



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

Marcelo Valdemir de Araújo

**Síntese de agentes hemostáticos coagulantes com base em
materiais zeolíticos**

São José do Rio Preto, 2013

Marcelo Valdemir de Araújo

**Síntese de Agentes Hemostáticos Coagulantes com Base em Materiais
Zeolíticos**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre 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”, Câmpus São José do Rio Preto – SP.

Orientador: Prof. Dr. José Geraldo Nery

São José do Rio Preto - 2013

Araújo, Marcelo Valdemir de.

Síntese de agentes hemostáticos coagulantes com base em materiais zeolíticos / Marcelo Valdemir de Araújo. -- São José do Rio Preto, 2013
84 f. : il., gráfs., tabs.

Orientador: José Geraldo Nery

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Microbiologia. 2. Sangue – Coagulação. 3. Zeólitos. 4. Hemostáticos. 5. Troca iônica. 6. Tromboelastografia. I. Nery, José Geraldo. II. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. III. Título.

CDU – 612.115

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

Marcelo Valdemir de Araújo

Síntese de Agentes Hemostáticos com Base em Materiais Zeolíticos

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre 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”, Câmpus São José do Rio Preto – SP.

Banca examinadora

Prof. Dr. José Geraldo Nery

UNESP – São José do Rio Preto

Orientador

Profa. Dra. Claudia Regina Bonini Domingos

UNESP – São José do Rio Preto

Prof. Dr. Moacir Fernandes Godoy

FAMERP – São José do Rio Preto

São José do Rio Preto - 2013

À minha família: Luzia, Lindomar, Andréia, Gesilano,

Ronaldo, Cilene, Ricardo, Sara, Guilherme,

Gabriela, Higor e José Victor.

Agradecimentos

À Deus, pela força e esperança diária.

Ao Prof. Dr. José Geraldo Nery, pela oportunidade, ensinamentos e sugestões.

Aos meus companheiros de laboratório: Adriano, Alex, Danilo, Roberto, Vinicius, Glaucia, Juliana, por toda força, por toda ajuda, por me suportarem nos piores dias e jubilarem comigo nos dias de alegria.

À Janaina, Júnior e Otávio, do Laboratório de Sucroquímica e Química Analítica, do campus Ibilce-UNESP, pelos dados TGA e ATR-FTIR.

À mestre Tânia, Dra Diana Fraes, Valéria e Regina, do Laboratório de Hematologia da USP, São Paulo, pelos dados de TEG, pelos ensinamentos sobre o funcionamento do mesmo e pela paciência, e ao Dr. Elbio D'Amico, responsável pelo laboratório, por ter aceito tão gentilmente participar deste projeto.

Aos professores da banca Prof. Dra. Claudia Regina Bonini Domingos e Prof. Dr. Moacir Fernandes Godoy.

Resumo

O presente trabalho teve como objetivo a síntese e a caracterização de diferentes tipos de famílias zeolíticas e a avaliação do uso como agentes hemostáticos coagulantes. Foram sintetizadas três classes de zeólitas: faujasita (FAU), gismondina (GIS) e mordenita (MOR) em sua forma sódica, e estas zeólitas foram convertidas para as formas Ca^{2+} pelo processo de troca iônica. Após a caracterização desses materiais, foram avaliados seus potenciais como agentes hemostáticos coagulantes, tanto em sua forma sódica como a forma Ca^{2+} , com testes *in vitro* utilizando a tromboelastografia. Para que se obtivesse dados comparativos, foi utilizado nos testes um agente hemostático já conhecido, o Caolin. Os resultados mostraram que os seis materiais zeolíticos sintetizados agiram como agente hemostático coagulante diminuindo consideravelmente o tempo de coagulação e aumentando a taxa de geração de trombina. Entretanto, a zeólita GIS/ Ca^{2+} exibiu maior eficácia nos parâmetros gerais como taxa de geração do coágulo (K), taxa de geração de trombina (α) e propriedade elástica da fibrina (AM), enquanto que a MOR/ Ca^{2+} exibiu resultados menos eficazes nos parâmetros gerais de coagulação, demonstrando que sua estrutura é de difícil acesso ao Ca^{2+} durante o processo de troca iônica, interferindo no processo de coagulação.

Palavras chave: zeólitas, agente hemostático, coagulação, troca iônica e tromboelastografia.

ABSTRACT

The main goals of this research work were the synthesis and characterization of different types of zeolites and evaluation of their use as hemostatic agents. Initially, three different zeolites were synthesized: faujasite (FAU), gismondine (GIS) and mordenite (MOR). The three zeolites were first prepared in their sodium form and thereafter they were submitted to an ion exchange process in order to replace extra-framework Ca^{2+} . After characterization these materials, were assessed in their potential as hemostatic agents, both the sodium as well as the calcium forms, in vitro tests using thromboelastography. In order to obtain comparative data was used in testing agent hemostatic already known, the Kaolin. The results showed that all six zeolite materials have successfully as a hemostatic agent reducing the coagulation time and increasing the rate of clot thrombin generation. Although, zeolite GIS/ Ca^{2+} to be more efficient in general parameters such as rate of generation (K), thrombin generation rates (α) and elastic property of fibrin (AM), while the results showed MOR/ Ca^{2+} less efficient in the general parameters of coagulation, showing that its structure is difficult access to Ca^{2+} in the ion exchange process.

Keywords: zeolites, hemostatic agent, coagulation, ion exchange and thromboelastography.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Estrutura cristalográfica das zeólitas Faujasita, Gismondina e Mordenita.....	18
Figura 2 Unidades primárias de construção.....	19
Figura 3 Unidades secundárias de construção.....	20
Figura 4 Unidades poliédricas de construção.....	21
Figura 5 Formação estrutural da zeólita A e Y.....	22
Figura 6 Esquema da cascata de coagulação, padrões intrínseco e extrínseco.....	31
Figura 7 Esquema da nova cascata de coagulação, modelo celular.....	34
Figura 8 Esquema representativo da ativação de contato.....	35
Figura 9 Imagem do aparelho Tromboelastógrafo.....	37
Figura 10 Esquema do tromboelastograma.....	37
Figura 11 Difratoograma da zeólita faujasita (FAU/PURA).....	43
Figura 12 Difratoograma da zeólita faujasita pura e com cálcio (FAU/PURA e FAU/Ca ²⁺).....	44
Figura 13 Difratoograma da zeólita gismondina (GIS/PURA).....	45
Figura 14 Difratoograma da zeólita gismondina pura e com cálcio (GIS/PURA e GIS/Ca ²⁺).....	46
Figura 15 Difratoograma da zeólita mordenita (MOR/PURA).....	47
Figura 16 Difratoograma da zeólita mordenita pura e com cálcio (MOR/PURA e MOR/Ca ²⁺).....	48
Figura 17 Difratoograma da zeólita mordenita com cálcio, comparando o primeiro e segundo processo de troca iônica.....	49

Figura 18 Termograma da zeólita faujasita (FAU/PURA).....	50
Figura 19 Termograma da zeólita faujasita pura e com cálcio (FAU/PURA e FAU/Ca ²⁺).....	51
Figura 20 Termograma da zeólita gismondina (GIS/PURA).....	52
Figura 21 Termograma da zeólita gismondina pura e com cálcio (GIS/PURA e GIS/Ca ²⁺).....	53
Figura 22 Termograma da zeólita mordenita (MOR/PURA).....	54
Figura 23 Termograma da zeólita mordenita pura e com cálcio (MOR/PURA e MOR/Ca ²⁺).....	55
Figura 24 Infravermelho da zeólita faujasita pura e com cálcio (FAU/PURA e FAU/Ca ²⁺) (400 cm ⁻¹ a 1200 cm ⁻¹).....	57
Figura 25 Infravermelho da zeólita faujasita pura e com cálcio (FAU/PURA e FAU/Ca ²⁺) (1200 cm ⁻¹ a 4000 cm ⁻¹).....	58
Figura 26 Infravermelho da zeólita gismondina pura e com cálcio (GIS/PURA e GIS/Ca ²⁺) (400 cm ⁻¹ a 1200 cm ⁻¹).....	59
Figura 27 Infravermelho da zeólita gismondina pura e com cálcio (GIS/PURA e GIS/Ca ²⁺) (1200 cm ⁻¹ a 4000 cm ⁻¹).....	59
Figura 28 Infravermelho da zeólita mordenita pura e com cálcio (MOR/PURA e MOR/Ca ²⁺) (400 cm ⁻¹ a 1200 cm ⁻¹).....	60
Figura 29 Infravermelho da zeólita mordenita pura e com cálcio (MOR/PURA e MOR/Ca ²⁺) (1200 cm ⁻¹ a 4000 cm ⁻¹).....	61
Figura 30 Micrografia eletrônica da zeólita faujasita pura (FAU/PURA).....	62
Figura 31 Micrografia eletrônica da zeólita faujasita com cálcio (FAU/Ca ²⁺).....	62
Figura 32 Micrografia eletrônica da zeólita gismondina pura (GIS/PURA).....	63
Figura 33 Micrografia eletrônica da zeólita gismonida com cálcio (GIS/Ca ²⁺).....	63
Figura 34 Micrografia eletrônica da zeólita mordenita pura (MOR/PURA).....	64

Figura 35 Micrografia eletrônica da zeólita mordenita com cálcio (MOR/Ca ²⁺).....	64
Figura 36 Tromboelastograma do sangue total puro.....	65
Figura 37 Tromboelastograma do sangue total tratado com a zeólita faujasita (FAU/PURA).....	66
Figura 38 Tromboelastograma do sangue total tratado com a zeólita faujasita com cálcio (FAU/Ca ²⁺).....	66
Figura 39 Tromboelastograma do sangue total tratado com a zeólita gismondina (GIS/PURA).....	67
Figura 40 Tromboelastograma do sangue total tratado com a zeólita gismondina com cálcio (GIS/Ca ²⁺).....	67
Figura 41 Tromboelastograma do sangue total tratado com a zeólita mordenita (MOR/PURA).....	68
Figura 42 Tromboelastograma do sangue total tratado com a zeólita mordenita com cálcio (MOR/Ca ²⁺).....	68
Figura 43 Tromboelastograma do sangue total tratado com o agente hemostático Caolin.....	69
Figura 44 Gráfico referente a média obtida dos valores do tempo R.....	70
Figura 45 Gráfico referente a média obtida dos valores do tempo K.....	71
Figura 46 Gráfico referente a média obtida dos valores do ângulo α	72
Figura 47 Gráfico referente a média obtida dos valores da MA.....	73
Figura 48 Gráfico referente a média obtida de todos os índices de coagulação do sangue total puro e do sangue total tratado com os materiais zeolíticos.....	74

INDICE DE TABELAS

Tabela 1 Atribuições de infra-vermelho comum a todas as zeólitas.....	56
Tabela 2 Dados obtidos das análises do tromboelastograma, parâmetros R, K, α e MA.....	69

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AM – amplitude máxima ou máxima amplitude (MA)

ATR-FTIR – espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier com refletância atenuada

DAS – agente direcionador de estrutura

FAU – faujasita

FAU/Ca²⁺ - faujasita trocada com cálcio

FDA – Food and Drug Administration

GIS – gismondina

GIS/Ca²⁺ – gismondina trocada com cálcio

HMWK – cininôgenio de alto peso molecular

IZA – International Zeolites Administration

MEV – micrografia eletrônica de varredura

MOR – mordenita

MOR/Ca²⁺ – mordenita trocada com cálcio

SBU – secondary building units

TAFI – inibidor de fibrinólise ativado pela trombina

TF – fator tecidual

TFPI – inibidor proteico do fator tecidual

TEAOH - tetraetilamônio

TEG – tromboelastograma

TGA - termogravimetria

TPAOH - tetrapropilamônio

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	15
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	17
2.1 Definição de zeólitas.....	17
2.1.1 Propriedades das zeólitas.....	19
2.1.2 Síntese das zeólitas.....	23
2.1.3 Zeólita na medicina veterinária (Agrobusiness).....	24
2.1.4 Zeólita aplicada à medicina humana.....	24
2.2 Hemostasia.....	26
2.2.1 Coagulação sanguínea (cascata de coagulação).....	27
2.2.1.1 Via intrínseca.....	28
2.2.1.2 Via extrínseca.....	29
2.2.1.3 Padrão comum.....	30
2.2.2 Modelo celular.....	31
2.2.2.1 Iniciação.....	32
2.2.2.2 Amplificação.....	32
2.2.2.3 Propagação.....	33
2.2.3 Ativação de contato.....	34
2.3 Tromboelastografo.....	35
3 JUSTIFICATIVA.....	38
4 OBJETIVO GERAL.....	38

5 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	38
6 MATERIAS E MÉTODO.....	39
7 SÍNTESES.....	39
7.1 Síntese da zeólita faujasita.....	39
7.2 Síntese da zeólita gismondina.....	39
7.3 Síntese da zeólita mordenita.....	40
8 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DOS MATERIAIS ZEOLÍTICOS.....	40
8.1 Difração de raio-X.....	40
8.2 Microscopia eletrônica de varredura.....	41
8.3 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier com refletância atenuada.....	41
8.4 Análise Termogravimétrica.....	41
8.5 Tromboelastrografia.....	41
9 RESULTADOS.....	43
9.1 Difração de raio-X.....	43
9.2 Análise Termogravimétrica.....	50
9.3 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier com refletância atenuada.....	56
9.4 Microscopia eletrônica de varredura.....	62
9.5 Tromboelastrografia.....	65
10 Discussão.....	75
11 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	76

1 – INTRODUÇÃO

A hemorragia descontrolada decorrente de trauma é a segunda maior causa de mortes em comunidades civis. E é a líder na causa de mortes resultante de traumas de batalhas (Pusateri *et al.*, 2004). No Brasil, a hemorragia é responsável por cerca de 45% das mortes causadas por traumas; além de ser considerada a primeira causa de óbitos nas primeiras 48 horas após o trauma e contribuir também para a mortalidade tardia (Parreira, Soldá e Rasslan, 2002). Sobreviventes de traumas tem a incapacidade de controlar o sangramento levando à transfusão de sangue, aumento na taxa de complicações, imunossupressão, incapacidade de gerar células vermelhas e tempo prolongado de internação. A solução ideal para estes problemas é o controle inicial da hemorragia (Wright *et al.*, 2004).

Celsus, no século I a.C., descreveu algumas práticas de contenção do sangramento como: aplicação de pressão na feridas, ligação dos vasos e cauterização; práticas similares às atuais; métodos melhores de alcançar a hemostasia aumentarão a sobrevivência e reduzirão significativamente as sequelas dos sobreviventes. Pesquisas efetivas nas últimas décadas produziram numerosos agentes hemostáticos que atualmente estão em fase de avaliação (Acheson *et al.*, 2005; Pusateri *et al.*, 2006).

Os materiais zeolíticos, aluminosilicatos, possuem propriedades hemostáticas e foram utilizados no desenvolvimento de novos agentes. As zeólitas oferecem uma grande área superficial e agem como uma peneira molecular, separando as moléculas por tamanho. Quando entram em contato com o sangue, as zeólitas adsorvem rapidamente e prendem as moléculas de água nos seus poros; essa sua ação tem como efeito a concentração das proteínas e elementos celulares resultando na formação do coágulo (Arnaud *et al.*, 2008).

Devido à importância do controle do sangramento em batalhas e traumas civis, as pesquisas focam na procura de um agente hemostático ideal para uso pré-hospitalar, este agente deve atender alguns critérios como: capacidade de estancar o sangramento, tanto arterial quanto venoso, dentro de 2 minutos após a aplicação na lesão; deve estar pronto para o uso sem necessidade de preparação prévia ou pessoal especializado; de fácil aplicação, ou seja, o indivíduo pode aplicá-lo sem ajuda; deve ser leve e durável; funcional em temperatura ambiente por pelo menos por 2 anos; deve ser seguro, sem riscos de dano a qualquer tecido que seja aplicado ou transmissão bacteriana ou viral; e

finalmente, deve ser barato (Pusateri *et al.*, 2004; Acheson *et al.*, 2005; Pusateri *et al.*, 2006; Snow, Olson e Melcer, 2006; Arnaud *et al.*, 2008).

Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi a síntese e a caracterização de diferentes materiais zeolíticos que atuariam como agente hemostático no controle de sangramentos através da aceleração do processo de coagulação, e que não teriam nenhum tipo de reação adversa ao tecido aplicado e ao paciente, e a possível comercialização desse material.

2 – FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Definição de zeólitas

O termo zeólita vem do grego, e significa “pedra de ebulição”. Foi o nome dado pelo mineralogista Axel von Cronstedt (1756), a um mineral que liberava água, visivelmente, quando aquecido (propriedade de intumescência) (Dyer, 2001).

A partir daí, muitos outros minerais similares a estes foram descobertos e a palavra zeólita passou a descrever uma família de minerais. Eles são comumente formados como o resultado da atividade vulcânica e também pela ação da água em ambientes próximos a vulcões (Dyer 2001).

Historicamente, as zeólitas são definidas como aluminossilicatos que possuem estrutura tridimensional com ligações tetraédricas de Silício-Alumínio-Oxigênio. Esta definição foi ampliada para incluir todos materiais caracterizados como materiais cristalinos de estrutura tetraédrica que contenha 4 (quatro) Oxigênio circundado por cátions que podem ser Al, Si, P, Be, Zn, Mg, Co, B, etc. Esta estrutura contém canais e cavidades em que podem ser encontrado moléculas de água e cátions. As moléculas de água podem ser liberadas reversivelmente e os cátions usualmente substituídos, pelo método de troca iônica. Os canais podem ter regiões microporosas e serem grandes o suficiente para acomodar determinadas moléculas, que podem ou não serem orgânicas (Dyer, 2001). Os tetraedros TO_4 nas zeólitas são aproximadamente regulares, com ângulos T-O-T em torno dos átomos de Oxigênio no intervalo de 125° a 180° , sendo essa uma das razões da existência de tantas estruturas diferentes (Vasconcellos, 2010).

A fórmula geral de uma zeólita à base de aluminossilicato 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 (Ghobarkar, Schaf e Guth, 1999).

A relação entre o átomo T (T=Al, Si) e o átomo de oxigênio é de 1:2 e a presença dos átomos de alumínio na rede induz a uma carga líquida negativa que pode

ser variada, mudando a relação de Si/Al. Essa carga negativa é neutralizada pela presença dos cátions metálicos ou orgânicos. Os cátions extra-rede estão geralmente localizados nos canais e cavidades, podendo ser trocados pelo tratamento de troca iônica com uma solução salina em condições físico-químicas apropriadas.

O terceiro componente da fórmula geral é a fase adsorvida. Esta é dada geralmente como água na fórmula acima, porém, pode ser também um componente orgânico, como por exemplo, o benzeno. O componente aquoso ou orgânico desempenha um importante papel durante a síntese das zeólitas, tornando-se uma parte integrante da estrutura em desenvolvimento. A fase adsorvida pode ser removida da zeólita cristalina por aquecimento ou sob pressão reduzida sem destruição da estrutura zeolítica. Os três componentes da estrutura (esqueleto cristalino, cátions extra-rede de compensação e a fase adsorvida) são alvos de intenso interesse e desempenham um papel cujo grau de importância varia de acordo com a sua aplicação (Cundy e Cox, 2005).

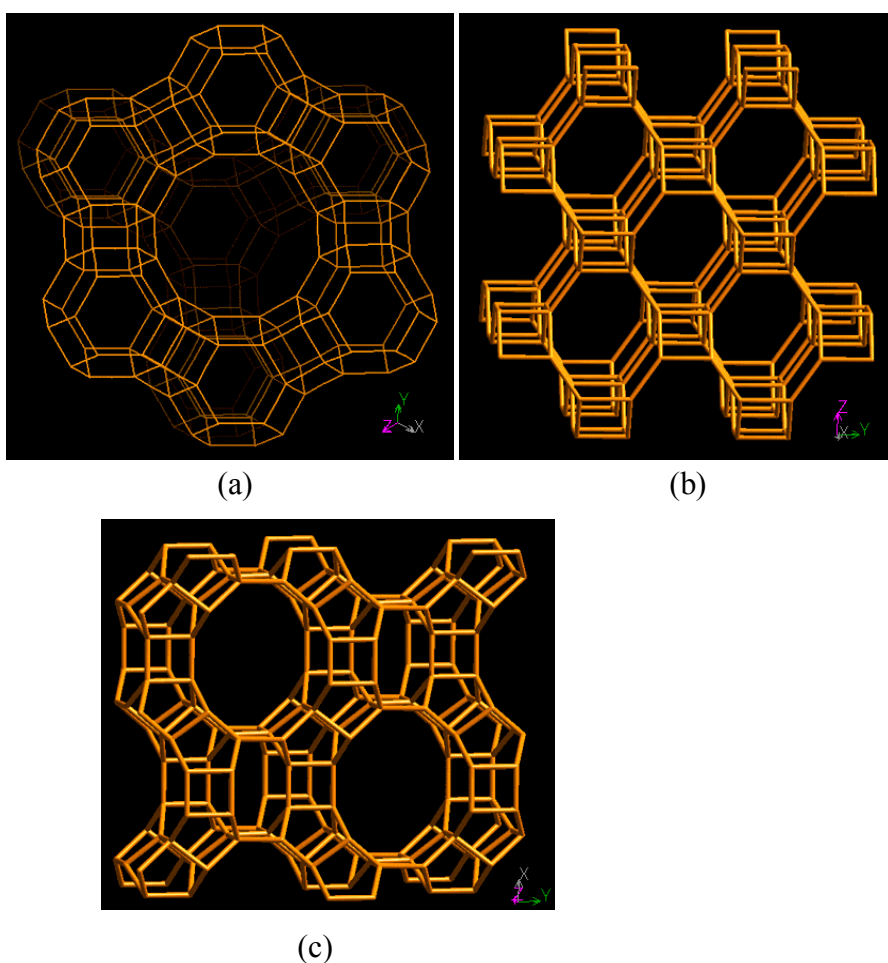


Figura 1: estrutura cristalográfica das zeólitas Faujasita (a), Gismondina (b) e Mordenita (c). Fonte IZA (Internacional Zeolite Association)

2.1.1 Propriedades das zeólitas

A maioria das propriedades físico-química das zeólitas estão diretamente relacionadas à sua estrutura cristalográfica. Por essa razão, a caracterização e a descrição estrutural dos materiais zeolíticos são muito importantes.

Para explicar as estruturas cristalográficas das zeólitas, utilizam-se recursos didáticos como a divisão em subunidades com o intuito de descrevê-las e classificá-las, sendo que as mais simples são as chamadas unidades de construções primárias e secundárias, até se chegar às unidades mais complexas, as unidades de construções poliédricas. Nas zeólitas, a unidade estrutural básica (unidade primária de construção) é a configuração tetraédrica de quatro átomos de oxigênio ao redor de um átomo central, geralmente Si e Al. A figura 2 ilustra as unidades primárias que são os tetraedros TO_4 (onde T é um átomo com coordenação tetraédrica Si, Al, P, Ga, B, Be, etc.) no qual cada átomo T possui 4 ligações, enquanto que o O possui 2, formando assim uma rede tridimensional (Vasconcellos, 2010).

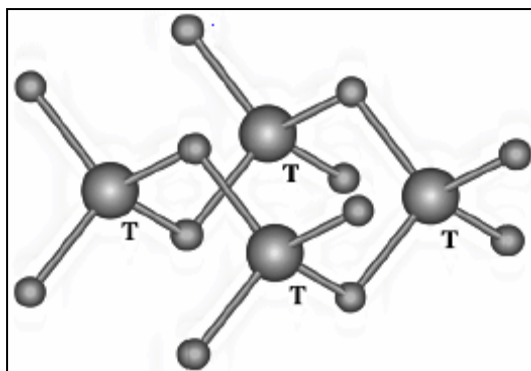


Figura 2: unidades primárias de construção

Embora seja difícil imaginar a construção de uma estrutura espacial contínua e complexa por intermédio da simples união de um pequeno número de tetraedros, a unidade de formação dessas estruturas pode ser facilmente visualizada por meio da existência de unidades secundárias de construção (Secondary Building Units ou SBU). As SBU são 16 unidades propostas por Meier (1968) e são formadas pelo agrupamento das unidades primárias. Dessa forma os tetraedros formam unidades secundárias mais complexas que consistem de 4 a 16 átomos T e que podem ser ligadas para construir diferentes tipos de redes zeolíticas. Essas unidades estão representadas na figura 3 e as ligações são ilustradas pelo desenho de linhas retas, que representam as pontes de oxigênio conectando duas unidades tetraédricas (Vasconcellos, 2010).

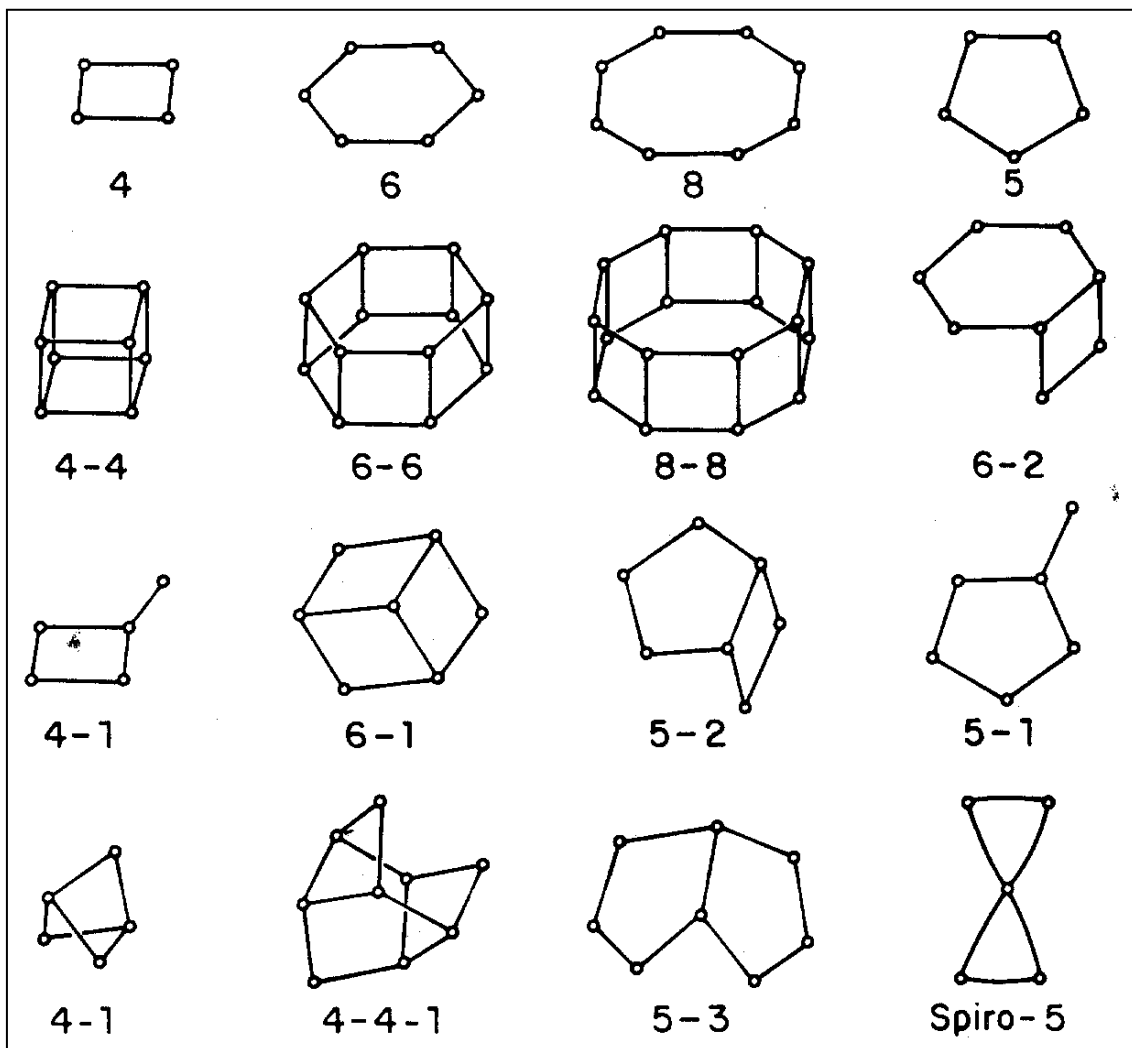


Figura 3: As 16 unidades secundárias de construção propostas por Meir (1968). Essas unidades consistem de 4 a 16 átomos T formando diferentes tipos de redes zeolíticas (Vasconcellos, 2010)

A terceira e última ramificação é obtida pelas diferentes maneiras por quais as unidades secundárias de construção se unem para formar uma estrutura tridimensional, contendo canais e poros interconectados. Dessa forma, as estruturas das zeólitas podem ser mais facilmente visualizadas empregando-se o conceito de unidades poliédricas de construção (Vasconcellos, 2010). A figura 4 mostra as diferentes unidades poliédricas de construção existentes.

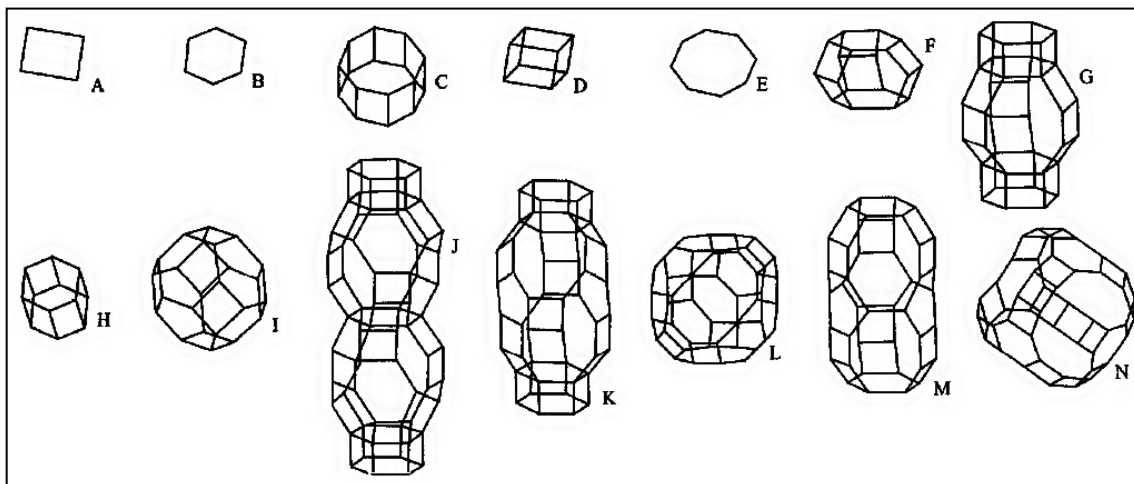


Figura 4: unidades poliédricas de construção. A= 4 anéis, B= 6 anéis, C= gaiola δ , D= gaiola 4-4, E= 8 anéis, F= gaiola ϵ , G= gaiola γ , H= gaiola 6-6, I= gaiola sodalítica, J= gaiola levina, K= gaiola chabazita, L= gaiola α , M= gaiola eronita, N= supergaiola faujasita

Por exemplo, a gaiola sodalítica (figura 4 – I) consiste de um octaedro truncado formado por anéis de 4 a 6 tetraedros e que facilmente descreve a estrutura das zeólitas A e Faujasita, zeólita esta isoestrutural das zeólitas sintéticas X e Y, conforme mostrado na figura 5. Embora a gaiola sodalítica possa ser usada para descrever tanto a zeólita A quanto a Y, podemos observar na figura que o tamanho do diâmetro da cavidade de entrada é diferente em cada uma delas. A estrutura da zeólita Y possui um sistema de poros tridimensionais formado por 12 átomos T com diâmetro de entrada de 7,4 Å, e apresenta dois sistemas de canais interconectados entre si, sendo um sistema formado pela união de supergaiolas α e outro sistema formado pela conexão alternada de sodalita e supergaiolas α . No caso da zeólita A, o sistema de poros tridimensionais é formado pela conexão alternada de gaiolas sodalíticas e gaiolas 4-4, resultando numa abertura de 8 átomos T com diâmetro de 4,2 Å (Vasconcellos, 2010).

Uma das propriedades que distinguem as zeólitas de outros materiais porosos é justamente sua variedade de tamanhos e formas, que definem os parâmetros estruturais de um determinado tipo zeolítico. As propriedades das zeólitas, tais como: troca iônica, poros intercrystalinos (que discriminam moléculas de dimensões diferentes), sítios ácidos e reservatórios ativos para as reações catalisadas por metais, tem recebido extenso uso industrial. Sua aplicabilidade vai desde utilizações bioquímicas, agroindustriais, detergentes, melhorias no solo, indústria nuclear, armazenamento de energia, a indústria têxtil (Pavelic e Hadzija, 2003; Suib, 2003).

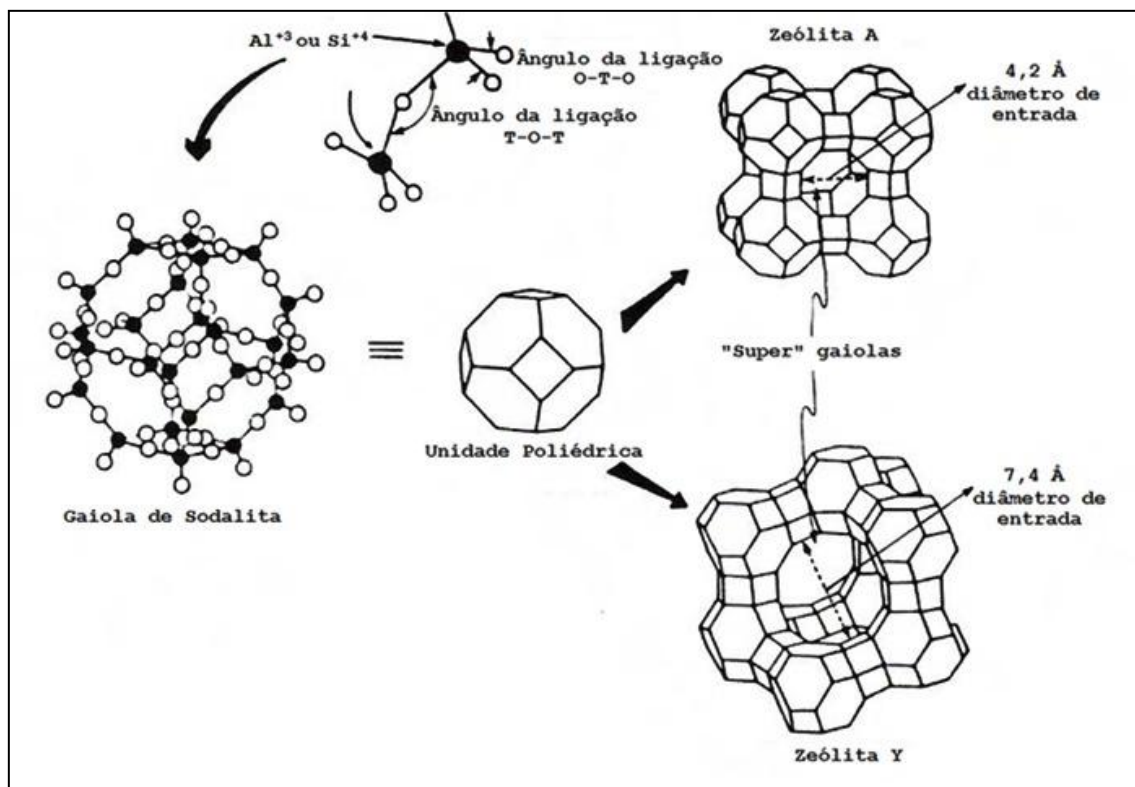


Figura 5: Formação estrutural das zeólitas A e Y. Fonte: Vasconcellos 2010

Uma característica importante das zeólitas, é sua capacidade de troca iônica. 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 Ca^{2+} , 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 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 (Pavelic e Hadzija, 2003).

2.1.2 Síntese das zeólitas

Uma síntese típica de zeólita pode ser descrita pelo processo hidrotérmico. Os reagentes utilizados são uma fonte de silício, uma fonte de alumínio, um agente mineralizante como OH^- e, para zeólitas com alta razão Si/Al, moléculas orgânicas atuando como agente direcionador de estrutura (“template” orgânico ou DAS). Os cátions metálicos inorgânicos, como Na^+ ou K^+ , tem papel importante para neutralização da carga da estrutura. As fontes de sílica são numerosas e incluem sílica coloidal, sílica amorfa, sílica precipitada e fontes orgânicas de silício. As fontes de alumínio são Aluminato de Sódio, Boemita, Hidróxido de Alumínio, Nitrato de Alumínio e Alumina. Normalmente, o agente mineralizador é um metal alcalino na forma de hidróxido, como por exemplo, o hidróxido de sódio ou o íon fluoreto (F^-). O template orgânico é uma espécie orgânica solúvel em água, como por exemplo, os sais quaternários de amônia.

Os processos físico-químicos que ocorrem durante a síntese da zeólita são bastante sensíveis ao tipo dos reagentes e à ordem de adição dos mesmos. Outros fatores críticos são a velocidade de agitação do sistema (homogeneização da mistura reacional), o envelhecimento do gel, a temperatura e o tempo de cristalização. Existem muitas reações químicas que ocorrem durante o processo de cristalização das zeólitas, e durante a síntese as interações entre as espécies orgânicas e inorgânicas são muito complexas. Sendo assim, fazendo variar a composição da solução (ou gel de síntese) e as condições operacionais, é possível sintetizar materiais com características estruturais e composições diferentes (Vasconcellos, 2010). 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 (Vasconcellos, 2010).

2.1.3 Zeólitas e medicina veterinária (Agrobusiness)

O uso das zeólitas na medicina é relativamente recente, e tem despertado grande interesse na comunidade científica. Especialmente a zeólita natural, clinoptilolita, que tem recebido destaque devido a suas aplicações, sua abundância, seu baixo custo e a variedade de íons em sua estrutura. Algumas pesquisas provaram que a inclusão dessa zeólita na dieta de animais fornece um aumento no peso de porcos, bezerros, ovelhas e frangos. Isto deve-se ao fato da zeólita absorver o amônio (NH_4^+) no intestino dos animais permitindo assim que possam usar o nitrogênio (N_2) mais eficientemente (Mumpton, 1999; Papaioannou *et al.*, 2002; Papaioannou *et al.*, 2005). A zeólita revelou-se também útil contra os efeitos tóxicos das micotoxinas, e tem a capacidade de absorver, sequestrar, as micotoxinas reduzindo sua absorção no intestino dos animais (Papaioannou *et al.*, 2005).

2.1.4 Zeólitas aplicada a medicina humana

As zeólitas também são utilizadas no tratamento de doenças em humanos. A clinoptilolita, foi analisada como adsorvente de glicose, o que favoreceria os doentes que sofrem de diabetes (Diabetes mellitus), auxiliando no controle dos níveis de glicose no sangue (Concepción-Rosabal, Rodríguez-Fuentes e Simón-Carballo, 1997). As zeólitas também podem ser usadas como agentes antibacterianos especialmente quando a prata (Ag) é incorporada em sua estrutura através do processo de troca iônica (Ceyhan, Tatlier e Akçakaya, 2007). Assim, as zeólitas também podem ser utilizadas como agentes antivirais; o material natural foi testado *in vitro* na replicação de adenovírus, herpesvírus e enterovírus (Grce e Pavelic, 2005). A zeólita Y foi bem estudada e mostrou-se capaz de liberar lentamente alguns antihelmínticos e anti-inflamatório (Horcajada *et al.*, 2006). As zeólitas podem também ser utilizadas como biosensores e algumas podem ser co-imobilizadas com enzimas e mediar a preparação dos mesmos. A prevenção de diarreia parece possível usando drogas complexadas a clinoptilolita. Nesse caso, elas atuam na alteração do metabolismo acidófilo por meio dos efeitos da pressão osmótica, retardando a passagem do ingestivo e aumentando a retenção do entero-patógeno (*E. Coli*) (Rodríguez-Fuentes *et al.*, 1997). O silício é um agente que tem sido utilizado no processo de calcificação dos ossos e, devido ao alto teor de silício nas zeólitas, estes materiais podem ser utilizados na melhoria da saúde

óssea. A zeólita A, por exemplo, tem mostrado-se um ótimo indutor na produção de osteoblasto *in vitro*. A zeólita Na Y (faujasita) também já foi estudada como agente de contraste para ressonância magnética, originando o agente Gadolite (Balkus e Bresinska, 1994).

Além do exposto anteriormente sobre zeólita e seu uso na medicina, a partir de 2002, a Food and Drug Administration (FDA) aprovou o uso de zeólitas para cuidados de sangramento em vítimas de guerra, o Quikclot, um agente hemostático com base em zeólitas que passou a ser comercializado pela Z-Médica Corp. O Quikclot é composto por aluminosilicatos porosos que oferecem uma grande área superficial e agem como uma peneira molecular, separando as moléculas por tamanho (Arnaud *et al.*, 2008). Em 1989 surgiu a primeira patente de zeólita utilizada como adjuvante no tratamento hemostático onde, nos estudos, a zeólita fornece um ligante adequado cuja forma esterilizada pode ser aplicada diretamente na ferida aberta, fazendo com que o sangue da ferida seja absorvido nos interstícios presentes no material zeolítico, resultando no aumento da coagulação devido ao fato de que as moléculas de água são retiradas do sangue, resultado da passagem do mesmo nas camadas do material zeolítico (Hursey, 1989).

Ou seja, o material retém rapidamente a água em seus poros por meio das ligações de hidrogênio; isto tem efeito localizado e concentra as proteínas e elementos celulares necessários para continuar a catálise na formação do coágulo (Arnaud *et al.*, 2008). Além disso, o material funciona com um ativador de contato do padrão intrínseco da cascata de coagulação ativando as proteínas, fatores, que iniciam uma série de mecanismos em cadeia responsáveis pela associação da enzima trombina e a polimerização da fibrina (Ostomel, Shi e Stucky, 2006). O Quikclot foi amplamente aceito pela comunidade científica, porém ele apresenta uma reação adversa; a absorção da água pelo material é uma reação do tipo exotérmica, ou seja, libera energia, nesse caso na forma de calor, gerando um aquecimento localizado. Esta propriedade foi bem criticada como possível risco de queimadura no paciente ou dano no tecido (Arnaud *et al.*, 2008).

Em uma variedade de circunstâncias o homem podem ser ferido. Muitas vezes o sangramento esta associado a muitas feridas e, em algumas circunstâncias, a ferida e o sangramento são menores, e as funções de coagulação sanguínea ocorrem normalmente necessitando apenas de aplicação de primeiros socorros. Infelizmente, em outras circunstâncias um sangramento substancial pode ocorrer. Nessas situações requer-se

equipamento e materiais especializados assim como pessoal treinado para administrar os cuidados apropriados. Se o ferimento não for rapidamente avaliado e estancado, um excesso de sangue é perdido (Hursey e Horn, 2006).

Para soldados feridos em batalhas, o controle da hemorragia é essencial para sua sobrevivência. A hemorragia descontrolada é a líder em causa de mortes em período pré-hospitalar, tanto para vítimas de combate quanto para traumas causados por acidentes em civis. Geralmente, é aceito que os produtos hemostáticos sejam levados a frente, na zona de batalha, para controlar os sangramentos rapidamente, que sejam pronto para o uso, simples de aplicar em primeiros socorros em situações de batalhas, tenha uma vida útil longa e previna infecção bacteriana ou viral (Snow, Olson e Melcer, 2006).

O número de sobreviventes de lesões graves tem aumentado não somente em ambientes de guerras, mas também em ambientes de traumas civis, com a ajuda de técnicas inovadoras e produtos que controlam, ou param, o sangramento com a máxima rapidez possível. A tecnologia de controle hemorrágico desenvolveu uma variedade de procedimentos, técnicas, e produtos que interrompem o sangramento tanto interno, quanto externo (Snow, Olson e Melcer, 2006). A descoberta de um material inorgânico de baixo custo, simples, altamente efetivo como agente hemostático, de fácil aplicação foi um avanço notável para o aumento na probabilidade de sobreviventes de lesões traumáticas e isto, é uma ótima razão para acreditarmos que tenha uma abordagem semelhante de eficácia quando aplicada a procedimentos cirúrgicos de alto-risco. O controle do fluxo sanguíneo é de interesse crítico tanto para o tratamento de pessoas traumáticamente feridas como para a projeção de dispositivos médicos que entram em contato com o sangue (Ostomel *et al.*, 2007).

2.2 Hemostasia

O aparelho circulatório de mamíferos constitui-se, em sentido geral, de um sistema de tubos, que impede que seu conteúdo, o sangue, escape para banhar diretamente os tecidos. Os fatores sanguíneos devem estar em equilíbrio, permitindo que o sangue permaneça líquido no interior dos vasos. O rompimento desse equilíbrio, qualquer que seja a natureza, poderá levar tanto a um extravasamento sanguíneo quanto a uma alteração da fluidez, tornando o sangue um gel, e assim dificultando ou mesmo impedindo a circulação no local de sua formação, devido à massa sólida de sangue

formada, chamada trombo. A formação do trombo ou a perda de sangue (hemorragia) terão consequências variadas, dependendo do local atingido. A intensidade de ambas (hemorragia ou trombose) vai depender da grandeza das alterações e do grau do desequilíbrio atingido (Carlos e Freitas, 2007).

A hemostasia é o resultado de um conjunto de processos bem regulados que executam duas funções importante: manter o sangue em um estado fluido, livre de coágulo nos vasos normais e prontos para induzir o tampão hemostático rápido, localizado em um local de lesão vascular (Carlos e Freitas, 2007). Após a lesão de um vaso, as plaquetas aderem às macromoléculas no tecido subendotelial no sítio da lesão e se agregam para formar um coágulo primário. As plaquetas estimulam a ativação local de fatores de coagulação do plasma, que levam a geração de um coágulo de fibrina que reforça a agregação plaquetária. Subsequentemente a cura da lesão, as plaquetas agregadas e o coágulo de fibrina são removidos (Riddel Jr *et al.*, 2007).

O processo hemostático é regulado basicamente por três componentes: parede vascular, plaquetas e cascata de coagulação. O processo normal ocorre como resultado de um conjunto de processos que realizam duas funções; primeiro, a manutenção do fluxo sanguíneo, e segundo a indução rápida e localizada de um tampão hemostático no sítio da injúria vascular. A coagulação ocorre quando a enzima trombina é gerada por proteólise do fibrinogênio solúvel no plasma, formando um polímero de fibrina insolúvel ou coágulo. Mecanismos para restringir a formação de agregados de plaquetas e coágulos de fibrina são necessários para manter a fluidez do sangue (Riddel Jr *et al.*, 2007).

2.2.1 Coagulação sanguínea (cascata de coagulação)

A coagulação é uma série complexa de interações nas quais o sangue perde suas características de fluido, sendo convertido em massa semi-sólida, formando um coágulo irreversível pela interação do tecido lesado, plaquetas e fibrina (Carlos e Freitas, 2007).

O entendimento bioquímico do processo de coagulação sanguínea iniciou-se na década de 40, quando Paul Owren (1947) reconheceu que a diatese hemorrágica, tendência a sangramento sem causa aparente, em uma jovem mulher poderia não ser explicado pelo conceito de 4 fatores, vigente na época, hipotetizando que ela perdeu o quinto fator de coagulação de seu plasma. Os fatores de coagulação foram designados por números romanos, vale salientar que no sistema numérico adotado é atribuído um

número ao fator de acordo com a sequência de descoberta e não ao ponto de interação na cascata. Entre as décadas de 40 e 50 vários fatores de coagulação foram descobertos, entretanto, o que não havia sido esclarecido ainda era a como esses múltiplos fatores interagiam entre si para converter a protrombina em trombina, resultando na formação de um coágulo de fibrina. O desenvolvimento deste conhecimento provou-se essencial na contribuição para o entendimento do mecanismo de coagulação (Riddel Jr *et al.*, 2007).

Em 1960, dois grupos independentes de bioquímicos introduziram o modelo de coagulação com uma série de passos nos quais a ativação de cada fator leva a ativação de um outro, culminando em uma explosão de geração de trombina. Este modelo descreve cada fator de coagulação sendo uma pró-enzima que pode ser convertida em uma enzima ativa. Os modelos de cascata ou cachoeira sugerem que a sequência de coagulação é dividida em dois padrões. A coagulação poderia ser iniciada pela via do padrão intrínseco, assim chamada porque todos os componentes estão presentes no sangue, ou pelo padrão extrínseco, em que uma proteína de membrana da célula subendotelial, fator tecidual (TF), é requerida adicionalmente aos componentes circundantes. A iniciação por qualquer um dos padrões resulta na ativação do Fator X e na eventual geração de um coágulo de fibrina através do padrão comum (Riddel Jr *et al.*, 2007).

2.2.1.1 Via Intrínseca

Este padrão consiste de uma cascata de reações proteicas iniciadas por fatores que estão presente no sangue. Quando em contato com uma superfície de carga negativa, tal como vidro ou a membrana de uma plaqueta ativada, uma proteína do plasma chamada de FXII (fator de Hageman) torna-se ativa FXIIa (o sufixo a indica que esta é “a” forma ativa do fator). O HMWK (High Molecular Weight Kininogen – cininogênio de alto peso molecular), um produto das plaquetas, que liga-se a membrana da plaqueta e ajuda a ancorar o FXII à superfície carregada servindo como um co-fator. A assistência da HMWK na conversão do FXII em FXIIa limita a velocidade de conversão (Riddel Jr *et al.*, 2007).

Uma vez que há uma pequena quantidade acumulada de FXIIa, este converte a pré-caliceína em caliceína, com HMWK como âncora. Por sua vez, a caliceína recém sintetizada acelera a conversão do FXII para FXIIa. Além de amplificar sua própria produção de caliceína, o FXIIa junto a HMWK, clivam proteoliticamente o FXI, formando FXIa. Por sua vez, FXIa, também ligado a superfície carregada da HMWK, cliva proteoliticamente o FIX a FIXa (Riddel Jr *et al.*, 2007).

FIXa e a trombina, clivam proteoliticamente o FVIII, formando o FVIIIa, um co-fator da próxima reação. Finalmente, o FIXa e o FVIIIa junto ao cátio Ca^{2+} , que pode vir em grande parte das plaquetas ativadas, e os fosfolípidos carregados negativamente, principal constituinte da membrana celular, formam um complexo trimolecular chamado *tenase*. Esse complexo converte o FX em FXa. Algumas séries paralelas de interações ocorrem, o FXa liga-se ao co-fator FVa, em si um fator resultante que participa do feedback positivo que esta presente na reação para gerar um complexo enzimaticamente ativo como uma protombinase. Este complexo converte a pró-enzima protrombina na sua forma enzimática, trombina. A trombina atua no fibrinogênio gerando um monômero de fibrina, que rapidamente polimeriza-se formando um coágulo de fibrina (Riddel Jr *et al.*, 2007). A figura 6 mostra o esquema da cascata de coagulação e as vias intrínseca, extrínseca e o padrão comum.

2.2.1.2 Via Extrínseca

Esse padrão também inclui proteínas, co-fatores e enzimas. O padrão extrínseco é iniciado pela formação de um complexo entre o fator tecidual (TF), na superfície celular, e o FVIIa que se localiza fora do sistema vascular. Células não vasculares constitutivamente expressam a proteína de membrana integral TF, variavelmente conhecida como um FIII ou tromboplastina tecidual, que é um receptor para a proteína plasmática. Quando uma lesão no endotélio permite que o FVII entre em contato com o TF, o TF não proteoliticamente ativa FVII a FVIIa. O mecanismo de início da conversão do zimogênio FVII a FVIIa é ainda debatido mas pode estar relacionado a ativação auto-catalítica e não ao efeito do TF. Esta ligação, FVIIa ao TF forma um complexo enzimático que ativa o FX a FXa. O complexo FVIIa/TF, tem função similar ao complexo tenase do padrão intrínseco, convertendo o FX para a forma ativa, FXa, que liga-se ao co-fator FV e a membrana superficial na presença de íons de cálcio para

gerar o complexo pro-trombinase. Este complexo por sua vez converte a protrombina em trombina, que converte fibrinogênio em fibrina gerando o coágulo de fibrina. Independente de o FXa surgir por meio do padrão extrínseco ou intrínseco, a cascata prossegue ao longo do padrão comum (Riddel Jr *et al.*, 2007).

2.2.1.3 Padrão Comum

A padrão comum inicia-se com a ativação do FX nos padrões intrínseco ou extrínseco, ou ambos. O FXa é a primeira protease deste padrão, na presença do FV, dos íons de Ca^{2+} e dos fosfolipídeos, a protease converte a protrombina na sua forma ativa, trombina. A principal ação da trombina é catalizar a proteólise do fibrinogênio solúvel no plasma para formar monômeros de fibrina que permanecem solúveis. Os monômeros de fibrina polimerizam-se para formar um gel de polímeros de fibrina que aprisionam as células do sangue. A trombina também ativa o FXIII, que é convertido em FXIIIa e medeia a ligação cruzada do polímero para formar uma malha chamada fibrina estável, que é menos solúvel que os polímeros. A trombina pode catalisar a formação de uma nova trombina da protrombina e ainda catalisar a formação de co-fatores (FVa e FVIIIa), resultando na amplificação eficiente da coagulação (Riddel Jr *et al.*, 2007).

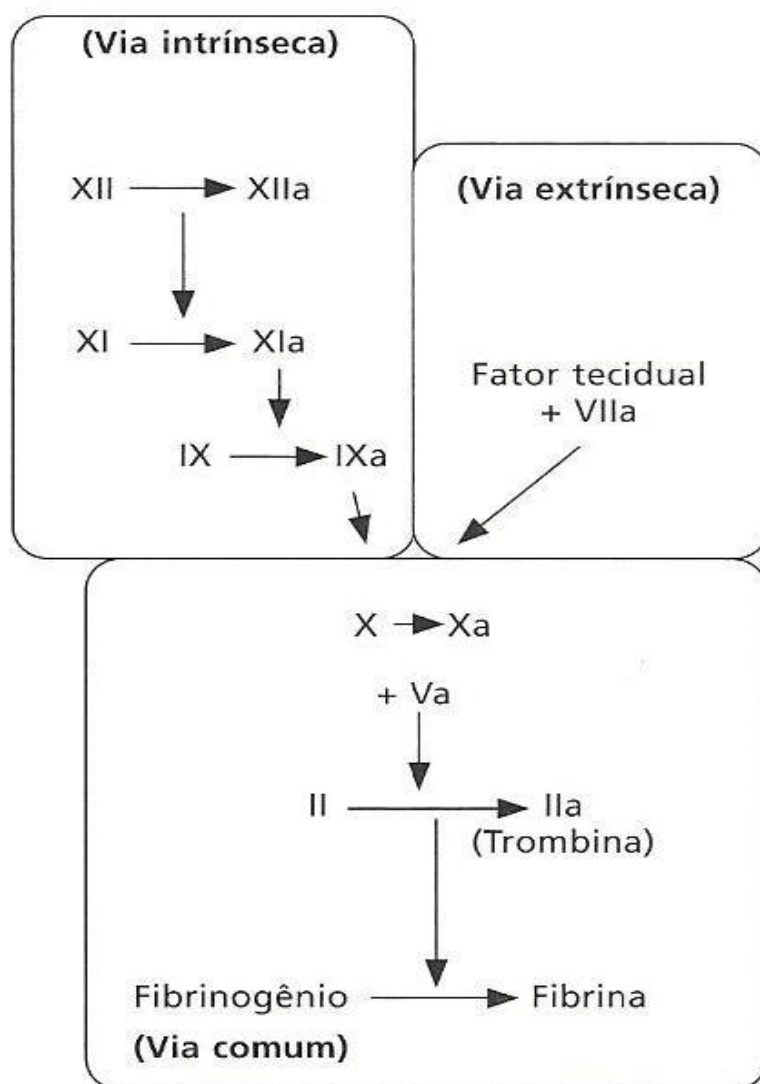


Figura 6: esquema da cascata de coagulação (simplificado) suas vias (intrínseca e extrínseca) e o padrão (ou via) comum (Santos, 2013)

2.2.2 Modelo celular

Recentemente um novo modelo que permite maior entendimento de como o processo hemostático funciona *in vivo* foi concebido. A nova teoria é conhecida como modelo celular de coagulação ou modelo da coagulação com base na superfície celular. Este modelo enfatiza a interação entre os fatores solúveis, a membrana celular e a célula, todos são considerados elementos essenciais para o processo de coagulação. O novo modelo realça a importância de um complexo TF/FVIIIa na fase de ativação do sistema e considera a coagulação como um processo com três diferentes fases: iniciação, amplificação e propagação (Hoffman, 2003; Galvez e Cortes, 2012).

2.2.2.1 Iniciação

A fase de iniciação do processo de coagulação ocorre quando as células que expressam o FT em sua superfície são expostas ao componentes do sangue no sítio de lesão. O FT uma vez ligado ao FVII presente no sangue, rapidamente ativa o FVII a FVIIa, o complexo TF/FVIIa ativa o FX diretamente e indiretamente através do FIX, transformando pequenas quantidades de protrombina (FII) em trombina, que ainda são insuficientes para a realização do processo de formação da trombina (figura 7). A interação entre o TF e o FVIIa é um passo fundamental para o início da coagulação (Perez-Gomez e Bover, 2007; Ferreira *et al.*, 2010; Galvez e Cortes, 2012).

2.2.2.2 Amplificação

A trombina gerada pelas células que expressam o FT possui várias funções, sendo a principal delas a ativação máxima das plaquetas, que expõem os receptores e sítios de ligação para os fatores de coagulação ativados. A trombina, em conjunto com o Ca^{2+} do sangue e os fosfolípidos derivados das plaquetas, participam ativamente no processo do feedback positivo na ativação dos fatores XI, IX, VIII e V, e, especialmente, para acelerar a ativação plaquetária (figura 7). Simultaneamente os fatores mencionados são atraídos por mecanismos quimiostáticos para a superfície das plaquetas, onde um processo muito importante da ativação e multiplicação ocorrem rapidamente (Perez-Gomez e Bover, 2007). A amplificação depende da presença da membrana de plaquetas ativadas e a interação destas com os fatores de coagulação, especialmente com as pequenas quantidades de trombina gerada próximo a célula transportadora TF. As plaquetas são ativadas e degranuladas enquanto elas aderem e formam um coágulo no local da lesão. Uma importante característica da ativação plaquetária é a mudança de polaridade da carga negativa final dos fosfolípidos, que permitem a interação com os fatores de coagulação. 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 dá um feedback positivo porque pode também ativar os fatores V, VIII e XII. A amplificação é também caracterizada pelo sistema de feedback negativo por intermédio de anticoagulantes naturais: TFPI, antitrombina e proteína C, que desempenha um importante papel na regulação da procoagulação (Galvez e Cortes, 2012).

2.2.2.3 Propagação

A fase de propagação é caracterizada pelo recrutamento de um grande número de plaquetas para o sítio de lesão e pela produção dos complexos tenase e protombinase na superfície das plaquetas ativadas. Primeiramente, o FIXa ativado durante a fase de iniciação pode agora ligar-se ao FVIIIa na superfície das plaquetas formando o complexo tenase. Uma quantidade adicional de FIXa pode também ser produzida pelo FXIa ligado às plaquetas. Como o FXa não pode mover-se efetivamente das células que expressam o FT para a plaqueta ativada, uma quantidade maior de FXa deve ser produzida diretamente na superfície da plaqueta pelo complexo FIXa/FVIIIa. Finalmente, FXa rapidamente se associa ao FVa ligado à plaqueta durante a fase de amplificação, resultando na formação do complexo protombinase, o qual converte grande quantidade de protombina em trombina (figura 7). A trombina é responsável pela clivagem do fibrinogênio em monômeros de fibrina (Ferreira *et al.*, 2010). O FXIII e o TAFI são simultaneamente ativados pela trombina, esses fatores adicionam positivamente efeitos de estabilização e resistência a plasmina (Galvez e Cortes, 2012).

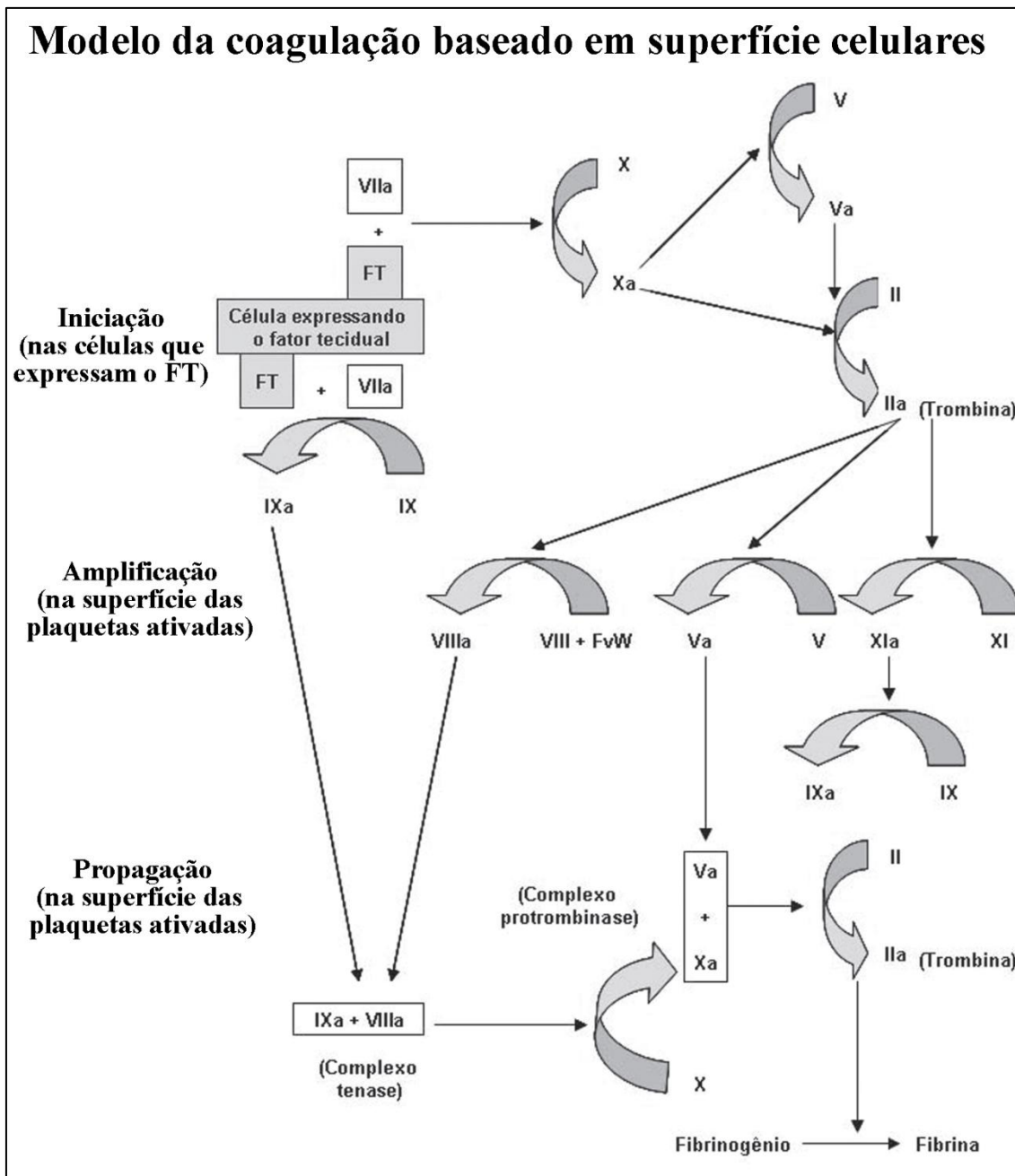


Figura 7: esquema de coagulação com base no modelo de superfície celular, a figura mostra as três fases da coagulação: iniciação, amplificação e propagação e os fatores envolvidos (Ferreira *et al.*, 2010)

2.2.3 Ativação de contato

O padrão, ou via, intrínseco da coagulação é desencadeado pela ativação de contato de uma protease do plasma conhecida como fator XII, seguida pela ativação proteolítica sequencial dos fatores XI e IX. Quando o sangue entra em contato com uma superfície carregada negativamente, uma série de reações proteolíticas é iniciada

resultando na ativação de proteases plasmáticas, além do FXII, como a pré-caliceína, FXI, e a clivagem do cininogênio de alto peso molecular (HMWK); este processo coletivamente chamado de ativação de contato, apresentado na figura 8, desencadeia vários sistemas de defesa plasmático *in vitro* incluindo a formação da fibrina, fibrinólise, ativação do complemento e geração de cinina (Gailani, David e Renne, Thomas, 2007; Gailani, D. e Renne, T., 2007).

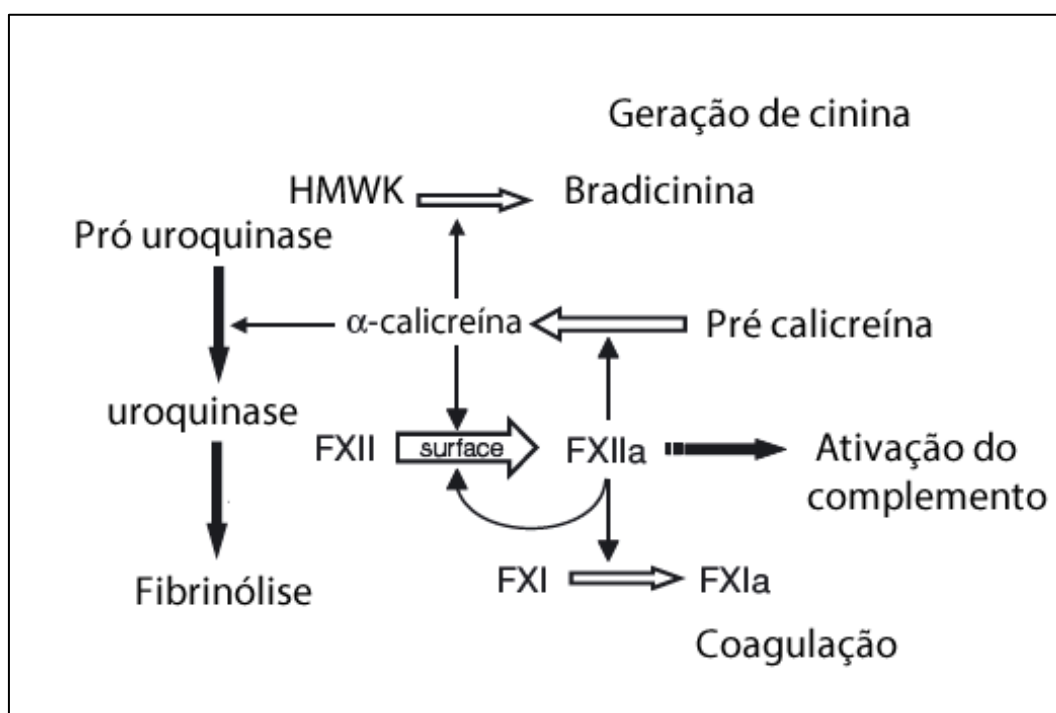


Figura 8: ativação de contato e os vários sistemas nos quais esta envolvida: geração de cinina, ativação do complemento, coagulação e fibrinólise (Gailani, D. e Renne, T., 2007)

2.3 Tromboelastografo (TEG)

O TEG é um método laboratorial *in vitro* que permite a avaliação global do processo de iniciação, formação, estabilização e lise do coágulo; documentando a interação das plaquetas e outras células sanguíneas com as proteínas da coagulação. As alterações viscoelásticas que ocorrem durante a coagulação são registradas, fornecendo uma representação gráfica do processo de polimerização da fibrina e também da força do coágulo. O sangue é introduzido em uma cuvetta onde encontra-se um pino suspenso conectado a um sistema de detecção. No TEG, figura 9, esse sistema é um fio de

torção, a cuveta e o pino sofrem um movimento de oscilação de 4°45' entre eles. O sangue total citratado, o citrato de sódio que sequestra os íons de cálcio presente no sangue interrompendo o processo de coagulação, é colocado na cuveta e a esta é adicionado o cloreto de cálcio e a medida que o coágulo se forma, as fibras da fibrina ligam as paredes da cuveta ao pino, desse modo os movimentos de rotação da cuveta e a impedância são transmitidos para pino e o gráfico é gerado.

As análises dos materiais como agentes hemostáticos coagulantes foram realizadas no laboratório de coagulação da FMUSP.

O TEG fornece um gráfico conhecido como tromboelastograma, figura 10, este gráfico permite a avaliação da coagulação sanguínea por meio dos seguintes índices de coagulação:

- 1) tempo de reação: caracterizado como R, é o tempo de formação de um coágulo reconhecível tamanho de aproximadamente 2 mm (Ostomel *et al.*, 2007), início da produção de fibrina (Santos, 2013).
- 2) tempo de coagulação: caracterizado como K, este parâmetro equivale ao tempo que 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 (Santos, 2013).

Consta na literatura que os materiais a base de aluminossilicato são ativadores de contato do padrão intrínseco, embora o TEG não forneça especificamente em qual fator de coagulação ocorre a deficiência ou não na amostra, ele fornece uma visão global do processo em si e através da análise dos índices pode-se inferir se há ou não deficiência no processo de hemostasia (Ribeiro, 2006).

Vale salientar, que os materiais zeolíticos foram sintetizados para serem aplicados em pacientes cujo processo de coagulação esteja em equilíbrio hemostático, ou seja, pacientes que não possuem deficiência nos fatores de coagulação, visto que o material não possui nenhum tipo de fator biológico que possa substituir e/ou interferir nos componentes da coagulação; embora os materiais foram testados em pacientes cujo sistema de coagulação possuía algum tipo de deficiência como por exemplos pacientes

com hemofilia, e obtivemos sucesso nessa aplicação, o foco são pacientes com sistema de coagulação normal.



Figura 9: imagem ilustrativa do TEG 5000 Tromboelastograph Hemostatic analyser system

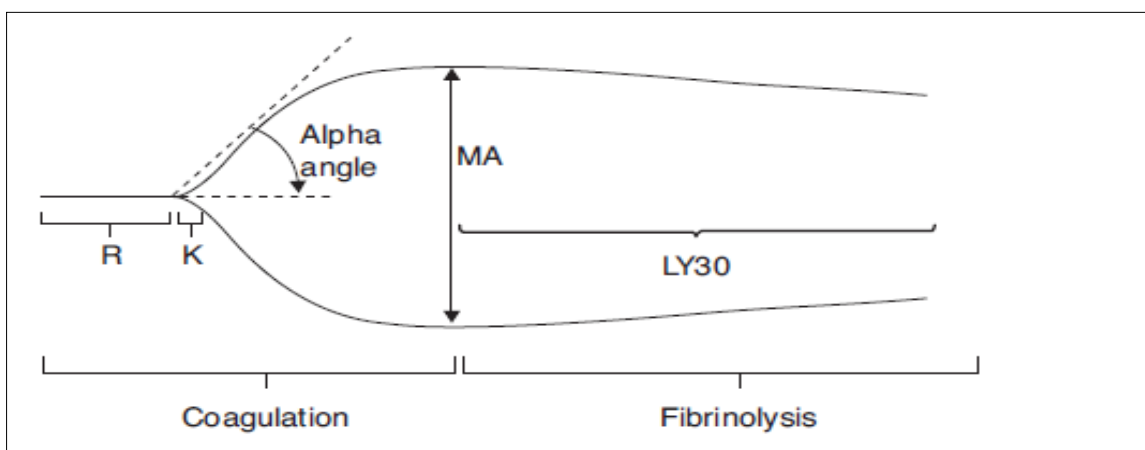


Figura 10: figura esquemática do tromboelastograma ilustrando os parâmetros R, K, α e MA (Galvez e Cortes, 2012)

3 - JUSTIFICATIVA

O potencial de aplicação de materiais zeolíticos como agentes hemostáticos foi evidenciado com o desenvolvimento do agente hemostático Quikclot, que tem como base a estrutura da zeólita faujasita (FAU). O uso prático desse material, apresentou uma contra indicação: queimaduras localizadas devido ao calor gerado pela absorção da água pelo material. Existe atualmente mais de 206 estruturas de zeólitas, devidamente catalogadas pela International Zeolites Association (IZA), e o potencial de uso dessas diferentes estruturas zeolíticas como agente hemostático coagulante ainda não foi completamente explorado, portanto o estudo sistemático desses materiais como agentes hemostáticos se justifica dentro dessa proposta de pesquisa. Outro aspecto relevante é que o desenvolvimento desse tipo de tecnologia, abre a possibilidade de nacionalização de vários desses agentes hemostáticos.

4 – OBJETIVO GERAL

O objetivo deste trabalho foi sintetizar famílias zeolítica já conhecidas como: Faujasita (FAU), Gismondina (GIS), Mordenita (MOR), realizar o processo de troca iônica com solução de cálcio (Ca^{2+}) com esses materiais, caracterizá-los por técnicas de Raio X, TGA, FTIR, MEV e estudar o uso desse material como agente hemostático *in vitro*, utilizando o TEG (tromboelastograma), e sua eficiência na coagulação sanguínea.

5 – OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Os objetivos específicos foram:

- sintetizar zeólitas Faujasita (FAU), Gismondina (GIS) e Mordenita (MOR)
- caracterizar as zeólitas através de difração de raio X, MEV, TGA, ATR-FTIR
- realizar troca iônica com solução de cálcio (Ca^{2+})
- analisar a eficácia com testes *in vitro* (TGE), verificar tempo de coagulação
- analisar os tipos de reações que possam ocorrer durante o processo de coagulação (reações exotérmicas)

6 – MATERIAIS E MÉTODO

Para as sínteses das zeólitas foram utilizados sais inorgânicos e orgânicos todos adquiridos da Sigma-Aldrich. Os materiais foram usados tais como recebidos, sem nenhum tipo de purificação.

7 - SÍNTESES

7.1 Síntese da Zeólita Faujasita (FAU)

A zeólita faujasita foi sintetizada da seguinte maneira: o aluminato de sódio e o hidróxido de sódio foram preparados em forma de solução usando água destilada. À solução de aluminato de sódio foi acrescentada uma solução de hidróxido de tetraetilamônio (20% TEAOH em H₂O) com agitação constante durante 15 minutos. Em seguida, foi acrescentada a sílica amorfa (Cabosil Grade EH-5) em quantidade suficiente para que a composição molar da reação fosse: 11,3SiO₂: 1,2 Al₂O₃: 4,5 Na₂O: 35,5 TEAOH: 500 H₂O. O gel final foi colocado em um reator estático (Parr Instrument Company) acondicionado à estufa (Lindberg/Blue M MO1440) e a cristalização ocorreu por 10 dias a 75°C. A amostra cristalina foi filtrada e seca a vácuo por 3 dias e, em seguida, foi feita sua análise por difração de raios X. A zeólita foi convertida para a forma Ca²⁺ por troca iônica com a solução de sal apropriada, cloreto de cálcio, com solução aquosa de 1 M. Em um típico experimento de troca iônica 1g da zeólita foi colocado num frasco de teflon junto com 30 mL de solução de cálcio (Ca²⁺) e, depois de 12 horas a 100°C, os produtos foram filtrados, lavados, secos a vácuo, e novamente hidratados dentro de um dessecador.

7.2 Síntese de Gismondina (GIS)

A zeólita gismondina foi sintetizada de maneira análoga a zeólita faujasita numa reação típica de zeólitas com uso de aluminato de sódio e hidróxido de sódio, em seguida, foram preparadas em forma de solução usando água destilada, ao contrário da síntese da zeólita faujasita o agente mineralizador foi o hidróxido de tetrapropilamônio. Após dissolução de hidróxido de tetrapropilamônio (20% TPAOH em H₂O) e agitada por 30 minutos. Em seguida foi acrescentada a sílica amorfa (Cabosil Grade EH-5), em quantidade suficiente para que a composição molar da reação fosse:

$\text{SiO}_2:\text{Al}_2\text{O}_3:4,5\text{Na}_2\text{O}:35,5\text{TPAOH}:500\text{H}_2\text{O}$. O gel final foi colocado em reator estático (*Parr Instrument Company*) e levados à estufa (*Lindberg/Blue M MO1440*) e a cristalização ocorreu por 5 dias a 100°C . O precipitado zeolítico foi filtrado, lavado com solução contendo NaOH (pH10) e seco a vácuo. O equilíbrio em constante umidade foi estabelecido em 3 dias (dissecador saturado com KOH, neste caso, obteve-se o produto em forma completamente hidratada). A zeólita foi convertida para a forma Ca^{2+} por troca iônica com a solução de sal apropriada, processo semelhante ao já citado na síntese de faujasita.

7.3 Síntese da Mordenita (MOR)

A zeólita mordenita foi sintetizada usando aluminato de sódio, como fonte de alumínio; hidróxido de sódio, como mineralizador e Ludox-30 como fonte de sílica, o gel final teve uma composição molar de $1,0\text{SiO}_2:0,052\text{Al}_2\text{O}_3:0,23\text{Na}_2\text{O}:7,95\text{H}_2\text{O}$. Após a homogeneização da mistura sob agitação magnética, a solução resultante foi acondicionada em garrafa de teflon e mantida em temperatura ambiente por aproximadamente 50 (cinquenta) minutos para o processo de envelhecimento. Após essa etapa, o gel final foi acoplado a um reator estático (*Parr Instrument Company*) e levada à estufa (*Lindberg/Blue M MO1440*) a 170°C por 4 (quatro) dias para o processo de cristalização, depois desse, o precipitado resultante foi filtrado, lavado várias vezes com água destilada aquecida entre 75° a 80°C e seco em estufa a 60°C . A zeólita foi convertida para a forma Ca^{2+} por troca iônica com a solução de sal apropriada, no caso da mordenita foram realizados dois processos de troca iônica o primeiro em condições semelhantes a gismondina e faujasita e o segundo em outras condições: 100°C a 60 horas.

8 - CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DOS MATERIAIS ZEOLÍTICOS

Os materiais zeolíticos foram caracterizados por difração de raio-X (DRX), microscopia eletrônica de varredura (MEV), espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier com refletância total atenuada (ATR-FTIR), termograma (TGA).

8.1 Difração de Raio X (DRX)

Os padrões de DRX dos materiais zeolíticos foram adquiridos pelo difratômetro Rigaku RotaFlex RU200B (Tóquio, Japão) com uma fonte de ânodo rotatório,

geometria de Bragg-Brentano, operando com radiação Cu-K α (comprimento de onda = 1,5418 Å) à 50 kV e 100 mA, e equipado com um monocromador de grafite. Os padrões de difração em pó foram registrados na faixa de $2\theta=3-80^\circ$ com uma velocidade de varredura de 2.0° por minuto.

8.2 Microscopia Eletrônica de Varredura

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 25kV. Previamente, as amostras foram submetidas a um revestimento fino de ouro foi depositado sobre as amostras.

8.3 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier com refletância total atenuada (ATR-FTIR)

As análises de ATR-FTIR foram realizadas para estudar as características estruturais dos materiais. Os espectros foram coletados por meio de um Smart Orbit ATR (Thermo Scientific) com acessório de diamante e um espectrofotômetro Nicolet 6700 (Thermo Scientific) equipado com um detector DTGS. Todas as amostras foram analisadas com capacidade de resolução espectral de 4 cm⁻¹ entre 400 cm⁻¹ e 4000 cm⁻¹ e 16 scan cada amostra.

8.4 Análise termogravimétrica (TGA)

A análise termogravimétrica foi realizada em um analisador TGA 4000 da Perkin Elmer, em atmosfera de nitrogênio na faixa de 35°C a 900°C de temperatura, utilizando uma faixa de aquecimento de 10°C min⁻¹.

8.5 Tromboelastografia

Para os testes de coagulação, os materiais (FAU/PURA, FAU/Ca²⁺, GIS/Na, GIS/Ca²⁺, MOR/PURA e MOR/Ca²⁺) foram analisados com o uso do aparelho TEG 5000 (sistema de análise de hemostasia, tromboelastografo 5000 da Haemoscope) no Laboratório de Coagulação do Hospital das Clínicas de São Paulo (HC-USP).

Para os testes de TEG foram coletadas amostras de sangue de voluntários, o sangue foi estabilizado com citrato para manter suas características; para a realização do teste 20 μL de solução aquosa de cloreto de cálcio a 0,2 M foram adicionado ao cup, o cálcio reativa o sangue quelado pelo citrato, em seguida 340 μL de sangue foram homogeneizados com 0,005 mg do agente hemostático e adicionado ao cup e a leitura foi feita; esse mesmo processo foi feito para todos os agentes hemostáticos e repetidos pelo menos três vezes pra cada agente, foi realizado também a leitura do sangue puro para comparação com o material zeolítico.

Foram realizados também testes de tromboelastografia com o agente hemostático Caolin. Esse agente é um tipo de material com base de aluminosilicato. Este material é um potente iniciador da coagulação agindo como um ativador de superfície similar às zeólitas. Suas características inertes permitem que seja aplicado na pele sem nenhum tipo de reação alérgica (Trabattoni, Gatto e Bartorelli, 2012).

9 - RESULTADOS

9.1 Difração de raio-X

Neste trabalho, os materiais foram submetidos à análise de raio-X para avaliar a formação da estrutura e compará-las com os padrões teóricos das mesmas. O padrão de difração dos materiais zeolíticos FAU, GIS e MOR, e suas formas puras e trocadas com o íon Ca^{2+} estão representadas nas figuras de 11 a 17 respectivamente.

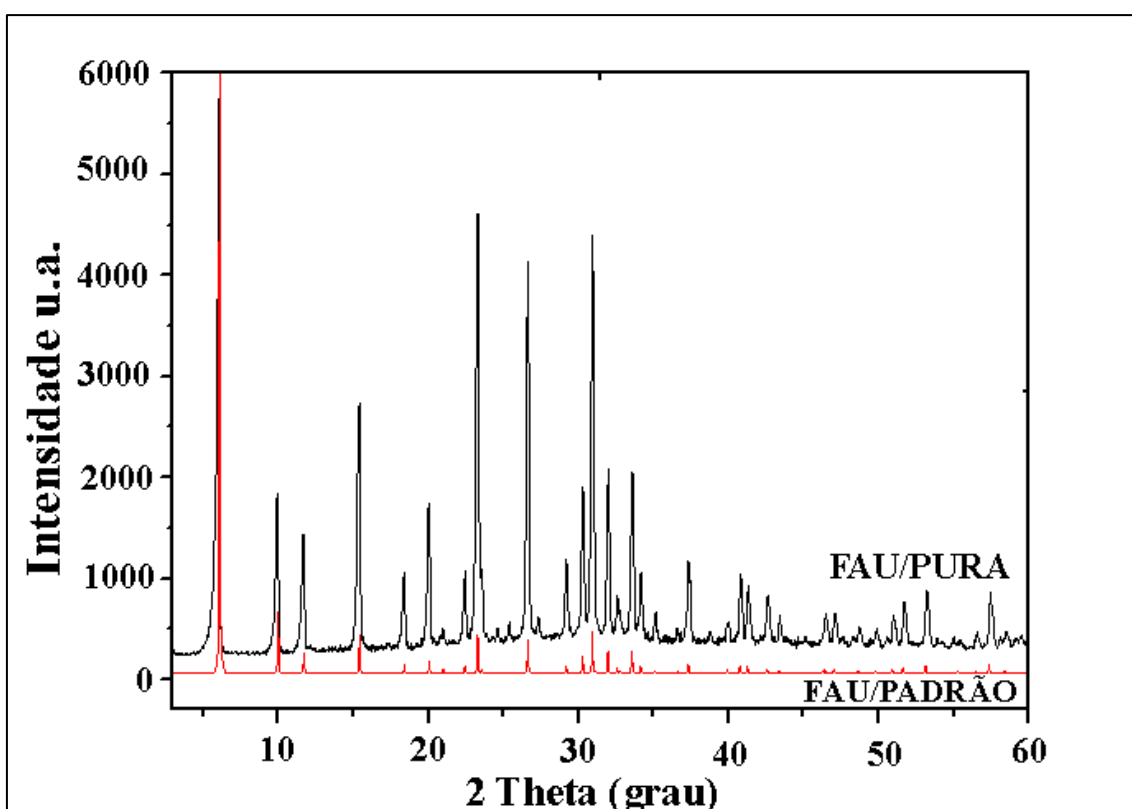


Figura 11: Difrátograma da zeólita FAU/PURA, e o padrão calculado para este tipo de material. (Fonte: (Treacy e Higgins, 2001))

O padrão de difração da zeólita faujasita (FAU) esta de acordo com os dados teóricos relatados na literatura por (Treacy e Higgins, 2001). A análise do padrão de difração da figura 11 mostra que há um perfeito “match”, ou seja, uma correspondência entre os picos de difração apresentados pelo material sintetizado e o seu padrão teórico, de acordo com (Hriljac et al., 1993) os valores de cela unitária da zeólita faujasita são: $a = 24.257 \text{ \AA}$ $b = 24.257 \text{ \AA}$ $c = 24.257$, $\alpha = 90^\circ$, $\beta = 90^\circ$, $\gamma = 90^\circ$.

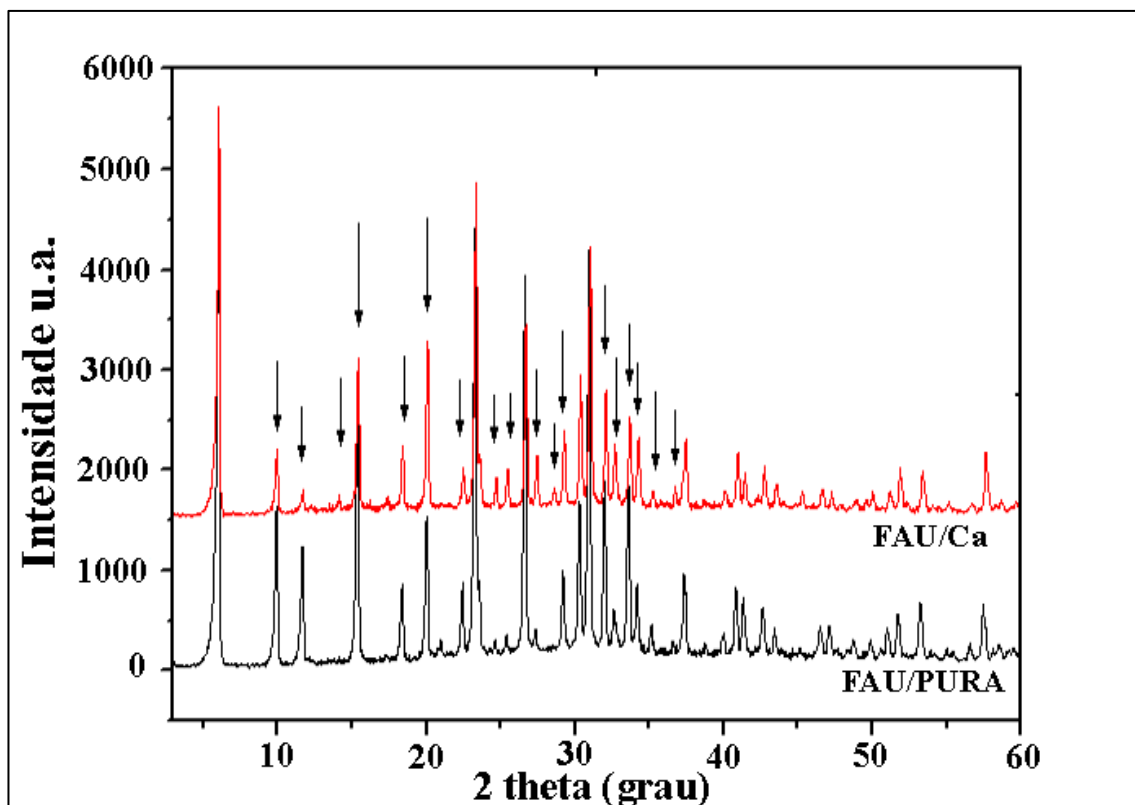


Figura 12: Difratoograma das zeólitas FAU/PURA e FAU/Ca²⁺, as setas indicam as mudanças na intensidade dos picos de difração após o processo de troca iônica

A figura 12, mostra o difratograma da zeólita FAU após o processo de troca iônica com o íon Ca²⁺, pode se observar que a estrutura da zeólita demonstrou pouca modificação estrutural, com o desaparecimento de alguns picos de baixa intensidade, e diminuição de outros picos de maior intensidade ambos identificados na figura pelas setas; porém a estrutura primária da zeólita FAU para as reflexões nos ângulos de difração 2 θ permaneceu inalterada.

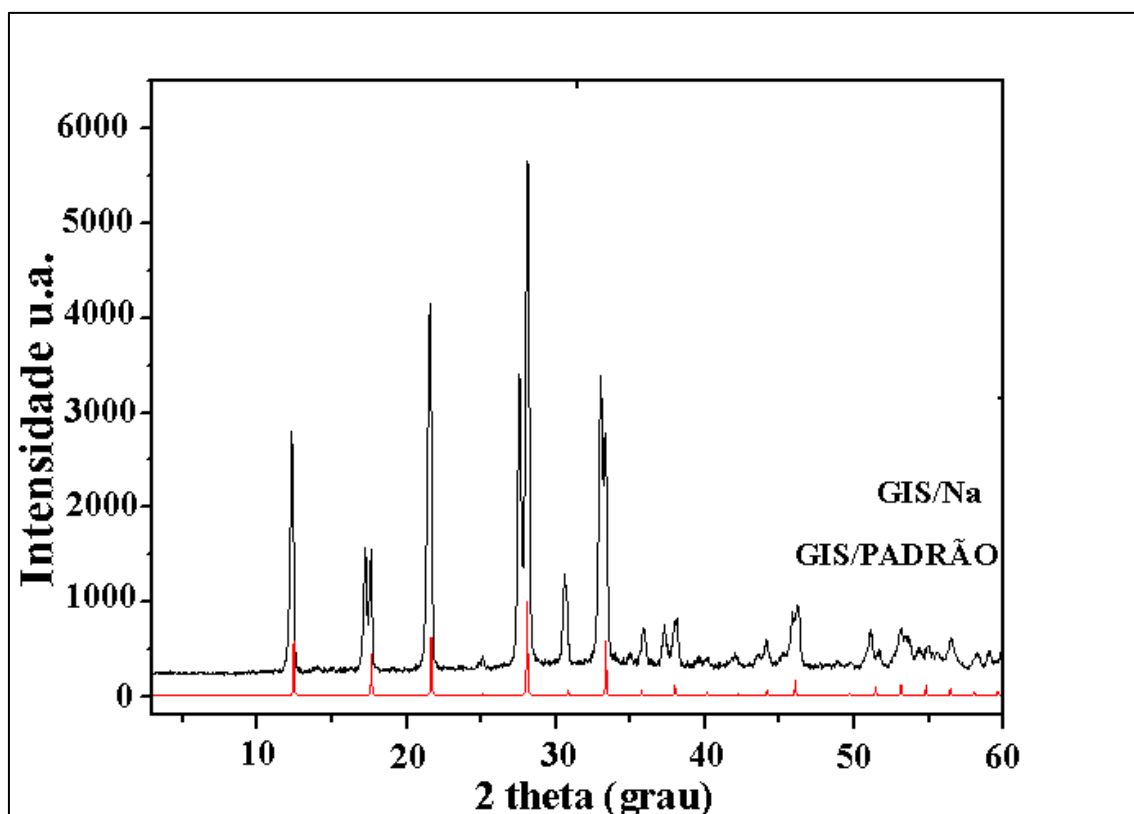


Figura 13: Difratoograma da zeólita GIS/Na e seu padrão calculado. Fonte: (Treacy e Higgins, 2001)

A figura 13, representa uma comparação das difrações da zeólita GIS/Na experimental e o padrão teórico reportado por (Albert *et al.*, 1998), pode se observar no difratograma que o padrão teórico, linha vermelha, e o padrão experimental, linha preta, são similares, de acordo com (Albert *et al.*, 1998) os valores de cela unitária da zeólita gismondina com sódio são: $a = 14.238 \text{ \AA}$ $b = 9.983 \text{ \AA}$ $c = 10.006$ $\beta = 134.217^\circ$, $R_p = 0.076$, $R_w = 0.056$.

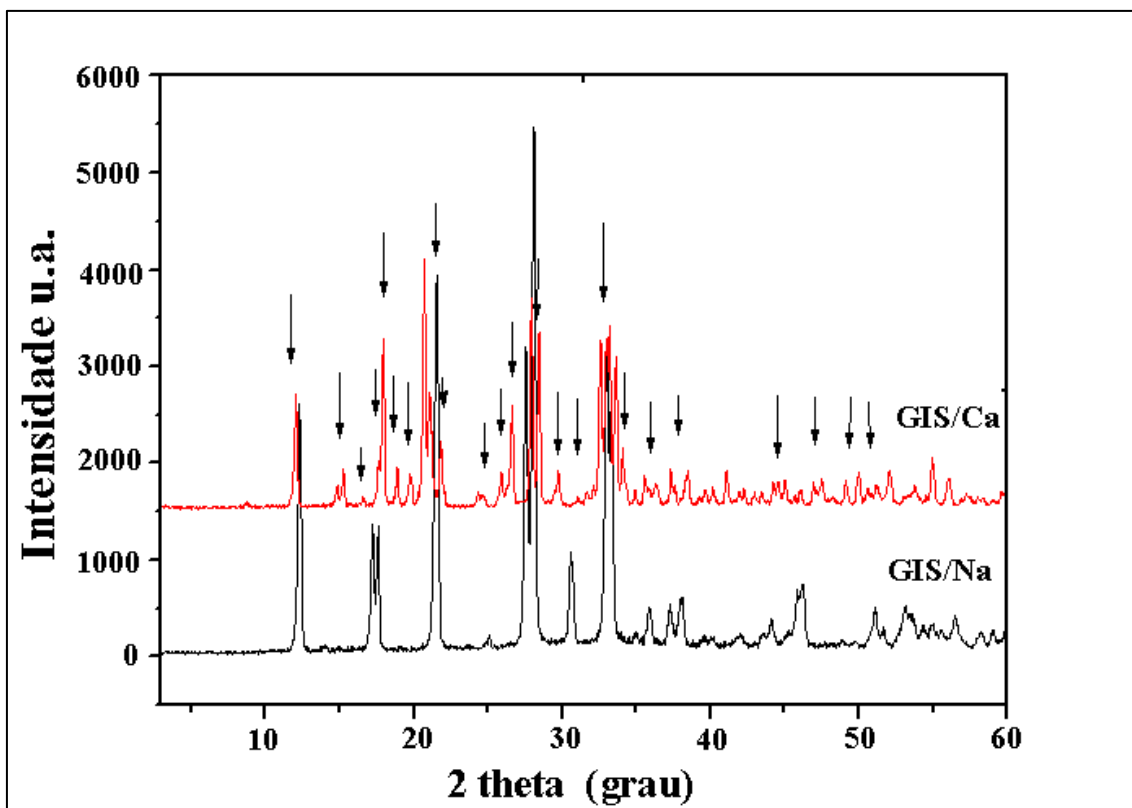


Figura 14: difratograma das zeólitas GIS/Na e GIS/Ca evidenciando a estrutura após o processo de troca iônica com o cátion Ca^{2+} , as setas indicam mudanças na intensidade, desaparecimento e surgimento de novos picos

O processo de troca iônica com Ca^{2+} com a GIS/Na, diferentemente da troca iônica com FAU, gerou modificações drásticas na estrutura cristalográfica da zeólita, isso pode ser observado no difratograma da figura 14, onde distingui-se o surgimento de novos picos, representados pelas setas, o desaparecimento de outros e mudanças na intensidades dos picos remanescentes; (Albert, Cheethman e Adams, 1998), reportou esta mudança na cela unitária com os seguintes dados: $a = 10.024 \text{ \AA}$ $b = 10.613 \text{ \AA}$ $c = 9.833$ $\beta = 92.292^\circ$ $R_p = 6.77 (\%)$, $R_w = 6.48 (\%)$.

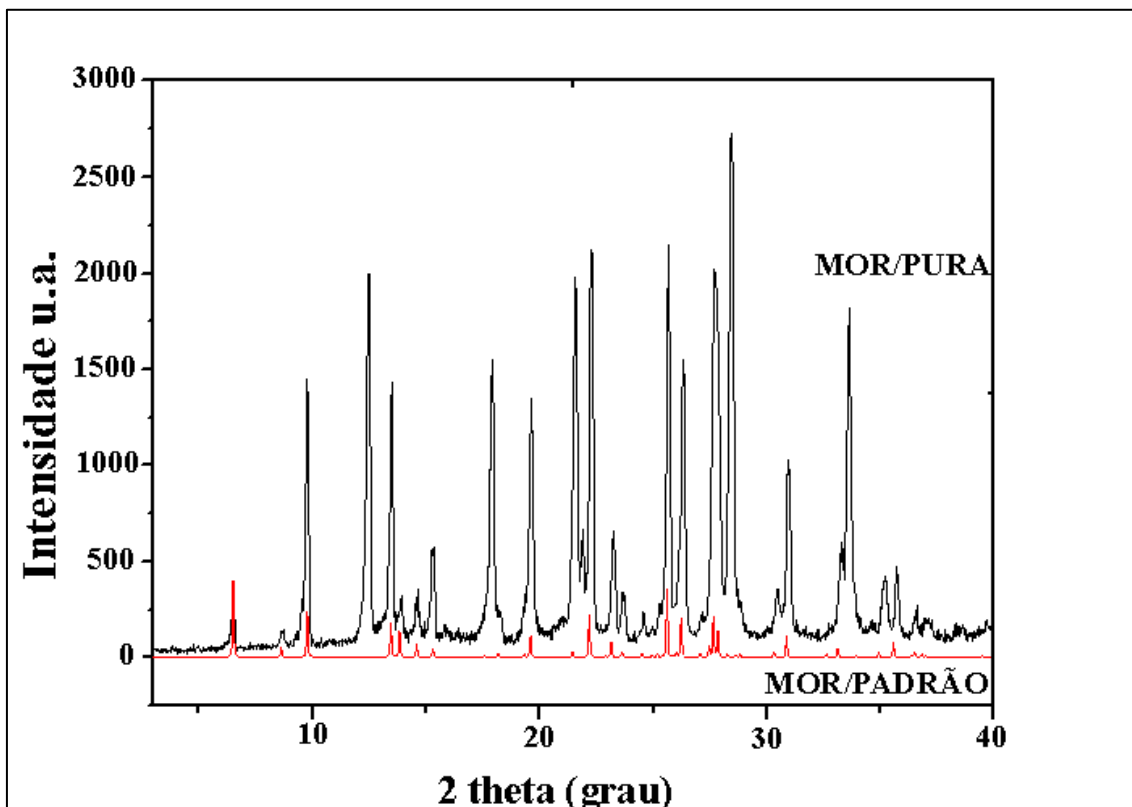


Figura 15: Difratoograma da zeólita MOR/PURA e seu padrão calculado. Fonte: (Treacy e Higgins, 2001)

A figura 15, representa a comparação das difrações da zeólita mordenita (MOR) experimental, linha preta, e o padrão teórico, linha vermelha, reportado por (Aly, Moustafa e Abdelrahman, 2012), o padrão de difração apresentado, revela os melhores resultados sintetizados, a síntese de zeólita MOR, não é um trabalho trivial pelo fato de necessitar de um template orgânico que funcione como um direcionador de estrutura, como o brometo de tetraetilamônio (Aly, Moustafa e Abdelrahman, 2012), o o-fenilenodiamina (Mohamed *et al.*, 2005). A comparação da difração teórico e o experimental indica um “match” entre eles, com exceção do pico 12,4; embora o padrão teórico não apresente esse pico há trabalhos que reportam o seu aparecimento (Mohamed *et al.*, 2005). O padrão de cela unitária para esta zeólita é: $a = 18.130 \text{ \AA}$ $b = 20.500 \text{ \AA}$ $c = 7.520 \text{ \AA}$.

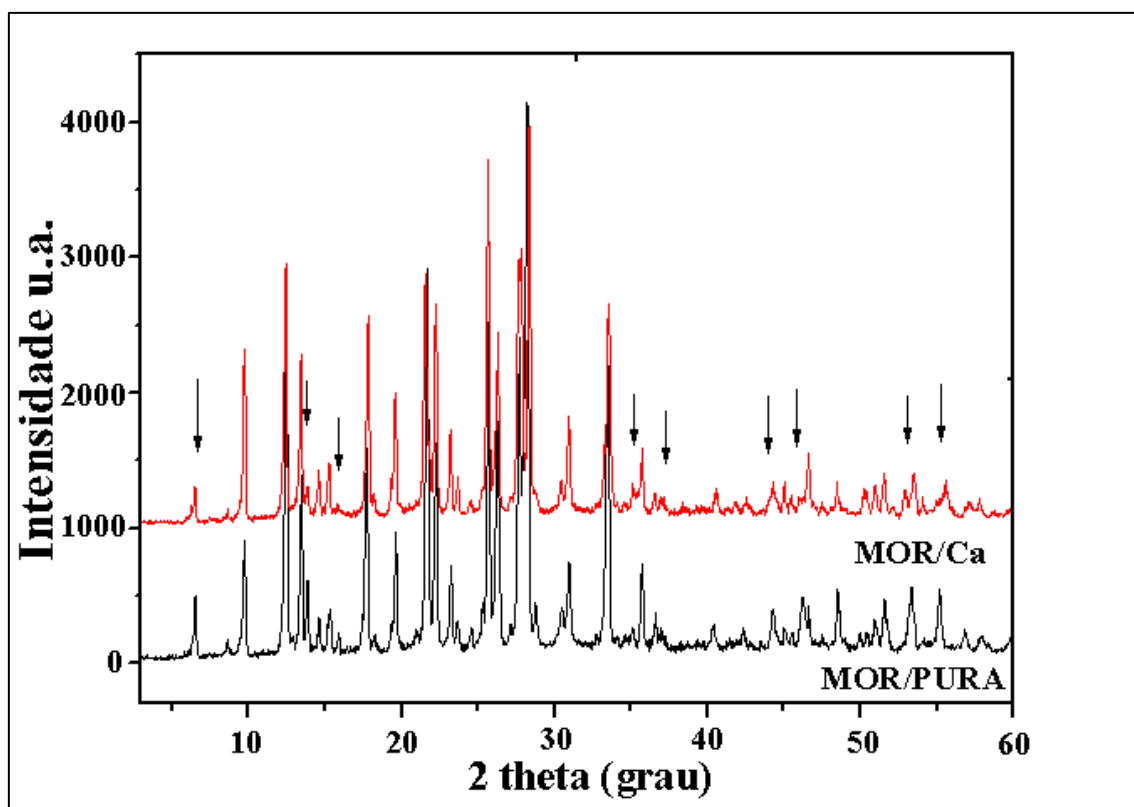


Figura 16: difratograma das zeólitas MOR/PURA e MOR/Ca²⁺, evidenciando modificações na estrutura após o processo de troca iônica com o cátion Ca²⁺

A figura 16, representa os padrões de difração das zeólitas MOR/PURA e MOR/Ca²⁺, observa-se que ocorreu a diminuição na intensidade de alguns picos e o desaparecimento de reflexões de baixa intensidade, indicando que a estrutura primária da zeólita MOR permaneceu inalterada.

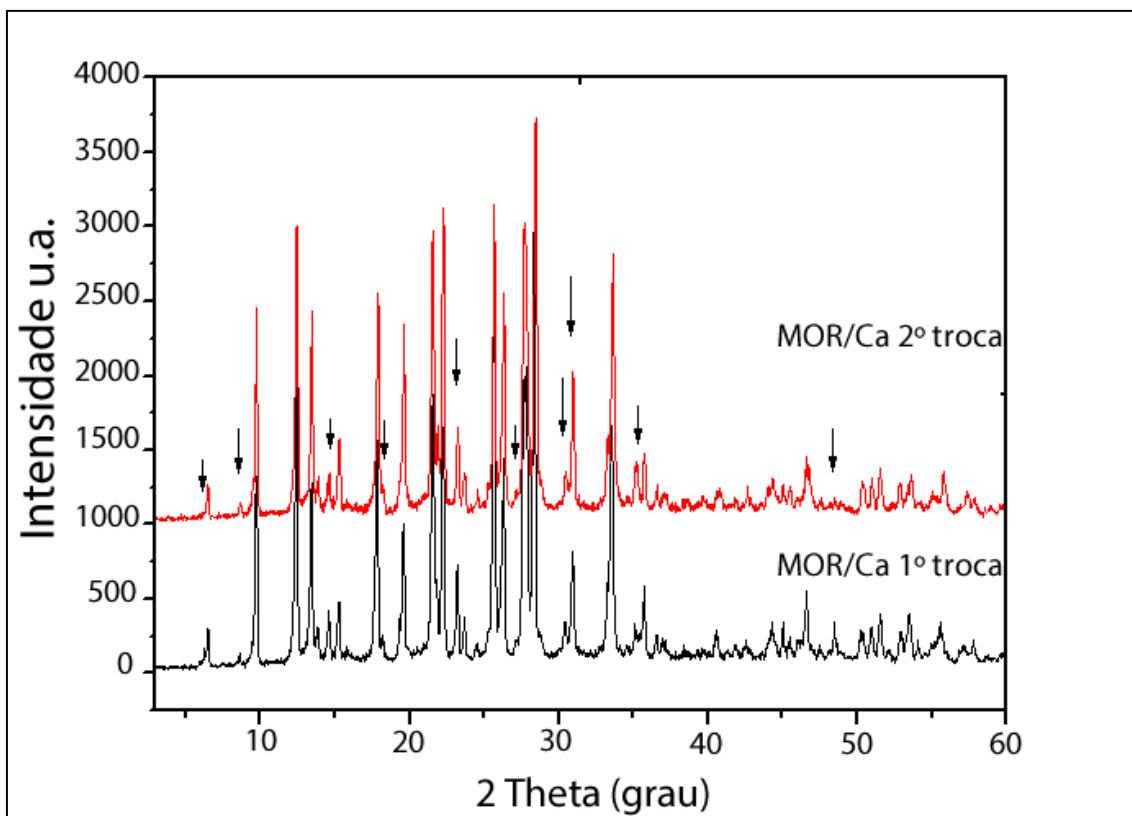


Figura 17: difratograma da zeólita MOR/Ca²⁺ comparando a primeira e a segunda troca iônica com o mesmo material, as setas evidenciam as mudanças na estrutura do material após o segundo processo

A zeólita mordenita, foi submetida ao segundo processo de troca iônica visto que o primeiro processo não resultou em uma incorporação de íons de Ca²⁺ com a mesma eficácia que os outros dois materiais (FAU/PURA e GIS/Na). O segundo processo de troca iônica, figura 17, descreto no item 7.3, demonstrou que houve uma modificação significativa na estrutura dessa zeólita como pode-se observar no difratograma onde as setas indicam as posições nas quais ocorreram a diminuição dos picos de baixa intensidade e o desaparecimento de alguns em comparação ao difratograma da primeira troca.

9.2 Análise termogravimétrica (TGA)

As análises termogravimétricas das zeólitas FAU/PURA, FAU/Ca²⁺, GIS/PURA, GIS/Ca²⁺, MOR/PURA e MOR/Ca²⁺ são apresentados nas figuras 18 a 23. O termograma da zeólita FAU/PURA, figura 18, registra uma perda de água em torno de 120°C essa perda está relacionada às moléculas de água adsorvida a superfície da zeólita. O total de massa, em forma de moléculas de água, liberada por esse material foi de aproximadamente 22% da massa original, ou seja foram liberadas $6,9 \cdot 10^{19}$ moléculas de água (Dalai *et al.*, 2005; Almeida, Martins e Cardoso, 2010).

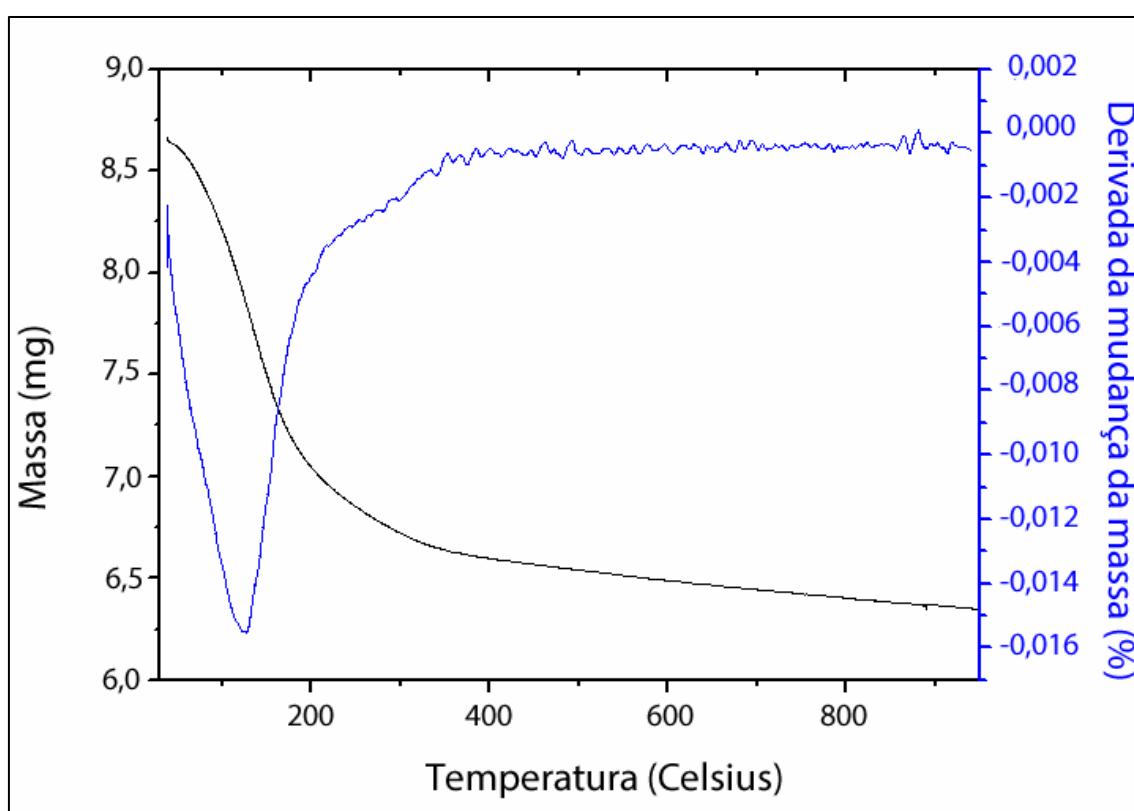


Figura 18: termograma da zeólita FAU/PURA, ilustrando a variação de temperatura de 35°C a 950, e a perda de massa relativa

Foi realizada também análise de TGA com as amostras após o processo de troca iônica, a figura 19, ilustra o termograma da zeólita FAU/ Ca^{2+} . A análise revela que não há diferença significativa entre os dois termogramas, o termograma da zeólita FAU/ Ca^{2+} mostra uma perda de massa em torno de 120°C, similar a perda da zeólita FAU/PURA; de aproximadamente 26% do material ou $7,62 \cdot 10^{19}$ moléculas de água; mostrando a estabilidade do material após o processo de troca iônica.

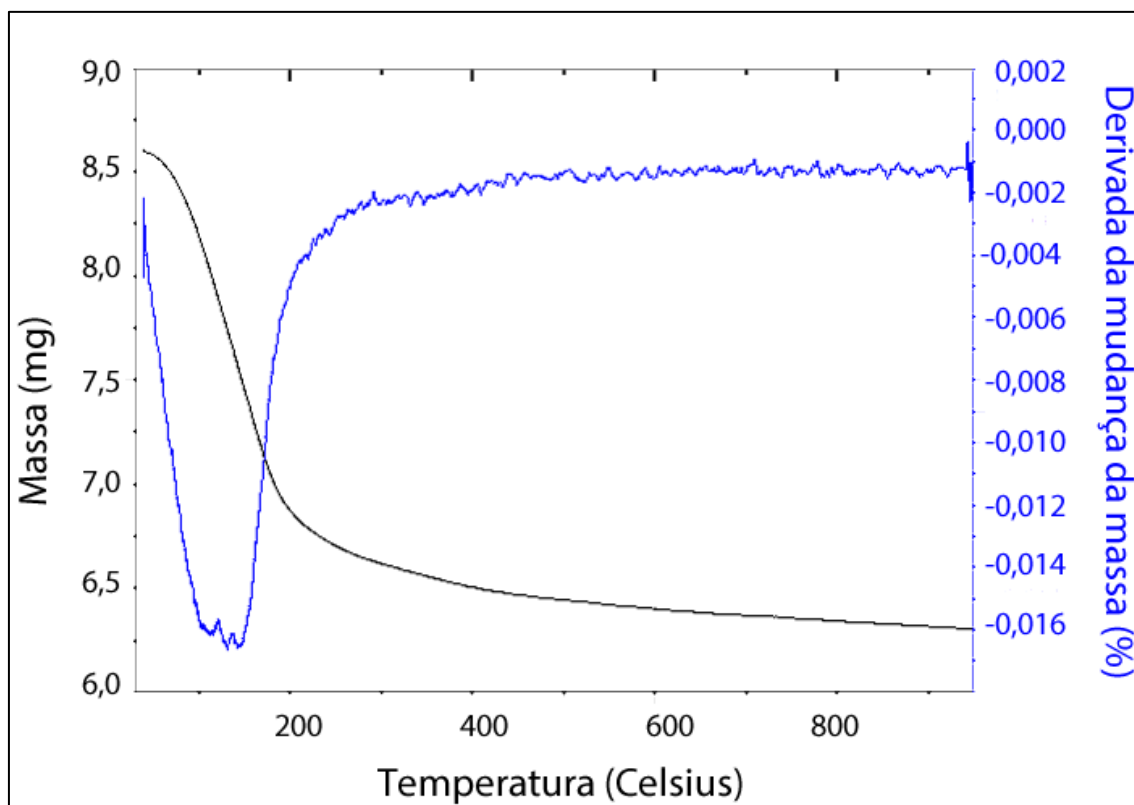


Figura 19: termograma da zeólita FAU/ Ca^{2+} ilustrando a variação de temperatura de 35°C a 950, e a perda de massa relativa

O termograma da GIS/PURA, figura 20, apresenta três curvas nítidas, a primeira e a segunda curva, por volta de 80°C e 180°C, referem-se a perda de água adsorvida a estrutura da zeólita. A terceira curva aproximadamente 280°C, refere-se a perda de água cristalográfica, ou seja, as moléculas de água que fazem parte da estrutura interna do material. A zeólita gismondina liberou aproximadamente 16% de sua massa em forma de água, num total de $4,83 \cdot 10^{17}$ moléculas de água (Pal et al., 2013).

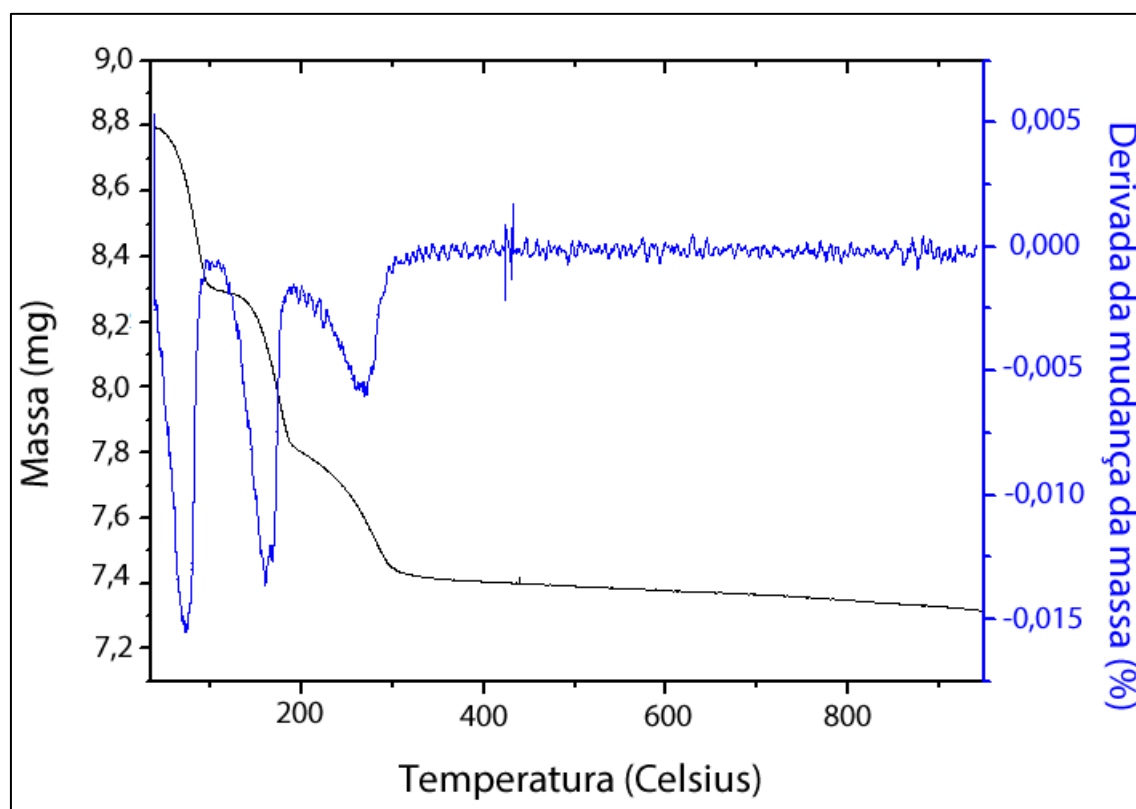


Figura 20: Termograma da zeólita GIS/PURA ilustrando a variação de temperatura de 35°C a 950, e a perda de massa relativa

O termograma da GIS/ Ca^{2+} , representado na figura 21 ilustra 3 curvas por volta de 80°C, 180°C e 280°C, que estão relacionadas a perda de massa referente a água adsorvida e cristalográfica respectivamente. A massa perdida relativa a saída da água foi de 21%, aproximadamente $5,4 \cdot 10^{17}$ moléculas de água, indicando que a estrutura dessa zeólita é mais flexível em relação ao processo de troca iônica incorporando melhor os íons de Ca^{2+} e com isso liberando uma quantidade maior de moléculas de água.

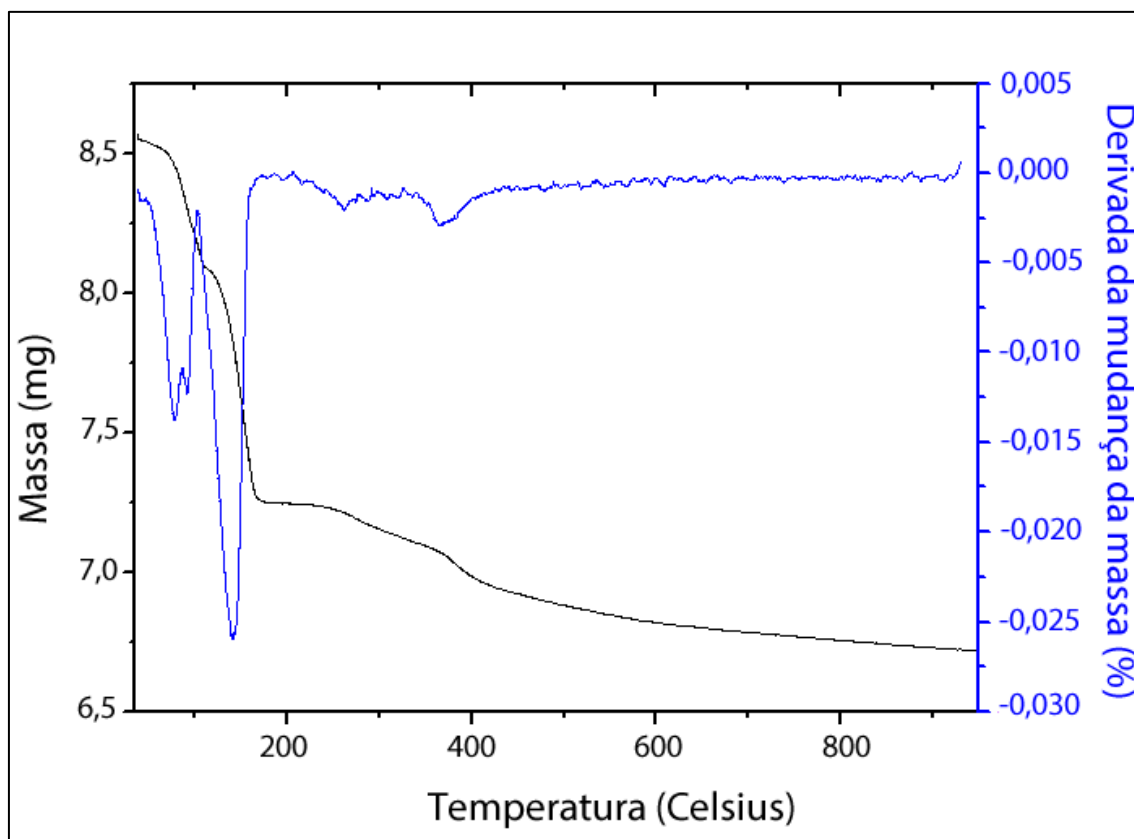


Figura 21: termograma da zeólita GIS/ Ca^{2+} ilustrando a variação de temperatura de 35°C a 950, e a perda de massa relativa

O termograma da zeólita MOR/PURA apresentado na figura 22, revela apenas uma curva referente a uma perda de massa, essa massa liberada foi de aproximadamente 21% e é referente a água adsorvida ao material, o termograma indica que o material perdeu $5,4 \cdot 10^{17}$ moléculas de água (Pechar e Rykl, 1987; Jiang et al., 2007).

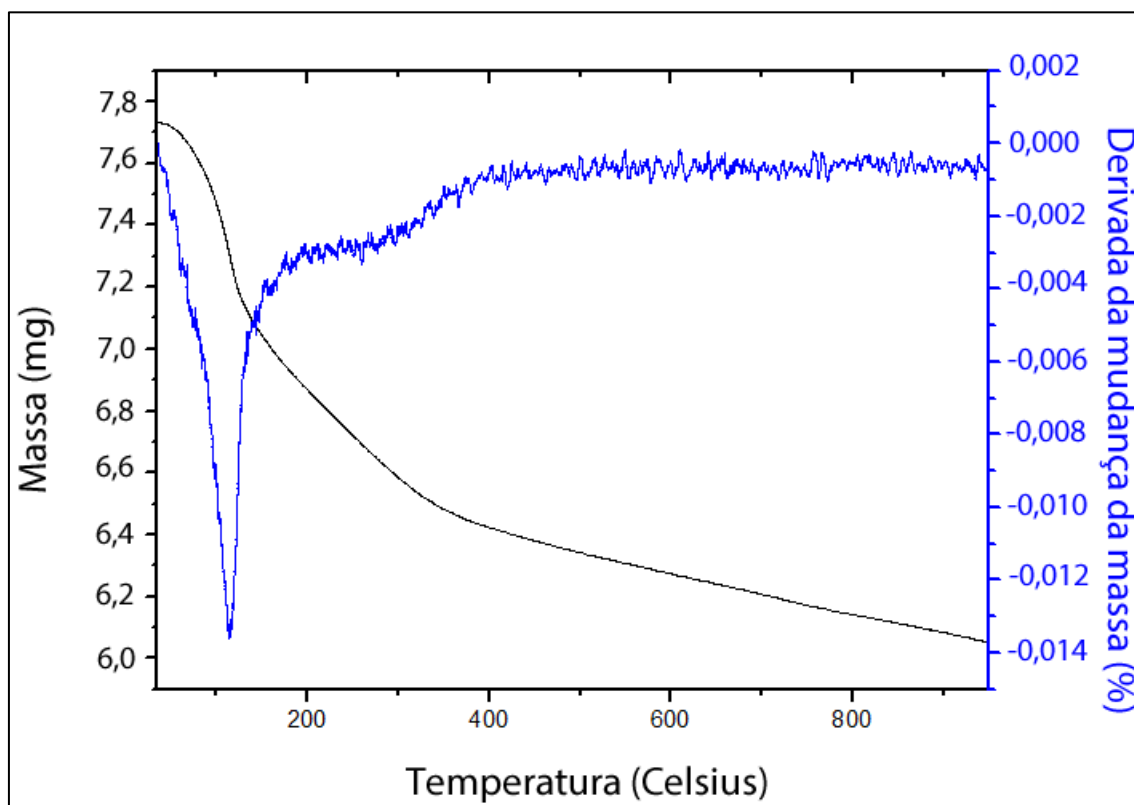


Figura 22: termograma da zeólita MOR/PURA ilustrando a variação de temperatura de 35°C a 950, e a perda de massa relativa

O termograma da zeólita MOR/Ca²⁺ apresentado na figura 23, revela uma única curva de perda de massa, a quantidade de água liberada foi de 15% da massa, em aproximadamente 100°C, referente a água adsorvida, um total de 5.10^{17} moléculas de água, o termograma é semelhante ao da forma pura.

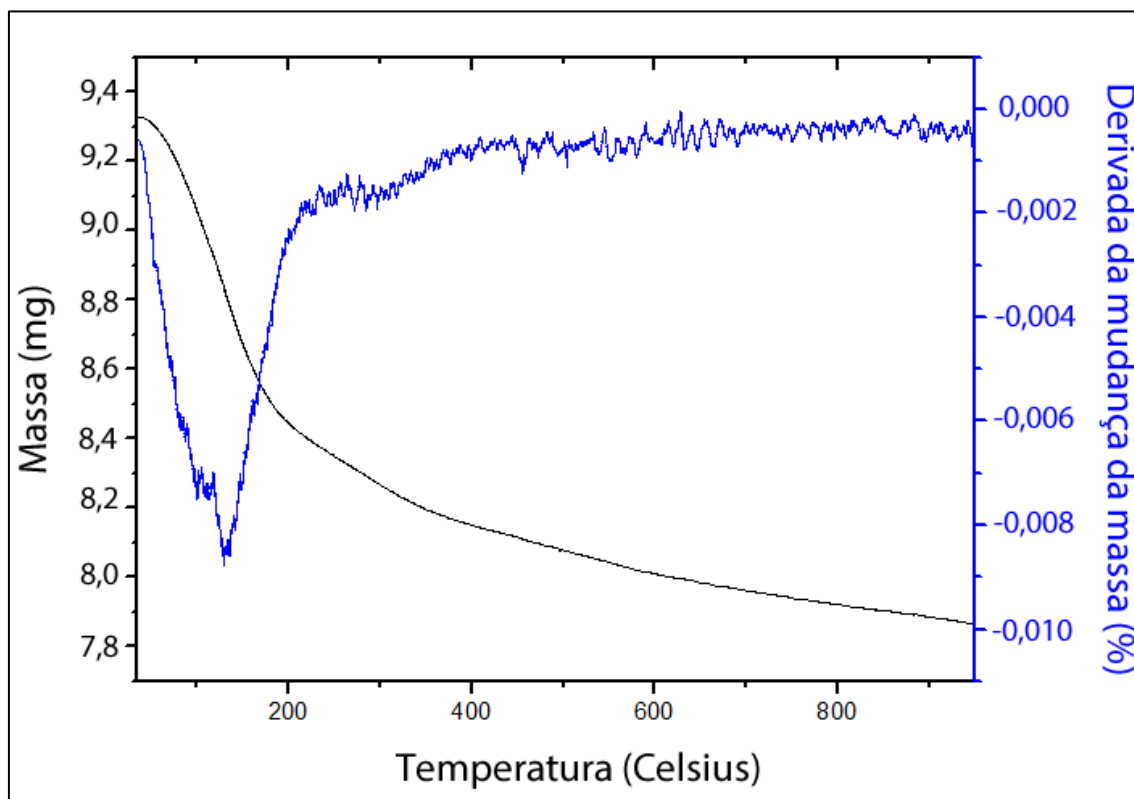


Figura 23: termograma da zeólita MOR/Ca²⁺ ilustrando a variação de temperatura de 35°C a 950, e a perda de massa relativa

9.3 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier com refletância total atenuada (FTIR)

Em geral, o espectro de IR pode ser dividido em dois grupos de vibrações: (1) as vibrações internas do quadro TO_4 , que são insensíveis as vibrações estruturais, e (2) as vibrações relacionadas com as ligações externas das unidades TO_4 nas estruturas; estas são sensíveis as vibrações externas (OJHA, 2004). Em geral, cada zeólita tem um padrão característico de infravermelho. No entanto, algumas características comuns são observadas, o que incluem o estiramento assimétrico e simétrico, dupla vibração do anel, modos de flexão das ligações T-O e, possivelmente, modo de abertura dos poros (OJHA, 2004). Os dados de infravermelho comum às zeólitas estão listados na tabela 01.

Tabela 1: atribuições de IR das zeólitas, comum a todas as zeólitas (Ojha, Pradhan e Samanta, 2004)

Tetraedro interno:	
Estiramento assimétrico	1250-950
Estiramento simétrico	720-650
Dobramento T-O	420-500
 Ligações externas:	
Anel duplo	650-500
Abertura dos poros	300-420
Estiramento simétrico	750-820
Estiramento assimétrico	1050-1150

As figuras 24 e 25, mostram os espectros da zeólita FAU/PURA e FAU/Ca²⁺ (400 a 1200 cm⁻¹ e 1200 a 4000 cm⁻¹), podemos visualizar os picos 460, 560, 670, 750 e 950 cm⁻¹, referentes a ligações T-O, anel duplo, estiramentos simétricos e assimétricos, respectivamente (Thuadaj e Nuntiya, 2012) e na segunda figura os picos 1650 e, aproximadamente, 3300 cm⁻¹ referentes a água na amostra e ligações O-H. (Wittayakun, Khemthong e Prayoonpokarach, 2008) ambos espectros são similares, confirmando que a estrutura não sofreu nenhuma alteração considerável após o processo de troca iônica.

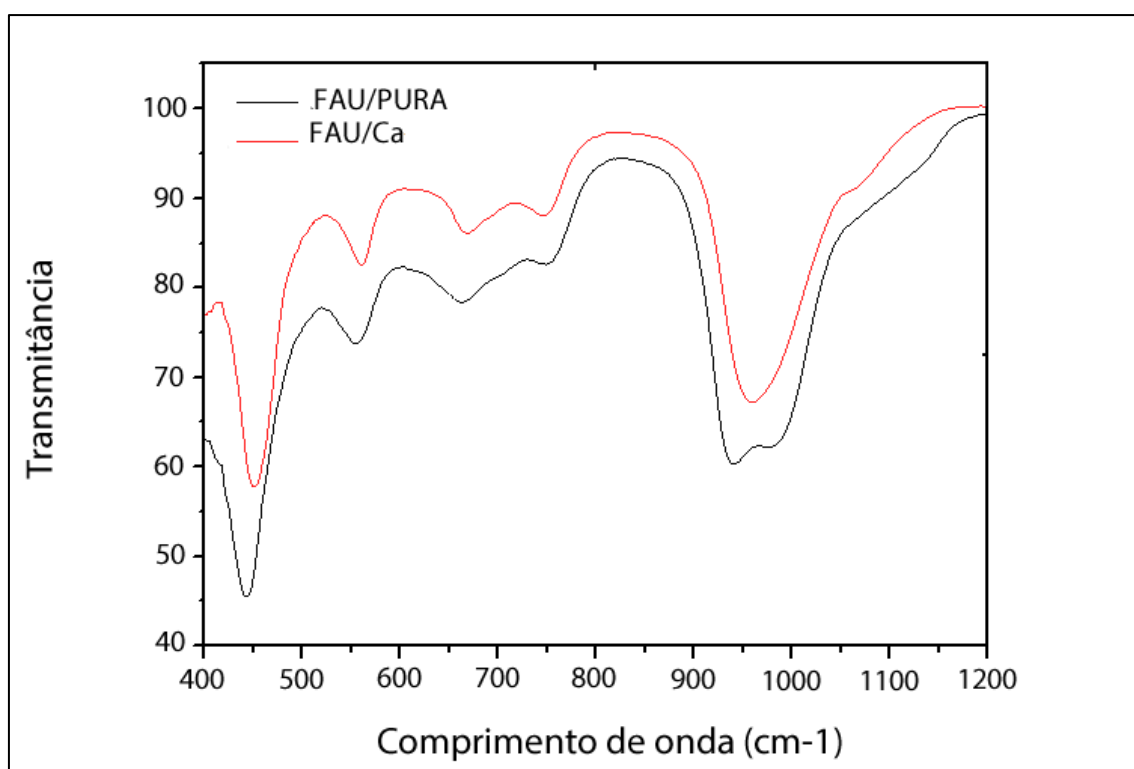


Figura 24: espectro de infravermelho das zeólitas FAU/PURA e FAU/Ca²⁺ (400 a 1200 cm⁻¹)

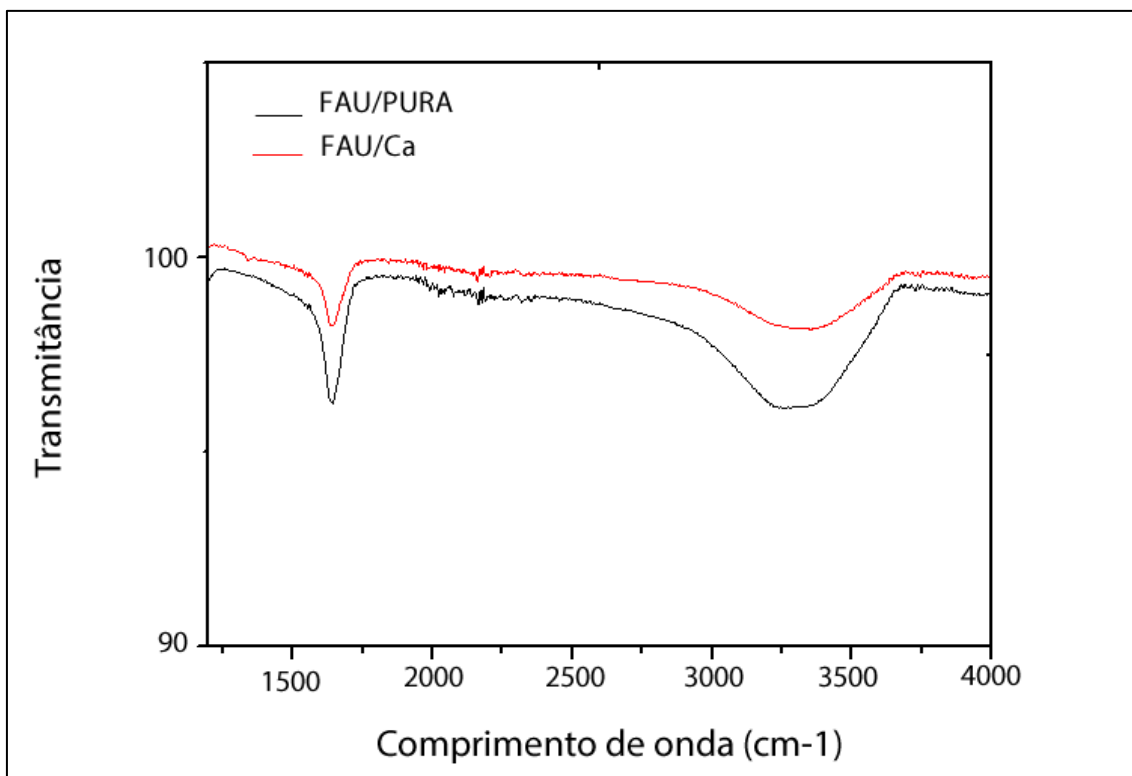


Figura 25: espectro de infravermelho das zeólitas FAU/PURA e FAU/Ca²⁺ (1200 a 4000cm⁻¹)

Os espectros mostrados nas figuras 26 e 27, referem-se a zeólita GIS/Na e GIS/Ca²⁺, os picos 440 (T-O), 620 (anel duplo), 660 e 740 (alongamento simétrico), 950 cm⁻¹ (alongamento assimétrico) 1640 e 3400 cm⁻¹ (água) são coerentes com os dados reportados na literatura (Tangkawanit e Rangsiwatananon, 2005; Sharma *et al.*, 2013). A zeólita GIS/Ca²⁺ apresentou mudanças consideráveis, após o processo de troca iônica, quando comparamos as duas estruturas, antes e depois, principalmente nas regiões de bandas de anel duplo (560 cm⁻¹), estiramentos simétricos (720 e 750 cm⁻¹) e assimétricos (940 cm⁻¹), esta mudança estrutural é coerente com a estrutura da zeólita GIS, este material é flexível, e as análises sugerem que ocorre uma distorção da estrutura original para melhor acomodar os cátions da troca iônica (Kuronen *et al.*, 2006).

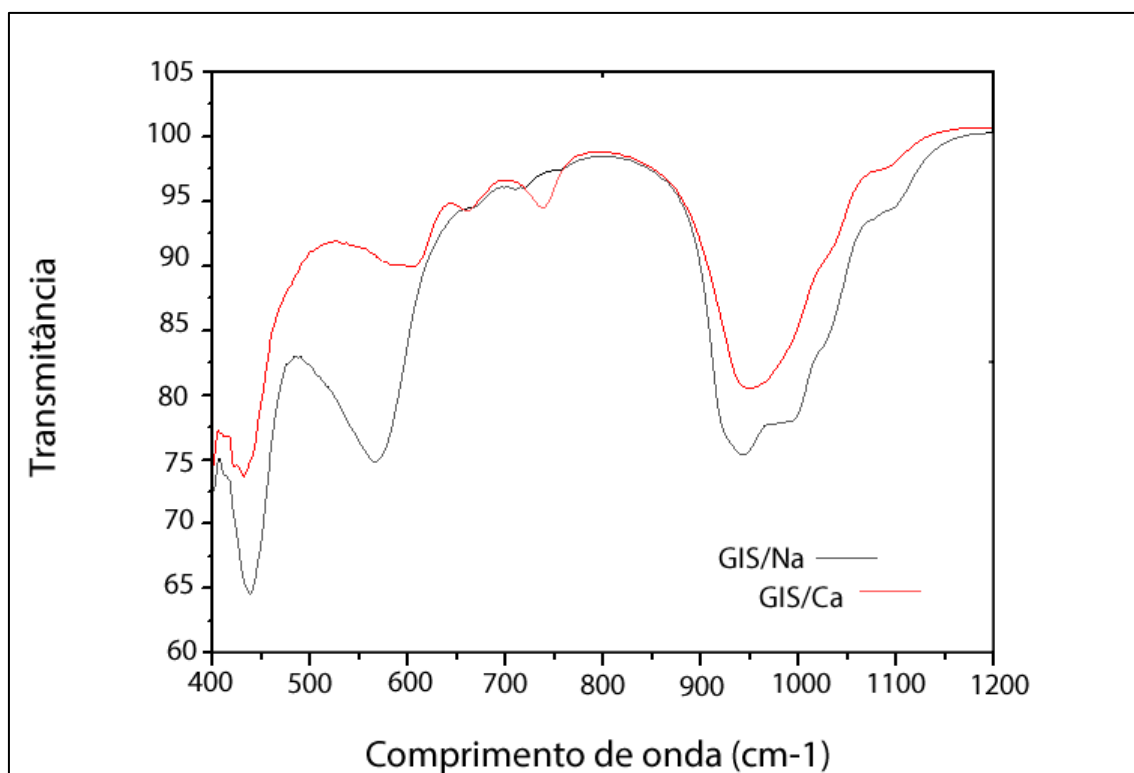


Figura 26: espectro de infravermelho das zeólitas GIS/PURA e GIS/Ca²⁺ (400 a 1200 cm⁻¹)

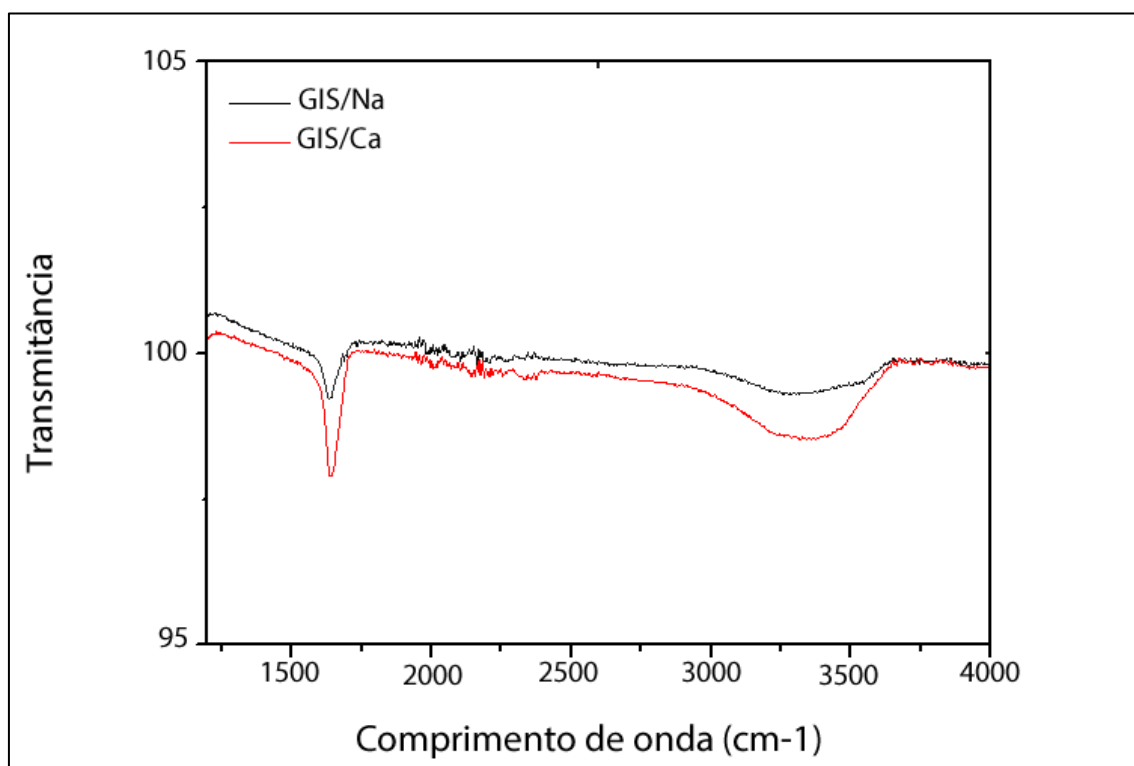


Figura 27: espectro de infravermelho das zeólitas GIS/PURA e GIS/Ca²⁺ (1200 a 4000cm⁻¹)

O espectro de infra vermelho da zeólita MOR/PURA e MOR/Ca²⁺ é mostrado nas figuras 28 e 29, onde notam-se as vibrações típicas desse tipo dessa zeólita; as vibrações referentes a água 1640 cm⁻¹, alongamentos assimétricos externas 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 (Hincapie *et al.*, 2004; Aly, Moustafa e Abdelrahman, 2012).

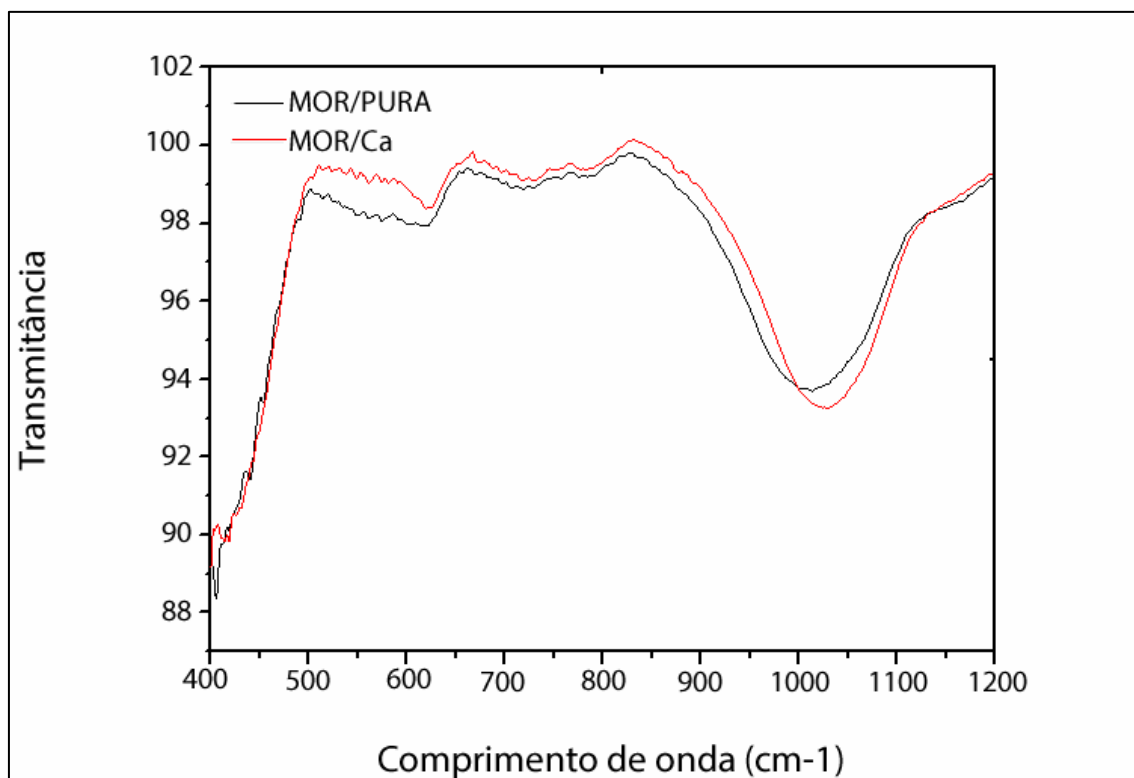


Figura 28: espectro de infravermelho das zeólitas MOR/PURA e MOR/Ca²⁺ (400 a 1200 cm⁻¹)

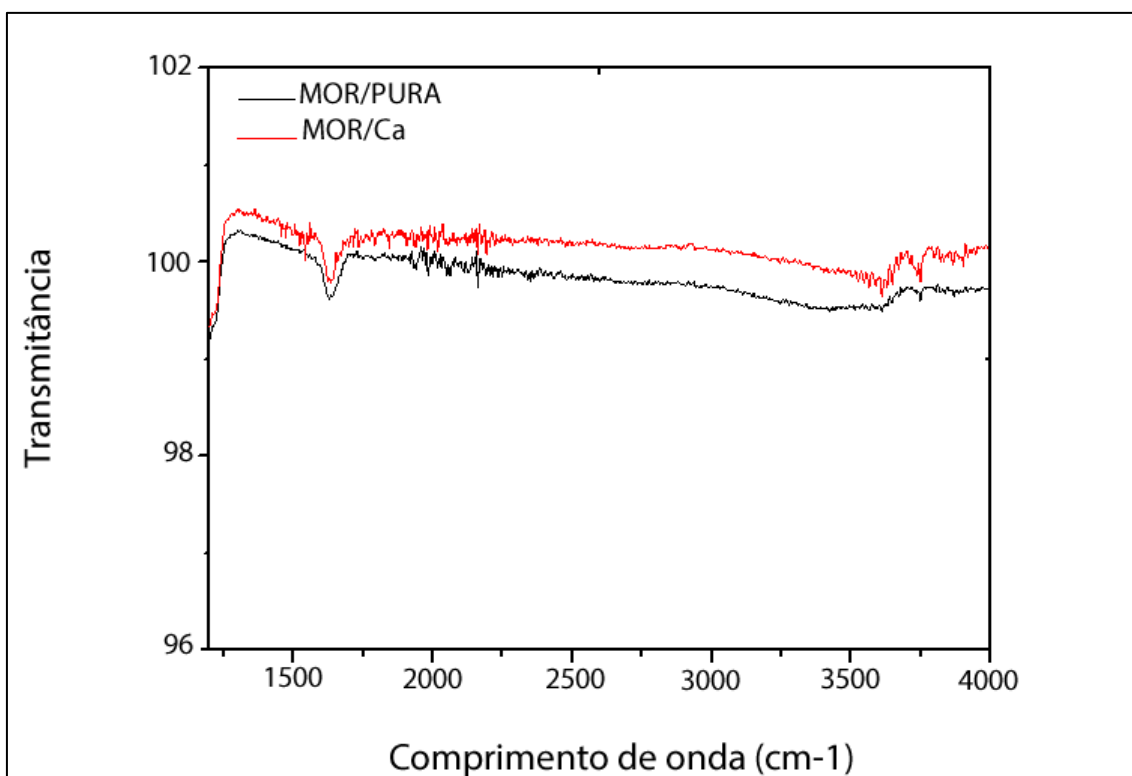


Figura 29: espectro de infravermelho das zeólitas MOR/PURA e MOR/Ca²⁺ (1200 a 4000 cm⁻¹)

9.4 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A utilização da microscopia eletrônica de varredura permite uma análise morfológica da estrutura do material, através dessa técnica foi possível comparar o material sintetizado e o padrão encontrado na literatura. As figuras 30 e 31 mostram a morfologia da zeólita faujasita pura e na forma Ca^{2+} , nelas pode-se visualizar formas hexagonais, coerentes com este tipo de material.

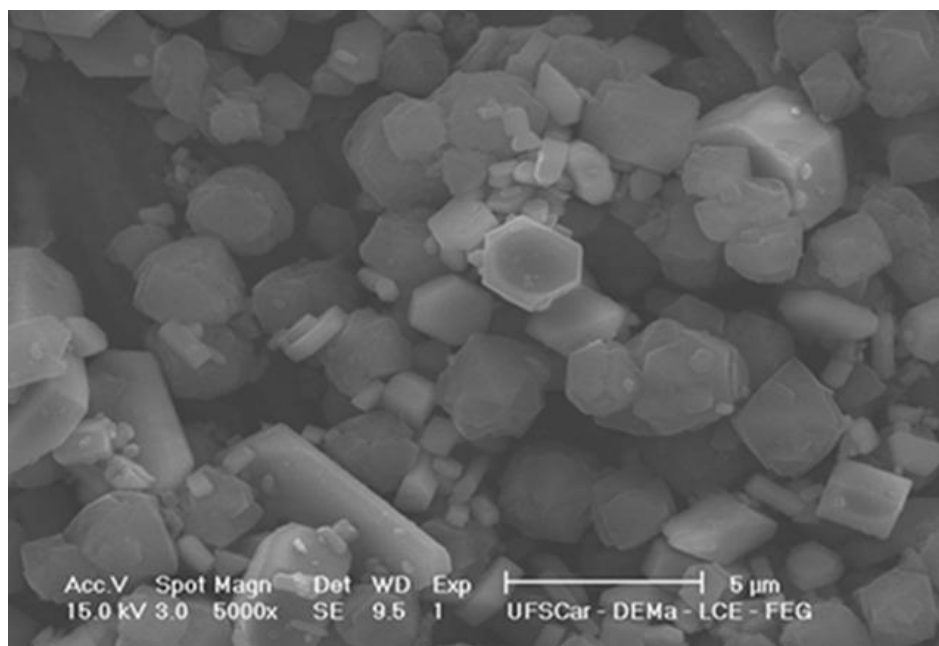


Figura 30: micrografia eletrônica de varredura da zeólita FAU/PURA

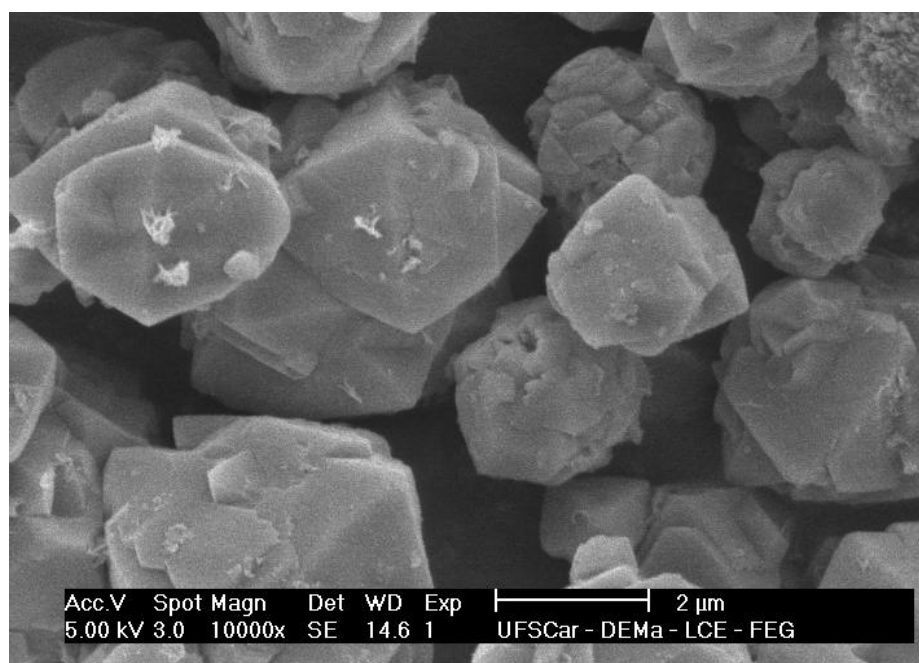


Figura 31: micrografia eletrônica de varredura da zeólita FAU/ Ca^{2+}

A figura 32, mostra o MEV da GIS/PURA, cujo material apresentou forma piramidal com bordas cristalinas confirmando sua alta cristalinidade (Huo *et al.*, 2012).

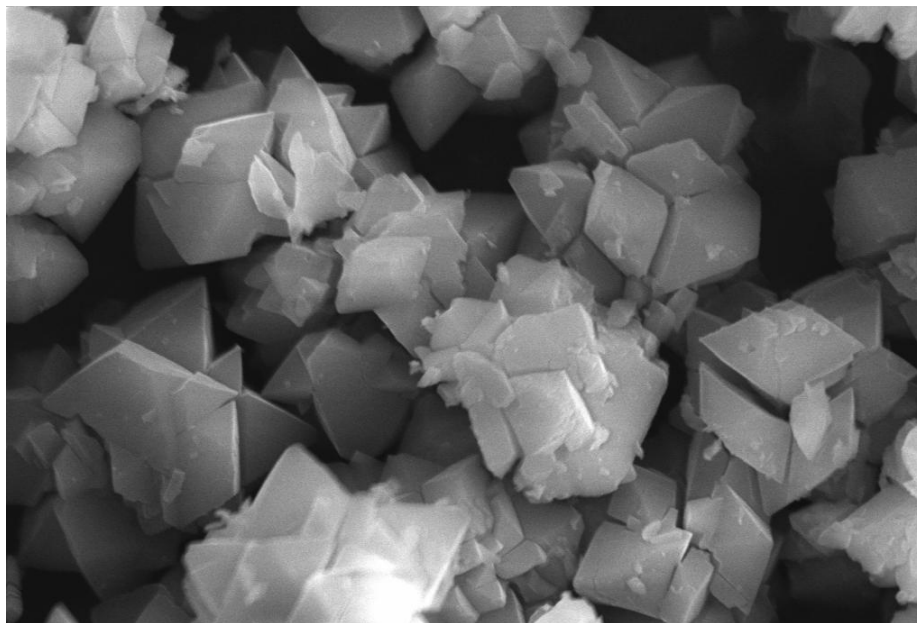


Figura 32: micrografia eletrônica de varredura da zeólita GIS/PURA

A micrografia da zeólita $\text{gis}/\text{Ca}^{2+}$ não revela uma característica piramidal encontrada na forma pura, porém a estrutura primária permanece, e pode se observar uma grande quantidade de debris na micrografia dessa amostra, figura 32.

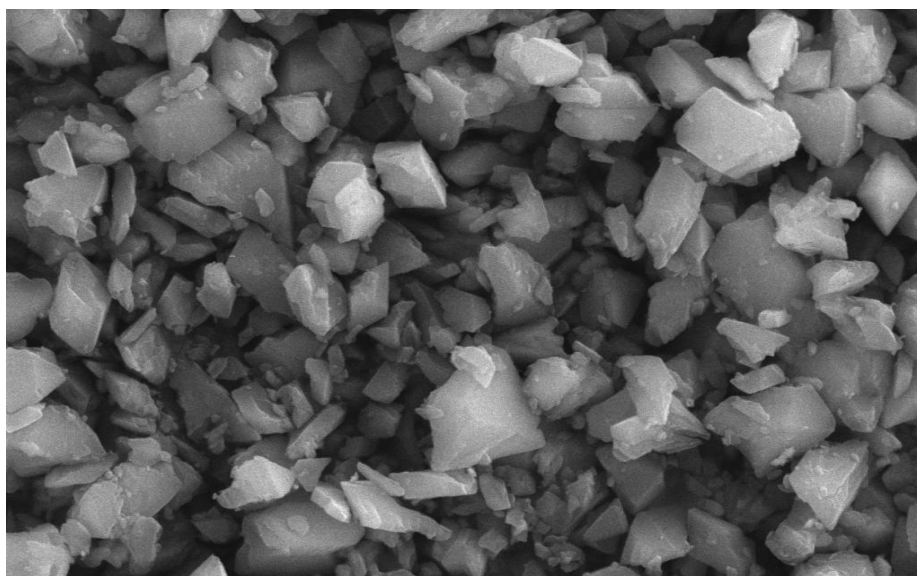


Figura 33: micrografia eletrônica de varredura da zeólita GIS/Ca²⁺

A micrografia da zeólita MOR/PURA, figura 34, revela que esta estrutura tem forma de agulha, coerente com a estrutura relatada na literatura (Aly, Moustafa e Abdelrahman, 2012).

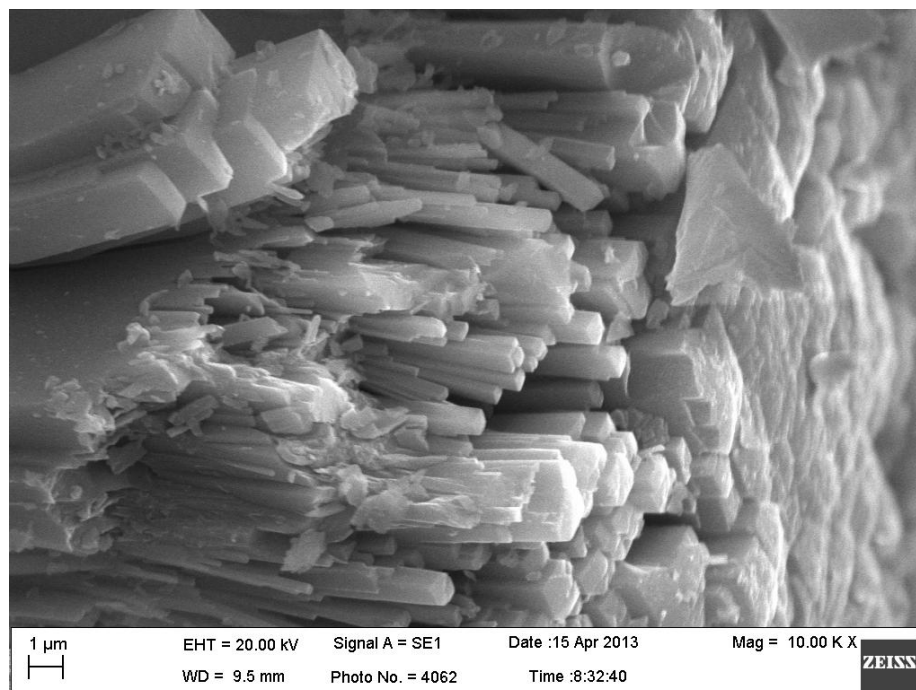


Figura 34: micrografia eletrônica de varredura zeólita MOR/PURA

O MEV da zeólita MOR/ Ca^{2+} não revelou modificação significativa, mantendo a estrutura primária da zeólita, figura 35.

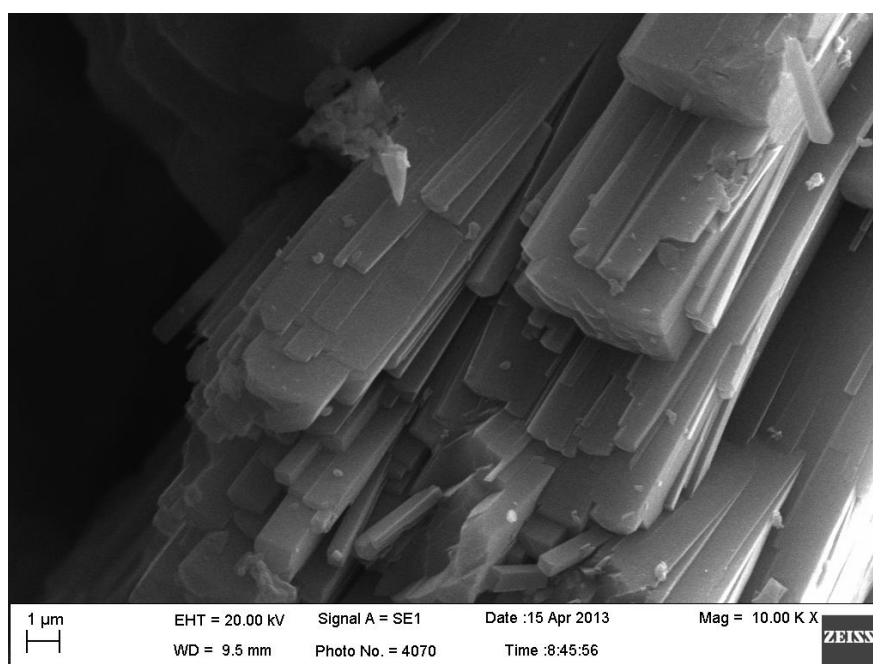


Figura 35: micrografia eletrônica de varredura da zeólita MOR/ Ca^{2+}

9.5 Tromboelastografia (TEG)

As análises tromboelastograficas seguiram os procedimentos descritos no item 8.5 deste trabalho, o tromboelastograma do sangue total puro esta representado na figura 36.

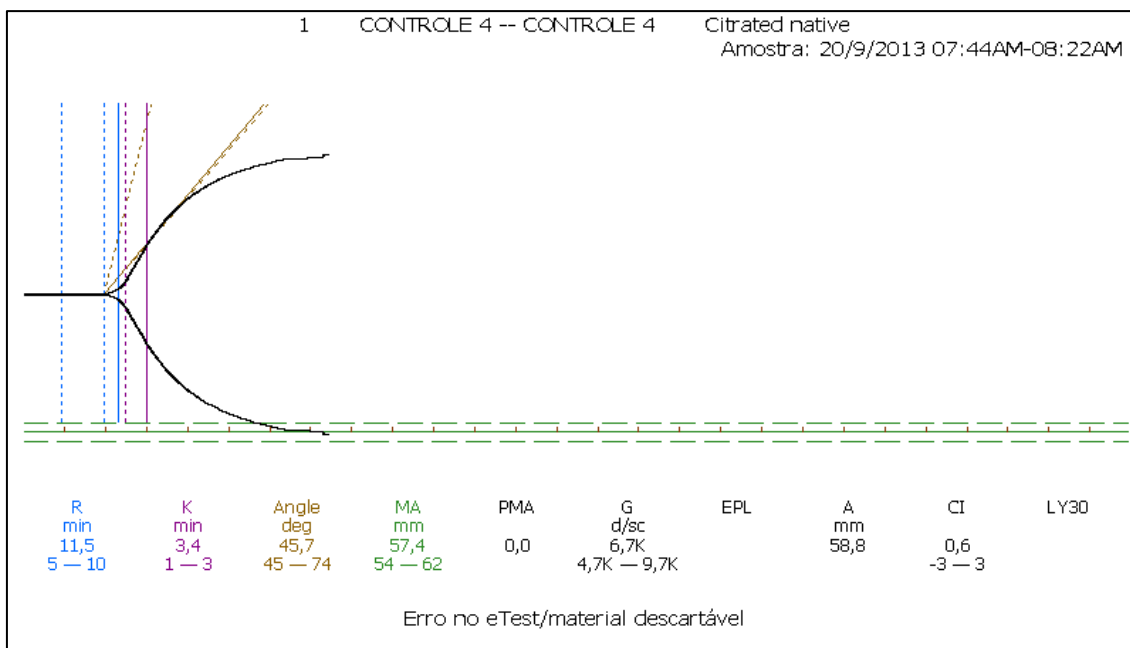


Figura 36: tromboelastograma do sangue total puro

O tromboelastograma do sangue total puro da figura 36 revela a análise da amostra de um voluntario cujo perfil de coagulação é considerado normal. Os parâmetros observados como o tempo R, K, ângulo α e amplitude máxima estão todos dentro das variações consideradas normais.

Os mesmos parâmetros foram avaliados para a amostra de sangue tratada com as zeólitas em sua forma pura e após o processo de troca iônica com cálcio: FAU/PURA, FAU/Ca²⁺, GIS/Na, GIS/Ca²⁺, MOR/PURA, MOR/Ca²⁺, além desses materiais zeolíticos o agente hemostático conhecido como Caolin também foi testados nos mesmos padrões para que se obtivesse valores de comparação entre os dois materiais. As figuras 37 a 43, ilustram o TGE do sangue do mesmo voluntário tratado com os materiais zeolíticos, FAU/PURA, FAU/Ca²⁺, GIS/Na, GIS/Ca²⁺, MOR/PURA, MOR/Ca²⁺ e Caolin respectivamente.

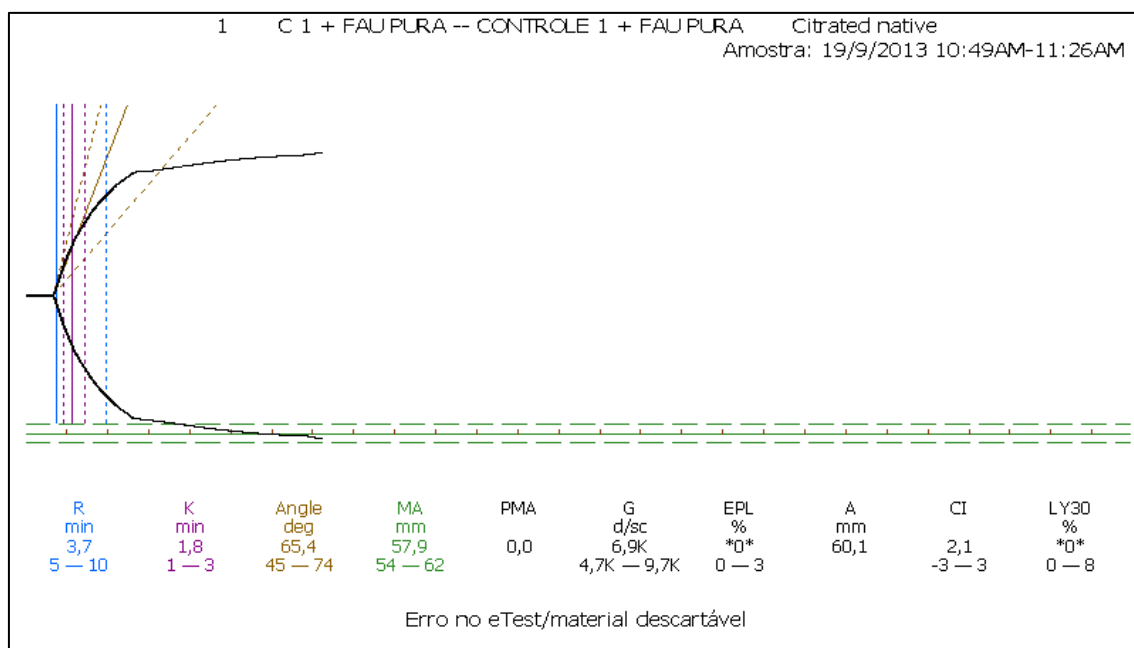


Figura 37: tromboelastograma do sangue total tratado com a zeólita FAU/PURA

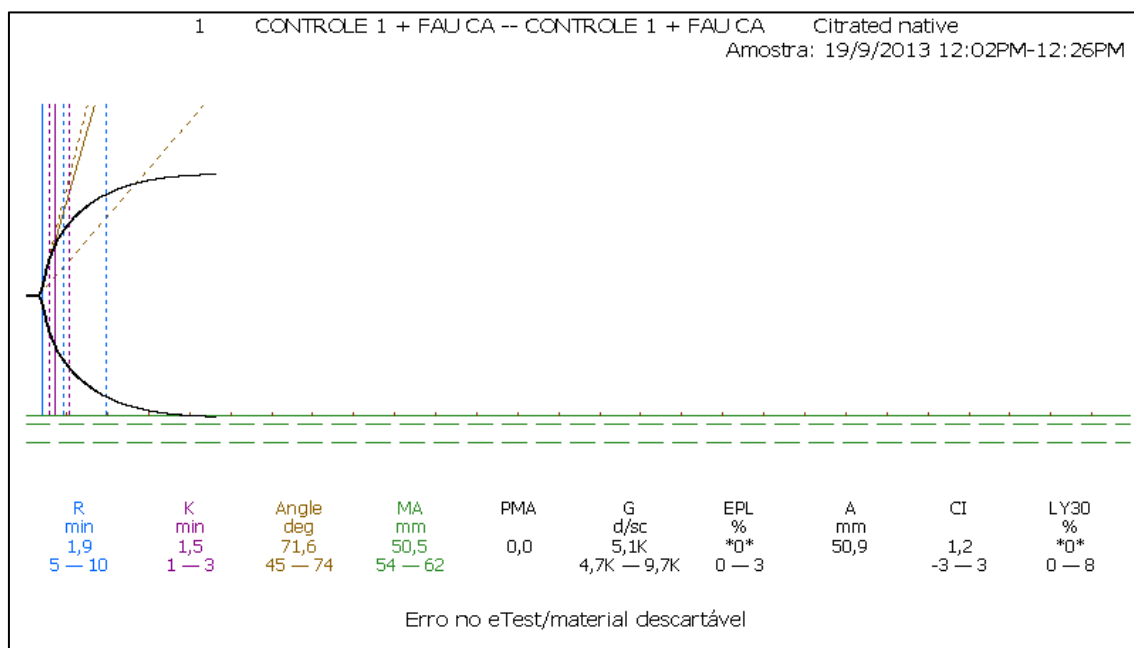


Figura 38: tromboelastograma do sangue total tratado com a zeólita FAU/Ca²⁺.

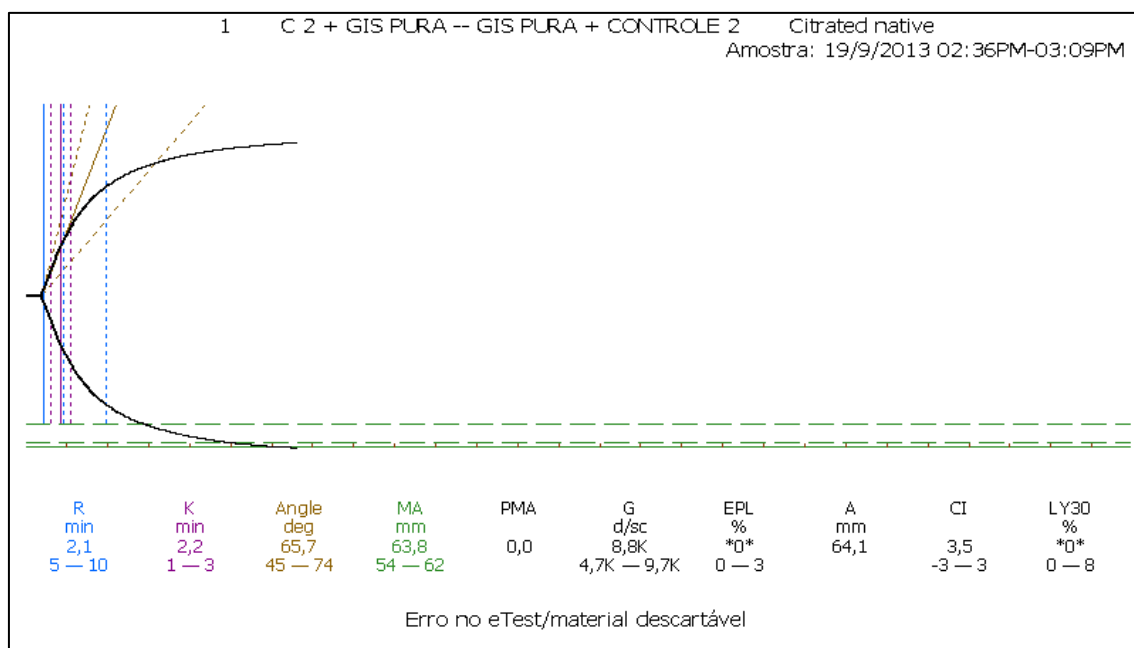


Figura 39: tromboelastograma do sangue tratado com a zeólita GIS/PURA.

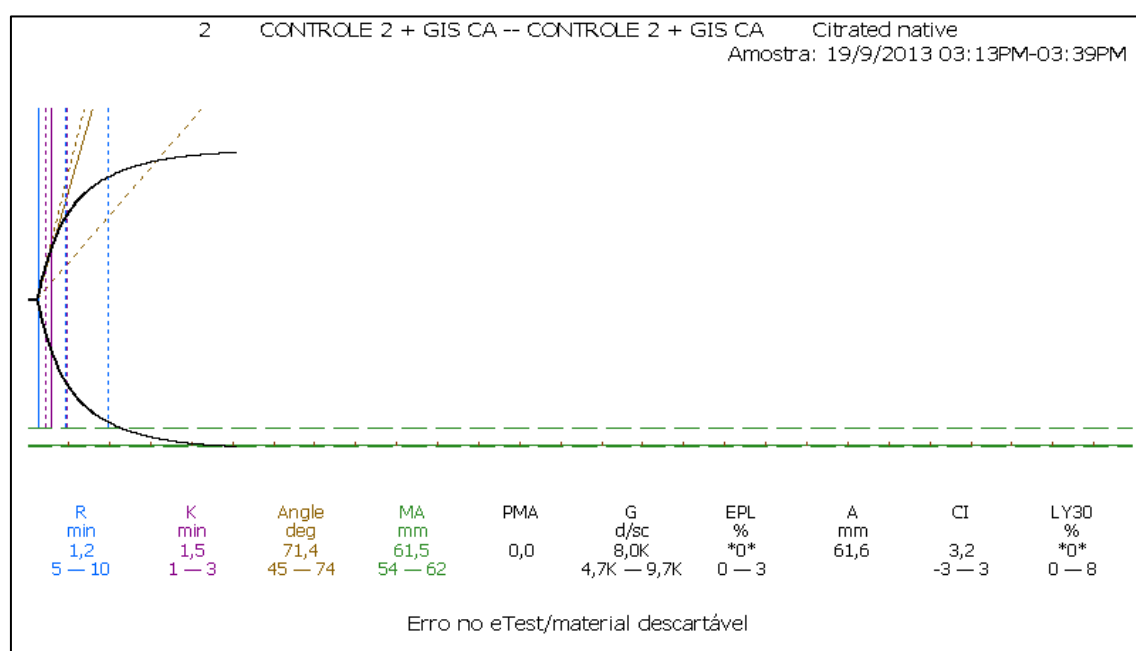


Figura 40: tromboelastograma do sangue total tratado com a zeólita GIS/Ca²⁺.

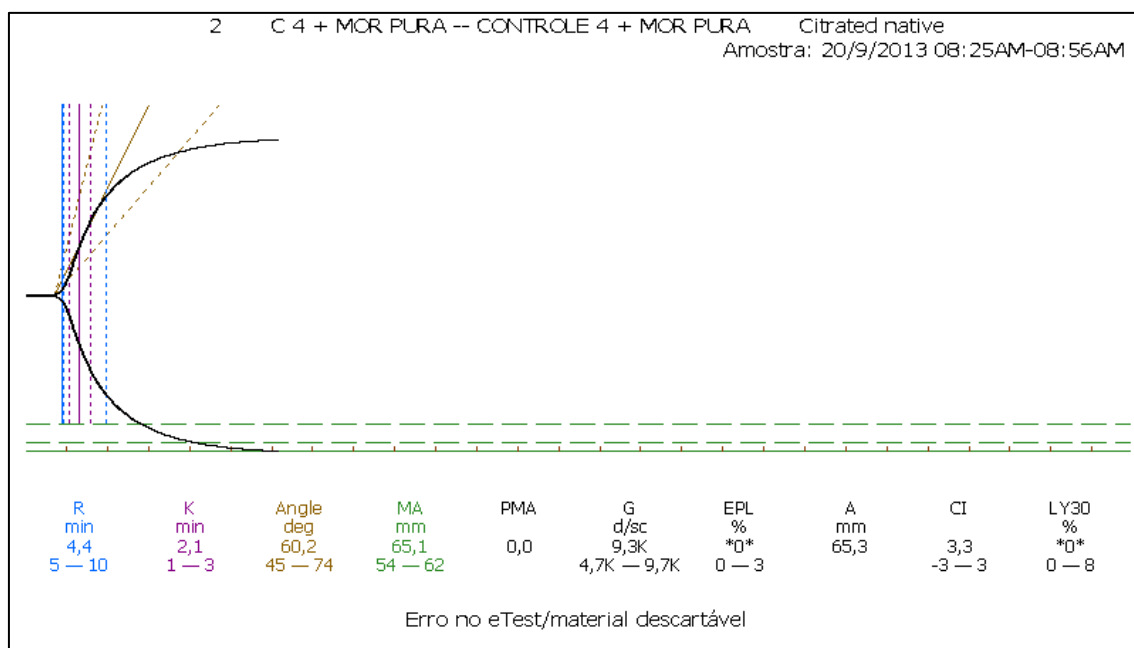


Figura 41: tromboelastograma do sangue total tratado com a zeólita MOR/PURA.

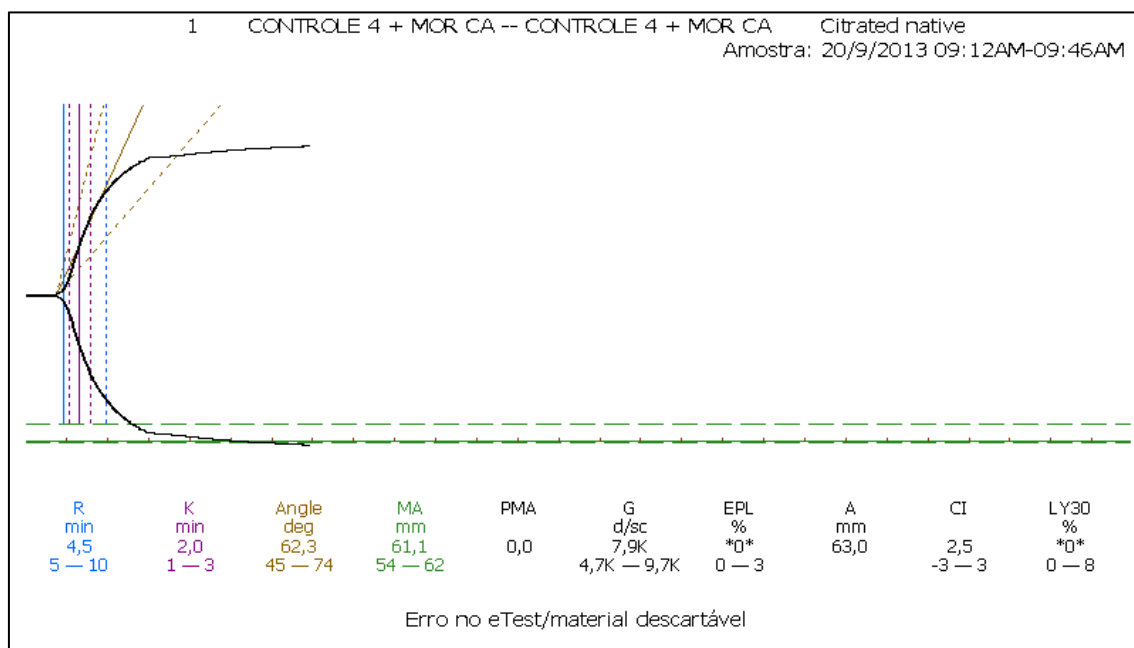


Figura 42: tromboelastograma do sangue total tratado com a zeólita MOR/Ca²⁺.

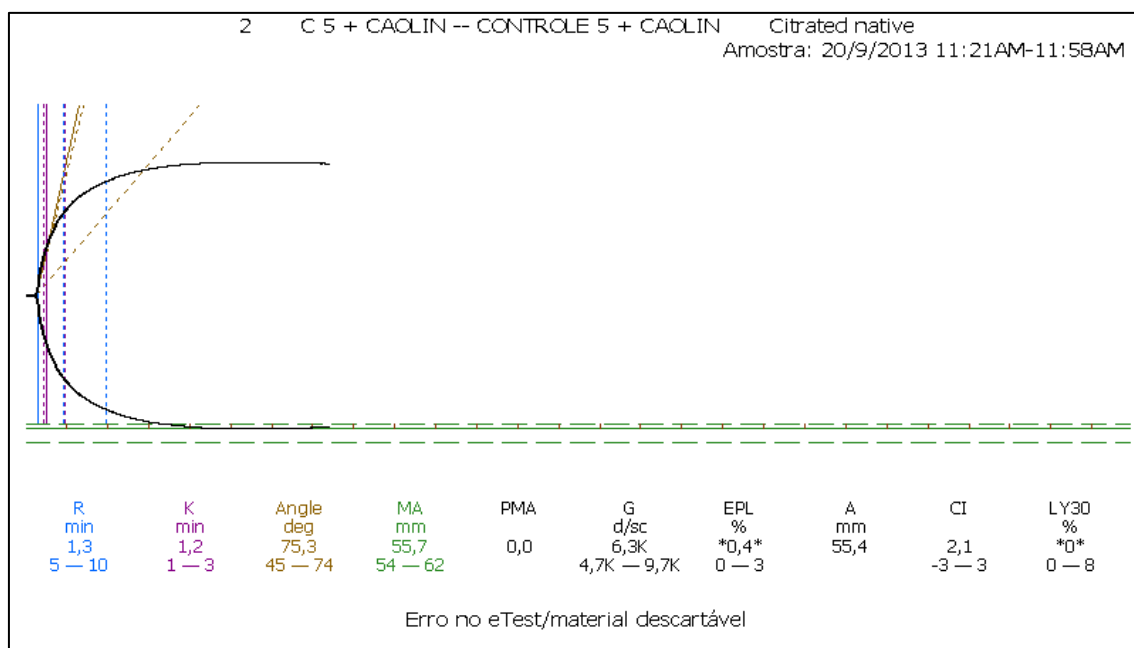


Figura 43: tromboelastograma do sangue total tratado com o agente hemostático Caolin.

Os índices de coagulação R, K, α e MA das figuras 36 a 43 estão apresentados na tabela 2.

Tabela 2: dados obtidos das análises de TGE das amostras de sangue tratadas com os materiais zeolíticos e com o agente coagulante Caolin, a tabela representa os valores obtidos para os parâmetro R, K, α e MA.

	R (min)	K (min)	α	MA (mm)
Controle	11,5	3,4	45,7	57,4
FAU/PURA	3,7	1,8	65,4	57,9
FAU/Ca²⁺	1,9	1,5	71,6	50,5
GIS/Na	2,1	2,2	65,7	63,8
GIS/Ca²⁺	1,2	1,5	71,4	61,5
MOR/PURA	4,4	2,1	60,2	65,1
MOR/Ca²⁺	4,5	2,0	62,3	61,1
Caolin	1,3	1,2	75,3	55,7

A análise dos índices de coagulação do sangue total pelo TEG, indicou que todos os materiais zeolíticos sintetizados funcionaram como agentes hemostáticos coagulantes reduzindo o tempo de coagulação das amostras de sangue em todas as medições feitas. Verificou-se ainda que cada material agiu diferentemente no processo de coagulação mudando os parâmetros de acordo com sua estrutura e ao cálcio incorporado.

Para melhor se obter dados comparativos, as análises de TEG foram realizadas triplicata para todas as amostras e a partir dos dados obtidos foi calculada a média dos índices e plotados em gráficos.

Os gráficos 44 a 48, exibem a comparação das médias para cada um dos índices (R, k, α e MA), assim pode-se comparar a ação de cada material em cada parâmetro separadamente.

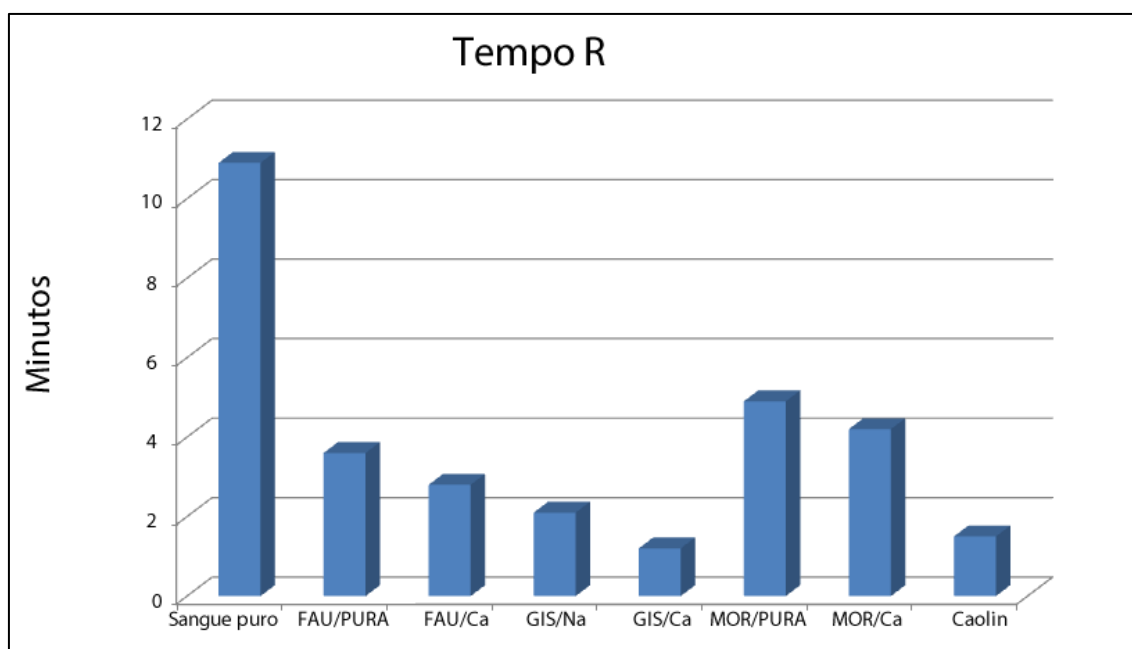


Figura 44: gráfico referente a média dos valores obtidos do tempo de reação (R) para o sangue total puro (10,9 min), FAU/PURA (3,6 min), FAU/Ca (2,8 min), GIS/Na (2,1 min), GIS/Ca (1,2 min), MOR/PURA (4,9 min), MOR/Ca (4,2 min) e Caolin (1,5 min)

O gráfico do tempo de reação (R), figura 44, indica o início da produção de fibrina e formação do coágulo, este tempo é considerado normal quando ocorre num intervalo de 5 a 10 minutos; as amostras do sangue total puro obtiveram média de 10,9 minutos, quando tratado com os materiais zeolíticos, a coagulação do sangue foi

acelerada e a média do tempo R diminuiu para 1,2 minutos com a zeólita GIS/ Ca^{2+} que exibiu o melhor desempenho no encurtamento desse parâmetro com uma queda de 89% no tempo.

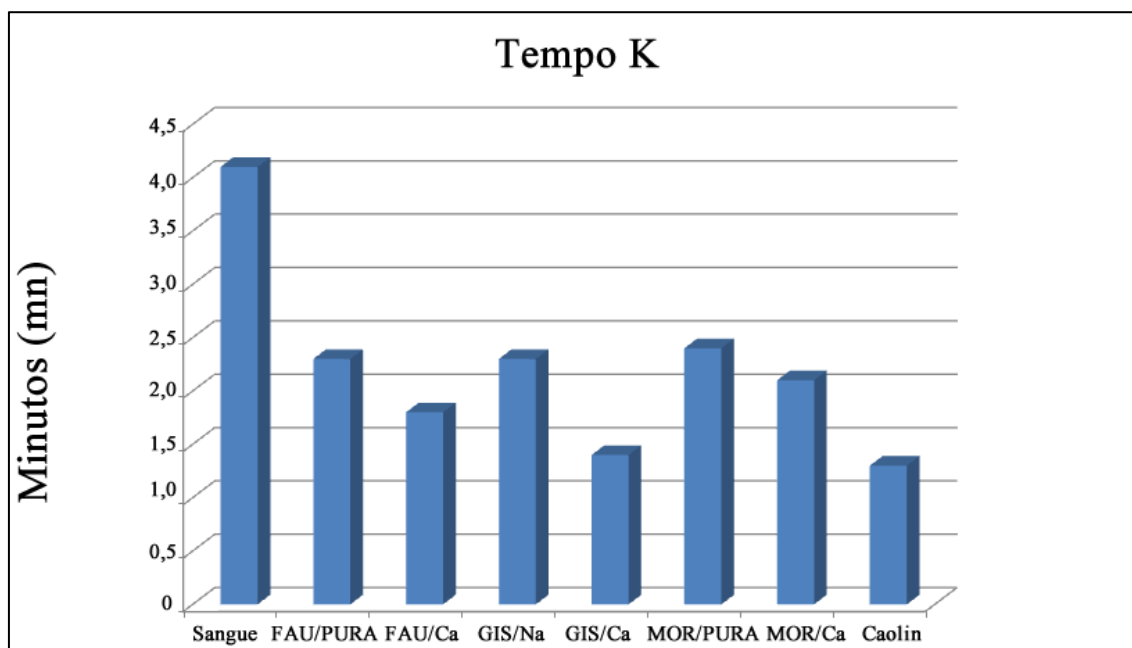


Figura 25: gráfico referente a média dos valores obtidos para o tempo de coagulação k para o sangue total puro (4,1 min) e os materiais zeolíticos (2,3 min, 1,8 min, 2,3 min, 1,4 min, 2,4 min, 2,1 min e 1,3 min respectivamente)

O gráfico do tempo de coagulação (K), figura 45, observa-se os valores das médias obtidas no TEG para o tempo K, esse tempo mostra a taxa na qual um coágulo relativamente firme é formado. O tempo para que isso ocorra em pessoas cujo perfil de coagulação é normal é de aproximadamente de 1 a 3 minutos, a média dessa taxa para o sangue total puro foi de 4,1 minutos. Quando as amostras de sangue foram tratadas com os materiais zeolíticos o tempo de coagulação diminuiu, a zeólita GIS/ Ca^{2+} foi o material que obteve melhor desempenho na diminuição desse índice cuja média foi de 1,4 minuto, uma diminuição de aproximadamente 66% no tempo de coagulação.

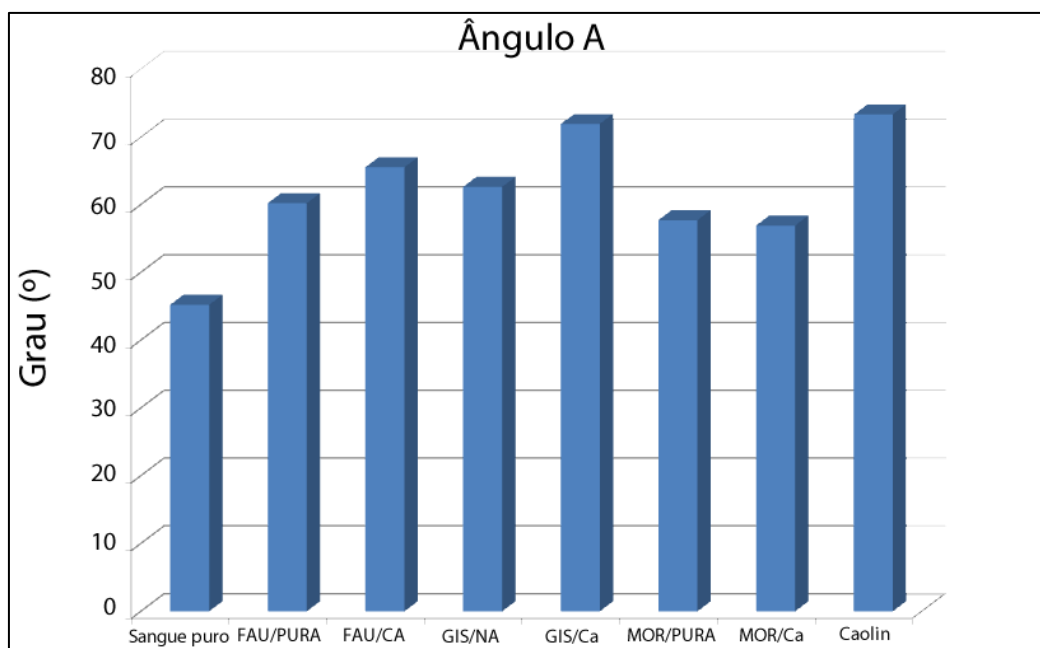


Figura 46: gráfico referente a média dos valores obtidos dos resultados do TEG para o ângulo α , do sangue total puro (45,2°), materiais zeolíticos (60,2°, 65,5°, 62,6°, 71,9°, 57,7°, 56,9°) e Caolin (72,5°) respectivamente.

O gráfico 46 revela os valores das médias obtidas no TEG para o ângulo α , em grau, das amostras (sangue total puro, materiais zeolíticos e Caolin), este índice representa a taxa de geração de trombina e conversão de fibrinogênio em fibrina revelando a qualidade da atividade plaquetária, quanto maior o ângulo maior a atividade e consequentemente a quantidade de fibrinogênio. Os valores considerados dentro da normalidade para o ângulo α varia entre 45 a 74°; o sangue total puro exibiu uma média de 45,2°. Nota-se no gráfico que todos os materiais zeolíticos e o agente coagulante Caolin aumentaram o ângulo α , novamente a zeólita GIS/Ca²⁺ e o Caolin exibiram maiores valores na conversão dos índices, 71,9° e 72,5° respectivamente, 71,5% e 73% de aumento no tempo K.

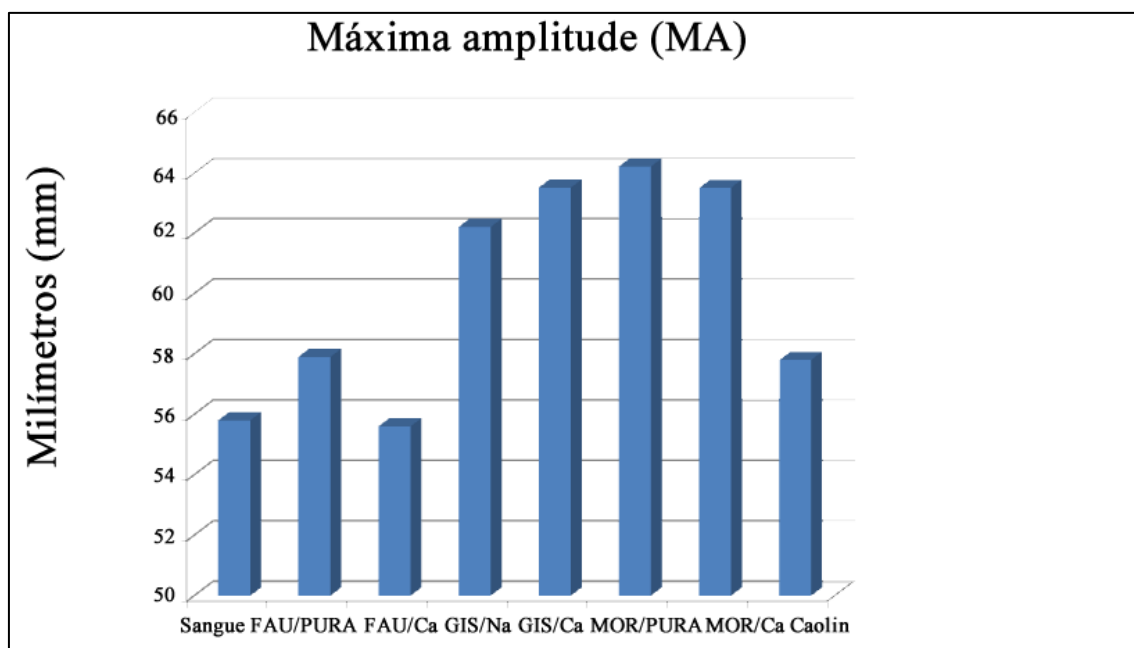


Figura 47: gráfico referente a média obtida do resultados de TEG, para a MA do sangue total puro (55,8 mm) materiais zeolíticos (57,9 mm, 55,6 mm, 62,2 mm, 63,5 mm, 64,2 mm, 63,5 mm) e Caolin (57,8 mm) respectivamente.

O gráfico da figura 47, ilustra os valores da média obtidos para o índice de AM, que mede o maior diâmetro que o coágulo pode atingir e sua elasticidade, quanto maior a amplitude maior a qualidade das plaquetas, do fibrinogênio e fator VIII. A média de AM para o sangue total puro foi de 55,8 mm, os valores considerados normais para este parâmetro oscilam entre 54mm a 62 mm. Os sangues tratados com os materiais zeolíticos tiveram a AM aumentada, neste caso a zeólita MOR/PURA obteve melhor desempenho na ampliação do AM, cuja média foi de 64,2 mm, um aumento de 15% no índice.

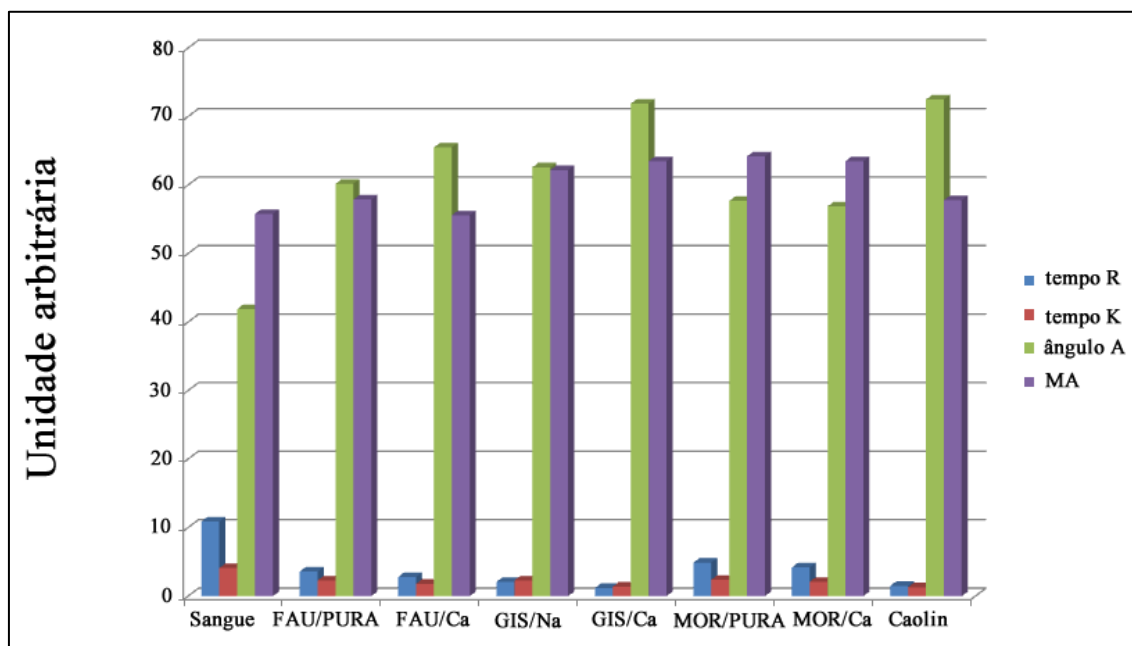


Figura 48: gráfico referente a média dos dados obtidos do TEG para o sangue puro e sangue tratado com os materiais zeolíticos exibindo a diferença nos índices de coagulação para todos os tratamentos.

De modo geral, todos os materiais zeolíticos agiram como agente hemostático coagulante, o gráfico da figura 48 ilustra todos os índices de coagulação do sangue total puro comparando com os materiais zeolíticos; verifica-se que os materiais que passaram pelo processo de troca iônica obtiveram os melhores resultados na tromboelastografia. Este resultado era esperado já que o íon cálcio é um cofator na coagulação sanguínea, o cálcio desempenha um papel crítico na orientação das enzimas de coagulação, servindo como ponte iônica entre dois resíduos negativamente carregados (superfície celular e fatores de coagulação), o íon é consumido durante o processo quando o Fator XII faz ligações cruzadas de fibrina com resíduos glicosilados carregados negativamente (Ostomel, Shi e Stucky, 2006).

10 - DISCUSSÃO

A primeira parte deste trabalho foi a síntese e a caracterização das zeólitas FAU, GIS e MOR. Os resultados de DRX, TGA, ATR-FTIR e MEV destes materiais indicaram que as zeólitas FAU, GIS e MOR foram sintetizadas e os dados obtidos estavam em concordância com a literatura (Treacy e Higgins, 2001), após a síntese todos os materiais zeolíticos passaram pelo processo de troca iônica para incorporação do cálcio em sua estrutura, a associação do cálcio auxilia na formação do coágulo já que ele é um co-fator na coagulação; verificou-se por meio das análises físico-químicas que as zeólitas FAU e GIS incorporaram melhor o íon à sua estrutura.

A segunda parte, foram os testes de coagulação *in vitro* utilizando amostras de sangue total puro e avaliação pelo TEG; os resultados apresentados são coerentes com a literatura, segundo (Ostomel *et al.*, 2007), os agentes inorgânicos porosos tem efeitos aceleratórios múltiplos na coagulação sanguínea, em conjunto com a ativação superficial e controle dos eletrólitos locais, e o bom desempenho do material testado é referente a ativação de contato realizada pela zeólita. A ativação de contato é um processo pelo qual a superfície polar ativa o padrão intrínseco da cascata de coagulação; a exposição do sangue à superfície polar interage com os Fatores XII, XI, HMWK ativando-os que por sua vez ativam numerosos mecanismos do feedback positivo responsável pela associação da enzima trombina e polimerização da fibrina (Ostomel, Shi e Stucky, 2006). Os resultados de TEG também mostraram que as zeólitas FAU e GIS com cálcio conseguiram melhores resultados nos índices de coagulação mostrando que a estrutura torna-se uma fonte de cálcio auxiliando durante o processo de formação do coágulo (Ostomel, Shi e Stucky, 2006).

Afim de, dar continuidade ao trabalho, sugere-se que análises complementares sejam feitas, a avaliação da carga superficial das zeólitas com o uso do potencial zeta (Ostomel *et al.*, 2007) por exemplo, fornecerá a correlação com a ativação de contato. Se faz necessário também a avaliação do calor liberado pelas zeólitas quando estas retêm a água presente no sangue, já foi relatado que o material realiza esse processo por meio de uma reação exotérmica (Arnaud *et al.*, 2008), testes de calorimetria poderão fornecer a quantidade de calor disperso. Um outro dado importante a padronizar são os testes *in vitro* (TEG), uma quantidade maior de amostras fornecerá uma melhor avaliação do efeito das zeólitas na aceleração do tempo de coagulação.

11 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACHESON, E. M. et al. Comparison of hemorrhage control agents applied to lethal extremity arterial hemorrhages in swine. **Journal of Trauma-Injury Infection and Critical Care**, v. 59, n. 4, p. 865-874, Oct 2005. ISSN 1079-6061. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000234513900015 >.

ALBERT, B. R. et al. Investigations on P zeolites: synthesis, characterisation, and structure of highly crystalline low-silica NaP. **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 21, n. 1-3, p. 133-142, Apr 1998. ISSN 1387-1811. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000075678800018 >.

ALBERT, B. R.; CHEETHMAN, A. K.; ADAMS, C. J. **Investigations on P zeolites: synthesis and structure of the gismondine analogue, highly crystalline low-silica CaP.** Microporous and Mesoporous Materials: Elsevier Science B.V.: 127 - 132 p. 1998.

ALMEIDA, K. A.; MARTINS, L.; CARDOSO, D. **PREPARAÇÃO E PROPRIEDADES DE ZEÓLITAS FAUJASITA CONTENDO CÁTIOS AMÔNIO.** Química Nova. 33: 1077-1081 p. 2010.

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, Nov 2012. ISSN 0921-8831. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000312515800009 >.

ARNAUD, F. et al. Exothermic reaction in zeolite hemostatic dressings: QuikClot ACS and ACS+(R). **Annals of Biomedical Engineering**, v. 36, n. 10, p. 1708-1713, Oct 2008. ISSN 0090-6964. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000259125000011 >.

BALKUS, K. J.; BRESINSKA, I. MOLECULAR-SIEVE BASED MRI CONTRAST AGENTS. **Journal of Alloys and Compounds**, v. 207, p. 25-28, Jun 1994. ISSN 0925-8388. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1994NU81500007 >.

CARLOS, M. M. L.; FREITAS, P. D. F. S. **Estudo da cascata de coagulação sanguínea e seus valores de referência.** Acta Veterinaria Brasilica. Brasil. 1: 6 p. 2007.

CEYHAN, T.; TATLIER, M.; AKÇAKAYA, H. **In vitro evaluation of the use of zeolites as biomaterials: effects on simulated body fluid and two types of cells.** J Mater Sci: Mater Med. J Mater Sci: Mater Med: 1557 -1562 p. 2007.

CONCEPCIÓN-ROSABAL, B.; RODRIGUEZ-FUENTES, G.; SIMÓN-CARBALLO, R. **Development and featuring of the zeolitic active principle FZ: A glucose adsorbent.** Zeolites. USA: Elsevier. 19: 47-50 p. 1997.

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, Jul 5 2005. ISSN 1387-1811. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000230274200001 >.

DALAI, A. K. et al. Synthesis and characterization of NaX and Cu-exchanged NaX zeolites from silica obtained from rice husk ash. **Indian Journal of Engineering and Materials Sciences**, v. 12, n. 3, p. 227-234, Jun 2005. ISSN 0971-4588. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000230058700008 >.

DYER, A. **Zeolites**. Elsevier. UK: 9859-9863 p. 2001

FERREIRA, C. N. et al. **O novo modelo da cascata de coagulação baseado nas superfícies celulares e suas implicações**. Revista brasileira de hematologia e hemoterapia. Brasil. 32: 416-421 p. 2010.

GAILANI, D.; RENNE, T. Intrinsic pathway of coagulation and arterial thrombosis. **Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology**, v. 27, n. 12, p. 2507-2513, Dec 2007. ISSN 1079-5642. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000251143300007 >.

The intrinsic pathway of coagulation: a target for treating thromboembolic disease? **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v. 5, n. 6, p. 1106-1112, Jun 2007. ISSN 1538-7933. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000246795800002 >.

GALVEZ, K. C.; CORTES, C. L. **Thromboelastography: New concepts in haemostasis physiology and correlation with trauma associated coagulopathy**. Colombian Journal of anesthesiology. Colombia: Elsevier España. 40: 224-230 p. 2012.

GHOBARAKAR, H.; SCHAF, O.; GUTH, U. Zeolites - from kitchen to space. **Progress in Solid State Chemistry**, v. 27, n. 2-4, p. 29-73, 1999. ISSN 0079-6786. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000086001000001 >.

GRCE, M.; PAVELIC, K. Antiviral properties of clinoptilolite. **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 79, n. 1-3, p. 165-169, Apr 1 2005. ISSN 1387-1811. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000228108000019 >.

HINCAPIE, B. O. et al. Synthesis of mordenite nanocrystals. **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 67, n. 1, p. 19-26, Jan 8 2004. ISSN 1387-1811. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000187970300002 >.

HOFFMAN, M. Remodeling the blood coagulation cascade. **Journal of Thrombosis and Thrombolysis**, v. 16, n. 1-2, p. 17-20, Aug-Oct 2003. ISSN 0929-5305. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000188716300004 >.

HORCAJADA, P. et al. Controlled release of ibuprofen from dealuminated faujasites. **Solid State Sciences**, v. 8, n. 12, p. 1459-1465, Dec 2006. ISSN 1293-2558. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000243227800008 >.

HRILJAC, J. A. et al. POWDER NEUTRON-DIFFRACTION AND SI-29 MAS NMR-STUDIES OF SILICEOUS ZEOLITE-Y. **Journal of Solid State Chemistry**, v. 106, n. 1, p. 66-72, Sep 1993. ISSN 0022-4596. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1993LY31300008 >.

HUO, Z. et al. Synthesis of zeolite NaP with controllable morphologies. **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 158, p. 137-140, Aug 1 2012. ISSN 1387-1811. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000305714200017 >.

HURSEY, F. X. **Method of treatings wounds**. United States Patent. 19. USA 1989.

HURSEY, F. X.; HORN, J. L. **Molecular sieve materials having increased particle size for the formation of blood clots**. USA: Z-Medica. US 2006/0141060 A1 2006.

JIANG, Z. et al. **Development of novel mordenite-filled chitosan-poly(acrylic acid) polyelectrolyte complex membranes for pervaporation dehydration of ethylene glycol aqueous solution**. Journal of Membrane Science: Elsevier: 142 - 150 p. 2007.

KURONEN, M. et al. Ion exchange selectivity and structural changes in highly aluminous zeolites. **Reactive & Functional Polymers**, v. 66, n. 11, p. 1350-1361, Nov 2006. ISSN 1381-5148. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000242231400017 >.

MOHAMED, M. M. et al. Synthesis of high silica mordenite nanocrystals using o-phenylenediamine template. **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 84, n. 1-3, p. 84-96, Sep 15 2005. ISSN 1387-1811. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000232036300011 >.

MUMPTON, F. A. La roca magica: Uses of natural zeolites in agriculture and industry. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 96, n. 7, p. 3463-3470, Mar 30 1999. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000079507900023 >.

OJHA, K.; PRADHAN, N. C.; SAMANTA, A. N. Zeolite from fly ash: synthesis and characterization. **Bulletin of Materials Science**, v. 27, n. 6, p. 555-564, Dec 2004. ISSN 0250-4707. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000225812000014 >.

OSTOMEL, T. A. et al. Metal oxide surface charge mediated Hemostasis. **Langmuir**, v. 23, n. 22, p. 11233-11238, Oct 23 2007. ISSN 0743-7463. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000250228100059 >.

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, Jul 5 2006. ISSN 0002-7863. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:000238590000009 >.

PAL, P. et al. Synthesis of NaP zeolite at room temperature and short crystallization time by sonochemical method. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 20, n. 1, p. 314-321, Jan 2013. ISSN 1350-4177. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:000311130000044 >.

PAPAIIOANNOU, D. et al. The role of natural and synthetic zeolites as feed additives on the prevention and/or the treatment of certain farm animal diseases: A review. **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 84, n. 1-3, p. 161-170, Sep 15 2005. ISSN 1387-1811. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:000232036300019 >.

PAPAIIOANNOU, D. S. et al. Effect of in-feed inclusion of a natural zeolite (clinoptilolite) on certain vitamin, macro and trace element concentrations in the blood, liver and kidney tissues of sows. **Research in Veterinary Science**, v. 72, n. 1, p. 61-68, Feb 2002. ISSN 0034-5288. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:000174165600010 >.

PARREIRA, J. G.; SOLDÁ, S.; RASSLAN, S. **Controle de danos: uma opção tática no tratamento dos traumatizados com hemorragia grave**. Brasil: Arq Gastroenterol. 39: 188-197 p. 2002.

PAVELIC, K.; HADZIJA, M. Medical application of zeolites. In: (Ed.). **Handbook of Zeolites Science and technology**. New York: Marcel Dekker, Inc., 2003. cap. 24,

PECHAR, F.; RYKL, D. THERMAL-DECOMPOSITION OF NATURAL MORDENITE. **Chemical Papers-Chemicke Zvesti**, v. 41, n. 3, p. 351-362, 1987 1987. ISSN 0366-6352. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:A1987J903100006 >.

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, Dec 2007. ISSN 0300-8932. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:000251681500001 >.

PUSATERI, A. E. et al. Application of a granular mineral-based hemostatic agent (QuikClot) to reduce blood loss after grade V liver injury in swine. **Journal of Trauma-Injury Infection and Critical Care**, v. 57, n. 3, p. 555-562, Sep 2004. ISSN 0022-5282. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:000224303800018 >.

_____. 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, Mar 2006. ISSN 1079-6061. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:000236374900047 >.

RIBEIRO, D. D. **ASSOCIAÇÃO DO DIAGNÓSTICO ETIOLÓGICO, CLASSIFICAÇÃO DE CHILD, PRESENÇA OU NÃO DE ASCITE E COAGULOGAMA COM O PERFIL TROMBOELASTOGRÁFICO**

PRÉ-OPERATÓRIO DE PACIENTES SUBMETIDOS A TRANSPLANTE HEPÁTICO. 2006. 103 (mestrado). gastroenterologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Brasil.

RIDDEL JR, J. P. et al. **Theories of Blood Coagulation.** Journal of Pediatric Oncology Nursing. 24: 123-131 p. 2007.

RODRÍGUES-FUENTES, G. et al. **Enterex: Anti-diarrheic drug based on purified natural clinoptilolite.** Zeolites. New York: Elsevier Science Inc.: 441-448 p. 1997.

SANTOS, P. C. J. L. **Hematologia** Brasil: ROCA, 2013. 450.

SHARMA, P. et al. Knobby surfaced, mesoporous, single-phase GIS-NaP1 zeolite microsphere synthesis and characterization for H-2 gas adsorption. **Journal of Materials Chemistry A**, v. 1, n. 7, p. 2602-2612, 2013. ISSN 2050-7488. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000314643100033 >.

SNOW, C.; OLSON, C.; MELCER, T. **The Navy Medical Technology Watch: Hemostatic Dressing Products for the Battlefield.** San Diego, California: Naval Health Research Center: 1-25 p. 2006.

SUIB, S. L. Handbook of zeolite science and technology. **Science**, v. 302, n. 5649, p. 1335-1336, Nov 2003. ISSN 0036-8075. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000186683500030 >.

TANGKAWANIT, S.; RANGSRIWATANANON, K. **SYNTHESIS AND KINETIC STUDY OF ZEOLITE FROM LOPBURI PERLITE.** Suranaree J. Sci. Technol. Thailand. 1: 7 p. 2005.

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, Sep 2012. ISSN 1513-1874. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000312521100011 >.

TRABATTONI, D.; GATTO, P.; BARTORELLI, A. L. A new kaolin-based hemostatic bandage use after coronary diagnostic and interventional procedures. **International Journal of Cardiology**, v. 156, n. 1, p. 53-54, Apr 5 2012. ISSN 0167-5273. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000301132900021 >.

TREACY, M. M. J.; HIGGINS, J. B. **Colletion of Simulated XRD Powder Patterns for Zeolites.** 4^o. Elsevier, 2001.

VASCONCELLOS, A. **Sínteses e caracterização de novos catalisadores zeolíticos e sua utilização como suportes inorgânicos para imobilização de lipase 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" - UNESP

WITTAYAKUN, J.; KHEMTHONG, P.; PRAYOONPOKARACH, S. Synthesis and characterization of zeolite NaY from rice husk silica. **Korean Journal of Chemical Engineering**, v. 25, n. 4, p. 861-864, Jul 2008. ISSN 0256-1115. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000258549600040 >.

WRIGHT, J. K. 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, Aug 2004. ISSN 0022-5282. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000224303700004 >.