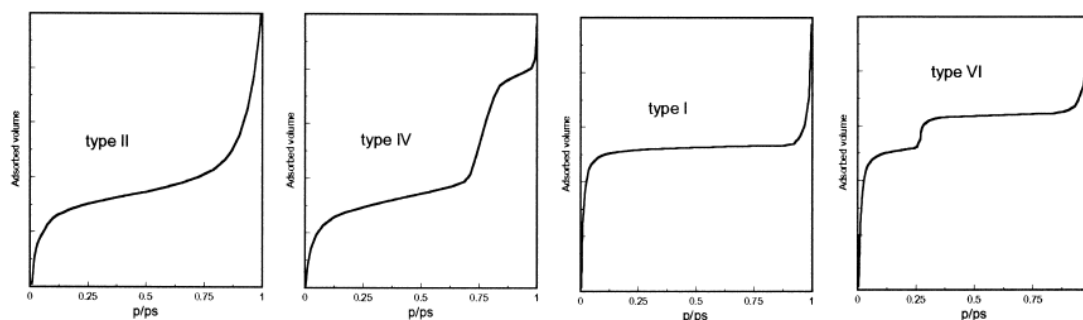
Algumas estruturas de zeólitas apresentam canais de cavidades interconectados de dimensões moleculares, e este tipo de estrutura microporosa confere as zeólitas uma superfície interna muito maior quando comparado à sua superfície externa ¹¹². Como foi discutido anteriormente, uns dos mecanismos proposto para a ação de agentes hemostáticos à base de materiais zeolíticos ocorre através do aumento da adsorção das moléculas de águas presentes no sangue ^{57; 59}. Conseqüentemente o estudo da área superficial destes materiais é extremamente importante para o entendimento deste mecanismo.

Um dos métodos mais comuns de determinação da área específica de um sólido se baseia na determinação da quantidade de um adsorvato necessária para recobrir como uma monocamada a superfície de um adsorvente. Os adsorvatos normalmente utilizados para esse

fim são gases e, por isso, torna-se necessário o estudo da interação entre o gás e o sólido no processo de adsorção. Quando um sólido é exposto a um gás ou vapor em um sistema fechado à temperatura constante, o sólido passa a adsorver o gás, ocorrendo assim um aumento da massa do sólido e um decréscimo da pressão do gás. Após um determinado tempo, a massa do sólido e a pressão do gás assumem um valor constante. A quantidade de gás adsorvida pode ser calculada pela diminuição da pressão por meio da aplicação das leis dos gases ou pela massa de gás adsorvida pelo sólido ¹¹³.

Adsorção de nitrogênio à temperatura de 77 K representa a técnica mais utilizada para determinação de área de superfície de materiais e para caracterização de sua textura porosa. O ponto de partida é a determinação da isoterma de adsorção, que é o volume da quantidade adsorvida em relação a pressão relativa (P / P_0) variando 0,05-1,0 ¹¹⁴. A forma da isoterma depende do tipo de porosidade do sólido. Dentre os 6 tipos de isotermas, normalmente quatro são mais utilizados em caracterização de sólidos (Figura 9) ¹¹⁴.

Figura 9 Os quatro tipos de adsorção isotérmica geralmente encontrada por adsorção de nitrogênio. Fonte: Leofanti *et al.*, 1998 ¹¹⁴



A isoterma do tipo I é característica de sólidos com microporosidade. As isotermas do tipo II e IV são típicas de sólidos não porosos e de sólidos com poros razoavelmente grandes, respectivamente. As isotermas do tipo III e V são características de sistemas onde as moléculas do adsorvato apresentam maior interação entre si do que com o sólido. Estes dois últimos tipos não são de interesse para a análise da estrutura porosa. A isoterma do tipo VI é obtida através da adsorção do gás por um sólido não poroso de superfície quase uniforme, o que representa um caso muito raro entre os materiais mais comuns ¹¹³. O tipo de isoterma é função do efeito do tamanho do poro sobre o fenômeno de adsorção. De acordo com as curvas conhecidas, foi estabelecida uma classificação dos poros em função de seu diâmetro: Microporos possuem um diâmetro menor que 20 Å; Mesoporos entre 20 e 500 Å e Macroporos maior que 500 Å ¹¹³.

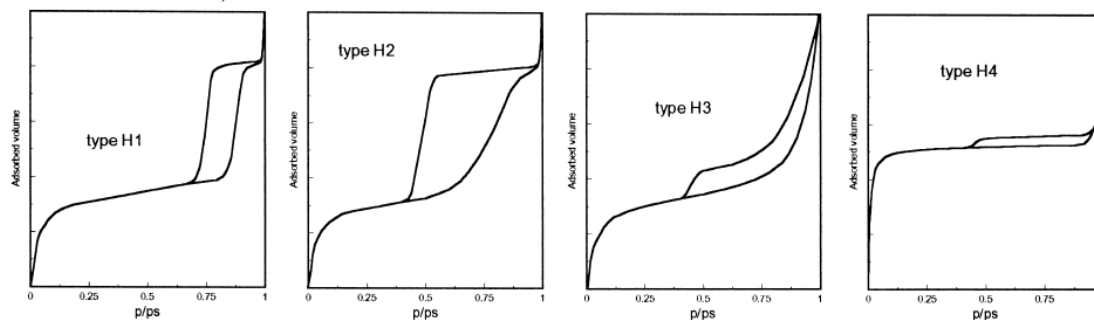
O método de BET é utilizado para o cálculo da área superficial total, enquanto que o método de Saito-Foley (SF) é utilizado para a determinação de área de superfície e volume de microporos ¹¹⁴.

A análise de BET fornece avaliação da área de superfície específica de materiais através da adsorção de nitrogênio. A técnica engloba as avaliações da área superficial e da área de poros externos para determinar a área de superfície específica total, em m²/g. O método BET baseia-se num modelo que assume a formação de sucessivas camadas de moléculas de gás numa dada superfície (adsorção multicamadas). A área de superfície específica é então calculada a partir da quantidade moléculas adsorvida na primeira camada. O espaço ocupado por uma molécula adsorvida é multiplicada pelo número na primeira camada ¹¹⁵.

As diferentes trajetórias entre os processos de adsorção e dessorção caracterizam uma histerese ¹¹³. A histerese é geralmente associada com a condensação capilar em estruturas de mesoporos. As histereses podem apresentar uma ampla variedade de formas dependendo da forma dos poros (Figura 10).

. Desta maneira, a histerese tipo H1 é geralmente associada a materiais porosos caracterizados por aglomerados ou de esferas uniformes compactadas em um arranjo bastante regular que, portanto, têm uma estreita distribuição de tamanhos de poros. Materiais porosos adsorventes (como por exemplo, sílica gel), que apresentam distribuição de tamanhos de poros e forma não muito bem definida, possuem uma histerese tipo H2. O loop de histerese tipo H3 é observado em agregados de placas que dão origem a poros com forma de fenda; de maneira similar, o tipo H4 é típico de poros estreitos também tipo fenda ¹¹⁶.

Figura 10 As quatro formas de histerese de adsorção isotérmica geralmente encontrada por adsorção de nitrogênio. Fonte: Leofanti *et al.*, 1998 ¹¹⁴



2.7 Análise qualitativa do efeito antimicrobiano de zeólitas na inibição do crescimento de microrganismos

Devido a suas características de sistemas de poros tridimensionais e pela grande abertura destes poros, as zeólitas permitem de forma relativamente fácil a troca de certos cátions entre soluções aquosas e sítios de trocas intercrystalinos ⁵³. Adicionalmente, sabe-se que os metais pesados tais como a prata, zinco, cobre, mercúrio, estanho, chumbo, bismuto, cádmio, cromo, e tálio têm propriedades antibacterianas ¹¹⁷. Consequentemente, nos últimos anos inúmeras pesquisas envolvendo zeólitas sintéticas ou naturais trocadas iônica com estes metais estão sendo realizadas na tentativa de adicionar atividade antibacteriana a estes materiais ¹¹⁷; ¹¹⁸. Os metais que apresentam capacidade antimicrobiana podem ser incorporados em zeólitas por meio do processo de troca iônica, em seguida, quando estão em seu sítio de ação podem liberar lentamente esses metais e atuarem como bactericida inorgânicos e desinfetantes, que são excelentes em termos de segurança e de estabilidade quando em comparação com outros antibióticos orgânicos ¹¹⁷; ¹¹⁹.

Dentre os metais com potencial antimicrobiano, a prata tem se destacado devido a sua alta eficiência na inibição do crescimento de um amplo espectro de microrganismo ¹²⁰; ¹²¹; ¹²². Matsumura *et al.* ¹²³ em seus estudos de atividade antimicrobiana de zeólitas com prata contra *Escherichia coli*, concluiu que o íon de prata desempenha um importante papel para a ação bactericida na zeólita de prata. Desta forma foi proposto por estes autores dois processos sucessivos possíveis que podem estar envolvidos na ação da zeólita de prata: as células bacterianas ao fazer contato com as zeólitas carregadas com íons prata, assimilam o metal que inibe várias funções na célula e, consequentemente, causando danos celulares. A segunda é a geração de espécies reativas de oxigênio, que são produzidos, possivelmente através da inibição de enzimas respiratórias pelos íons prata causando danos na própria célula bacteriana.

Desta maneira, avaliar se zeólitas apresentam potencial antimicrobiano é muito importante já que seria uma excelente característica adicional a um possível agente hemostático enquadrado como produto para a saúde.

3 Objetivos

3.1 Geral

O objetivo deste trabalho é a síntese e a caracterização físico-química dos materiais zeolíticos na escala micrométrica e nanométrica em suas formas sódicas e seus derivados de troca iônica com ação hemostática e antimicrobiana.

3.2 Específico

Os objetivos específicos são:

- Sintetizar zeólitas Faujasita (FAU), Gismondina (GIS), Mordenita (MOR), zeólita A (LTA), zeólita Beta (BEA), Titânio Silicato (TS-1) na escala micrométrica e nanométrica;
- Troca iônica dos materiais zeolíticos preparados na escala micrométrica e nanométrica com solução de cálcio (Ca^{+2}), Bário (Ba^{2+}), Prata (Ag^+), Magnésio (Mg^{2+});
- Caracterizar os materiais zeolíticos na escala micrométrica e nanométrica usando Difração de Raios-X (DRX), MEV, EDS, BET, AFM, Contraste de fase, FT-IR, Potencial Zeta, RMN-MAS, TGA e DSC.
- Determinar os parâmetros (R, K, α , MA) obtidos pela técnica de tromboelastografia (TEG) usando como agentes hemostáticos os materiais zeolíticos na escala micrométrica e nanométrica sintetizados neste estudo, para a comprovação da eficiência coagulante destes materiais.
- Avaliar propriedades antimicrobianas de zeólitas pelos métodos de microdiluição e difusão utilizando os microrganismos *Candida albicans*, *Candida parapsilosis* e *Staphylococcus aureus*.

4 Procedimentos experimentais

4.1 Sínteses das zeólitas na escala micrométrica

4.1.1 Síntese de zeólita Gismondina (GIS) na escala micrométrica

A zeólita Gismondina na escala micrométrica foi sintetizada de acordo com processo previamente descrito por Vasconcellos *et al.*¹²⁴.

A zeólita Gismondina foi preparada da seguinte maneira: solubilizou-se o hidróxido de sódio em água destilada formando uma solução. Em seguida, foi adicionado a esta solução o aluminato de sódio. Após dissolução do aluminato de sódio foi acrescentada à solução resultante o hidróxido de tetrapropilamônio (20% TPAOH em H₂O). A mistura resultante permaneceu sob agitação durante 30 minutos. Em seguida foi acrescentada a sílica amorfa (Cabosil Grade EH-5).

O gel final foi colocado em reator estático (Parr Instrument Company) e levado à estufa por 5 dias a 100°C. O material resultante foi denominado GIS. A composição final do gel foi a seguinte: 1SiO₂: 1Al₂O₃: 4,5 Na₂O: 35,5 TPAOH: 500 H₂O.

4.1.2 Síntese de Zeólita A (LTA) na escala micrométrica

A zeólita LTA na escala micrométrica foi sintetizada de acordo com processo previamente descrito por Zhan *et al.*¹²⁵.

A zeólita LTA foi sintetizada da seguinte maneira: 2,73g de hidróxido de sódio foram solubilizados em 25g de água destilada. Em seguida foi adicionado 1,21g de aluminato de sódio. Para que a solução ficasse límpida, foi necessário permanecer sob agitação durante 15 minutos. Em seguida foi adicionada a solução resultante 1,72g de sílica coloidal 30% e agitado até a completa solubilização. A solução permaneceu em agitação magnética por 12 horas em temperatura ambiente. Após esse processo, houve a formação de um sólido branco. Este sólido foi submetido a um processo de purificação e lavagem que consistiu na remoção da água mãe e a redispersão deste sólido em água destilada (três vezes) utilizando um banho ultrassônico. No final do processo o material foi seco em estufa a 40°C por 16 horas. O material resultante foi denominado LTA. A composição final do gel foi a seguinte: 5,5 Na₂O: 10 Al₂O₃: 4 SiO₂: 190 H₂O.

4.1.3 Síntese de zeólita Mordenita (MOR) na escala micrométrica

A zeólita Mordenita na escala micrométrica foi sintetizada de acordo com processo previamente descrito por Zhang *et al.*¹²⁶.

Em uma síntese típica de mordenita, 1,36 g de NaAlO₂ e 2,24g de NaOH foram adicionados em 32g de solução de sílica coloidal (Ludox AM 30). A mistura resultante permaneceu sob agitação durante 10 minutos. O gel branco uniforme foi transferido para uma garrafa de Teflon e envelhecido à temperatura ambiente durante 50 minutos. Em seguida, o pH foi determinado na faixa de pH 12. O gel foi transferido para um reator e colocado em estufa a 170°C por quatro dias. Depois deste processo, o material foi filtrado e lavado com água destilada (75-80°C) e seco a 60°C por 14 horas. O material resultante foi denominado MOR. A composição final do gel foi a seguinte: 1,0 SiO₂: 0,052 Al₂O₃: 0,23 Na₂O: 7,95 H₂O.

4.1.4 Síntese de zeólita Faujasita (FAU) na escala micrométrica

A zeólita Faujasita na escala micrométrica foi sintetizada de acordo com processo previamente descrito por Zhan *et al.*¹²⁵.

A zeólita Faujasita foi sintetizada da seguinte maneira: o hidróxido de sódio foi solubilizado em água. Em seguida foi adicionado o aluminato de sódio. A solução deve ficar límpida, para isso foi necessária agitação por 15 minutos. Em seguida foi adicionado sílica fumê (fumed sílica) e agitado até a solubilização. A solução foi colocada em um reator e deixada na estufa a 90°C por quatro dias. E após este período ocorreu a formação do material zeolítico sólido. O processo de purificação e lavagem deste material incluiu a remoção da água mãe e a redispersão deste sólido em água destilada (três vezes) utilizando um banho ultrassônico e por fim, secagem em estufa do material sólido a 40°C por 16 horas. O material resultante foi denominado FAU. A composição final do gel foi a seguinte: 5,5 Na₂O: 1 Al₂O₃: 4 SiO₂: 190 H₂O.

4.1.5 Síntese de zeólita Titânio-silicato (TS1) na escala micrométrica

A zeólita Titânio-silicato na escala micrométrica foi sintetizada de acordo com processo previamente descrito por Tarainasso *et al.*¹²⁷.

Na síntese da zeólita titânio-silicato, 40,82 g tetraetilortosilicato e 0,64 g tetraetilortotitânico foram misturados e agitados a 35°C (Solução 1). Na solução 1 foram

adicionados 42,5 g hidróxido de tetrapropilamonio (40% solução) lentamente com o auxílio de uma bureta a 0°C para prevenir a hidrólise. Em seguida, o material foi aquecido a 80°C para evaporar o etanol. Ao final, foi adicionado água para restabelecer o volume inicial. A solução foi colocada em um reator e deixada na estufa a 175°C por 2 dias. E após este período ocorreu a formação do material zeolítico sólido. O processo de purificação e lavagem incluiu a remoção da água mãe e a redispersão em água destilada (3 vezes) utilizando um banho ultrassônico e por fim, secagem em estufa a 40°C por 16 horas. Ao final, a amostra foi submetida ao processo de calcinação a 550°C por 8 horas para remoção do template orgânico TPA-OH. O material resultante foi denominado TS-1. A composição final do gel foi a seguinte: TiO₂: 70 SiO₂:1980 H₂O: 30 TPA-OH.

4.1.6 Síntese de zeólita Beta (BEA) na escala micrométrica

A zeólita beta na escala micrométrica foi sintetizada de acordo com processo previamente descrito por Cambor *et al.* ¹²⁸.

Em uma síntese típica, 14,85g de água, 22,4 g TEAOH (40%), 0.132 g Cloreto de sódio e 0,36 g Cloreto de potássio foram misturados e agitados até a completa dissolução (Solução 1). Na solução anterior, foram adicionados 7,38 g sílica e homogeneizar por 10 minutos (Solução 2). Em outro recipiente, 5 g água, 0.0825 g hidróxido de sódio e 0,4475 g aluminato de sódio foram agitados até a completa dissolução (Solução 3). A solução 2 foi misturada com a solução 3 e agitada por 10 minutos até a formação de um gel espesso. Por fim, o gel foi colocado a um reator com temperatura a 135°C por 20 horas. E após este período ocorreu a formação do material zeolítico sólido. O processo de purificação e lavagem incluiu a remoção da água mãe e a redispersão em água destilada (3 vezes) utilizando um banho ultrassônico e por fim, secagem em estufa a 40°C por 16 horas. Ao final, a amostra foi submetida ao processo de calcinação a 600°C por 8 horas para a remoção do template orgânico TEAOH. O material resultante foi denominado BEA. A composição final do gel foi a seguinte: 1 SiO₂: 0,01 Al₂O₃: 0,5 TEA-OH: 16 H₂O.

4.2 Síntese de zeólitas na escala nanométrica

4.2.1 Síntese da zeólita Gismondina na escala nanométrica (NanoGIS)

A nanozeólita Gismondina foi sintetizada de acordo com o procedimento experimental previamente descrito por Kecht *et al.* ¹²⁹.

A síntese da nanozeólita gismondina típica foi realizada da seguinte maneira: Uma solução de isopropóxido de alumínio (98%, Aldrich), hidróxido de tetrametilamônio pentahidratado (TMAOH 5H₂O, 97% Aldrich), água destilada, e tetraetilortosilicato (Si(OC₂H₅)₄, 98%, Aldrich) foram misturados em um reator de polipropileno sob agitação vigorosa, resultando em uma solução clara após 30 min. A solução clara foi tratada por 1h a 0°C em um banho de ultra-som, em seguida, deixada sob forte agitação por um período de 20h à temperatura ambiente. Após este período, um tratamento hidrotérmico adicional de 120°C por aproximadamente 30 min foi realizado para garantir a dissolução de todas as partículas maiores restantes, seguido por 15min de resfriamento a 0°C em um banho ultra-som preenchido com gelo. A mistura final foi colocada em um reator estático e levada à estufa por 13 dias a 100°C. E após este período ocorreu a formação do material zeolítico sólido. No final da síntese, o sobrenadante nanozeolítico foi resfriado e centrifugado em alta velocidade (17.000 rpm) por aproximadamente 15 minutos. O processo de purificação e lavagem incluiu a remoção da água mãe e a redispersão em água destilada (3 vezes) utilizando um banho ultrassônico e por fim, secagem em estufa a 40°C por 16 horas. Ao final deste processo, todo o material sólido sintetizado foi submetido ao processo de calcinação a 500-600°C por 8 horas para a remoção do template orgânico TMA-OH. O material sólido resultante foi denominado NanoGIS. A composição final do gel reação resultante foi: Al₂O₃: 4,17 SiO₂: 2,39 TMA₂O: 253 H₂O.

4.2.2 Síntese de zeólita A LTA na escala nanométrica (NanoLTA)

A zeólita A (NanoLTA) na escala nanométrica foi sintetizada de acordo com processo previamente descrito por Biemmi *et al.* ¹³⁰.

Para sintetizar nanozeólita LTA, 2,29 g de isopropóxido de alumínio (98%, Aldrich) e 15,04 g de hidróxido de tetrametilamônio pentahidrato (TMAOH 5H₂O, 97%, Aldrich) foram primeiramente dissolvidos em uma solução aquosa de hidróxido de sódio (0,1 g de NaOH em 27,2 g de H₂O).

Após agitação da mistura à temperatura ambiente durante 24 h obteve-se uma solução clara. Em seguida, a esta solução clara, 7,04 g de uma solução aquosa de sílica (Ludox HS-30, 30% em peso, Aldrich) foi adicionada gota a gota sob agitação vigorosa. O gel foi envelhecido durante 72 h à temperatura ambiente e finalmente tratada hidrotermicamente a 60 ° C durante 24 h. A fase sólida contida nas suspensões foi sistematicamente recuperada por ciclos repetidos de ultracentrifugação a 19 000 rpm (1 h). Após a centrifugação, o mesmo gel foi colocado novamente na estufa a 100°C por mais 24 horas. E em seguida, novamente centrifugado, lavado e seco em estufa a 40°C por 16 horas. Ao final deste processo, todo o material sólido sintetizado foi submetido ao processo de calcinação a 500°C por 8 horas para a remoção do template orgânico TMA-OH. O material resultante foi denominado NanoLTA. A composição do gel resultante foi: 0,4 Na₂O:1,9 Al₂O₃:14,0 (TMA)₂OH:11,9 SiO₂:700 H₂O.

4.2.3 Síntese de zeólita Mordenita na escala nanométrica (NanoMOR)

A zeólita Mordenita na escala nanométrica foi sintetizada de acordo com processo previamente descrito pela patente de Shujian *et al.*¹³¹.

A síntese da zeólita Mordenita na escala nanométrica foi dividida em 6 etapas. Na etapa 1, 5 mL de sílica 30%, 0,7mL de hidróxido de sódio (8,036 M) e 2 mL de água destilada foram misturados e agitados fortemente a temperatura ambiente durante 1h30min para de obter uma solução sol de sílica (Solução 1). Na etapa 2, 0,81 mL de hidróxido de sódio (8,036 M), 0,251g de aluminato de sódio e 1mL de água destilada foram uniformemente misturados e adicionados à Solução 1 e agitados à temperatura ambiente por 1h. Na etapa 3, foi adicionado 5,3mL de água destilada na solução anterior sob agitação vigorosa por 1 hora. Na etapa 4 foi adicionado 1,127g de Na₂SO₄ à solução anterior e a mesma foi submetida a agitação por mais 1 hora. Na etapa 5, foi adicionado 0,4g de semente de Mordenita (zeólita Mordenita na escala micrométrica) e a solução final ficou sob agitação por mais 1 hora. Na etapa 6 (final), a solução anterior foi colocada em banho ultrassônico por 2 horas. E em seguida, o gel final foi colocado em estufa a 100°C por 12hs, e após este período o processo de cristalização foi continuado a 130°C por 80hs. E após este período, ocorreu a formação do material zeolítico sólido. Ao final do experimento o reator foi colocado imediatamente em ambiente com temperatura controlada de 10°C por 1 hora. Em seguida, este material foi centrifugado, lavado e seco em estufa a 40°C por 16 horas. O material resultante foi denominado NanoMOR. A composição da reação resultante foi: 3 Na₂O: 2 Na₂SO₄: 1 Al₂O₃: 15 SiO₂: 390 H₂O.

4.2.4 Síntese de zeólita Faujasita na escala nanométrica (NanoFAU)

A zeólita Faujasita na escala nanométrica foi sintetizada de acordo com processo previamente descrito por Zhan *et al.* ¹²⁵.

Uma síntese típica foi realizada da seguinte maneira: o hidróxido de sódio foi solubilizado em água. Em seguida foi adicionado o aluminato de sódio. A solução deve ficar límpida, para isso foi necessária agitação de 15 minutos. Em seguida foi adicionada sílica fumê (fumed sílica). A solução foi agitada a 60°C por 48 horas. E após este período, ocorreu a formação do material zeolítico sólido. O processo de purificação e lavagem incluiu a remoção da água mãe e a redispersão em água destilada (3 vezes) utilizando um banho ultrassônico e por fim, secagem em estufa a 40°C por 16 horas. O material resultante foi denominado NanoFAU. A composição do gel resultante foi: 5,5 Na₂O: 1 Al₂O₃: 4 SiO₂: 190 H₂O.

4.2.5 Síntese de zeólita Titânio-silicato na escala nanométrica (NanoTS-1)

A síntese da zeólita TS-1 na escala nanométrica foi adaptada dos procedimentos experimentais de Cundy *et al.* ^{49; 132} e realizadas da seguinte maneira: 13,2 g de Tetraetilortossilicato e 1,26 g Tetrabutylortossilicato (Aldrich, 98%) foram transferidos para um frasco de polipropileno e agitadas à temperatura ambiente por 10 minutos até a formação de uma mistura homogênea. Foi adicionada à solução anterior, uma solução de hidróxido de tetrapropilamônio (22,07g, 1M) com auxílio de uma bureta (gota-a-gota). A solução foi agitada vigorosamente por 1 hora. Em seguida, acrescentou-se 3,46g de água destilada. A mistura foi agitada por período overnight e envelhecido em condições estáticas em temperatura ambiente por 1 hora. Colocou-se o gel em reator estático e em seguida, em estufa a 100°C por 24 horas. E após este período ocorreu a formação do material zeolítico sólido. O processo de purificação e lavagem incluiu a remoção da água mãe e a redispersão em água destilada (3 vezes) utilizando um banho ultrassônico e por fim, secagem em estufa a 40°C por 16 horas. Ao final, a amostra foi submetida ao processo de calcinação a 550°C por 8 horas para remoção do template orgânico TPA-OH. O material resultante foi denominado NanoTS-1.

4.2.6 Síntese de zeólita Beta na escala nanométrica (NanoBEA)

A zeólita beta na escala nanométrica foi sintetizada de acordo com procedimento previamente descrito por Larlus *et al.* ¹³³.

A síntese típica de zeólita Beta na escala nanométrica foi realizada da seguinte maneira: Em um frasco de polipropileno foi adicionado TEAOH e o isopropóxido de alumínio que permaneceu sob agitação durante 1 hora a temperatura ambiente. Em seguida, adicionou-se Cab-o-sil e a mistura foi agitada overnight. Logo após, colocou-se a mistura em reator estático em estufa por cinco dias a 140°C. E após este período ocorreu a formação do material zeolítico sólido. O processo de purificação e lavagem incluiu a remoção da água mãe e a redispersão em água destilada (três vezes) utilizando um banho ultrassônico e por fim, secagem em estufa a 40°C por 16 horas. Ao final, a amostra foi submetida ao processo de calcinação a 600°C por 8 horas para remoção do template orgânico TEA-OH. O material resultante foi denominado NanoBEA. A composição da reação resultante foi: 1 SiO₂: 0,01 Al₂O₃: 0,5 TEA₂O: 16 H₂O.

No Quadro 1 pode ser observado as diferentes composições molares de todas as zeólitas que foram sintetizadas para efeito comparativo.

Quadro 1 Composição molar das zeólitas sintetizadas

Zeólita	Forma Sódica	Composição Molar
Faujasita	FAU	5,5 Na ₂ O: 1 Al ₂ O ₃ : 4 SiO ₂ : 190 H ₂ O
	NanoFAU	5,5 Na ₂ O: 1 Al ₂ O ₃ : 4 SiO ₂ : 190 H ₂ O
A (LTA)	LTA	5,5 Na ₂ O: 10 Al ₂ O ₃ : 4 SiO ₂ : 190 H ₂ O
	NanoLTA	0,4 Na ₂ O:1,9 Al ₂ O ₃ :14,0 (TMA) ₂ OH: 11,9 SiO ₂ :700 H ₂ O
Gismondina	GIS	1SiO ₂ : 1Al ₂ O ₃ : 4,5 Na ₂ O: 35,5 TPAOH: 500 H ₂ O
	NanoGIS	Al ₂ O ₃ : 4,17 SiO ₂ : 2,39 TMA ₂ O: 253 H ₂ O
Mordenita	MOR	1,0 SiO ₂ : 0,052 Al ₂ O ₃ : 0,23 Na ₂ O: 7,95 H ₂ O
	NanoMOR	3 Na ₂ O: 2 Na ₂ SO ₄ : 1 Al ₂ O ₃ : 15 SiO ₂ : 390 H ₂ O
Beta	BEA	1 SiO ₂ : 0,01 Al ₂ O ₃ : 0,5 TEA-OH: 16 H ₂ O
	NanoBEA	1 SiO ₂ : 0,01 Al ₂ O ₃ : 0,5 TEA ₂ O: 16 H ₂ O
Titânio-Silicato	TS-1	TiO ₂ : 70 SiO ₂ :1980 H ₂ O: 30 TPA-OH
	NanoTS-1	TiO ₂ : 70 SiO ₂ :1980 H ₂ O: 30 TPA-OH

4.3 Experimentos de troca iônica com as zeólitas na escala micrométrica e nanométrica

Após a síntese e a remoção dos agentes direcionadores de estruturas das zeólitas Gismondina (GIS), Faujasita (FAU), Mordenita (MOR), Beta (BEA), Zeólita A (LTA) e Titânio-Silicato (TS-1) na escala nanométrica e micrométrica, foi realizado o processo de troca iônica com as seguintes soluções: Cloreto de cálcio 0,5 mol. L⁻¹, Cloreto de magnésio 0,5 mol. L⁻¹, Cloreto de bário 0,5 mol. L⁻¹ e Nitrato de prata 0,5 mol. L⁻¹.

Em um experimento de troca iônica adaptado do trabalho de Vasconcellos *et al.*¹²⁴, foi colocado em um frasco de teflon 1g de zeólita com 30 mL de solução dos íons e, submetidos a uma temperatura de 100°C por 12 horas. Em seguida, os materiais zeolíticos foram filtrados, lavados, secos e armazenados. O Quadro 2 mostra os derivados de troca iônica originados a partir deste processo. Nota-se que o volume de amostras é bem grande, desta maneira nem todos os derivados dos materiais foram totalmente explorados. Foram escolhidos os derivados de troca iônica da zeólita Faujasita na escala micrométrica e nanométrica para serem estudados mais profundamente. Para esta escolha foi levado em consideração o rendimento e o baixo custo dos reagentes utilizados na sua produção, além do domínio da técnica de síntese deste material pelo nosso grupo de pesquisa.

Quadro 2 Derivados de troca iônica originados a partir dos materiais zeolíticos

Derivados de troca iônica					
Zeólita	Forma Sódica	Cálcio	Magnésio	Bário	Prata
Faujasita	FAU	FAU_Ca	FAU_Mg	FAU_Ba	FAU_Ag
	NanoFAU	NanoFAU_Ca	NanoFAU_Mg	NanoFAU_Ba	NanoFAU_Ag
A (LTA)	LTA	LTA_Ca	LTA_Mg	LTA_Ba	LTA_Ag
	NanoLTA	NanoLTA_Ca	NanoLTA_Mg	NanoLTA_Ba	NanoLTA_Ag
Gismondina	GIS	GIS_Ca	GIS_Mg	GIS_Ba	GIS_Ag
	NanoGIS	NanoGIS_Ca	NanoGIS_Mg	NanoGIS_Ba	NanoGIS_Ag
Mordenita	MOR	MOR_Ca	MOR_Mg	MOR_Ba	MOR_Ag
	NanoMOR	NanoMOR_Ca	NanoMOR_Mg	NanoMOR_Ba	NanoMOR_Ag
Beta	BEA	BEA_Ca	BEA_Mg	BEA_Ba	BEA_Ag
	NanoBEA	NanoBEA_Ca	NanoBEA_Mg	NanoBEA_Ba	NanoBEA_Ag
Titânio-Silicato	TS-1	TS-1_Ca	TS-1_Mg	TS-1_Ba	TS-1_Ag
	NanoTS-1	NanoTS-1_Ca	NanoTS-1_Mg	NanoTS-1_Ba	NanoTS-1_Ag

4.4 Caracterização físico-química das zeólitas sintetizadas

4.4.1 Difração de Raios X (DRX)

Os padrões de DRX das partículas sintetizadas foram coletados utilizando um difratômetro Rigaku MiniFlex II (Tokio, Japan) com uma fonte de ânodo rotativo com uma placa plana na geometria de Bragg-Brentano, operando com radiação Cu-K α comprimento de onda = 1.5418 Å) em 40 kV e 15 mA, e equipado com um monocromador de grafite. Os padrões

de difração em pó foram registrados na faixa de $2\theta = 3\text{--}50^\circ$ com um passo de digitalização de $2^\circ (2\theta) \text{ min}^{-1}$ e uma taxa de 10 s/step.

4.4.2 Microscopia eletrônica de varredura (MeV)

As imagens de Microscopia eletrônica de varredura (MeV) foram registrados utilizando um instrumento Phillips XL30 FEG, operando com um feixe de elétrons regulável para tensões de 5 a 25 kV. Antes das análises, um revestimento fino de ouro foi depositado sobre as amostras. O experimento foi realizado no Laboratório Nacional de Nanotecnologia LNNano (CNPEM – Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais) em Campinas - SP.

4.4.3 Microscopia de força atômica (AFM)

Experimentos utilizando AFM foram coletados por meio de um microscópio NX-10 Park Systems (SPM, Suwon, Coreia) com uma sonda PPP-CNDH usando uma frequência de ressonância de 320 kHz e 42 N/m de força constante. As imagens de AFM modo foram adquiridas no ar ambiente usando TESP tapping mode com sonda de silício. Antes de realizar as medidas, as amostras foram dispersas em água destilada e em seguida foram depositadas sobre mica crivada e secas em alto vácuo. Os resultados foram analisados no software Gwyddion (32bit). O experimento foi realizado no Laboratório Nacional de Nanotecnologia LNNano (CNPEM – Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais) em Campinas - SP.

4.4.4 Microscopia de Contraste de fase

Imagens obtidas por meio de microscopia de contraste de fase foram coletadas por meio de um microscópio Olympus BX60 (Nova York, EUA). Para este experimento, 170 μL de sangue total coletado em tubos contendo citrato de sódio (4% v/v) foram depositados sobre uma lâmina de vidro de microscópio. Em seguida, 10 μL de solução salina de CaCl_2 de 0,2 M foi adicionado ao sangue, a fim de reverter o efeito anticoagulante causado pela quelação de cálcio. Em seguida, 0,25 mg de cada zeólita foi depositado sob o sangue. Imediatamente, a lâmina de microscópio de vidro foi colocada sobre o microscópio para avaliação de estruturas formadas. O experimento foi realizado no Centro Multiusuário de Microscopia e Microanálises Ibilce/Unesp.

4.4.5 Determinação da composição por Espectroscopia de Energia Dispersiva de Raios-X (EDS)

A espectroscopia de energia dispersiva de raios-X (EDS), uma técnica de caracterização química ou análise elementar teve como principal objetivo avaliar se o processo de troca iônica das zeólitas sintetizadas foi satisfatório. Para análise de EDS, foi utilizado um detector EVES-EDS. Os experimentos foram realizados no Laboratório Nacional de Nanotecnologia LNNano (CNPEM – Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais) em Campinas - SP.

4.4.6 Estudo de adsorção de nitrogênio para determinação da área superficial (BET)

As medidas de adsorção/dessorção de N₂ foram realizadas para a determinação das áreas superficiais, volume total de poros, volume de microporos e diâmetro médio de poros e distribuição de tamanhos de poro. As isotermas de adsorção/dessorção de nitrogênio foram registradas na temperatura do nitrogênio líquido utilizando o equipamento Nova 2000e da Quantachrome (Boynton Beach, FL). As amostras foram submetidas a um pré tratamento a 150°C por 4 h sob vácuo para retirada de toda umidade e espécies adsorvidas da superfície do material. Em seguida, foram caracterizadas através de isotermas de adsorção/dessorção de N₂. Para determinação da área superficial específica foi utilizado o método BET (*Brunauer-Emmett-Teller*), o volume e raio de poros de mesoporos foram determinados pelo método de adsorção BJH (*Barret-Joyer-Halenda*) e dos microporos foram calculados utilizando o método de *Saito-Foley* (SF). Este experimento foi realizado no Centro de Revestimento Cerâmicos (CRC) em São Carlos - SP.

4.4.7 Ressonância Magnética Nuclear do Estado Sólido rotação em torno do Ângulo Mágico (²⁹Si RMN-MAS)

O espectrômetro utilizado na realização dos experimentos de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) em estado sólido apresentados neste trabalho é o Espectrômetro Bruker Avance III 400MHz, 2 canais. A sonda utilizada é a VTN/CPMAS *broadband* com 15N-31P + 1H canais. Magneto supercondutor ASCEND, 54 mm gerando um campo magnético de intensidade 9,397 Tesla, com esse campo magnético as frequências de ressonância foi de 79,5 MHz para o ²⁹Si. A sonda permite experimentos de dupla ressonância, usando rotores de 4mm com rotações até 15 kHz. O ângulo mágico (MAS, do inglês *Magic Angle Spinning*) foi ajustado pela

ressonância do átomo de ^{79}Br utilizando o padrão de KBr. As amostras foram empacotadas em um rotor de zircônio com tampas de Kal-F e rotacionados em uma frequência de 10kHz em temperatura ambiente. O ajuste de homogeneidade do campo foi realizado usando a mesma amostra de KBr monitorando a largura da quinta banda lateral. O espectro obtido pelo espectrômetro no domínio tempo foi convertido para o domínio das frequências utilizando o software Spinworks. Não foi possível realizar este experimento com todas as amostras, pois esta análise é de alto custo e que consome muito tempo de máquina.

4.4.8 Espectroscopia no infravermelho FT-IR

Análises de FT-IR foram realizadas para estudar as características estruturais dos materiais zeolíticos sintetizados nesse estudo. Os espectros no infravermelho foram coletados usando um espectrômetro da marca IRTracer-100 (Shimadzu). A preparação das amostras foram feitas pelo método de pastilhas de KBr contendo cerca de 10% em massa da amostra. As amostras foram medidas na faixa espectral de 400 cm^{-1} e 4000 cm^{-1} , com resolução espectral de 4 cm^{-1} , e uma média de 16 scans para cada amostra.

4.4.9 Determinação do ponto isoelétrico por potencial zeta

As determinações do ponto isoelétrico foram realizadas utilizando dados obtidos a partir de um Malvern NanoZS. Este estudo foi realizado de acordo com protocolo de Ostomel *et al.*¹⁰³. O objetivo deste experimento foi determinar se as zeólitas sintetizadas são de natureza anticoagulantes ou pro-coagulantes de acordo com o pH do seu ponto isoelétrico.

Devido à natureza heterogênea coloidal do sangue, é impossível realizar medidas *in situ* do potencial zeta das zeólitas diretamente no sangue, e por isso, a carga de superfície deve ser inferida a partir das medidas de mobilidade eletroforética^{103; 134}. O experimento foi realizado na presença de um eletrólito de CaCl_2 que imita as concentrações de íons cálcio encontrados no soro sanguíneo¹³⁴.

Aproximadamente 2mg de cada material foi suspenso em 60 mL de uma solução aquosa de CaCl_2 $0,03\text{ mol. L}^{-1}$ e sonificado por 10 minutos antes da análise. Medidas de potencial zeta das zeólitas tanto em escala micrométrica quanto na escala nanométrica foram realizadas em função da variação de pH em um range de 2-12. Os ajustes dos valores de pH foram realizados com soluções de HCl e NaOH $0,25\text{ mol. L}^{-1}$.

4.4.10 Análise Termogravimétrica (TG) e Calorimetria diferencial de varredura (DSC)

O protocolo padrão para a determinação do calor de hidratação de zeólitas foi descrito por Drebuschak V.A.¹³⁵ e Ostomel *et. al*² que descrevem as medidas da quantidade do calor de desorção da água de zeólitas hidratadas. Os materiais sintetizados foram armazenados durante duas semanas em compartimentos suspensos sobre uma placa de Petri contendo uma solução aquosa saturada de KBr, o qual mantém 80% de umidade relativa. As medidas de DSC e TG foram realizadas utilizando um DSC Netzach STA 409C.

Aproximadamente 4 mg de cada zeólita foi depositado em um cadinho de alumínio. Cada amostra foi então aquecida a partir de 20°C até 900°C, a uma taxa de 10 ° C/min. A capacidade de hidratação de cada zeólita foi medida por análise termogravimétrica (TG) através da perda de água, e simultaneamente foi realizada medidas de calorimetria exploratória diferencial (DSC). As curvas foram integradas para obter o calor total para a reação de desidratação.

4.4.11 Tromboelastografia utilizando zeólitas na escala micrométrica e nanométrica

As análises tromboelastográficas dos materiais zeolíticos foram realizadas com um Tromboelastógrafo Haemoscope modelo 5000 (TEG), através do qual foi possível determinar os parâmetros *in vitro* de coagulação (R, K, α , MA) dos materiais hemostáticos testados utilizando sangue total tratado com citrato de sódio.

Antes da adição dos materiais zeolíticos no cup, 20 μ L de CaCl₂ 0,2 M foi adicionado a 340 μ L de sangue total estabilizado, este procedimento serve para repor os íons de cálcio quelados pelo citrato e também para a restauração da atividade de coagulação do sangue. Em um experimento típico, 0,5 mg de zeólita foi introduzida diretamente no recipiente de amostra (cup) contendo o sangue total citratado com íons cálcio. As análises foram realizadas em triplicatas e em três eventos independentes. As alterações viscoelásticas que ocorrem durante a coagulação foram registradas, fornecendo uma representação gráfica para então serem analisados. O parecer consubstanciado do comitê de ética em pesquisa se encontra no anexo III.

4.4.11.1 Análise estatística

A análise estatística descritiva para avaliação da eficiência hemostática das zeólitas sintetizadas por meio da análise tromboelastográfica TEG foi realizada através de médias e desvios-padrão. Para a análise estatística de inferência, os valores médios de cada grupo foram

comparados com a ajuda do One-Way ANOVA considerando valores significativos de $p \leq 0,05$ e em caso de detecção de diferenças estatisticamente significativas, comparações múltiplas foram realizadas com a ajuda do teste de Tukey-Kramer.

4.4.12 Análise da atividade antimicrobiano de zeólitas

4.4.12.1 Análise do potencial de inibição do crescimento microbiano pelo método de microdiluição

Estes experimentos tiveram como objetivo avaliar a atividade antimicrobiana dos microrganismos (*Candida albicans*, *Candida parapsilosis* e *Staphylococcus aureus*) na presença de determinadas zeólitas. Estes experimentos foram realizados no Laboratório de Microbiologia – Famerp. Foram utilizadas zeólitas Faujasita na escala nanométrica (NanoFau) e alguns de seus derivados de troca iônica de cálcio e prata (NanoFau_Ca e NanoFau_Ag) frente á 3 tipos de microrganismos: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Candida albicans* ATCC 90028 e *Candida parapsilosis* ATCC 22019 em triplicata. O protocolo de referência para avaliação da suscetibilidade in vitro, é o de diluição em caldo preconizado pelo CLSI 2012 nos documentos M27-S4¹³⁶.

O experimento foi conduzido utilizando uma placa de microdiluição (placa de elisa) em caldo nutriente. Em cada fileira da placa foi adicionado um tipo de zeólita: NanoFau, NanoFau_Ca, NanoFau_Ag, uma mistura contendo NanoFau_Ca e NanoFau_Ag e uma fileira de controle de crescimento, a fim de comprovar a viabilidade dos microrganismos testados (Figura 11).

Primeiramente, foi preparada uma solução de zeólita contendo 0,01g dissolvido em 1 ml de água destilada. Após 30 minutos de sonicação, 100 μ L da solução foi depositada em cada poço e colocado em estufa por 3 horas para que a água evaporasse. Após 24 horas, a placa foi colocada sob luz ultravioleta por 1 hora. Em cada poço previamente preenchido com a zeólita, foi adicionado 100 μ L de meio de cultura (Caldo BHI para *Staphylococcus aureus* e Caldo Saboraand para *Candida albicans* e *Candida parapsilosis*) e 100 μ L de inóculo previamente preparado (microrganismo disperso em solução salina 0,9% na escala 1 mac farland). Por fim a placa de microdiluição foi colocada em estufa por 24hs à 35°C. Após o período de incubação, os materiais foram semeados em ágar Muller-Hunton e colocados em estufa por mais 24hs. Por fim, foi avaliado se houve crescimento de microrganismos através da observação do surgimento ou não de colônias.

Figura 11 Imagem fotográfica da placa de microdiluição com as seguintes zeólitas testadas: NanoFau, NanoFau_Ca, NanoFau_Ag e NanoFau_Ca e NanoFau_Ag para a avaliação do crescimento dos microrganismos *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans* e *Candida parapsilosis em triplicata*



4.4.12.2 Análise do potencial de crescimento microbiano por difusão de solução de zeólita em placa de petri

A preparação do inóculo e a semeadura em placa contendo ágar Mueller-Hinton na qual foram feitos poços para a inclusão da solução de zeólita foi baseado no protocolo descrito por pelo NCCLS nos documentos M2-A8¹³⁷.

a) Zeólita Faujasita na escala nanométrica NanoFau e seus derivados de troca iônica de cálcio e prata (NanoFau_Ca e NanoFau_Ag) frente aos microrganismos *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

Para este experimento foram preparadas soluções de zeólitas em água destilada com os seguintes materiais: NanoFau, NanoFau_Ca, NanoFau_Ag e NanoFau_Ca + Ag (mistura das zeólitas NanoFau_Ag e NanoFau_Ca). Foi utilizada a técnica de pour plate em que o microrganismo *Staphylococcus aureus* (microrganismo disperso em solução salina 0,9% na escala 1 mac farland) foi semeado sobre a placa de petri contendo o meio de cultura ágar Mueller-Hinton. Em seguida, foi adicionado em cada poço 0,4 mg/mL de solução de zeólita previamente preparada. As placas foram colocadas em estufa 36,5°C por 24h para posterior análise e medição dos halos de inibição formados. O mesmo experimento foi realizado

utilizando o dobro da quantidade de zeólitas (0,8 mg/mL) como o objetivo de avaliar se a diluição seriada da zeólita afeta ou não o crescimento microbiano.

b) Zeólita Faujasita na escala nanométrica NanoFau e seus derivados de troca iônica de zinco, cobre, magnésio e prata frente aos microrganismos Staphylococcus aureus ATCC 25923, Candida albicans ATCC 90028 e Candida parapsilosis ATCC 22019

Foi preparada uma solução de cada zeólita em água destilada. Em cada poço foi colocado 40µL de solução de zeólita (0,4 mg/mL) NanoFau_Zn, NanoFau_Cu, NanoFau_Mg e NanoFau_Ag. As zeólitas foram testadas frente aos microrganismos *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Candida albicans* ATCC 90028 e *Candida parapsilosis* ATCC 22019. Para esta análise também foi utilizado o derivado de troca iônica com zinco (NanoFau_Zn), esta amostra foi preparada e utilizada somente para este experimento. A troca iônica foi realizada utilizando uma solução de ZnSO₄ 0,5M, conforme procedimento descrito no item 4.3. Seguiu-se a incubação em estufa 36,5°C por 24h para posterior análise e medição dos halos de inibição.

4.4.12.3 Determinação da concentração mínima inibitória das zeólitas NanoFau, NanoFau_Ag frente aos microrganismos Staphylococcus aureus ATCC 25923, Candida albicans ATCC 90028

A concentração mínima inibitória, ou seja, a sensibilidade dos microrganismos expostos a menor concentração do material que é capaz de inibir o seu desenvolvimento visível quando expostos aos materiais foram testados.

Para esta análise foi utilizada uma placa de microdiluição para cada microrganismo contendo somente um tipo de zeólita no qual foram realizadas sucessivas diluições. Para a zeólita NanoFau, a diluição foi realizada a partir de 500 mg/mL, para a zeólita NanoFau_Ag, a partir de 1 mg/mL, concentração inferior a NanoFau. A fileira 1 foi utilizado como Controle de crescimento (caldo de crescimento e inóculo) e a fileira 12 como Controle negativo (apenas o caldo de crescimento). Os materiais foram testados frente aos microrganismos *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Candida albicans* ATCC 90028. Nos Quadros 3 e 4 podem ser observados as sucessivas diluições que foram realizadas para cada material. O protocolo utilizado para a realização deste experimento foi proposto por Kumar *et al.*¹³⁸.

Primeiramente, foi preparada uma solução de zeólita, e após 30 minutos de sonicação, foi depositada 100µL em cada poço, referente a diluição proposta e colocado em estufa até que a água evaporasse. Em seguida, a placa foi colocada sob luz ultravioleta por 1 hora. Em cada

poço, onde previamente foi adicionado a diluição da zeólita, foi adicionado 100µL do meio de cultura Caldo Saboraud para o teste com *Candida albicans* e Caldo BHI para *Staphylococcus aureus*. Em seguida, 100µL de inóculo previamente preparado (microrganismo disperso em solução salina 0,9% na escala 0.5 mac farland, ajustado por espectrofotômetro em comprimento de onda 490 nm para *Candida albicans* e 520 nm para *Staphylococcus aureus*). As placas de microdiluição foram colocadas em estufa por 24hs à 35°C. Após o período de incubação, repiques foram estabelecidos em ágar Mueller-Hinton e colocados em estufa por mais 24hs. Antes de ser colocado na estufa, 20 µL de uma solução salina de Cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio - TTC (0,3g em 15mL de água estéril) foram adicionados em cada poço a fim de confirmar a viabilidade dos microrganismos. Esse sal é incolor na forma oxidada e vermelho quando reduzido por microrganismos, indicando a viabilidade do microrganismo. Após as 24hs, foi avaliado se houve crescimento de microrganismos nas placas.

Quadro 3 Diluições propostas para a determinação da concentração mínima inibitória da zeólita NanoFau

	1*	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12**
A	C.C	500 mg/mL NanoFau	1,95 mg/mL NanoFau	0,007 mg/mL NanoFau	$2,98 \times 10^{-5}$ mg/mL NanoFau	$1,16 \times 10^{-7}$ mg/mL NanoFau	$4,54 \times 10^{-10}$ mg/mL NanoFau	$1,77 \times 10^{-12}$ mg/mL NanoFau	$6,9 \times 10^{-15}$ mg/mL NanoFau	$2,71 \times 10^{-17}$ mg/mL NanoFau	$1,05 \times 10^{-19}$ mg/mL NanoFau	C.N
B	C.C	250 mg/mL NanoFau	0,97 mg/mL NanoFau	0,004 mg/mL NanoFau	$1,49 \times 10^{-5}$ mg/mL NanoFau	$5,82 \times 10^{-8}$ mg/mL NanoFau	$2,27 \times 10^{-10}$ mg/mL NanoFau	$8,88 \times 10^{-13}$ mg/mL NanoFau	$3,46 \times 10^{-15}$ mg/mL NanoFau	$1,35 \times 10^{-17}$ mg/mL NanoFau	$5,29 \times 10^{-20}$ mg/mL NanoFau	C.N
C	C.C	125 mg/mL NanoFau	0,48 mg/mL NanoFau	0,002 mg/mL NanoFau	$7,45 \times 10^{-6}$ mg/mL NanoFau	$2,91 \times 10^{-8}$ mg/mL NanoFau	$1,13 \times 10^{-10}$ mg/mL NanoFau	$4,44 \times 10^{-13}$ mg/mL NanoFau	$1,74 \times 10^{-15}$ mg/mL NanoFau	$6,77 \times 10^{-18}$ mg/mL NanoFau	$2,64 \times 10^{-20}$ mg/mL NanoFau	C.N
D	C.C	62,5 mg/mL NanoFau	0,24 mg/mL NanoFau	0,001 mg/mL NanoFau	$3,72 \times 10^{-6}$ mg/mL NanoFau	$1,45 \times 10^{-8}$ mg/mL NanoFau	$5,68 \times 10^{-11}$ mg/mL NanoFau	$2,22 \times 10^{-13}$ mg/mL NanoFau	$8,67 \times 10^{-16}$ mg/mL NanoFau	$3,38 \times 10^{-18}$ mg/mL NanoFau	$1,32 \times 10^{-20}$ mg/mL NanoFau	C.N
E	C.C	31,25 mg/mL NanoFau	0,122 mg/mL NanoFau	0,0005 mg/mL NanoFau	$1,86 \times 10^{-6}$ mg/mL NanoFau	$7,27 \times 10^{-9}$ mg/mL NanoFau	$2,84 \times 10^{-11}$ mg/mL NanoFau	$1,11 \times 10^{-13}$ mg/mL NanoFau	$4,33 \times 10^{-16}$ mg/mL NanoFau	$1,69 \times 10^{-18}$ mg/mL NanoFau	$6,61 \times 10^{-21}$ mg/mL NanoFau	C.N
F	C.C	15,6 mg/mL NanoFau	0,061 mg/mL NanoFau	0,00023 mg/mL NanoFau	$9,31 \times 10^{-7}$ mg/mL NanoFau	$3,63 \times 10^{-9}$ mg/mL NanoFau	$1,42 \times 10^{-11}$ mg/mL NanoFau	$5,55 \times 10^{-14}$ mg/mL NanoFau	$2,16 \times 10^{-16}$ mg/mL NanoFau	$8,47 \times 10^{-19}$ mg/mL NanoFau	$3,30 \times 10^{-21}$ mg/mL NanoFau	C.N
G	C.C	7,8 mg/mL NanoFau	0,030 mg/mL NanoFau	0,00012 mg/mL NanoFau	$4,65 \times 10^{-7}$ mg/mL NanoFau	$1,81 \times 10^{-9}$ mg/mL NanoFau	$7,10 \times 10^{-12}$ mg/mL NanoFau	$2,77 \times 10^{-14}$ mg/mL NanoFau	$1,08 \times 10^{-16}$ mg/mL NanoFau	$4,23 \times 10^{-19}$ mg/mL NanoFau	$1,65 \times 10^{-21}$ mg/mL NanoFau	C.N
H	C.C	3,9 mg/mL NanoFau	0,015 mg/mL NanoFau	$5,96 \times 10^{-5}$ mg/mL NanoFau	$2,32 \times 10^{-7}$ mg/mL NanoFau	$9,1 \times 10^{-10}$ mg/mL NanoFau	$3,55 \times 10^{-12}$ mg/mL NanoFau	$1,38 \times 10^{-14}$ mg/mL NanoFau	$5,42 \times 10^{-17}$ mg/mL NanoFau	$2,11 \times 10^{-19}$ mg/mL NanoFau	$8,27 \times 10^{-22}$ mg/mL NanoFau	C.N

*Controle de crescimento (Caldo e inóculo)

** Controle Negativo (Caldo de crescimento)

Quadro 4 Diluições propostas para a determinação da concentração mínima inibitória da zeólita NanoFau Ag

	1*	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12**
A	C.C	1 mg/mL NanoFau /Ag	0,0019 mg/mL NanoFau /Ag	$7,63 \times 10^{-6}$ mg/mL NanoFau /Ag	$2,98 \times 10^{-8}$ mg/mL NanoFau /Ag	$1,16 \times 10^{-10}$ mg/mL NanoFau /Ag	$4,54 \times 10^{-13}$ mg/mL NanoFau /Ag	$1,77 \times 10^{-15}$ mg/mL NanoFau/ Ag	$6,9 \times 10^{-18}$ mg/mL NanoFau/ Ag	$2,71 \times 10^{-20}$ mg/mL NanoFau/ Ag	$1,05 \times 10^{-22}$ mg/mL NanoFau/ Ag	C.N
B	C.C	0,5 mg/mL NanoFau /Ag	0,00097 mg/mL NanoFau /Ag	$3,81 \times 10^{-6}$ mg/mL NanoFau /Ag	$1,49 \times 10^{-8}$ mg/mL NanoFau/ Ag	$5,82 \times 10^{-11}$ mg/mL NanoFau /Ag	$2,27 \times 10^{-13}$ mg/mL NanoFau /Ag	$8,88 \times 10^{-16}$ mg/mL NanoFau/ Ag	$3,46 \times 10^{-18}$ mg/mL NanoFau/ Ag	$1,35 \times 10^{-20}$ mg/mL NanoFau/ Ag	$5,29 \times 10^{-23}$ mg/mL NanoFau/ Ag	C.N
C	C.C	0,25 mg/mL NanoFau /Ag	0,00048 mg/mL NanoFau /Ag	$1,91 \times 10^{-6}$ mg/mL NanoFau /Ag	$7,45 \times 10^{-9}$ mg/mL NanoFau /Ag	$2,91 \times 10^{-11}$ mg/mL NanoFau /Ag	$1,13 \times 10^{-13}$ mg/mL NanoFau /Ag	$4,44 \times 10^{-16}$ mg/mL NanoFau /Ag	$1,74 \times 10^{-18}$ mg/mL NanoFau /Ag	$6,77 \times 10^{-21}$ mg/mL NanoFau /Ag	$2,64 \times 10^{-23}$ mg/mL NanoFau/ Ag	C.N
D	C.C	0,125 mg/mL NanoFau /Ag	0,00024 mg/mL NanoFau /Ag	$9,54 \times 10^{-7}$ mg/mL NanoFau /Ag	$3,72 \times 10^{-9}$ mg/mL NanoFau /Ag	$1,45 \times 10^{-11}$ mg/mL NanoFau /Ag	$5,68 \times 10^{-14}$ mg/mL NanoFau /Ag	$2,22 \times 10^{-16}$ mg/mL NanoFau/ Ag	$8,67 \times 10^{-19}$ mg/mL NanoFau/ Ag	$3,38 \times 10^{-21}$ mg/mL NanoFau/ Ag	$1,32 \times 10^{-23}$ mg/mL NanoFau/ Ag	C.N
E	C.C	0,031 mg/mL NanoFau /Ag	0,000122 mg/mL NanoFau /Ag	$4,77 \times 10^{-7}$ mg/mL NanoFau /Ag	$1,86 \times 10^{-9}$ mg/mL NanoFau /Ag	$7,27 \times 10^{-12}$ mg/mL NanoFau /Ag	$2,84 \times 10^{-14}$ mg/mL NanoFau /Ag	$1,11 \times 10^{-16}$ mg/mL NanoFau/ Ag	$4,33 \times 10^{-19}$ mg/mL NanoFau/ Ag	$1,69 \times 10^{-21}$ mg/mL NanoFau/ Ag	$6,61 \times 10^{-24}$ mg/mL NanoFau/ Ag	C.N
F	C.C	0,015 mg/mL NanoFau /Ag	$6,1 \times 10^{-5}$ mg/mL NanoFau /Ag	$2,38 \times 10^{-7}$ mg/mL NanoFau /Ag	$9,31 \times 10^{-10}$ mg/mL NanoFau /Ag	$3,63 \times 10^{-12}$ mg/mL NanoFau /Ag	$1,42 \times 10^{-14}$ mg/mL NanoFau /Ag	$5,55 \times 10^{-17}$ mg/mL NanoFau/ Ag	$2,16 \times 10^{-19}$ mg/mL NanoFau/ Ag	$8,47 \times 10^{-22}$ mg/mL NanoFau/ Ag	$3,30 \times 10^{-24}$ mg/mL NanoFau/ Ag	C.N
G	C.C	0,0078 mg/mL NanoFau /Ag	$3,05 \times 10^{-5}$ mg/mL NanoFau /Ag	$1,19 \times 10^{-7}$ mg/mL NanoFau /Ag	$4,65 \times 10^{-10}$ mg/mL NanoFau /Ag	$1,81 \times 10^{-12}$ mg/mL NanoFau /Ag	$7,10 \times 10^{-15}$ mg/mL NanoFau /Ag	$2,77 \times 10^{-17}$ mg/mL NanoFau /Ag	$1,08 \times 10^{-19}$ mg/mL Nano Ag	$4,23 \times 10^{-22}$ mg/mL Nano Ag	$1,65 \times 10^{-24}$ mg/mL Nano Ag	C.N
H	C.C	0,0039 mg/mL NanoFau /Ag	$1,53 \times 10^{-5}$ mg/mL NanoFau /Ag	$5,96 \times 10^{-8}$ mg/mL NanoFau /Ag	$2,32 \times 10^{-10}$ mg/mL NanoFau /Ag	$9,1 \times 10^{-13}$ mg/mL NanoFau /Ag	$3,55 \times 10^{-15}$ mg/mL NanoFau /Ag	$1,38 \times 10^{-17}$ mg/mL NanoFau /Ag	$5,42 \times 10^{-20}$ mg/mL Nano Ag	$2,11 \times 10^{-22}$ mg/mL Nano Ag	$8,27 \times 10^{-25}$ mg/mL Nano Ag	C.N

*Controle de crescimento (Caldo e inóculo)

** Controle Negativo (Caldo de crescimento)

5 Resultados e Discussões

5.1 Análises de difração de Raios-X das zeólitas micrométrica e nanométrica na forma sódica e dos seus derivados de troca iônica

Foram realizadas diversas sínteses das zeólitas na escala micrométrica e nanométrica Gismondina (GIS), Beta (BEA), Mordenita (MOR), Titânio-silicato (TS-1), Faujasita (FAU), Zeólita A (LTA) e seus derivados de troca iônica. Todos estes materiais foram sintetizados de acordo com procedimentos reportados na literatura (ver itens 4.1 e 4.2) e sua caracterização estrutural foi realizada por difração de raios-X.

A Figura 12 mostra o padrão de difração de Raios-X da zeólita Gismondina (GIS) na escala micrométrica em sua forma sódica juntamente com os difratogramas de seus derivados de troca iônica. A zeólita GIS na sua forma sódica exibiu um padrão com três reflexões de Bragg observadas em $2\theta = 12,3^\circ$; $2\theta = 21,6^\circ$; $2\theta = 27,4^\circ$ (Figura 12), e estes dados estão de acordo com o padrões de difração de raios-X característico para a zeólita Gismondina reportados na literatura ⁵¹.

Pode-se observar que o processo de troca iônica com os íons Ca^{2+} , Mg^{+2} , Ba^{+2} e Ag^+ gerou modificações na estrutura cristalográfica da zeólita, onde se pode distinguir o surgimento de novas reflexões de Bragg, o desaparecimento de outros, assim também como mudanças nas intensidades de reflexões de Bragg remanescentes.

A troca iônica com o íon cálcio (GIS_Ca) causou o aparecimento de novas reflexões de Bragg na região de $2\theta = 15,2^\circ$; $2\theta = 18,06^\circ$; $2\theta = 18,9^\circ$; $2\theta = 19,8^\circ$; $2\theta = 26,6^\circ$ e $2\theta = 28,5^\circ$. Pode-se observar também o desaparecimento de reflexões de Bragg na região de $2\theta = 35,9^\circ$; $2\theta = 37,3^\circ$; $2\theta = 37,9^\circ$ e $2\theta = 46,35^\circ$.

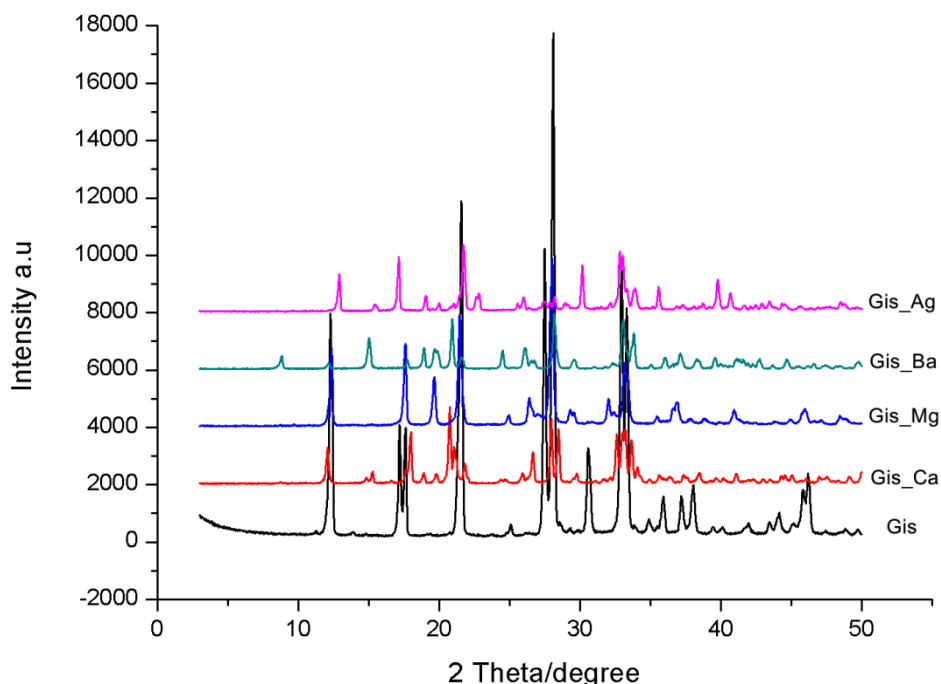
A troca iônica com o íon magnésico (GIS_Mg) exibiu em relação à amostra original, o aparecimento de reflexões de Bragg localizadas na região de $2\theta = 19,7^\circ$; $2\theta = 26,5^\circ$ e $2\theta = 32^\circ$. Também se observou o desaparecimento de algumas reflexões de Bragg localizadas na região de $2\theta = 38^\circ$; $2\theta = 45,9^\circ$.

Após a troca iônica com o íon bário (GIS_Ba) nota-se o mesmo padrão de alteração dos outros cátions. Houve o surgimento de reflexões de Bragg localizadas na região de $2\theta = 8,7^\circ$; $2\theta = 15^\circ$; $2\theta = 18,8^\circ$; $2\theta = 20,9^\circ$; $2\theta = 26,1^\circ$ e $2\theta = 33,8^\circ$. É possível observar o desaparecimento de reflexões de Bragg localizadas na região $2\theta = 30,5^\circ$; $2\theta = 38^\circ$ e $2\theta = 46^\circ$.

No padrão de difração de Raios-X da amostra de Gismondina trocada com íon de prata (GIS_Ag), observou-se o aparecimento de reflexões de Bragg localizadas na região de $2\theta =$

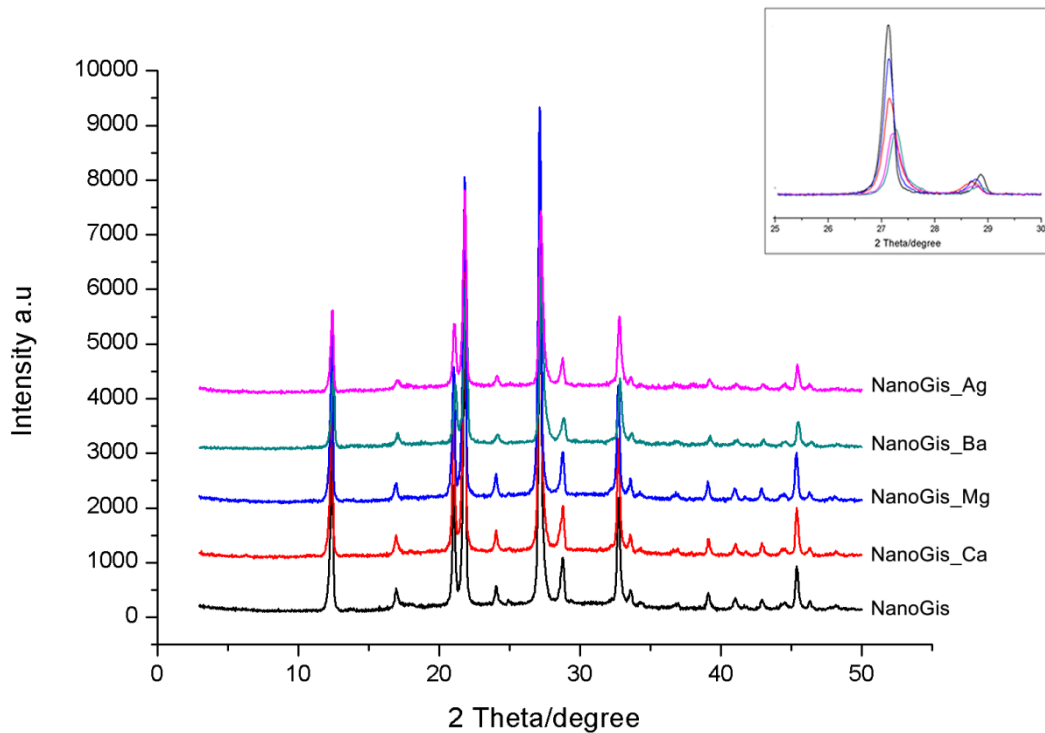
19,11°; $2\theta = 22,8^\circ$, e desaparecimento de reflexões de Bragg localizadas na região de $2\theta = 46,4^\circ$. É importante notar também que a troca iônica induziu a diminuição da intensidade das reflexões de Bragg em todas as amostras.

Figura 12 Padrões de difração de Raios-X da amostra GIS (Gismondina micrométrica) na forma sódica e seus derivados de trocas iônicas



Na Figura 13 observam-se os padrões de difração de Raios-X da zeólita Gismondina na escala nanométrica em sua forma sódica e de seus derivados de troca iônica. É possível observar que o material (NanoGIS) exibiu um padrão com três reflexões de Bragg em $2\theta=12,4^\circ$; $2\theta=21,7^\circ$; $2\theta=27,2^\circ$ (Figura 13) e essas são reflexões de Bragg típicas da nanozeólita Gismondina segundo a literatura ¹²⁹. Contrariando o que ocorreu com a zeólita Gismondina na escala micrométrica, não foram observadas grandes modificações estruturais do padrão de difração de Raios-X para os derivados de troca iônica da zeólita Gismondina nanométrica. De Waele *et al.* ¹³⁹, observou fenômeno similar em seus estudos de troca iônica com a nanozeólita Gismondina com íons de cobre. Neste estudo, o que foi observado para os derivados de troca iônica das nanozeólita Gismondina foi uma pequena variação nas intensidades das reflexões de Bragg localizadas na região de $25-30^\circ 2\theta$ (ver insert da Figura 13), e estas observações estão de acordo com as observações reportadas por De Waele *et al.* ¹³⁹.

Figura 13 Padrões de difração de raios-X da amostra NanoGIS (Gismondina nanométrica) forma sódica e seus derivados de trocas iônicas. A inserção mostra a mudança na intensidade dos picos na faixa 2θ de 25-30°.



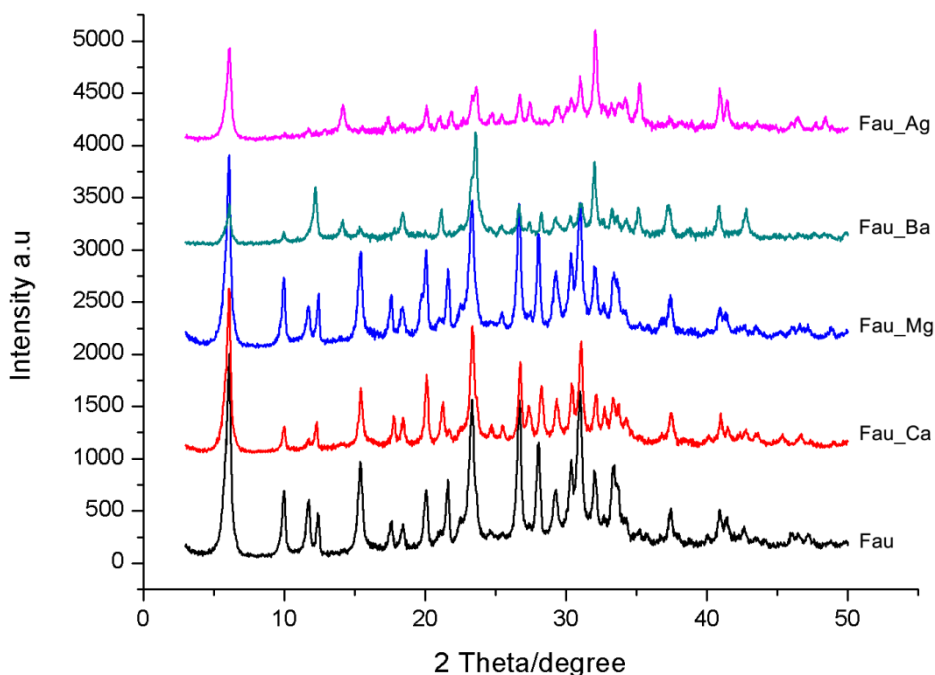
A Figura 14 mostra os difratogramas das zeólitas Faujasita na escala micrométrica na sua forma sódica e trocada com seus derivados de troca iônica. O material FAU exibiu um padrão com reflexões de Bragg mais importantes que são observadas em $2\theta = 6,0^\circ$; $2\theta = 9,9^\circ$; $2\theta = 11,7^\circ$; $2\theta = 15,3^\circ$; $2\theta = 23,2^\circ$; $2\theta = 26,6^\circ$; $2\theta = 31,1^\circ$ (Figura 14) esses padrões de difração de Raios-X são típicos da zeólita Faujasita segundo a literatura ¹²⁵.

A troca iônica com íon cálcio (FAU_Ca), não acarretou mudanças significativas, no padrão de difração de Raios-X, a não ser pelo desaparecimento de algumas reflexões de Bragg localizadas na região de $2\theta = 11,7^\circ$; $2\theta = 27,4^\circ$. Foi observado que a troca iônica com íons magnésio (FAU_Mg) não acarretou alteração no padrão de difração de Raios-X em relação a amostra original.

Na troca iônica com íons bário (FAU_Ba), é possível observar o desaparecimento de reflexões de Bragg localizadas na região de $2\theta = 10,3^\circ$; $2\theta = 12,9^\circ$; $2\theta = 15,4^\circ$; $2\theta = 20^\circ$; $2\theta = 21,6^\circ$, além de uma diminuição sistemática das intensidades das reflexões de Bragg pré-existentes. A troca iônica com íons prata (FAU_Ag) causou o desaparecimento de reflexões de Bragg

localizadas na região de $2\theta = 10^\circ$; $2\theta = 11,4^\circ$; $2\theta = 12,2^\circ$; $2\theta = 15,4^\circ$, bem como a diminuição das intensidades das reflexões de Bragg pré-existentes.

Figura 14 Padrões de difração de Raios-X da amostra FAU (faujasita micrométrica) forma sódica e seus derivados de trocas iônicas



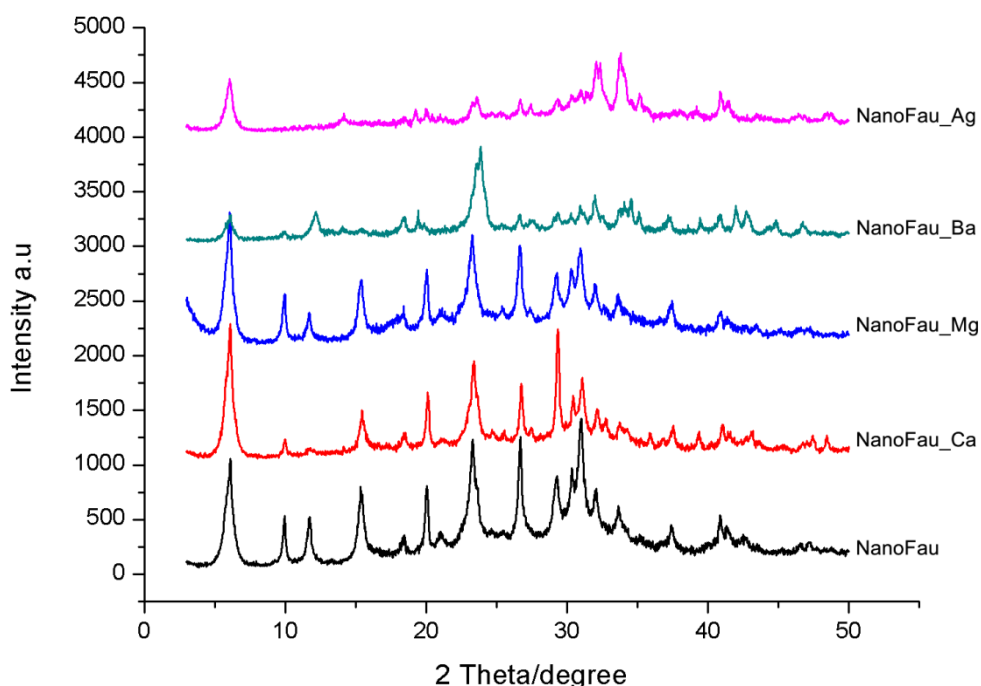
A Figura 15 mostra o padrão de difração de Raios-X da nanozeólita Faujasita (NanoFAU) em sua forma sódica e os seus derivados de troca iônica. O material NanoFAU apresentou um padrão de difração de Raios-X característico deste material conforme os dados reportados na literatura ¹²⁵ e as principais reflexões de Bragg estão localizadas na região de $2\theta = 6,1^\circ$; $2\theta = 9,9^\circ$; $2\theta = 11,7^\circ$; $2\theta = 15,3^\circ$; $2\theta = 20^\circ$; $2\theta = 23,3^\circ$; $2\theta = 26,5^\circ$; $2\theta = 31,1^\circ$.

A troca iônica com íons de cálcio (NanoFAU_Ca) não acarretou mudanças significativas no padrão de difração de Raios-X, a não ser pelo desaparecimento de uma reflexão de Bragg localizada em $2\theta = 11,7^\circ$, e uma diminuição sistemática das intensidades das reflexões de Bragg pré-existentes. O mesmo comportamento foi observado para a troca iônica com íons de magnésio (NanoFAU_Mg), onde o padrão de difração de Raios-X do derivado de troca iônica (NanoFAU_Mg) permaneceu idêntico ao da amostra original (Nano_FAU).

Na troca iônica com íons Bário (NanoFAU_Ba), é possível observar o desaparecimento de reflexões de Bragg localizadas na região $2\theta = 9,8^\circ$; $2\theta = 15,3^\circ$; $2\theta = 20^\circ$, além de uma

diminuição sistemática das intensidades das reflexões de Bragg pré-existentes. A troca iônica com íon prata (NanoFAU_Ag) acarretou mudanças significativas no padrão de difração de Raios-X, com o desaparecimento das reflexões de Bragg localizadas na região de $2\theta = 9,8^\circ$; $2\theta = 11,6^\circ$; $2\theta = 15,3^\circ$; $2\theta = 20^\circ$; $2\theta = 26,6^\circ$ e uma diminuição sistemática das intensidades das reflexões de Bragg pré-existentes.

Figura 15 Padrões de difração de Raios-X da amostra NanoFAU (Faujasita nanométrica) forma sódica e seus derivados de trocas iônicas



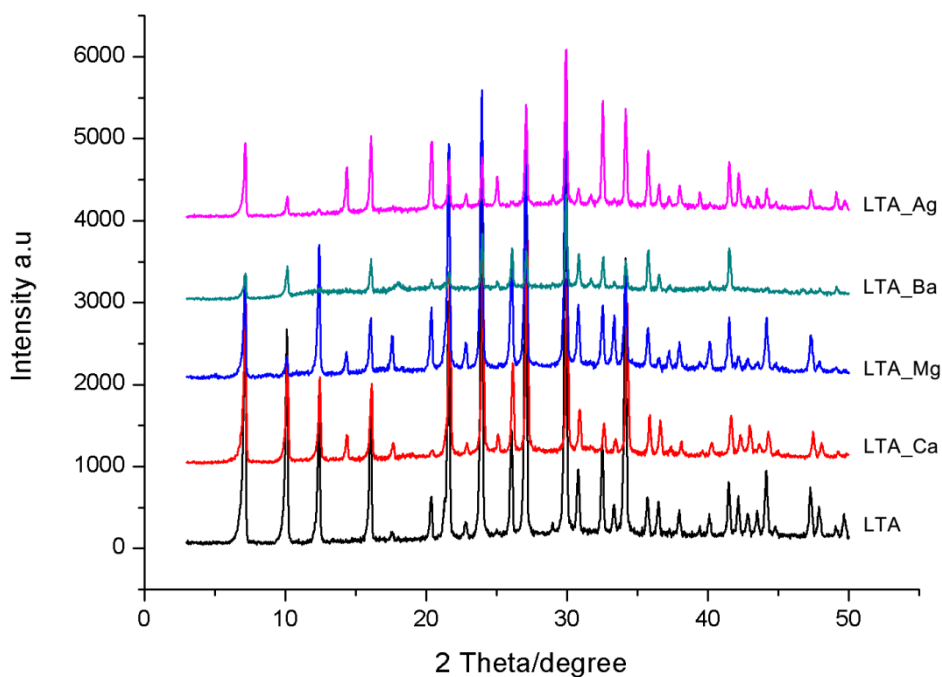
A Figura 16 mostra os difratogramas de DRX da zeólita A (LTA) na escala micrométrica na sua forma sódica e de seus derivados de troca iônica. A zeólita A apresentou um padrão de difração de Raios-X típico daqueles reportados na literatura ¹²⁵ com reflexões de Bragg localizadas na região de $2\theta = 7,2^\circ$; $2\theta = 10^\circ$; $2\theta = 12,4^\circ$; $2\theta = 16,1^\circ$; $2\theta = 21,6^\circ$; $2\theta = 24^\circ$; $2\theta = 27,2^\circ$; $2\theta = 30^\circ$; $2\theta = 34^\circ$. Em contrapartida, a troca iônica com íon Cálcio (LTA_Ca) não causou nenhuma mudança drástica na estrutura, sendo observado apenas o aparecimento de uma reflexão de Bragg localizado na região de $2\theta = 14,3^\circ$, em relação ao padrão de difração de Raios-X original. Observou-se também o desaparecimento de uma reflexão de Bragg em $2\theta = 20,3^\circ$, além de uma sistemática diminuição das intensidades das demais reflexões de Bragg.

O padrão de difração de Raios-X da amostra trocada com íons de magnésio (LTA_Mg) não exibiu nenhuma mudança drástica da estrutura cristalina em relação à amostra original, a

não ser pelo aparecimento de duas reflexões de Bragg localizadas na região em $2\theta = 14,3^\circ$; $2\theta = 17,6^\circ$, enquanto a troca iônica com bário (LTA_Ba) causou apenas uma diminuição sistemática nas intensidades de todas as reflexões de Bragg.

A troca iônica com íons de prata (LTA_Ag), não causou nenhuma mudança drástica na estrutura cristalina em relação a amostra original, sendo observado apenas o aparecimento de uma reflexão de Bragg localizado na região de $2\theta = 14,3^\circ$, o desaparecimento de uma reflexão de Bragg localizada na região $2\theta = 12,4^\circ$, além de uma diminuição sistemática nas intensidades de todas as reflexões de Bragg pré-existentes.

Figura 16 Padrões de difração de Raios-X da amostra LTA (LTA micrométrica) forma sódica e seus derivados de trocas iônicas



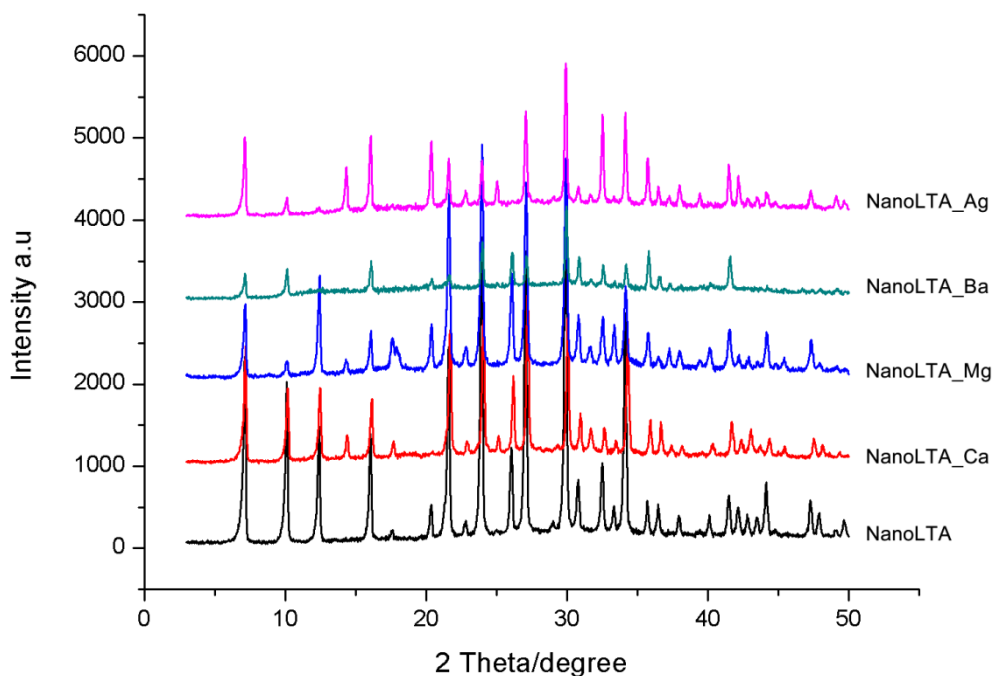
A Figura 17 mostra os difratogramas das zeólitas A (LTA) na escala nanométrica NanoLTA em sua forma sódica e de seus derivados de troca iônica. A zeólita A (NanoLTA) apresentou um padrão de difração de Raios-X típico daqueles reportados na literatura¹²⁵ com reflexões de Bragg mais importantes localizadas na região $2\theta = 7,1$; $2\theta = 10,1$; $2\theta = 12,2$; $2\theta = 16,7$; $2\theta = 21,6^\circ$; $2\theta = 24^\circ$; $2\theta = 27^\circ$; $2\theta = 30^\circ$; $2\theta = 34,1^\circ$. Por outro lado, a troca iônica com íons de cálcio (NanoLTA_Ca) não causou nenhuma mudança drástica na estrutura, sendo observado apenas o aparecimento de uma reflexão de Bragg localizado na região de $2\theta = 14,3^\circ$. Observou-

se também o desaparecimento de uma reflexão de Bragg em $2\theta = 20,2^\circ$, além de uma sistemática diminuição das intensidade das demais reflexões de Bragg.

O padrão de difração de Raios-X da amostra trocada com íons de magnésio (NanoLTA_Mg), não exibiu nenhuma mudança drástica da estrutura cristalina em relação a amostra original, a não ser pelo aparecimento de uma reflexão de Bragg localizadas na região de $2\theta = 14,3^\circ$, enquanto a troca iônica com bário (NanoLTA_Ba), causou o desaparecimento de duas reflexões de Bragg localizadas na região de $2\theta = 12,2^\circ$; $2\theta = 20,3^\circ$, além de uma diminuição sistemática nas intensidades de todas as reflexões de Bragg pré-existentes.

O padrão de difração de Raios-X após a troca iônica com íons de prata (NanoLTA_Ag) não exibiu nenhuma mudança drástica da estrutura cristalina em relação à amostra original, a não ser pelo aparecimento de uma reflexão de Bragg localizada na região de $2\theta = 14,3^\circ$ e o desaparecimento de uma reflexão de Bragg localizada na região de $2\theta = 12,2^\circ$, além de uma diminuição sistemática nas intensidades de todas as reflexões de Bragg pré-existentes.

Figura 17 Padrões de difração de Raios-X da amostra NanoLTA (LTA nanométrica) forma sódica e seus derivados de trocas iônicas

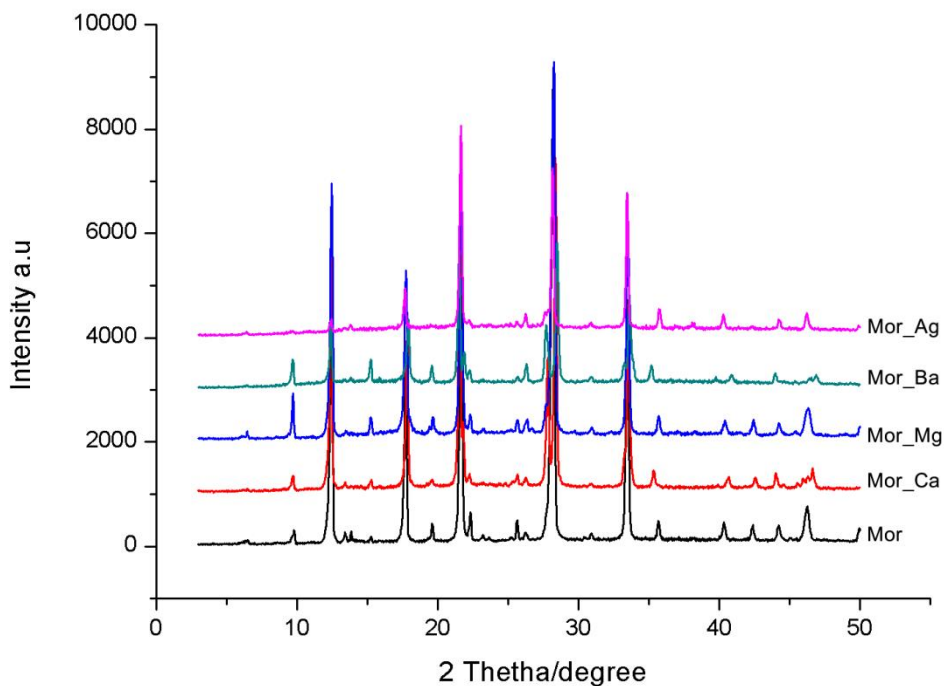


A Figura 18 representa os padrões de difração de Raios-X da zeólita Mordenita (MOR) na escala micrométrica na forma sódica e seus derivados de troca iônica. A zeólita MOR apresentou um padrão de difração de Raios-X típico daqueles reportados na literatura ¹²⁶ com

reflexões de Bragg mais importantes localizadas na região de $2\theta = 12,3^\circ$; $2\theta = 17,5^\circ$; $2\theta = 21,8^\circ$; $2\theta = 28,3^\circ$; $2\theta = 33,6^\circ$.

A troca iônica com íons de cálcio (MOR_Ca) e íons de bário (MOR_Ba) não exibiram mudanças drásticas da estrutura cristalina em relação a amostra original. Enquanto que a troca iônica com íons de magnésio (MOR_Mg) causou um aumento na intensidade das reflexões de Bragg. A troca iônica com íons de prata (MOR_Ag), não exibiu nenhuma mudança drástica da estrutura cristalina em relação a amostra original, a não ser pelo o desaparecimento de reflexões de Bragg localizadas na região de $2\theta = 9,7^\circ$; $2\theta = 15,2^\circ$; $2\theta = 19,6^\circ$.

Figura 18 Padrões de difração de Raios-X da amostra MOR (Mordenita micrométrica) forma sódica e seus derivados de trocas iônicas



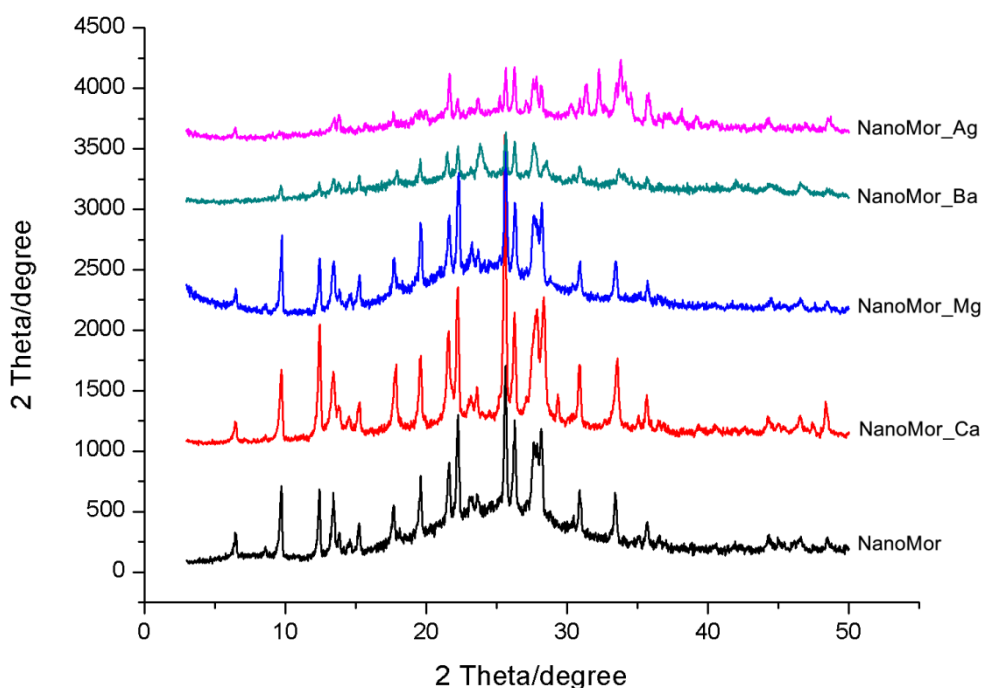
A Figura 19 representa os padrões de difração de Raios-X das zeólitas mordenita (MOR) na escala nanométrica na forma sódica e seus derivados de troca iônica. A zeólita NanoMOR apresentou um padrão de difração de Raios-X típico daqueles reportados na literatura ¹³¹, com reflexões de Bragg mais importantes localizadas na região de $2\theta = 6,2^\circ$; $2\theta = 9,6^\circ$; $2\theta = 12,3^\circ$; $2\theta = 13,4^\circ$; $2\theta = 22,3^\circ$; $2\theta = 25,6^\circ$; $2\theta = 28,1^\circ$.

A troca iônica com íons de cálcio (NanoMOR_Ca) não causou nenhuma alteração da estrutura cristalina em relação a amostra original. No entanto, a troca iônica com íons de

magnésio (NanoMOR_Mg) causou apenas o desaparecimento de uma reflexão de Bragg localizada na região $2\theta = 6,2^\circ$, além da diminuição sistemática nas intensidades de todas as reflexões de Bragg pré-existentes.

A troca iônica com íons bário (NanoMOR_Ba) induziu o desaparecimento de reflexões de Bragg localizadas na região de $2\theta = 6,2^\circ$; $2\theta = 9,6^\circ$; $2\theta = 12,2^\circ$; $2\theta = 13,5^\circ$; $2\theta = 15,2^\circ$; $2\theta = 19,6^\circ$. Enquanto que a troca iônica com íons prata (NanoMOR_Ag) causou a diminuição da intensidade das reflexões de Bragg em relação à amostra original.

Figura 19 Padrões de difração de Raios-X da amostra NanoMOR (Mordenita nanométrica) na forma sódica e seus derivados de trocas iônicas



As Figura 20 e 21 representam os padrões de difração de Raios-X das zeólitas Titânio-Silicato (TS-1) nas escalas micrométrica e nanométrica na forma sódica e com seus respectivos derivados de troca iônica. As zeólitas TS-1 e NanoTS-1 apresentaram um padrão de difração de Raios-X típico daqueles reportados na literatura¹²⁷ com reflexões de Bragg mais importantes localizadas na região de $2\theta = 7,8^\circ$; $2\theta = 8,7^\circ$; $2\theta = 14,6^\circ$; $2\theta = 23^\circ$; $2\theta = 23,8^\circ$; $2\theta = 29,8^\circ$.

Pode se observar que as estruturas das zeólitas TS-1 e NanoTS-1 não demonstraram nenhuma modificação estrutural após o processo de troca iônica. Estes materiais não possuem a capacidade de troca iônica devido à falta de tetraedros de alumínio, consequentemente, a

estrutura primária da zeólita TS-1 e NanoTS-1 para as reflexões de Bragg nos ângulos de difração 2θ permaneceu inalterada. Não foi observado mudanças significativas no difratograma da zeólita TS-1 da escala micrométrica (Figura 20) em comparação a escala nanométrica NanoTS-1 (Figura 21), neste caso, foi observado apenas uma diminuição da intensidade das reflexões de Bragg.

Figura 20 Padrões de difração de Raios-X da amostra TS-1 (titânio-silicato micrométrica) na forma sódica e seus derivados de trocas iônicas

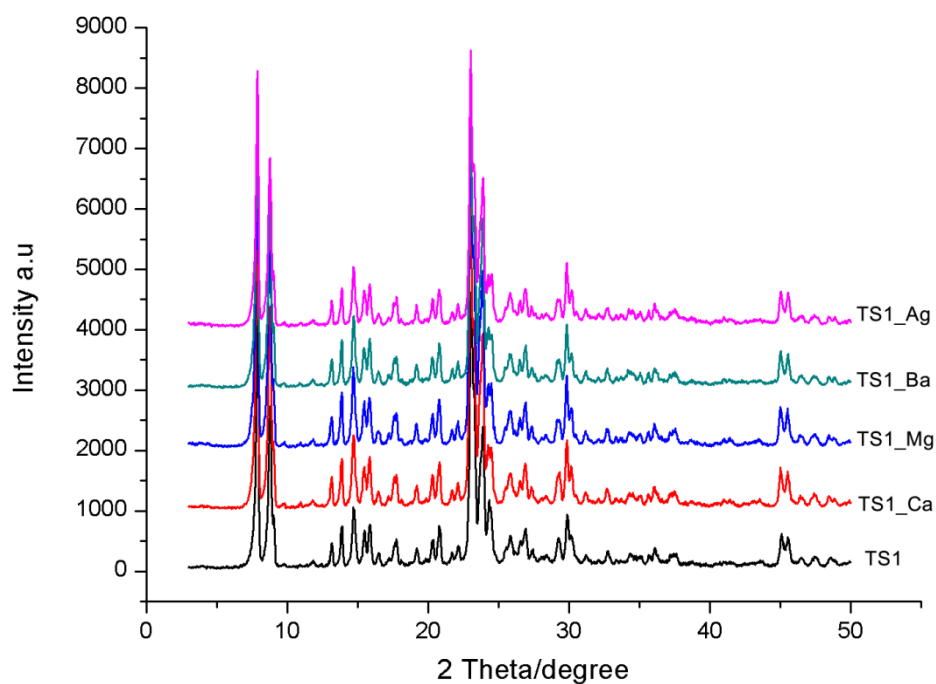
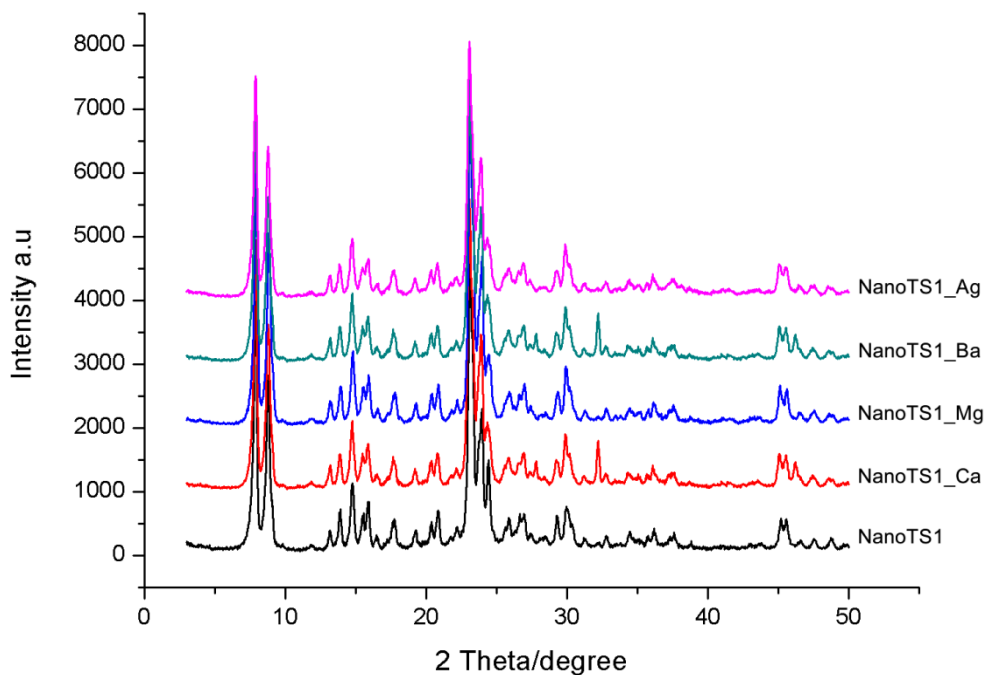


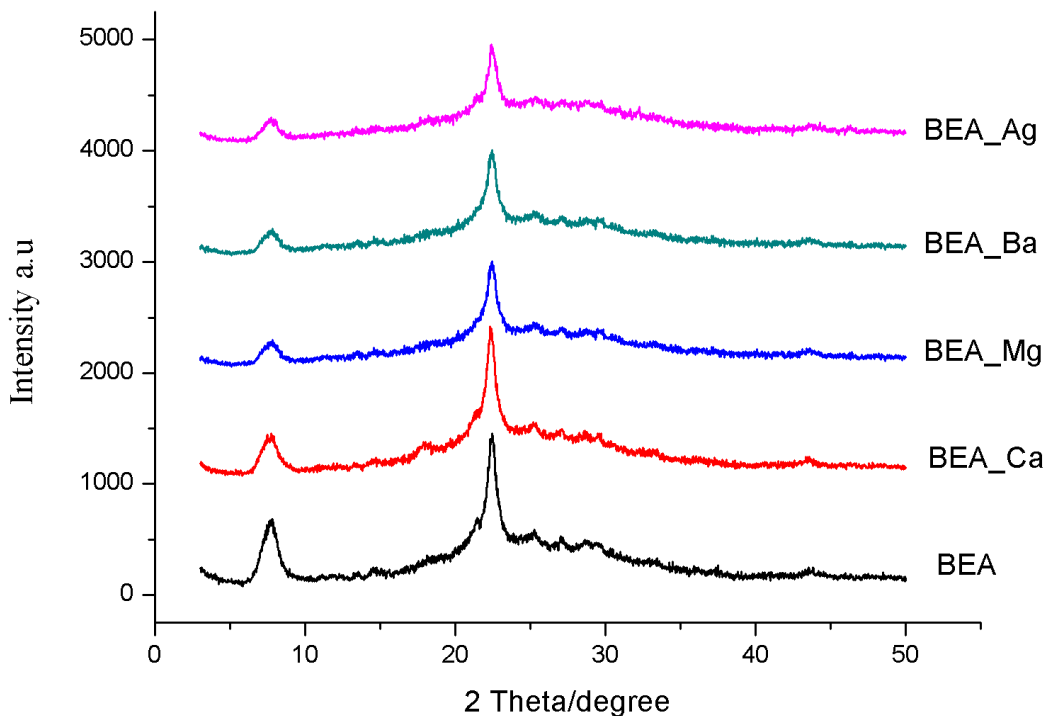
Figura 21 Padrões de difração de Raios-X da amostra NanoTS-1 (titânio-silicato nanométrica) na forma sódica e seus derivados de trocas iônicas



A Figura 22 representa os padrões de difração de Raios-X da zeólita Beta (BEA) na escala micrométrica na forma sódica e com seus respectivos derivados de troca iônica. A zeólita BEA apresentou um padrão de difração de Raios-X típico daqueles reportados na literatura ¹²⁸ com reflexões de Bragg mais importantes localizadas na região de $2\theta = 7,6^\circ$; $2\theta = 22,3^\circ$.

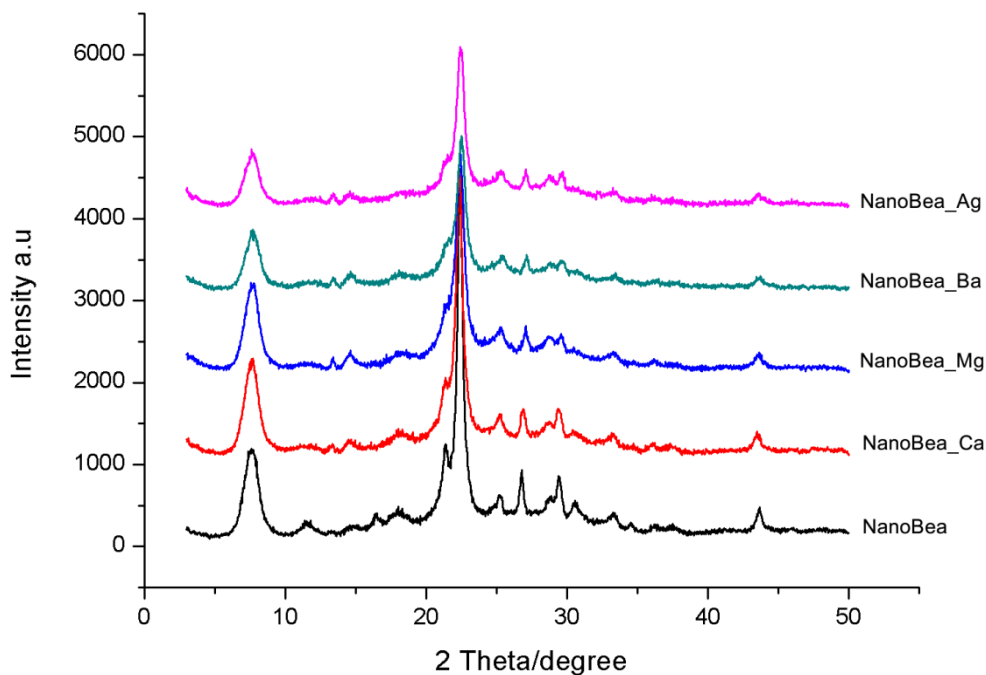
Pode se observar que a estrutura da zeólita BEA também não demonstrou nenhuma modificação estrutural após a troca iônica (Figura 22).

Figura 22 Padrões de difração de Raios-X da amostra BEA (escala micrométrica) na forma sódica e seus derivados de trocas iônicas



A Figura 23 representa os padrões de difração de Raios-X da zeólita Beta (BEA) na escala nanométrica na forma sódica e com seus respectivos derivados de troca iônica. A zeólita NanoBEA apresentou um padrão de difração de Raios-X típico daqueles reportados na literatura¹³³ com reflexões de Bragg mais importantes localizadas na região $2\theta = 7,8^\circ$; $2\theta = 22,5^\circ$; $2\theta = 26,8^\circ$; $2\theta = 29,8^\circ$. Pode-se observar que não houve uma mudança significativa no difratograma da zeólita NanoBEA (Figura 23), neste caso, ocorreu apenas uma diminuição na intensidade de algumas reflexões de Bragg em comparação à amostra original.

Figura 23 Padrões de difração de Raios-X da amostra NanoBEA (escala nanométrica) na forma sódica e seus derivados de trocas iônicas

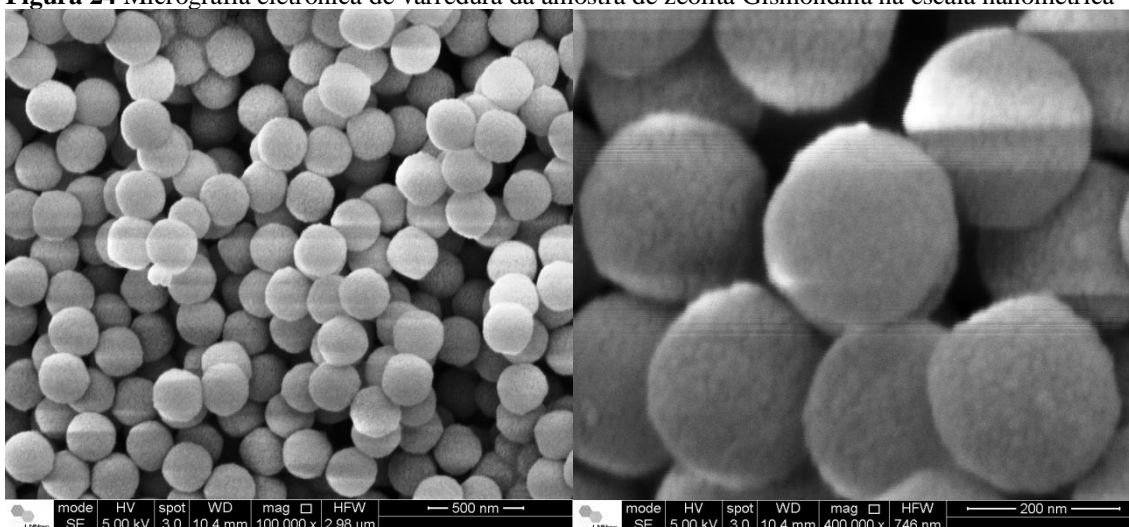


5.2 Microscopia eletrônica de varredura (MEV) das zeólitas nas escalas nanométricas e micrométricas

Para a confirmação da morfologia e tamanho dos cristais foram feitas micrografias eletrônicas obtidas por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), obtendo-se imagens de alta resolução das amostras zeolíticas preparadas nesse estudo.

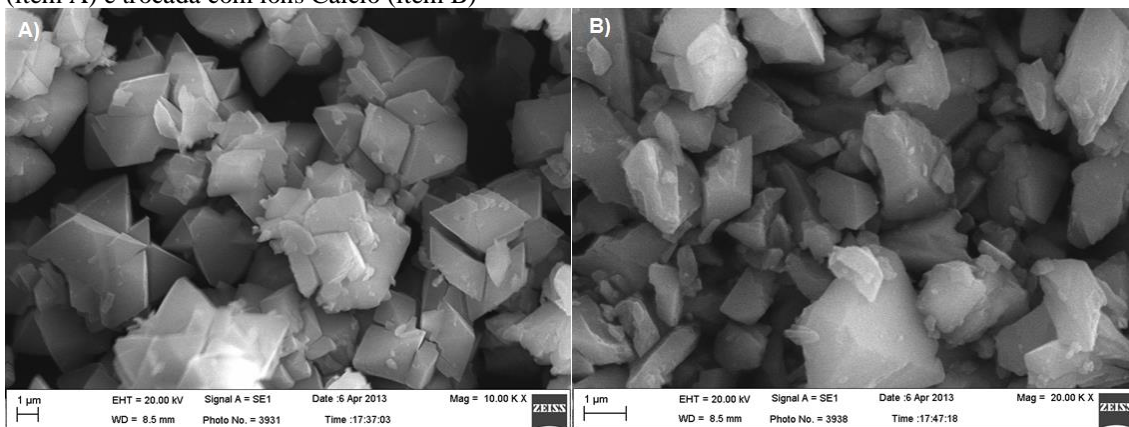
Na Figura 24 observa-se que os cristais de Gismondina na escala nanométrica (NanoGIS) foram cristalizados na forma esférica e seu tamanho está na faixa de 250-275nm.

Figura 24 Micrografia eletrônica de varredura da amostra de zeólita Gismondina na escala nanométrica



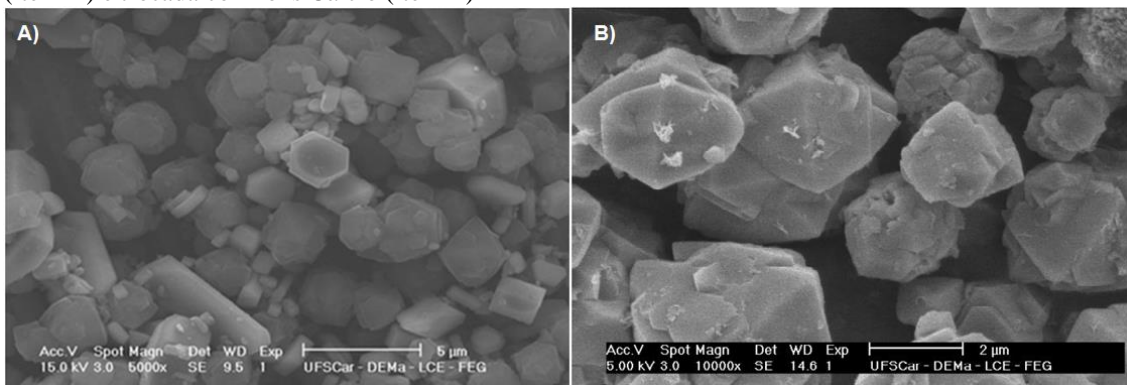
A Figura 25 mostra o MEV da Gismondina na escala micrométrica (GIS), cujo material apresentou forma piramidal com bordas cristalinas confirmando sua alta cristalinidade ¹⁴⁰. A micrografia da zeólita Gismondina após a troca iônica com íons cálcio (GIS_Ca) não revela uma característica piramidal bem definida como encontrada na Gismondina em sua forma na forma sódica, porém os dados indicam que a morfologia inicial foi mantida, e também pode-se observar uma grande quantidade de debris na superfície da amostra GIS_Ca (item B).

Figura 25 Micrografia eletrônica de varredura da amostra de Gismondina na escala micrométrica na forma sódica (item A) e trocada com íons Cálcio (item B)



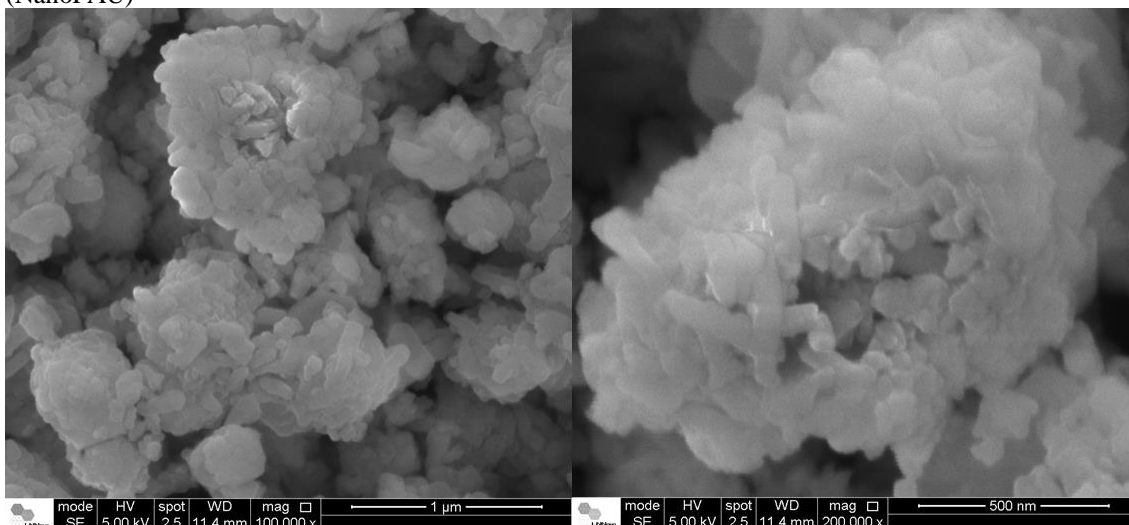
A Figura 26 mostra a morfologia da zeólita Faujasita na escala micrométrica na forma sódica (FAU) e trocada com íons cálcio (FAU_Ca), tanto para o material na sua forma sódica quanto para seu derivado de troca iônica, pode-se visualizar uma morfologia de cristais com formas hexagonais, o que é coerente com a morfologia descrita na literatura para esta zeólita

Figura 26 Micrografia eletrônica de varredura da amostra de Faujasita na escala micrométrica na forma sódica (item A) e trocada com íons Cálcio (item B)



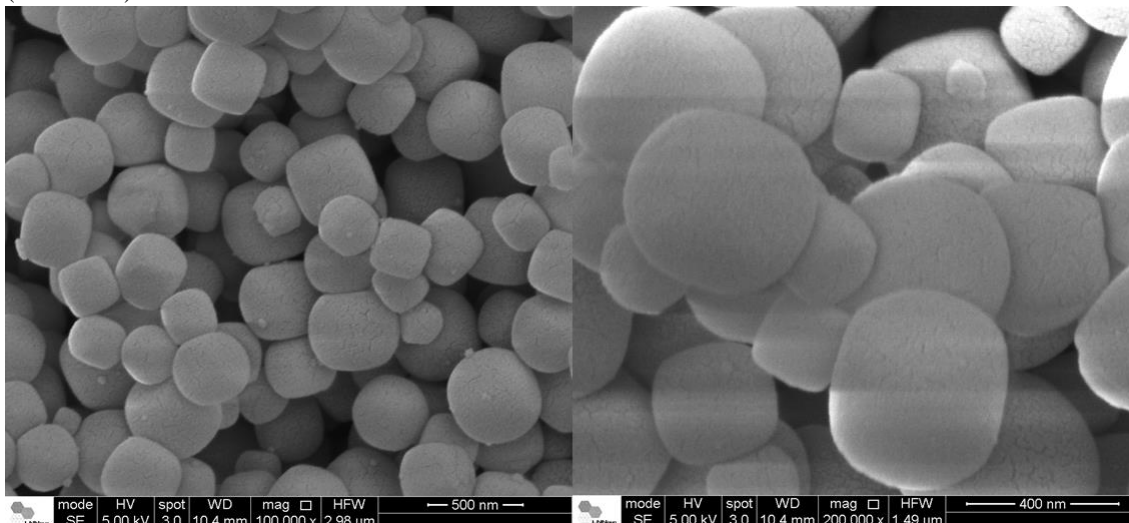
Na Figura 27 mostra a micrografia da zeólita Faujasita na escala nanométrica (NanoFAU), em que é possível observar que os cristais foram aparentemente aglomerados formando agregados de tamanho dentro da faixa de intervalo de 20-100 nm, resultado, semelhante ao reportado por Zhan *et al*¹²⁵.

Figura 27 Micrografia eletrônica de varredura da amostra de Faujasita na escala nanométrica em sua forma sódica (NanoFAU)



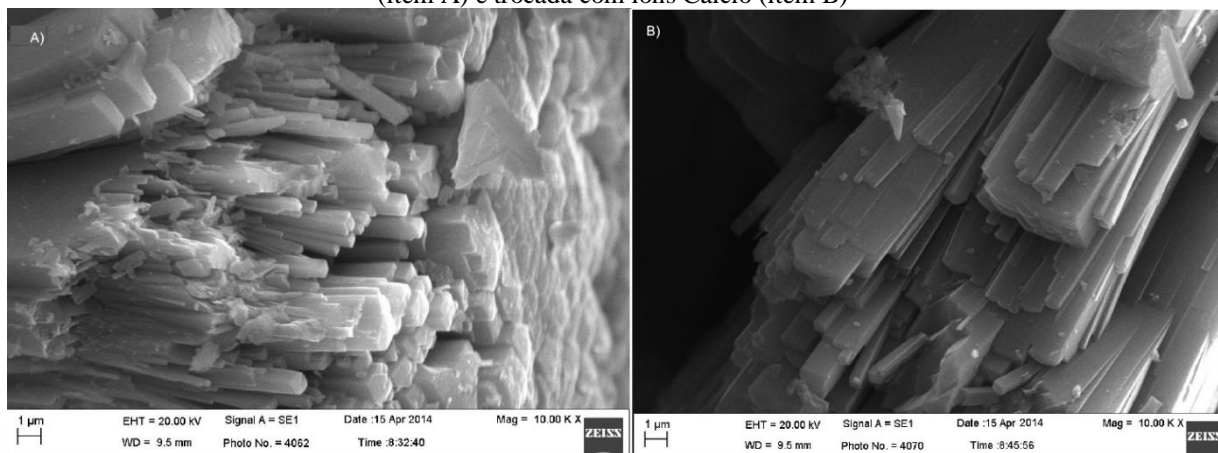
A Figura 28 mostra as micrografias da amostra de LTA na escala nanométrica (NanoLTA), é possível observar cristais de morfologia esférica, cujo tamanho está em um amplo intervalo de tamanho, sendo o tamanho máximo da ordem de 500 nm.

Figura 28 Micrografia eletrônica de varredura da amostra de LTA na escala nanométrica em sua forma sódica (NanoLTA)



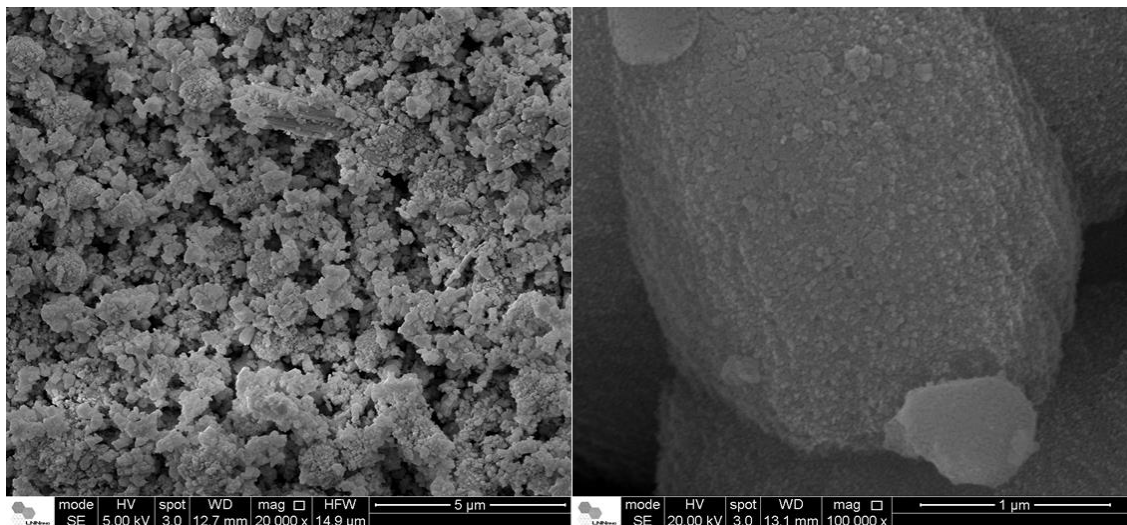
A micrografia da zeólita mordenita (MOR) na escala micrométrica (Figura 29), revela que esta estrutura tem forma de agulha, coerente com a estrutura relatada na literatura ¹⁴¹. O MEV da zeólita após a troca iônica com cálcio (MOR_Ca), não revelou modificação significativa, mantendo a morfologia original da zeólita.

Figura 29 Micrografia eletrônica de varredura da amostra de Mordenita na escala micrométrica na forma sódica (item A) e trocada com íons Cálcio (item B)



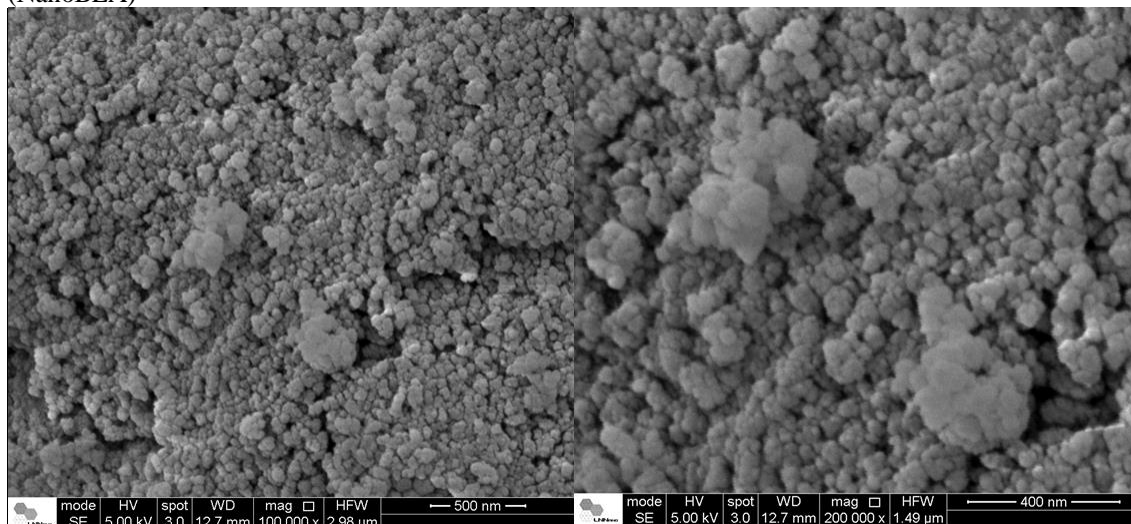
Na Figura 30 observa-se a micrografia da zeólita mordenita na escala nanométrica (NanoMOR), em que nota-se um aglomerado de partículas na escala nanométrica, coerente com o que foi reportado por Shujian *et al.* ¹³¹.

Figura 30 Micrografia eletrônica de varredura da amostra de Mordenita na escala nanométrica na forma sódica (NanoMOR)



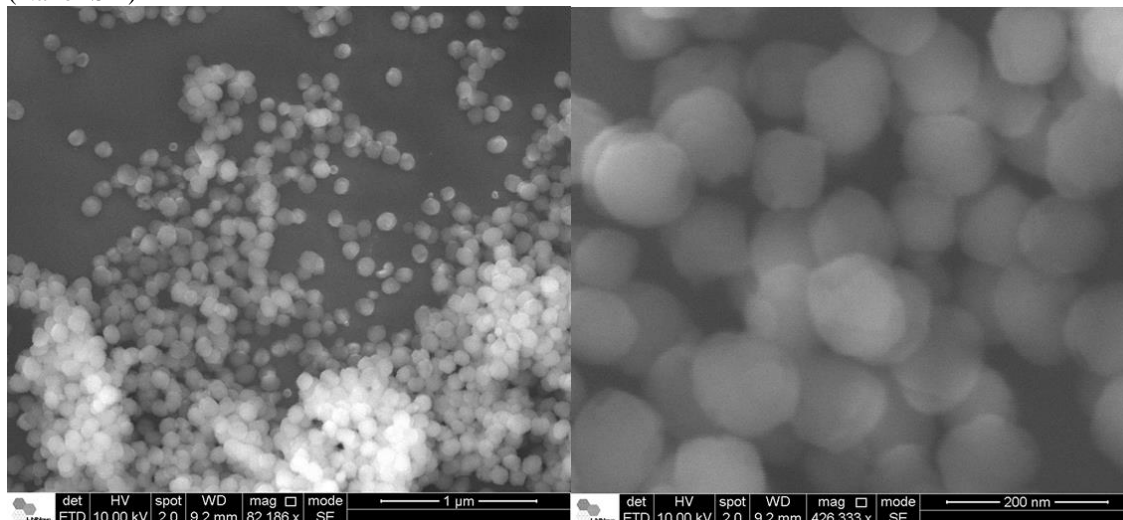
Na Figura 31 observa a microscopia da amostra de zeólita BEA na escala nanométrica (NanoBEA). É possível notar um aglomerado de partículas uniforme com um tamanho menor que 100nm, conforme relatado por Larlus *et al.* ¹³³.

Figura 31 Micrografia eletrônica de varredura da amostra de BEA na escala nanométrica na forma sódica (NanoBEA)



Na Figura 32 observa-se que os cristais de TS-1 na escala nanométrica foram cristalizados na forma esférica e seu tamanho está na faixa de 150-210 nm, semelhantes aos obtidos por Cundy *et al.* ^{49; 132}.

Figura 32 Micrografia eletrônica de varredura da amostra de TS-1 na escala nanométrica na forma sódica (NanoTS-1)



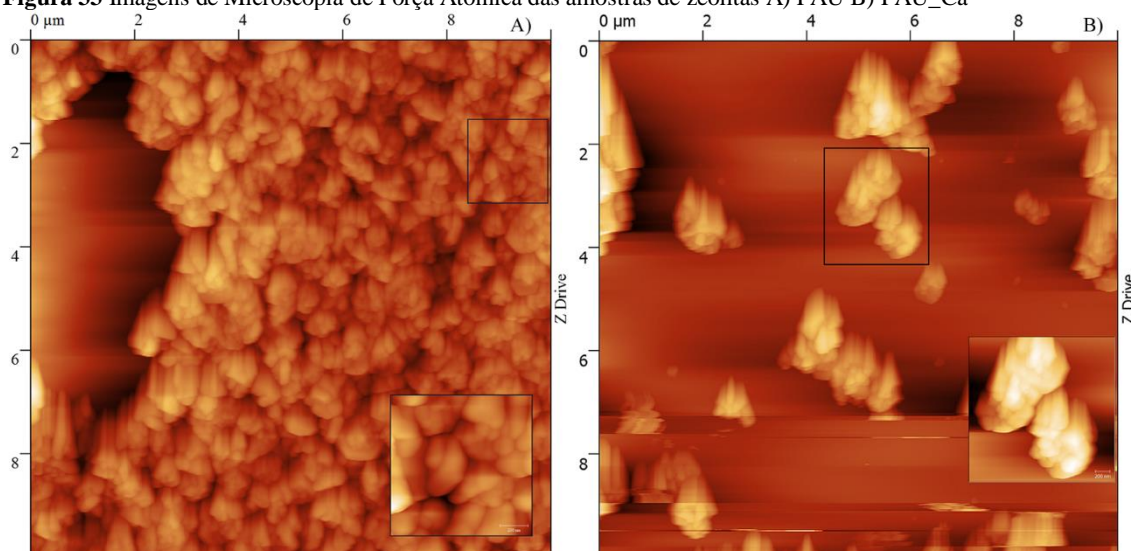
5.3 Microscopia de força atômica (AFM) das zeólitas FAU e NanoFAU e seu derivado de troca iônica com cálcio

As imagens de AFM foram utilizadas de forma a complementar as informações obtidas por MEV (microscopia eletrônica de varredura) e também para avaliar as propriedades da superfície de algumas zeólitas sintetizadas que foram mais profundamente estudadas.

As micrografias de superfície das zeólita FAU e NanoFAU antes e depois do processo de troca iônica com cálcio são apresentadas na Figura 33 e Figura 34.

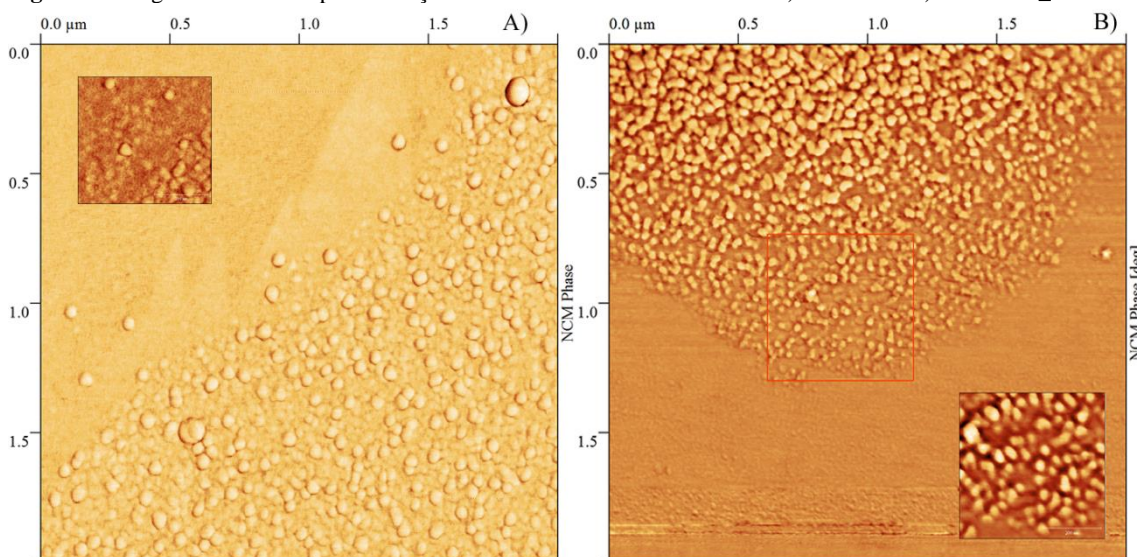
Em relação à topografia superficial da zeólita FAU, apesar da presença de artefatos é possível confirmar o desenvolvimento de formas hexagonais ⁵² o que corrobora com os dados de MEV para esta amostra. É possível observar também que não houve alterações na morfologia após o processo de troca iônica com cálcio (Figura 33).

Figura 33 Imagens de Microscopia de Força Atômica das amostras de zeólitas A) FAU B) FAU_Ca



Em relação às amostras de zeólitas faujasita na escala nanométrica, é possível observar que as partículas aparentemente encontram-se aglomeradas sobre o substrato, sendo que alguns materiais apresentaram formato levemente arredondado. Após o processo de troca iônica com cálcio, é possível observar que não houve alteração do formato da nanozeólita (Figura 34).

Figura 34 Imagens de Microscopia de Força Atômica das amostras de zeólitas A) NanoFAU B) NanoFAU_Ca

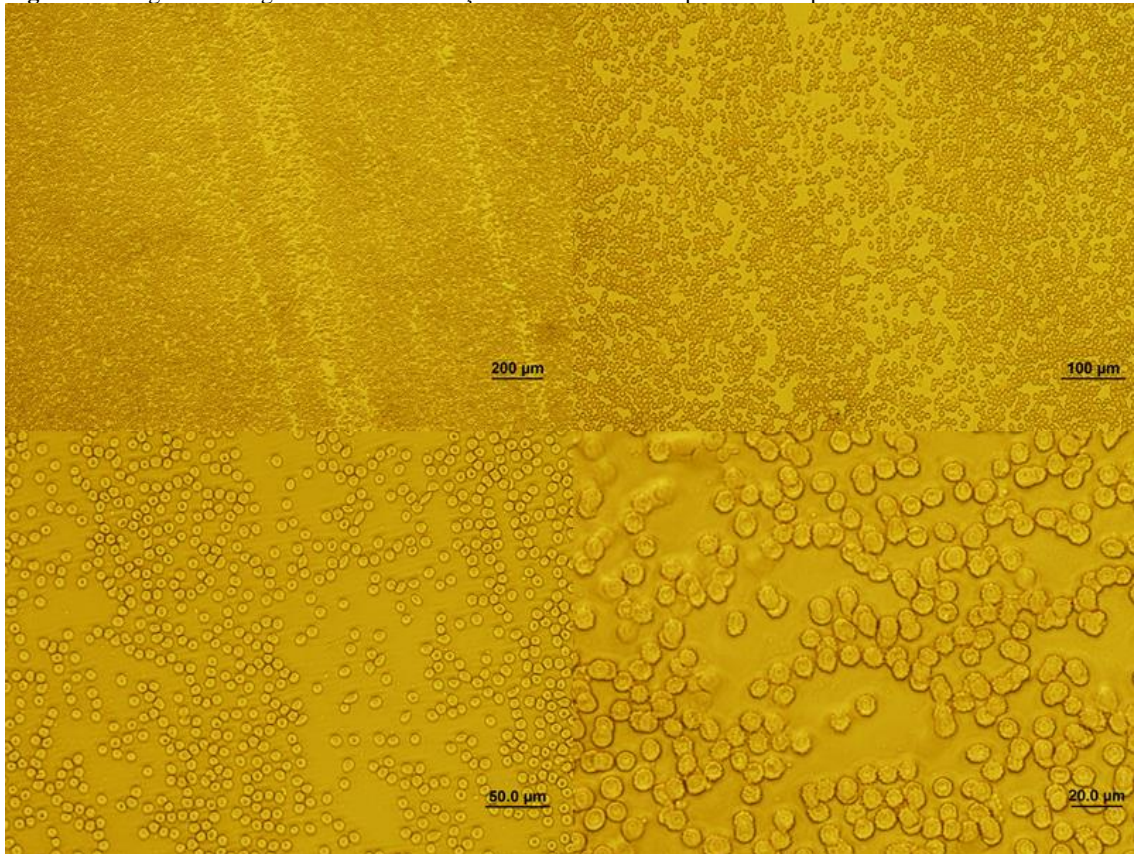


5.4 Microscopia de contraste de fase

A microscopia de contraste de fase foi realizada com o objetivo de observar as alterações morfológicas nas células vermelhas do sangue total quando entram em contato com a zeólita.

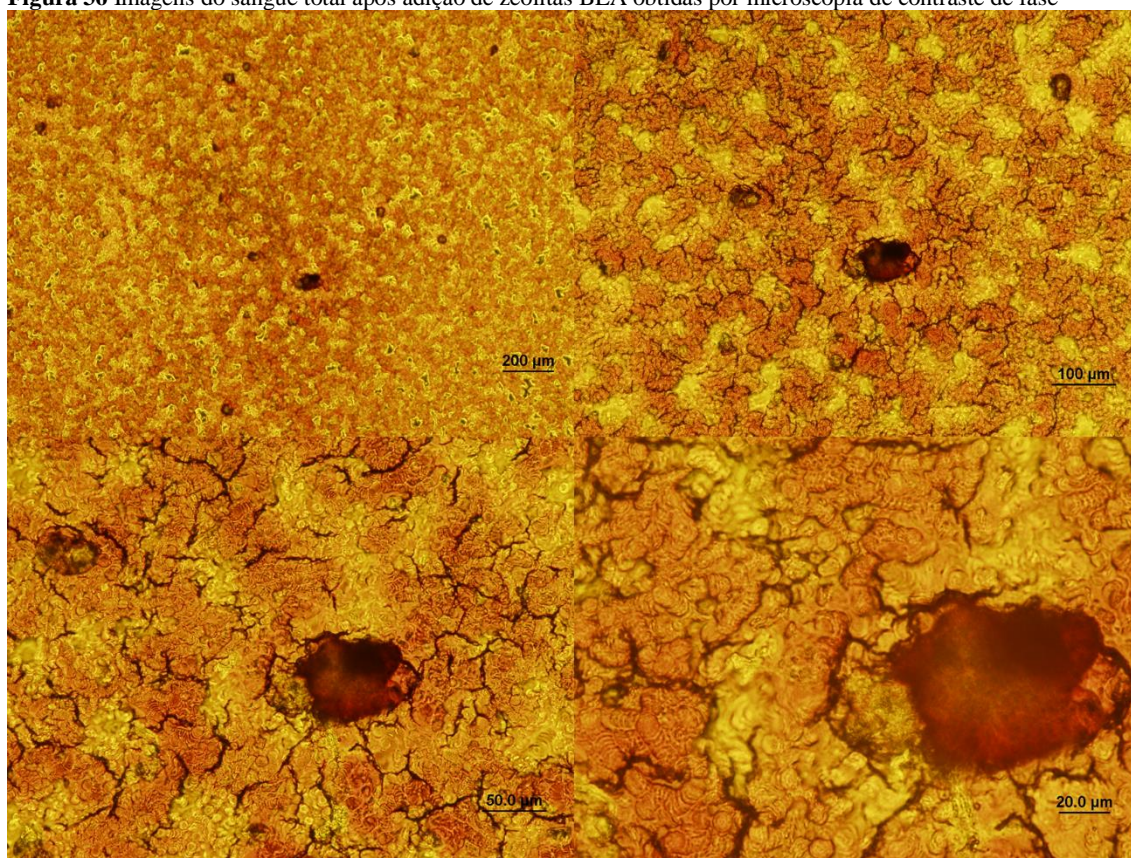
A Figura 35 mostram os glóbulos vermelhos antes da adição de zeólitas em diferentes aumentos (20, 50, 100 e 200 μm), utilizando uma objetiva de contraste de fase. Os dados revelam que as células vermelhas do sangue normais possuem uma forma circular, apresentam formato bicôncavo e um diâmetro que varia de 6 a 8 μm .

Figura 35 Imagens do sangue total antes da adição de zeólitas obtidas por microscopia de contraste de fase



Ao adicionar zeólita BEA (Figura 36), depois de alguns minutos foi possível observar a formação de aglomeração de células sanguíneas, semelhante a uma grande massa sólida de células, confirmando a influência das zeólitas na aglomeração das células sanguíneas.

Figura 36 Imagens do sangue total após adição de zeólitas BEA obtidas por microscopia de contraste de fase



Comportamento semelhante também foi observado quando os outros materiais zeolíticos na escala micrométrica e nanométrica foram adicionados ao sangue total.

A presença dos materiais zeolíticos no sangue é capaz de promover uma aglomeração de células sanguíneas após o sangue entrar em contato com a zeólita, e isto não foi observado quando o sangue foi colocado sob a superfície da lâmina de microscopia sem a zeólita. Sendo assim, esta técnica juntamente com os dados de tromboelastografia (ver adiante item 5.11) é útil para confirmar a capacidade da zeólita em promover a aceleração da coagulação sanguínea.

Da Figura 37 à 49 é possível observar as imagens obtidas através da técnica de microscopia de contraste de fase dos materiais zeolítico sintetizados na sua forma sódica na escala micrométrica e nanométrica e os derivados de troca iônica de cálcio da zeólita Faujasita na escala micrométrica e nanométrica. Para todas as amostras analisadas, é possível observar a formação de aglomerados de células sanguíneas.

Figura 37 Imagens do sangue total após adição de zeólitas FAU obtidas por microscopia de contraste de fase

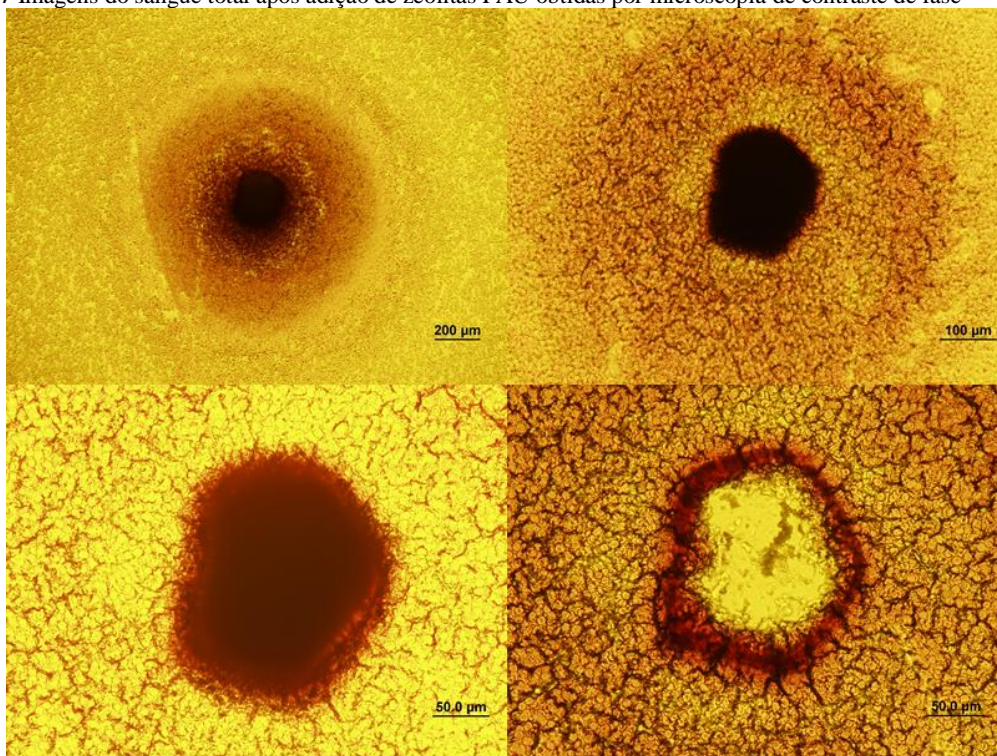


Figura 38 Imagens do sangue total após adição de zeólitas GIS obtidas por microscopia de contraste de fase

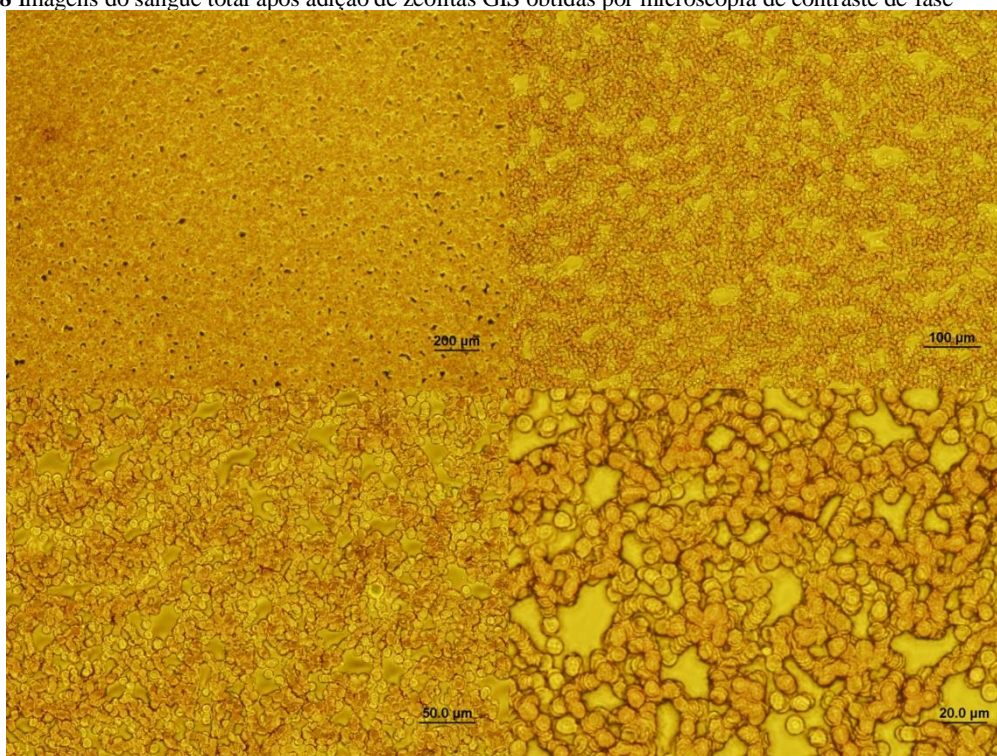


Figura 39 Imagens do sangue total após adição de zeólitas LTA obtidas por microscopia de contraste de fase

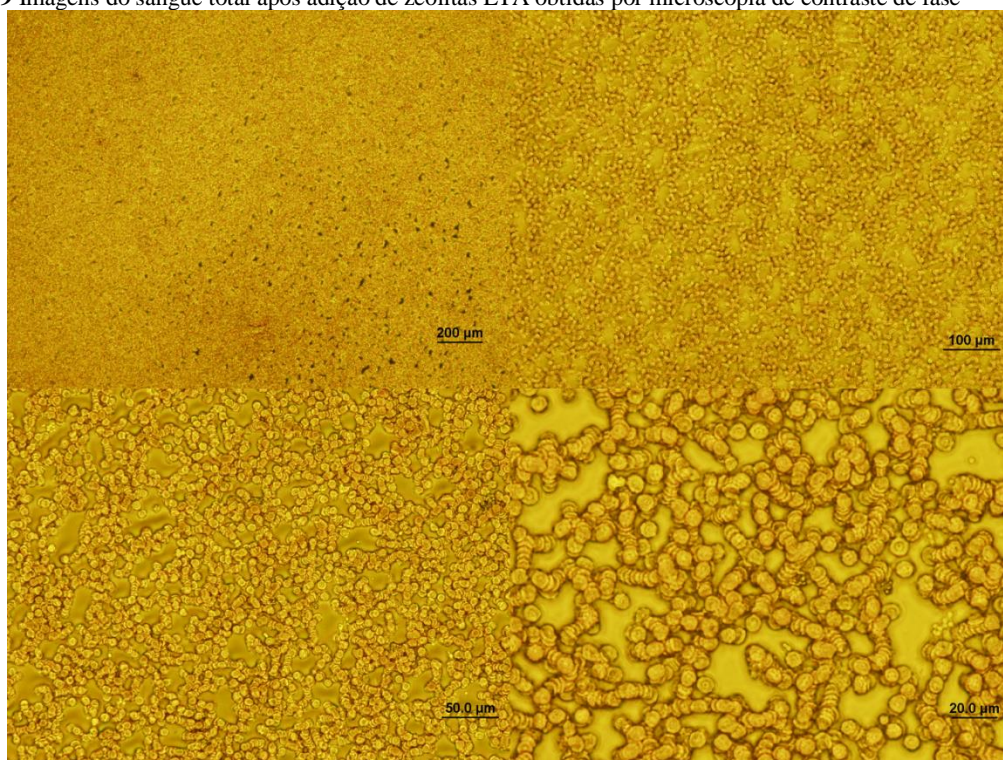


Figura 40 Imagens do sangue total após adição de zeólitas MOR obtidas por microscopia de contraste de fase

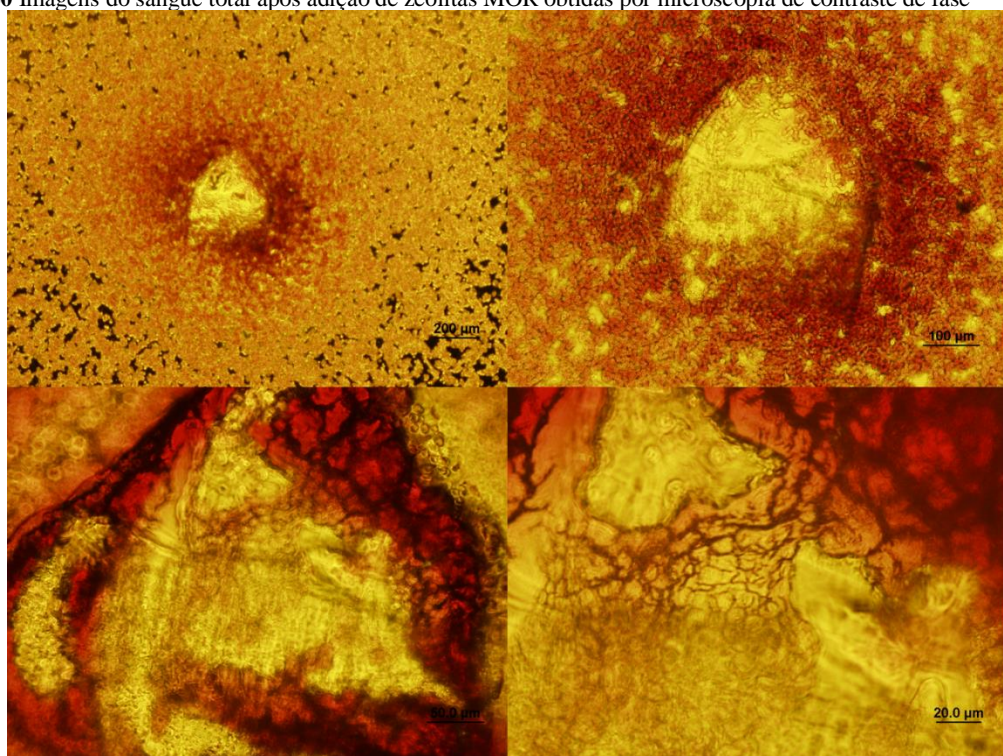


Figura 41 Imagens do sangue total após adição de zeólitas TS1 obtidas por microscopia de contraste de fase

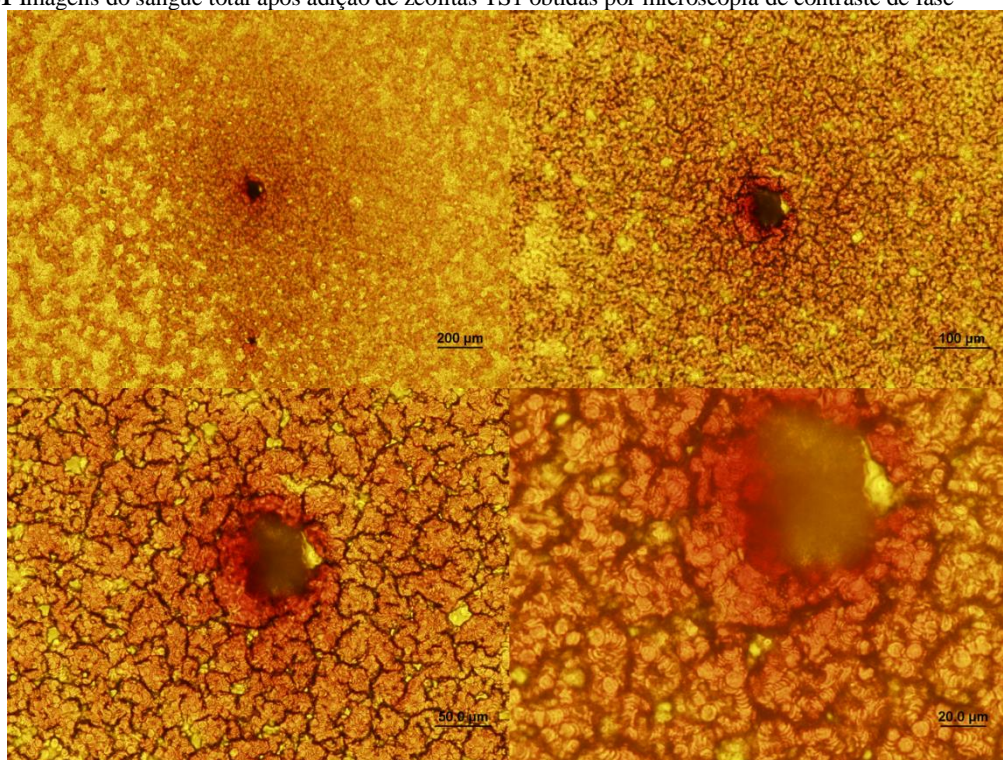


Figura 42 Imagens do sangue total após adição de zeólitas NanoBEA obtidas por microscopia de contraste de fase

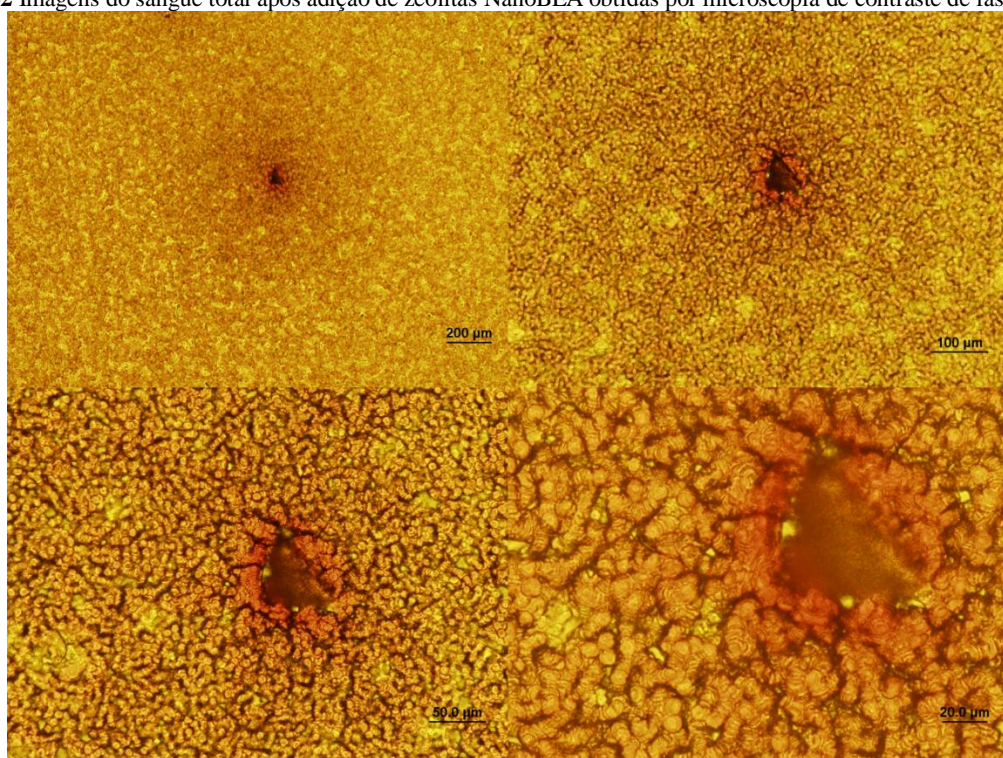


Figura 43 Imagens do sangue total após adição de zeólitas NanoFAU obtidas por microscopia de contraste de fase

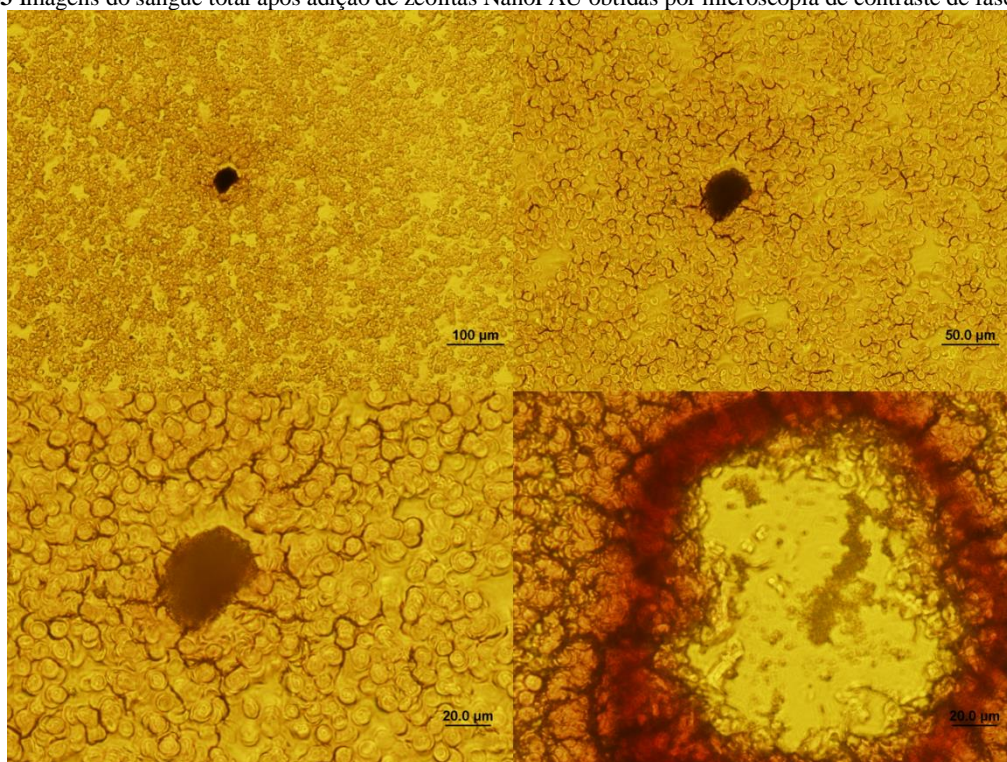


Figura 44 Imagens do sangue total após adição de zeólitas NanoGIS obtidas por microscopia de contraste de fase

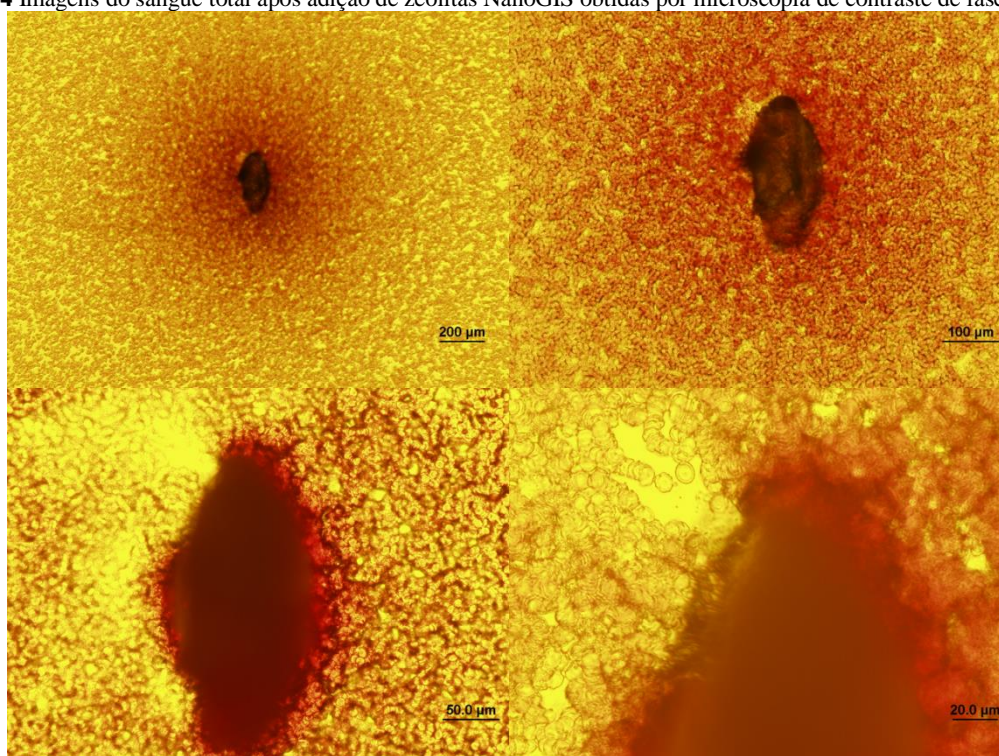


Figura 45 Imagens do sangue total após adição de zeólitas NanoLTA obtidas por microscopia de contraste de fase

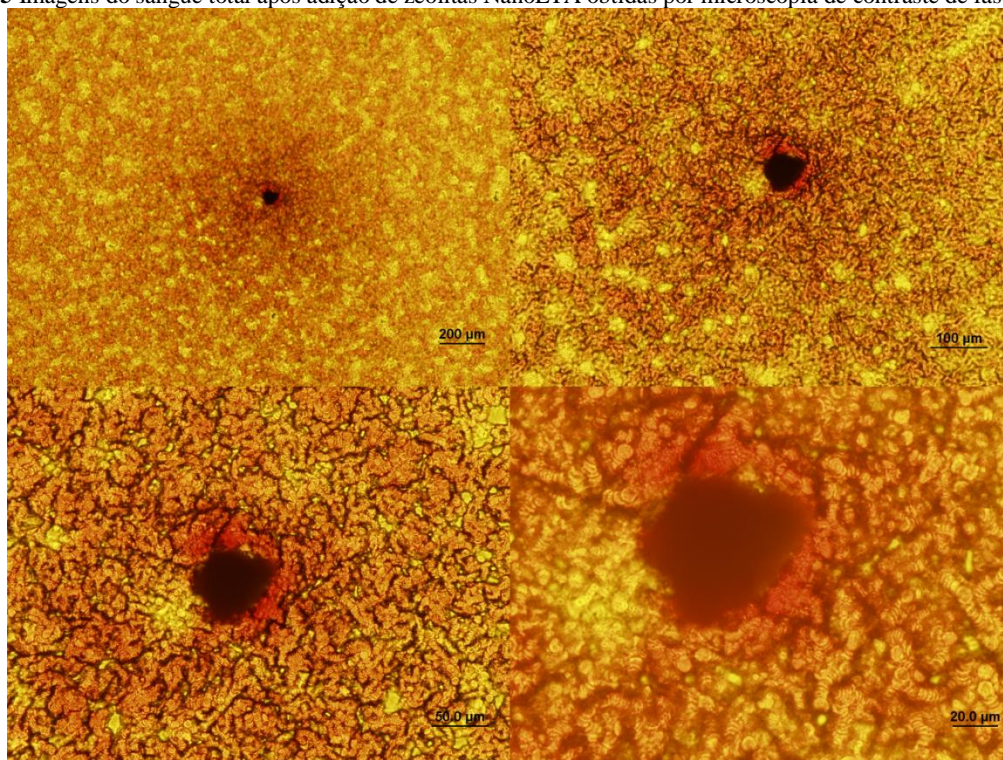


Figura 46 Imagens do sangue total após adição de zeólitas NanoMOR obtidas por microscopia de contraste de fase

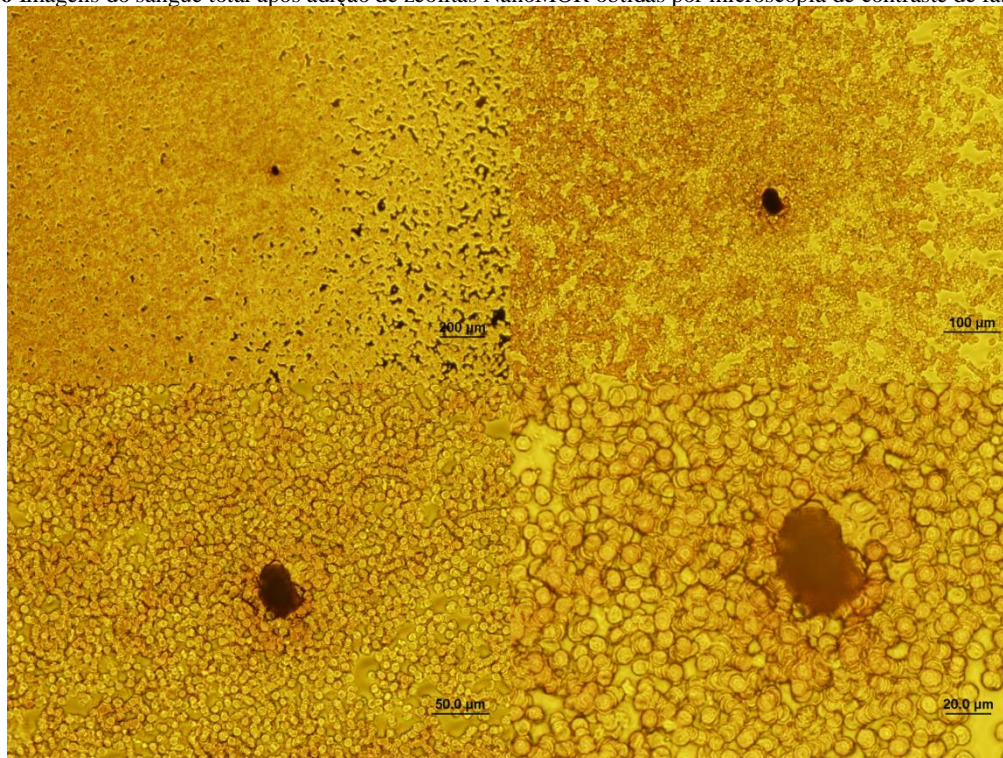


Figura 47 Imagens do sangue total após adição de zeólitas NanoTS1 obtidas por microscopia de contraste de fase

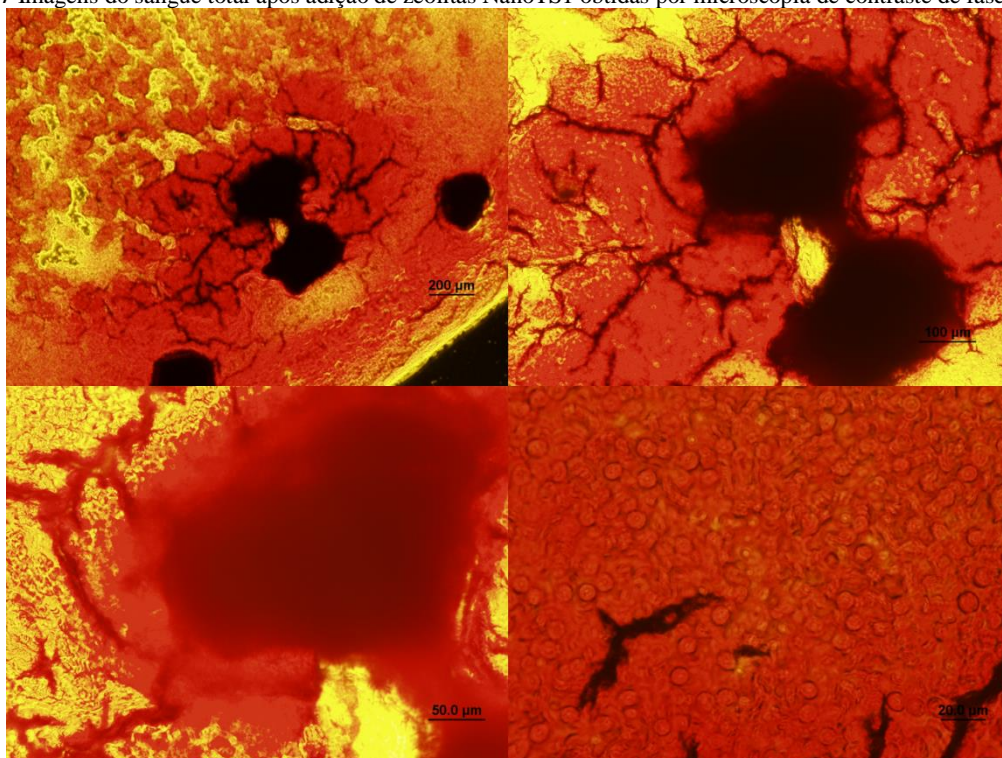


Figura 48 Imagens do sangue total após adição de zeólitas FAU_Ca obtidas por microscopia de contraste de fase

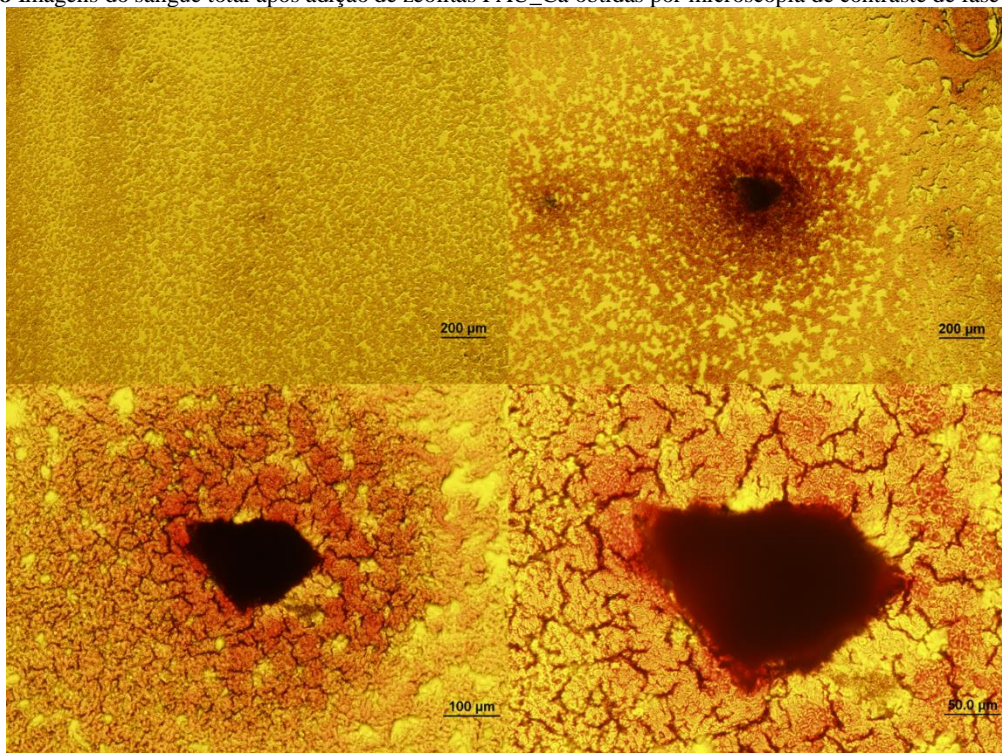
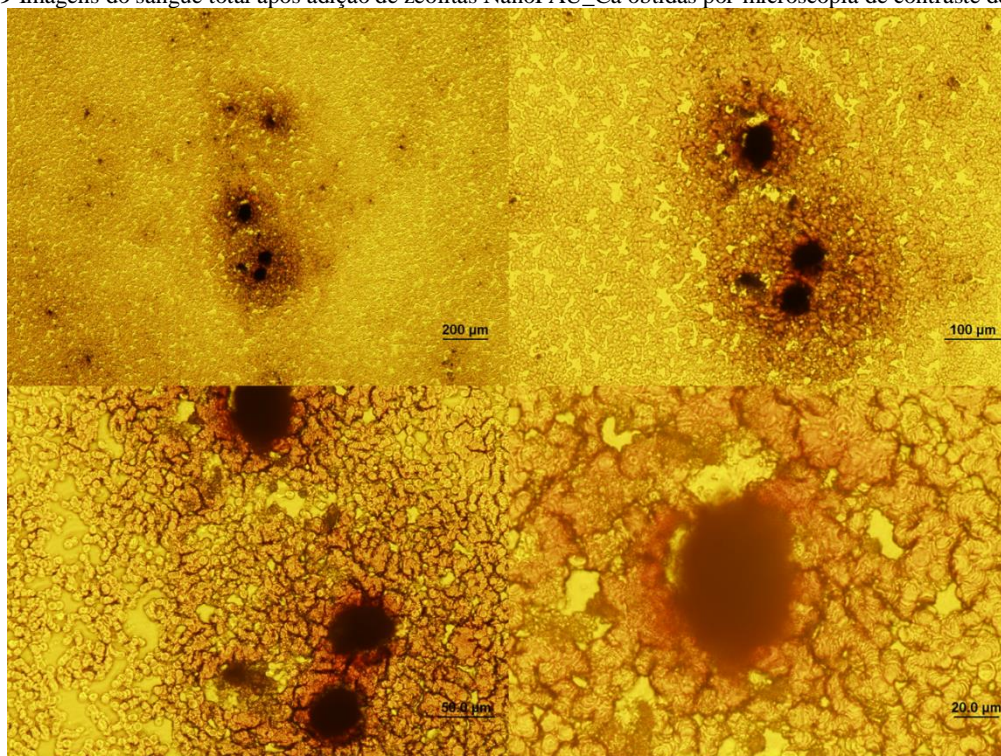


Figura 49 Imagens do sangue total após adição de zeólitas NanoFAU_Ca obtidas por microscopia de contraste de fase



5.5 Análise de EDS para quantificação da porcentagem em peso dos elementos químicos presentes nas zeólitas

A Espectrometria de Energia Dispersiva de Raios-X (EDS), uma técnica sensível de superfície foi utilizada para mensurar e comprovar a efetividade do processo de troca iônica. As zeólitas na escala micrométrica e nanométrica foram sintetizadas de acordo com procedimentos descritos na literatura. Em seguida, foi realizado o processo de troca iônica com todos os materiais utilizando as seguintes soluções: Cloreto de Cálcio, Cloreto de Bário, Cloreto de Magnésio e Nitrato de prata nas concentrações 0,5 mol. L⁻¹. Os experimentos de troca iônica foram adaptados do trabalho de Ostomel *et al.*², pois segundo estes autores o processo de troca iônica induzem a diminuição da liberação de calor do agente hemostático. Essa redução da taxa de calor é muito importante, pois é um efeito colateral bastante prejudicial constantemente relatado em agentes hemostáticos baseados em materiais zeolíticos.

Sabe-se que zeólitas são constituídas por unidades tetraédrica do tipo [SiO₄]⁻ ou [AlO₄]⁻ formando canais bem definidos e cavidades em nanoescalas que podem acomodar uma variedade de cátions metálicos, são estes íons e o sistema de canais e poros que são responsáveis por adsorver as moléculas de água do meio^{125; 142; 143}.

Da Figura 50 até a 59 pode ser observado os percentuais de átomos presente em concentração por peso (%) nos materiais sintetizados e dos seus derivados de troca iônica. É possível observar a presença dos seguintes elementos químicos na estrutura da zeólita: Alumínio, Silício e Oxigênio. Há também a presença do elemento sódio (cátion de compensação) na estrutura da zeólita indicando que os materiais foram preparados pelo método hidrotermal com base.

Sabe-se que cátions Na^+ não são fixos rigidamente à estrutura da zeólita hidratada e são facilmente trocados com outros cátions em soluções aquosas^{1; 144}. Todos os materiais sofreram o processo de troca iônica com os seguintes cátions: Ca^{+2} , Mg^{+2} , Ba^{+2} , Ag^+ . É possível observar que realmente ocorreu a troca de íons, uma vez que em todas as amostras houve uma diminuição da quantificação de íons Na^+ e um aumento dos outros cátions (ver Figura 50 até a 59). Na troca iônica com íons Ag^+ , pode-se observar que todos os íons Na^+ foram completamente substituídos por íons Ag^+ . De acordo com Sherry *et al.*¹⁴⁵ a alta seletiva de íons Ag^+ é devido a sua alta polarização e forte ligação por todos os tipos de sítios aniônicos. Da mesma forma, o íon bário também exibiu uma alta seletividade pelos sítios aniônicos da zeólita.

Figura 50 Quantificação em porcentagem em peso dos elementos constituintes da zeólita Faujasita na forma sódica e seus derivados de troca iônica por espectroscopia de energia dispersiva (EDS) para área analisada

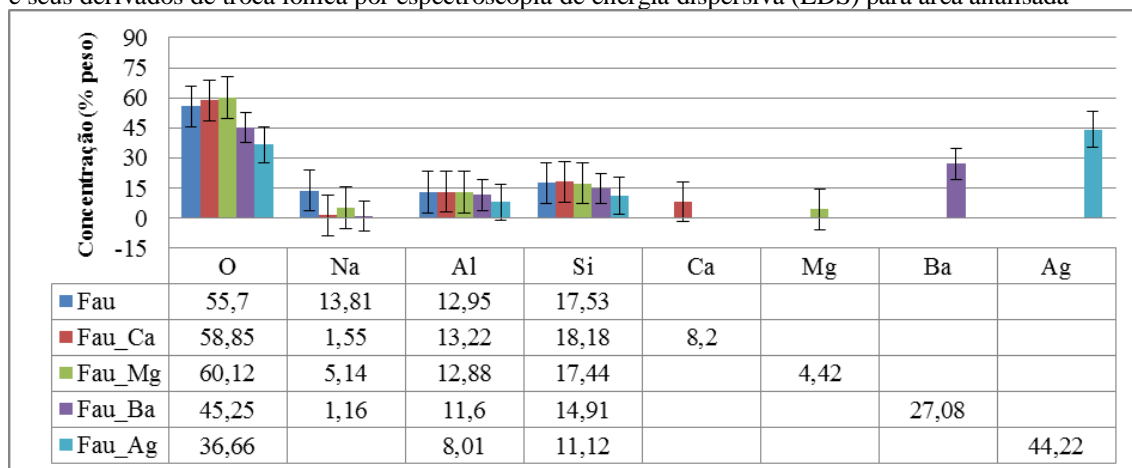


Figura 51 Quantificação em porcentagem em peso dos elementos constituintes da nanozeólita Faujasita na forma sódica e seus derivados de troca iônica por espectroscopia de energia dispersiva (EDS) para área analisada

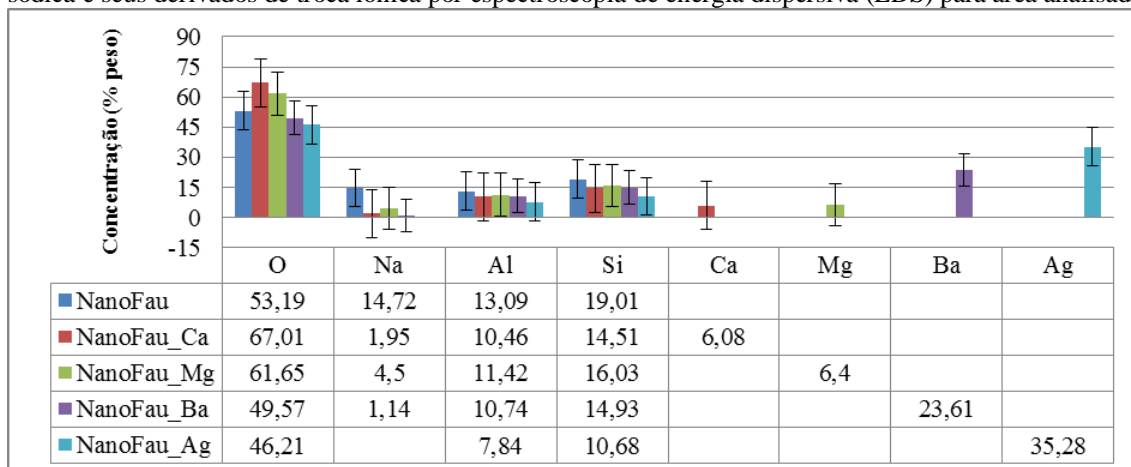


Figura 52 Quantificação em porcentagem em peso dos elementos constituintes da zeólita A (LTA) na forma sódica e seus derivados de troca iônica por espectroscopia de energia dispersiva (EDS) para área analisada

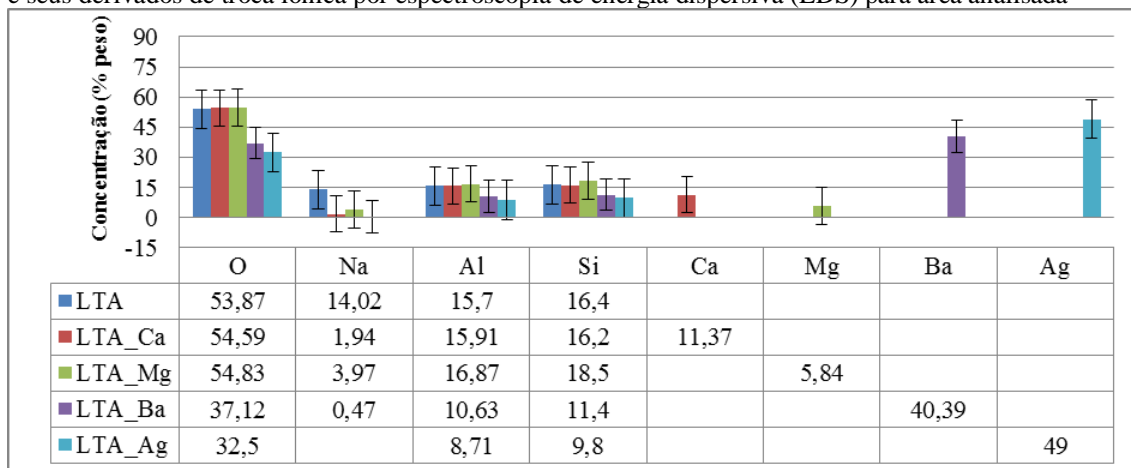


Figura 53 Quantificação em porcentagem em peso dos elementos constituintes da Nanozeólita A (LTA) na forma sódica e seus derivados de troca iônica por espectroscopia de energia dispersiva (EDS) para área analisada

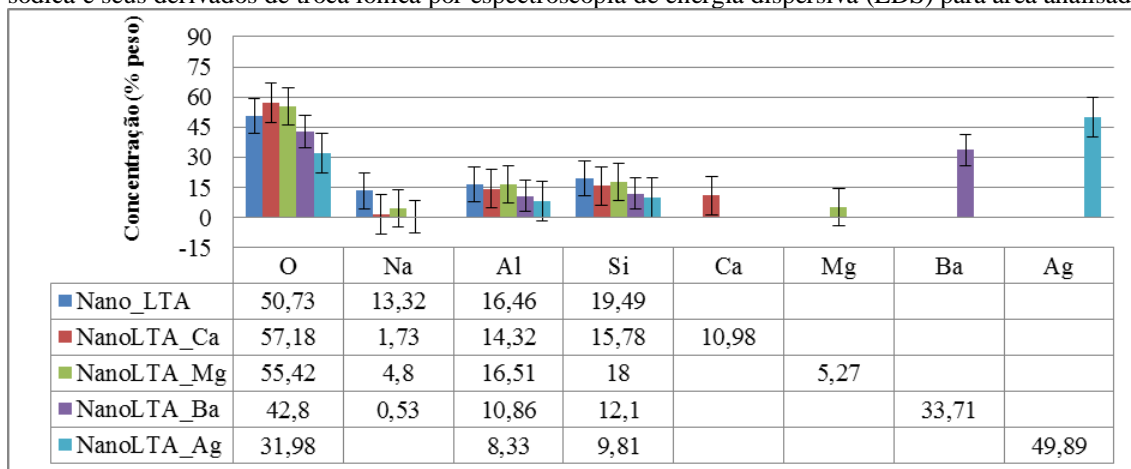


Figura 54 Quantificação em porcentagem em peso dos elementos constituintes da zeólita Mordenita na forma sódica e seus derivados de troca iônica por espectroscopia de energia dispersiva (EDS) para área analisada

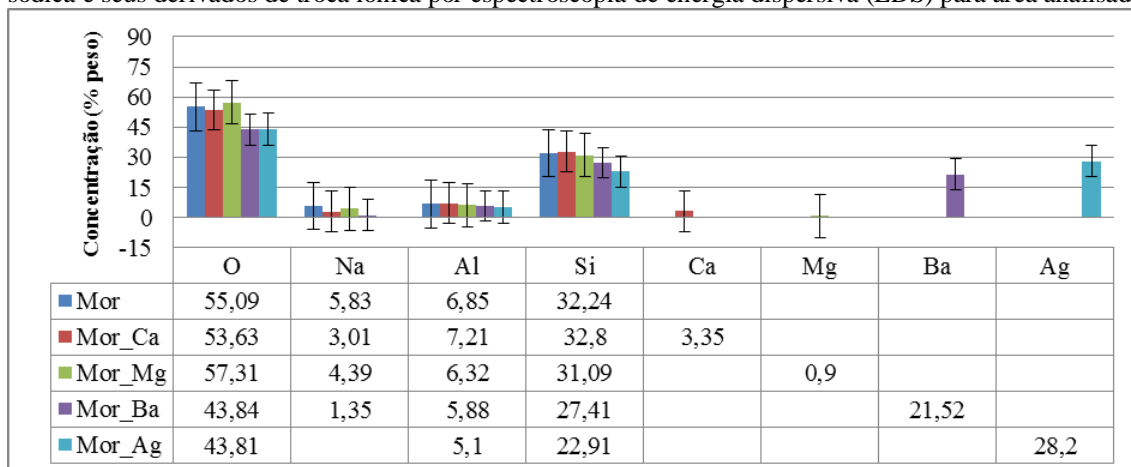


Figura 55 Quantificação em porcentagem em peso dos elementos constituintes da nanozeólita Mordenita na forma sódica e seus derivados de troca iônica por espectroscopia de energia dispersiva (EDS) para área analisada

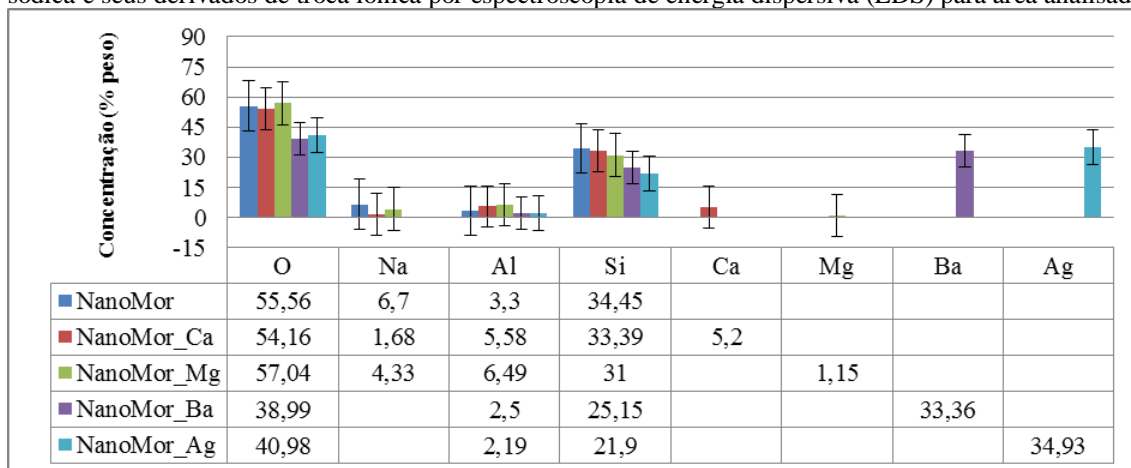
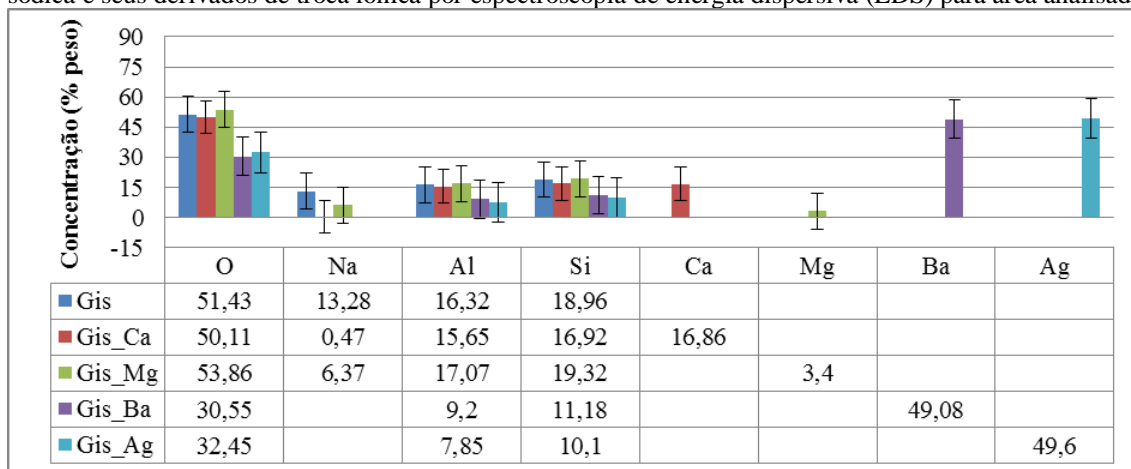
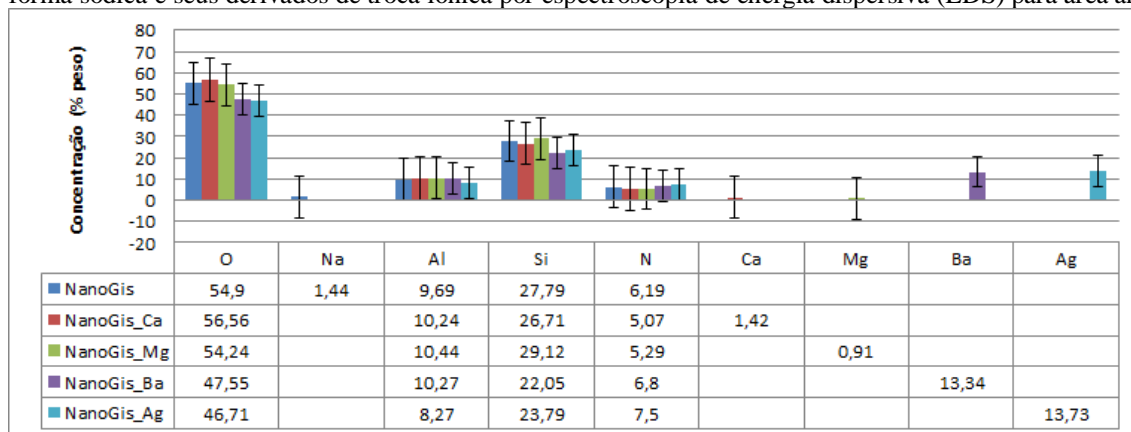


Figura 56 Quantificação em porcentagem em peso dos elementos constituintes da zeólita Gismondina na forma sódica e seus derivados de troca iônica por espectroscopia de energia dispersiva (EDS) para área analisada



Em relação à zeólita NanoGIS, é importante observar que além das espécies químicas comum em zeólitas (oxigênio, alumínio, silício e cátions de compensação), há a presença do elemento nitrogênio em uma quantidade considerável. Este elemento origina-se do template orgânico empregado nas sínteses como agentes direcionadores de estrutura. A remoção do template orgânico é realizada por calcinação, ou seja, por decomposição térmica, porém para esta nanozeólita não funcionou. Neste caso a estrutura cristalográfica da NanoGIS não suportou altas temperaturas (500-600°C) necessárias para a remoção do template orgânico e houve colapso da estrutura cristalográfica. Calcinações a temperaturas mais baixas não foram suficientes para a remoção completa do composto, o que afetou os procedimentos de troca iônica para essas amostras, pois a quantidade de cátions incorporados foi muito pequena, a ponto de não notar mudanças significativas na estrutura da nanozeólita gismondina (NanoGIS).

Figura 57 Quantificação em porcentagem em peso dos elementos constituintes da nanozeólita Gismondina na forma sódica e seus derivados de troca iônica por espectroscopia de energia dispersiva (EDS) para área analisada



O espectro de EDS para as zeólitas BEA, NanoBEA, TS1 e NanoTS1 estão de acordo com o que será abordado no RMN-MAS (ver adiante item 5.7). Para as zeólitas BEA e NanoBEA é possível observar que estes materiais possuem uma alta relação silício/alumínio, consequentemente encontra-se uma grande quantidade de silício, uma baixa quantidade de alumínio e praticamente nenhuma quantidade de cátions de compensação (Figura 58). O mesmo pode ser observado para as zeólitas TS-1 e NanoTS-1 (Figura 59), neste caso foi possível observar a predominância de espécies de silício e oxigênio sem a presença de alumínio e cátions de compensação. Essas duas classes de zeólitas (BEA e TS-1) não são ideais para serem submetidas ao processo de troca iônica, já que não possuem ou é quase inexistente a presença de alumínio de cargas negativas, consequentemente não possuem cátions de compensação para ser trocado por outro cátion.

Figura 58 Quantificação em porcentagem em peso dos elementos constituintes da zeólita BEA na escala nanométrica e micrométrica por espectroscopia de energia dispersiva (EDS) para área analisada

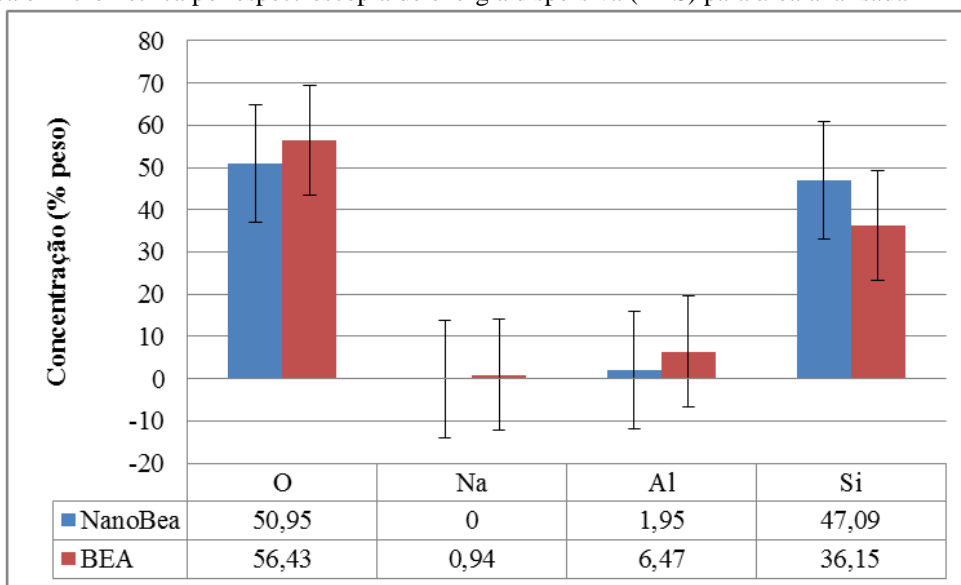
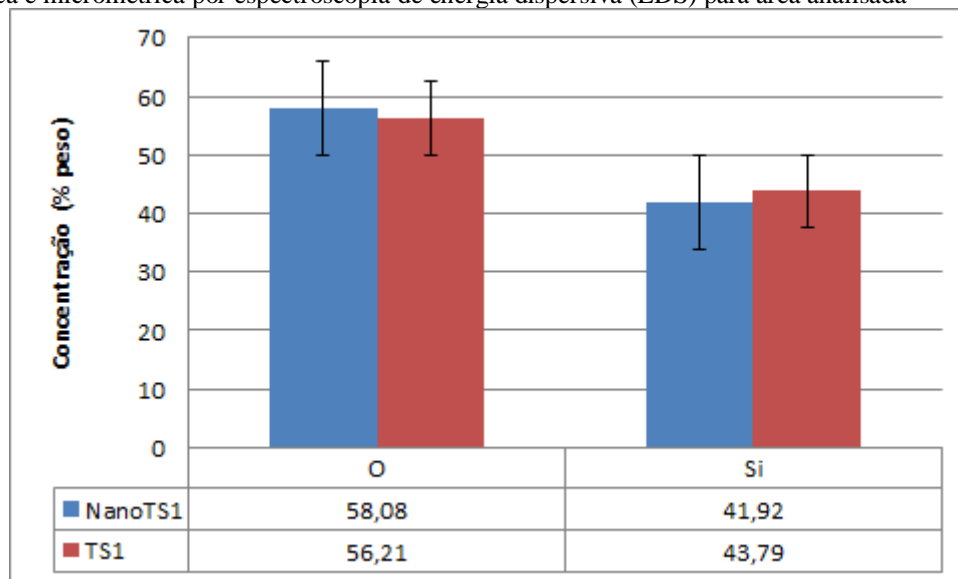


Figura 59 Quantificação em porcentagem em peso dos elementos constituintes da zeólita TS-1 na escala nanométrica e micrométrica por espectroscopia de energia dispersiva (EDS) para área analisada



5.6 Análise textural por adsorção de nitrogênio pelo método de BET para NanoFau, NanoFau_Ca e NanoFau_Ag

O entendimento do sistema de poros e canais de zeólitas é muito importante para compreender como funciona o mecanismo de ação de zeólitas através da adsorção de moléculas de água em seus canais e poros. Sendo assim, um estudo de análise superficial e porosidade foram realizados através da medida de adsorção de gás no material sólido. A isoterma obtida a

partir desta medida de adsorção fornece informações a respeito da área superficial, volume de poros, e distribuição do tamanho de poros ¹¹⁶. Para materiais microporosos, área de superfície e volume de microporos foi calculada utilizando o método de Saito-Foley (SF), enquanto que volume de mesoporos foi obtido utilizando o método de Barrett-Joyner-Halenda (BJH).

A forma das isotermas e os “loops” de histerese podem apresentar uma variedade de formatos e as formas das curvas podem ser relacionadas a estruturas de poros ¹¹⁴. As isotermas de adsorção e desorção das nanozeólitas preparadas (NanoFAU, NanoFAU_Ca e NanoFAU_Ag) são mostradas nas Figuras 60, 61 e 62, respectivamente. Pode-se observar que as isotermas são características do tipo III o que corrobora com os dados da literatura para zeólita faujasita na escala nanométrica ^{52; 146}. A falta de histerese para a NanoFau pode indicar que os íons sódio podem estar bloqueando a passagem do gás por entre os poros ¹⁴⁷, ou devido aos aglomerados formados pelos agregados de nanozeólitas. A isoterma de NanoFAU_Ca e NanoFAU_Ag (Figura 61 e Figura 62) indica um “loop” de histerese iniciando em p/po 0,42, indicando uma histerese do tipo H1, que é também típico de zeólitas, sendo que o “loop” mais pronunciado foi da amostra NanoFau_Ca.

Figura 60 Isotermas de adsorção e desorção da zeólita faujasita na escala nanométrica NanoFAU

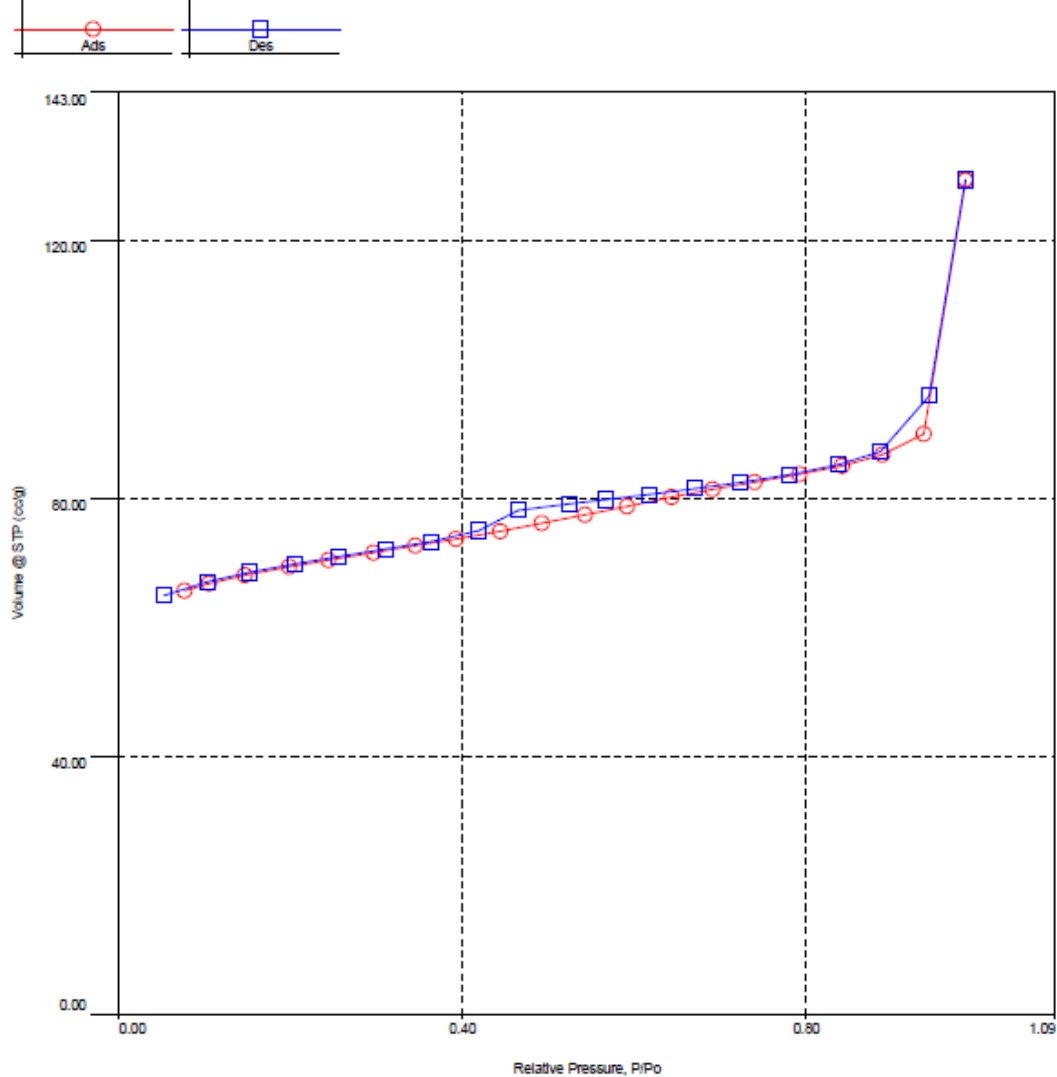


Figura 61 Isotermas de adsorção e desorção da zeólita faujasita na escala nanométrica trocada com íons cálcio NanoFAU_Ca

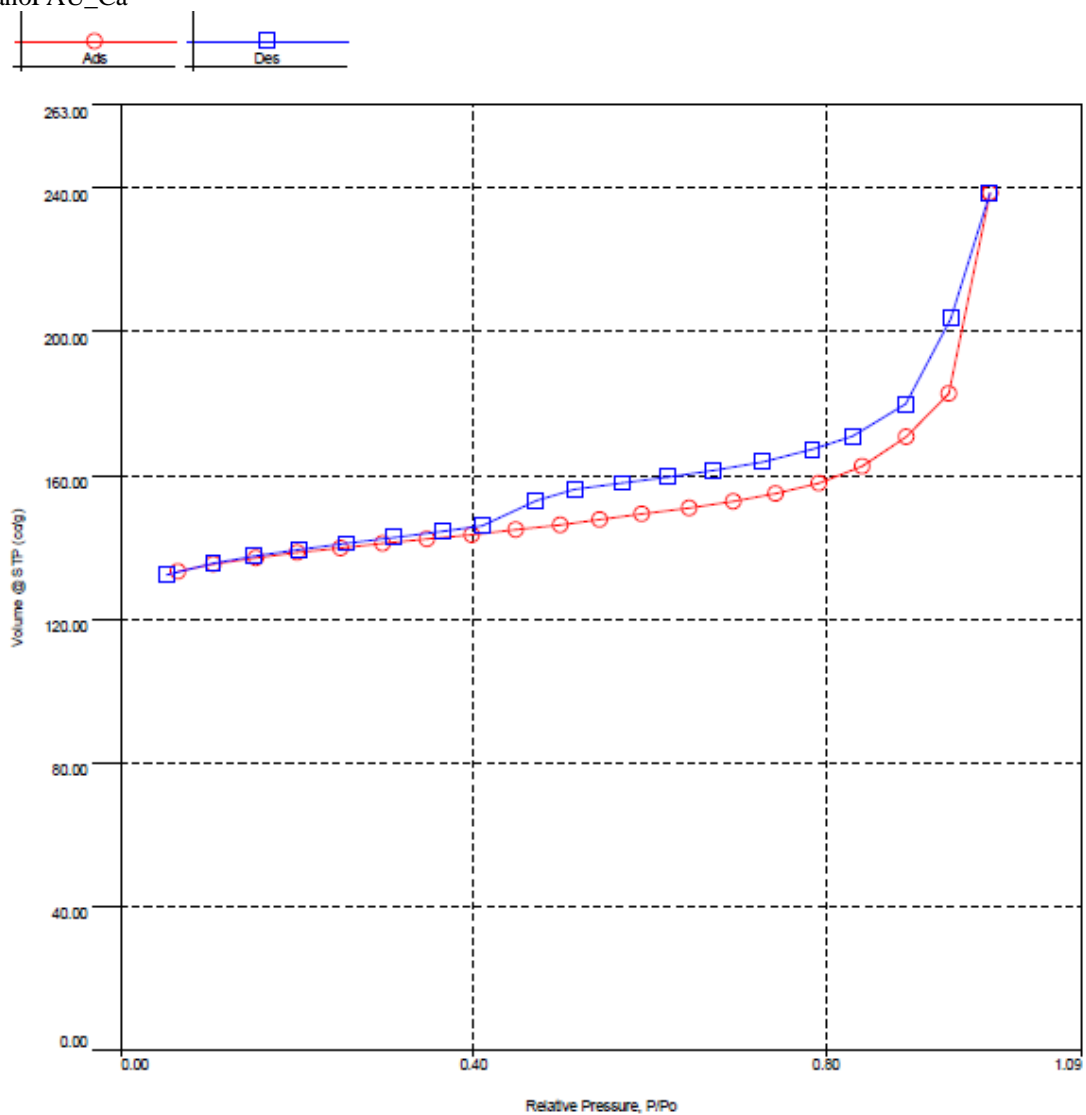
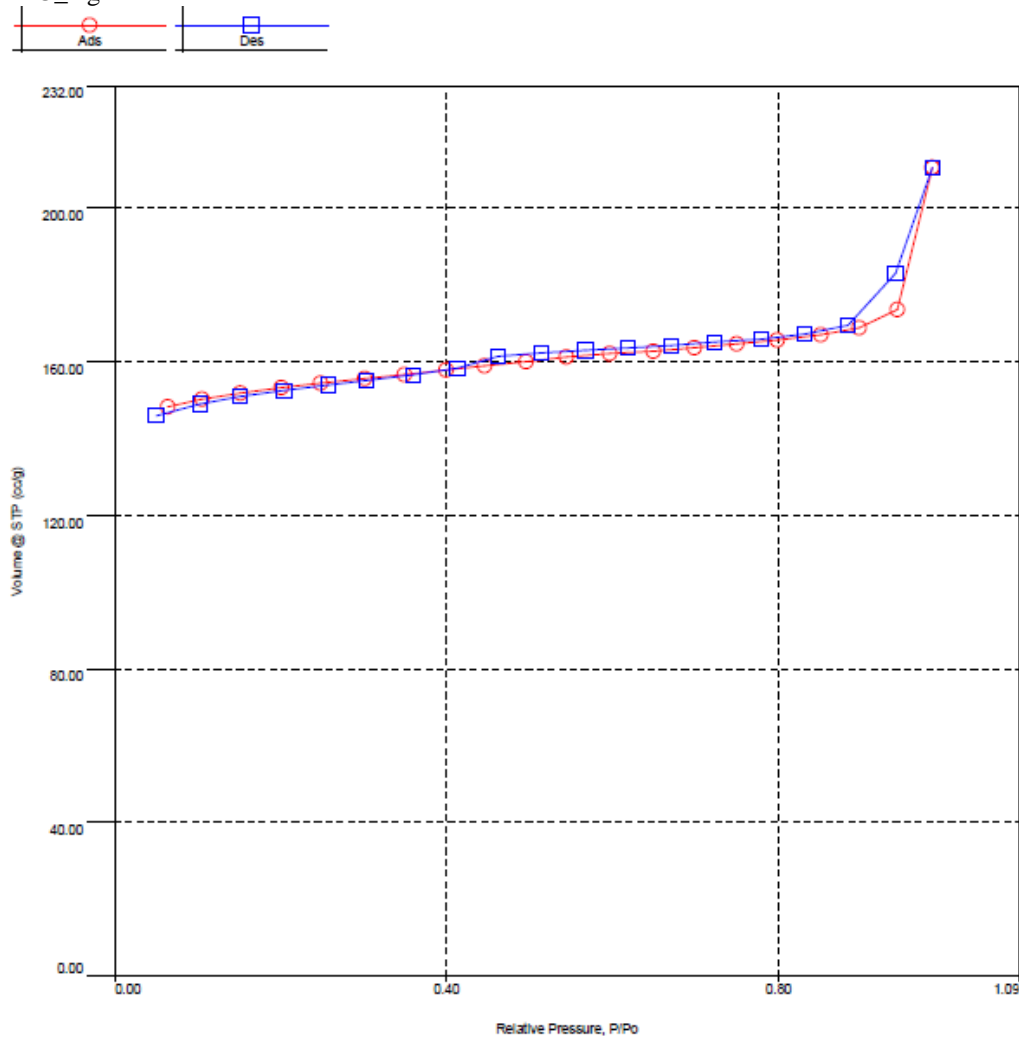


Figura 62 Isotermas de adsorção e desorção da zeólita faujasita na escala nanométrica trocada com íons prata NanoFAU_Ag



A partir destes resultados foram calculadas as áreas superficiais, os volumes e os raios dos poros empregando as equações de BET e os métodos de BJH e SF (Tabela 1).

Tabela 1 Dados obtidos a partir do experimento de adsorção/dessorção de N₂ das amostras NanoFAU, NanoFAU_Ca e NanoFAU_Ag

Material	Área superficial total (BET) (m ² /g)	Volume dos poros (cm ³ /g)		Raio dos poros (nm)	
		Mesoporos (BJH)	Microporos (SF)	Mesoporos (BJH)	Microporos (SF)
NanoFAU	212,697	0,101	0,09	1,77	0,226
NanoFAU_Ca	419,703	0,176	0,202	1,76	0,226
NanoFAU_Ag	460,660	0,0979	0,226	1,75	0,226

Pode-se observar na Tabela 1 que após o processo de troca iônica, houve um aumento na área superficial total, enquanto que a zeólita de NanoFau exibiu uma área superficial de 212,697 m²/g, as amostras NanoFAU_Ca e NanoFAU_Ag exibiram uma área de 419,703 e 460,660 m²/g, respectivamente. É possível que as aberturas dos poros parcialmente obstruídas por íons sódio foram liberadas, aumentando deste modo a área superficial.

Em relação ao volume de poros, pode-se observar que mesoporos exibiram um volume de poros de 0,101, 0,176 e 0,0979 cm³/g para as amostras de NanoFau, NanoFau_Ca e NanoFau_Ag, respectivamente. Entretanto para o volume de microporos, houve um aumento de volume das amostras de NanoFau_Ca (0,202 cm³/g) e NanoFau_Ag (0,226 cm³/g) em comparação com a amostra de NanoFau (0,09 cm³/g). No caso do raio de poros, após o processo de troca iônica, não houveram grandes modificações no tamanho do raio.

A distribuição de volume de poros observada a partir da análise BJH dos dados da isoterma de adsorção de N₂ são mostrados nas Figuras 63, 64 e 65, respectivamente. Os poros apresentaram uma ampla distribuição de tamanho, sendo que o volume total de poros deve-se principalmente a poros com aproximadamente de 20 - 50 nm¹¹⁴. Todavia, para todas as amostras analisadas o maior pico foi por volta de 1,7 nm de raio.

Figura 63 Curva de distribuição de tamanho de poros do material NanoFAU

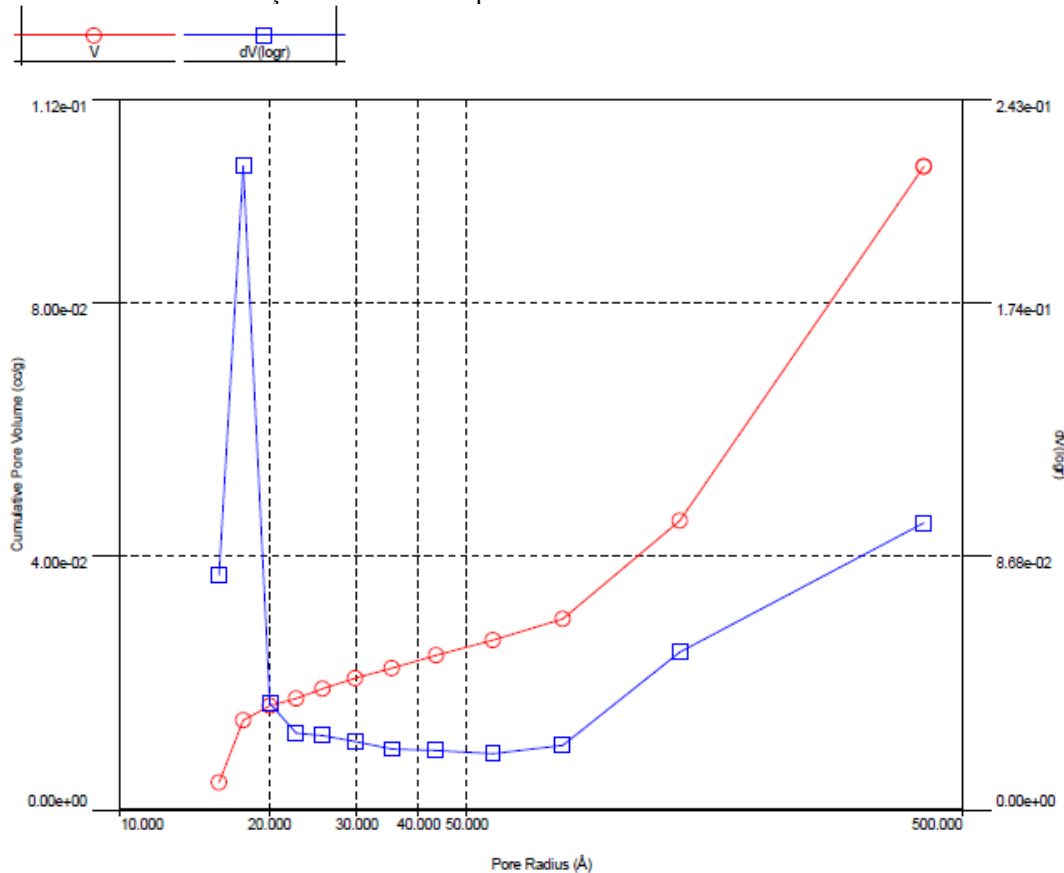


Figura 64 Curva de distribuição de tamanho de poros do material NanoFAU_Ca

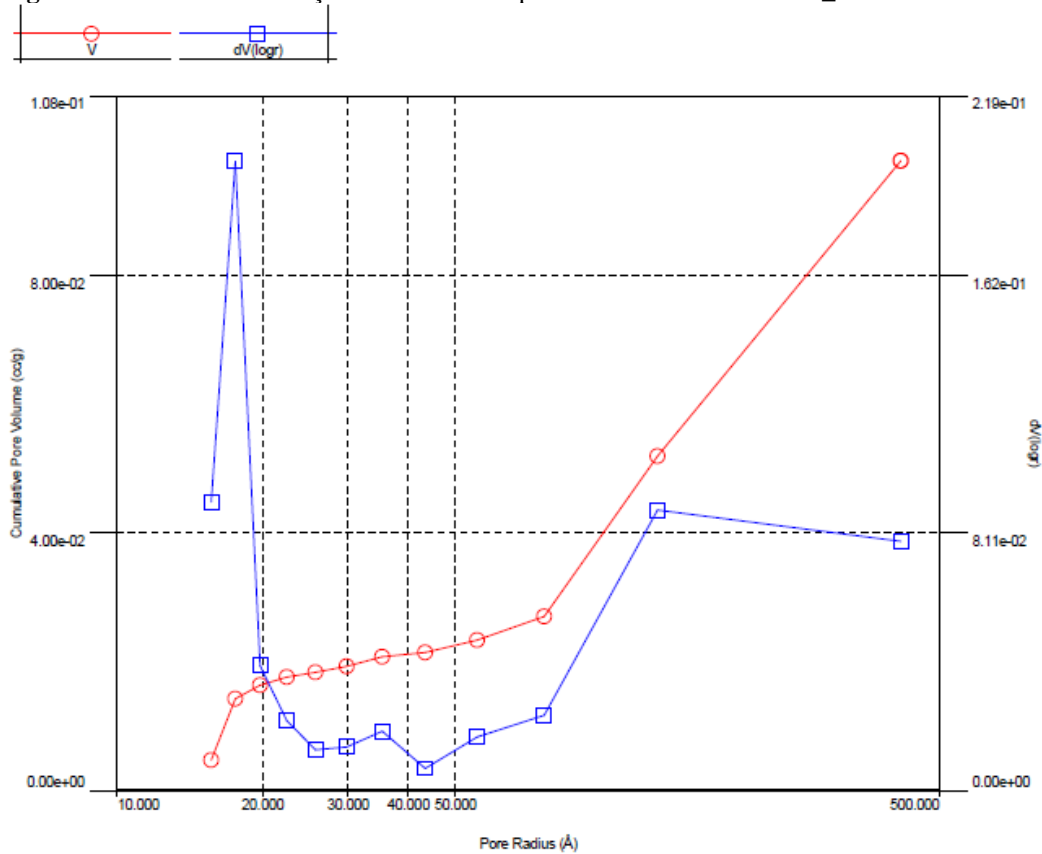
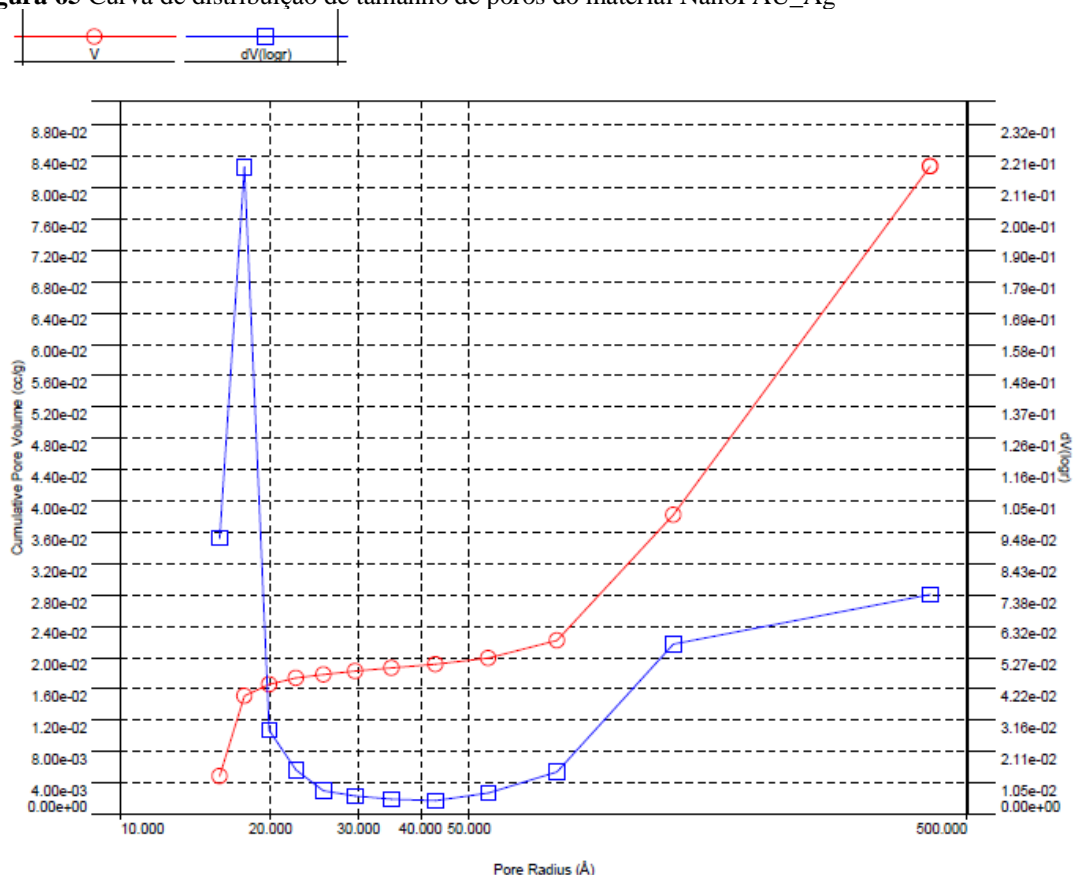


Figura 65 Curva de distribuição de tamanho de poros do material NanoFAU_Ag



5.7 Ressonância Magnética Nuclear do Estado Sólido (NMR-MAS) das amostras de zeólitas Faujasita, A (LTA), BEA, Gismondina e Titânio-silicato (TS1) na escala nanométrica e derivados de troca iônica da nanozeólita Faujasita

Os dados de difração de Raios-X (item 5.1) claramente indicaram que não houve grandes modificações da estrutura zeolítica quando as zeólitas em sua forma sódica foram trocadas com os cátions Ca^{2+} , Mg^{2+} , Ba^{2+} e Ag^+ . Todavia como dados de difração de Raios-X fornecem uma média da densidade eletrônica envolvendo a estrutura, detalhes como modificações estruturais próximos a vizinhança de cada tetraedro de silício não pode ser determinado com segurança usando-se apenas dados de difração de Raios-X. Sendo assim, para determinação da forma com que os átomos de silício, oxigênio e alumínio estão arranjados na estrutura cristalina, foi utilizado a técnica de Ressonância Magnética Nuclear do Estado Sólido.

A Figura 66 apresenta os espectros de RMN-MAS de ^{29}Si das amostras sintetizadas de NanoTS1, NanoGIS, NanoLTA, NanoBEA e NanoFAU antes do processo de troca iônica.

Para o espectro de ^{29}Si -RMN-MAS obtido para as amostras NanoTS1 é possível observar um sinal intenso em -109,5 ppm o que indica a predominância da espécie $\text{Si}(4\text{Si}, 0\text{Ti})$,

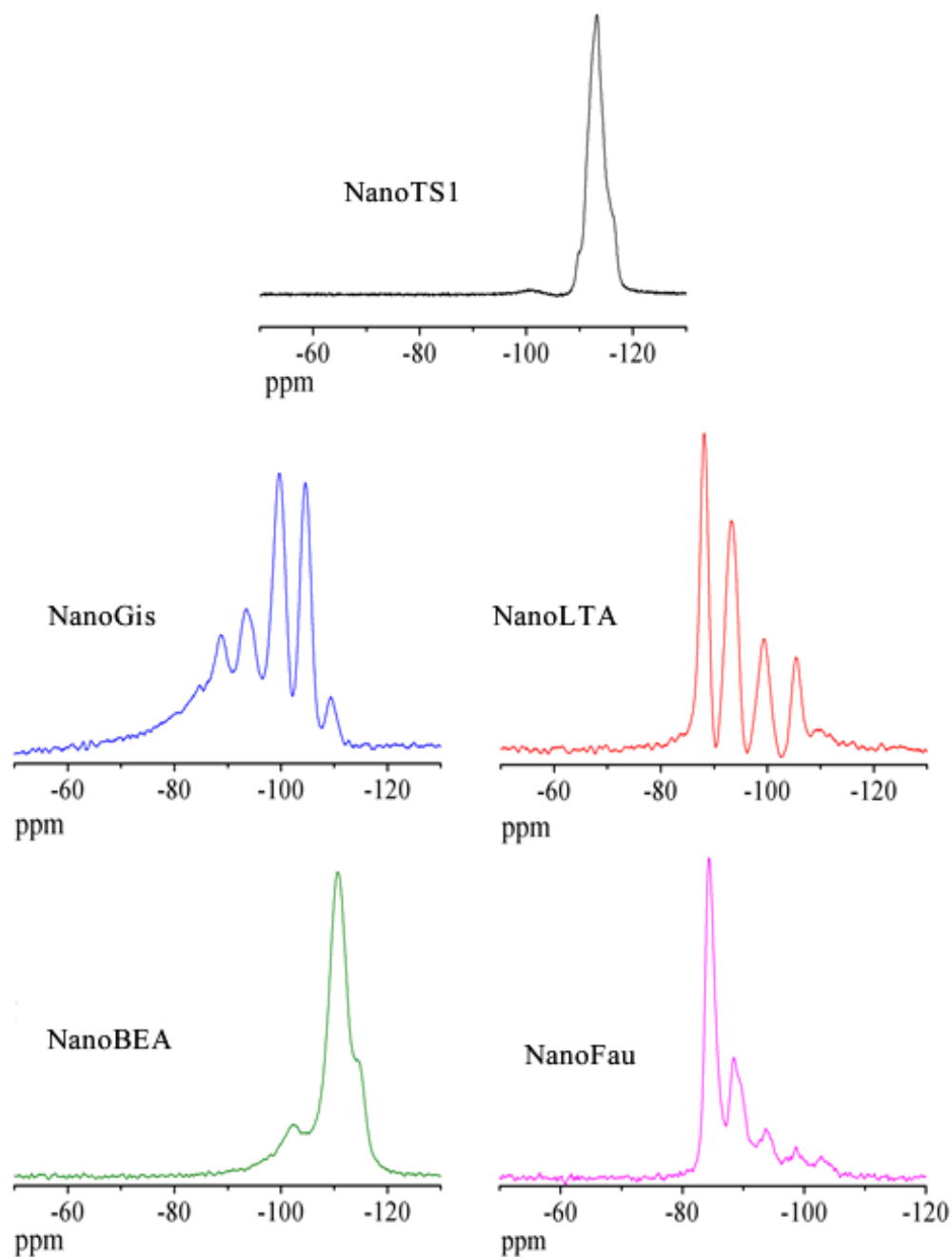
enquanto o sinal de baixa intensidade relacionado ao deslocamento químico observado na região de 101 a -103 ppm, pode ser interpretado como sendo um deslocamento químico relacionado à presença da espécie tetraédrica $\text{Ti}(\text{OSi})_4$ ^{148; 149} (Figura 66). Zhuang *et al.*¹⁴⁹ reportou a dificuldade de assinalar os deslocamentos químicos relacionados às espécies $\text{Ti}(\text{OSi})_4$ no espectro de ^{29}Si -RMN-MAS em amostra de zeólitas TS-1, e nesse caso o sinal de baixa intensidade observada na região de deslocamento químico na região de região -101 a -103 ppm, foi atribuído por eles como sinais ou evidências de defeitos na rede do tipo Si-O-H.

Embora haja na literatura relatos de que a partir da análise de ^{29}Si RMN-MAS de zeólitas substituídas com heteroátomos (como o alumínio e o boro), possa-se facilmente identificar sinais para os núcleos de Si com o seu heteroátomo vizinho mais próximo, no caso da TS-1 observa-se que não há nenhum sinal de deslocamento químico bem resolvido que possa ser assinalado sem ambiguidade aos átomos de silício ao seu vizinho de titânio mais próximo na estrutura de TS-1^{149; 150}.

Para o espectro de RMN-MAS de ^{29}Si da amostra da NanoBEA é possível observar dois sinais de deslocamento químico em cerca de -109,5 ppm e -101,5 ppm. O primeiro sinal Q4 refere-se a (4Si,0Al), enquanto o último refere-se ao Si (1OH, 3Si) ou Si (1Al, 3Si)^{130; 150; 151}. Esse é um perfil de nanozeólitas com elevada relação Si:Al, uma vez que o sinal intenso é referente à espécie Si(4Si, 0Al) e indica que, na estrutura do material, predominam ligações do tipo Si-O-Si¹⁴⁸ (Figura 66).

Em relação aos espectros de ^{29}Si -RMN-MAS das amostras NanoFAU, NanoLTA e NanoGIS (Figura 66), mostram a presença dos cinco sinais diferentes com mudanças químicas no intervalo de -89 a -110 ppm¹⁵². Esses deslocamentos químicos podem ser atribuídos aos diferentes ambientes de silício em Q3 ($\text{Si}(\text{OSi}/\text{Al})_3\text{OH}$) e Q4 ($\text{Si}(\text{OSi}/\text{Al})_4$)¹³⁰. Por exemplo, a nanozeólita NanoFAU apresenta cinco picos de Q4 semelhantes às outras nanozeólitas. Contudo, existem alguns “ombros” pronunciados em seu espectro de RMN-MAS ^{29}Si . Esses “ombros” fracos provavelmente são devidos à contribuição das espécies de Q3^{52; 153}.

Figura 66 Espectros de RMN-MAS de ^{29}Si das amostras das zeólitas em suas formas sódicas Titânio-silicato (NanoTS1), Gismondina (NanoGIS), A (NanoLTA), NanoBEA e Faujasita (NanoFAU) na escala nanométrica

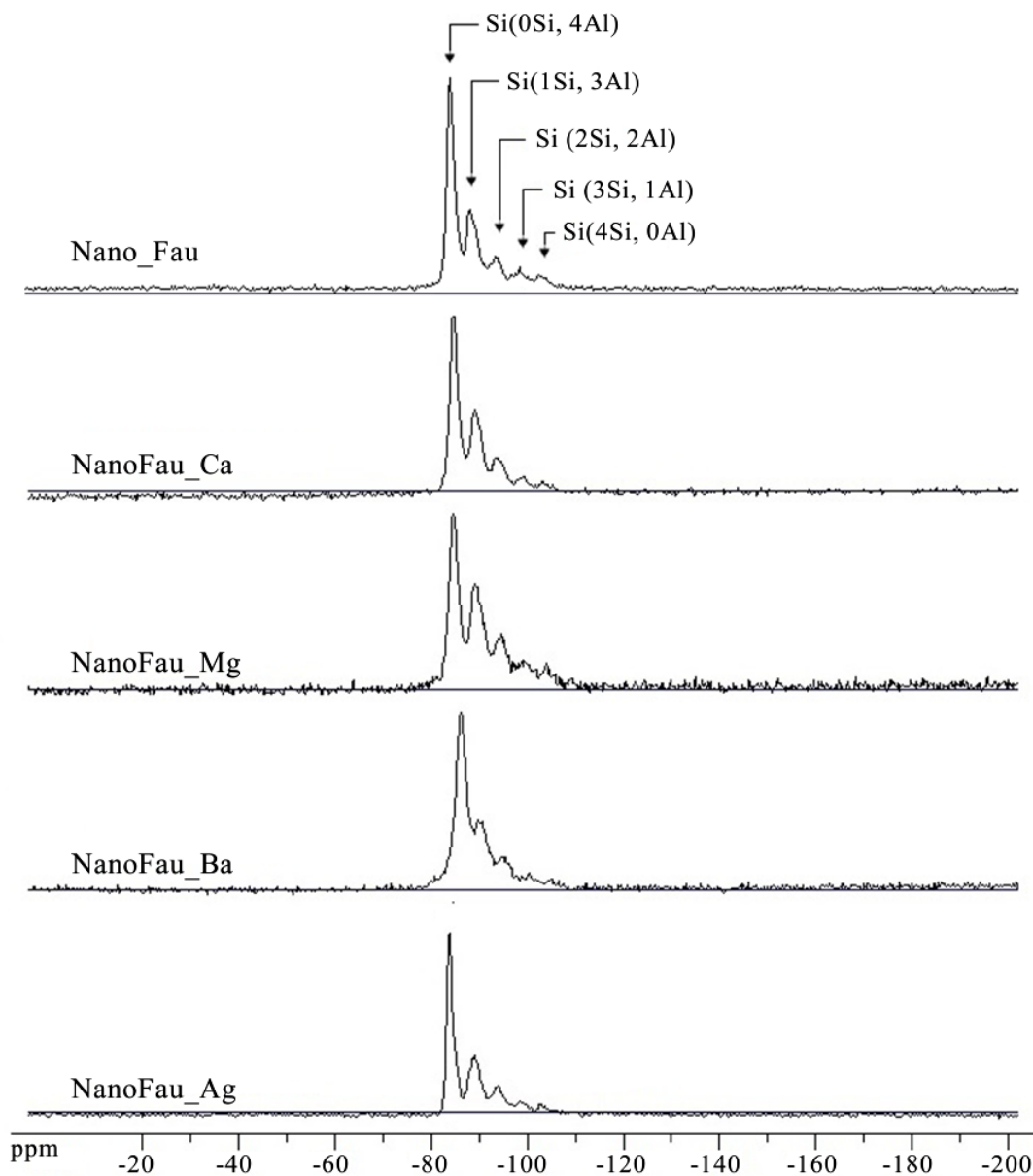


A Figura 67 apresenta os espectros de ^{29}Si -RMN-MAS das amostras de zeólitas faujasita em sua forma sódica e após sofrer processo de troca iônica com solução de íons Ca^{2+} , Mg^{2+} , Ag^{+} , Ba^{2+} . Para o espectro de ^{29}Si -RMN-MAS das amostras de NanoFAU é possível observar cinco deslocamentos químicos para o silício que estão de acordo com a literatura ¹⁵¹. O deslocamento químico em torno de -84 ppm observado na NanoFAU em sua forma sódica representa a ligação do átomo de silício com quatro átomos de alumínio intermediados por

átomos de oxigênio Si(0Si,4Al). À direita deste deslocamento, observa-se um sinal em torno de -89 ppm referente a ligação do átomo de silício com três átomos de alumínio e um átomo de silício, intermediados por oxigênios Si(1Si,3Al). Observa-se também um deslocamento em torno de -94 ppm que representa a ligação do átomo de silício com dois átomos de alumínio e dois átomos de silício, intermediados por oxigênios Si(2Si, 2Al). Um deslocamento em -99 ppm foi observado e é referente à ligação do átomo de silício com um átomo de alumínio e três átomos de silício, intermediados por oxigênios Si(3Si, 1Al). Por fim, o deslocamento químico em torno de -103 ppm representa a ligação do átomo de silício com quatro átomos de alumínio, intermediados por oxigênios Si(4Si, 0Al).

Em relação aos espectros de ^{29}Si -RMN-MAS das amostras da zeólita faujasita na escala nanométrica após o processo de troca iônica, pode-se notar que quando se compara um espectro com outro, não existem grandes diferenças entre os deslocamentos dos picos, exceto para a amostra NanoFAU_Ba. Neste espectro observam-se os seguintes deslocamentos químicos: -86 ppm, -90 ppm, -95 ppm, -100 ppm e -104 ppm, diferindo apenas 1 a 2 ppm das outras amostras. Essas diferenças são devido aos efeitos provocados pelos cátions ligados à estrutura e que devido as suas características modificam o ambiente químico do silício, contudo, essas alterações no ambiente químico não são suficientes para modificar a estrutura cristalina. Em relação aos espectros das amostras de NanoFAU_Ca, NanoFAU_Mg e NanoFAU_Ag não foi observado diferenças significativas nos deslocamentos dos picos.

Figura 67 Espectros de RMN-MAS de ^{29}Si das amostras de zeólitas faujasitas na escala nanométrica em sua forma sódica e trocadas com íons cálcio, magnésio, bário e prata.



5.8 Espectroscopia no infravermelho FT-IR com as amostras zeólitas

Foi realizada análise de FT-IR com as amostras de zeólitas na escala nanométrica e micrométrica em sua forma sódica e seus derivados de troca iônica.

Sabe-se que a estrutura da zeólita é composta de uma rede formada por tetraedros de TO_4 ($\text{T} = \text{Si}$ or Al). As vibrações dessas estruturas resultam na origem de bandas típicas em

regiões da zona média e distante do infravermelho. A distinção destas bandas é feita entre as vibrações internas e externas do tetraedro de TO_4 ¹⁵⁴.

De acordo com a literatura, é na região com comprimento de onda compreendido entre 1300 a 400 cm^{-1} que contém as vibrações fundamentais da estrutura tetraédrica (Si, Al) O_4 e que reflete a estrutura da zeólita. A primeira classe de vibração comum para todas as zeólitas é atribuída à vibração tetraédrica interna que inclui duas bandas mais intensas no espectro, uma mais forte entre 950-1250 cm^{-1} e uma de média intensidade em 420-500 cm^{-1} ³.

Para materiais zeolíticos as principais bandas encontradas no espectro de infravermelho são as seguintes: vibração tetraédrica interna localizada entre 1250 - 920 cm^{-1} , estiramento assimétrico 720 - 650 cm^{-1} , estiramento simétrico localizado entre 500 - 420 cm^{-1} , banda T-O; ligações externas: 650 - 500 cm^{-1} , vibrações duplas no anel 420-300 cm^{-1} , vibrações abertura dos poros; 1150 - 1050 cm^{-1} , estiramento assimétrico; 820 - 750 cm^{-1} estiramento simétrico ³; ¹⁵⁵. Estas bandas de absorção estão presentes tanto nas zeólitas na escala nanométrica quanto micrométrica. A Tabela 2 mostra as principais bandas de absorção das zeólitas sintetizadas em sua forma sódica na escala nanométrica e micrométrica juntamente com as bandas de absorção de acordo com a literatura (ver Figura 68 e 69).

Tabela 2 Principais bandas de absorção do FT-IR presente nas amostras sintetizadas de acordo com os dados presentes na literatura

Amostras Principais bandas presente em zeólitas (cm ⁻¹)	Vibração tetraédrica interna (1250 - 920 cm ⁻¹)	Estiramento assimétrico (720 - 650 cm ⁻¹)	Estiramento simétrico (500 - 420 cm ⁻¹)	Flexão H-OH (1630-1650 cm ⁻¹)	Alongamento de OH (3400-3500 cm ⁻¹)
BEA (escala micrométrica)	1085	780	460	1630	3490
NanoBEA (escala nanométrica)	1066	525	460, 525	1622	-
GIS (escala micrométrica)	1644, 990	611, 661, 740	454, 611	1644	3480
NanoGIS (escala nanométrica)	1060, 972	791	430, 541	1644	-
Zeólita A-LTA (escala micrométrica)	1006	665	468, 555	1650	3438
NanoLTA (escala nanométrica)	996	674	465, 557	1641	3351
TS1 (escala micrométrica)	1075	800	458	-	-
NanoTS1 (escala nanométrica)	1075	800	458	-	-
FAU (escala micrométrica)	970	750	458, 560	1650	3460
NanoFAU (escala nanométrica)	980	670, 750	460, 560	1635	3370
MOR (escala micrométrica)	1250	800, 720	620	1651	3521
NanoMOR (escala nanométrica)	1250	800, 720	620	1651	3521

Em relação ao espectro de FTIR da zeólita Beta (BEA) na escala micrométrica e nanométrica é possível observar bandas de absorção típicas na região espectral de 460, 573 e 780 cm⁻¹ (Figura 68); 460, 525 e 800 cm⁻¹ para a escala nanométrica (Figura 69) respectivamente, e bandas de absorção intensas e alargadas na faixa espectral de 1060-1090 cm⁻¹ que são atribuídas às vibrações assimétricas (T-O-T) para ambas as escalas ¹⁵⁶.

A zeólita gismondina (GIS) na escala micrométrica apresentou bandas de absorção em 454, 611, 661, 740, 990 e 1644 cm⁻¹, enquanto que a zeólita gismondina na escala nanométrica (NanoGIS), apresentou as frequências de absorção observadas em 430, 541, 791, 972, 1060 cm⁻¹, que estão de acordo com os principais dados espectrais reportados na literatura ¹⁵⁷ (Figura 68 e 69).

A zeólita A (LTA) apresentou as seguintes bandas de absorção: 468, 555, 665, 1006 cm^{-1} e estão de acordo com a literatura ¹⁵⁸ (Figura 68). O espectro FT-IR observado para a NanoLTA revela bandas de absorção na região espectral de 465, 557, 674 e 996 cm^{-1} estas bandas estão de acordo com os dados reportados na literatura ¹⁵⁹. As bandas de absorção em 665 cm^{-1} podem ser atribuídas às vibrações internas do tetraedro da NanoLTA (Si, Al)O₄, ao passo que a banda em 996 cm^{-1} é atribuída às vibrações assimétricas para tetraedro (Si, Al)O₄ da NanoLTA. No que diz respeito às bandas de absorção observadas na faixa espectral de 420-500 cm^{-1} e 950-1250 cm^{-1} , podem ser relacionadas com a vibração das ligações do grupo T-O-T (T= Al, Si) ¹⁶⁰.

Para a zeólita titânio-silicato (TS1) tanto na escala micrométrica e nanométrica foi possível observar bandas de absorção em 458, 800 e 1075 cm^{-1} que estão de acordo com Kusabiraki *et al.* ¹⁶¹ (ver Figura 68 e 69).

Para a zeólita faujasita (FAU) foi observado as seguintes bandas de absorção: 458, 560, 750 e 970 cm^{-1} (Figura 68) ¹⁶². No espectro da NanoFAU, pode-se visualizar as bandas em 460, 560, 670, 750 e 980 cm^{-1} , referentes a ligações T-O, anel duplo, estiramentos simétricos e assimétricos, respectivamente ¹⁶³ (Figura 69).

Em relação à zeólita mordenita (MOR) tanto na escala micrométrica quanto na nanométrica notam-se as vibrações típicas para este tipo de zeólita; alongamentos assimétricos externos em 1250 cm^{-1} , internos 1000 cm^{-1} , alongamento simétrico externos 800 cm^{-1} , internos 720 cm^{-1} , anel duplo 620 cm^{-1} , flexão T-O 420 cm^{-1} coerentes com a literatura ^{141;164} (ver Figura 68 e 69).

As bandas de absorção presente entre 1630-1650 cm^{-1} e por volta de 3400-3500 cm^{-1} referem-se à vibração de flexão H-OH e alongamento de OH referentes às moléculas de água que se encontram presentes nos canais das zeólitas, respectivamente, e que podem ser observados em todas as amostras, exceto para a TS1, NanoTS1, NanoBEA e NanoGIS ^{155; 165} (ver Figura 68 e 69).

Figura 68 Espectro de infravermelho FT-IR das diferentes zeólitas MOR, FAU, TS1, LTA, GIS, BEA

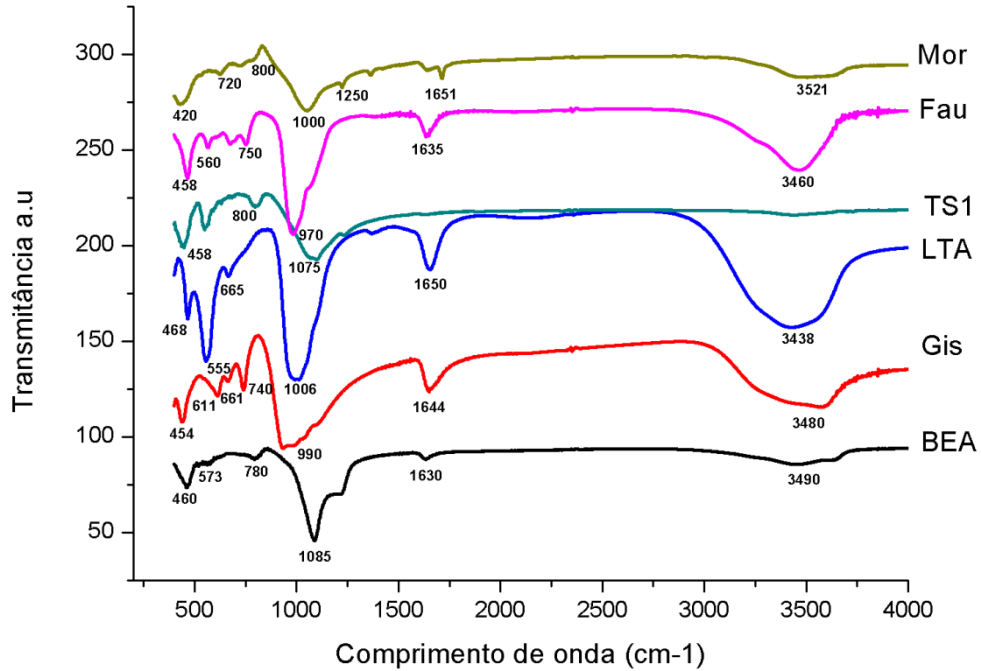
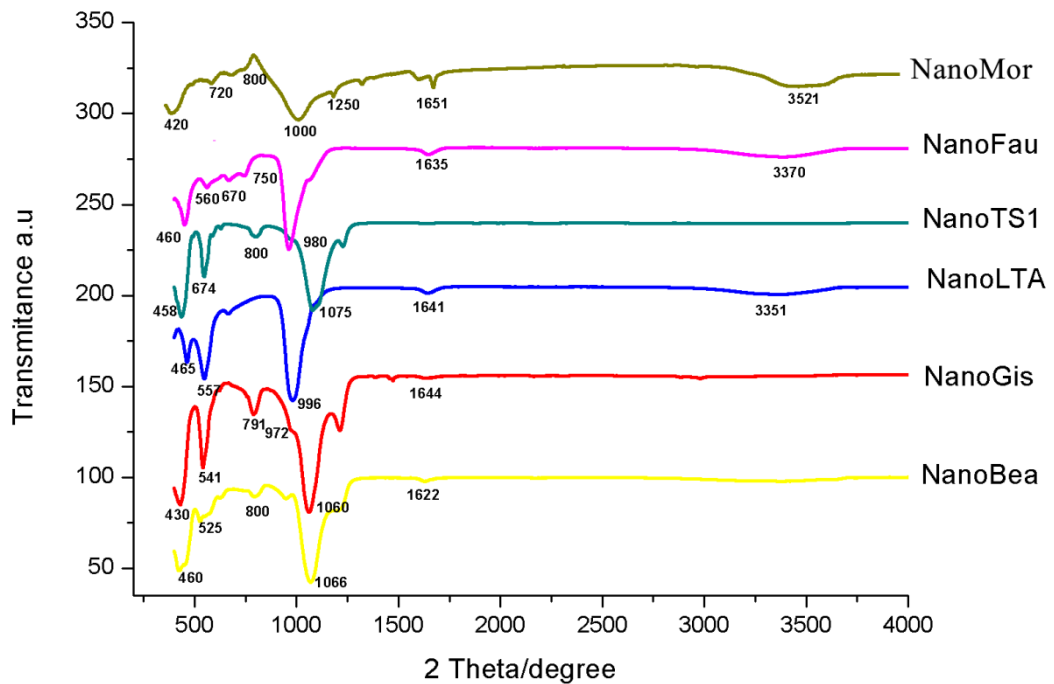


Figura 69 Espectro de infravermelho FT-IR das diferentes nanozeólitas NanoMOR, NanoFAU, NanoTS1, NanoLTA, NanoGIS e NanoBEA



As Figuras 70 e 71 referem-se aos espectros de absorção de FT-IR dos derivados de troca iônica das zeólitas faujasita na escala nanométrica e micrométrica, respectivamente.

Posições de bandas de absorção correspondente aos cátions presentes na estrutura da zeólita dependem da carga, massa e interação com a zeólita ¹⁵⁴. As bandas de absorção das zeólitas na região entre 250-50 cm^{-1} são atribuídas, principalmente, as vibrações de alongamento dos cátions presentes na estrutura da zeólita ^{154; 155}, porém no caso desta análise, a varredura iniciou-se a 400 cm^{-1} , não sendo possível visualizar diferenças significativas entres os espectros de absorção de 400-4000 cm^{-1} . Assim sendo, não foram observadas mudanças significativas no espectro de absorção, exceto uma diminuição da intensidade de algumas bandas como, por exemplo, nas zeólitas que sofreram troca iônica com prata: NanoFAU_Ag e FAU_Ag.

Figura 70 Espectro de infravermelho FT-IR das nanozeólitas faujasita em sua forma sódica (NanoFAU) e seus derivados de troca iônica NanoFAU_Ca; NanoFAU_Mg; NanoFAU_Ba e NanoFAU_Ag

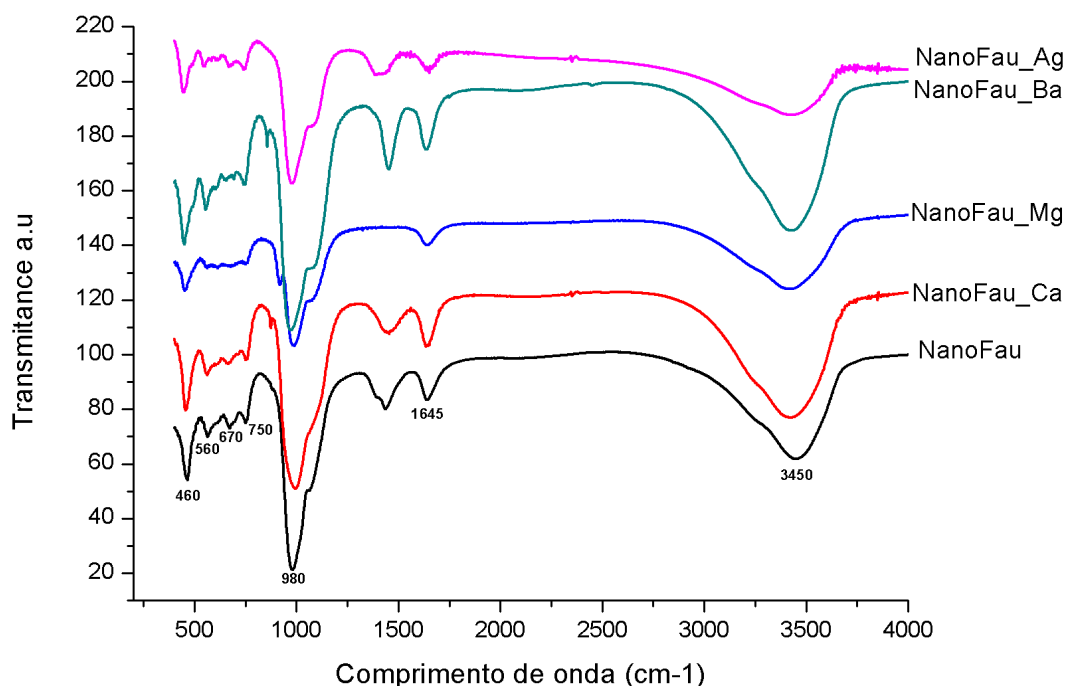
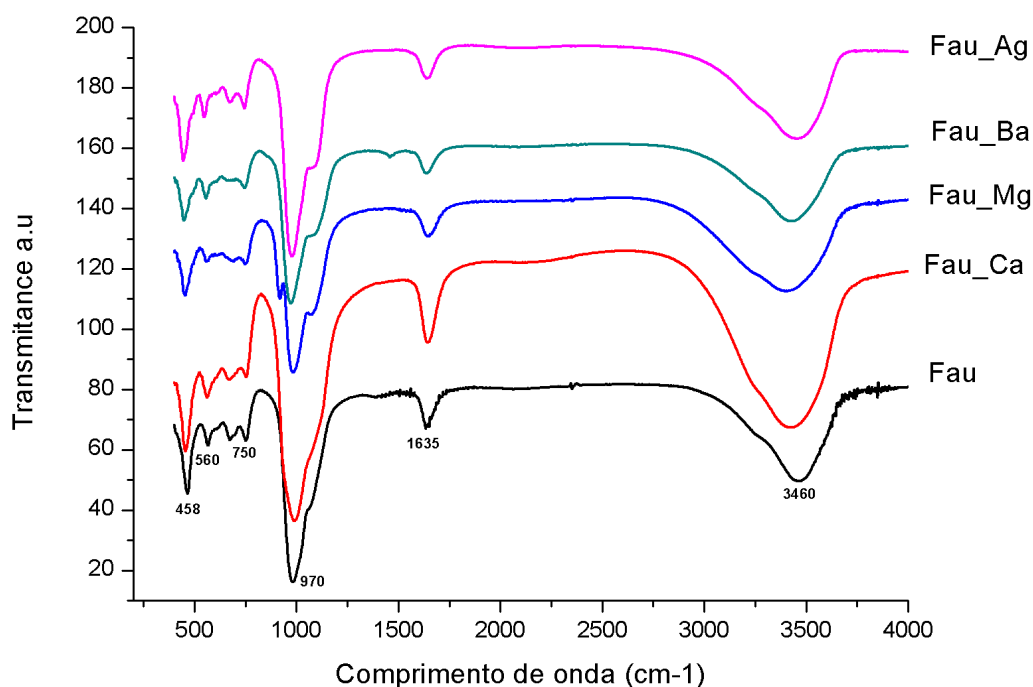


Figura 71 Espectro de infravermelho FT-IR das zeólitas faujasita em sua forma sódica (FAU) e seus derivados de troca iônica FAU_Ca; FAU_Mg; FAU_Ba e FAU_Ag



É importante notar o aparecimento de uma banda de absorção na faixa de 1400 – 1490 cm⁻¹ nas amostras de zeólitas faujasitas na escala nanométrica (NanoFAU forma sódica e seus derivados de troca iônica) que não estão presente na zeólita faujasita na escala micrométrica (FAU forma sódica e seus derivados de troca iônica). Banda semelhante foi encontrada no trabalho de Azizi *et al.*¹⁶⁶ em zeólitas faujasitas em escala nanométrica (NanoX), porém a mesma não foi caracterizada no trabalho de Azizi. O aparecimento desta banda pode estar associado ao aumento de grupos silanóis e aluminóis devido ao aumento da superfície de contato quando o material passa da escala micrométrica para nanométrica (ver Figura 70 e 71).

5.9 Determinação do ponto isoelétrico e medidas de mobilidade eletroforética (Potencial Zeta)

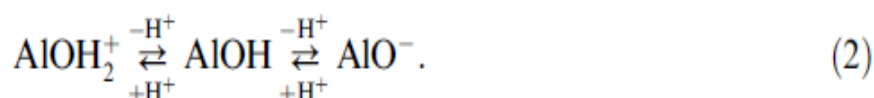
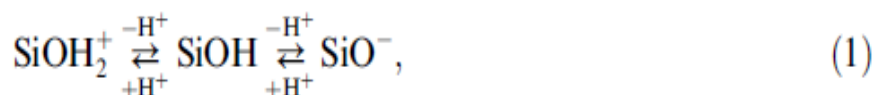
A densidade de cargas superficiais de um óxido metálico pode ser um fator determinante na adesão seletiva de moléculas de cargas opostas de meios biológicos (células e proteínas) quando em contato com o sangue. As cargas da superfície dos materiais são dependentes do pH, e, para cada um, existe um valor de pH acima do qual o material é carregado negativamente e abaixo do qual o material é carregado positivamente. O pH no qual o total de cargas superficiais negativas e positivas são iguais a zero é chamado de ponto isoelétrico. O ponto isoelétrico de um óxido metálico pode ser considerado um parâmetro base que afeta fortemente a resposta biológica do sangue durante as reações de ativação de contato da cascata de coagulação ¹⁰³.

Ostomel *et al.* ¹⁰³ verificaram que o sinal e a amplitude de densidade de cargas superficiais de óxidos metálicos em suspensões aquosas podem ser quantitativamente relacionado pelo ponto isoelétrico em relação ao pH do sangue. O ponto isoelétrico de um óxido pode ser determinado utilizando-se medições de potencial zeta na presença de concentrações de íons cálcio semelhante aos níveis séricos e podem ser utilizados para prever a sua atividade hemostática *in vitro*. Sendo assim, este estudo de determinação do ponto isoelétrico foi realizado com as zeólitas sintetizadas de acordo com procedimentos experimentais descrito no item 4.4.9.

As Figuras 72 e 73 mostram os pontos isoelétricos medidos para as zeólitas sintetizadas na escala micrométrica e nanométrica, respectivamente, em solução de CaCl₂ que mimetiza as concentrações de cálcio do sangue. As zeólitas na escala micrométrica e nanométrica apresentaram os pontos isoelétricos abaixo do pH do sangue, e por esta razão, estes materiais são considerados pro-coagulantes. No caso das zeólitas na escala micrométrica (Figura 72), observou-se nas regiões entre 2,5 < pH < 12,5, que as superfícies das zeólitas permaneceram carregadas negativamente e não houve ponto isoelétrico nesta faixa de pH. O mesmo observou-se para as zeólitas na escala nanométrica (Figura 73), em que entre as regiões de 3,5 < pH < 12,5, a superfície das zeólitas permaneceram carregadas negativamente e não ocorreram determinação do ponto isoelétrico. Os pontos isoelétricos para os materiais analisados foram observados entre 1 < pH < 2,5 (Figura 72 e Tabela 3) para as zeólitas na escala micrométrica e entre 1 < pH < 3,5 (Figura 73 e Tabela 4) para as zeólitas na escala nanométrica.

A carga de superfície das zeólitas é o resultado da protonação ou dissociação dos grupos hidroxilas, de modo a que o pH controla a carga de superfície da partícula e, portanto, o potencial zeta, através do seguinte mecanismos ¹⁶⁷:

Esquema 1 Esquema de protonação ou dissociação dos grupos hidroxilas da superfície das zeólitas ¹⁶⁷



O potencial zeta de zeólitas não depende apenas do pH, mas também da força iônica da suspensão, e do teor de alumínio presente na zeólita. O tipo de estrutura da zeólita é definido pelo número de grupos silanóis e aluminóis existentes nas superfícies cristalinas. Esses grupamentos podem ser facilmente desprotonados para a forma (SiO^- e AlO^-) em um intervalo amplo de pH, fazendo com que a zeólita fique com carga negativa ^{167; 168}. Conforme há a diminuição do pH, a protonação faz com que as cargas superficiais dos materiais tendem a ficar positiva alcançando seu ponto isoelétrico.

Os valores de pH do ponto isoelétrico para as zeólitas tanto na escala micrométrica quanto para a escala nanométrica, podem ser observados na Tabela 3 e Tabela 4, respectivamente. Observa-se que quando a zeólita passa da escala micrométrica para a nanométrica, há um aumento da superfície de contato do material, conseqüentemente há um aumento no número de grupos aluminóis e silanóis de superfície, com isso deslocando o ponto isoelétrico para valores de pH mais baixos. Este comportamento pode ser observado para as zeólitas gismondina, mordenita e TS1. A zeólita BEA exibiu o mesmo valor de pH de ponto isoelétrico nas duas escalas, diferentemente das zeólitas LTA e FAU que apresentaram um deslocamento do ponto isoelétrico para valores de pH maiores do que foi exibido para a escala micrométrica.

Figura 72 Potencial zeta das zeólitas micrométricas em sua forma sódica: faujasita, gismondina, zeólita A (LTA), mordenita, titânio-silicato (TS1) e beta (BEA) em função do pH em solução de CaCl₂ juntamente com seus respectivos pontos isoelétricos

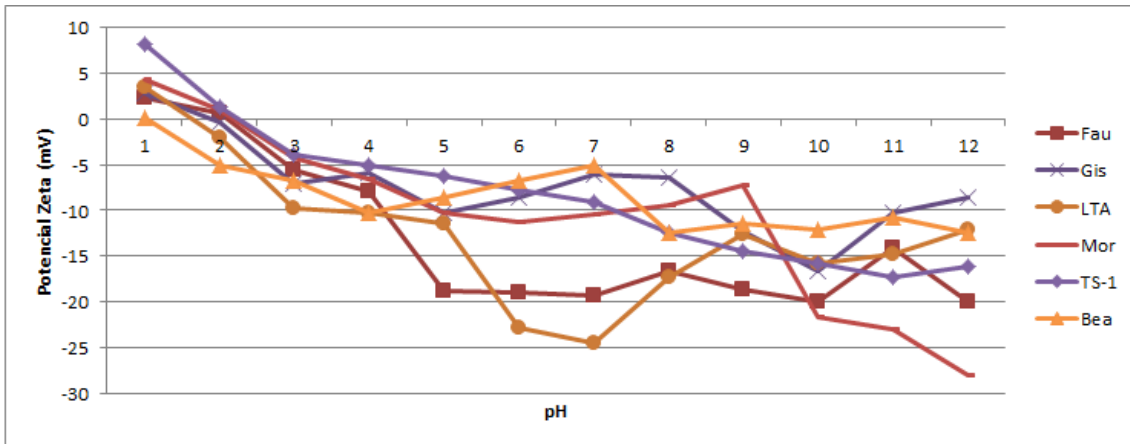


Tabela 3 pH do ponto isoelétrico das zeólitas na escala micrométrica

Zeólita	pH do ponto isoelétrico
BEA	1,0
A (LTA)	1,3
Gismondina (GIS)	2,0
Faujasita (FAU)	2,0
Mordenita (MOR)	2,2
Titânio – Silicato (TS-1)	2,4

Figura 73 Potencial zeta das nanozeólitas em sua forma sódica: faujasita (NanoFAU), gismondina (NanoGIS), zeólita A (NanoLTA), mordenita (NanoMOR), titânio-silicato (NanoTS1) e NanoBEA em função do pH em solução de CaCl₂ juntamente com seus respectivos pontos isoelétricos

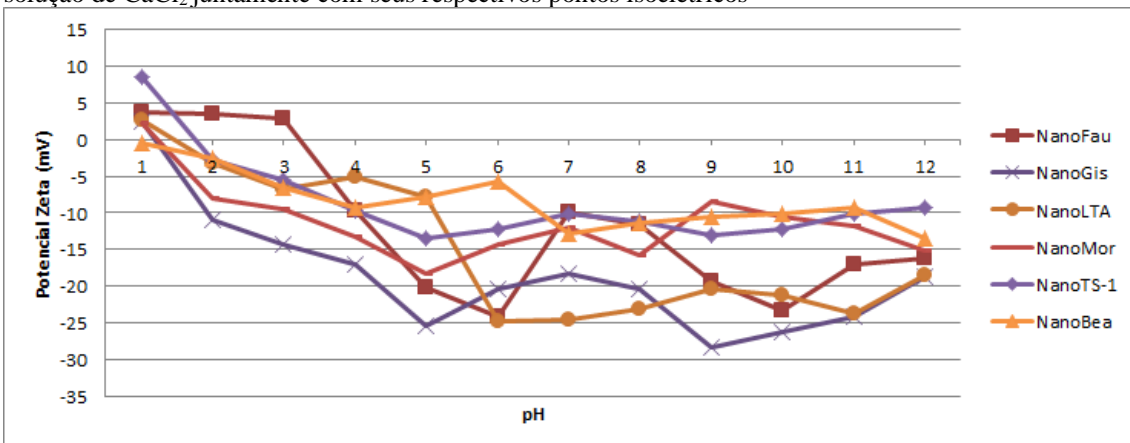
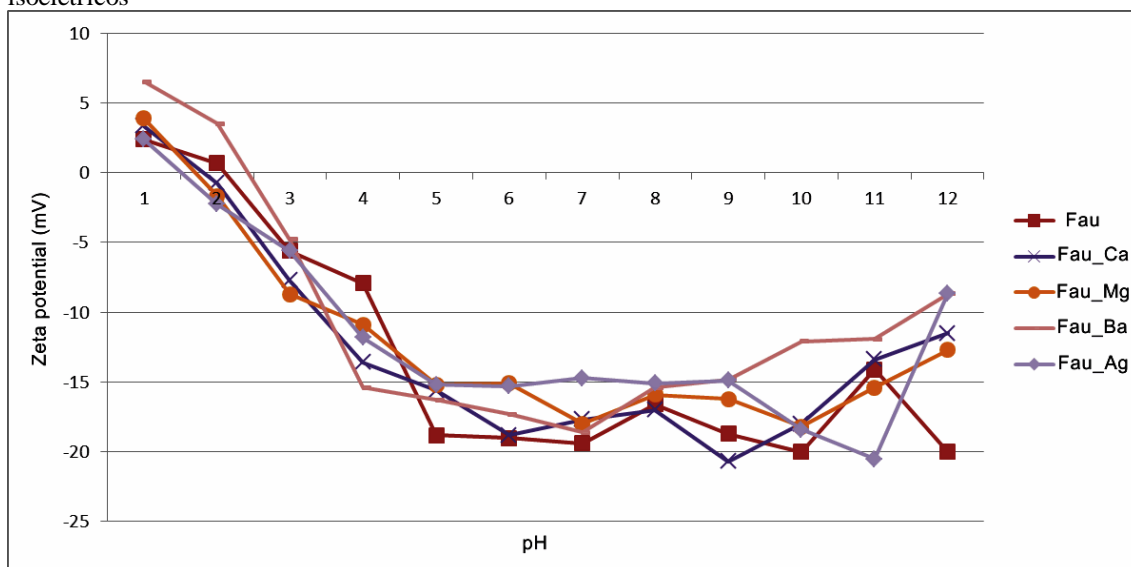


Tabela 4 pH do ponto isoelétrico das zeólitas na escala nanométrica

Zeólita	pH do ponto isoelétrico
NanoBEA	1,0
Gismondina (NanoGIS)	1,2
Mordenita (NanoMOR)	1,2
A (NanoLTA)	1,5
Titânio – Silicato (NanoTS-1)	1,8
Faujasita (NanoFAU)	3,2

Na Figura 74 é possível observar as medidas de potencial zeta da zeólita Faujasita na escala micrométrica em sua forma sódica e seus derivados de troca iônica em função do pH com seus respectivos pontos isoelétricos. Foi observado que após o processo de troca iônica houve uma diminuição dos valores de pH do ponto isoelétrico para as amostras FAU_Ag (p.i 1,5), FAU_Mg (p.i 1,6), FAU_Ca (p.i 1,9), exceto para a amostra FAU_Ba (p.i 2,5) que apresentou um valor de ponto isoelétrico acima do ponto isoelétrico da amostra na forma sódica de FAU (p.i 2,0).

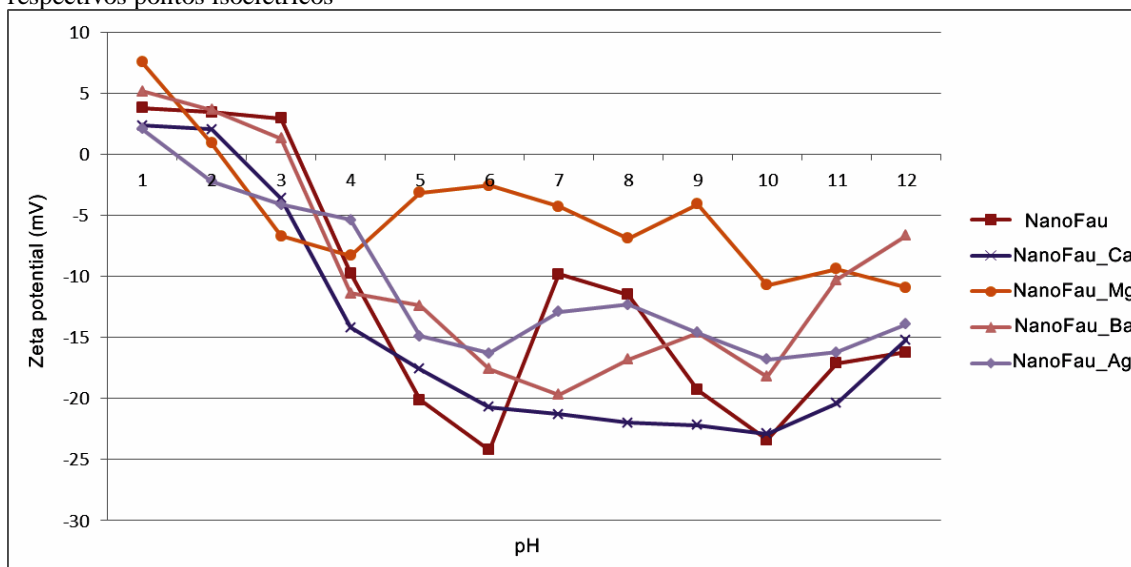
Figura 74 Potencial zeta das zeólitas faujasita na forma sódica e seus derivados de troca iônica (FAU_Ca; FAU_Mg; FAU_Ba e FAU_Ag) em função do pH em solução de CaCl₂ juntamente com seus respectivos pontos isoelétricos



A Figura 75 apresenta as medidas de potencial zeta da zeólita faujasita na escala nanométrica em sua forma original e seus derivados de troca iônica em função do pH com seus respectivos pontos isoelétricos. Foi observado que após o processo de troca iônica houve uma diminuição dos valores de pH do ponto isoelétrico para todas as amostras que sofreram o

processo de troca iônica NanoFAU_Ag (p.i 1,5), NanoFAU_Mg (p.i 2,3), NanoFAU_Ca (p.i 2,5), NanoFAU_Ba (p.i 3,1) quando comparada à amostra original NanoFAU (p.i 3,2).

Figura 75 Potencial zeta das zeólitas faujasita na forma sódica e seus derivados de troca iônica (NanoFAU_Ca; NanoFAU_Mg; NanoFAU_Ba e NanoFAU_Ag) em função do pH em solução de CaCl₂ juntamente com seus respectivos pontos isoelétricos



5.10 Análise Termogravimétrica (TG) e Calorimetria diferencial de varredura (DSC)

As zeólitas podem exibir reações do tipo exotérmicas, resultante da adsorção de água que produz temperaturas elevadas que podem ser prejudiciais aos tecidos próximos à lesão^{17; 40; 60; 169}, por isso medidas DSC/TG são necessários para avaliar este comportamento das zeólitas.

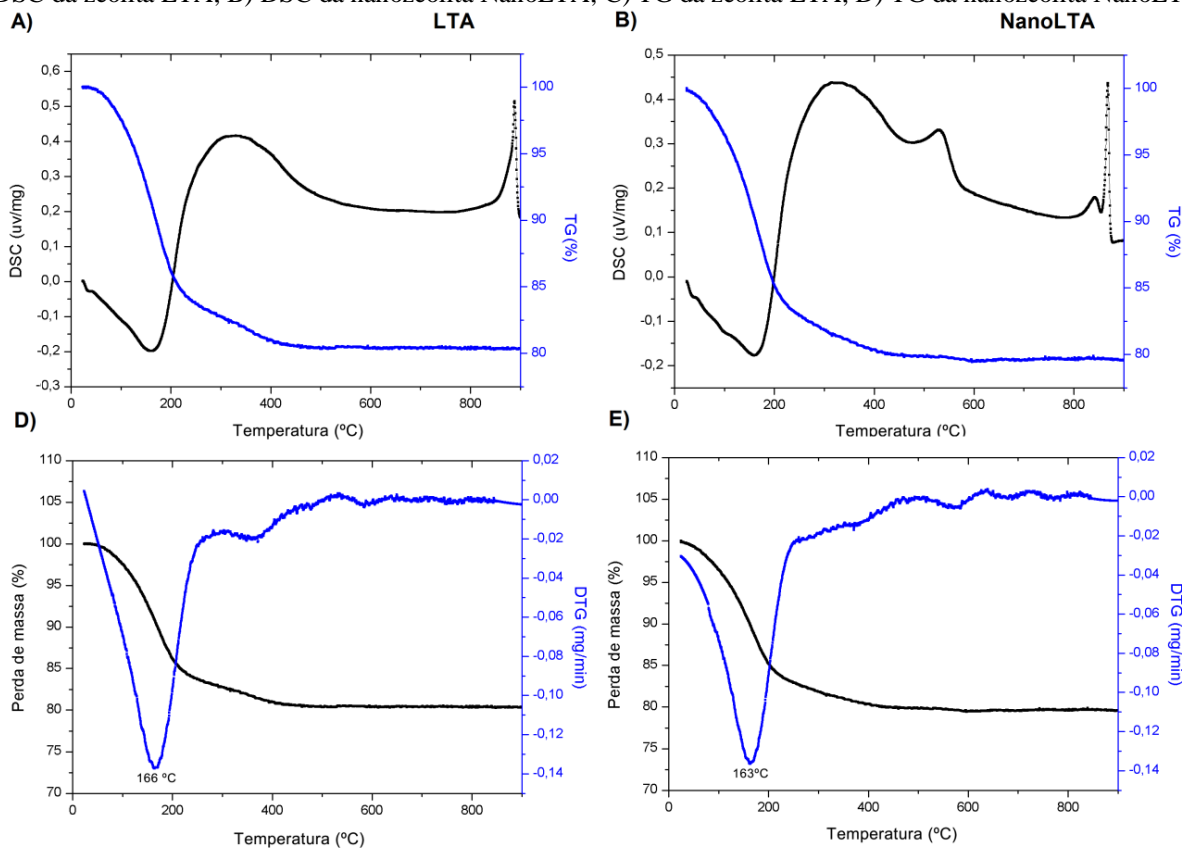
A técnica de DSC/TG foi utilizada para avaliar a quantidade de calor liberado e a perda de massa em função do tempo e da temperatura (20-900°C) das amostras de zeólitas sintetizadas. A análise de DSC/TG foi realizada com as amostras de zeólita em sua forma sódica tanto na escala micrométrica quanto na escala nanométrica. A Tabela 5 apresenta os dados obtidos para o DSC J/g e TG %. Da Figura 76 até a 82 é possível observar as curvas de DSC/TG e TG/DTG (derivada da curva do TG) das amostras estudadas, em que é possível observar a temperatura que houve perda de massa.

Tabela 5 DSC (J/g), TG (%) para as zeólitas estudadas na escala micrométrica e nanométrica

	DSC (J/g)	TG (%) (quantidade de perda de massa)
LTA (escala micrométrica)	87,43	19,71
NanoLTA (escala nanométrica)	87,7	20,43
FAU (escala micrométrica)	105,6	24,20
NanoFAU (escala nanométrica)	85,19	25,42
BEA (escala micrométrica)	17,29	11,94
NanoBEA (escala nanométrica)	53,34	14,59
MOR (escala micrométrica)	27,11	9,85
NanoMOR (escala nanométrica)	51,83	16,79
GIS (escala micrométrica)	105,67	16,72
NanoGIS (escala nanométrica)	5,49	32,10
TS1 (escala micrométrica)	1,2	1,17
NanoTS1 (escala nanométrica)	2,22	2,81

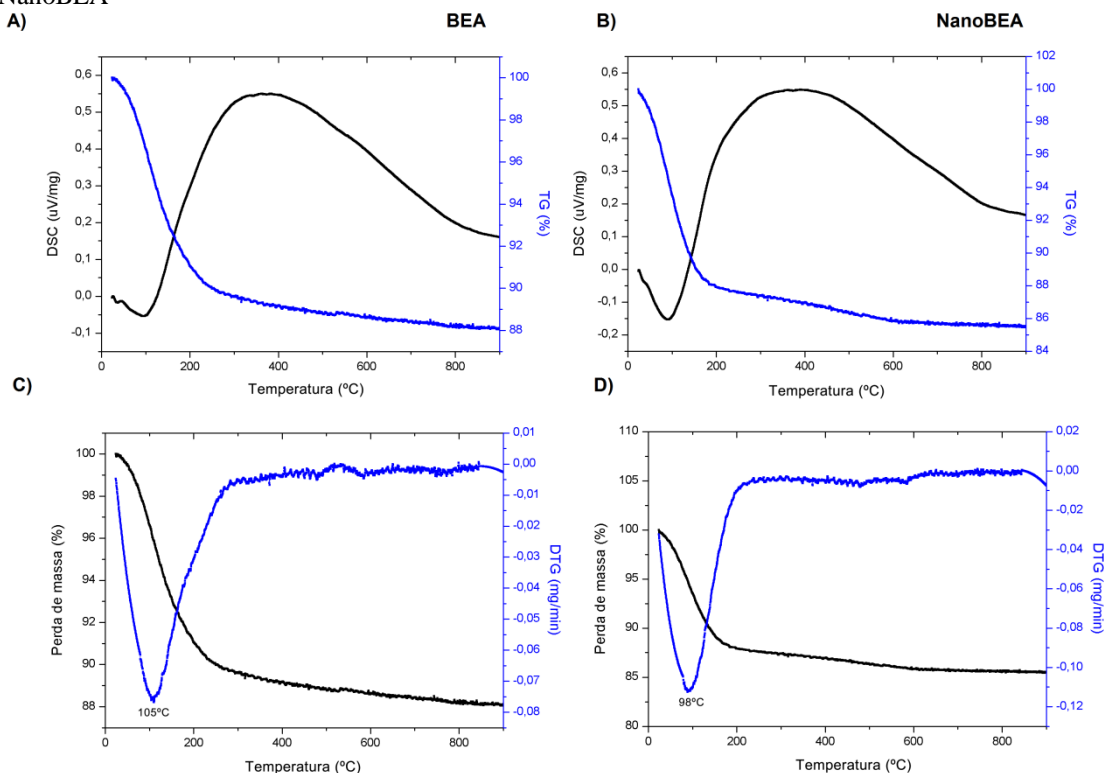
A Figura 76 mostra as curvas de DSC e TG/DTG das amostras de zeólita A (LTA) (itens A e D) e NanoLTA (itens B e E). É possível observar somente um evento significativo de perda de massa que ocorreu entre 25°C-200°C para ambos os materiais, sendo o pico de perda de massa em 166°C para a zeólita LTA e 163°C para a NanoLTA. Essa perda de massa pode ser atribuída à remoção da água adsorvida com perda de massa total de cerca de 19,71% para LTA e 20,43% para NanoLTA (ver Tabela 5). Além disso, neste intervalo de temperatura pode ser observado um acentuado pico exotérmico na curva de DSC por volta de 87,43 J/g para a zeólita LTA e 79,09 J/g para a NanoLTA, além de um pico exotérmico fraco de 8,7 J/g para a NanoLTA.

Figura 76 Termograma de DSC e TG das amostras de zeólita A (LTA) na escala micrométrica e nanométrica A) DSC da zeólita LTA; B) DSC da nanozeólita NanoLTA; C) TG da zeólita LTA; D) TG da nanozeólita NanoLTA



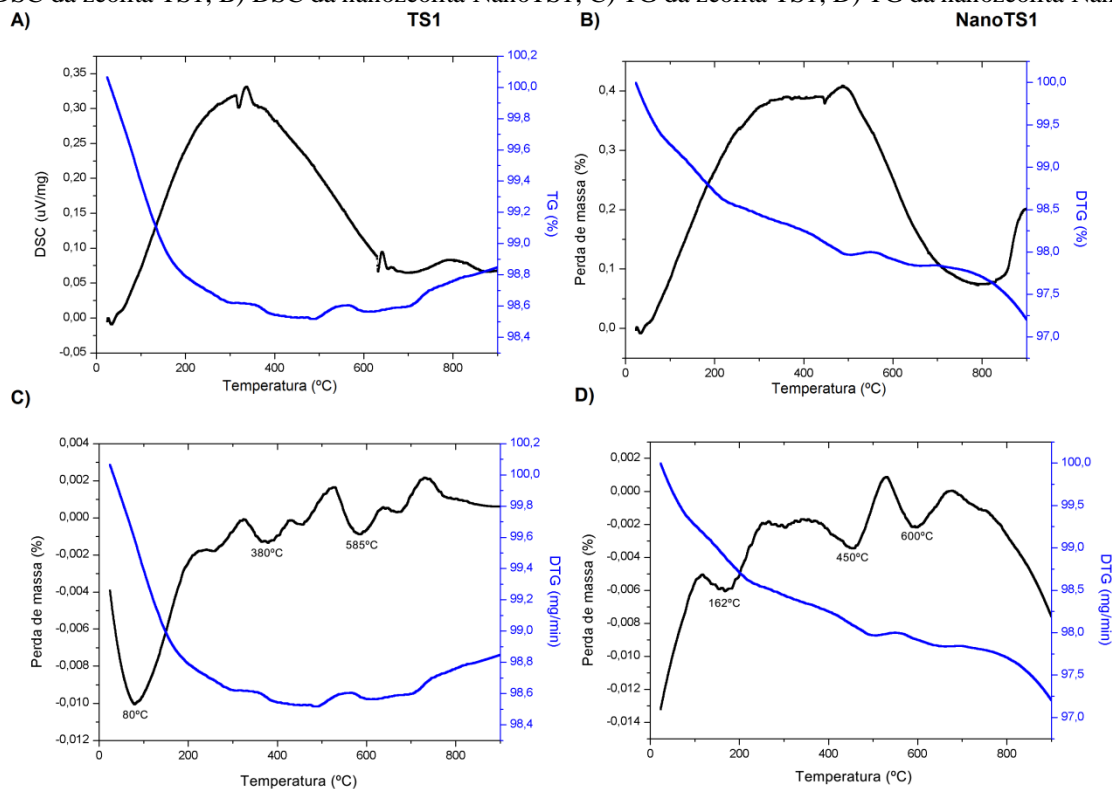
A Figura 77 mostra as curvas de DSC e TG/DTG das amostras de zeólita BEA (itens A e D) e NanoBEA (itens B e E). É possível observar somente um evento significativo de perda de massa que ocorreu entre 25°C-170°C para ambos os materiais, sendo o pico de perda de massa em 105°C para a zeólita BEA e 98°C para a NanoBEA. Essa perda de massa pode ser atribuída à remoção da água adsorvida com perda de massa total de 11,94% para BEA e 14,59% para NanoBEA (ver Tabela 5). Além disso, neste intervalo de temperatura pode ser observado um acentuado pico exotérmico na curva de DSC por volta de 17,29 J/g para a zeólita BEA e 53,34 J/g para a NanoBEA. Houve um aumento significativo na quantidade de energia liberada quando o material passou da escala micrométrica para nanométrica.

Figura 77 Termograma de DSC e TG/DTG das amostras de zeólita BEA na escala micrométrica e nanométrica A) DSC da zeólita BEA; B) DSC da nanozeólita NanoBEA; C) TG da zeólita BEA; D) TG da nanozeólita NanoBEA



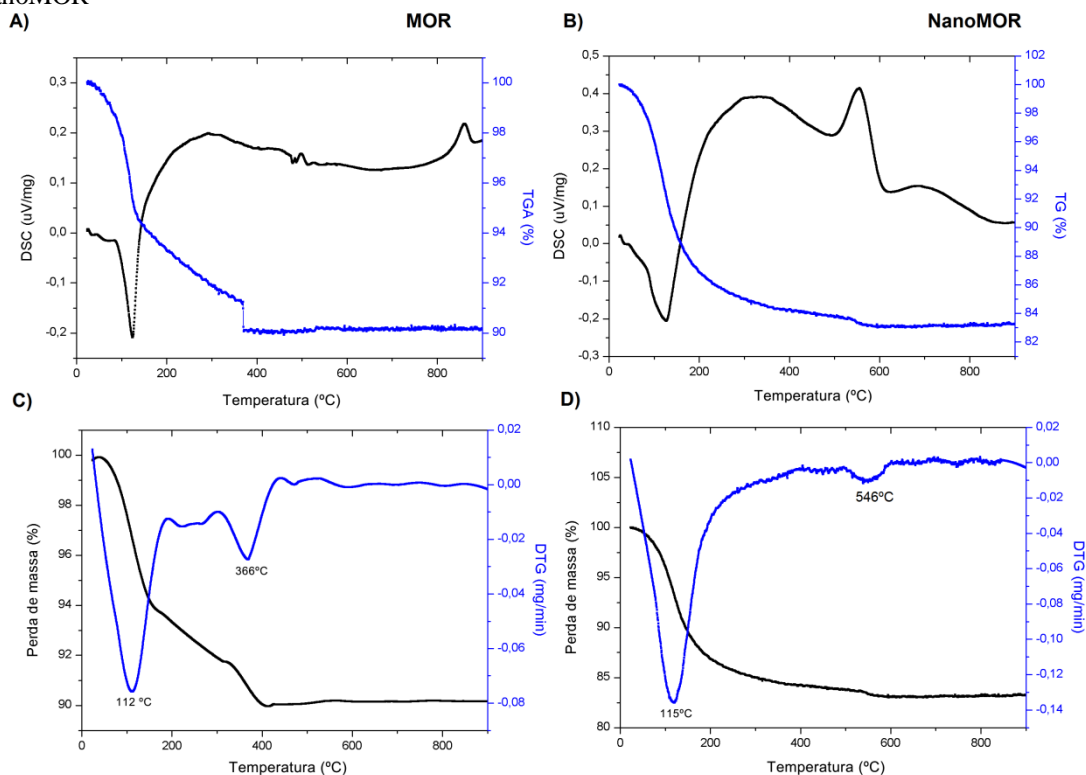
A Figura 78 mostra as curvas de DSC e TG/DTG das amostras de zeólita TS-1 (itens A e D) e NanoTS-1 (itens B e E). Para a zeólita TS-1 há três eventos de perda de massa. O primeiro evento ocorreu entre 25-170°C sendo o pico de perda de massa observado em 80°C referente à remoção de água superficial adsorvida. Os outros dois eventos ocorreram entre 340-420°C e 550-620°C, sendo os picos de perda de massa em 380°C e 585°C, respectivamente. Esta perda pode ser associada à remoção de água pertencente ao retículo cristalino, sendo a perda total de massa de 1,17%. Para a zeólita NanoTS-1 é possível também observar três eventos de perda de massa. O primeiro evento ocorreu entre 160-200°C, sendo em 162°C o pico de perda de massa referente à água superficial. Os outros eventos ocorreram entre 390-480°C e em 560-640°C, sendo os picos de perda de massa em 450°C e 600°C, respectivamente, referente à água cristalina, sendo a perda total de massa em 2,8% (ver Tabela 5). Em relação à curva de DSC foi observado um suave pico exotérmico de 1,2 J/g e 2,2 J/g para a amostra de TS-1 e NanoTS-1 respectivamente.

Figura 78 Termograma de DSC e TG/DTG das amostras de zeólita TS1 na escala micrométrica e nanométrica A) DSC da zeólita TS1; B) DSC da nanozeólita NanoTS1; C) TG da zeólita TS1; D) TG da nanozeólita NanoTS1



A Figura 79 mostra as curvas de DSC e TG/DTG das amostras de zeólita MOR (itens A e D) e NanoMOR (itens B e E). Para a zeólita MOR foi observado dois eventos de perda de massa, o primeiro entre 90-140°C, sendo o pico de perda de massa mais significativo em 112°C, referente à remoção de água superficial adsorvida. Além do evento que ocorreu entre 310-410°C, sendo o pico de perda em 366°C referente à remoção de água pertencente ao retículo cristalino. A perda total de massa neste caso foi de 9,85 % (Tabela 5). Para a nanozeólita NanoMOR é possível também observar dois eventos de perda de massa. O primeiro evento ocorreu entre 50-200°C, sendo em 115°C o pico de perda de massa referente à água superficial. O segundo evento ocorreu entre 500-600°C, sendo o pico de perda de massa em 546°C referente à água cristalina. A perda total de massa foi de 16,79 % (ver Tabela 5). Em relação à curva de DSC foi observado um intenso pico exotérmico de 27,11 J/g e 51,83 J/g para amostra de MOR e NanoMOR respectivamente.

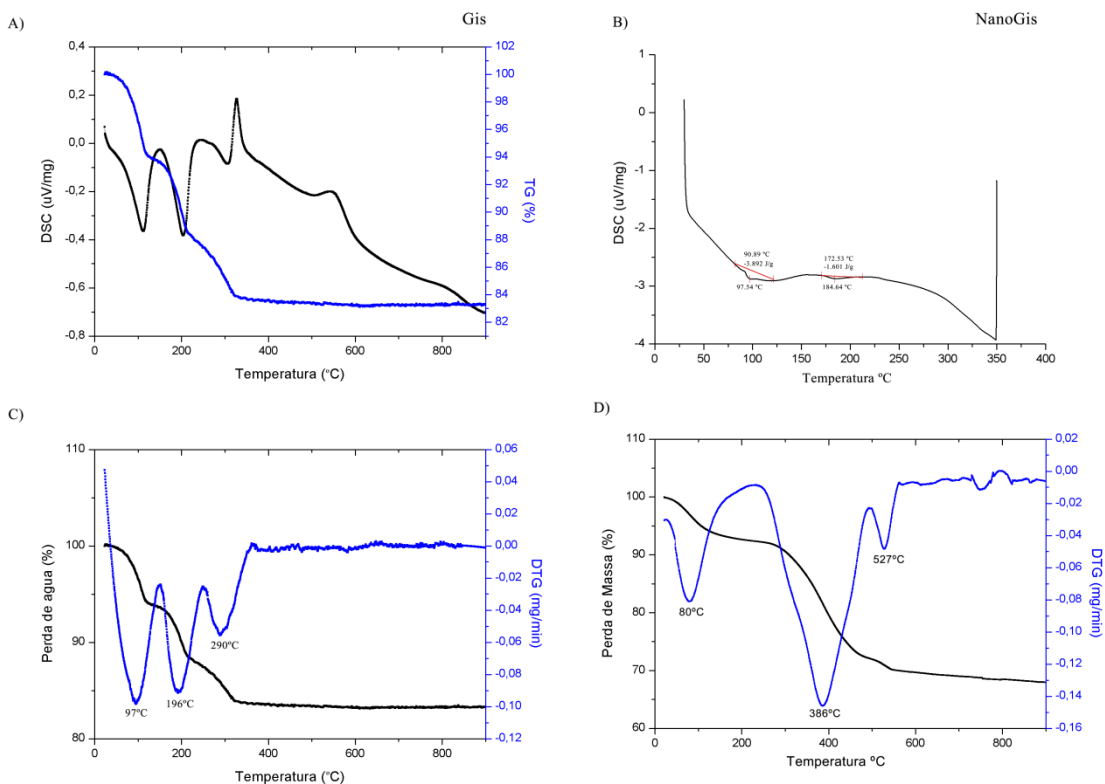
Figura 79 Termograma de DSC e TG/DTG das amostras de zeólita MOR na escala micrométrica e nanométrica A) DSC da zeólita MOR; B) DSC da nanozeólita NanoMOR; C) TG da zeólita MOR; D) TG da nanozeólita NanoMOR



A Figura 80 mostra as curvas de DSC e TG/DTG das amostras de zeólita GIS (itens A e D) e NanoGIS (itens B e E). Para a zeólita GIS há três eventos de perda de massa, sendo o primeiro evento entre 50-140°C, sendo o pico de perda de massa em 97°C referente à remoção de água superficial adsorvida. Os outros eventos de perda de massa em 160-240°C e 260-330°C, sendo os picos de perda de massa em 196°C e 290°C respectivamente. Esta perda é referente à remoção de água pertencente ao retículo cristalino, sendo a perda total de massa de 9,85 % (Tabela 5). Para a nanozeólita NanoGIS é possível também observar quatro eventos de perda de massa: o primeiro entre 50-170°C, sendo o pico observado em 80°C, referente à água superficial; entre 300-400°C e 420-600°C, sendo os picos observados em 366°C e 527°C referente à água cristalina; e por fim entre 700-830°C com pico em 780°C, possivelmente esse evento pode estar relacionado à perda do agente direcionador de estrutura (template orgânico) utilizado durante a síntese do material. Não foi possível calcinar este material, já que a partir de 550°C há colapso da estrutura, e desta forma o processo de troca iônica não é satisfatório. A perda total de massa foi de 32,10 % (ver Tabela 5). Em relação à curva de DSC foi observado para a zeólita GIS três picos exotérmicos de 54,49 J/g, 41,97 J/g e 9,21 J/g, para amostra de NanoGIS foram observados dois picos exotérmicos de 3,89 J/g e 1,6 J/g.

É importante notar que as zeólitas que tiveram uma menor liberação de energia na forma de calor, foram às que não exibiram bandas de absorção no infravermelho nas regiões localizadas entre 1630-1650 cm^{-1} e 3400-3500 cm^{-1} , bandas que em geral são associadas aos grupos hidroxilas das moléculas de água que se encontram presentes nos canais das zeólitas (ver item 4.4.8). Esse comportamento foi observado principalmente com as amostras de TS1, NanoTS1 e NanoGIS. O fato deles não terem adsorvidos moléculas de água como os demais materiais zeolíticos reportados, faz com que os mesmos não apresentem o efeito colateral, ou seja, queimadura que é provocado pelo aumento de temperatura. E ainda agem como agentes hemostáticos, pois possuem cargas negativas de superfície atuando como ativador de contato do fator intrínseco de coagulação conforme mostrado na seção seguinte.

Figura 80 Termograma de DSC e TG/DTG das amostras de zeólita GIS na escala micrométrica e nanométrica A) DSC da zeólita GIS; B) DSC da nanozeólita NanoGIS; C) TG da zeólita GIS; D) TG da nanozeólita NanoGIS



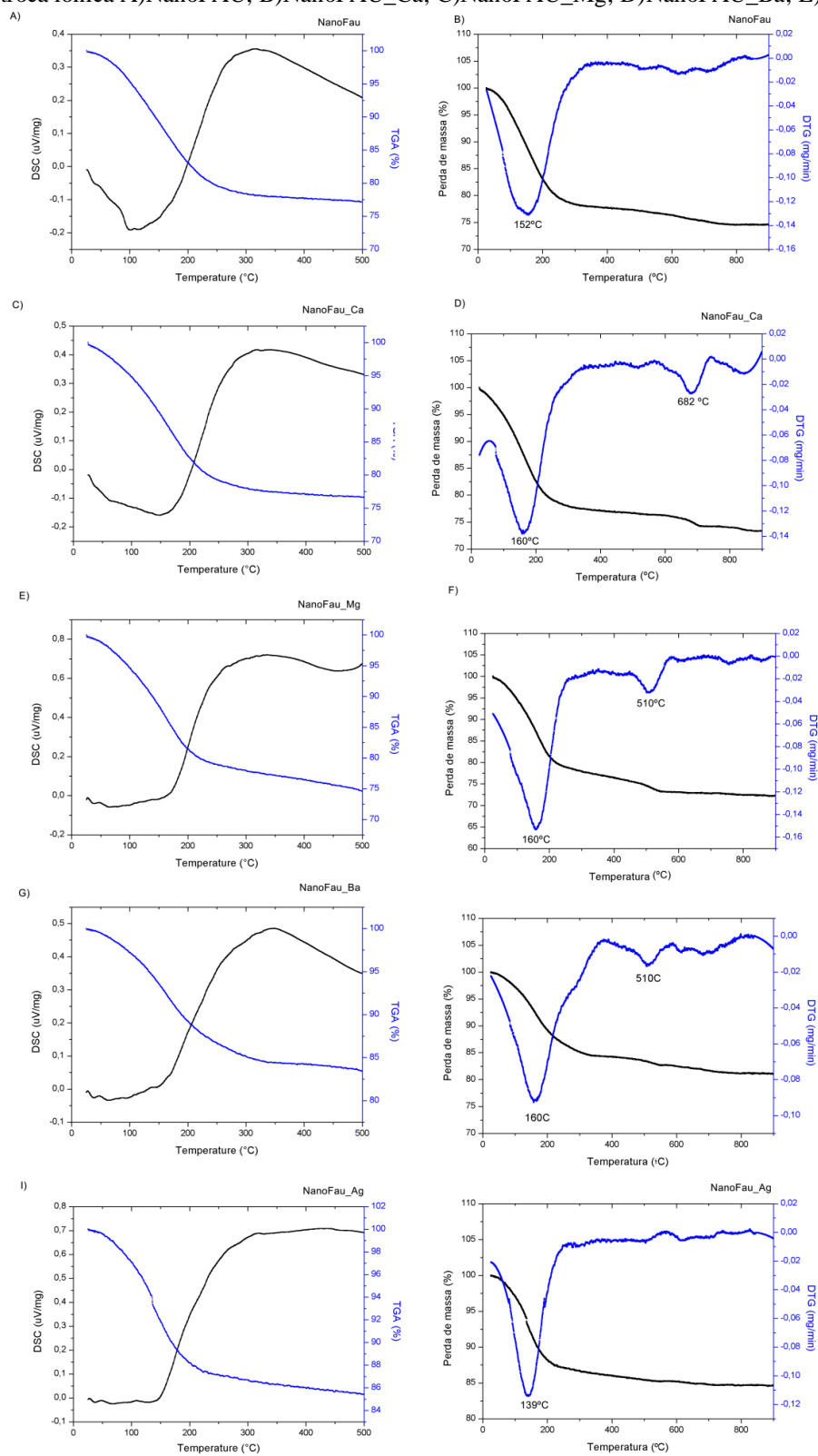
Para atenuar o calor de hidratação, os íons podem ser substituídos por outros íons com uma energia padrão livre de formação mais baixo quando estão em água²⁸. Segundo Ahuja *et al.*²⁸, alterando a composição química da zeólita, é possível diminuir a geração de calor. Ostomel *et al.*² realizaram estudos sistemáticos com zeólita 5A (LTA) realizando troca iônicas com diversos íons. Os resultados demonstraram que zeólitas 5A trocadas com íons de Ag^+ , apresentavam uma redução na liberação de calor de 680 J/g para 420 J/g.

Foi realizada análise de DSC/TG com as zeólitas faujasita na escala micrométrica e nanométrica na sua forma sódica e após sofrerem processo de troca iônica. Na Tabela 6 podem ser observados os valores de DSC (J/g), TG (%) e o raio iônico dos cátions utilizados no processo de troca iônica. A Figura 81 mostra as curvas de DSC/TG e TG/DTG juntamente com os pontos onde houve perda de massa. Nota-se uma diminuição significativa na energia liberada após as amostras de nanozeólitas faujasitas sofrerem troca iônica, principalmente quando o material foi trocado com íons Ba^{+2} e Ag^{+} , passando de 85,48 J/g (NanoFAU) para 13,28 J/g (NanoFAU_Ba) e 9,5 J/g (NanoFAU_Ag). A quantidade de moléculas de água adsorvida também diminuiu significativamente passando de 25,42 % (NanoFAU) para 19,02 % (NanoFAU_Ba) e 15,43 % (NanoFAU_Ag). Em relação à temperatura dos eventos em que ocorreu perda de massa, para a amostra NanoFAU, o pico foi em 152°C referente a águas superficiais. Para a amostra NanoFAU_Ca houve um evento em 160°C e outro em 682°C. Para as amostras NanoFAU_Mg e NanoFAU_Ba em 160°C e 510°C, respectivamente. Já para a amostra NanoFAU_Ag houve somente um evento de perda de massa em 139°C.

Tabela 6 DSC (J/g), TG/DTG, número de moléculas de água adsorvida e raio iônico dos cátions para as nanozeólitas faujasita na forma sódica e seus derivados de troca iônica

	DSC (J/g)	TG (%) (quantidade de perda de massa)	Raio iônico (pm)
NanoFAU	85,48	25,42	98
NanoFAU_Ca	78,21	26,68	100
NanoFAU_Mg	33,4	27,87	72
NanoFAU_Ba	13,28	19,02	135
NanoFAU_Ag	9,5	15,43	115

Figura 81 Termograma de DSC e TG/DTG das amostras de faujasita na escala nanométrica juntamente com seus derivados de troca iônica A) NanoFAU; B) NanoFAU_Ca; C) NanoFAU_Mg; D) NanoFAU_Ba; E) NanoFAU_Ag

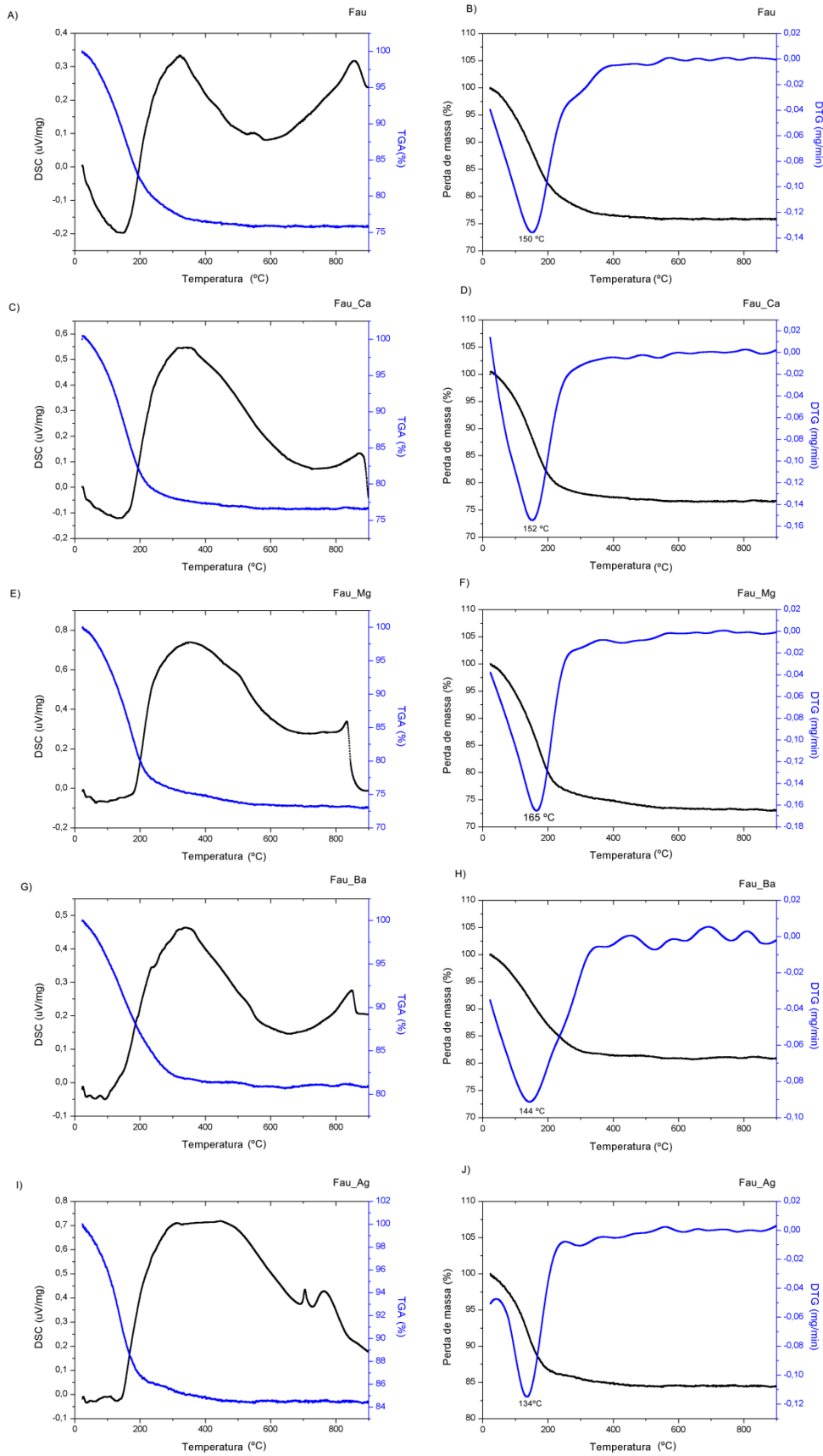


Comportamento semelhante foi observado para a amostra de faujasita na escala micrométrica (FAU). A Tabela 7 apresenta os dados de DSC J/g e TG % das amostras de faujasitas na escala micrométrica em sua forma sódica e após sofrerem o processo de troca iônica, além do raio iônico dos íons que participaram do processo de troca iônica. Houve uma diminuição significativa na energia liberada após as amostras de zeólitas faujasitas sofrerem troca iônica, principalmente quando o material foi trocado com íons Ba^{+2} e Ag^{+} , passando de 105,6 J/g (FAU) para 14,71 J/g (FAU_Ba) e 9,8 J/g (FAU_Ag). A quantidade de moléculas de água adsorvida também diminuiu significativamente passando de 24,2 % (FAU) para 19,17 % (FAU_Ba) e 15,55 % (FAU_Ag). Em relação à temperatura dos eventos em que ocorreu perda de massa, para a amostra FAU, o pico foi em 150°C referente às águas superficiais. Para a amostra FAU_Ca houve um evento em 152°C. Para as amostras FAU_Mg em 165°C, para a FAU_Ba em 144°C e para a amostra FAU_Ag houve somente um evento de perda de massa em 134°C.

Tabela 7 DSC (J/g), TG/DTG, número de moléculas de água adsorvida e raio iônico dos cátions para as zeólitas faujasita na forma sódica e seus derivados de troca iônica

	DSC (J/g)	TG (%) (quantidade de água adsorvida)	Raio iônico (pm)
FAU	105,6	24,2	98
FAU_Ca	65,80	23,36	100
FAU_Mg	36,44	26,98	72
FAU_Ba	14,71	19,17	135
FAU_Ag	9,8	15,55	115

Figura 82 Termograma de DSC e TG/DTG das amostras de faujasita na escala micrométrica juntamente com seus derivados de troca iônica A) FAU; B) FAU_Ca; C) FAU_Mg; D) FAU_Ba; E) FAU_Ag



Uma possível explicação para os dados reportados nas Tabela 6 e Tabela 7 em relação ao comportamento destes materiais após o processo de troca iônica pode ser relacionado ao raio iônico e a energia de hidratação destes cátions que participaram deste processo. O raio iônico é um importante fator para a troca iônica em termos de difusão e sítios de absorção na estrutura da zeólita ¹⁴⁴.

Yang *et al.* ¹⁷⁰ fizeram troca iônica utilizando diversos íons com zeólita Y, eles observaram que cátions que possuem um raio menor ocupam menos espaço e permitem a acomodação de mais moléculas de água dentro da estrutura da zeólita, levando a uma maior estabilização do cátion. No caso dos dados para a zeólita FAU (escala micrométrica) e NanoFAU (escala nanométrica) podemos observar valores coerentes para as amostras trocadas com cátion Ca^{+2} e Mg^{+2} onde a substituição dos cátions de Na^{+} por esses dois cátions de fato acarretaram uma diminuição da energia liberada, e este resultado está condizente com os resultados reportados por Yang *et al.* ¹⁷⁰. Interessante notar que os difratogramas de Raios-X das amostras de FAU e NanoFAU trocadas com Ca^{+2} e Mg^{+2} indicaram claramente que a incorporação desses cátions não induz mudanças significativas na estrutura das zeólitas, portanto é perfeitamente aceitável que essas moléculas de água estejam alocadas em sítios cristalográficos bem definidos, onde a coordenação com as moléculas de água seja bastante estáveis.

Todavia, o mesmo não pode ser dito para as amostras de FAU e NanoFAU trocadas com Ag^{+} e Ba^{+2} . No caso dessas amostras, a troca acarretou um determinado grau de amorfização das amostras modificando os canais e cavidades dessas zeólitas, logo é possível que os cátions de Ag^{+} e Ba^{+2} não estejam em sítios cristalográficos bem definidos e esses cátions estejam coordenados ou ligados às moléculas de água de maneira instável ou numa coordenação desfavorável, o que resulta em baixos valores de energia liberados ¹⁷⁰ (ver Figura 15 e Figura 14). Independentes disso, os dados mostram que a modulação das propriedades das zeólitas através da troca iônica podem de fato resultar em materiais que desprendem menos energia em forma de calor, o que seria muito bom para contrabalancear o efeito colateral das queimaduras.

5.11 Estudos tromboelastográficos (TEG) com zeólitas na escala micrométrica e nanométrica

O potencial tromboelastográfico dos materiais zeolíticos, ou seja, a capacidade de coagulação do sangue pelas zeólitas na escala micrométrica e nanométrica preparadas nesse estudo, foi testada através da técnica de tromboelastografia.

As análises tromboelastográficas seguiram os procedimentos experimentais descritos no item 4.4.11. Para este estudo o sangue total citratado puro (sem acréscimo de zeólitas) foi adotado como padrão de comparação para as amostras de sangue tratadas com a adição de zeólitas. Análises estatísticas na verificação dos parâmetros foram utilizados para tratar os dados coletados.

Os parâmetros (R, K, α e MA) que avaliam a coagulação do sangue foram medidos para as amostras de sangue tratadas com as zeólitas tanto na escala micrométrica e nanométrica em sua forma sódica. Para as zeólitas Faujasita na escala micrométrica e nanométrica, os testes foram realizados com todos os cátions abordados neste trabalho (Ca^{+2} , Mg^{+2} , Ba^{+2} e Ag^{+}).

A Tabela 8 mostra os parâmetros tromboelastográficos das amostras de zeólitas na escala micrométrica na forma sódica enquanto que a

Figura 83 mostra as curvas tromboelastográficas fornecidas pelo aparelho TEG[®]. Observa-se que para a amostra de sangue total citratado antes da adição de zeólitas FAU, houve uma redução no tempo R (tempo de formação de um coágulo com tamanho de aproximadamente 2 mm e início da produção de fibrina) de $8,6 \pm 0,7$ minutos (sangue total sem adição de zeólitas) para $3,2 \pm 0,7$ minutos. Para o tempo K (tempo para o coágulo atingir 20 mm) de $3,5 \pm 0,6$ para $1,2 \pm 0,1$ minutos. Em relação ao ângulo alfa (inclinação entre R e K, que representa a taxa de geração de trombina e a conversão de fibrinogênio em fibrina) um aumento de $49,7 \pm 6,8$ para $74,3 \pm 1,0$ e finalmente para o parâmetro MA (maior amplitude ou amplitude máxima, que reflete a máxima propriedade elástica da fibrina e adesão plaquetária) houve um aumento de $53,6 \pm 2,4$ para $64,0 \pm 0,9$ mm.

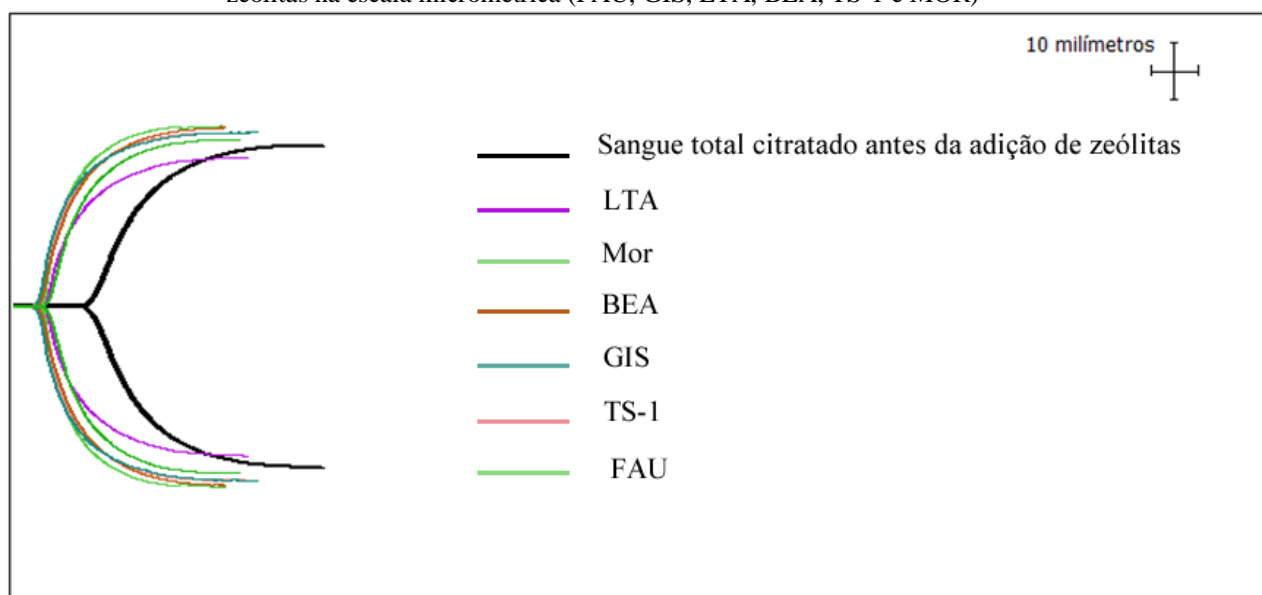
No caso da amostra GIS, houve uma diminuição no tempo R passando de $8,6 \pm 0,7$ para $2,8 \pm 0,1$ minutos. Para o tempo K houve uma redução para $1,5 \pm 0,4$ minutos, o ângulo alfa aumentou para $72,5 \pm 0,2$ e o MA aumentou para $57,5 \pm 4,9$ mm. Para a amostra LTA, houve uma diminuição no tempo R e K para $4,0 \pm 0,9$ e $1,3 \pm 0,3$ min respectivamente. Para o ângulo alfa e o MA, houve um aumento para $72,9 \pm 4,9$ e $56,7 \pm 4,4$ mm respectivamente. Para a amostra BEA, houve uma diminuição no tempo R e K para $3,2 \pm 0,1$ e $1,3 \pm 0,3$ min

respectivamente. Para o ângulo alfa e o MA, houve um aumento para $72,9 \pm 4,9$ e $56,7 \pm 4,4$ mm respectivamente. Para a amostra de TS-1, houve uma diminuição no tempo R e K para $2,9 \pm 0,1$ e $1,5 \pm 0,1$ min, respectivamente. Para o ângulo alfa e o MA, houve um aumento para $70 \pm 1,6$ e $57,2 \pm 5,2$ mm respectivamente. Por fim, a amostra MOR apresentou os seguintes parâmetros: houve uma diminuição no tempo R e K para $4,1 \pm 0,1$ e $1,6 \pm 0,1$ min, respectivamente. Para o ângulo alfa e o MA, houve um aumento para $67,1 \pm 0,7$ e $58,6 \pm 0,6$ mm respectivamente (ver Tabela 8 e Figura 83).

Tabela 8 Parâmetros tromboelastrográficos das amostras de sangue antes da adição de zeólitas e após a adição de zeólitas na escala micrométrica (FAU, GIS, LTA, BEA, TS-1 e MOR)

	R	K	Ângulo Alfa	MA
<i>Valor de Referência</i>	<i>5 – 10 (min)</i>	<i>1 – 3 (min)</i>	<i>45 – 74</i>	<i>54 – 62 (mm)</i>
Sangue antes da adição de zeólitas	$8,6 \pm 0,7$	$3,5 \pm 0,6$	$49,7 \pm 6,8$	$53,6 \pm 2,4$
FAU	$3,2 \pm 0,7$	$1,2 \pm 0,1$	$74,3 \pm 1,0$	$64,0 \pm 0,9$
GIS	$2,8 \pm 0,1$	$1,5 \pm 0,4$	$72,5 \pm 0,2$	$57,5 \pm 4,9$
LTA	$4,0 \pm 0,9$	$1,3 \pm 0,3$	$72,9 \pm 4,9$	$56,7 \pm 4,4$
BEA	$3,2 \pm 0,1$	$1,3 \pm 0,1$	$73,6 \pm 3,3$	$61,9 \pm 0,7$
TS-1	$2,9 \pm 0,1$	$1,5 \pm 0,1$	$70,0 \pm 1,6$	$57,2 \pm 5,2$
MOR	$4,1 \pm 0,1$	$1,6 \pm 0,1$	$67,1 \pm 0,7$	$58,6 \pm 0,6$

Figura 83 Curvas de tromboelastrograma da amostra de sangue antes da adição de zeólita e após a adição de zeólitas na escala micrométrica (FAU, GIS, LTA, BEA, TS-1 e MOR)



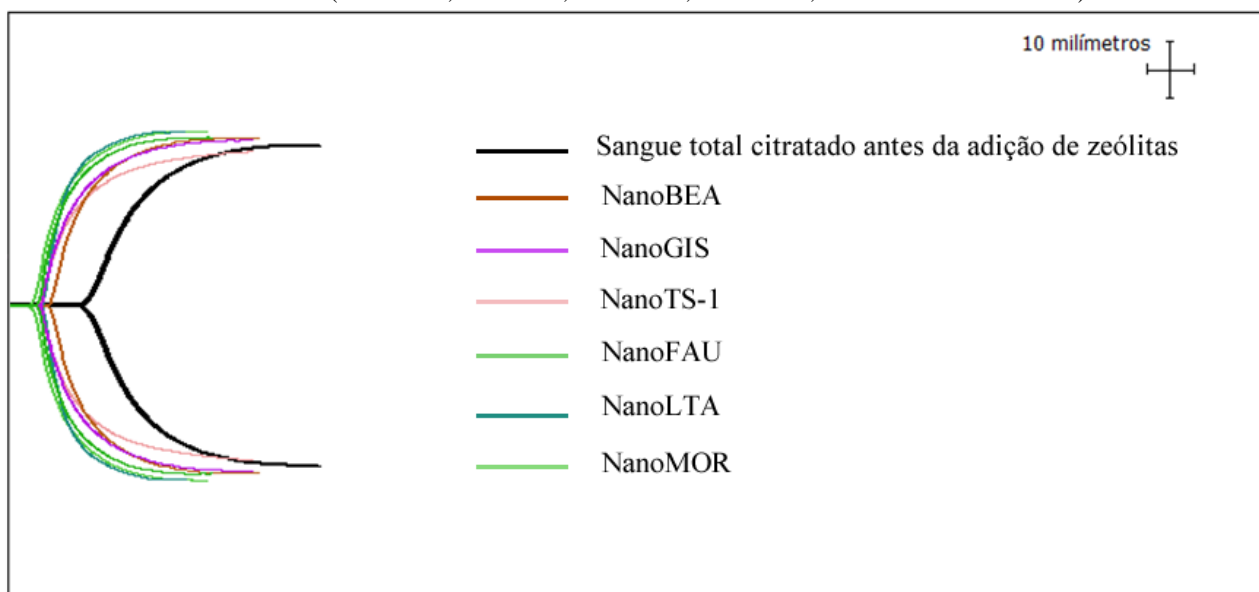
Os parâmetros tromboelastográficos medidos referente às zeólitas na escala micrométrica e na forma sódica foram submetidos à análise estatística de variância One-Way (Anova One-Way) em que mostrou um valor de p global para o parâmetro R $<0,0001$. Em seguida, foi realizada uma análise por meio do teste de Tukey. Foi observado que o valor de F é maior que o valor do F crítico, assim sendo, é possível afirmar que existem diferenças significativas, na média, entre os grupos ($p < 0,0001$). O teste Tukey (aplicado com 95% de confiança) foi empregado para verificar se existem diferenças significativas entre as médias e quais são diferentes. Em relação ao parâmetro R, foi observado que existem diferenças significativas entre o controle e as amostras. Dentro do grupo das amostras, somente a GIS e a MOR são estatisticamente diferentes quando comparada com as outras amostras. Em relação ao parâmetro K e o ângulo alfa, pode-se observar que as amostras são estatisticamente diferentes ($p < 0,005$), todavia apenas existem diferenças significativas entre o controle e as amostras, e não foi encontrado diferenças entre as amostras entre si. Em relação ao parâmetro MA, como o valor de F é menor que o valor do F crítico não existe diferenças significativas entre as amostras estudadas.

Em relação às zeólitas na escala nanométrica, houve também uma melhora nos parâmetros tromboelastográficos em termos de aceleração da coagulação sanguínea (Tabela 9 e Figura 84). Para a amostra NanoFAU, houve uma diminuição significativa no tempo R passando de $8,6 \pm 0,7$ para $2,4 \pm 0,1$ minutos. Para o tempo K houve uma redução para $1,2 \pm 0,0$ minutos, o ângulo alfa aumentou para $73,9 \pm 0,5$ e o MA aumentou para $61,2 \pm 1,6$ mm. Para a amostra de NanoGIS, houve uma diminuição no tempo R e K para $3,6 \pm 0,0$ e $1,3 \pm 0,1$ min respectivamente. Para o ângulo alfa e o MA, houve um aumento para $73,0 \pm 1,2$ e $58,9 \pm 1,0$ mm respectivamente. Para a amostra de NanoLTA, houve uma diminuição no tempo R e K para $3,4 \pm 0,3$ e $0,9 \pm 0,1$ min respectivamente. Para o ângulo alfa e o MA, houve um aumento para $76,7 \pm 0,6$ e $62,3 \pm 1,7$ mm respectivamente. Para a amostra de NanoBEA, houve uma diminuição no tempo R e K para $4,6 \pm 0,0$ e $1,5 \pm 0,1$ min respectivamente. Para o ângulo alfa e o MA, houve um aumento para $70,9 \pm 2,0$ e $59,0 \pm 0,1$ mm respectivamente. Para a amostra de NanoTS-1, houve uma diminuição no tempo R e K para $3,4 \pm 0,1$ e $1,4 \pm 0,1$ min respectivamente. Para o ângulo alfa e o MA, houve um aumento para $69,9 \pm 0,6$ e $57,5 \pm 4,9$ mm respectivamente. Por fim, a amostra NanoMOR apresentou os seguintes parâmetros: houve uma diminuição no tempo R e K para $3,0 \pm 0,3$ e $1,1 \pm 0,0$ min respectivamente. Para o ângulo alfa e o MA, houve um aumento para $74,4 \pm 0,1$ e $58,0 \pm 1,7$ mm respectivamente (Tabela 9 e Figura 84).

Tabela 9 Parâmetros tromboelastográficos das amostras de sangue antes da adição de zeólitas e após a adição de zeólitas na escala nanométrica (NanoFAU, NanoGIS, NanoLTA, NanoBEA, NanoTS-1 e NanoMOR)

	R	K	Ângulo Alfa	MA
<i>Valor de Referência</i>	5 – 10 (min)	1 – 3 (min)	45 – 74	54 – 62 (mm)
Sangue antes da adição de zeólitas	8,6 ± 0,7	3,5 ± 0,6	49,7 ± 6,8	53,6 ± 2,4
NanoFAU	2,4 ± 0,1	1,2 ± 0,0	73,9 ± 0,5	61,2 ± 1,6
NanoGIS	3,6 ± 0,0	1,3 ± 0,1	73,0 ± 1,2	58,9 ± 1,0
NanoLTA	3,4 ± 0,3	0,9 ± 0,1	76,7 ± 0,6	62,3 ± 1,7
NanoBEA	4,6 ± 0,0	1,5 ± 0,1	70,9 ± 2,0	59,0 ± 0,1
NanoTS-1	3,4 ± 0,1	1,4 ± 0,1	69,9 ± 0,6	57,5 ± 4,9
NanoMOR	3,0 ± 0,3	1,1 ± 0,0	74,4 ± 0,1	58,0 ± 1,7

Figura 84 Curvas de tromboelastograma da amostra de sangue antes da adição de zeólita e após a adição de zeólitas na escala nanométrica (NanoFAU, NanoGIS, NanoLTA, NanoBEA, NanoTS-1 e NanoMOR)



Comparando-se as amostras em relação ao tamanho, não foi observado uma correlação direta entre o tamanho do material e a eficiência hemostática. Por exemplo, para as amostras Faujasita, Zeólita A (LTA) e Mordenita, houve um aumento nos parâmetros tromboelastográficos quando a zeólita passaram da escala micrométrica para nanométrica. Ao contrário das amostras de zeólitas Gismondina, BEA, TS-1 em que foi observado uma diminuição nos parâmetros tromboelastográficos.

Da mesma maneira, os dados foram submetidos à análise estatística ANOVA, em que foi possível observar quais são os parâmetros que apresentam diferenças estatisticamente

significativas. Em relação ao parâmetro R, o valor de F é maior que o valor do F crítico, por isso, é possível afirmar que existem diferenças significativas, na média, entre os grupos ($p < 0,0001$). Foi observado também que existe diferenças significativas entre o controle e as amostras. Dentro do grupo das amostras, as amostras NanoFAU, NanoGIS e NanoBEA são estatisticamente diferentes quando comparada entre as outras amostras. Em relação ao parâmetro K e o ângulo alfa para as zeólitas na escala nanométrica, pode-se observar que as amostras são estatisticamente diferentes ($p < 0,005$), todavia apenas existem diferenças significativas entre o controle e as amostras, e não foi encontrado diferenças entre as amostras entre si. Em relação ao parâmetro MA, como o valor de F é menor que o valor do F crítico não existem diferenças significativa entre as amostras estudadas.

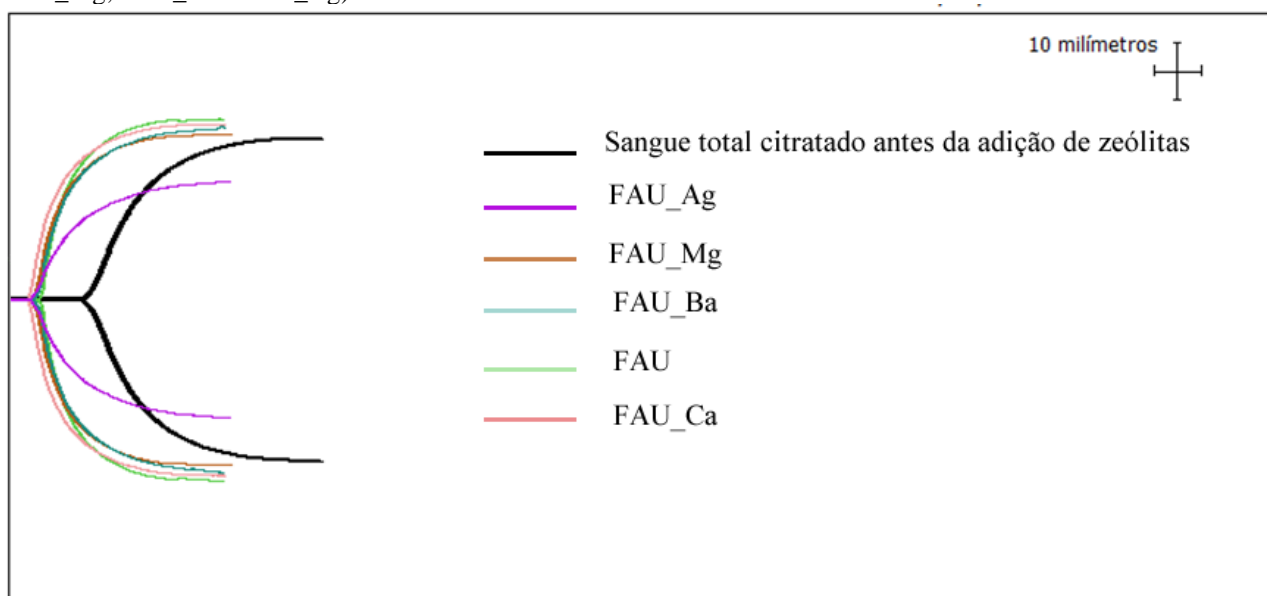
Foi realizado um estudo dos parâmetros tromboelastográficos para as amostras de Faujasita na escala micrométrica e nanométrica na forma sódica e trocada com os íons (Ca^{+2} , Mg^{+2} , Ba^{+2} e Ag^{+}).

A Tabela 10 e a Figura 85 mostram os parâmetros tromboelastográficos do sangue tratado com zeólita Faujasita na escala micrométrica forma sódica (FAU) e trocado os íons (Ca^{+2} , Mg^{+2} , Ba^{+2} e Ag^{+}). Para a amostra FAU_Ca houve uma diminuição no tempo R para $2,3 \pm 0,1$ minutos quando comparado ao sangue tratado com a zeólita FAU ($3,2 \pm 0,7$ min). O tempo K permaneceu o mesmo. Em relação ao ângulo alfa um aumento para $75,6 \pm 1,2$ e, finalmente para o parâmetro MA houve uma diminuição para $55,5 \pm 5,0$ mm. Para a amostra FAU_Mg houve uma diminuição no tempo R para $2,7 \pm 0,1$ minutos. O tempo K houve uma ligeira diminuição para $1,1 \pm 0,3$ minutos. Em relação ao ângulo alfa, uma diminuição para $73,0 \pm 0,3$ e, para o parâmetro MA houve uma diminuição para $59,6 \pm 2,7$ mm quando comparado ao sangue tratado com a zeólita FAU. A amostra FAU_Ba apresentou um valor de R semelhante à amostra de sangue tratada com FAU ($3,2 \pm 0,7$ min). Para o tempo K houve um ligeiro aumento ($1,4 \pm 0,4$ min). Para os parâmetros ângulo alfa e MA houve uma diminuição para $72,5 \pm 3,2$ e $59,4 \pm 1,2$ mm, respectivamente. A amostra FAU_Ag apresentou um valor de R semelhante à amostra de sangue tratada com FAU ($3,2 \pm 0,7$ min). Para o tempo K houve um significativo aumento ($2,3 + 0,5$ min). Para os parâmetros ângulo alfa e MA houve uma diminuição para $59,2 \pm 2,9$ e $43,6 \pm 2,5$ mm, respectivamente.

Tabela 10 Parâmetros tromboelastrográficos das amostras de sangue antes da adição de zeólitas e após a adição de zeólitas Faujasita na escala micrométrica (FAU) juntamente com seus derivados de troca iônica (FAU_Ca; FAU_Mg; FAU_Ba e FAU_Ag)

	R	K	Ângulo Alfa	MA
<i>Valor de Referência</i>	5 – 10 (min)	1 – 3 (min)	45 – 74	54 – 62 (mm)
Sangue antes da adição de zeólitas	8,6 ± 0,7	3,5 ± 0,6	49,7 ± 6,8	53,6 ± 2,4
FAU	3,2 ± 0,7	1,2 ± 0,1	74,3 ± 1,0	64,0 ± 0,9
FAU_Ca	2,3 ± 0,1	1,2 ± 0,1	75,6 ± 1,2	55,5 ± 5,0
FAU_Mg	2,7 ± 0,1	1,1 ± 0,3	73,0 ± 0,3	59,6 ± 2,7
FAU_Ba	3,2 ± 0,7	1,4 ± 0,4	72,5 ± 3,2	59,4 ± 1,2
FAU_Ag	3,2 ± 0,7	2,3 ± 0,5	59,2 ± 2,9	43,6 ± 2,5

Figura 85 Curvas de tromboelastrograma da amostra de sangue antes da adição de zeólita e após a adição de zeólitas Faujasita na escala micrométrica (FAU) juntamente com seus derivados de troca iônica (FAU_Ca; FAU_Mg; FAU_Ba e FAU_Ag)



A análise estatística ANOVA para os dados apresentados na Tabela 10, mostrou para o parâmetro R que o valor de F é maior que o valor do F crítico, logo, é possível afirmar que existem diferenças significativas, na média, entre os grupos ($p < 0,0001$). Foi observado também que existe diferenças significativas somente entre o controle e as amostras e não existe entre as amostras entre si. Em relação ao parâmetro K e o ângulo alfa, pode-se observar que as amostras são estatisticamente diferentes ($p < 0,005$), sendo que as amostras que são estatisticamente

diferentes são o controle e a FAU_Ag. Em relação ao parâmetro MA, como o valor de F é menor que o valor do F crítico não existe diferenças significativas entre as amostras estudadas.

As amostras de sangue tratadas com zeólitas NanoFAU e trocadas os íons Ca^{+2} , Mg^{+2} , Ba^{+2} e Ag^{+} (Tabela 11 e Figura 86) apresentaram os seguintes resultados para os parâmetros tromboelastográficos: A amostra NanoFAU_Ca apresentou um valor de R bem inferior à amostra de sangue tratada com NanoFAU ($1,1 \pm 0,2$ min). O tempo K permaneceu inalterado ($1,2 \pm 0,0$ min). Os parâmetros ângulo alfa e MA não houve grandes modificações $75,1 \pm 2,3$ e $60,3 \pm 1,6$ mm, respectivamente. Para a amostra NanoFAU_Mg, houve uma ligeira diminuição no tempo R e o no tempo K ($2,1 \pm 0,2$ e $1,1 \pm 0,2$ min, respectivamente). Houve um aumento no ângulo alfa ($76,5 \pm 2,2$) e uma diminuição no MA ($53,5 \pm 5,7$ mm). Para a amostra NanoFAU_Ba, houve um ligeiro aumento no tempo R ($2,7 \pm 0,2$ min) e uma ligeira diminuição no tempo K ($1,0 \pm 0,1$ min). Houve um aumento no ângulo alfa ($75,6 \pm 0,3$) e uma diminuição acentuada no MA ($50,9 \pm 3,4$ mm). Finalmente, a amostra NanoFAU_Ag apresentou um aumento significativo nos tempos R e K ($3,4 \pm 0,5$ e $2,5 \pm 0,6$) respectivamente, além de uma acentuada diminuição no ângulo alfa e no MA ($60 \pm 2,4$ e $42,4 \pm 6,4$ mm) respectivamente.

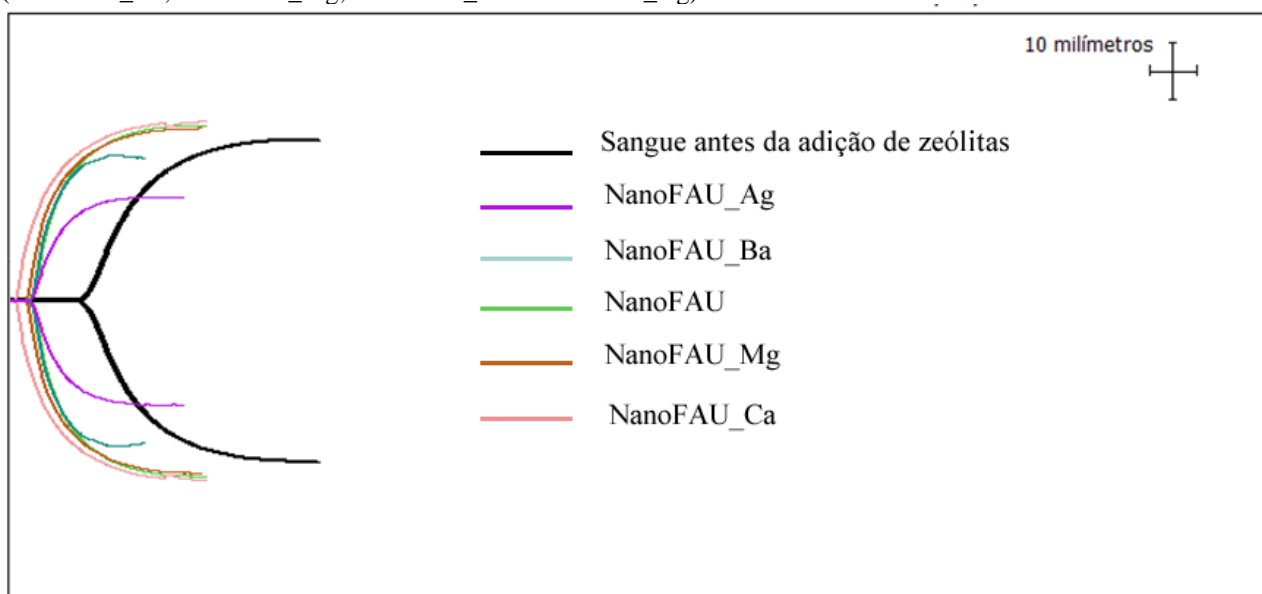
É importante notar que os derivados de troca iônica com Ag^{+} , tanto na escala micrométrica e nanométrica apresentaram uma diminuição nos parâmetros tromboelastográficos quando comparado com as amostras de Faujasita na forma sódica. O parâmetro mais afetado foi o MA que está relacionado à máxima propriedade elástica da fibrina e adesão plaquetária.

A análise de variância One-Way (Anova One-Way) para os dados estatísticos apresentados na Tabela 11 revelou que existe diferença estatisticamente significativa para o parâmetro R com todas as amostras em relação ao controle ($P < 0.0001$). Sendo que a amostra NanoFAU_Ca mostrou as reduções mais importantes em relação ao controle. Em relação ao parâmetro k e ângulo alfa, houve diferenças estatisticamente significativas com as amostras em relação ao controle ($P < 0.005$). Em relação ao parâmetro MA, como o valor de F é menor que o valor do F crítico não existe diferenças significativas entre as amostras estudadas.

Tabela 11 Parâmetros tromboelastográficos das amostras de sangue antes da adição de zeólitas e após a adição de zeólitas Faujasita na escala nanométrica (NanoFAU) juntamente com seus derivados de troca iônica (NanoFAU_Ca; NanoFAU_Mg; NanoFAU_Ba e NanoFAU_Ag)

	R	K	Ângulo Alfa	MA
<i>Valor de Referência</i>	5 – 10 (min)	1 – 3 (min)	45 – 74	54 – 62 (mm)
Sangue antes da adição de zeólitas	8,6 ± 0,7	3,5 ± 0,6	49,7 ± 6,8	53,6 ± 2,4
NanoFAU	2,4 ± 0,1	1,2 ± 0,0	73,9 ± 0,5	61,2 ± 1,6
NanoFAU_Ca	1,1 ± 0,2	1,2 ± 0,1	75,1 ± 2,3	60,3 ± 1,6
NanoFAU_Mg	2,1 ± 0,2	1,1 ± 0,2	76,5 ± 2,2	53,5 ± 5,7
NanoFAU_Ba	2,7 ± 0,2	1,0 ± 0,1	75,6 ± 0,3	50,9 ± 3,4
NanoFAU_Ag	3,4 ± 0,5	2,5 ± 0,6	60 ± 2,4	42,4 ± 6,4

Figura 86 Curvas de tromboelastograma da amostra de sangue antes da adição de zeólita e após a adição de zeólitas Faujasita na escala nanométrica (NanoFAU) juntamente com seus derivados de troca iônica (NanoFAU_Ca; NanoFAU_Mg; NanoFAU_Ba e NanoFAU_Ag)



É evidente que os materiais zeolíticos sintetizados e caracterizados apresentam grande potencial de atuarem como agentes hemostáticos coagulantes reduzindo o tempo de coagulação das amostras de sangue. O tempo (R) para iniciar a coagulação é relevante, pois este parâmetro é crítico para a concepção de agentes hemostáticos com ação imediata (primeira resposta), bem como para a concepção de dispositivos médicos que requerem uma superfície tromboelastografica passiva ¹⁰³. Ostomel *et al.* ¹⁰³ relataram que materiais que são capazes de induzirem a formação de um coágulo de sangue em 2 minutos *in vitro*, tem uma maior chance

de promover a sobrevivência de 75% de pacientes, quando aplicados externamente como um agente hemostático a uma lesão fatal do sistema vascular ^{2; 28}.

Podemos observar que os materiais zeólitos que mostraram um melhor desempenho no que diz respeito à aceleração do processo de coagulação sanguínea foram derivados de troca iônica: NanoFAU_Ca, FAU_Ca, NanoFAU_Mg e FAU_Mg, sendo que a amostra de sangue tratada com NanoFau_Ca se sobressaiu em relação às outras.

A aceleração da coagulação causada por zeólitas pode ser associado à adsorção de moléculas de água nos canais e poros da zeólita causando a concentração de proteínas e fatores de coagulação, tornando mais facilitado o processo de coagulação sanguínea, e também das cargas negativas presente na superfície das partículas. De acordo com a literatura ^{103; 171; 172}, óxidos inorgânicos e cerâmicas com superfícies polares foram consideradas mais susceptíveis para promover a aceleração da formação de coágulos. Ativação da coagulação do sangue por contato é comumente chamado de "*glass effect*", este termo foi criado para descrever a observação geral de que a formação de coágulos de sangue ocorre mais rápido quando em contato com superfícies polares do que com superfícies não polares ¹⁰³.

A ativação de contato do fator XII (FXII) *in vivo* pode estar associada à ativação de plaquetas, células endoteliais, neutrófilos e colágenos ¹⁷³. FXII também é ativado após contato com superfícies carregadas negativamente, tais como o vidro, o caulim, complexos metálicos insolúveis de ácido elágico, sulfato de dextrano, sulfatídeos e fosfolípidos ¹⁷³. Este fator de coagulação se liga a uma superfície carregada negativamente através de aminoácidos carregados positivamente na sua cadeia pesada ^{174; 175}, induzindo mudanças conformacionais na molécula ¹⁷¹.

Zeólitas podem agir como ativadores de contato devido a suas superfícies com cargas negativas. De acordo com Griffin *et al.* ¹⁷¹ esta alteração conformacional por si só não ativa a molécula, mas em vez disso torna o FXII muito mais susceptíveis à ativação por proteólise pela calicreína (ou pela plasmina, Factor Xla, e outras proteases).

FXII pode ser dividida em duas regiões, uma cadeia pesada e uma cadeia leve ¹⁷⁴. Ao entrar em contato com a superfície carregada negativamente, FXII é auto-ativado (ativação em fase sólida) ^{174; 176}. Tanto a ligação à superfície e a clivagem durante autoativação resulta em alterações conformacionais ^{174; 177}. Proteínas plasmáticas, incluindo calicreína de plasma e plasmina, ativam o FXII a FXIIa, clivando a ligação que une Arg353-Val354 e gerando uma molécula de duas cadeias compostas por uma cadeia pesada (353 resíduos) e uma cadeia leve (243 resíduos), mantidas juntas por uma ligação dissulfeto ^{174; 178}.

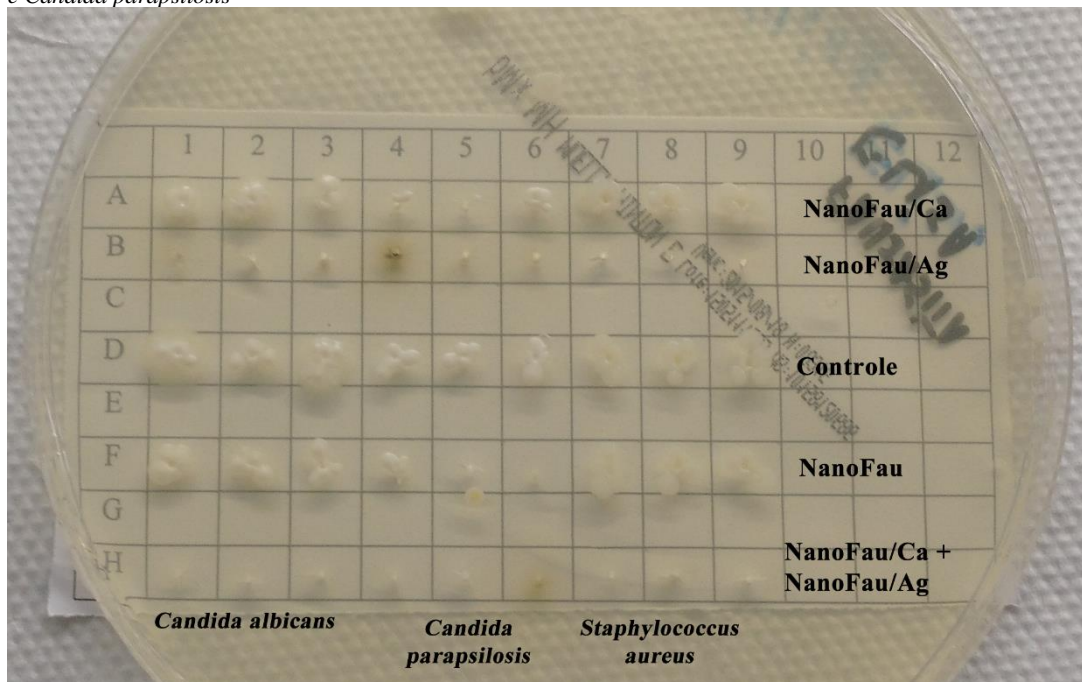
Vários estudos ainda sugerem uma possível relação entre os íons metálicos e interações superficiais por ativação de contato^{174; 179; 180}. De acordo com Colman e Schmaier¹⁷⁴, a ligação de íons Zn^{+2} ao fator XII induz uma alteração conformacional que torna a proteína mais susceptível para o desenvolvimento da atividade enzimática quando associado a superfícies carregadas negativamente^{181; 182; 183}. Mutch, Waters e Morrissey¹⁸⁰ investigaram se metais de transição (Zn^{+2} , Ni^{+2} , Cu^{+2} , Co^{+2}) imobilizados em superfícies de lipossomas são capazes de iniciar o processo de coagulação por ativação de contato. Foram observados que íons de metais de transição Ni^{2+} , Cu^{2+} e Zn^{2+} interagem fortemente com fatores FXI, FXII, e cininogênio de alto peso molecular (HK). É possível que os metais alcalinos terrosos estudados neste trabalho, principalmente Ca^{+2} e Mg^{+2} , podem ter atuado de uma maneira similar no processo de coagulação sanguínea.

5.12 Atividade antimicrobiana de zeólitas

5.12.1 Determinação da atividade microbiana por microdiluição

A Figura 87 mostra as colônias de microrganismos desenvolvidos em placa contendo Ágar Mueller-Hinton que foram repicados a partir das placas de microdiluição contendo zeólitas, caldo nutriente e inóculo dos microrganismos em triplicata. Pode-se observar que para NanoFau_Ca houve a inibição de *Candida parapsilosis*. A NanoFau_Ag exibiu inibição do crescimento microbiano para todos os ensaios com *Candida albicans*, *Candida parapsilosis* e *Staphylococcus aureus*. Para a NanoFau em sua forma sódica houve a inibição da *Candida Parapsilosis*. Para a composição de 2 tipos de zeólitas (NanoFau_Ag+NanoFau_Ca) também houve a inibição de todos os microrganismos estudados *Candida albicans*, *Candida parapsilosis* e *Staphylococcus aureus*. Portanto, podemos observar uma inibição considerável do crescimento microbiano da amostra de zeólita NanoFau_Ag em contato com os microrganismos testes.

Figura 87 Análise do crescimento de microrganismos frente a presença de zeólitas A) NanoFau_Ca, B) NanoFau_Ag, D) Controle, F) NanoFau e H) NanoFau_Ag+NanoFau_Ca frente aos microrganismos *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans* e *Candida parapsilosis*



5.12.2 Determinação da atividade microbiana por difusão

As Figuras 88 e 89 mostram as placas de ágar Mueller-Hinton no qual foi adicionado em poços uma solução de zeólita de modo que a mesma se difundisse no meio de cultura contendo o microrganismo *Staphylococcus aureus* previamente inoculados, a fim de se avaliar a formação ou não de halos de inibição. Foram testadas duas concentrações diferentes de zeólitas: 0,4 mg/mL (Figura 88) e 0,8 mg/mL (Figura 89). Pode-se observar a formação de halos de inibição para a amostra NanoFau_Ag com diâmetro de 23mm e para a mistura das zeólitas NanoFau_Ca+NanoFau_Ag com diâmetro de 24mm (Figura 88).

Para a concentração 0,8 mg/mL, os halos de inibição formados para NanoFau_Ag foi de 22mm de diâmetro e para a mistura das zeólitas NanoFau_Ca+NanoFau_Ag foi de 22mm (Figura 89). Nota-se que a quantidade de zeólita foi indiferente para a formação do halo de inibição, nos dois casos, houveram formação de halos de tamanhos parecidos.

Figura 88 Imagem fotográfica dos halos de inibição formados por difusão de solução de zeólitas (0,001g) NanoFau, NanoFau_Ca, NanoFau_Ag, NanoFau_Ca +NanoFau_Ag frente ao crescimento de *Staphylococcus aureus*

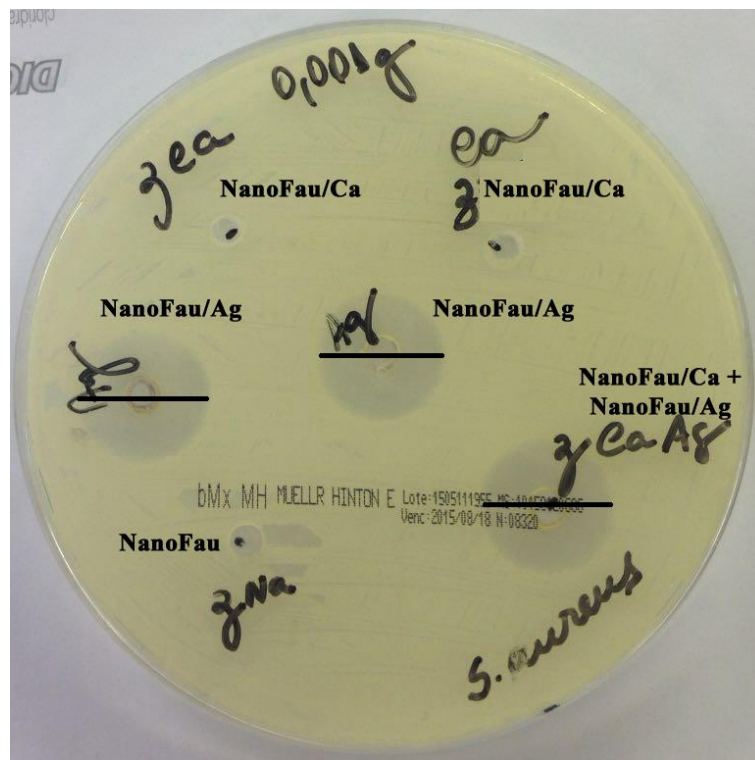
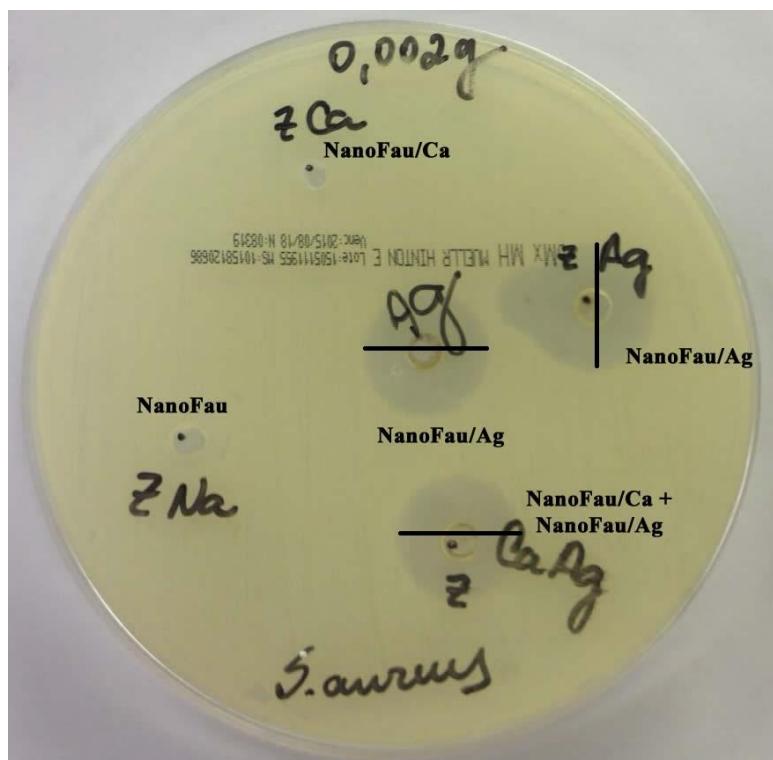
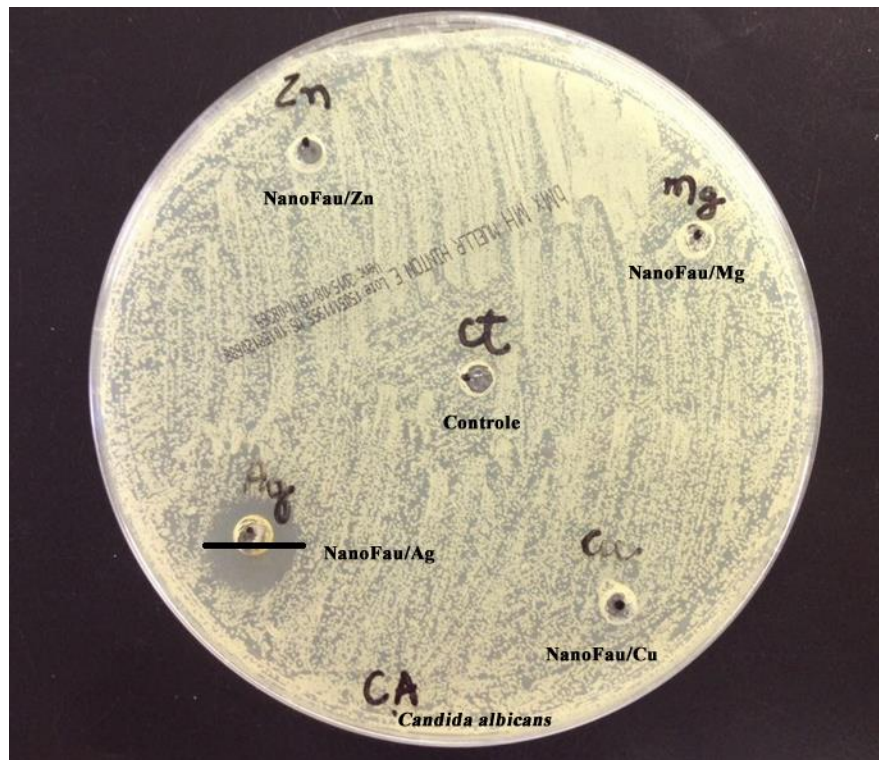


Figura 89 Imagem fotográfica dos halos de inibição formados por difusão de solução de zeólitas (0,002g) NanoFau, NanoFau_Ca, NanoFau_Ag, NanoFau_Ca +NanoFau_Ag frente ao crescimento de *Staphylococcus aureus*



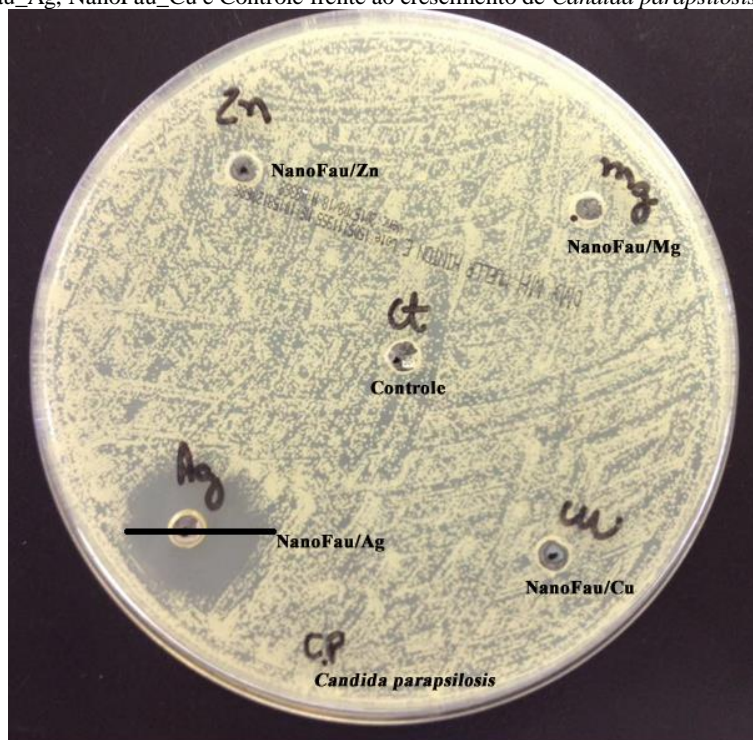
As Figuras 90, 91 e 92 referem-se as placas de ágar Mueller-Hinton em que foi avaliado a formação de halos de inibição após a adição de solução de 0,4 mg/mL zeólitas (NanoFau_Zn, NanoFau_Mg, NanoFau_Ag e NanoFau_Cu) em cada poço frente aos seguintes microrganismos: *Candida albicans*, *Candida parapsilosis* e *Staphylococcus aureus*. Em relação à placa contendo o microrganismo *Candida albicans*, pode-se observar a formação de halo de inibição somente para a amostra de NanoFau_Ag com um diâmetro de 19,8 mm. Para as outras amostras não houve formação de halos de inibição.

Figura 90 Imagem fotográfica dos halos de inibição formados por difusão de solução de zeólitas NanoFau_Zn, NanoFau_Mg, NanoFau_Ag, NanoFau_Cu e Controle frente ao crescimento de *Candida albicans*



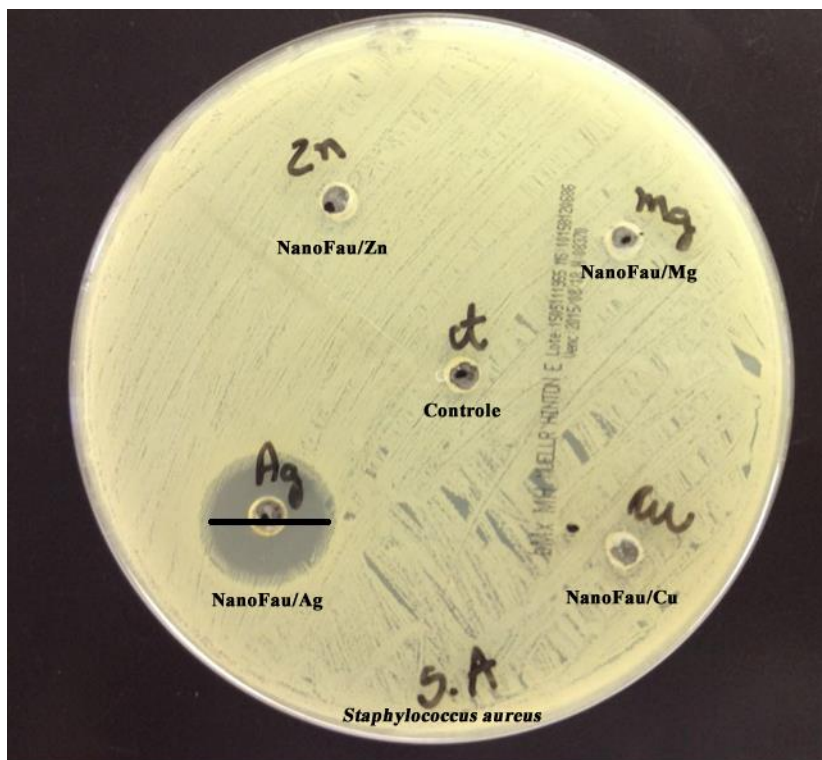
Comportamento semelhante pode ser observado para a placa de ágar Mueller-Hinton contendo colônias de *Candida parapsilosis*, em que foi observado formação de halo de inibição somente para a amostra NanoFau_Ag com o diâmetro de 32 mm (Figura 91).

Figura 91 Imagem fotográfica dos halos de inibição formados por difusão de solução de zeólitas NanoFau_Zn, NanoFau_Mg, NanoFau_Ag, NanoFau_Cu e Controle frente ao crescimento de *Candida parapsilosis*



No caso da placa de ágar Mueller-Hinton contendo colônias de *Staphylococcus aureus*, foi observado formação de halo de inibição para a amostra NanoFau_Ag com o diâmetro de 25 mm (Figura 92).

Figura 92 Imagem fotográfica dos halos de inibição formados por difusão de solução de zeólitas NanoFau_Zn, NanoFau_Mg, NanoFau_Ag, NanoFau_Cu e Controle frente ao crescimento de *Staphylococcus aureus*



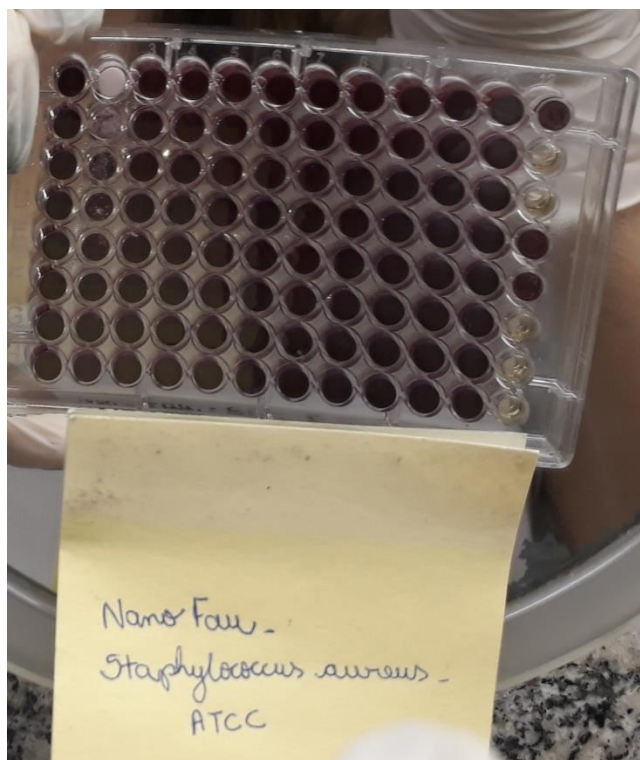
Pode-se observar que algumas zeólitas apresentaram atividade antimicrobiana, principalmente as que sofreram troca iônica com íons prata. Estes materiais atuaram como importantes inibidores do crescimento microbianos tanto para *Staphylococcus aureus* quanto para *Candida albicans* e *Candida parapsilosis*. É possível afirmar que os íons prata foram responsáveis pela inibição do crescimento microbiano, já que zeólitas em sua forma sódica não apresentaram o mesmo efeito, assim como as amostras de zeólitas que sofreram troca iônica com os demais íons, estas não apresentaram resultados relevantes para inibição do crescimento microbiano nestes experimentos. É de conhecimento comum que cátions antimicrobianos, como íons prata, podem ser alojados nas cavidades das zeólitas e serem trocados com outros cátions do meio^{118; 120; 184; 185}. À medida que essa disponibilidade de íons ocorrem, os cátions livres entram em contato com os microrganismos presente no meio, suprimindo seu desenvolvimento através da inativação de enzimas vitais, interrompendo a replicação do RNA e bloqueando sua respiração por um processo oxidativo¹⁸⁴.

Diante disso, foi importante calcular também a concentração mínima inibitória da amostra de zeólita NanoFau_Ag a fim de descobrir a menor concentração do material que é capaz de inibir o desenvolvimento visível dos microrganismos testados.

5.12.3 Determinação da concentração mínima inibitória das zeólitas NanoFau, NanoFau_Ag frente aos microrganismos *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Candida albicans* ATCC 90028

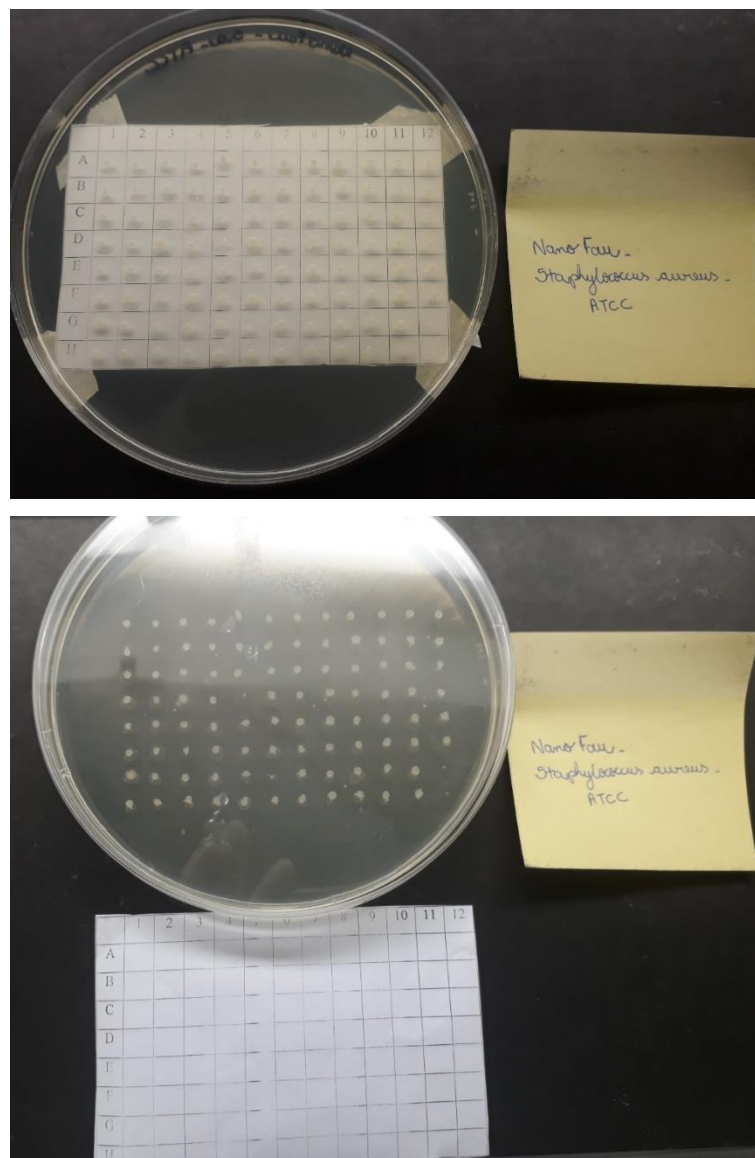
A Figura 93 mostra a placa de elisa onde foi realizada a diluição sequencial de zeólitas NanoFau frente ao microrganismo *Staphylococcus aureus*. Devido à adição do corante TTC, é possível analisar se ocorreu crescimento microbiano. Quando o microrganismo está viável, ocorre a redução do composto, tornando o meio vermelho, por outro lado, onde não houve crescimento, a coloração permanece oxidada na cor do meio de cultura (amarelada). De acordo com os resultados obtidos, pode-se observar que o crescimento microbiano foi inibido nos poços 2A e 2B, cuja concentrações foram 500 e 250 mg/mL de zeólitas NanoFau, respectivamente. Em relação à fileira de Controle de crescimento, foi observado que houve crescimento de microrganismos em todos os poços, o que sugere que os microrganismos são viáveis, enquanto que a fileira 12 (Controle negativo) não houve crescimento de microrganismos na maioria dos poços, apenas em alguns poços em que houve contaminação durante a manipulação.

Figura 93 Imagem fotográfica das placas de Elisa contendo zeólitas NanoFAU frente ao microrganismo *Staphylococcus aureus*



A Figura 94 mostra as colônias de microrganismos repicadas a partir da placa de microdiluição para placas de ágar Mueller-Hinton. Pode-se observar o crescimento de colônias até mesmo nos poços onde não houveram alteração na coloração na placa de microdiluição. Isto sugere que a zeólita pode atuar por mecanismo bacteriostático em que somente ocorre a inibição do crescimento do microrganismo enquanto estavam em contato com a zeólita.

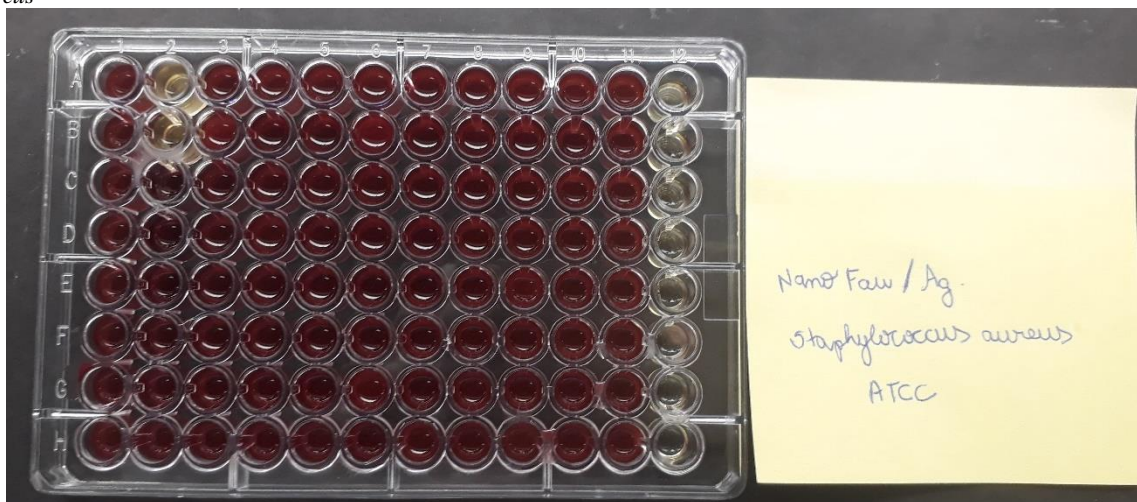
Figura 94 Imagem fotográfica das colônias de crescimento de microrganismos *Staphylococcus aureus* em ágar Mueller-Hinton replicada da placa de elisa contendo diluições de NanoFau



A Figura 95 mostra a placa de elisa onde foi realizada a diluição sequencial de zeólitas NanoFau_Ag frente ao microrganismo *Staphylococcus aureus*. É possível observar que o crescimento microbiano foi inibido nos poços 2A e 2B, cuja concentrações foram 1 e 0,5 mg/mL de zeólitas NanoFau_Ag, respectivamente. Em relação à fileira de Controle de

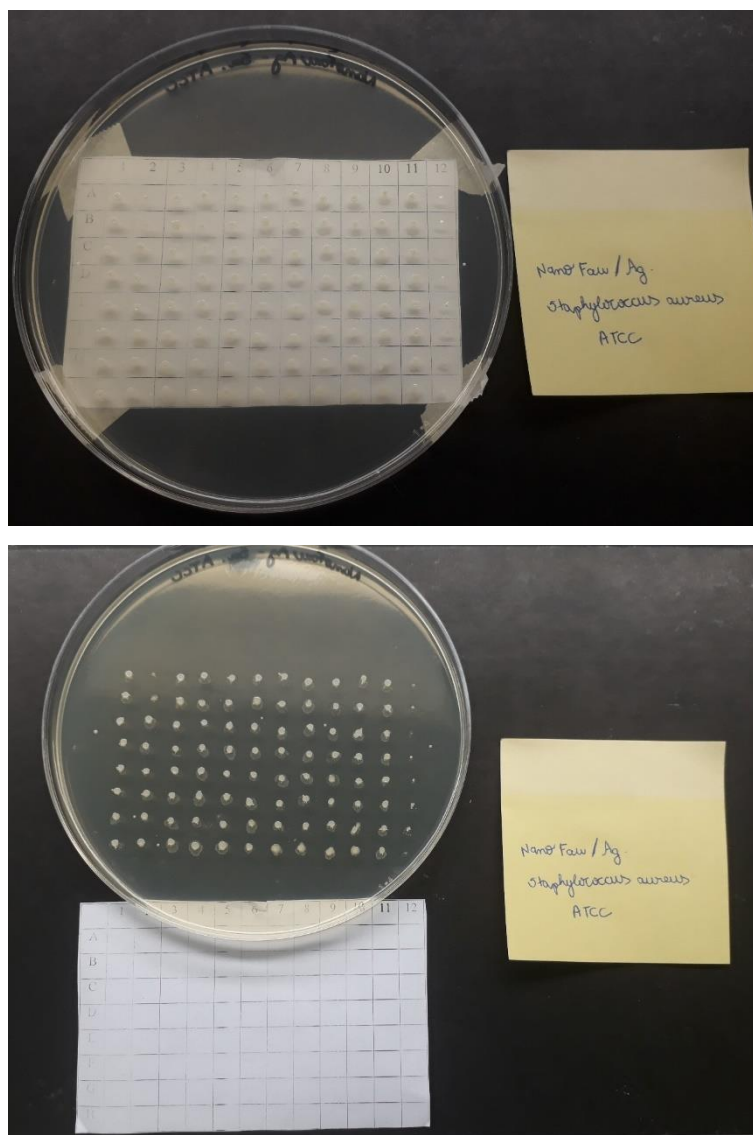
crescimento, foi observado que houve crescimento de microrganismos em todos os poços o que sugere que os microrganismos são viáveis, enquanto que a fileira 12 de Controle negativo não houve crescimento de microrganismos. Pode-se notar que a zeólita que sofreu troca iônica com íons prata apresentou uma melhor capacidade de inibir o crescimento microbiano em uma menor concentração quando comparado a zeólita antes do processo de troca iônica (NanoFau).

Figura 95 Imagem fotográfica das placas de Elisa contendo zeólitas NanoFAU_Ag frente ao microrganismo *Staphylococcus aureus*



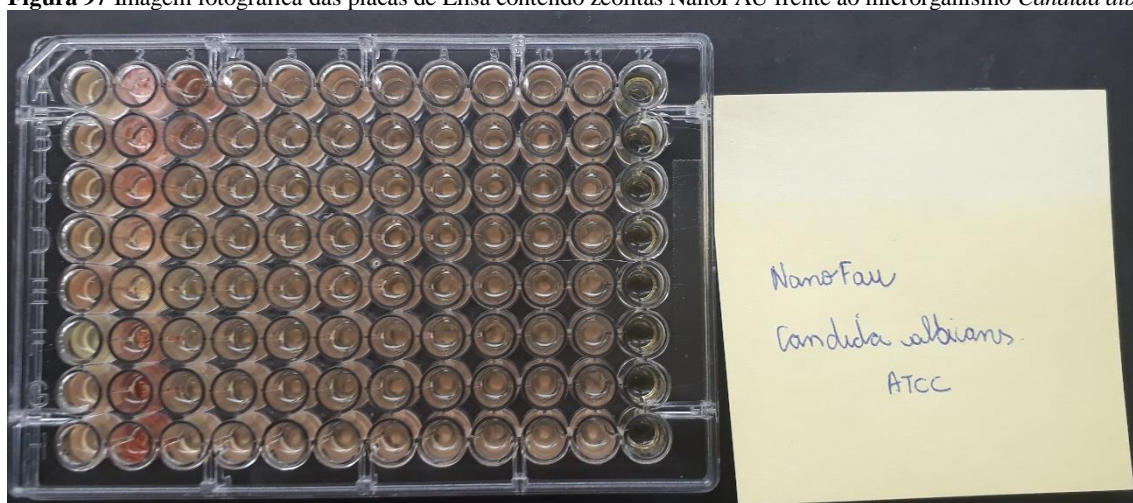
A Figura 96 mostra as colônias de microrganismos *Staphylococcus aureus* repicadas da placa de elisa contendo zeólitas NanoFau_Ag para placas de ágar Mueller-Hinton. Pode-se observar o crescimento de colônias nos poços onde houveram alteração na coloração na placa de elisa para vermelho. Em relação aos repiques referente aos poços 2A e 2B (1mg/mL e 0,5 mg/mL, respectivamente), não houve formação de colônias, o que sugere que para o microrganismos *Staphylococcus aureus*, a zeólita NanoFau_Ag foi capaz de impedir o crescimento e a proliferação bacteriana.

Figura 96 Imagem fotográfica das colônias de crescimento de microrganismos *Staphylococcus aureus* em ágar Mueller-Hinton replicada da placa de elisa contendo diluições de NanoFau_Ag



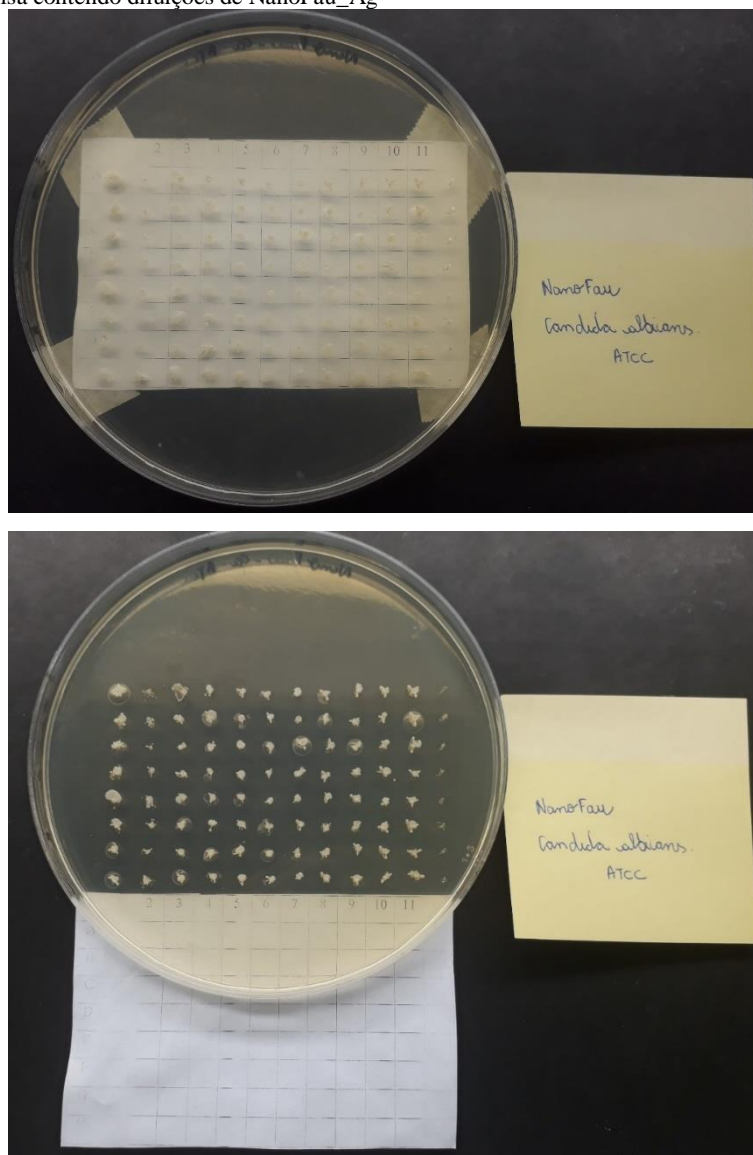
A Figura 97 mostra a placa de elisa onde foi realizada a diluição sequencial da zeólita NanoFau frente ao microrganismo *Candida albicans*, após a adição do corante TTC. Foi possível observar uma ligeira alteração na coloração dos poços, exceto a fileira 12 (Controle Negativo) em que a coloração do meio de cultura permaneceu com a coloração original. Sendo assim, a zeólita NanoFau não possui a capacidade de inibir o crescimento dos microrganismos independente da concentração.

Figura 97 Imagem fotográfica das placas de Elisa contendo zeólitas NanoFAU frente ao microrganismo *Candida albicans*



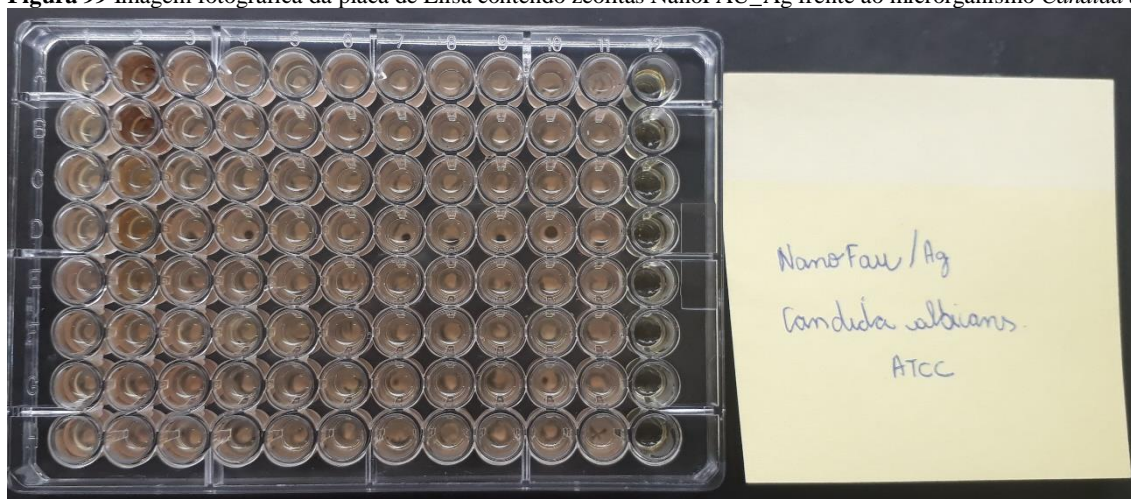
A Figura 98 mostra as colônias de microrganismos *Candida albicans* repicadas da placa de elisa contendo zeólitas NanoFau para placas de ágar Mueller-Hinton. Pode-se observar o crescimento de colônias em todos os poços, exceto na fileira 12 (Controle Negativo).

Figura 98 Imagem fotográfica das colônias de crescimento de microrganismos *Candida albicans* em ágar Mueller-Hinton repicada da placa de elisa contendo diluições de NanoFau_Ag



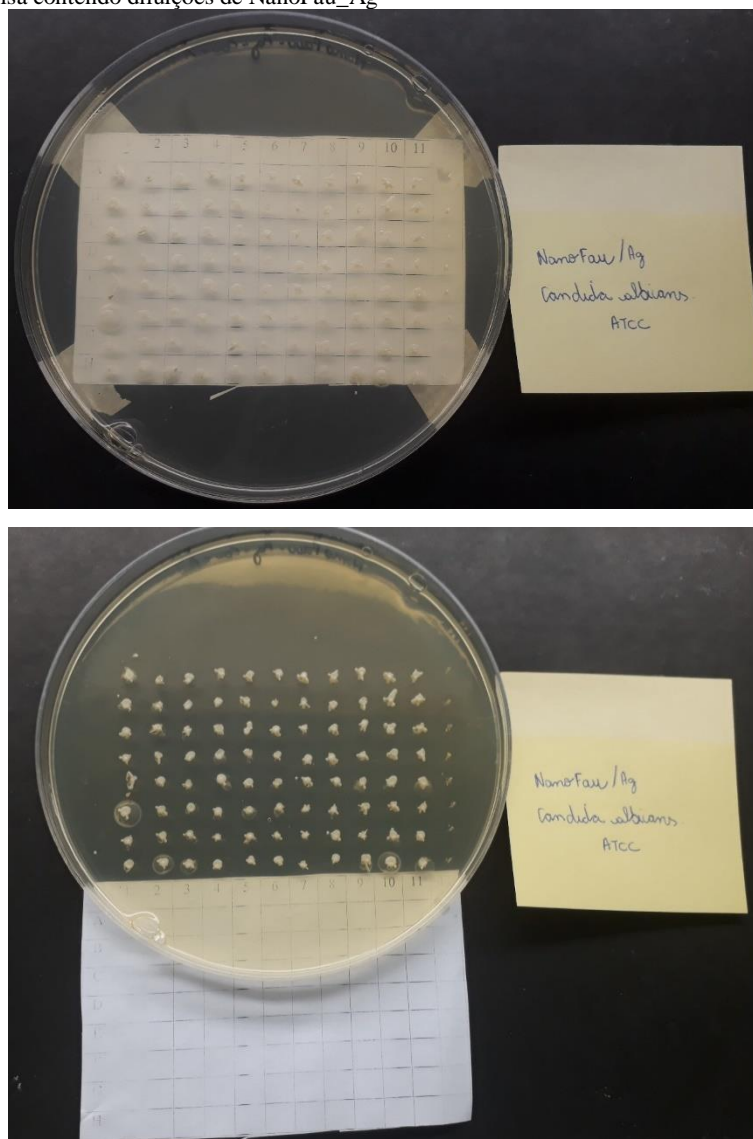
A Figura 99 mostra a placa de elisa onde foi realizada a diluição sequencial da zeólita NanoFau_Ag frente ao microrganismo *Candida albicans*. Foi possível observar uma ligeira alteração na coloração dos poços. Por outro lado, os poços 2A e 2B, cuja concentrações de zeólitas foram 1 e 0,5 mg/mL de NanoFau_Ag, respectivamente, apresentaram uma alteração na coloração diferentemente dos demais, caracterizando assim uma inibição no crescimento microbianos. A fileira 12 (Controle Negativo) não foi observado nenhuma alteração na coloração, logo não houve crescimento microbiano.

Figura 99 Imagem fotográfica da placa de Elisa contendo zeólitas NanoFAU_Ag frente ao microrganismo *Candida albicans*



A Figura 100 mostra as colônias de microrganismos *Candida albicans* repicadas a partir da placa de elisa contendo zeólitas NanoFau_Ag para placas de ágar Mueller-Hinton. Pode-se observar o crescimento de colônias em todos os poços, exceto na fileira 12 (Controle Negativo). Houve crescimento também nos poços 2A e 2B, porém em tamanho menor quando comparado às outras colônias. Isto sugere que a zeólita NanoFau_Ag, neste caso, atuou por mecanismo fungistático em que somente ocorreu a inibição do crescimento do microrganismo enquanto estavam em contato com a zeólita. O comportamento fungistático neste caso não foi semelhante ao observado no experimento realizado no item 5.12.1 a, mesmo utilizando a mesma quantidade de zeólita. No experimento anterior não houve formação de colônias após o repique em placa de ágar Mueller-Hinton (ver Figura 87) para a *Candida albicans*, já no presente experimento, foi observado crescimento de colônias. A divergência de resultados pode estar relacionada ao mecanismo de ação de zeólitas com prata. Estudos de Takai *et al.*¹⁸⁶ relatou que existem diferenças específicas nas taxas de inativação de vários microrganismos expostos à zeólitas com prata¹⁸⁷. De acordo com o autor, a atividade antimicrobiana de zeólitas de prata resulta da geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) derivadas do oxigênio dissolvido em ambientes aeróbios, incluindo ânions superóxido, peróxido de hidrogênio, radicais de hidróxilos, e que a atividade antibacteriana de zeólitas de prata podem ser inibidos por sequestrantes de ROS^{186; 187}. Nesse contexto, as várias espécies de microrganismos podem exibir maior ou menor sensibilidade as zeólitas devido as diferenças intrínsecas em suas habilidades para lidar com o estresse oxidativo^{187; 188}.

Figura 100 Imagem fotográfica das colônias de crescimento de microrganismos *Candida albicans* em ágar Mueller-Hinton replicada da placa de elisa contendo diluições de NanoFau_Ag



6 Conclusões

O principal objetivo deste trabalho foi a síntese, caracterização e modulação de diferentes materiais zeolíticos nas escalas nanométricas e micrométricas (Faujasita (FAU), Gismondina (GIS), Mordenita (MOR), zeólita A (LTA), zeólita Beta (BEA), Titâno Silicato (TS-1)) para que os mesmos possam ser usados como agentes hemostáticos coagulantes e antimicrobianos. Inicialmente, os materiais foram sintetizados e caracterizados, para em seguida serem testados como agentes hemostáticos. As conclusões dessa pesquisa de doutorado são:

- Zeólitas Faujasita (FAU), Titano-silicato (TS-1), Gismondina (GIS), Mordenita (MOR), zeólita A (LTA), zeólita Beta (BEA) podem ser sintetizadas na escala micrométrica e nanométrica através do processo sol-gel e via rota hidrotérmica. Caracterizações físico-químicas indicam que os materiais foram obtidos em suas fases puras e cristalinas;
- Zeólitas na escala micrométrica e nanométricas são submetidas ao processo de troca iônica com os íons Ca^{2+} , Mg^{2+} , Ba^{2+} e Ag^+ com o objetivo de modular suas propriedades físico-químicas para atuarem como agentes hemostáticos coagulantes;
- Com a determinação dos pontos isoelétricos para cada zeólita, observa-se que todos os materiais sintetizados apresentam uma natureza pro-coagulante, por apresentarem um ponto isoelétrico abaixo do pH sanguíneo (7.0);
- Os melhores resultados dos estudos via tromboelastografia são obtidos com a zeólita Faujasita na escala nanométrica trocada com o íon Ca^{2+} (NanoFau_Ca). Os parâmetros R (tempo de formação de um coágulo com um tamanho de 2 mm), K (tempo para um coágulo atingir 20 mm) e MA (propriedade elástica da fibrina) são 1,1 min, 1,2 min, e 60.3 mm, respectivamente;
- Análises térmicas dos materiais zeolíticos indicam que após o processo de troca iônica, ocorreu uma diminuição na energia liberada, o que sugere que os materiais têm o potencial de evitar queimaduras graves, um dos efeitos colaterais típicos destes materiais;
- Análises qualitativa do efeito antimicrobiano das zeólitas no crescimento de microrganismos mostram que o derivado de troca iônica de prata da zeólita faujasita na escala nanométrica tem a capacidade de inibir o crescimento dos

microrganismos testados neste trabalho (*Candida albicans*, *Candida parapsilosis* e *Staphylococcus aureus*), sendo uma característica adicional bastante positiva para estes materiais.

7 Perspectivas

Em vista dos resultados experimentais alcançado e aqui descritos, novas perspectivas de aprofundamento desse estudo estão sendo consideradas. Entre as principais, destaca-se:

- Estudos tromboelastográficos detalhados dos demais materiais nanozeolíticos e seus derivados de troca iônica. Entre eles destacamos os derivados de troca iônica da zeólita Gismondina (GIS), Mordenita (MOR), zeólita Beta (BEA), titanossilicato (TS-1) e zeólita A (LTA);
- Estudo da ação hemostática e coagulantes de cations de transição (Zn^{2+} , Co^{2+} , Mn^{2+} , Sr^{2+}) trocados com as nanozeólitas pesquisadas nesse estudo;
- Estudos de biocompatibilidade e estabilidade dos materiais sintetizados;
- Testes *in vivo* dos agentes hemostáticos a base de materiais zeolíticos em modelos biológicos na University of Texas-Health Science Center at Houston;
- Aprofundamento dos estudos microbiológicos com os agentes hemostáticos descrito nesse trabalho visando entender a ação dos diferentes íons na matriz zeolítica e sua ação coagulante e antimicrobiana.

8 Referências

- 1 BRECK, D. W. Zeolite Molecular Sieves, Structure, Chemistry and Use. New York, London, Sydney, Toronto: John Wiley & Sons 1974.
- 2 OSTOMEL, T. A.; .; STOIMENOV, P.K. HOLDEN, P.A. et al. Host-guest composites for induced hemostasis and therapeutic healing in traumatic injuries. *Journal of Thrombosis and Thrombolysis*, v. 22, n. 1, p. 55-67, Aug 2006.
- 3 EM, F. In: LVC Rees, ed. Proceedings of Fifth International Conference on Zeolites. London: Hezden, 1980. p.
- 4 AUERBACH, S. M.; CARRADO, K. A.; DUTTA, P. K. Medical Applications of Zeolites. In: (Ed.). *Handbook of Zeolite Science and Technology*. USA: CRC Press, 2003. cap. Chapter 24, p.1204.
- 5 MUMPTON, F. A. La roca magica: Uses of natural zeolites in agriculture and industry. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 96, n. 7, p. 3463-3470, 1999.
- 6 CERRI, G.; GENNARO, M.; BONFERONI, M. C. et al. Zeolites in biomedical application: Zn-exchanged clinoptilolite-rich rock as active carrier for antibiotics in anti-acne topical therapy. *Applied Clay Science*, v. 27, n. 3-4, p. 141-150, 2004.
- 7 RODRIGUEZ FUENTES, G.; BARRIOS, M. A.; IRAIZOZ, A. et al. Enterex: Anti-diarrheic drug based on purified natural clinoptilolite. *Zeolites*, v. 19, n. 5-6, p. 441-448, Nov-Dec 1997.
- 8 LI, Z.; HÜVE, J.; KRAMPE, C. et al. Internalization Pathways of Anisotropic Disc-Shaped Zeolite L Nanocrystals with Different Surface Properties in HeLa Cancer Cells. *Small*, v. 9, n. 9-10, p. 1809-1820, 2013.
- 9 SOLDATKIN, O. O.; ERRACHID, A.; SOY, E. et al. Influence of composition of zeolite/enzyme nanobiocomposites on analytical characteristics of urea biosensor based on ion-selective field-effect transistors. *Sensor Lett.*, v. 9, p. 2320-6, 2011.
- 10 KEETING, P. E.; OURSLER, M. J.; WIEGAND, K. E. et al. Zeolite a increases proliferation, differentiation, and transforming growth factor β production in normal adult human osteoblast-like cells in vitro. *Journal of Bone and Mineral Research*, v. 7, n. 11, p. 1281-1289, 1992.
- 11 BALKUS, K. J.; BRESINSKA, I. Molecular sieve based MRI contrast agents. *Journal of Alloys and Compounds*, v. 207, p. 25-28, 1994.

- 12 RIMOLI, M. G.; RABAIOLI, M. R.; MELISI, D. et al. Applying dehydrated zeolite molecular sieve material Synthetic zeolites as a new tool for drug delivery. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, v. 87 A, n. 1, p. 156-164, 2008.
- 13 CISNEROS, V.; OCANTO, F.; LINARES, C. F. Ca²⁺, Mg²⁺ or Fe²⁺ ion-exchanged cancrinite-type zeolites as possible hypoglycemic agents. *Revista latinoamericana de química*, v. 39, p. 55-61, 2011.
- 14 WECKHUUSEN, B. M.; VERBERCKMOES, A. A.; VANNIJVEL, I. P. et al. Zeolite encaged Cu(histidine) complexes as mimics of natural Cu enzymes. *Angewandte Chemie-International Edition*, v. 34, n. 23-24, p. 2652-2654, 1995.
- 15 COLELLA, C. A critical reconsideration of biomedical and veterinary applications of natural zeolites. *Clay Minerals*, v. 46, n. 2, p. 295-309, 2011.
- 16 KOZEN, B. G.; KIRCHER S. J.; HENAO J. et al. An alternative hemostatic dressing: Comparison of CELOX, HemCon, and QuikClot. *Academic Emergency Medicine*, v. 15, n. 1, p. 74-81, 2008.
- 17 ALAM, H. B.; CHEN Z.; JASKILLE A. et al. Application of a zeolite hemostatic agent achieves 100% survival in a lethal model of complex groin injury in swine. *Journal of Trauma-Injury Infection and Critical Care*, v. 56, n. 5, p. 974-983, 2004.
- 18 HUEY, R.; LO, D.; BURNS, D. J. Clay-based hemostatic agents and devices for the delivery thereof: *Google Patents* 2007.
- 19 ACHNECK, H. E.; SILESHI, B.; JAMIOLKOWSKI, R. M. et al. A Comprehensive Review of Topical Hemostatic Agents Efficacy and Recommendations for Use. *Annals of Surgery*, v. 251, n. 2, p. 217-228, 2010.
- 20 ALAM, H. B.; BURRIS, D.; DACORTA, J. A. et al. Hemorrhage control in the battlefield: Role of new hemostatic agents. *Military Medicine*, v. 170, n. 1, p. 63-69, 2005.
- 21 ERYILMAZ, M.; OZER, T.; MENTEŞ, O. et al. Is the zeolite hemostatic agent beneficial in reducing blood loss during arterial injury? *Ulusal Travma Ve Acil Cerrahi Dergisi-Turkish Journal of Trauma & Emergency Surgery*, v. 15, n. 1, p. 7-11, 2009.
- 22 LI, J.; CAO, W.; LV, X. et al. Zeolite-based hemostat QuikClot releases calcium into blood and promotes blood coagulation in vitro. *Acta Pharmacologica Sinica*, v. 34, n. 3, p. 367-372, 2013.
- 23 DA ROCHA MOTTA FILHO, G.; SILVA, L. F.; FERRACINI, A. M. et al. Protocolo de cirurgia segura da OMS: o grau de conhecimento dos ortopedistas

- brasileiros. *Revista Brasileira de Ortopedia*, v. 48, n. 6, p. 554-562, 2013.
- 24 PUSATERI, A. E.; HOLCOMB, J. B.; KHEIRABADI, B. S. et al. Making sense of the preclinical literature on advanced hemostatic products. *Journal of Trauma-Injury Infection and Critical Care*, v. 60, n. 3, p. 674-682, 2006.
- 25 RHEE, P.; BROWN, C.; MARTIN, M. et al. QuikClot use in trauma for hemorrhage control: Case series of 103 documented uses. *Journal of Trauma-Injury Infection and Critical Care*, v. 64, n. 4, p. 1093-1099, 2008.
- 26 GALEN D, S.; OSTOMEL, T. A.; SHI, et al. Inorganic materials for hemostatic modulation and therapeutic wound healing. *Google Patents*, 7858123B2 2010.
- 27 OSTOMEL, T. A.; SHI, Q. H.; STUCKY, G. D. Oxide hemostatic activity. *Journal of the American Chemical Society*, v. 128, n. 26, p. 8384-8385, 2006.
- 28 AHUJA, N.; OSTOMEL, T. A.; RHEE, P. et al. Testing of modified zeolite hemostatic dressings in a large animal model of lethal groin injury. *Journal of Trauma-Injury Infection and Critical Care*, v. 61, n. 6, p. 1312-1320, 2006.
- 29 GERLACH, T.; GRAYSON, J. K.; PICHAKRON, K.O. et al. Preliminary Study of the Effects of Smectite Granules (WoundStat) on Vascular Repair and Wound Healing in a Swine Survival Model. *Journal of Trauma-Injury Infection and Critical Care*, v. 69, n. 5, p. 1203-1209, 2010.
- 30 ZHANG, Y. L.; XU, C.; HE, Y. et al. Zeolite/Polymer Composite Hollow Microspheres Containing Antibiotics and the In Vitro Drug Release. *Journal of Biomaterials Science-Polymer Edition*, v. 22, n. 4-6, p. 809-822, 2011.
- 31 MORTAZAVI, S. M. J.; TAVASOLI, A.; ATEFI, M. et al. CoolClot, a novel hemostatic agent for controlling life-threatening arterial bleeding. *World Journal of Emergency Medicine, China*, v. 4, n. 2, p. 123-127, 2013.
- 32 ALAVI, M.; TOTONCHI, A.; OKHOVAT, M. A. et al. The effect of a new impregnated gauze containing bentonite and halloysite minerals on blood coagulation and wound healing. *Blood Coagulation & Fibrinolysis*, v. 25, n. 8, p. 856-859, 2014.
- 33 BEYAZIT, Y.; HURI, E.; PURNAK, T. et al. Next Generation Nanomedicine in the Genesis of "Ankaferd Blood Stopper Nanohemostat" A Novel Chimeric Topical Hemostatic Agent for Clinical Hemorrhages. *Clinical and Applied Thrombosis-Hemostasis*, v. 20, n. 4, p. 456-457, 2014.
- 34 HURI, E.; AKGÜL, T.; AYYILDIZ, A. et al. Hemostatic Role of a Folkloric Medicinal Plant Extract in a Rat Partial Nephrectomy Model: Controlled Experimental Trial. *The Journal of Urology*, v. 181, n. 5, p. 2349-2354, 2009.

- 35 ORHAN, I.; DOGAN, R.; SOYLU, E. et al. Histopathological evaluation of Ankaferd blood stopper use in the rabbit septoplasty model. *International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology*, v. 79, n. 3, p. 305-309, 2015.
- 36 ELLIS-BEHNKE, R. At the nanoscale: nanohemostat, a new class of hemostatic agent. *Wiley Interdisciplinary Reviews-Nanomedicine and Nanobiotechnology*, v. 3, n. 1, p. 70-78, 2011.
- 37 LAURENTI, J. B.; ZAZERI, G.; POVINELLI, A. P. R. et al. Enhanced pro-coagulant hemostatic agents based on nanometric zeolites. *Microporous and Mesoporous Materials*, v. 239, p. 263-271, 2017.
- 38 TOSHEVA, L.; Hölzlb, M.; Metzger, T. H. et al. Zeolite beta films synthesized from basic and near-neutral precursor solutions and gels. *Materials Science & Engineering C-Biomimetic and Supramolecular Systems*, v. 25, n. 5-8, p. 570-576, 2005.
- 39 WEITKAMP, J. Zeolites and catalysis. *Solid State Ionics*, v. 131, n. 1-2, p. 175-188, 2000.
- 40 WRIGHT, J. K.; KALNS, J. WOLF, E. A. TRAWEEK, F. et al. Thermal injury resulting from application of a granular mineral hemostatic agent. *Journal of Trauma-Injury Infection and Critical Care*, v. 57, n. 2, p. 224-230, 2004.
- 41 HURTADO, T. R.; WISENBAUGH, T. Images in Emergency Medicine. *Annals of Emergency Medicine*, v. 46, n. 3, p. 297, 2005.
- 42 GHOBARKAR, H.; SCHAF, O.; GUTH, U. Zeolites - from kitchen to space. *Progress in Solid State Chemistry*, v. 27, n. 2-4, p. 29-73, 1999.
- 43 BRAGA, A. A. C.; MORGON, N. H. Descriptions of crystalline structures of zeolites. *Quimica Nova*, v. 30, n. 1, p. 178-188, 2007.
- 44 FIGUEIREDO GRECCO, S. D. T.; RANGEL, M. D. C.; URQUIETA-GONZALEZ, E. A. Hierarchically structured zeolites. *Quimica Nova*, v. 36, n. 1, p. 131-U372, 2013.
- 45 SHERMAN, J. D. Synthetic zeolites and other microporous oxide molecular sieves (vol 96, pg 3471, 1999). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 97, n. 11, p. 6236-6236, 2000.
- 46 LUNA, F. J.; SCHUCHARDT, U. Modifying zeolites for use in catalysis. *Quimica Nova*, v. 24, n. 6, p. 885-892, 2001.
- 47 CORMA, A. State of the art and future challenges of zeolites as catalysts. *Journal*

- of Catalysis*, v. 216, n. 1-2, p. 298-312, 2003.
- 48 THOMAS, J. M. Hydrothermal Chemistry of Zeolites - BARRER, R.M. *Chemistry & Industry*, n. 19, p. 757-758, 1983.
- 49 CUNDY, C. S.; FORREST, J. O.; PLAISTED, R. J. Some observations on the preparation and properties of colloidal silicalites. Part 1: synthesis of colloidal silicalite-1 and titanosilicalite-1 (TS-1). *Microporous and Mesoporous Materials*, v. 66, n. 2-3, p. 143-156, 2003.
- 50 CUNDY, C. S.; COX, P. A. The hydrothermal synthesis of zeolites: Precursors, intermediates and reaction mechanism. *Microporous and Mesoporous Materials*, v. 82, n. 1-2, p. 1-78, 2005.
- 51 VASCONCELLOS, A. Sínteses e caracterização de novos catalisadores zeolíticos e sua utilização como suportes inorgânicos para imobilização de Lípase produzida por *Rhizomucor miehei* e seu estudo catalítico na reação de transesterificação do óleo de soja para a produção de biodiesel. 2010. 126 (*Mestrado*). Microbiologia, Universidade Estadual Paulista "Julio de Mesquita Filho", São José do Rio Preto.
- 52 ZHAN, B. Z.; WHITE, M. A.; LUMSDEN, M. et al. Control of particle size and surface properties of crystals of NaX zeolite. *Chemistry of Materials*, v. 14, n. 9, p. 3636-3642, 2002.
- 53 MELO, C. R.; RIELLA, H. G. Síntese de zeólita tipo NaA a partir de caulim para obtenção de zeólita 5A através de troca iônica. *Cerâmica*, v. 56, n. 340, p. 340-346, 2010.
- 54 LUZ, A. B. Zeólitas: propriedades e usos industriais. *CETEM, Série Tecnologia Mineral*. Rio de Janeiro 1995.
- 55 PAVELIC, K.; HADZIJA, M. Medical application of zeolites. In: (Ed.). *Handbook of Zeolites Science and technology*. New York: Marcel Dekker, Inc., 2003.
- 56 FLORES, W. F.; MACHADO, N. R. C. F. Tratamento de efluentes com cálcio metálico por troca iônica com zeólitas comerciais e materiais zeolíticos natural. Uberlândia - MG: *VIII Congresso Brasileiro de Engenharia Química em Iniciação Científica*, 2009.
- 57 GALOWNIA, J.; MARTIN, J.; DAVIS, M. E. Aluminophosphate-based, microporous materials for blood clotting. *Microporous and Mesoporous Materials*, v. 92, n. 1-3, p. 61-63, 2006.
- 58 HURSEY, F. H., W; DECHENE, F. J. Applying dehydrated zeolite molecular

- sieve material. PATENT, U. S. UNITED STATES. US4.822.349 25 abr. 1984, 18 abr. 1989.
- 59 MCMANUS, J.; HURTADO, T.; PUSATERI, A. et al. A case series describing thermal injury resulting from zeolite use for hemorrhage control in combat operations. *Prehospital Emergency Care*, v. 11, n. 1, p. 67-71, 2007.
- 60 ARNAUD, F.; TOMORI, T.; CARR, W. et al. Exothermic reaction in zeolite hemostatic dressings: QuikClot ACS and ACS+(R). *Annals of Biomedical Engineering*, v. 36, n. 10, p. 1708-1713, 2008.
- 61 KAZANCIOGLU, H. O.; CAKIR, O.; AK, G.; ZÜLFİKAR, B. et al. The Effectiveness of a New Hemostatic Agent (Ankaferd Blood Stopper) for the Control of Bleeding following Tooth Extraction in Hemophilia: A Controlled Clinical Trial. *Turkish Journal of Hematology*, v. 30, n. 1, p. 19-24, 2013.
- 62 HURSEY, F. X.; DECHENE, F. J. et al. Zeolite molecular sieve material: On Site Gas Systems Inc; Univ Connecticut; Hursey F X; Wu a; Suib S L; Bushmich S L; Liu J; Hincapie B.
- 63 BEDARD, R. L.; WILCHER, S. A. Adsorbent-containing hemostatic devices: *Google Patents* 2014.
- 64 DAVIS, M. Aluminophosphate-based materials for the treatment of wounds: *Google Patents* 2006.
- 65 MENTKOW, J.; MENTKOW, L. Hemostatic Agent Composition, Delivery System and Method: *Google Patents* 2010.
- 66 _____ Method for improving haemostatic effect of external-use zeolite haemostatic. *Google Patents* 2010.
- 67 _____ Externally-applied zeolite hemostat and its preparation. *Google Patents* 2010.
- 68 BENALIOUCHE, F.; HIDOUS, N.; GUERZA, M. et al. Characterization and water adsorption properties of Ag- and Zn-exchanged A zeolites. *Microporous and Mesoporous Materials*, v. 209, n. 0, p. 184-188, 2015.
- 69 BRASIL. Resolução RDC nº 185, de 22 de outubro de 2001. Aprova o regulamento técnico sobre o registro, cadastramento, Revalidação e Cancelamento do Registro de Produtos Médico. Resolução RDC nº 185, de 22 de outubro de 2001. Órgão emissor: ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/anvisaegis/resol/2001/185_01rdc.htm. Acesso em 14 de jan. de 2016.

- 70 ABDI, Agência Brasileira de Desenvolvimento Industrial. Manual de registro e cadastramento de materiais de uso em saúde. *Brasília*: 306 p. 2011.
- 71 HORN, J.; HUEY, R. Pillow for the delivery of blood clotting materials to a wound site: *Google Patents* 2005.
- 72 HORN, J.; HUEY, R. Device for the delivery of blood clotting materials to a wound site: *Google Patents* 2005.
- 73 HORN, J.; HUEY, R. J. Swab device and kit for the delivery of blood clotting materials to a wound site: *Google Patents* 2005.
- 74 HUEY, R.; HORN, J.; LO, D. Devices and methods for promoting the formation of blood clots in esophageal varices: *Google Patents* 2007.
- 75 LO, D.; BASADONNA, G. Radio-opaque hemostatic agents and devices and methods for the delivery thereof: *Google Patents* 2007.
- 76 LO, D. Heat mitigating hemostatic agent: *Google Patents* 2006.
- 77 FISCHER, T. H. et al. Hemostatic textile: *Google Patents* 2012.
- 78 SMITH, S. A. The cell-based model of coagulation. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care*, v. 19, n. 1, p. 3-10, 2009.
- 79 MACFARLANE, R. G. Enzyme cascade in blood clotting mechanism + its function as biochemical amplifier. *Nature*, v. 202, n. 493, p. 498-&, 1964.
- 80 DAVIE, E. W.; RATNOFF, O. D. Waterfall sequence for intrinsic blood clotting. *Science*, v. 145, n. 363, p. 1310-&, 1964.
- 81 RIDDEL, J. P.; AOUIZERAT B. E.; MIASKOWSKI, C. et al. Theories of blood coagulation. *Journal of Pediatric Oncology Nursing*, v. 24, n. 3, p. 123-131, 2007.
- 82 CARLOS, M.; FREITAS, P. Estudo da cascata de coagulação sanguínea e seus valores de referência: *Acta Veterinaria Brasilica*. 1: 49-55 p. 2007.
- 83 FRANCO, R. F. Fisiologia da coagulação, anticoagulação e fibrinólise. *Medicina, Ribeirão Preto*, v. 34, p. 229-237, 2001.
- 84 JOHARI, V.; LOKE, C. Brief Overview of the Coagulation Cascade. *Disease-a-Month*, v. 58, n. 8, p. 421-423, 2012.
- 85 FERREIRA, C. N.; SOUZA, M. O.; DUSSE, L. M. S. et al. O novo modelo da

- cascata de coagulação baseado nas superfícies celulares e suas implicações: *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*. 32: 416-421 p. 2010.
- 86 HOFFMAN, M.; MONROE, D. M. A cell-based model of hemostasis. *Thrombosis and Haemostasis*, v. 85, n. 6, p. 958-965, 2001.
- 87 GALVEZ C, K.; CORTES L, C. Thromboelastography: New concepts in haemostasis physiology and correlation with trauma associated coagulopathy. *Colombian Journal of Anesthesiology*, v. 40, n. 3, p. 224-230, 2012.
- 88 BECKER, R. C. Cell-based models of coagulation: A paradigm in evolution. *Journal of Thrombosis and Thrombolysis*, v. 20, n. 1, p. 65-68, 2005.
- 89 PEREZ-GOMEZ, F.; BOVER, R. The new coagulation cascade and its possible influence on the delicate balance between thrombosis and hemorrhage. *Revista Espanola De Cardiologia*, v. 60, n. 12, p. 1217-1219, 2007.
- 90 VINE, A. K. Recent advances in haemostasis and thrombosis. *Journal of Retinal and Vitreous Diseases*, v. 29, n. 1, p. 1-7, 2009.
- 91 ADAMS, R. L. C.; BIRD, R. J. Review article: Coagulation cascade and therapeutics update: Relevance to nephrology. Part 1: Overview of coagulation, thrombophilias and history of anticoagulants. *Nephrology*, v. 14, n. 5, p. 462-470, 2009.
- 92 BOWERS, J.; FERGUSON, J. J. Use of the activated clotting time in anticoagulation monitoring of intravascular procedures. *Texas Heart Institute Journal*, v. 20, n. 4, p. 258-263, 1993.
- 93 RACIOPPI, L.; QUINART, A.; BIAIS, M. et al. Validation of a bedside activated clotting time test (Hemochron((R)) Jr II Signature) with low dose heparin therapy. *Anaesthesia*, v. 64, n. 4, p. 430-434, 2009.
- 94 HATTERSL, P. G. Activated coagulation time of whole blood. *Journal of the American Medical Association*, v. 196, n. 5, p. 436-&, 1966
- 95 DONAHUE, S. M.; OTTO, C. M. Thromboelastography: a tool for measuring hypercoagulability, hypocoagulability, and fibrinolysis. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care*, v. 15, n. 1, p. 9-16, 2005.
- 96 SALOOJA, N.; PERRY, D. J. Thrombelastography. *Blood Coagulation & Fibrinolysis*, v. 12, n. 5, p. 327-337, 2001.
- 97 PENG, H. T.; RHIND, S. G. Thromboelastographic Study of Psychophysiological Stress: A Review. *Clinical and Applied Thrombosis-Hemostasis*, v. 21, n. 6, p. 497-512, 2015.

- 98 EINSTEN, M. D. Tromboelastografia/Tromboelastrometria. Disponível em: <http://medsv1.einstein.br/doc/novidades/TEG2.pdf>. Acesso em 05 de jul. de 2016
- 99 BOLLIGER, D.; SEEBERGER, M. D.; TANAKA, K. A. Principles and Practice of Thromboelastography in Clinical Coagulation Management and Transfusion Practice. *Transfusion Medicine Reviews*, v. 26, n. 1, p. 1-13, 2012.
- 100 TRAPANI, L. M. Thromboelastography: current applications, future directions. 2013.
- 101 VIG, S.; CHITOLIE, A.; BEVAN, D. H. et al. Thromboelastography: a reliable test? *Blood coagulation & fibrinolysis*, v. 12, n. 7, p. 555-561, 2001.
- 102 DAVENPORT, R.; KHAN, S. Management of major trauma haemorrhage: treatment priorities and controversies. *British Journal of Haematology*, v. 155, n. 5, p. 537-548, 2011.
- 103 OSTOMEL, T. A.; SHI, Q. H., STUCKY, G. D. et al. Metal Oxide Surface Charge Mediated Hemostasis. *Langmuir*, v. 23, n. 22, p. 11233-11238, 2007.
- 104 LI, Y.; LIAO, X.; ZHANG, X. et al. In situ generated thrombin in the protein corona of zeolites: Relevance of the functional proteins to its biological impact. *Nano Research*, v. 7, n. 10, p. 1457-1465, 2014.
- 105 MONOPOLI, M. P.; ABERG, C.; SALVATI, A. et al. Biomolecular coronas provide the biological identity of nanosized materials. *Nature Nanotechnology*, v. 7, n. 12, p. 779-786, 2012.
- 106 DENG, Z. J.; MONTEIRO, M.; LIANG, M. et al. Nanoparticle-induced unfolding of fibrinogen promotes Mac-1 receptor activation and inflammation. *Nature Nanotechnology*, v. 6, n. 1, p. 39-44, 2011.
- 107 LYNCH, I.; DAWSON, K. A.; LINSE, S. Detecting Cryptic Epitopes Created by Nanoparticles. *Science Signaling*, v. 2006, n. 327, 2006.
- 108 TENZER, S.; KUHAREV, J.; DOCTER, D. et al. Rapid formation of plasma protein corona critically affects nanoparticle pathophysiology. *Nat Nano*, v. 8, n. 10, p. 772-781, 2013.
- 109 BERNAL, C.; COUTO, A. B.; BREVIGLIERI, S. T. et al. Influência de alguns parâmetros experimentais nos resultados de análises calorimétricas diferenciais - DSC. *Química Nova*, v. 25, p. 849-855, 2002.
- 110 MULLER, J. C. M.; HAKVOORT, G.; JANSEN, J. C. DSC and TG study of

- water adsorption and desorption on zeolite NaA - Powder and attached as layer on metal. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, v. 53, n. 2, p. 449-466, 1998.
- 111 STUCKY, G. D.; OSTOMEL, T. A.; SHI, Q. et al. Inorganic materials for hemostatic modulation and therapeutic wound healing: *Google Patents*, 2010.
- 112 RIGO, R. T.; PERGHER, S. B. C.; PETKOWICZ, D. I. et al. Um novo procedimento de síntese da zeólita A empregando argilas naturais. *Química Nova*, v. 32, p. 21-25, 2009.
- 113 TEIXEIRA, V. G.; COUTINHO, F. M. B.; GOMES, A. S. Principais métodos de caracterização da porosidade de resinas à base de divinilbenzeno. *Química Nova*, v. 24, p. 808-818, 2001.
- 114 LEOFANTI, G.; PADOVANB, M.; TOZZOLAC, G. Numbers and letters correspond to the affiliation list. Click to expose these in author workspace. Author links open the author workspace. et al. Surface area and pore texture of catalysts. *Catalysis Today*, v. 41, n. 1-3, p. 207-219, 1998.
- 115 WECKHUYSEN, B. Surface and Nanomolecular Catalysis. Edited by Ryan Richards. *Angewandte Chemie International Edition*, v. 46, n. 4, p. 492-492, 2007.
- 116 SING, K. S. W. Reporting physisorption data for gas/solid systems with special reference to the determination of surface area and porosity (Recommendations 1984). *Pure and applied chemistry*, v. 57, n. 4, p. 603-619, 1985.
- 117 TEKIN, R.; BAC, N. Antimicrobial behavior of ion-exchanged zeolite X containing fragrance. *Microporous and Mesoporous Materials*, v. 234, p. 55-60, 2016.
- 118 REIJI NIIRA, D.; YAMAMOTO, T.; UCHIDA, M. Antibiotic zeolite: *Google Patents* 1990.
- 119 RIVERA-GARZA, M.; OLGUÍNA, M. T.; GARCÍA-SOSA, I. et al. Silver supported on natural Mexican zeolite as an antibacterial material. *Microporous and Mesoporous Materials*, v. 39, n. 3, p. 431-444, 2000.
- 120 FANG, M.; CHEN, J. H.; XU, X. L. et al. Antibacterial activities of inorganic agents on six bacteria associated with oral infections by two susceptibility tests. *International Journal of Antimicrobial Agents*, v. 27, n. 6, p. 513-517, 2006.
- 121 FERREIRA, L.; FONSECA, A. M.; BOTELHO, G. et al. Antimicrobial activity of faujasite zeolites doped with silver. *Microporous and Mesoporous Materials*, v. 160, p. 126-132, 2012.

- 122 KIM, J. S.; KUK, E.; YU, K. N. et al. Antimicrobial effects of silver nanoparticles. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, v. 3, n. 1, p. 95-101, 2007.
- 123 MATSUMURA, Y.; YOSHIKATA, K.; KUNISAKI, S. et al. Mode of bactericidal action of silver zeolite and its comparison with that of silver nitrate. *Applied and environmental microbiology*, v. 69, n. 7, p. 4278-4281, 2003.
- 124 DE VASCONCELLOS, A.; PAULA, A. S.; FILHO, R. A. L. et al. Synergistic effect in the catalytic activity of lipase *Rhizomucor miehei* immobilized on zeolites for the production of biodiesel. *Microporous and Mesoporous Materials*, v. 163, p. 343-355, 2012.
- 125 ZHAN, B. Z.; WHITE, M. A.; ROBERTSON, K. N. et al. A novel, organic-additive-free synthesis of nanometer-sized NaX crystals. *Chemical Communications*, n. 13, p. 1176-1177, 2001.
- 126 ZHANG, L.; VAN LAAK, A. N. C.; DE JONGH, P. E. et al. Synthesis of large mordenite crystals with different aspect ratios. *Microporous and Mesoporous Materials*, v. 126, n. 1-2, p. 115-124, Nov 2009.
- 127 TARAINASSO, M.; PEREGO, G.; NOTARI, B. United States. *Google Patents*, US Patent 4 410 501.
- 128 CAMBLOR, M. A.; CORMAA, A.; MIFSUD, A. et al. Synthesis of nanocrystalline zeolite Beta in the absence of alkali metal cations. *Progress in Zeolite and Microporous Materials*, p. 341-348, 1997.
- 129 KECHT, J.; MIHAILOVA, B.; KARAGHIOSOFF, K. et al. Nanosized gismondine grown in colloidal precursor solutions. *Langmuir*, v. 20, n. 13, p. 5271-5276, 2004.
- 130 BIEMMI, E.; BEIN, T. Assembly of nanozeolite monolayers on the gold substrates of piezoelectric sensors. *Langmuir*, v. 24, n. 19, p. 11196-11202, 2008.
- 131 SHUJIAN, Process for synthesis of nano mordenite molecular sieve. *Google Patents* 2009.
- 132 CUNDY, C. S.; FORREST, J. O. Some observations on the preparation and properties of colloidal silicalites Part II: Preparation, characterisation and properties of colloidal silicalite-1, TS-1, silicalite-2 and TS-2. *Microporous and Mesoporous Materials*, v. 72, n. 1-3, p. 67-80, 2004.
- 133 LARLUS, O.; MINTOVAB, S. ; WILSON, S. T. et al. A powerful structure-directing agent for the synthesis of nanosized Al- and high-silica zeolite Beta in

- alkaline medium. *Microporous and Mesoporous Materials*, v. 142, n. 1, p. 17-25, 2011.
- 134 FISHER, M. L.; COLIC, M.; RAO, M. P. et al. Effect of silica nanoparticle size on the stability of alumina/silica suspensions. *Journal of the American Ceramic Society*, v. 84, n. 4, p. 713-718, 2001.
- 135 DREBUSHCHAK, V. A. Measurements of heat of zeolite dehydration by scanning heating. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, v. 58, n. 3, p. 653-662, 1999.
- 136 CLSI M27-S4, C. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of yeasts. SUPPLEMENT, F. I. Wayne: *Clinical and Laboratory Standards Institute* 2012.
- 137 NCCL, NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY, S. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests. *National Committee for Clinical Laboratory Standards*, 2003.
- 138 KUMAR, S. N.; SIJI, J. V.; NAMBISAN, B. et al. Activity and synergistic interactions of stilbenes and antibiotic combinations against bacteria in vitro. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 28, n. 11, p. 3143-3150, 2012.
- 139 DE WAELE, V.; KECHTB, J.; TAHRIA, Z. et al. Diverse copper clusters confined in microporous nanocrystals. *Sensors and Actuators B-Chemical*, v. 126, n. 1, p. 338-343, 2007.
- 140 HUO, Z.; XU, X.; LU, Z. et al. Synthesis of zeolite NaP with controllable morphologies. *Microporous and Mesoporous Materials*, v. 158, p. 137-140, 2012.
- 141 ALY, H. M.; MOUSTAFA, M. E.; ABDELRAHMAN, E. A. Synthesis of mordenite zeolite in absence of organic template. *Advanced Powder Technology*, v. 23, n. 6, p. 757-760, 2012.
- 142 POURSHAHRESTANI, S.; ZEIMARAN, E., DJORDJEVIC, I. et al. Inorganic hemostats: The state-of-the-art and recent advances. *Materials Science Engineering C-Materials for Biological Applications*, v. 58, p. 1255-1268, 2016.
- 143 TOSHEVA, L.; VALTCHEV, V. P. Nanozeolites: Synthesis, crystallization mechanism, and applications. *Chemistry of Materials*, v. 17, n. 10, p. 2494-2513, 2005.
- 144 MEKATEL, H.; AMOKRANE, S.; BENTURKI, A. et al. Treatment of Polluted Aqueous Solutions by Ni²⁺, Pb²⁺, Zn²⁺, Cr⁺⁶, Cd⁺² and Co⁺² Ions by Ion

- Exchange Process Using Faujasite Zeolite. *Procedia Engineering*, v. 33, n. 0, p. 52-57, 2012.
- 145 SHERRY, H. S. The Ion-Exchange Properties of Zeolites. I. Univalent Ion Exchange in Synthetic Faujasite. *The Journal of Physical Chemistry*, v. 70, n. 4, p. 1158-1168, 1966.
- 146 NGOC, D. T.; PHAM, T. H.; NGUYEN, K. D. H. Synthesis, characterization and application of nanozeolite NaX from Vietnamese kaolin. *Advances in Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology*, v. 4, n. 4, p. 045018, 2013.
- 147 GHASEMI, Z.; YOUNESI, H. Preparation of free-template nanometer-sized Na-A and-X zeolites from rice husk ash. *Waste and Biomass Valorization*, v. 3, n. 1, p. 61-74, 2012.
- 148 CAMBLOR, M. A.; CORMA, A.; VALENCIA, S. Characterization of nanocrystalline zeolite Beta. *Microporous and Mesoporous Materials*, v. 25, n. 1-3, p. 59-74, 1998.
- 149 ZHUANG, J.; YAN, Z.; LIU, X. et al. NMR Study on the Acidity of TS-1 Zeolite. *Catalysis Letters*, v. 83, n. 1-2, p. 87-91, 2002.
- 150 BLASCO, T.; CAMBLOR, M. A.; CORMA, A. et al. Direct synthesis and characterization of hydrophobic aluminum-free Ti-beta zeolite. *Journal of Physical Chemistry B*, v. 102, n. 1, p. 75-88, 1998.
- 151 FYFE, C. A.; FENG, Y.; GRONDEY, H. et al. One- and two-dimensional high-resolution solid-state NMR studies of zeolite lattice structures. *Chemical Reviews*, v. 91, n. 7, p. 1525-1543, 1991.
- 152 AGUADO, J.; SERRANO, D. P.; RODRÍGUEZ, J. M. Zeolite Beta with hierarchical porosity prepared from organofunctionalized seeds. *Microporous and Mesoporous Materials*, v. 115, n. 3, p. 504-513, 2008.
- 153 BAYRAMOGLU, G.; YALCIN, E.; ARICA, M. Y. Immobilization of urease via adsorption onto l-histidine-Ni(II) complexed poly(HEMA-MAH) microspheres: preparation and characterization. *Process Biochem.*, v. 40, p. 3505-13, 2005.
- 154 CAN, L.; ZILI, W. Microporous Materials Characterized by Vibrational Spectroscopies. In: (Ed.). *Handbook of Zeolite Science and Technology*: CRC Press, 2003.
- 155 KARGE, H. Verified synthesis of zeolitic materials. Characterization by IR spectroscopy. Berlin, Germany: Fritz-Haber-Institut der Max-Planck-Gesellschaft: 3 p.

- 156 KANTAM, M. L.; BHAVNARI, P. C. R.; CHOUDARY, B. M. et al. Synthesis of nanocrystalline zeolite beta in supercritical fluids, characterization and catalytic activity. *Journal of Molecular Catalysis a-Chemical*, v. 252, n. 1-2, p. 76-84, 2006.
- 157 ALBERT, B. R.; CHEETHAMA, A. K.; STUARTB, J. A. et al. Investigations on P zeolites: synthesis, characterisation, and structure of highly crystalline low-silica NaP. *Microporous and Mesoporous Materials*, v. 21, n. 1, p. 133-142, 1998.
- 158 MOZGAWA, W.; KRÓL, W.; BARCZYK, K. FT-IR studies of zeolites from different structural groups: *Chemik*. 65: 667-674s p. 2011.
- 159 PIRUTKO, L. V.; URIARTEB, A. K.; CHERNYAVSKY, V. S. et al. Preparation and catalytic study of metal modified TS-1 in the oxidation of benzene to phenol by N₂O. *Microporous and Mesoporous Materials*, v. 48, n. 1-3, p. 345-353, 2001.
- 160 NASER-AZIZI, S.; DEHNAVI, A. R.; JOORABDOOZHA, A. Synthesis and characterization of LTA nanozeolite using barley husk silica: Mercury removal from standard and real solutions. *Materials Research Bulletin*, v. 48, n. 5, p. 1753-1759, 2013.
- 161 KUSABIRAKI, K. Infrared and raman spectra of vitreous silica and sodium silicates containing titanium. *Journal of Non-Crystalline Solids*, v. 95-6, p. 411-418, 1987.
- 162 MONEIM, M.; AHMED, E. Synthesis of Faujasite from Egyptian Clays: Characterizations and Removal of Heavy Metals: *Geomaterials*: 68-76 p. 2015.
- 163 THUADAIJ, P.; NUNTIYA, A. Effect of the SiO₂/Al₂O₃ ratio on the synthesis of Na-x zeolite from Mae Moh fly ash. *Scienceasia*, v. 38, n. 3, p. 295-300, 2012.
- 164 HINCAPIE, B. O.; GARCES, L. J.; ZHANG, Q. et al. Synthesis of mordenite nanocrystals. *Microporous and Mesoporous Materials*, v. 67, n. 1, p. 19-26, 2004.
- 165 BHADAURIA, J.; SINGHB, B.; TOMAR, A. Synthesis and characterization of analogue of mordenite and its role as a catalyst for Friedel-Crafts acylation of anisole: *J. Chem. Pharm. Res.* 3: 245-257 p. 2011.
- 166 AZIZI, S. N.; GHASEMI, S.; KAVIAN, S. Synthesis and characterization of NaX nanozeolite using stem sweep as silica source and application of Ag-modified nanozeolite in electrocatalytic reduction of H₂O₂. *Biosensors & Bioelectronics*, v. 62, p. 1-7, 2014.
- 167 KUZNIATSOVA, T.; KIM, Y.; SHQUA, K. et al. Zeta potential measurements of zeolite Y: Application in homogeneous deposition of particle coatings.

- Microporous and Mesoporous Materials*, v. 103, n. 1–3, p. 102-107, 2007.
- 168 YANG, W. L.; WANG, X.; TANG, Y. et al. Layer-by-layer assembly of nanozeolite based on polymeric microsphere: Zeolite coated sphere and hollow zeolite sphere. *Journal of Macromolecular Science-Pure and Applied Chemistry*, v. 39, n. 6, p. 509-526, 2002.
- 169 PUSATERI, A. E.; MCCARTHY, S. J. ; GREGORY, K. W. et al. Effect of a chitosan-based hemostatic dressing on blood loss and survival in a model of severe venous hemorrhage and hepatic injury in swine. *Journal of Trauma-Injury Infection and Critical Care*, v. 54, n. 1, p. 177-182, 2003.
- 170 YANG, S.; NAVROTSKY, A. Energetics of formation and hydration of ion-exchanged zeolite Y. *Microporous and Mesoporous Materials*, v. 37, n. 1–2, p. 175-186, 2000.
- 171 GRIFFIN, J. H. Role of surface in surface-dependent activation of Hageman factor (blood coagulation factor XII). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 75, n. 4, p. 1998-2002, 1978.
- 172 MARGOLIS, J. Initiation of blood coagulation by glass and related surfaces. *Journal of Physiology-London*, v. 137, n. 1, p. 95-109, 1957.
- 173 ROJKJAER, R.; SCHOUSBOE, I. Partial identification of the Zn²⁺-binding sites in factor XII and its activation derivatives. *European Journal of Biochemistry*, v. 247, n. 2, p. 491-496, 1997.
- 174 COLMAN, R. W.; SCHMAIER, A. H. Contact system: A vascular biology modulator with anticoagulant, Profibrinolytic, antiadhesive, and proinflammatory attributes. *Blood*, v. 90, n. 10, p. 3819-3843, 1997.
- 175 POURSHAHRESTANI, S.; ZEIMARAN E.; DJORDJEVIC I. et al. Inorganic hemostats: The state-of-the-art and recent advances. *Materials Science & Engineering C Materials for Biological Applications*, v. 58, p. 1255-1268, 2016.
- 176 COCHRANE, C. G.; REVAK, S. D.; WUEPPER, K. D. Activation of Hageman factor in solid and fluid phases. A critical role of kallikrein. *Journal of Experimental Medicine*, v. 138, n. 6, p. 1564-1583, 1973.
- 177 SAMUEL, M.; PIXLEY, R. A.; VILLANUEVA; M. A. et al. Human factor XII (Hageman factor) autoactivation by dextran sulfate. Circular dichroism, fluorescence, and ultraviolet difference spectroscopic studies. *Journal of Biological Chemistry*, v. 267, n. 27, p. 19691-19697, 1992.
- 178 COOL, D. E.; EDGELL, C. J.; LOUIE, G. V. et al. Characterization of human blood coagulation factor XII cDNA. Prediction of the primary structure of factor

- XII and the tertiary structure of beta-factor XIIIa. *Journal of Biological Chemistry*, v. 260, n. 25, p. 3666-3676, 1985.
- 179 SHORE, J. D.; DAY, D. E.; BOCK, P. E. et al. Acceleration of surface-depedent autocatalytic activation of blood-coagulation factor-XII by divalent metal-ion. *Biochemistry*, v. 26, n. 8, p. 2250-2258, 1987.
- 180 MUTCH, N. J.; WATERS, E. K.; MORRISSEY, J. H. Immobilized transition metal ions stimulate contact activation and drive factor XII-mediated coagulation. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, v. 10, n. 10, p. 2108-2115, 2012.
- 181 BERNARDO, M. M.; DAY, D.E.; HALVORSON, H.R. et al. Surface-independent acceleration of factor-XII activation by zinc ions. .1. Kinetic characterization of the metal-ion rate enhancement. *Journal of Biological Chemistry*, v. 268, n. 17, p. 12468-12476, 1993.
- 182 BERNARDO, M.M.; DAY, D.E.; HALVORSON, H.R. Surface-independent acceleration of factor-XII activation by zinc ions. 2. Direct binding and fluorecence studies. *Journal of Biological Chemistry*, v. 268, n. 17, p. 12477-12483, 1993.
- 183 SCHOUSBOE, I. Contact activation in human plasma is triggered by zinc ion modulation of factor-XII (hageman-factor). *Blood Coagulation and Fibrinolysis*, v. 4, n. 5, p. 671-678, 1993.
- 184 CASEMIRO, L. A.; GOMES MARTINS, C. H.; PIRES-DE-SOUZA, F. de C. et al. Antimicrobial and mechanical properties of acrylic resins with incorporated silver–zinc zeolite–part I. *Gerodontology*, v. 25, n. 3, p. 187-194, 2008.
- 185 NIKAWA, H.; YAMAMOTO, T.; HAMADA, T. et al. Antifungal effect of zeolite-incorporated tissue conditioner against *Candida albicans* growth and/or acid production. *Journal of oral Rehabilitation*, v. 24, n. 5, p. 350-357, 1997.
- 186 TAKAI, K.; OHTSUKA T.; SENDA Y.; NAKAO M et al. Antibacterial Properties of Antimicrobial-Finished Textile Products. *Microbiology and immunology*, v. 46, n. 2, p. 75-81, 2002.
- 187 GALEANO, B.; KORFF, E.; NICHOLSON, W. L. Inactivation of vegetative cells, but not spores, of *Bacillus anthracis*, *B. cereus*, and *B. subtilis* on stainless steel surfaces coated with an antimicrobial silver-and zinc-containing zeolite formulation. *Applied and environmental microbiology*, v. 69, n. 7, p. 4329-4331, 2003.
- 188 INOUE, Y.; HOSHINO, M.; TAKAHASHI, H. et al. Bactericidal activity of Ag–zeolite mediated by reactive oxygen species under aerated conditions. *Journal of inorganic biochemistry*, v. 92, n. 1, p. 37-42, 2002.

ANEXO I – Patente depositada

< Uso exclusivo do INPI >

Espaço reservado para o protocolo

Espaço reservado para a etiqueta

Espaço reservado para o código QR



INPI
INSTITUTO
NACIONAL
DA PROPRIEDADE
INDUSTRIAL

INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL
Sistema de Gestão da Qualidade
Diretoria de Patentes

DIRPA GPATENTES	Tipo de Documento:	Formulário Eletrônico	DIRPA	Página: 1 / 3
	Título do Documento:	Depósito de Pedido de Patente		Código: FQ001
			Procedimento:	Versão: 6
			Não Aplicável	

Ao Instituto Nacional da Propriedade Industrial:

O requerente solicita a concessão de um privilégio na natureza e nas condições abaixo indicadas

1. Depositante (71):

1.1 Nome: Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho
 1.2 CNPJ: 48.031.918/0001-24
 1.3 Endereço Completo: Rua Quirino de Andrade, 215, Centro, São Paulo, São Paulo, Brasil
 1.4 CEP: 01049-010
 1.5 Telefone: +55(11)56270233
 1.6 Fax: ---
 1.7 E-mail: auin@unesp.br

2. **Natureza:** Invenção Modelo de Utilidade Certificado de Adição

3. Título da Invenção ou Modelo de Utilidade (54):

PROCESSO DE OBTENÇÃO DE NANOZEÓLITAS COM ATIVIDADE HEMOSTÁTICA E PRODUTO OBTIDO

4. **Pedido de Divisão:** do pedido Nº: ---

5. Prioridade:

Declaração na forma do item 3.2 da Instrução Normativa nº 17/2013:

Declaro que os dados fornecidos no presente formulário são idênticos ao da certidão de depósito ou documento equivalente do pedido cuja prioridade está sendo reivindicada.

O depositante reivindica a(s) seguinte(s) prioridade(s):

Pais ou Organização do depósito	Número do depósito	Data do depósito	Tipo
---	---	---	---

6. Inventor (72):

6.1 Nome: José Geraldo Nery
 6.2 Qualificação: Brasileiro, solteiro, professor universitário
 6.3 CPF: 069.524.078-12
 6.4 Endereço Completo: Rua Cristóvão Colombo, nº 2265, Jardim Nazareth, São José do Rio Preto, São Paulo, Brasil
 6.5 CEP: 15054-000
 6.6 Telefone: +55(11)33937904
 6.7 Fax: ---
 6.8 E-mail: auin@unesp.br

6.1 Nome: Juliana Bergamasco Laurenti
 6.2 Qualificação: Brasileira, casada, farmacêutica
 6.3 CPF: 069.426.986-79
 6.4 Endereço Completo: Rua Cristóvão Colombo, nº 2265, Jardim Nazareth, São José do Rio Preto, São Paulo, Brasil
 6.5 CEP: 15054-000
 6.6 Telefone: +55(11)33937904
 6.7 Fax: ---
 6.8 E-mail: auin@unesp.br

6.1 Nome: Gabriel Zazeri
 6.2 Qualificação: Brasileiro, solteiro, físico
 6.3 CPF: 395.633.548-18
 6.4 Endereço Completo: Rua Cristóvão Colombo, nº 2265, Jardim Nazareth, São José do Rio Preto, São Paulo, Brasil
 6.5 CEP: 15054-000
 6.6 Telefone: +55(11)33937904
 6.7 Fax: ---
 6.8 E-mail: auin@unesp.br

7. Declaração de divulgação anterior não prejudicial:

Artigo 12 da LPI - Período de Graça.

GRU - 00.000.2.2.15.0988997.8



DIRPA PATENTES	Tipo de Documento: Formulário Eletrônico	DIRPA	Página: 2 / 3
Título do Documento: Depósito de Pedido de Patente		Código: FQ001	Versão: 6
		Procedimento: Não Aplicável	

8. Procurador (74):

8.1 Nome: Fabíola de Moraes Spiandorello
8.2 Qualificação: Brasileira, divorciada, advogada
8.3 CPF: 135.210.278-13
8.4 API: ---
8.5 OAB: 244.141 SP
8.6 Endereço Completo: Rua Bento Teobaldo Ferraz, 271, bloco II, Barra Funda, São Paulo, São Paulo, Brasil
8.7 CEP: 01140-070
8.8 Telefone: +55(11)33937904
8.9 Fax: ---
8.10 E-mail: fabiola@reitoria.unesp.br

9. Listagem de seqüências biológicas: (documentos anexados, se houver)

- Código de controle alfanumérico no formato de código de barras (arquivo em formato eletrônico PDF).
 Código de controle alfanumérico no formato de código de barras (arquivo em formato eletrônico XML).
 Listagem de seqüências (arquivo em formato eletrônico TXT).
 Declaração relativa à listagem de seqüências (arquivo em formato eletrônico PDF).

10. Material biológico: (se houver)

10.1 Identificação: ---
10.2 Instituição depositária: ---
10.3 Endereço completo: ---
10.4 Número de adesão: ---

11. Declaração de igualdade de conteúdo técnico entre os arquivos eletrônicos em formato PDF e TXT (texto):

- Declaro que todos os documentos de especificação em formato texto têm conteúdo igual ao dos documentos de especificação anexados em formato PDF. Caso haja alguma divergência entre os arquivos PDF e TXT (texto), será considerado o conteúdo do arquivo PDF para fins de exame.

12. Dados gerais do conteúdo técnico do depósito (caso aplicável):

Sugestão de desenho a ser publicado com o resumo: 1 (sujeito a avaliação do INPI)
Número de desenhos: 7
Cor dos desenhos: Preto e branco Colorido / Escala de cinza

13. Documentos Anexados: (assinale e indique também o número de folhas)

<input checked="" type="checkbox"/> Relatório descritivo em formato eletrônico PDF	21 p.
<input checked="" type="checkbox"/> Reivindicações em formato eletrônico PDF	1 p.
<input checked="" type="checkbox"/> Resumo em formato eletrônico PDF	1 p.
<input checked="" type="checkbox"/> Desenhos em formato eletrônico PDF	5 p.
<input checked="" type="checkbox"/> Relatório descritivo em formato eletrônico texto	--- p.
<input checked="" type="checkbox"/> Reivindicações em formato eletrônico texto	--- p.
<input checked="" type="checkbox"/> Resumo em formato eletrônico texto	--- p.
<input checked="" type="checkbox"/> Guia de Recolhimento da União (GRU) paga com comprovante de pagamento em formato eletrônico PDF [Código de serviço: 200, Número: 00.000.2.2.15.0988997.8, Nome do sacado: Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho]	1 p.
<input checked="" type="checkbox"/> Procuração em formato eletrônico PDF	2 p.
<input checked="" type="checkbox"/> Documento de cessão ou autorização do inventor em formato eletrônico PDF	1 p.
<input checked="" type="checkbox"/> Documentos de qualquer outra natureza em formato eletrônico PDF [DOESP - Decreto nomeação Reitor / Vice-Reitora Unesp]	1 p.



DIRPA PATENTES	Tipo de Documento:	Formulário Eletrônico	DIRPA	Página:	3 / 3	
	Título do Documento:	Depósito de Pedido de Patente		Código:	FQ001	Versão:
				Procedimento:	Não Aplicável	

14. Declarações gerais do sistema para depósito eletrônico de pedidos de patente do INPI:

- Declaro que assumo total responsabilidade sobre a integridade, a legibilidade e a fidedignidade dos documentos enviados por meio eletrônico, bem como sua adequação aos requisitos técnicos exigíveis para seu correto processamento pelo sistema e-Patentes/Depósito.
- Declaro ciência de que o envio dos documentos ao INPI só é considerado concretizado após esses serem protocolados e um recibo com assinatura digital do INPI for entregue eletronicamente aos usuários dos serviços. Em qualquer situação de dúvida, o usuário deverá apresentar esse recibo.
- Declaro ciência de que o INPI não é responsável por qualquer perda resultante de falhas externas ao órgão ou quaisquer eventualidades não relacionadas a problemas de infraestrutura do INPI que impeçam o depósito ou o peticionamento eletrônico.
- Declaro ciência de que os documentos enviados por formulários eletrônicos serão considerados recebidos pelo INPI nas exatas data e hora indicadas pelo provedor do INPI, constantes no recibo eletrônico expedido ao usuário.
- Declaro ciência de que o depósito ou o peticionamento eletrônico não eliminam a necessidade da realização do exame formal e/ou de mérito nos depósitos de pedidos de patente ou nas petições, não sendo suficiente para garantir o cumprimento de todas as formalidades e exigências técnicas.
- Declaro que me comprometo a não realizar qualquer modificação capaz de alterar os arquivos automaticamente criados pelo sistema e-Patentes/Depósito, tendo ciência de que qualquer alteração poderá invalidar o depósito ou o peticionamento eletrônico.
- Declaro ciência de que eventuais exigências formais e/ou técnicas serão posteriormente publicadas na Revista Eletrônica da Propriedade Industrial (RPI) disponibilizada no portal do INPI.
- Declaro, sob penas da Lei, que todas as informações prestadas neste formulário eletrônico são completas e verdadeiras.

22 de fevereiro de 2016

Data

E=spianfm@terra.com.br, CN=FABIOLA DE MORAES SPIANDORELLO, OU=5090377, OU=ADVOGADO, OU=0005835907, OU=Assinatura Tipo A3, OU=Autenticado por AR OAB SP, O=ICP-Brasil, C=BR (Certificado por: CN=AC OAB G2, OU=ORDEN DOS ADVOGADOS DO BRASIL CONSELHO FEDERAL, O=ICP-Brasil, C=BR)

Assinatura (Requerente ou Procurador)



Contents lists available at ScienceDirect

Microporous and Mesoporous Materials

journal homepage: www.elsevier.com/locate/micromeso

Enhanced pro-coagulant hemostatic agents based on nanometric zeolites



Juliana Bergamasco Laurenti ^a, Gabriel Zazeri ^a, Ana Paula Ribeiro Povinelli ^a,
Moacir Fernandes de Godoy ^b, Domingo Marcolino Braile ^c, Tânia R. Flores da Rocha ^d,
Élbio Antônio D' Amico ^d, José Geraldo Nery ^{a,*}

^a Department of Physics, Institute of Biosciences, Letters and Exact Sciences, UNESP–São Paulo State University, Campus de São José do Rio Preto, São Paulo 15054-000, Brazil

^b Department of Cardiology and Cardiovascular Surgery, School of Medicine of São José do Rio Preto, São Paulo 15054-000, Brazil

^c Braile Biomédica Industry, Commerce and Representation São José do Rio Preto, São Paulo 15091-450, Brazil

^d Laboratory of Hemostasis, Hospital of the Faculty of Medicine, University of São Paulo, USP-SP, São Paulo 05403-000, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 16 August 2016

Received in revised form

14 October 2016

Accepted 16 October 2016

Available online 17 October 2016

Keywords:

Hemorrhage

Nanometric zeolites

Inorganic

Hemostatic agents

ABSTRACT

Micro- and nanometric *faujasite* zeolites were tested as hemostatic coagulant agents. The as-made zeolites and their calcium ion exchanged derivatives were characterized by XRD, SEM, AFM, TGA, and DSC. Zeta potential measurements of the micro and nanometric zeolites, as a function of pH (1–12.5), revealed the hemostatic potential of the materials. The isoelectric point for FAU, FAU/Ca, Nano-FAU, and Nano-FAU/Ca were measured at pH 2.0, 1.9, 3.2, and 2.5, respectively. The hemostatic activity was confirmed by the TEG technique for both micro and nanometric zeolites, however a superior activity were observed for the nanometric materials. FAU and FAU/Ca exhibited a reduction of the R parameter (defined as period of time of latency from the start of test to initial fibrin formation) for the formation of a clot of an amplitude of 2 mm) from 8.6 ± 0.7 min (control) to 3.2 ± 0.7 min and 2.3 ± 0.1 min, respectively. On the other hand, for the Nano-FAU, and Nano-FAU/Ca the observed decrease were to 2.4 ± 0.6 min, and 1.1 ± 0.2 min, respectively. The amounts of heat released were 105.60 J/g (FAU), 65.8 J/g (FAU/Ca), 85.48 J/g (Nano-FAU), and 78.21 J/g (Nano-FAU/Ca). Statistical analysis using one-way analysis of variance showed a global value of $p < 0.0001$. Tukey-Kramer multiple comparisons revealed significant ($p < 0.0001$) differences for FAU, FAU/Ca, Nano-FAU, and Nano-FAU/Ca, relative to the control. Nano-FAU/Ca showed the most important reductions of the R with significant differences compared to the control ($p < 0.0001$ and $p < 0.0001$, respectively) and FAU ($p = 0.0071$ for the R parameter).

© 2016 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Hemostatic coagulant agents are materials capable of reducing bleeding and can be grouped into three classes, depending on their mechanism of action: factor concentrators [1], mucoadhesive agents [2], and procoagulants [3,4]. They can also be grouped according to their forms and types: solid sheets, normally known as hemostatic dressings [5]; solid particles, or powders and fibers [3]; hydrogels [6]; liquid tissue sealants [7]; dispersions made from natural [8] or synthetic polymers [9], ceramics [10] clays such as smectite and kaolin [11–13]. Several of these materials have been

reported to be used as hemostatic agents both in their pure forms or combined with other materials [10,14]. Among the inorganic classes of materials, zeolites have attracted the attention of the scientific and medical communities for their potential use as efficient hemostatic agents.

Hemostatic agent employing dehydrated zeolites as powder dressing was employed during the Iraq war 2003 under the trademark QuikClot[®] (Z-Medica, Wallingford, CT) [3,15–17]. In principle it acts as a molecular sieve, adsorbing water molecules at the wound site and increasing the concentrations of clotting factors, platelets, and erythrocytes in order to stimulate hemostasis [18,19]. Other authors have studied different classes of composites based on zeolites with the purpose of finding more efficient hemostatic agents. Zhang et al. [9] developed an antibiotics-loaded zeolite/polymer composite for hemostatic applications, while

* Corresponding author.

E-mail address: nery@ibilce.unesp.br (J.G. Nery).

Mortazavi et al. [20] showed that a mixture of bentonite and zeolite minerals could dramatically reduce bleeding and the volume of blood loss, as well as the clotting time, and observed a control of exothermic reactions, which eliminated the risk of burning in the wound. Alavi et al. [21] studied *in vivo* the effects of a new impregnated sterile gauze containing bentonite and halloysite minerals on blood coagulation and the wound healing rate in male Wistar rats, and it was observed that topical application of this material decreased the clotting time and accelerated the wound healing rate.

Despite the beneficial effects of zeolites in accelerating blood coagulation and shortening the clot formation time, the main drawback of their use is related to the exothermic reaction, which can reach temperatures higher than 100 °C (212 °F) and cause full-thickness tissue damage [22,23]. Several methods have been tested to attenuate this adverse effect, such as ion exchange treatment of the as-made zeolites using K^+ , Ba^{2+} , Sr^{2+} , or Ag^+ . A heat reduction from 680 J/g to 420 J/g was reported for ion exchange in Linde Type 5A zeolite using Ag^+ ions [24].

Reduction of particle size from the micrometric to the nanometric scale leads to substantial changes in the properties of the materials, which in turn affects the performance of zeolites in the traditional applications areas such as catalysis and separation [25]. A survey of the literature will show that the hemostatic agents based on zeolitic materials that have so far been tested appear to be on the micrometric scale. To the best of our knowledge no study concerning the behavior of nanometric zeolites used as hemostatic coagulation agents has until now been reported. Therefore, the questions raised in this study are: a) Does zeolite size (micrometric or nanometric) affect the coagulation cascade? b) Does it affect the collateral damage of burning? With the aim of answering these questions, systematic studies were undertaken with micrometric and nanometric *faujasite* zeolites hydrothermally synthesized, ion exchanged with calcium, characterized by several spectroscopic techniques, and tested as hemostatic agents using *in vitro* thromboelastography assays to observe the acceleration in clotting time.

2. Experimental section

2.1. Chemicals

The preparation of the *faujasite* zeolite and the ion exchange experiments employed the following chemicals: sodium hydroxide pellets (NaOH, 98%, Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany), sodium aluminate ($NaAlO_2$, Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany), fumed silica (SiO_2 , 99.8%, Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany), and calcium chloride dihydrate ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$, Merck, Darmstadt, Germany). All the chemicals were used as received. *In vitro* assays were performed with human blood samples. All the patients who participated in this study gave informed consent before blood donation. The study was approved by the Research Ethics Committee of FAMERP (São José do Rio Preto Medical School) under the protocol number CAAE 48358215.9.0000.5415.

2.2. Preparation of materials

2.2.1. Synthesis of as-made micrometric and nanometric *faujasite* zeolites

The nanometric *faujasite* zeolite was synthesized by hydrothermal crystallization, following the procedure reported by Zhan et al. [26]. Aluminosilicate gel was prepared by mixing freshly prepared aluminate and silicate solutions at a molar ratio of 5.5 $Na_2O:1.0 Al_2O_3:4.0 SiO_2:190 H_2O$. In a typical synthesis, sodium hydroxide solution (5.34 g of NaOH/50 mL of H_2O) was freshly prepared, followed by addition of 2.42 g of sodium aluminate

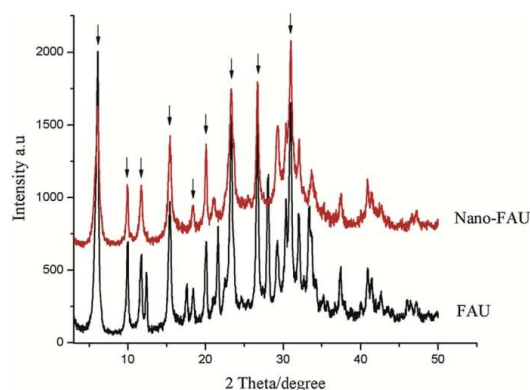


Fig. 1. XRD patterns of the as made micrometric (FAU) and nanometric *faujasite* zeolite (Nano-FAU).

($NaAlO_2$), with stirring for 15 min at room temperature. Fumed silica (SiO_2 , 3.43 g) was then added to the solution, with stirring until a homogeneous gel was obtained. The gel was immediately transferred to a temperature-controlled shaker and agitated at 250 rpm for 2 days at 60 °C. The powdered product was recovered by centrifugation at 13,400 rpm (CR22N centrifuge, Hitachi, Tokyo, Japan), washed with deionized water until reaching pH < 8, and dried in an oven at 40 °C for 16 h. The micrometric *faujasite* zeolite was synthesized following the same procedure described above, except that crystallization was conducted at 90 °C for 4 days in a static reactor (Parr Instruments Co., USA). The micrometric and nanometric zeolites were denoted FAU and Nano-FAU, respectively.

2.2.2. Ion exchange of the zeolite

In a typical ion exchange experiment [27], 1 g portions of as-made FAU and Nano-FAU were added to several Teflon-lined digestion reactors (Parr Instruments Co., USA), followed by the addition of 30 mL of 0.5 M $CaCl_2$ solution to each reactor. The ion exchange reactions were conducted at 90 °C for 12 h. The solid products were subsequently collected by centrifugation at 13,400 rpm, washed three times with deionized water, and dried in an oven at 40 °C for 16 h. The ion exchanged zeolite derivatives were denoted FAU/Ca (micrometric) and Nano-FAU/Ca (nanometric).

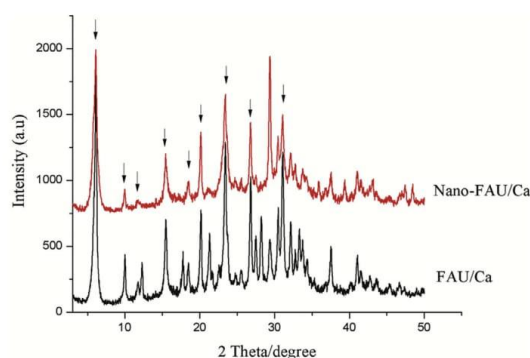


Fig. 2. XRD patterns of the calcium-exchange derivatives (FAU/Ca; Nano-FAU/Ca).

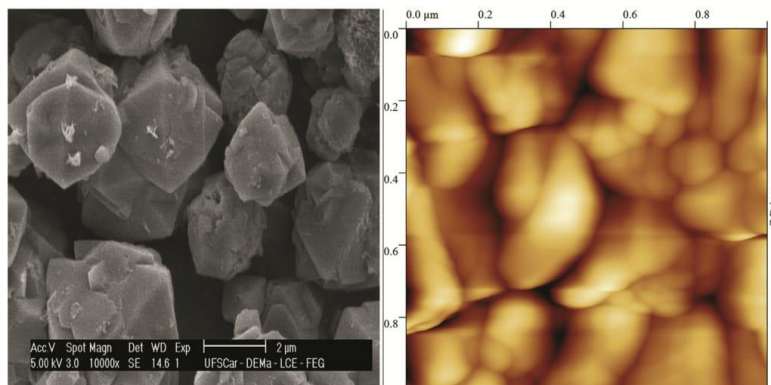


Fig. 3. SEM/AFM micrographs of the as made micrometric *faujasite* zeolite (FAU).

2.3. Physical characterization of the micrometric and nanometric *faujasite* zeolites

The as-made and calcium exchanged zeolites were characterized by XRD, SEM, AFM, TGA, and DSC. The XRD analyses were performed using a MiniFlex II instrument (Rigaku, Tokyo, Japan)

with a rotating anode source, flat-plate Bragg-Brentano geometry, and a graphite monochromator. The instrument was operated with CuK α radiation (wavelength = 1.5418 Å) at 40 kV and 15 mA. The powder diffraction patterns were recorded in the range $2\theta = 3\text{--}50^\circ$, with a goniometer scan rate of $2^\circ (2\theta) \text{ min}^{-1}$. The AFM and SEM analyses were performed at the Brazilian National Laboratory of

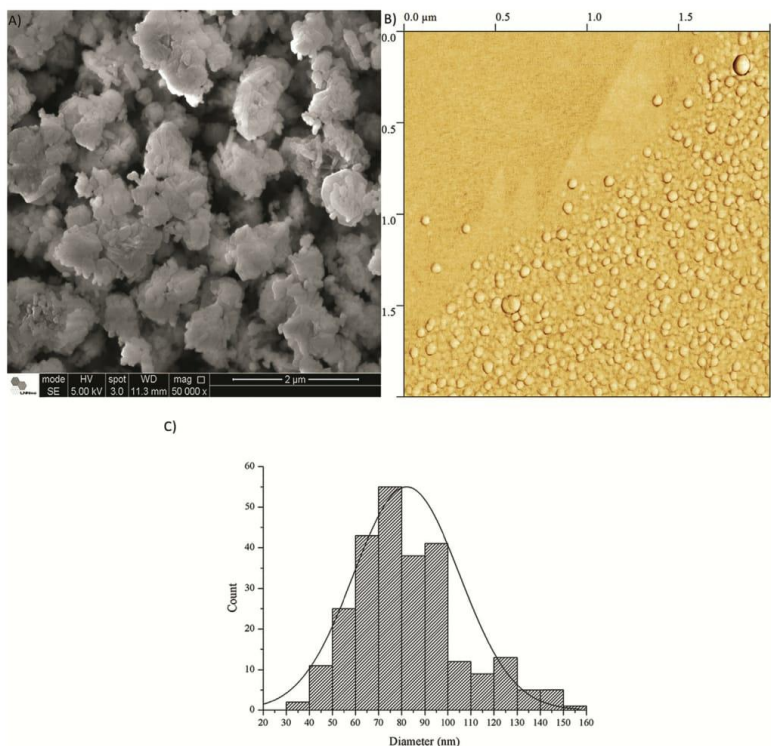


Fig. 4. SEM/AFM micrographs and size distribution of the of the as made nanometric *faujasite* zeolite (Nano-FAU).

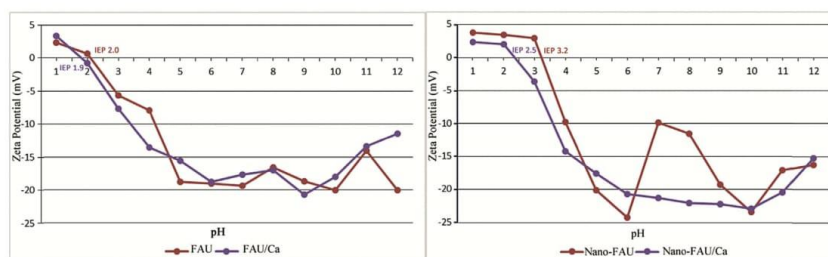


Fig. 5. Zeta potential in function pH of as made micrometric *faujasite* zeolite (FAU) and nanometric (Nano-FAU) and calcium-exchange derivatives (FAU/Ca; Nano-FAU/Ca).

Nanotechnology (LNNano) in Campinas. The AFM experiments employed an NX-10 microscope (Park Systems, Suwon, Korea) fitted with a PPP-NCHR probe, operated at 320 kHz resonance frequency and constant force of 42 N/m. Tapping mode AFM images were acquired in ambient air using TESP tapping mode etched silicon probes. SEM data were obtained using an XL30 FEG instrument (Philips, Eindhoven, The Netherlands), with a thin coating of gold deposited onto the samples prior to analysis and particle size distribution analysis was performed using Image Pro plus[®] software. Elemental chemical analyses of nanosized *faujasite* were performed via inductively coupled plasma atomic emission spectroscopy (ICP-AES, Chemical Analysis Labs-Sao Paulo University Facilities-USP).

Phase contrast imaging was performed using a BX60 microscope (Olympus, New York, USA). In these analyses, 170 μL volumes of whole blood, collected in tubes containing sodium citrate (4% v/v), were deposited onto glass microscope slides. Then, 10 μL of 0.2 M aqueous CaCl_2 was added to the blood to reverse the anticoagulant effect caused by calcium chelation. After this, 0.25 mg portions of each micrometric and nanometric *faujasite* zeolite and their ion exchanged derivatives were deposited under the blood. The slide was immediately placed in the microscope for assessment of the structures formed.

2.3.1. Thermal gravimetric analysis (TGA) and differential scanning calorimetry (DSC)

Thermal gravimetric analysis (TGA) and differential scanning calorimetry (DSC) were performed according to the methodologies described by Ostomel et al. [24], Drebuschak [28] and Brown [29]. The as-made and calcium exchanged zeolites were stored for two weeks in enclosures suspended over a Petri dish containing a saturated water solution of KBr, which maintains 80% relative humidity. Thermal analyses (DSC/TG) were performed using a Netzsch 429 instrument (Selb, Germany) which was used to quantify the heat associated with the desorption of water from the zeolite. The synthesized materials (5 mg) were heated in a stream of synthetic air (50 mL/min) at a heating rate of 10 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ in the temperature range 25–500 $^{\circ}\text{C}$. The hydration capacity of each zeolite was measured by thermogravimetric analysis (TGA) of water loss, and simultaneously collected differential scanning calorimetric (DSC) curves were integrated to obtain the total heat for the dehydration reaction.

2.3.2. Isoelectric point determination (zeta potential)

The isoelectric points (IEP) (which is defined as the pH at which the total of negative and positive surface charges equals zero) were estimated using zeta potential data obtained with a Malvern NanoZS instrument (Malvern Instruments, Herrenberg, Germany), following the procedure described by Ostomel et al. [30]. Zeta

potential of synthesized material were measured as a function of pH using Smoluchowski's equation [31].

The purpose of this experiment was to understand how the anticoagulant or procoagulant properties of the zeolite varied according to the pH of the isoelectric point. Approximately 2 mg portions of the as-made and calcium exchanged zeolites were suspended in 60 mL of aqueous 0.03 M CaCl_2 and sonicated for 10 min before analysis. Zeta potential measurements of the suspensions were conducted as a function of pH in the range 1–12.5, which was adjusted by the addition of 0.25 M HCl or NaOH solutions. Due to the heterogeneous colloidal nature of blood, it is impossible to measure the zeta potential of the zeolite *in situ*, so the surface charge must be inferred from the electrophoretic mobility measurements [30,32]. The experiment was performed in the presence of a CaCl_2 electrolyte that mimicked the calcium ion concentrations found in blood serum [30].

2.3.3. Thromboelastography analysis (TEG)

Thromboelastography was performed using a Haemonetics TEG 5000 thromboelastograph (Niles, IL, USA), with volunteers who were physically healthy and had no history of blood disorders. This analysis was used to acquire *in vitro* clotting parameters for total blood stabilized with sodium citrate (4% v/v) and exposed to the hemostatic materials evaluated. Firstly, 20 μL of 0.2 M aqueous CaCl_2 was added to 340 μL of the whole blood, followed by direct introduction of 0.5 mg of hydrated micrometric and nanometric *faujasite* zeolite into the TEG sample cup containing the blood and performance of the measurement.

2.3.4. Statistical analysis

The descriptive statistical analysis for evaluation of the micrometric and nanometric *faujasite* zeolites and their calcium exchanged derivatives (control, FAU, FAU/Ca, Nano-FAU, and Nano-FAU/Ca) was performed using averages and standard deviations. For inferential statistical analysis, the average values for each group were compared using one-way ANOVA (with a significance level of $p \leq 0.05$). When statistically significant differences were detected,

Table 1

Summary of the parameters analyzed in thromboelastography of micrometric and nanometric *faujasite* zeolite and its calcium-exchange derivative: Control; FAU; FAU/Ca; Nano-FAU and Nano-FAU/Ca.

Sample	R (min)	K (min)	Alpha angle ($^{\circ}$)	MA (mm)
Control ^a	8.6 \pm 0.7	3.5 \pm 0.7	49.7 \pm 7.5	53.6 \pm 2.6
FAU	3.2 \pm 0.7	1.2 \pm 0.1	74.3 \pm 1.0	64.0 \pm 0.9
FAU/Ca	2.3 \pm 0.1	1.2 \pm 0.1	75.6 \pm 1.2	55.5 \pm 5.0
Nano-FAU	2.4 \pm 0.6	1.2 \pm 0.1	73.9 \pm 2.3	61.2 \pm 2.3
Nano-FAU/Ca	1.1 \pm 0.2	1.2 \pm 0.1	75.1 \pm 2.3	60.3 \pm 1.6

^a Blood not exposed to the hemostatic agents.

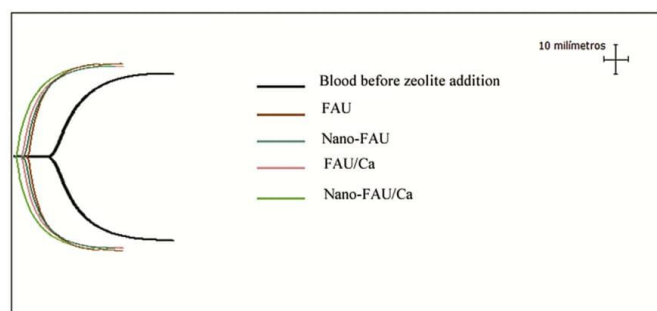


Fig. 6. Thromboelastography plot of the blood before zeolite addition and after addition of FAU; Nano-FAU; FAU/Ca and Nano-FAU/Ca.

multiple comparisons were performed using the Tukey-Kramer post-test.

3. Results and discussion

XRD patterns of the as made FAU and Nano-FAU and their calcium ion-exchanged derivatives FAU/Ca and Nano-FAU/Ca are respectively shown in Figs. 1 and 2. XRD data for the as made micro and nanometric *faujasite* zeolites are in accordance with results reported by Zhan et al. [26] and ICP-AES revealed a Si/Al ratio of 1.40, which by definition is a NaX *faujasite* [33]. Typical Bragg reflections for micrometric and nanometric *faujasite* zeolites were observed at ($2\theta = 6.1^\circ, 9.8^\circ, 11.7^\circ, 12.3^\circ, 15.3^\circ, 20^\circ, 21.6^\circ,$

$23.3^\circ, 26.6^\circ, 28^\circ, 31.1^\circ, 33.3^\circ$). XRD patterns of the calcium-exchange derivatives have caused no significant modification of the structure in comparison to the original micro and nanometric zeolites (Fig. 2).

SEM and AFM micrographs of the as made micro and nanometric *faujasite* (FAU; NanoFAU) are shown in Figs. 3 and 4 respectively. Crystal morphology of micrometric *faujasite* is built up of hexagonal shaped crystals whose size range from 1 to 3 μm , while SEM micrographs for nanometric zeolites show agglomerated crystal with particle size in the 60–100 nm range (Fig. 4c). The ion-exchange process with calcium have caused no significant difference in the morphology of micrometric or nanometric zeolites.

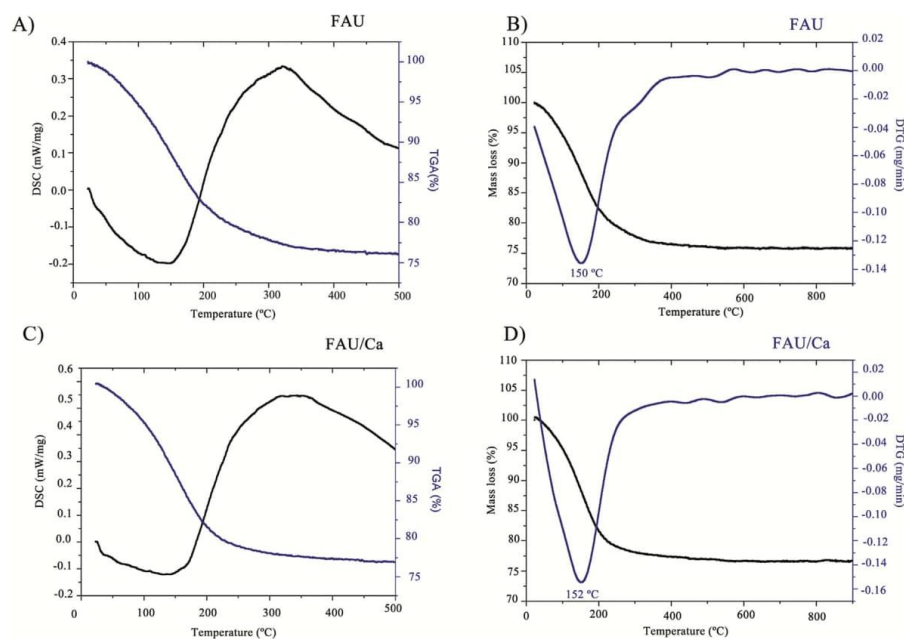


Fig. 7. DSC and TGA/DTG Thermogram of micrometric *faujasite* zeolite and its calcium-exchange derivative: A) Black and blue curves are the DSC and TGA responses for FAU respectively; B) Black and blue curves are the variation of mass loss versus temperature and derivative thermogravimetric curve (DTG) for FAU respectively; C) Black and blue curves are the DSC and TGA responses for FAU/Ca respectively; D) Black and blue curves are the variation of mass loss versus temperature and derivative thermogravimetric curve (DTG) for FAU/Ca respectively. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

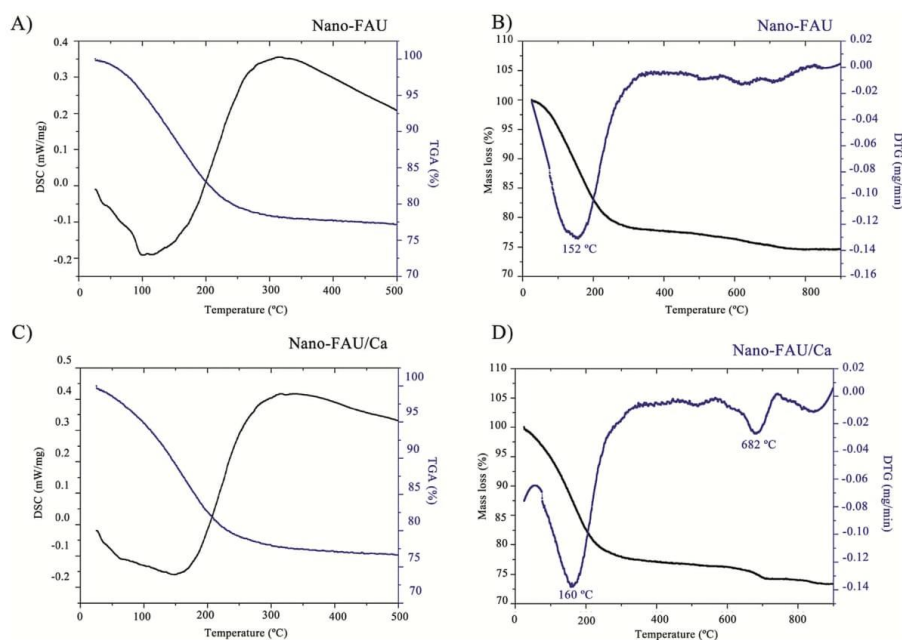


Fig. 8. DSC and TG/DTG Thermogram of nanometric *faujasite* zeolite and calcium-exchange derivate: A) Black and blue curves are the DSC and TGA responses for Nano-FAU respectively; B) Black and blue curves are the variation of mass loss versus temperature and derivative thermogravimetric curve (DTG) for Nano-FAU respectively; C) Black and blue curves are the variation of mass loss versus temperature and derivative thermogravimetric curve (DTG) for Nano-FAU/Ca respectively. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

The zeta potential of zeolites can be positive or negative and it depends not only on the pH, but also on the ionic strength of the suspension, the presence of organic templates or structure directing agents (SDAs) and the Al content of the framework [34]. As pointed out by Griffin et al. [35], zeolites can act as surface contact activation agents due to their negative surface charges, by rendering factor XII (FXII) much more susceptible to proteolysis activation by the kallikrein protein, therefore it is important follow the surface charge behavior of zeolites.

Zeolite structures are defined by the numbers of silanol and aluminol groups present at the crystal surface, and these groups can be easily deprotonated to form SiO^- and AlO^- , in a wide pH range, hence making the surface more negatively charged [36,37]. On the other hand, a lower pH leads to protonation, so the surface charge tends to be positive and the isoelectric point is reached. Fig. 5 shows the experimental isoelectric points for micrometric (FAU) and nanometric (Nano-FAU) *faujasite* zeolites and their calcium-exchange derivatives (FAU/Ca; Nano-FAU/Ca). Detailed experimental zeta potential (mV) as a function of the pH are provided in the supplementary material.

The isoelectric point of a metal oxide is an important parameter because it can strongly affect the biological response during activation of the coagulation cascade reactions [30]. According to Ostomel et al. [30], basic oxides with isoelectric points above the pH of blood (7.3–7.4) and which are initially positively charged when immersed in blood are, in principle, anticoagulant oxides. On the other hand, acidic oxides with isoelectric points below the physiological pH of blood, which initially carry negative charges when immersed in blood, are procoagulant oxides.

Experimental pH value for isoelectric points (IEP) of the zeolite samples were 2.0, 1.9, 3.2, 2.5 for FAU, FAU/Ca, Nano-FAU, Nano-FAU/Ca, respectively. It was observed that all samples showed the isoelectric point below the blood pH (7.3–7.4), therefore all the samples are procoagulants. It is important to observe that in the $3.2 < \text{pH} < 12.5$ pH range the zeolite surface remained negatively charged and no isoelectric point was observed in this pH range. Although in this work we can not provide straightforward experimental evidence of it, some authors have in principle associated the zeolite surface charges as resulting of the surface silanol groups deprotonation [38] and or to the protonation or dissociation of the hydroxyl groups according to scheme described below [36]:



The *in vitro* hemostatic activities of the zeolitic materials were evaluated using the thromboelastography technique, which provides a global evaluation of hemostasis by quantitatively measuring the viscoelastic changes in blood during the coagulation process, from the beginning to the final [39].

Experimental relevant parameters for the clotting process are: R (as the period of time of latency from the start of test to initial fibrin formation for the formation of a clot of an amplitude of 2 mm)

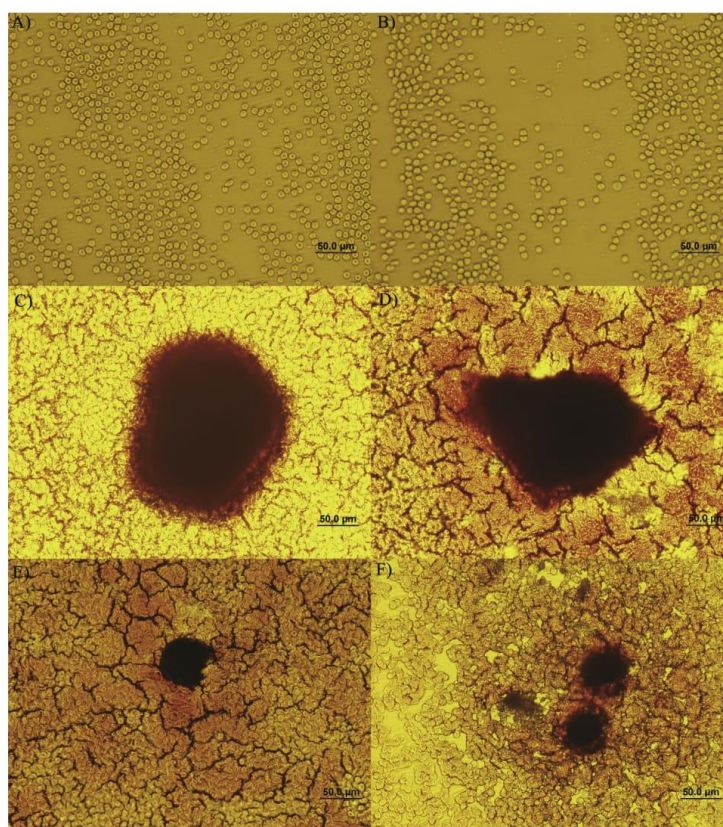


Fig. 9. Phase-Contrast Imaging of blood: A and B) Control (Blood without zeolite); C) Blood after the FAU addition; D) Blood after the FAU/Ca addition; E) Blood after the Nano-FAU addition and F) Blood after the Nano-FAU/Ca addition.

[40,41]; K (time for the clot size to reach 20 mm); α angle (inclination between R and K, representing the rate of thrombin generation and the conversion of fibrinogen to fibrin); and MA (maximum amplitude, reflecting the maximum elastic property of fibrin and platelet adhesion) [39]. These parameters were measured for all the zeolite samples and are summarized in Table 1 and their thromboelastogram plots are shown in Fig. 6.

The use of FAU resulted in decreases of the values of R and K from 8.6 ± 0.7 min (control) to 3.2 ± 0.7 min, and from 3.5 ± 0.7 min to 1.2 ± 0.1 min, respectively. The α angle and MA values increased from $49.7 \pm 7.5^\circ$ to $74.3 \pm 1.0^\circ$, and from 53.6 ± 2.6 mm to 64.0 ± 0.9 mm, respectively. In the case of FAU/Ca, R decreased from 3.2 ± 0.7 min (FAU) to 2.3 ± 0.1 min (FAU/Ca). No noticeable or significant differences in the K and α angle parameters were observed between FAU and FAU/Ca (Table 1). However, the MA value was smaller for FAU/Ca (55.5 ± 5.0 mm) than for FAU (64.0 ± 0.9 mm). There was a significant decrease in R for Nano-FAU/Ca (1.1 ± 0.2 min), compared to Nano-FAU (2.4 ± 0.6 min). Considering the other parameters, there were no significant differences between Nano/FAU and Nano-FAU/Ca (Table 1). The application of one-way analysis of variance resulted in a global p value < 0.0001 , and use of the Tukey-Kramer multiple comparisons test revealed significant ($p < 0.0001$)

differences for FAU, FAU/Ca, Nano-FAU, and Nano-FAU/Ca, relative to the control. Nano-FAU/Ca showed the greatest reductions of the R and K values, with significant differences compared to the control ($p < 0.0001$ and $p < 0.0001$, respectively) and FAU ($p = 0.0071$ for the R parameter).

It is clear from the results that all the zeolites here investigated were potential hemostatic coagulant agents, nevertheless in the design of hemostatic agents for medical devices the R parameter is critical, because a rapid clotting is the essential first response in a medical emergency. Ostomel et al. [30] reported that materials that could induce a detectable blood clot in 2 min *in vitro* correlated with a 75% survivability when applied externally as a rapidly-acting hemostatic agent to a universally lethal injury of the vascular system [17,42]. In this study, significant reductions in the R time were observed, especially with the nanometric calcium exchanged *faujasite* derivative (Nano-FAU/Ca), strongly indicating that Nano-FAU/Ca should act as an efficient hemostatic agent. Hence, it was experimentally shown that zeolite size plays an important role in the coagulation cascade (see Table 1 and Fig. 6).

Ca^{2+} ions are essential cofactors that are vital for the orientation of clotting enzymes on cellular surfaces, providing ionic bridges between two negatively charged residues (such as cellular

surfaces and clotting factors) [42,43]. Li et al. [44], using Quikclot[®] ion exchanged with Ca²⁺, reported that Ca²⁺ ions maintained the procoagulant activity of zeolites. However, the zeolite used was on the micrometric scale and no thromboelastography parameters (R, K, α angle, or MA) were measured, only the qualitative prothrombin time (PT) and the activated partial thromboplastin time (APTT).

Side effects of using zeolites as hemostatic agents, such as high-temperature exothermic reactions due to water adsorption, have been extensively discussed in the literature [3,22,45,46], and in order to know if the zeolite scale could have some influence on these parameters DSC/TG analyses were performed. The heat of hydration for synthesized materials was calculated by integrating the DSC response whereas the water content in the zeolite is measured experimentally as mass loss versus temperature and the derivative thermogravimetric curve (DTG) which expresses the first derivative of the mass variation versus time as a function of temperature. These results are shown in Figs. 7 and 8. Experimental DSC/TGA data revealed significantly lower energy release for the nanometric *faujasite* Nano-FAU (85.48 J/g), compared to the micrometric zeolite FAU (105.6 J/g). Furthermore, the ion exchanged materials showed lower energy release, with values of 105.60 and 65.8 J/g obtained for FAU and FAU/Ca, respectively. Experimental values of 85.48 and 78.21 J/g were observed for Nano-FAU and Nano-FAU/Ca, respectively. Therefore, in principle, Nano-Fau/Ca should not only be the best hemostatic agent (according to the thromboelastography parameters), but should also have less severe side effects in terms of burning.

According to the results reported by Ostomel et al. [24], zeolite Linde Type 5A ion exchanged with monovalent cations (K⁺, Ag⁺) are more efficient in reducing the heat releasing than divalent cations (Ba²⁺, Sr²⁺). Zeolite Linde type 5A ion exchanged with K⁺ and Ag⁺ have caused a decrease of heat release from 680 J/g to 584 J/g and 420 J/g, respectively. While ion exchange with Ba²⁺ and Sr²⁺ have caused a decrease of heat release from 680 to 600 J/g and 650 J/g, respectively. Therefore replacement of Na⁺ ions for different monovalent or divalent ions has the potential of decreasing the energy loss or heat releasing of these materials. Our data shown that the replacement of Na⁺ ions for Ca²⁺ has also caused decreased the heat releasing from 105.6 to 65.8 J/g. One possible explanation to this significant difference between the values found by Ostomel et al. [24] and results reported in this work could attributed to the their different zeolites crystallographic structures of the zeolites [47,48]. Both zeolites have a completely different system of channels and porous with crystallographic or occupation site defined by distinct space groups and symmetries [49], hence it is reasonable to expect that the extra-framework cations would have different diffusion and physicochemical behavior at the distinct crystallographic sites by binding themselves strong or weakly to the crystallographic waters molecules or framework oxygen, therefore in order to break down these chemical bonds different amount of energy would be required.

Additionally phase-contrast microscopy was also performed in order to observe the morphological changes in red cells when zeolites come into contact with blood. Fig. 9a and b have shown red cells before the addition of zeolite using a phase contrast objective with an increase of 10X and the data reveal that normal red blood cells have a circular shape, biconcave format and have a diameter ranging from 6 to 8 μ m in absence of zeolites. The presence of zeolite cause a red cell agglomeration forming a large clot similar to a mass solid blood cells (Fig. 9c–f). Similar behavior was also observed for micrometric *faujasite* zeolite calcium-exchange derivative FAU/Ca (Fig. 9d); Nano-FAU (Fig. 9e) and Nano-FAU/Ca (Fig. 9f) were put in contact with blood, therefore confirming the

clot formation and the capacity of zeolites to promote the acceleration of blood coagulation.

4. Conclusions

Experimental evidences have shown that nanometric *faujasite* zeolites are more efficient hemostatic agents in comparison to the micrometric zeolites, therefore with potential of being externally used as rapidly-acting hemostatic agent to a universally lethal injury of the vascular system. The use of *in vitro* assays with micrometric and nanometric zeolites have shown Nano-FAU and Nano-FAU/Ca have significantly induced the formation of a detectable blood clot faster than the micrometric zeolites. Nanometric zeolites materials in principle can also reduce the collateral damage of burning, since the experimental evidences have shown they released lesser heat than the micrometric zeolites.

Acknowledgements

This work was funded by the São Paulo State Research Foundation (FAPESP, #2013/16754-4, #2012/24259-0), and made use of the CNPEM/LNNano (National Research Center for Energy and Materials) facilities (#SEM-19234/AFM-17388).

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data related to this article can be found at <http://dx.doi.org/10.1016/j.micromeso.2016.10.020>.

References

- [1] G.C. Velmahos, M. Tabbara, K. Spaniolas, M. Duggan, H.B. Alam, M. Serra, L. Sun, J. de Luis, *J. Trauma* 66 (2009) 984–988.
- [2] I. Wedmore, J.G. McManus, A.E. Pusateri, J.B. Holcomb, *J. Trauma* 60 (2006) 655–658.
- [3] H.B. Alam, Z. Chen, A. Jaskille, R. Querol, E. Koustova, R. Inocencio, R. Conran, A. Seufert, N. Ariaban, K. Toruno, P. Rhee, *J. Trauma* 56 (2004) 974–983.
- [4] J. Granville-Chapman, N. Jacobs, *Injury* 42 (2011) 447–459.
- [5] B.G. Kozen, S.J. Kircher, J. Henao, F.S. Godinez, A.S. Johnson, *Acad. Emerg. Med.; Off. J. Soc. Acad. Emerg. Med.* 15 (2008) 74–81.
- [6] M. Wu, Z. Ye, H. Zhu, X. Zhao, *Biomacromolecules* 16 (2015) 3112–3118.
- [7] D.G. Wallace, G.M. Cruise, W.M. Rhee, J.A. Schroeder, J.J. Prior, J. Ju, M. Maroney, J. Duronio, M.H. Ngo, T. Estridge, G.C. Coker, *J. Biomed. Mater. Res.* 58 (2001) 545–555.
- [8] E. Huri, T. Akgül, A. Ayyıldız, H. Üstün, C. Germiyanoglu, *J. Urol.* 181 (2009) 2349–2354.
- [9] Y.L. Zhang, C. Xu, Y.Q. He, X.D. Wang, F.B. Xing, H.X. Qiu, Y. Liu, D.Y. Ma, T. Lin, J.P. Gao, *J. Biomater. Sci. Polym.* 22 (2011) 809–822.
- [10] T. Gerlach, J.K. Grayson, K.O. Pichakron, M.J. Sena, S.D. DeMartini, B.Z. Clark, J.S. Estep, D. Zierold, *J. Trauma* 69 (2010) 1203–1209.
- [11] B.S. Kheirabadi, M.R. Scherer, J.S. Estep, M.A. Dubick, J.B. Holcomb, *J. Trauma Acute Care Surg.* 67 (2009) 450–460.
- [12] B.S. Kheirabadi, J.E. Mace, I.B. Terrazas, C.G. Fedyk, J.S. Estep, M.A. Dubick, L.H. Blackburne, *J. Trauma Acute Care Surg.* 68 (2010) 269–278.
- [13] S.E. Baker, A.M. Sawvel, N. Zheng, G.D. Stucky, *Chem. Mater.* 19 (2007) 4390–4392.
- [14] T. Peng, *Biomater. Artif. Organs* 24 (2010) 27–68.
- [15] A.E. Pusateri, J.B. Holcomb, B.S. Kheirabadi, H.B. Alam, C.E. Wade, K.L. Ryan, *J. Trauma* 60 (2006) 674–682.
- [16] P. Rhee, C. Brown, M. Martin, A. Salim, D. Plurad, D. Green, L. Chambers, D. Demetriades, G. Velmahos, H. Alam, *J. Trauma* 64 (2008) 1093–1099.
- [17] N. Ahuja, T.A. Ostomel, P. Rhee, G.D. Stucky, R. Conran, Z. Chen, G.A. Al-Mubarak, G. Velmahos, M. deMoya, H.B. Alam, *J. Trauma* 61 (2006) 1312–1320.
- [18] H.E. Achneck, B. Sileshi, R.M. Jamiolkowski, D.M. Albalá, M.L. Shapiro, J.H. Lawson, *Ann. Surg.* 251 (2010) 217–228.
- [19] H.B. Alam, D. Burris, J.A. DaCorta, P. Rhee, *Mil. Med.* 170 (2005) 63–69.
- [20] S.M.J. Mortazavi, A. Tavasoli, M. Atefi, N. Tanide, N. Radpey, P. Roshan-shomal, H. Moradi, S. Taeb, *World J. Emerg.* 4 (2013) 123–127.
- [21] M. Alavi, A. Totonchi, M.A. Okhovat, M. Motazedian, P. Rezaei, M. Atefi, *Blood Coagul. Fibrinolysis; Int. J. Haemost. Thromb.* 25 (2014) 856–859.
- [22] J.K. Wright, J. Kalns, E.A. Wolf, F. Traweek, S. Schwarz, C.K. Loeffler, W. Snyder, L.D. Yantis, J. Eggers, *J. Trauma* 57 (2004) 224–230.
- [23] T.R. Hurtado, T. Wisenbaugh, *Ann. Emerg. Med.* 46 (2005) 297.

- [24] T.A. Ostomel, P.K. Stoimenov, P.A. Holden, H.B. Alam, G.D. Stucky, *J. Thromb. Thrombolysis* 22 (2006) 55–67.
- [25] L. Tosheva, V.P. Valtchev, *Chem. Mater.* 17 (2005) 2494–2513.
- [26] B.Z. Zhan, M.A. White, K.N. Robertson, T.S. Cameron, M. Gharghoury, *Chem. Commun.* (2001) 1176–1177.
- [27] J.G. Nery, Y.P. Mascarenhas, A.K. Cheetham, *Microporous Mesoporous Mater.* 57 (2003) 229–248.
- [28] V.A. Drebuschak, Measurements of heat of zeolite dehydration by scanning heating, *J. Therm. Anal. Calorim.* 58 (1999) 653–662.
- [29] M.E. Brown, *Introduction to Thermal Analysis: Techniques and Applications*, Chapman & Hall, New York, 1988, pp. 174–202.
- [30] T.A. Ostomel, Q. Shi, P.K. Stoimenov, G.D. Stucky, *Langmuir ACS J. Surfaces Colloids* 23 (2007) 11233–11238.
- [31] M. Alkan, Ö. Demirbaş, M. Doğan, *J. Colloid Interface Sci.* 281 (2005) 240–248.
- [32] M.L. Fisher, M. Colic, M.P. Rao, F.F. Lange, *J. Am. Ceram. Soc.* 84 (2001) 713–718.
- [33] T. Frising, P. Leflaive, *Micropor. Mesopor. Mat.* 114 (2008) 27–63.
- [34] V. Nikolakis, *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* 10 (2005) 203–210.
- [35] J.H. Griffin, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 75 (1978) 1998–2002.
- [36] T. Kuzniatsova, Y. Kim, K. Shqau, P.K. Dutta, H. Verweij, *Microporous Mesoporous Mater.* 103 (2007) 102–107.
- [37] W.L. Yang, X.D. Wang, Y. Tang, Y.J. Wang, C. Ke, S.K. Fu, *J. Macromol. Sci. Part B* 39 (2002) 509–526.
- [38] D. Tarn, C.E. Ashley, M. Xue, E.C. Carnes, J.I. Zink, C.J. Brinker, *Acc. Chem. Res.* 46 (2013) 792–801.
- [39] H.T. Peng, S.G. Rhind, *Clin. Appl. Thromb.; Off. J. Int. Acad. Clin. Appl. Thromb.* 21 (2015) 497–512.
- [40] P.F. Glidden, C. Malaska, S.W. Herring, *Clin. Appl. Thromb. Hemost.* 6 (2000) 226–233.
- [41] M. Thakur, A.B. Ahmed, *IJPUT* 1 (2012) 25–29.
- [42] T.A. Ostomel, Q.H. Shi, G.D. Stucky, *J. Am. Chem. Soc.* 128 (2006) 8384–8385.
- [43] M. Hoffman, Remodeling the blood coagulation cascade, *J. Thromb. Thrombolysis* 16 (2003) 17–20.
- [44] J. Li, W. Cao, X.X. Lv, L. Jiang, Y.J. Li, W.Z. Li, S.Z. Chen, X.Y. Li, *Acta Pharmacol. Sin.* 34 (2013) 367–372.
- [45] F. Arnaud, T. Tomori, W. Carr, A. McKeague, K. Teranishi, K. Prusaczyk, R. McCarron, *Ann. Biomed. Eng.* 36 (2008) 1708–1713.
- [46] A.E. Pusateri, S.J. McCarthy, K.W. Gregory, R.A. Harris, L. Cardenas, A.T. McManus, C.W. Goodwin, *J. Trauma* 54 (2003) 177–182.
- [47] V. Gramlich, W.M. Meier, *The Crystal Structure of Hydrated NaA: a Detailed Refinement of a Pseudosymmetric Zeolite Structure*, Database of Zeolite Structures, <http://www.iza-structure.org/databases/>.
- [48] W.H. Baur, *On the Cation and Water Positions in Faujasite* Database of Zeolite Structures, <http://www.iza-structure.org/databases/>.
- [49] T. Hahn, *Space-Group Symmetry*, International Tables for Crystallography, vol. A, Reidel, Dordrecht, 1983.

ANEXO III – Parecer Consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa



FACULDADE DE MEDICINA DE
SÃO JOSÉ DO RIO PRETO-
FAMERP - SP



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: SÍNTESE DE AGENTES HEMOSTÁTICOS COAGULANTES BASEADOS EM NOVOS MATERIAIS ZEOLÍTICOS

Pesquisador: Juliana Bergamasco Laurenti

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 48358215.9.0000.5415

Instituição Proponente: FUNDAÇÃO FACULDADE REGIONAL DE MEDICINA S J RIO PRETO

Patrocinador Principal: FUNDAÇÃO DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DE SÃO PAULO

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.217.677

Apresentação do Projeto:

Trata-se de um estudo cujo objetivo é investigar a possibilidade de que a síntese e a caracterização de diferentes materiais zeolíticos tanto na escala nanométrica e micrométrica possam atuar como agentes hemostáticos no controle de sangramentos através da aceleração do processo de coagulação pela via intrínseca.

Objetivo da Pesquisa:

O objetivo deste trabalho é a síntese e a caracterização de novos materiais zeolíticos na escala micrométrica e nanométrica de diferentes estruturas que possam atuar como agente hemostático no controle de sangramentos através da aceleração do processo de coagulação; análise da eficiência hemostática através de estudos in vitro utilizando o monitor de coagulação ativado e a técnica de tromboelastografia (TEG) que avalia a eficiência na coagulação sanguínea através da determinação dos parâmetros (R, K, α , MA); e estudos do efeito térmico das zeólitas utilizando as técnicas de análise termogravimétrica (TGA) e Calorimetria diferencial de varredura (DSC).

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Para a execução deste projeto haverá um risco mínimo, pois serão utilizadas amostras de sangue pertencentes à Laboratório de Hemodinâmica do Hospital de Base de São José do Rio Preto – SP de

Endereço: BRIGADEIRO FARIA LIMA, 5416
Bairro: VILA SÃO PEDRO **CEP:** 15.090-000
UF: SP **Município:** SÃO JOSÉ DO RIO PRETO
Telefone: (17)3201-5813 **Fax:** (17)3201-5813 **E-mail:** cepfamerp@famerp.br



Continuação do Parecer: 1.217.677

pacientes que serão submetidos à algum tipo de procedimento médico que será necessário a coleta de sangue. Antes da coleta os pacientes serão abordados e aplicados o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Os benefícios estão diretamente ligados aos possíveis desfechos a serem investigados.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de um pesquisa interessante, factível, sem maiores desdobramentos à Ética ou à segurança dos pacientes.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Presentes e adequados.

Recomendações:

Não há.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Projeto aprovado.

Considerações Finais a critério do CEP:

Projeto Aprovado.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Termo de consentimento.pdf	10/08/2015 19:18:45		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto Plataforma Brasil.pdf	10/08/2015 19:20:55		Aceito
Folha de Rosto	Folha de rosto.pdf	10/08/2015 19:18:24		Aceito
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_468374.pdf	10/08/2015 19:24:55		Aceito
Outros	Declaração_Comite_etica.pdf	12/08/2015 12:19:58		Aceito
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_468374.pdf	12/08/2015 12:20:19		Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Endereço: BRIGADEIRO FARIA LIMA, 5416
Bairro: VILA SAO PEDRO CEP: 15.090-000
UF: SP Município: SAO JOSÉ DO RIO PRETO
Telefone: (17)3201-5813 Fax: (17)3201-5813 E-mail: cepfamerp@famerp.br



FACULDADE DE MEDICINA DE
SÃO JOSE DO RIO PRETO-
FAMERP - SP



Continuação do Parecer: 1.217.877

Necessita Apreciação da CONEP:
Não

SAO JOSE DO RIO PRETO, 08 de Setembro de 2015

Assinado por:
LUCIANO GARCIA LOURENCAO
(Coordenador)

Endereço: BRIGADEIRO FARIA LIMA, 5416
Bairro: VILA SAO PEDRO CEP: 15.090-000
UF: SP Município: SAO JOSE DO RIO PRETO
Telefone: (17)3201-5813 Fax: (17)3201-5813 E-mail: cepfamerp@famerp.br

Termo de consentimento livre e esclarecido - TCLE

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO - TCLE

1. Você está sendo convidado para participar da pesquisa “SÍNTESE DE AGENTES HEMOSTÁTICOS COAGULANTES BASEADOS EM NOVOS MATERIAIS ZEOLÍTICO”.
2. Você foi selecionado casualmente e sua participação não é obrigatória.
3. A qualquer momento você pode desistir de participar e retirar seu consentimento.
4. Sua recusa não trará nenhum prejuízo em sua relação com o pesquisador ou com a instituição.
5. Os objetivos deste estudo são o desenvolvimento de novos agentes hemostáticos coagulantes de uso médico-hospitalar e farmacêutico que tem como finalidade a promoção da hemostasia através da aceleração da coagulação sanguínea.
6. Sua participação nesta pesquisa consistirá na doação de uma alíquota de sangue que será retirada juntamente com a amostra de sangue para exames de rotina e/ou procedimentos médicos.
7. Os riscos relacionados com sua participação são caracterizados por mínimo durante a coleta de sangue.
8. Os benefícios relacionados com a sua participação são: os resultados e o sucesso dessa pesquisa oferece a possibilidade de nacionalização de agentes hemostáticos, ainda não comercializados no mercado brasileiro, visto que estes materiais apresentam um grande potencial de aplicação em serviços de emergência, salas de parto, unidades de cuidados intensivos e consultórios dentários.
9. As informações obtidas através dessa pesquisa serão confidenciais e asseguramos o sigilo sobre sua participação.
10. Os dados não serão divulgados de forma a possibilitar sua identificação. O tratamento dos dados será por métodos estatísticos não sendo necessária a identificação dos participantes.
11. Você receberá uma cópia deste termo onde consta o telefone e o endereço do pesquisador principal, podendo tirar suas dúvidas sobre o Projeto de Pesquisa de sua participação, agora ou a qualquer momento.

DADOS DO PESQUISADOR PRINCIPAL (ORIENTADOR/ORIENTADA)

José Geraldo Nery / Juliana Bergamasco Laurenti

Nome

Assinatura

Rua: Cristóvão Colombo, 2265. Jardim Nazareth. São José do Rio Preto - SP

Endereço completo

(017)991036515

Telefone

Declaro que entendi os objetivos, riscos e benefícios de minha participação na pesquisa e concordo em participar. O pesquisador me informou que o projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da FAMERP (CEP/FAMERP) está disponível no telefone: (17) 3201-5813 ou pelo email: cepfamerp@famerp.br.

São José do Rio Preto, ____ de _____ de _____

Sujeito da pesquisa *

Pai / Mãe ou Responsável Legal

OBSERVAÇÃO: * Quando o sujeito da pesquisa for criança, adolescente, ou pessoa com discernimento prejudicado faz-se necessário, também, a assinatura do Pai / Mãe ou Responsável Legal.

TERMO DE REPRODUÇÃO XEROGRÁFICA

Autorizo a reprodução xerográfica do presente Trabalho de Conclusão, na íntegra ou em partes, para fins de pesquisa.

São José do Rio Preto, 17/08/2017

Assinatura do autor