

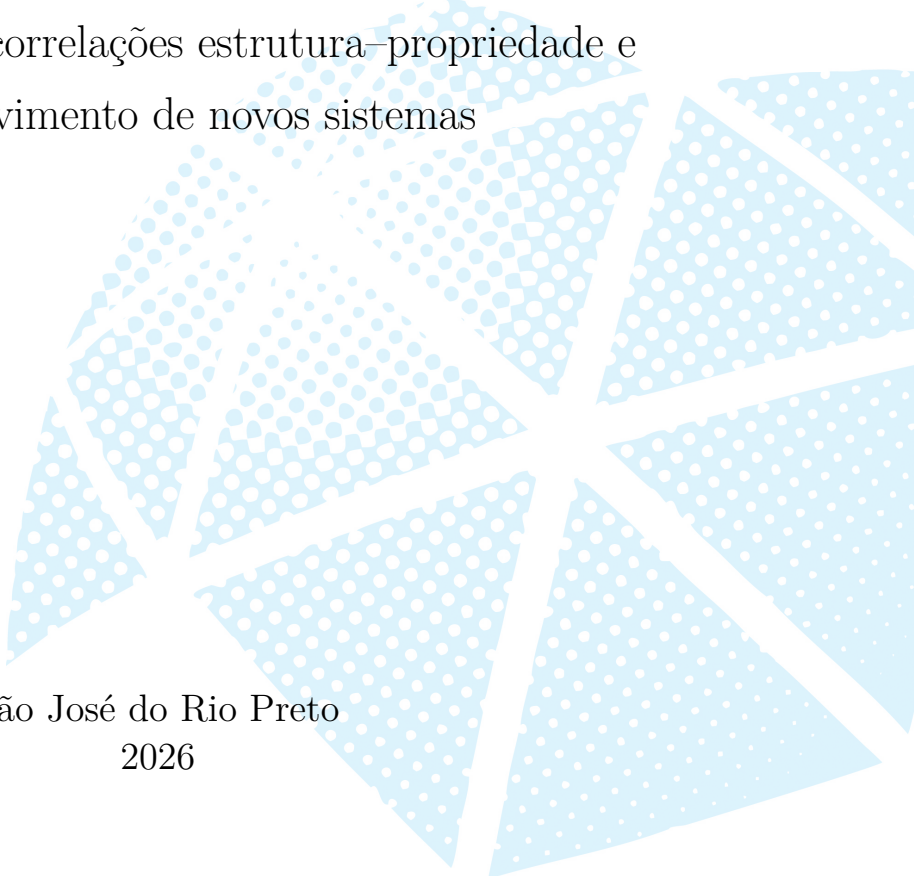
UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas – Campus de São José do Rio Preto

Guilherme de Paula Guarnieri

**Materiais hemostáticos e antimicrobianos para
aplicações biomédicas**

Estado-da-Arte, correlações estrutura–propriedade e
desenvolvimento de novos sistemas

São José do Rio Preto
2026



Guilherme de Paula Guarnieri

Materiais hemostáticos e antimicrobianos para aplicações biomédicas

Estado-da-Arte, correlações estrutura–propriedade e desenvolvimento de novos sistemas

Tese apresentada à Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto, para obtenção do título de doutor em Biofísica Molecular.

Área de Concentração: Física Biomolecular

Orientador: Prof. Dr. José Geraldo Nery

São José do Rio Preto

2026

D419m de Paula Guarnieri, Guilherme

Materiais hemostáticos e antimicrobianos para aplicações biomédicas : Estado-da-Arte, correlações estrutura-propriedade e desenvolvimento de novos sistemas / Guilherme de Paula Guarnieri.

-- São José do Rio Preto, 2026

163 p. : il., tabs.

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

Orientador: José Geraldo Nery

1. Silicatos. 2. Propriedades físicas e químicas. 3. Hemostáticos. 4. Anti-infecciosos. 5. Economia circular. I. Título.

IMPACTO POTENCIAL DESTA PESQUISA

Esta pesquisa contribui para o desenvolvimento de materiais de baixo custo e com potencial para auxiliar no controle de sangramentos e infecções. O emprego de resíduos como matéria-prima também representa uma alternativa mais sustentável, ampliando as perspectivas de futuras aplicações na saúde, inclusive no sistema público.

POTENTIAL IMPACT OF THIS RESEARCH

This research contributes to the development of low-cost materials with the potential to assist in the control of bleeding and infections. The use of waste materials as raw materials also represents a more sustainable alternative, expanding the prospects for future healthcare applications, including in the public healthcare system.

Guilherme de Paula Guarnieri

Materiais hemostáticos e antimicrobianos para aplicações biomédicas

Estado-da-Arte, correlações estrutura–propriedade e desenvolvimento de novos sistemas

Tese apresentada à Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto, para obtenção do título de doutor em Biofísica Molecular.

Área de Concentração: Física Biomolecular

Data da defesa: 22/07/2026

Banca Examinadora:

Prof. Dr. José Geraldo Nery

Universidade Estadual Paulista (UNESP) – São José do Rio Preto, Brasil

Profa. Dra. Andrea Simone Stucchi de Camargo Alvarez Bernardez

Bundesanstalt für Materialforschung und -prüfung (BAM) – Berlim, Alemanha

Profa. Dra. Iêda Aparecida Pastre Fertonani

Universidade Estadual Paulista (UNESP) – São José do Rio Preto, Brasil

Prof. Dr. Nader de Sousa Amadeu

Bundesanstalt für Materialforschung und -prüfung (BAM) – Berlim, Alemanha

Prof. Dr. Valmor Roberto Mastelaro

Universidade de São Paulo – São Carlos, Brasil

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho aos meus pais, Rogério e Vanessa,
e ao meu irmão, Eduardo.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente aos meus pais, Rogério Guarnieri e Vanessa Aparecida de Paula Sanches Guarnieri, e ao meu irmão, Eduardo de Paula Guarnieri, por toda a força, incentivo, apoio e suporte.

Ao Prof. Dr. José Geraldo Nery pela orientação, pela amizade, pela confiança e pelas inúmeras oportunidades proporcionadas.

Aos meus companheiros de laboratório Guilherme Molinari Sacco, Vagner Roberto Magri, José Eduardo Ferraz Souza, Vinícius Litrenta Medeiros, Erick Paiva Cancelli, Oscar Antônio Niño Santisteban, Rui Giorgi Filho e Mian Abdul Ali pelas vivências e discussões científicas.

Ao Dr. Nader de Sousa Amadeu pela gentileza de me receber em seu grupo de pesquisa (*SS NMR Laboratory*) no *Bundesanstalt für Materialforschung und -prüfung* (BAM, Berlim, Alemanha) durante meu período de estágio no exterior.

À Profa. Dra. Andrea Simone Stucchi de Camargo Alvarez Bernardez pela gentileza de me receber em seu grupo de pesquisa (*Division 5.6 – Glasses*) no *Bundesanstalt für Materialforschung und -prüfung* (BAM, Berlim, Alemanha) durante meu período de estágio no exterior.

À profa. Dra. Margarete Teresa Gottardo de Almeida por disponibilizar a infraestrutura do Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (FAMERP), possibilitando a realização dos ensaios microbiológicos conduzidos durante esse projeto de doutorado. Também agradeço ao seu aluno de doutorado Arthur Lima Barbosa, pela sua indispensável ajuda na execução dos experimentos.

A todos os docentes e servidores do Departamento de Física, especialmente os técnicos Antônio Aparecido Barbosa e Bruno Rogério Fernandes, e a secretária Valéria Adriana Lopes Sedenho, por todo o suporte.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) pela bolsa de estágio no exterior atribuída através do Programa de Doutorado Sanduíche no Exterior (PDSE), que possibilitou minha estadia em Berlim (Alemanha) por 7 meses para realização de parte de meu doutorado (Processo: 88881.128015/2025-01).

Ao Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas (UNESP – Ibilce) por fornecer um ambiente propício ao desenvolvimento intelectual e científico.

Finalmente, agradeço a Deus, por razões que transcendem o escopo desta tese.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior — Brasil (CAPES) — Código de Financiamento 001, Processo: 88887.661419/2022-00.

“Posso conviver com a dúvida, a incerteza e o desconhecimento. Acho muito mais interessante viver sem saber do que ter respostas que talvez estejam erradas.”

— Richard P. Feynman

Resumo

Esta tese teve como objetivo desenvolver materiais silicatos para aplicações biomédicas, com foco na obtenção de agentes hemostáticos e materiais multifuncionais. A partir de duas abordagens distintas, porém complementares, foram investigadas estratégias para controlar as propriedades físico-químicas desses materiais e relacioná-las ao seu desempenho biológico. O primeiro estudo explora o potencial hemostático de silicatos de cálcio sintetizados a partir de resíduos de biomassa inorgânica rica em Ca^{2+} (cascas de ovos de galinha). A utilização de agentes direcionadores de estrutura (SDAs) orgânicos, especificamente aminas quaternárias ($\text{TEA} \cdot \text{OH}$, $\text{TPA} \cdot \text{OH}$ e $\text{TBA} \cdot \text{OH}$), demonstrou ser uma estratégia eficiente para controlar a formação das fases cristalinas e modular as propriedades texturais dos materiais obtidos, em especial a área superficial específica. No segundo estudo, a modificação de zeólitas do tipo Faujasita por meio de troca iônica com diferentes metais (Ag^+ , Ba^{2+} , Ca^{2+} e Mg^{2+}) permitiu investigar a influência da composição química sobre suas propriedades hemostáticas e antimicrobianas. Os resultados demonstram que a incorporação de espécies metálicas impacta não apenas a atividade antimicrobiana, mas também a ação hemostática dos materiais, evidenciando que a adoção de um desenho experimental integrado é fundamental em estudos dessa natureza, uma vez que modificações químicas podem afetar simultaneamente diferentes funcionalidades de interesse, especialmente no contexto de materiais multifuncionais. De forma geral, os resultados obtidos nos dois estudos reforçam a ideia de que materiais silicatos podem ter suas propriedades estruturais, texturais e químicas ajustadas por diferentes estratégias de síntese e modificação, permitindo direcionar seu comportamento para aplicações biomédicas específicas. A combinação entre rotas sustentáveis de obtenção, como o uso de biomassa inorgânica, e estratégias de funcionalização química amplia as possibilidades futuras de desenvolvimento de materiais multifuncionais voltados ao controle de hemorragias e infecções.

Palavras-chave: Silicatos; Propriedades físicas e químicas; Hemostáticos; Anti-infecciosos; Economia circular.

Abstract

This thesis aimed to develop silicate materials for biomedical applications, with a focus on hemostatic agents and multifunctional materials. Two distinct yet complementary approaches were employed to investigate strategies for controlling the physicochemical properties of these materials and correlating them with their biological performance. The first study explores the hemostatic potential of calcium silicates synthesized from Ca^{2+} -rich inorganic biomass waste (chicken eggshells). The use of organic structure-directing agents (SDAs), specifically quaternary ammonium compounds ($\text{TEA} \cdot \text{OH}$, $\text{TPA} \cdot \text{OH}$, and $\text{TBA} \cdot \text{OH}$), proved to be an effective strategy for controlling crystal phase formation and tailoring the textural properties of the resulting materials, particularly their specific surface area. In the second study, Faujasite-type zeolites were modified through ion exchange with different metal species (Ag^+ , Ba^{2+} , Ca^{2+} , and Mg^{2+}) to investigate the influence of chemical composition on their hemostatic and antimicrobial properties. The results demonstrate that the incorporation of metal species affects not only the antimicrobial activity but also the hemostatic performance of the materials, highlighting the importance of adopting an integrated experimental design in studies of this nature, as chemical modifications may simultaneously influence multiple functional properties, particularly in the development of multifunctional materials. Overall, the findings of the two studies reinforce the concept that the structural, textural, and chemical properties of silicate materials can be tailored through different synthesis and modification strategies, enabling the design of materials for specific biomedical applications. The combination of sustainable synthesis routes, such as the use of inorganic biomass, with chemical functionalization strategies expands future opportunities for the development of multifunctional materials for the control of hemorrhage and infection.

Keywords: Silicates; Physical and chemical properties; Hemostatics; Anti-infective agents; Circular economy.

Lista de Figuras

Figura 2.1	Principais causas de morte associadas a complicações pós-parto, complicações no trato gastrointestinal e em decorrência de traumas físicos.	24
Figura 2.2	Representação esquemática em corte transversal da parede de um vaso sanguíneo.	28
Figura 2.3	Esquema geral da hemostasia secundária com base no modelo de cascata de coagulação.	29
Figura 2.4	Exemplos de agentes hemostáticos comerciais baseados em diferentes classes de materiais: zeólitas e argilas (QuikClot), quitosana (HemCon) e gelatina (GelFoam).	30
Figura 2.5	Classes de materiais hemostáticos e alguns de seus principais representantes.	31
Figura 2.6	Estrutura química dos monômeros da quitina e da quitosana.	32
Figura 2.7	Estrutura química do monômero do álcool polivinílico (PVA).	33
Figura 2.8	Representação esquemática do modelo de reticulação “egg-box” entre moléculas de pectina e íons divalentes de cálcio (Ca^{2+}).	34
Figura 2.9	Representação do framework da zeólita LTA, principal componente da formulação original do agente hemostático comercial QuikClot.	35
Figura 2.10	Ilustração esquemática da proteína corona. Circulo menor corresponde à “Hard Corona” e circulo maior corresponde à “Soft Corona”.	36
Figura 2.11	Estrutura da argila montmorilonita. A montmorilonita possui estrutura lamelar, sendo cada camada constituída por duas folhas de sílica em coordenação tetraédrica, e uma folha central de alumina em coordenação octaédrica. Água e cátions de superfície penetram entre camadas adjacentes, causando a expansão do material.	37
Figura 2.12	Representação esquemática do tetraedro $[\text{SiO}_4]^{4-}$, unidade estrutural fundamental dos silicatos.	38
Figura 2.13	Unidade estrutural $[\text{Si}_2\text{O}_7]^{6-}$ característica dos sorossilicatos, formada pelo compartilhamento de um átomo de oxigênio entre dois tetraedros adjacentes.	39
Figura 2.14	Exemplo de arranjo cíclico característico dos ciclossilicatos. Os círculos azuis representam átomos de silício e os círculos vermelhos representam átomos de oxigênio.	39
Figura 2.15	Arranjos em cadeia observados em inossilicatos, resultantes da polimerização de tetraedros por compartilhamento de átomos de oxigênio. Os círculos azuis representam átomos de silício e os círculos vermelhos representam átomos de oxigênio.	40

Figura 2.16	Exemplo de arranjo lamelar característico dos flossilicatos, resultante da polimerização bidimensional dos tetraedros estruturais. Os círculos azuis representam átomos de silício e os círculos vermelhos representam átomos de oxigênio.	41
Figura 2.17	Unidades secundárias de construção (SBUs) que compõem estruturas zeolíticas.	42
Figura 2.18	Unidades estruturais resultantes de combinações entre as SBUs e estruturas zeolíticas formadas.	43
Figura 2.19	Representação esquemática de troca iônica em zeólita Faujasita.	44
Figura 2.20	Representação das topologias zeolíticas frequentemente agrupadas sob a denominação <i>Big Five</i> devido à sua ampla utilização tecnológica e comercial. A topologia BEC é apresentada como modelo estrutural relacionado à zeólita Beta.	45
Figura 2.21	Átomo de alumínio em coordenação octaédrica, como observado em minerais argilosos.....	46
Figura 2.22	Estrutura lamelar de minerais argilosos <i>TO</i> (1:1) e <i>TOT</i> (2:1).....	46
Figura 2.23	Estrutura cristalográfica da caulinita, evidenciando seu caráter lamelar. Os tetraedros de silício estão representados em azul, e os átomos de alumínio em coordenação octaédrica em azul claro. Os átomos de hidrogênio estão representados em amarelo, e as pontes de hidrogênio em linhas pontilhadas.	47
Figura 2.24	Etapas de um típico processo de síntese hidrotermal via química sol-gel.	49
Figura 2.25	Síntese do material zeolítico SAPO-37 (FAU) utilizando a estratégia de <i>co-templating</i> : moléculas de TPA^+ direcionam a formação das <i>supercages</i> , enquanto moléculas de TMA^+ direcionam a formação das gaiolas sodalita.	51
Figura 2.26	Etapas do processo de cicatrização.....	55
Figura 2.27	Representação simplificada das fases do processo de cicatrização.....	56
Figura 2.28	Tabela periódica destacando os metais presentes em compostos que foram submetidos ao CO-ADD até 2020.	60
Figura 2.29	Mecanismos de ação antimicrobiana de nanopartículas de cobre.	61
Figura 3.1	General scheme of the coagulation cascade.....	70
Figura 3.2	X-ray diffraction (XRD) pattern of CaZ-4, compared with the simulated diffractogram of natural calcium-silicate rhodesite, based on the JCPDS database. The y-axis represents intensity in arbitrary units....	76

Figura 3.3	Electron micrographs of CaZ-4. (A) Scanning electron microscopy (SEM) image; (B) transmission electron microscopy (TEM) image; (C) selected area electron diffraction (SAED) pattern corresponding to the region marked with a red circle in (B).	77
Figura 3.4	Solid-state NMR spectra of CaZ-4: (A) cross-polarization magic angle spinning ($^1\text{H}-^{29}\text{Si}$ CPMAS) spectrum; (B) single-pulse excitation magic angle spinning (^{29}Si SPEMAS) spectrum with peak deconvolution.	78
Figura 3.5	FTIR spectrum of CaZ-4, with magnified view of the $1800 - 400\text{ cm}^{-1}$ region highlighting key vibrational bands.	79
Figura 3.6	Nitrogen adsorption-desorption isotherm of CaZ-4.	80
Figura 3.7	Thermogravimetric (TG, blue line) and derivative thermogravimetric (DTG, red dotted line) curves of CaZ-4.	81
Figura 3.8	Zeta potential (mV) of CaZ-1, CaZ-2, CaZ-3, and CaZ-4 as a function of pH.	83
Figura 3.9	Thromboelastography (TEG® 5000, Haemonetics, Niles, IL, USA) curves of human blood after contact with QuikClot and calcium silicate materials CaZ-1, CaZ-2, CaZ-3, and CaZ-4. The control curve corresponds to human blood without exposure to any hemostatic agent.	85
Figura 4.1	Powder X-ray diffraction (XRD) patterns of nanocrystalline Faujasite in the sodium form (NanoFAU) and its ion-exchanged derivatives (Mg^{2+} , Ca^{2+} , Ag^{+} , and Ba^{2+}).	101
Figura 4.2	Fourier-transform infrared (FT-IR) spectra of nanocrystalline Faujasite in the sodium form (NanoFAU) and its ion-exchanged derivatives (Mg^{2+} , Ca^{2+} , Ag^{+} , and Ba^{2+}).	103
Figura 4.3	SEM (a,b) and HRTEM (c,d) images of nanocrystalline Faujasite (NanoFAU). SEM reveals aggregated assemblies composed of primary nanocrystals. HRTEM shows well-resolved lattice fringes ($d \approx 0.82\text{ nm}$) characteristic of the FAU framework, while dark-field TEM indicates representative particle size of approximately 52 nm , corroborating the data reported by Zhan <i>et al.</i> ¹ when first describing the synthetic route adopted in this work.	104
Figura 4.4	Elemental composition (atomic %) of nanocrystalline NaX and its ion-exchanged derivatives, as determined by energy-dispersive X-ray spectroscopy (EDS) within the analyzed region.	106
Figura 4.5	Solid-state ^{29}Si magic-angle spinning (MAS) NMR spectra of nanocrystalline Faujasite (NanoFAU) in the sodium form and its ion-exchanged derivatives (Ca^{2+} , Mg^{2+} , Ba^{2+} , and Ag^{+}).	108

Figura 4.6	Zeta potential profiles of nanocrystalline Faujasite in the sodium form (NanoFAU) and its ion-exchanged derivatives (Ca^{2+} , Mg^{2+} , Ba^{+2} , and Ag^{+}) as a function of pH, measured in CaCl_2 solution, highlighting their respective isoelectric points.....	109
Figura 4.7	Thromboelastography (TEG) curves of citrated whole blood before zeolite addition (control) and after treatment with nanocrystalline Faujasite (NanoFAU) and its ion-exchanged derivatives (NanoFAU-Ca, NanoFAU-Mg, NanoFAU-Ba, and NanoFAU-Ag).....	113
Figura 4.8	Representative inhibition halos observed in agar diffusion assays using nanometric zeolite suspensions (4 mg mL^{-1}). (a) Antifungal activity against <i>Candida albicans</i> : NanoFAU-Zn (no inhibition), NanoFAU-Mg (no inhibition), NanoFAU-Ag (inhibition halo: 19.8 mm), NanoFAU-Cu (no inhibition), and growth control (CT). (b) Antibacterial activity against <i>Staphylococcus aureus</i> : NanoFAU-Zn (no inhibition), NanoFAU-Mg (no inhibition), NanoFAU-Ag (inhibition halo: 25 mm), NanoFAU-Cu (no inhibition), and growth control (CT).....	115
Figura 4.9	Antibacterial activity of zeolite-based materials against <i>Staphylococcus aureus</i> evaluated by the agar diffusion method. (a) At 0.4 mg mL^{-1} : NanoFAU (no inhibition), NanoFAU-Ca (no inhibition), NanoFAU-Ag (inhibition halo: 23 mm), and NanoFAU-Ca + NanoFAU-Ag (inhibition halo: 24 mm). (b) At 0.8 mg mL^{-1} : NanoFAU (no inhibition), NanoFAU-Ca (no inhibition), NanoFAU-Ag (inhibition halo: 22 mm), and NanoFAU-Ca + NanoFAU-Ag (inhibition halo: 22 mm).	116
Figura 4.10	Cell viability (%) of HaCaT cells after 24 h exposure to silver-exchanged zeolite at concentrations ranging from 1000 to $3.9 \mu\text{g mL}^{-1}$. Data represent mean $\pm$ SD ($n = 3$). Statistical analysis was performed using one-way ANOVA followed by Dunnett's <i>post hoc</i> test. ns: not significant ($p > 0.05$). The dashed line represents the 70% viability threshold according to ISO 10993-5.....	117
Figura B3.1	XRD patterns of CaZ-1, CaZ-2, CaZ-3, CaZ-4 and their comparison to the simulated diffractogram of the natural calcium-silicate rhodesite, according to JCPDS database. y-axis corresponds to intensity in arbitrary units.	154
Figura B3.2	SEM images of CaZ-1, CaZ-2, CaZ-3 and CaZ-4 with 5000x magnification.	155
Figura B3.3	Full FTIR spectra obtained for CaZ-1, CaZ-2, CaZ-3, CaZ-4.....	155
Figura B3.4	Amplification of the FTIR spectra obtained for CaZ-1, CaZ-2, CaZ-3, CaZ-4 in the region $1800 - 400 \text{ cm}^{-1}$	156
Figura B3.5	N_2 sorption isotherm for CaZ-1.	156

Figura B3.6	N ₂ sorption isotherm for CaZ-2.	157
Figura B3.7	N ₂ sorption isotherm for CaZ-3.	157
Figura B3.8	TG (blue line) and DTG (red dotted line) curves for CaZ-1.	158
Figura B3.9	TG (blue line) and DTG (red dotted line) curves for CaZ-2.	158
Figura B3.10	TG (blue line) and DTG (red dotted line) curves for CaZ-3.	159
Figura B3.11	DSC curves for CaZ-1.	159
Figura B3.12	DSC curves for CaZ-2.	160
Figura B3.13	DSC curves for CaZ-3.	160
Figura B3.14	DSC curves for CaZ-4.	161
Figura B3.15	Phase contrast microscopy images (20x magnification) of whole blood: A) Control (pure blood); B) Blood after addition of CaZ-4.	161
Figura C4.1	Atomic Force Microscopy image of NanoFAU.	163
Figura C4.2	Adsorption and desorption isotherms of nanometric Faujasite zeolite (NanoFAU).	163
Figura C4.3	Pore size distribution curve of the NanoFAU material.	164
Figura C4.4	Images of whole blood before the addition of zeolites obtained by phase-contrast microscopy.	164
Figura C4.5	Images of whole blood after the addition of NanoFAU zeolites obtained by phase-contrast microscopy.	165
Figura C4.6	Images of whole blood after the addition of NanoFAU-Ca zeolites obtained by phase-contrast microscopy.	165

Lista de Tabelas

Tabela 2.1	Fatores de coagulação, seus nomes alternativos e descrições, para fins de clareza.	27
Tabela 3.1	Coagulation data obtained for recalcification time, prothrombin time (PT) and activated partial thromboplastin time (aPTT). The Control corresponds to blood plasma incubated with Tyrode buffer.	84
Tabela 3.2	Clotting kinetic parameters (R, K, α , and MA) for human blood using the hemostatic agents QuikClot and the synthesized calcium–silicate materials. The control corresponds to human blood not exposed to the hemostatic agents.	85
Tabela 3.3	Comparison of thromboelastographic parameters reported in the literature for inorganic hemostatic agents.	85
Tabela 4.1	Compositional data extracted from the EDS spectra. The oxide formulas were normalized to Al_2O_3 . Exchanged Na^+ was determined from the normalized oxide formulas and represents the proportion of Na^+ ions removed in the ion-exchanged samples relative to the original NanoFAU.	107
Tabela 4.2	Thromboelastographic (TEG) parameters of citrated whole blood in the absence of zeolite (control) and after treatment with nanocrystalline Faujasite (NanoFAU) and its ion-exchanged derivatives (NanoFAU-Ca, NanoFAU-Mg, NanoFAU-Ba, and NanoFAU-Ag). Reaction time (R), clot formation time (K), α -angle, and maximum amplitude (MA) were extracted from TEG tracings and are reported as mean $\pm$ standard deviation ($n = 3$).	112
Tabela 4.3	Antimicrobial activity of NanoFAU and its ion-exchanged derivatives (NanoFAU-Ag, NanoFAU-Cu, and NanoFAU-Mg) at concentrations of 0.1 g, 0.01 g, and 0.001 g against <i>Staphylococcus aureus</i> and <i>Candida albicans</i>	114
Tabela 4.4	Inhibitory concentrations of zeolites against <i>S. aureus</i> and <i>C. albicans</i> observed in the microdilution antimicrobial susceptibility test.	114
Tabela B3.1	Textural properties of the synthesized calcium silicates.	162
Tabela B3.2	Mass variation ($\Delta m_{25-600^\circ\text{C}}$ (%) and $\Delta m_{600-900^\circ\text{C}}$ (% CO_2), amount of CaCO_3 (%) present, onset temperature ($T_{\text{onset-TG}}$ ($^\circ\text{C}$)), and peak temperature ($T_{\text{peak-DTG}}$ ($^\circ\text{C}$)) obtained from the TG and DTG thermal decomposition curves for all the synthesized materials.	162
Tabela B3.3	Detailed Zeta Potential data for all materials in the analyzed pH range.	162

Lista de Abreviaturas e Siglas

aPTT	<i>Activated partial thromboplastin time</i>
BET	Modelo de Brunauer–Emmett–Teller para fisissorção em multicamadas
BJH	Modelo de Barrett–Joyner–Halenda para distribuição de tamanho de poros
CAAE	Certificado de Apresentação de Apreciação Ética
CO-ADD	<i>Community for Open Antimicrobial Drug Discovery</i>
DSC	<i>Differential Scanning Calorimetry</i>
DTG	<i>Differential Thermogravimetry</i>
EDX	<i>Energy-Dispersive X-Ray Spectroscopy</i>
FRX	Espectrometria de Fluorescência de Raios-X
FTIR	<i>Fourier Transform Infrared Spectroscopy</i>
H–K	Modelo de Horváth–Kawazoe para distribuição de tamanho de microporos
ICP-OES	<i>Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectroscopy</i>
ICSD	<i>Inorganic Crystal Structure Database</i>
IUPAC	<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>
IZA	<i>International Zeolite Association</i>
JCPDS	<i>Joint Committee on Powder Diffraction Standards</i>
MSN	<i>Mesoporous Silica Nanoparticles</i>
MSS	<i>Mesoporous Silica Spheres</i>
NMR	<i>Nuclear Magnetic Resonance</i>
OSDA	<i>Organic Structure Directing Agent</i>
PT	<i>Prothrombin time</i>
ROS	<i>Reactive oxygen species</i>
SDA	<i>Structure Directing Agent</i>
SDS	<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>
SEM	<i>Scanning Electron Microscopy</i>

TEG	Tromboelastografia
TEM	<i>Transmission Electron Microscopy</i>
TG	Termogravimetria
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Fator</i>
XRD	<i>X-Ray Diffraction</i>

Lista de Unidades e Símbolos

°	Grau
°C	Graus Celsius
A	Ampere
Å	Angstrom
C	Coulomb
eV	Elétron-volt
g	Grama
h	Hora
K	Kelvin
L	Litro
m	Metro
µmHg	Micrometro de mercúrio
mmHg	Milímetros de mercúrio
min	Minuto
M	Molar
N	Newton
s	Segundo
V	Volt
W	Watt
2θ	Ângulo de espalhamento em difração
α	Ângulo entre a reta tangente e o eixo de simetria (TEG)
β	Ângulo entre os eixos cristalográficos a e c
Δm	Variação de massa
ϕ_{pores}	Diâmetro médio de poros
ζ	Potencial zeta

a	Parâmetro de rede ao longo do eixo cristalográfico a
b	Parâmetro de rede ao longo do eixo cristalográfico b
c	Parâmetro de rede ao longo do eixo cristalográfico c
D_{max}	Diâmetro de poros com maior representatividade volumétrica
K	Tempo necessário para a amplitude atingir 20 mm (TEG)
MA	Amplitude máxima da curva de tromboelastografia (TEG)
P	Pressão de equilíbrio do adsorvato na fase gasosa
P_0	Pressão de saturação do adsorvato na fase gasosa
Q^n	Unidade estrutural de SiO_4 com n oxigênios em ponte ($0 \leq n \leq 4$)
R	Tempo até o início da formação do coágulo (TEG)
S_{BET}	Área superficial específica determinada pelo método BET
V_{pores}	Volume total de poros
$\text{TBA} \cdot \text{OH}$	Hidróxido de tetrabutilamônio
$\text{TEA} \cdot \text{OH}$	Hidróxido de tetraetilamônio
$\text{TPA} \cdot \text{OH}$	Hidróxido de tetrapropilamônio

Sumário

1	Introdução Geral	21
2	Fundamentação Teórica	23
2.1	Hemorragia.....	24
2.2	Hemostasia.....	25
2.2.1	Cascata de coagulação	26
2.3	Agentes Hemostáticos	30
2.3.1	Agentes hemostáticos orgânicos	31
2.3.2	Agentes hemostáticos inorgânicos	34
2.4	Silicatos	38
2.4.1	Zeólitas	41
2.4.2	Argilas	45
2.5	Síntese de silicatos.....	48
2.5.1	Agentes direcionadores de estrutura.....	50
2.5.2	Emprego de biomassa na síntese de silicatos	53
2.6	Cicatrização: Processos pós-hemostasia.....	55
2.7	Controle de infecções	56
2.7.1	Metais	58
2.8	Materiais multifuncionais	62
3	Artigo I: De biomassa a materiais hemostáticos	65
3.1	Introduction.....	68
3.2	Experimental Section.....	71
3.3	Results and Discussion	75
3.4	Conclusions	86
4	Artigo II: Hemostasia e ação antimicrobiana	88
4.1	Introduction.....	91
4.2	Experimental Section.....	93
4.3	Results and Discussion	100
4.4	Conclusions	117
5	Conclusões Gerais e Perspectivas Futuras	119
	Referências	121
	Apêndice A: Trabalhos publicados em coautoria	149
	Apêndice B: Material Suplementar do Artigo I	154

Apêndice C: Material Suplementar do Artigo II	163
Dados Curriculares	166

Capítulo 1

Introdução Geral

Hemorragias constituem um importante problema de saúde pública, figurando entre as principais causas de mortalidade associadas a traumas, acidentes e procedimentos médicos. Embora existam mecanismos fisiológicos capazes de promover a interrupção do sangramento por meio do processo conhecido como hemostasia, em casos extremos ou em pacientes com condições clínicas subjacentes, perdas sanguíneas severas podem exceder a capacidade natural de resposta do organismo, demandando intervenção médica. Como consequência, o desenvolvimento de materiais destinados ao controle rápido e eficiente de hemorragias tem se consolidado como uma importante área de pesquisa, impulsionada tanto pela demanda clínica quanto pelo avanço das técnicas de síntese e caracterização de materiais, que permitem a modulação de propriedades físico-químicas como composição, área superficial, porosidade e carga superficial.

Historicamente, os agentes hemostáticos evoluíram de materiais passivos, cuja ação se limitava a absorção de fluidos e obstrução mecânica, para sistemas capazes de interagir diretamente com os mecanismos biológicos envolvidos na coagulação sanguínea. Entre esses materiais, destacam-se aqueles à base de sílica (SiO_2), conhecidos de forma genérica como silicatos, que desde a virada do século XXI figuram entre os sistemas mais investigados para aplicações hemostáticas devido à sua capacidade de adsorção e de promover a concentração local de plaquetas e fatores de coagulação. Além de sua eficiência e versatilidade, silício e oxigênio representam dois dos elementos mais abundantes da crosta terrestre, o que é particularmente relevante no contexto de biomateriais, em que o custo de produção pode constituir um fator determinante para sua ampla utilização.

Paralelamente, a busca por processos mais sustentáveis tem impulsionado o aproveitamento de resíduos como matérias-primas para a síntese de materiais de alto valor agregado. No caso de materiais destinados ao controle de hemorragias, resíduos ricos em cálcio despertam interesse particular devido ao papel fundamental desempenhado por esse elemento na cascata de coagulação. Assim, a utilização de resíduos representa não apenas uma alternativa ambientalmente favorável, mas também uma oportunidade para a obtenção de materiais com propriedades potencialmente relevantes para aplicações hemostáticas.

Entretanto, é preciso salientar que a hemostasia representa apenas a primeira etapa da resposta fisiológica desencadeada após uma lesão. A progressão adequada do processo de cicatrização depende de uma série de eventos subsequentes, incluindo o controle

de infecções, fundamental para a manutenção de um ambiente favorável à regeneração tecidual. Nesse contexto, a crescente preocupação com a resistência microbiana tem estimulado a busca por alternativas aos antibióticos convencionais. Entre elas, destaca-se o emprego de metais com atividade antimicrobiana: ao contrário dos antibióticos, que normalmente atuam sobre alvos específicos, os metais podem afetar simultaneamente diferentes componentes celulares, dificultando o surgimento de microrganismos resistentes.

Além disso, processos biológicos raramente ocorrem de forma isolada. A contenção do sangramento, o controle de infecções e a regeneração tecidual constituem etapas interligadas da resposta do organismo a uma lesão. Essa interdependência conduz naturalmente ao conceito de multifuncionalidade, que tem se consolidado em diferentes áreas da ciência de materiais como uma estratégia para integrar múltiplas propriedades em um único sistema. No contexto biomédico, a combinação entre hemostasia e ação antimicrobiana surge como uma abordagem promissora para o desenvolvimento de materiais destinados ao tratamento emergencial de ferimentos.

Com essas considerações, esta tese de doutoramento está organizada em três capítulos principais. No Capítulo 2, apresentamos a fundamentação teórica necessária para contextualização do estudo desenvolvido, abordando conceitos relacionados a hemorragias, agentes hemostáticos, ciência de materiais, controle de infecções e materiais multifuncionais. Os Capítulos 3 e 4 apresentam dois artigos científicos publicados por nosso grupo de pesquisa durante a execução deste projeto. No Capítulo 3, exploramos a síntese de silicatos de cálcio a partir de resíduos de casca de ovos empregando diferentes agentes direcionadores de estrutura, discutindo a influência dessas moléculas sobre as fases cristalinas obtidas e suas propriedades hemostáticas. No Capítulo 4, investigamos a modulação química de zeólitas do tipo Faujasita por meio de troca iônica com metais de interesse biomédico, buscando integrar ação hemostática a ação antimicrobiana. Por fim, são apresentadas as conclusões gerais obtidas a partir dos resultados discutidos ao longo da tese.

Capítulo 2

Fundamentação Teórica

Como mencionado, o primeiro capítulo desta tese de doutoramento apresenta a fundamentação teórica necessária para contextualizar os temas abordados ao longo do trabalho. Inicialmente, serão apresentados os conceitos de hemorragia e sua relevância estatística como problema de saúde, bem como a hemostasia enquanto mecanismo fisiológico responsável pelo controle do sangramento. Em seguida, exploraremos algumas classes de materiais com potencial hemostático, suas propriedades físico-químicas e a forma com que essas características se relacionam com o desempenho biológico observado. Os materiais silicatos, especialmente zeólitas e argilas, serão discutidos com mais afinco, por estarem mais fortemente relacionados aos materiais explorados em nosso grupo de pesquisa e nos trabalhos expostos nos capítulos seguintes.

Considerando que processos biológicos raramente ocorrem de maneira isolada, discutiremos como a hemostasia se integra às etapas subsequentes da resposta fisiológica desencadeada por uma lesão. Será abordada a importância do controle de populações patogênicas no sítio lesionado para garantir a progressão adequada do processo de cicatrização e favorecer a regeneração tecidual. A partir dessa perspectiva, serão apresentados materiais com potencial antimicrobiano, seus principais mecanismos de ação, propriedades e aplicações atualmente exploradas na literatura.

Por fim, discutiremos brevemente como o conceito de multifuncionalidade tem se consolidado em ciência de materiais e como ele se aplica ao desenvolvimento de materiais para aplicações biomédicas. Será dada atenção especial à integração entre atividade hemostática e atividade antimicrobiana, às estratégias empregadas para sua obtenção e aos desafios e oportunidades que atualmente orientam a evolução desse campo de pesquisa. Assim, a discussão apresentada neste capítulo busca contextualizar os materiais, aplicações e conceitos que motivam os estudos descritos nos capítulos subsequentes.

Cabe ressaltar que os aspectos biológicos discutidos aqui não têm a pretensão de constituir uma revisão aprofundada dos mecanismos fisiológicos envolvidos. Em vez disso, eles serão apresentados de forma panorâmica, com o objetivo de contextualizar os desafios clínicos que motivam o desenvolvimento dos materiais abordados nesta tese.

2.1 Hemorragia

Quadros hemorrágicos são caracterizados pela perda de sangue em decorrência de lesões no sistema circulatório. Sua severidade está diretamente relacionada ao volume sanguíneo perdido, podendo variar desde sangramentos de baixa relevância clínica até condições potencialmente fatais. Embora possam ocorrer de forma aparentemente espontânea em decorrência de alterações fisiológicas subjacentes (e.g. hemofilia, hipertensão arterial e aneurismas), hemorragias geralmente estão associadas a uma causa primária identificável, como traumas e complicações cirúrgicas, frequentemente demandando intervenção médica imediata^{2, 3}. De fato, estima-se que cerca de 35% da mortalidade associada a traumas seja decorrente de hemorragias, sendo que entre 33 e 56% dessas mortes ocorrem antes do atendimento hospitalar⁴. É importante destacar, entretanto, que a relevância clínica das hemorragias não se restringe ao contexto traumático. Como ilustrado na Figura 2.1, complicações hemorrágicas figuram entre as principais causas de mortalidade em diferentes cenários clínicos, incluindo complicações pós-parto e doenças do trato gastrointestinal⁵.

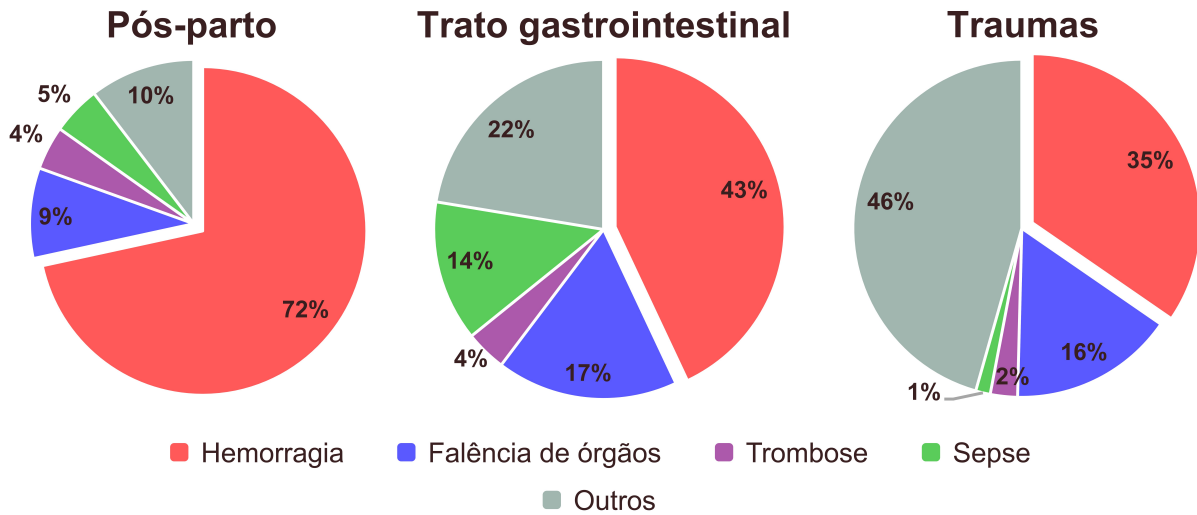


Figura 2.1: Principais causas de morte associadas a complicações pós-parto, complicações no trato gastrointestinal e em decorrência de traumas físicos. Fonte: Adaptação de Brenner et al.⁵

A perda de grande volume de sangue produz efeitos imediatos sobre diversos processos fisiológicos, uma vez que o sistema circulatório desempenha papel central na manutenção da homeostase. A entrega de sangue aos tecidos, por exemplo, depende de um regime adequado de perfusão. Para meios isotrópicos, esse regime pode ser descrito pela Lei de Darcy, que relaciona a permeabilidade do meio (k), a viscosidade dinâmica do fluido (μ) e o gradiente de pressão ($\vec{\nabla}P$) à velocidade superficial do fluido ($\vec{u}$)^{6, 7}:

$$\vec{u} = -\frac{k}{\mu}\vec{\nabla}P \quad (2.1)$$

Observa-se, pela Equação 2.1, que o vetor velocidade superficial (velocidade média do escoamento em um meio poroso) possui mesma direção, sentido oposto e módulo diretamente proporcional ao gradiente de pressão. No contexto de hemorragias, as consequências dessa relação desenrolam-se de forma direta: a redução do volume sanguíneo pode levar a uma queda da pressão intravascular; a diminuição do gradiente de pressão entre os meios intravascular e intratissular causa uma diminuição (em módulo) da velocidade superficial; por fim, o comprometimento da entrega de sangue aos tecidos resulta em hipoperfusão tecidual⁸.

Além de limitar a entrega de oxigênio aos tecidos, a hipoperfusão reforça esse comprometimento por uma segunda via. É sabido que o transporte de oxigênio do sangue para os tecidos ocorre majoritariamente por difusão, processo descrito pela Lei de Fick, segundo a qual o fluxo difusivo de oxigênio ($\vec{J}$) é diretamente proporcional ao gradiente de concentração ($\vec{\nabla}C$) entre duas regiões⁹. Quando o suprimento sanguíneo de determinada região torna-se insuficiente, a concentração de oxigênio nos capilares locais diminui gradualmente em razão do consumo celular contínuo. Como consequência, reduz-se a diferença de concentração entre o sangue e o tecido, tornando o gradiente $\vec{\nabla}C$ progressivamente menor. Como esse gradiente constitui a força motriz da difusão, o fluxo de oxigênio tende a diminuir ($\vec{J} \rightarrow \vec{0}$), podendo resultar em hipóxia tecidual local⁹. Quando os efeitos da perda de sangue tornam-se sistêmicos, manifestando-se, por exemplo, por meio de hipotensão arterial e hipoperfusão generalizada, estabelece-se o quadro clínico conhecido como choque hipovolêmico, condição grave que demanda controle imediato do sangramento e, em muitos casos, reposição volêmica ou transfusão sanguínea^{8, 10}.

Paralelamente, a perda de grande volume de sangue pode induzir o organismo a um estado de choque, no qual a perfusão de órgãos vitais é priorizada em detrimento de funções fisiológicas consideradas menos críticas. Como consequência, pode ocorrer uma desaceleração global do metabolismo celular e um comprometimento da distribuição de calor, favorecendo o desenvolvimento de quadros de hipotermia. A redução da temperatura corporal, por sua vez, prejudica diversos processos bioquímicos envolvidos na coagulação sanguínea, estabelecendo um ciclo de retroalimentação positiva que tende a agravar o quadro hemorrágico (a chamada “tríade letal”: hipotermia, acidose e coagulopatia)^{11–13}.

Diante das consequências fisiológicas associadas à perda sanguínea, a rápida contenção do sangramento torna-se fundamental para a manutenção da homeostase. Essa função é desempenhada por um conjunto de mecanismos biológicos especializados conhecidos coletivamente como hemostasia.

2.2 Hemostasia

Hemostasia é o nome dado ao conjunto de processos fisiológicos desencadeados após uma lesão vascular com o objetivo de limitar a perda de sangue e restabelecer a integridade

do sistema circulatório. O resultado final desse processo é a formação de um coágulo, constituído por uma rede tridimensional de fibrina que atua como suporte estrutural para o aprisionamento de células sanguíneas, incluindo plaquetas, hemácias e leucócitos¹⁴. Dessa forma, o coágulo atua como uma barreira física capaz de reduzir a perda de sangue até que o vaso lesionado seja reparado.

Atualmente, dois modelos principais são empregados para descrever o processo hemostático: o modelo de cascata de coagulação e o modelo celular^{15, 16}. No modelo clássico de cascata, a coagulação é apresentada como uma sequência de eventos bioquímicos interdependentes, frequentemente descrita de forma linear. Já o modelo celular enfatiza a participação coordenada de diferentes tipos celulares e reconhece que diversas etapas da coagulação ocorrem simultaneamente e de forma integrada. Embora o modelo celular represente uma descrição mais moderna e fisiologicamente mais próxima da realidade, o modelo de cascata permanece amplamente utilizado por sua simplicidade conceitual e valor didático.

Considerando que os estudos apresentados nesta tese se limitam majoritariamente à experimentação *in vitro*, a descrição da coagulação sanguínea por meio da cascata de coagulação representa uma aproximação adequada para a discussão dos resultados obtidos. Por essa razão, a apresentação teórica desenvolvida nas próximas seções será baseada nesse modelo.

2.2.1 Cascata de coagulação

O modelo de cascata de coagulação foi proposto em 1964 em dois artigos científicos publicados independentemente por Davie e Ratnoff¹⁷ e Macfarlane¹⁸. Nesse modelo, a coagulação sanguínea é interpretada como uma sequência de eventos bioquímicos interdependentes, em que a ativação de um componente desencadeia a ativação do próximo, em um mecanismo frequentemente descrito como “efeito dominó”. Embora tenha sido refinado ao longo das décadas para incorporar novos conhecimentos sobre a fisiologia da coagulação, sua estrutura conceitual permanece amplamente preservada¹⁹. No modelo de cascata, a hemostasia é tradicionalmente dividida em duas etapas: hemostasia primária e hemostasia secundária.

Assim como no modelo celular, a coagulação é descrita com base na participação de fatores de coagulação e cofatores, muitos dos quais circulam no plasma sanguíneo na forma de proenzimas e são convertidos para suas formas ativas após o início da hemostasia²⁰. Convencionalmente, esses componentes são identificados por algarismos romanos (e.g. fX, referente ao fator X). A Tabela 2.1 apresenta os principais fatores de coagulação e suas respectivas funções, para fins de contextualização.

A hemostasia primária inicia-se imediatamente após a lesão vascular. Nesse estágio, ocorre vasoconstrição local, reduzindo o fluxo sanguíneo para a região afetada. Parale-

Tabela 2.1: Fatores de coagulação, seus nomes alternativos e descrições, para fins de clareza.

Fator	Nome Alternativo	Descrição
I	Fibrinogênio	Proteína solúvel convertida em fibrina pela trombina
II	Protrombina	Proenzima convertida em trombina
III	Fator Tissular (fT), Tromboplastina	Glicoproteína presente nas células subendoteliais
IV	Íons Ca^{2+}	Cofator essencial para várias etapas da coagulação
V	Fator lábil	Cofator que atua junto ao fator Xa
VI	-	Designação original do fator Va
VII	Proconvertina	Ativado pelo fator Tissular; inicia a via extrínseca
VIII	Fator anti-hemofílico A	Cofator do fator IXa; deficiência causa hemofilia A
IX	Fator de Christmas; fator anti-hemofílico B	Atua com o fator VIIIa; deficiência causa hemofilia B
X	Fator de Stuart–Prower	Ativado por vias extrínseca e intrínseca; ativa a trombina
XI	Antecedente da tromboplastina plasmática	Ativa o fator IX; deficiência causa hemofilia C
XII	Fator de Hageman	Ativa o fator XI; importante em testes laboratoriais, mas não essencial <i>in vivo</i>
XIII	Fator estabilizador da fibrina	Realiza ligações cruzadas entre moléculas de fibrina para estabilizar o coágulo

Fonte: Adaptação de Park e Park²¹

lamente, o fator de von Willebrand (fvW), uma proteína multimérica presente tanto no plasma quanto no subendotélio, promove a adesão de plaquetas ao colágeno exposto da matriz extracelular por meio de receptores específicos presentes em sua superfície^{22–24}. Esse evento desencadeia a ativação plaquetária, processo caracterizado por alterações estruturais, funcionais e bioquímicas que convertem as plaquetas de componentes circulantes passivos em participantes ativos da resposta hemostática²⁵.

É importante ressaltar que, em condições fisiológicas normais, o colágeno subendotelial permanece inacessível aos componentes sanguíneos. Isso ocorre porque o endotélio vascular atua como uma barreira entre os meios intravascular e extravascular, impedindo o contato direto das plaquetas com estruturas capazes de desencadear sua ativação. Dessa forma, a adesão plaquetária ao colágeno é uma consequência direta da lesão vascular. A Figura 2.2 apresenta uma representação esquemática da estrutura de um vaso sanguíneo para melhor visualização de alguns dos componentes envolvidos nesse processo.

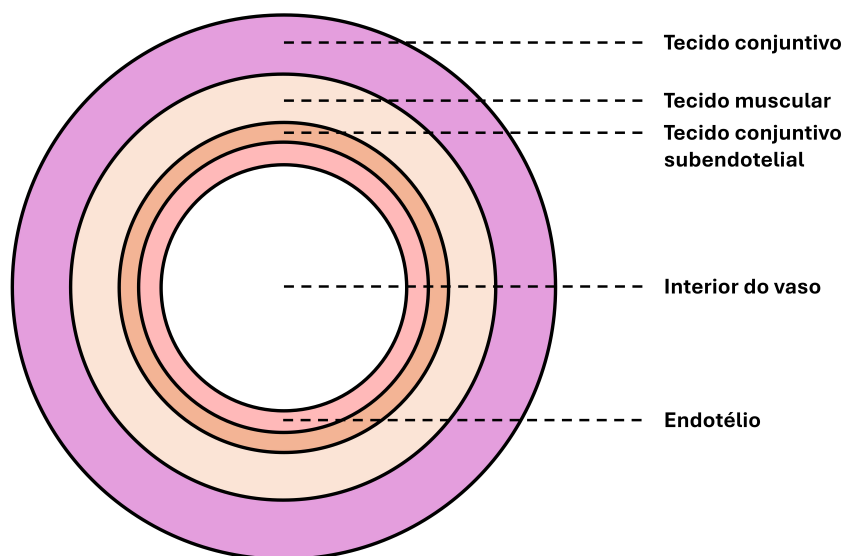


Figura 2.2: Representação esquemática em corte transversal da parede de um vaso sanguíneo. Fonte: Adaptação de Jouda, Murillo e Wang²⁶.

A hemostasia secundária ocorre em seguida e corresponde à etapa em que os fatores de coagulação são progressivamente ativados, culminando na formação da rede de fibrina que estabiliza o coágulo. Tradicionalmente, essa etapa é dividida em três vias denominadas intrínseca, extrínseca e comum. Inicialmente, acreditava-se que as vias intrínseca e extrínseca constituíam processos independentes. Entretanto, em 1977 essa interpretação foi revisada após a demonstração de que o complexo fT:fVIIa é capaz de ativar não apenas o fX, associado à via extrínseca, mas também o fIX, tradicionalmente atribuído à via intrínseca²⁷. Essa observação evidenciou a existência de interações entre ambas as vias. Ainda assim, por razões didáticas, elas serão apresentadas separadamente nas seções seguintes. A Figura 2.3 apresenta um esquema simplificado da cascata de coagulação e das etapas envolvidas até a formação do coágulo de fibrina.

A via extrínseca é iniciada quando o fator tecidual (fT), uma proteína transmembrana presente no tecido subendotelial e exposta após uma lesão vascular, associa-se ao fVII circulante ou à sua forma ativa, fVIIa³⁰. No plasma, o fVII encontra-se predominantemente na forma de proenzima, embora pequenas quantidades de fVIIa também estejam presentes. A interação entre fT e fVII promove sua ativação por proteólise limitada, resultando em uma serina protease constituída por duas cadeias ligadas por ponte dissulfeto³¹. Diferentemente de outras serina proteases da coagulação, o fVIIa livre apresenta relativa resistência aos inibidores plasmáticos, embora sua origem *in vivo* ainda não seja completamente compreendida³². O complexo fT:fVIIa, conhecido como tenase extrínseco, ancora-se à superfície de membranas fosfolipídicas, onde atua como um potente iniciador da coagulação³⁰. Nesse contexto, íons Ca^{2+} exercem papel fundamental ao estabilizar o complexo por meio da formação de pontes entre resíduos carboxilato negativamente carregados do fVIIa ($\text{R}-\text{COO}^-$) e a membrana fosfolipídica, também carregada negativamente devido a

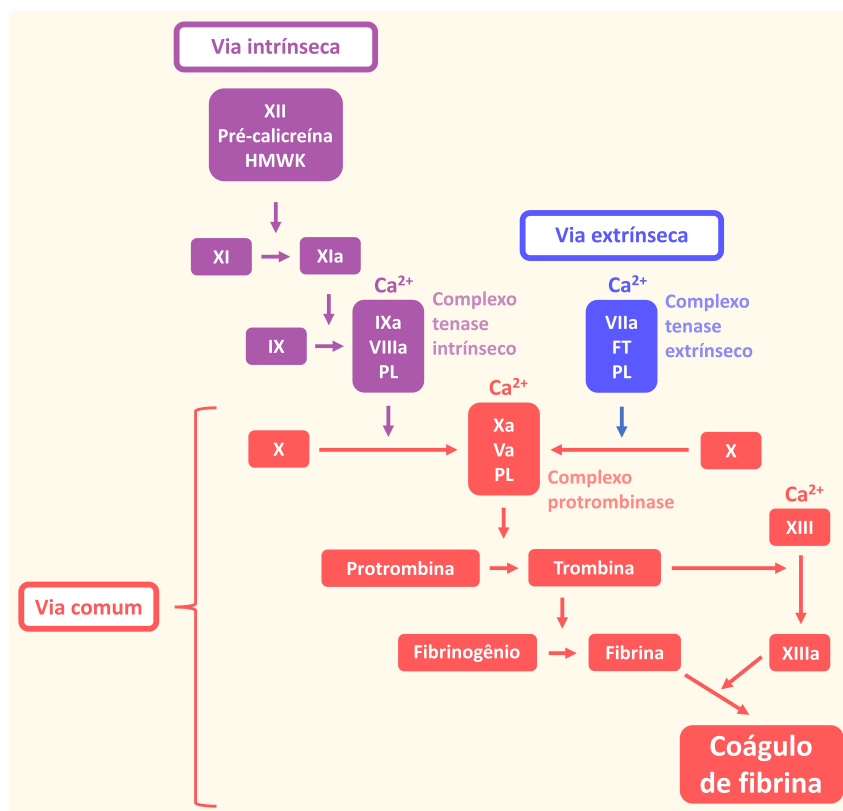


Figura 2.3: Esquema geral da hemostasia secundária com base no modelo de cascata de coagulação. Fonte: Adaptação de Hoffman e Monroe²⁸, e Smith, Travers e Morrissey²⁹.

presença de grupos fosfato que encontram-se desprotonados em pH fisiológico (PO_4^{3-}). Como consequência, o complexo fT:fVIIa torna-se capaz de promover a conversão do fX em fXa por proteólise limitada, estabelecendo a conexão entre a via extrínseca e a via comum²⁹.

A via intrínseca, também denominada via de contato, é iniciada pela ativação do fXII em um processo que envolve ainda o cininogênio de alto peso molecular (HK) e a pré-caliceína plasmática (PK)^{28, 29}. O contato do sangue com superfícies carregadas negativamente induz alterações conformacionais no fXII, resultando na formação de pequenas quantidades de fXIIa^{33, 34}. O fXIIa converte a PK em caliceína, que por sua vez promove a geração adicional de fXIIa. A ativação recíproca entre essas espécies estabelece um ciclo de retroalimentação positiva responsável pela amplificação inicial da resposta³⁵. O fXIIa então converte o fXI em fXIa, que subsequentemente promove a ativação do fIX. Em associação ao fVIIIa, uma superfície fosfolipídica e íons Ca^{2+} , o fIXa forma o complexo tenase intrínseco, responsável pela conversão do fX em fXa²⁹.

A geração de fXa marca a convergência das vias intrínseca e extrínseca para a denominada via comum. Inicialmente, o fXa promove a ativação de pequenas quantidades do fV, que passa a atuar como cofator na formação do complexo protrombinase²⁹. Constituído por fXa, fVa, Ca^{2+} e uma superfície fosfolipídica carregada negativamente, esse complexo catalisa a conversão da protrombina (fII) em trombina (fIIa). A trombina

ocupa posição central na cascata de coagulação por amplificar sua própria geração através da ativação dos fatores V, VIII e XI, além de converter o fibrinogênio em monômeros de fibrina^{29, 36}. Esses monômeros polimerizam-se espontaneamente, formando filamentos insolúveis que constituem a estrutura básica do coágulo. Por fim, a trombina promove a ativação do fXIII em fXIIIa na presença de Ca^{2+} . O fXIIIa catalisa a formação de ligações cruzadas covalentes entre moléculas adjacentes de fibrina, estabilizando a malha formada e consolidando o coágulo no local da lesão³⁷.

2.3 Agentes Hemostáticos

Conforme discutido nas seções anteriores, a rápida contenção do sangramento é um fator determinante para a sobrevivência em casos de hemorragia severa. Embora o organismo disponha de mecanismos fisiológicos capazes de promover a hemostasia, a velocidade e a eficiência dessa resposta nem sempre são suficientes para evitar complicações decorrentes da perda excessiva de sangue. Nesse contexto, agentes hemostáticos são materiais desenvolvidos com a finalidade de auxiliar ou acelerar o processo de coagulação, desempenhando papel importante em procedimentos cirúrgicos, atendimentos de emergência, medicina militar e aplicações de primeiros socorros^{38, 39}.

Os agentes hemostáticos mais simples atuam por mecanismos essencialmente físicos, como absorção de fluidos e obstrução mecânica da lesão. Entretanto, o aprofundamento do conhecimento acerca dos mecanismos fisiológicos da coagulação permitiu o desenvolvimento de materiais capazes de interagir diretamente com diferentes etapas do processo hemostático, favorecendo a adesão e ativação plaquetária, concentrando fatores de coagulação por absorção de fluidos, fornecendo componentes diretamente envolvidos na formação do coágulo ou combinando múltiplos mecanismos de ação em um mesmo sistema⁴⁰. Como consequência, uma ampla variedade de materiais tem sido explorada para essa finalidade, incluindo polímeros naturais e sintéticos, proteínas, cerâmicas, argilas, silicatos e compósitos⁴¹. A Figura 2.4 ilustra alguns exemplos de agentes hemostáticos comercializados atualmente.



Figura 2.4: Exemplos de agentes hemostáticos comerciais baseados em diferentes classes de materiais: zeólitas e argilas (QuikClot), quitosana (HemCon) e gelatina (GelFoam).

Fonte: Autoria própria.

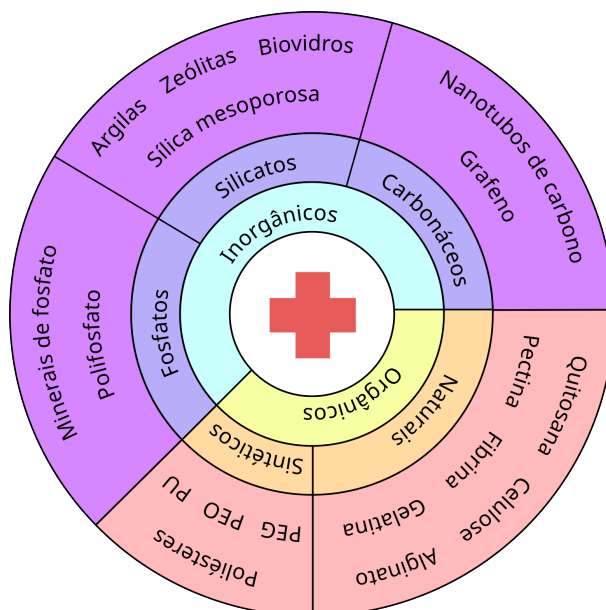


Figura 2.5: Classes de materiais hemostáticos e alguns de seus principais representantes.
Fonte: Adaptação de Gheorghită et al.⁴⁸

Sob a perspectiva do mecanismo de ação, agentes hemostáticos são frequentemente classificados como ativos, passivos ou híbridos⁴². Os agentes ativos contêm componentes biologicamente funcionais, como trombina ou fibrinogênio, capazes de participar diretamente das etapas da coagulação sanguínea e acelerar a formação do coágulo^{43, 44}. Em contraste, agentes passivos dependem predominantemente de suas propriedades físicas para promover a hemostasia, atuando por mecanismos como absorção de fluidos, concentração local de plaquetas e fatores de coagulação, e tamponamento mecânico da lesão^{45–47}. Os agentes híbridos combinam características de ambas as abordagens, buscando integrar diferentes mecanismos de ação em um único material.

Outra forma comum de classificação baseia-se na natureza química dos materiais empregados. Sob essa perspectiva, agentes hemostáticos podem ser agrupados em materiais orgânicos e inorgânicos (Figura 2.5). Embora essa divisão seja simplificada, ela é particularmente útil para discutir as relações entre composição química, propriedades físico-químicas e mecanismos de atuação. Nas seções seguintes serão apresentadas algumas das principais classes de agentes hemostáticos orgânicos e inorgânicos descritas na literatura, com ênfase naquelas mais diretamente relacionadas aos materiais investigados nesta tese.

2.3.1 Agentes hemostáticos orgânicos

Os agentes hemostáticos orgânicos são representados majoritariamente por materiais poliméricos. Assim, é preciso, inicialmente, fazer uma distinção entre os polímeros naturais e os polímeros sintéticos, uma vez que suas propriedades físico-químicas e interação com o ambiente biológico dependem diretamente de sua origem e estrutura química.

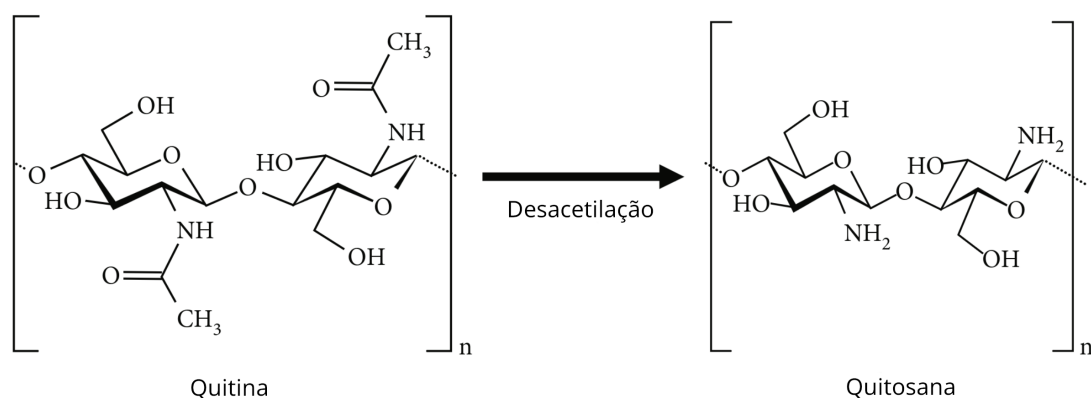


Figura 2.6: Estrutura química dos monômeros da quitina e da quitosana. Fonte: Adaptação de Alemu, Getachew e Mondal⁵⁷.

Os polímeros naturais mais amplamente empregados em aplicações hemostáticas, de forma geral, são os polissacarídeos e proteínas estruturais, como o colágeno. Os polissacarídeos são particularmente atrativos devido à sua biocompatibilidade, baixa toxicidade e biodegradabilidade, características que motivaram sua utilização em diversas aplicações biomédicas, incluindo curativos, peles artificiais, suturas absorvíveis e sistemas de liberação controlada de fármacos^{49–55}.

Dentre os polissacarídeos com potencial hemostático, a quitosana aparece como um dos materiais mais extensivamente estudados⁵⁶. Trata-se de um polímero obtido a partir da desacetilação parcial da quitina, ambos constituídos por unidades repetitivas conectadas por ligações glicosídicas β -(1,4). Enquanto a quitina é composta exclusivamente por resíduos de N-acetil-d-glucosamina, a quitosana contém uma fração desses grupos convertida em resíduos de d-glucosamina, em proporções que tipicamente variam entre aproximadamente 55 – 100% (Figura 2.6)⁵⁷.

Embora os mecanismos responsáveis pela ação hemostática da quitosana ainda não sejam completamente compreendidos, evidências experimentais indicam que suas propriedades catiônicas desempenham papel central nesse processo^{48, 58}. Diferentemente da maioria dos polissacarídeos naturais, a quitosana apresenta grupos amino protonáveis, o que a torna um dos poucos polímeros naturais catiônicos amplamente disponíveis^{59, 60}. Em contrapartida, é sabido que as superfícies de eritrócitos e plaquetas apresentam carga líquida negativa devido à presença de grupos aniônicos em glicoconjugados, como resíduos de ácido siálico, e em fosfolipídios de membrana^{61–64}. A interação eletrostática entre essas superfícies favorece a formação de ligações cruzadas com os eritrócitos, resultando na formação do que é comumente denominado na literatura como uma “barreira mucoadesiva”, contribuindo para a redução do sangramento^{65, 66}. De fato, diversos estudos demonstraram que o aumento do grau de desacetilação da quitosana resulta em maior densidade de carga positiva e, conseqüentemente, em maior capacidade de agregação de eritrócitos e plaquetas^{48, 64, 67}.

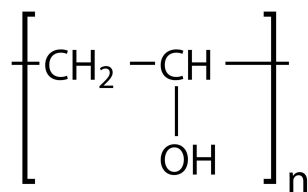


Figura 2.7: Estrutura química do álcool polivinílico (PVA). Fonte: Autoria própria.

Ainda vale destacar como polímeros naturais de interesse para aplicações hemostáticas a celulose, o ácido hialurônico, o alginato, o colágeno e a própria fibrina suplementada⁵⁶.

Dentre os polímeros sintéticos explorados no contexto da hemostasia e dos biomateriais em geral, podemos citar o polietileno glicol (PEG), o poliuretano (PU), o álcool polivinílico (PVA), a policaprolactona (PCL) e o óxido de polietileno (PEO)⁵⁶. Cabe destacar que a maioria dos polímeros sintéticos não apresenta atividade hemostática intrínseca. Em vez disso, são frequentemente empregados como matrizes, suportes estruturais ou agentes de reticulação em sistemas hemostáticos mais complexos⁵⁶.

Os materiais à base de PVA (Figura 2.7), por exemplo, constituem uma das classes mais exploradas para aplicações biomédicas. Este polímero foi obtido pela primeira vez por Herrmann e Haehnel⁶⁸ em 1924 a partir da hidrólise do acetato de polivinila em meio alcoólico alcalino e, atualmente, materiais hemostáticos à base de PVA são frequentemente projetados na forma de esponjas, explorando suas propriedades hidrofílicas e sua elevada capacidade de absorção de fluidos^{56, 69}.

Além disso, muitos desses materiais podem ser processados na forma de hidrogéis após a seleção de um agente reticulante adequado. A pectina, por exemplo, é um polissacarídeo aniônico abundantemente encontrado em cascas de frutas cítricas que tem sido explorado em aplicações biomédicas⁷⁰⁻⁷⁴. Sua estrutura é composta majoritariamente por resíduos de ácido galacturônico ligados por ligações glicosídicas α -(1,4), cujo grau de metoxilação influencia diretamente suas propriedades físico-químicas. Pectinas de baixo grau de metoxilação (*low methoxyl pectin*, LDM), por exemplo, apresentam elevada densidade de grupos carboxila que se encontram predominantemente desprotonados em pH fisiológico ($\text{pK}_a \sim 3.5$)⁷⁵. Essa característica permite sua reticulação por cátions divalentes ou trivalentes, que interagem com resíduos de ácido galacturônico formando zonas de junção conhecidas como “egg-box”, como ilustrado na Figura 2.8⁷⁶⁻⁷⁹. O resultado é a formação de uma rede tridimensional capaz de reter grandes quantidades de água, isto é, um hidrogel. Materiais dessa natureza não somente atuam na hemostasia, mas também são particularmente interessantes para aplicações em cicatrização devido à sua capacidade de manter um ambiente úmido e mimetizar, em certa medida, aspectos da matriz extracelular, favorecendo adesão celular, ancoragem tecidual e recrutamento celular⁸⁰.

É importante notar que parâmetros como massa molar, grau de reticulação e

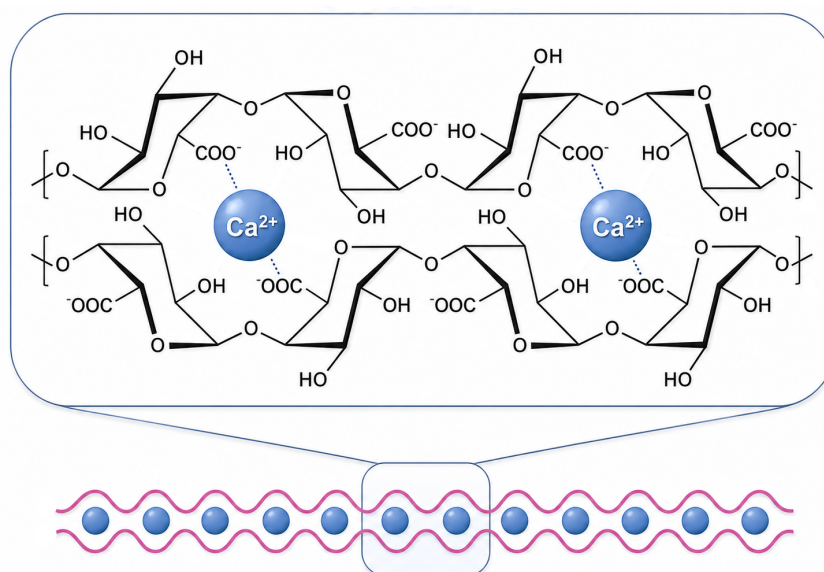


Figura 2.8: Representação esquemática do modelo de reticulação “egg-box” entre moléculas de pectina e íons divalentes de cálcio (Ca^{2+}). Fonte: Adaptação de Vigneswararajah, Thavarajah e Fernando⁸¹

características estruturais específicas de cada polímero, como o grau de desacetilação no caso da quitosana, podem influenciar significativamente suas propriedades físico-químicas e, conseqüentemente, sua resposta biológica. Dessa forma, tais parâmetros devem ser cuidadosamente considerados durante o desenvolvimento de materiais destinados a aplicações biomédicas.

2.3.2 Agentes hemostáticos inorgânicos

Diversos materiais inorgânicos têm sido investigados no contexto da biomedicina, ainda que, de forma geral, possam ser agrupados em categorias como cerâmicas cristalinas, biovidros e alótropos de carbono. Em comparação com materiais orgânicos, destacam-se por sua elevada estabilidade química e por sua resistência à degradação microbiológica, características que frequentemente resultam em maior durabilidade e manutenção de suas propriedades ao longo do tempo.

O uso medicinal de argilas remonta à antiguidade, sendo documentado em diferentes civilizações para finalidades terapêuticas diversas, incluindo aplicações cutâneas e tratamento de feridas⁸². Ainda assim, a introdução de materiais inorgânicos como agentes hemostáticos comerciais é relativamente recente. Um marco importante ocorreu no início do século XXI com a introdução do QuikClot®, um agente hemostático granular cuja formulação original era baseada em zeólitas do tipo LTA (Linde Type A; Figura 2.9). O material foi desenvolvido para o controle emergencial de hemorragias traumáticas, particularmente em cenários militares. De fato, há relatos na literatura acerca da utilização prática do QuikClot durante a Guerra do Iraque (2003), evidenciando sua eficácia no

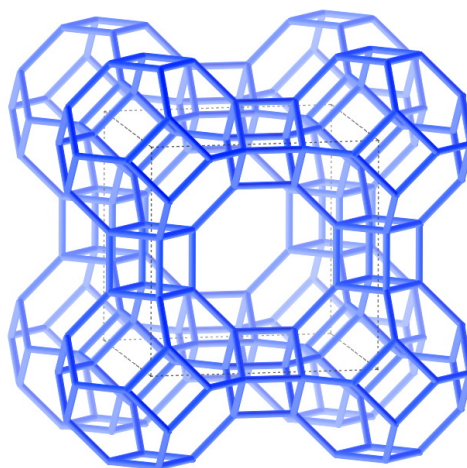


Figura 2.9: Representação do framework da zeólita LTA, principal componente da formulação original do agente hemostático comercial QuikClot. Fonte: International Zeolite Association (IZA)⁸⁴

controle de sangramentos graves em condições de campo⁸³.

A ação hemostática das zeólitas está associada a diversas de suas propriedades físico-químicas. A primeira característica a se destacar é sua elevada capacidade de adsorção de água. Algumas espécies zeolíticas são extremamente hidrofílicas e atuam como peneiras moleculares, adsorvendo rapidamente moléculas de água no local da lesão. Como consequência, ocorre um aumento local da concentração de fatores de coagulação, plaquetas e eritrócitos, favorecendo a formação do coágulo e acelerando a hemostasia^{85–87}. Adicionalmente, com o avanço dos procedimentos de síntese, tornou-se possível a obtenção de zeólitas em escala nanométrica, ampliando ainda mais a já significativa reatividade desses materiais. Isso ocorre porque a redução do tamanho das partículas aumenta naturalmente a razão entre átomos de superfície e átomos internos, maximizando a interface de interação entre o material e o meio biológico⁸⁷. Vale destacar ainda que a presença de íons extra-rede possibilita a realização de procedimentos de troca iônica relativamente simples, como será discutido na Seção 2.4.1. Dessa forma, zeólitas podem ser moduladas para atuar como reservatórios de íons de interesse biológico, como Ca^{2+} , adicionando novos mecanismos de ação e possibilitando a otimização de sua atividade hemostática⁸⁷.

Outra característica relevante desses materiais diz respeito à sua carga superficial. De fato, Ostomel et al.⁸⁸ observaram em 2006 que óxidos básicos, como o ZnO , cujo ponto isoelétrico encontra-se acima do pH fisiológico do sangue ($\text{pH} \sim 7.4$), tendem a apresentar comportamento anticoagulante. Em contrapartida, óxidos ácidos, como a sílica e diversas zeólitas, cujo ponto isoelétrico encontra-se abaixo do pH sanguíneo, tendem a exibir comportamento pró-coagulante⁸⁸, embora os mecanismos responsáveis por esse fenômeno não fossem completamente compreendidos à época. Recentemente, Shang et al.⁸⁹ propuseram que a ação hemostática de superfícies zeolíticas negativamente carregadas estava relacionada ao conceito de proteína corona. Nesse fenômeno, proteínas plasmáticas

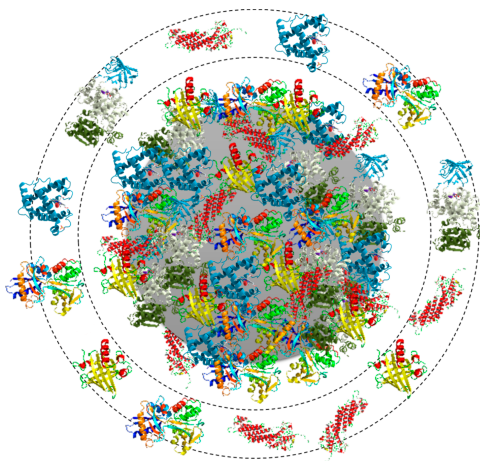


Figura 2.10: Ilustração esquemática da proteína corona. Círculo menor corresponde à “Hard Corona” e círculo maior corresponde à “Soft Corona”. Fonte: Adaptação de García-Álvarez e Vallet-Regí⁹¹

interagem com a superfície do material por forças eletrostáticas. Essa camada pode ser subdividida em uma região mais fortemente ligada à superfície (“Hard Corona”) e outra mais dinâmica e fracamente associada (“Soft Corona”), como representado na Figura 2.10⁹⁰.

No caso das zeólitas, foi observado que a adsorção proteica favorece a organização dos fatores Xa e Va na forma do complexo protrombinase, responsável pela conversão de protrombina em trombina, sobre a superfície zeolítica. Curiosamente, a atividade catalítica desse complexo mostrou-se superior à observada quando sua montagem ocorre sobre superfícies plaquetárias, efeito atribuído a alterações conformacionais induzidas pela interação com a superfície do material⁸⁹. Sob essa perspectiva, foi proposto que as zeólitas podem servir como verdadeiras “plaquetas inorgânicas”, capazes de participar ativamente da coagulação sanguínea.

Apesar do potencial das zeólitas na aceleração da coagulação sanguínea, a principal limitação de seu uso está relacionada ao calor liberado durante a adsorção de água. Como demonstrado por Ostomel et al.⁹², o calor de hidratação da zeólita LTA é da ordem de 680 J g^{-1} , fazendo com que a hidratação completa do material possa elevar a temperatura local para valores próximos a 100°C . Em aplicações hemostáticas, esse aquecimento pode causar danos térmicos aos tecidos adjacentes^{87, 93, 94}. Isso motivou o desenvolvimento de novas formulações e, atualmente, o QuikClot® emprega materiais argilosos, especificamente o caolim, em substituição às zeólitas originalmente utilizadas⁹⁵. Devido à sua baixa porosidade, o caolim não atua através da adsorção de água e concentração dos fatores de coagulação, mas sim através da interação direta com o fXII, proteína responsável por iniciar a via intrínseca da cascata de coagulação^{95, 96}.

Os materiais argilosos foram usados pela primeira vez em contexto militar, devido à sua ação pró-coagulante e à combinação de propriedades favoráveis, como estabilidade

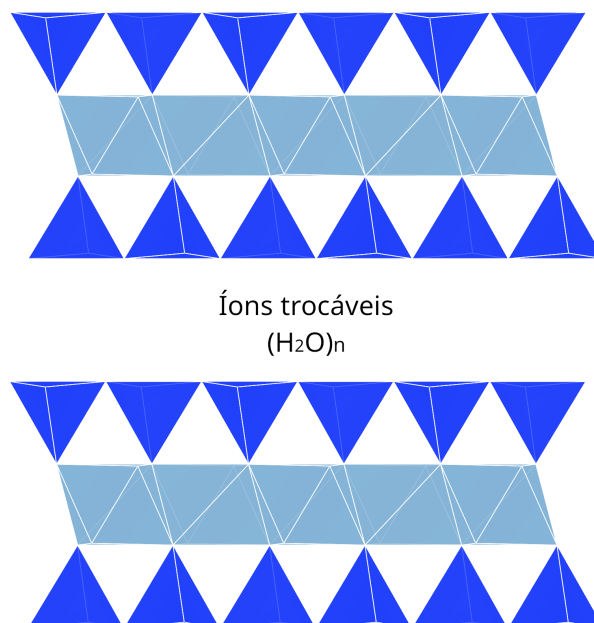


Figura 2.11: Estrutura da argila montmorilonita. A montmorilonita possui estrutura lamelar, sendo cada camada constituída por duas folhas de sílica em coordenação tetraédrica, e uma folha central de alumina em coordenação octaédrica. Água e cátions de superfície penetram entre camadas adjacentes, causando a expansão do material. Fonte: Adaptação de Sachs-Barrable, Darlington e Wasan¹⁰⁴

físico-química, facilidade de produção e ausência de componentes de origem humana ou animal^{97, 98}. Diversos produtos hemostáticos baseados em minerais argilosos receberam aprovação da *Food and Drug Administration* (FDA) nas últimas décadas para utilização em primeiros socorros no campo de batalha^{98, 99}.

Algo interessante a se destacar acerca das argilas é que algumas delas apresentam capacidade de expansão após absorção de água, como ocorre com a montmorilonita^{100, 101}. Esse comportamento está relacionado à sua estrutura lamelar e à presença de carga negativa permanente nas camadas, resultante da substituição isomórfica de íons de maior valência por íons de menor valência na rede cristalina. Em particular, substituições de Al^{3+} por Mg^{2+} ou Fe^{2+} em sítios octaédricos, bem como de Si^{4+} por Al^{3+} em sítios tetraédricos, geram um excesso de carga negativa que precisa ser compensado por cátions localizados entre as lamelas, como Na^+ , K^+ e Ca^{2+} ¹⁰². Como esses cátions encontram-se relativamente fracamente ligados à estrutura, moléculas de água podem penetrar na região interlamelar, causando uma expansão (Figura 2.11)¹⁰². Essa capacidade de inchamento favorece a absorção de fluidos e pode contribuir para sua ação hemostática¹⁰³.

Por fim, cabe mencionar brevemente os alótropos de carbono. Foi demonstrado por Semberova et al.¹⁰⁵ que nanotubos de carbono de parede única podem promover agregação plaquetária, interagir com múltiplos fatores de coagulação e reduzir o tempo necessário para formação de coágulos. Em um estudo posterior, Sokolov et al.¹⁰⁶ observaram que nanotubos funcionalizados com grupos carboxílicos reduziam significativamente o tempo

de coagulação do plasma pobre em plaquetas. Entretanto, esse efeito desaparecia em plasma deficiente no fator XI, sugerindo que sua ação estava associada principalmente à ativação por contato da cascata de coagulação, e não à agregação plaquetária¹⁰⁶. Mais recentemente, nanofibras de carbono super-hidrofóbicas também foram investigadas como agentes hemostáticos¹⁰⁷. Diferentemente de materiais que atuam por absorção de fluidos, essas estruturas parecem acelerar a formação de fibrina sem promover a concentração local dos componentes sanguíneos. Adicionalmente, seu caráter hidrofóbico reduz a adesão bacteriana, contribuindo para a prevenção de infecções¹⁰⁸.

Nesta tese de doutoramento daremos enfoque aos silicatos, principal classe de materiais explorada em nosso grupo de pesquisa. Suas características estruturais, propriedades e métodos de obtenção serão discutidos nas seções seguintes.

2.4 Silicatos

Os silicatos constituem a classe mais abundante de minerais da crosta terrestre, correspondendo a aproximadamente 60% de sua composição em massa. Representam uma das mais amplas e versáteis classes de materiais, sendo definidos pela presença de unidades estruturais formadas por tetraedros de silício e oxigênio, $[\text{SiO}_4]^{4-}$ ^{109, 110}. Nessa configuração, cada tetraedro é composto por um átomo central de silício coordenado a quatro átomos de oxigênio dispostos em geometria tetraédrica, como ilustrado na Figura 2.12. Apesar da simplicidade dessa unidade estrutural, diferentes formas de conectividade entre os tetraedros originam uma enorme diversidade de estruturas cristalinas e propriedades físico-químicas, conferindo aos silicatos grande relevância em aplicações industriais, tecnológicas e biomédicas^{111, 112}.

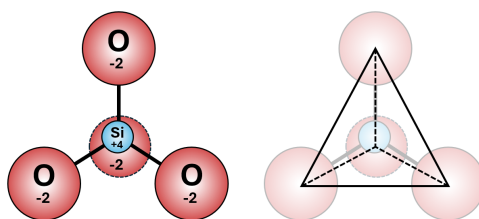


Figura 2.12: Representação esquemática do tetraedro $[\text{SiO}_4]^{4-}$, unidade estrutural fundamental dos silicatos. Fonte: Adaptação de Shamiryan et al.¹¹⁰

Do ponto de vista estrutural, os silicatos são tradicionalmente classificados de acordo com o grau de compartilhamento de vértices entre tetraedros adjacentes. Essa classificação dá origem a diferentes subclasses mineralógicas, descritas a seguir.

- Nesossilicatos: Constituem a subclasse estruturalmente mais simples dos silicatos. São caracterizados pela presença de tetraedros $[\text{SiO}_4]^{4-}$ isolados, nos quais os átomos de oxigênio permanecem coordenados exclusivamente ao átomo central de silício. A

estabilidade estrutural é garantida pela interação eletrostática entre esses tetraedros e íons como Mg^{2+} , Fe^{2+} , Ca^{2+} e Al^{3+} , que ocupam posições intersticiais na rede cristalina¹⁰⁹.

- Sorossilicatos: Caracterizam-se pela presença de pares de tetraedros conectados por um átomo de oxigênio compartilhado, formando a unidade estrutural $[\text{Si}_2\text{O}_7]^{6-}$ (Figura 2.13). Diferentemente das subclasses mais polimerizadas, essas unidades permanecem isoladas entre si e são conectadas estruturalmente por espécies iônicas, de maneira análoga ao observado nos nesossilicatos¹⁰⁹.

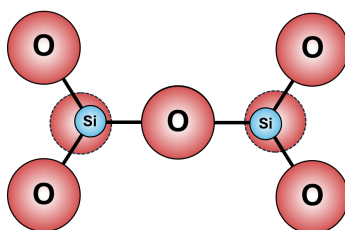


Figura 2.13: Unidade estrutural $[\text{Si}_2\text{O}_7]^{6-}$ característica dos sorossilicatos, formada pelo compartilhamento de um átomo de oxigênio entre dois tetraedros adjacentes. Fonte: Adaptação de Klein e Dutrow¹⁰⁹

- Ciclossilicatos: Apresentam unidades estruturais organizadas na forma de anéis fechados de tetraedros conectados pelo compartilhamento de vértices. Dependendo do número de tetraedros participantes, podem formar estruturas do tipo $[\text{Si}_3\text{O}_9]^{6-}$, $[\text{Si}_4\text{O}_{12}]^{8-}$ ou $[\text{Si}_6\text{O}_{18}]^{12-}$, todas caracterizadas pela razão atômica $\text{O}/\text{Si} = 3$ (Figura 2.14)¹⁰⁹. A ligação entre anéis adjacentes é promovida por espécies iônicas que atuam como elementos de estabilização estrutural.

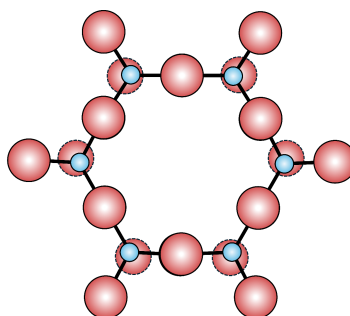


Figura 2.14: Exemplo de arranjo cíclico característico dos ciclossilicatos. Os círculos azuis representam átomos de silício e os círculos vermelhos representam átomos de oxigênio. Fonte: Adaptação de Klein e Dutrow¹⁰⁹

- Inossilicatos: São caracterizados pela formação de cadeias extensas de tetraedros geradas pelo compartilhamento de dois ou três átomos de oxigênio por unidade

estrutural (Figura 2.15). Essas cadeias podem ocorrer na forma simples, típica dos piroxênios, ou dupla, característica dos anfibólios. Em ambos os casos, a coesão entre cadeias vizinhas é promovida pela presença de espécies iônicas localizadas entre elas¹⁰⁹.

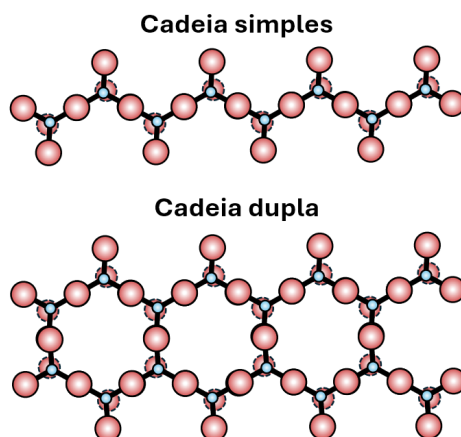


Figura 2.15: Arranjos em cadeia observados em inossilicatos, resultantes da polimerização de tetraedros por compartilhamento de átomos de oxigênio. Os círculos azuis representam átomos de silício e os círculos vermelhos representam átomos de oxigênio. Fonte: Adaptação de Klein e Dutrow¹⁰⁹

- Filossilicatos: Correspondem aos chamados *sheet silicates*, caracterizados pela formação de estruturas lamelares bidimensionais (Figura 2.16). Nesses materiais, cada tetraedro compartilha três de seus vértices com tetraedros vizinhos, originando folhas extensas compostas por anéis poligonais interconectados. A interação entre camadas adjacentes ocorre por meio de espécies iônicas e grupos hidroxila presentes na estrutura, conferindo a esses materiais seu caráter lamelar característico¹⁰⁹.
- Tectossilicatos: Apresentam o mais elevado grau de polimerização dentre os silicatos. Nesses materiais, todos os vértices de cada tetraedro podem participar do compartilhamento com tetraedros adjacentes, resultando em uma rede tridimensional contínua denominada *framework*. As zeólitas, um dos grupos de tectossilicatos de maior relevância industrial, consistem em materiais inorgânicos cristalinos cuja estrutura aberta e porosa é formada pela polimerização de unidades $[\text{SiO}_4]$ e $[\text{AlO}_4]^{-109, 112}$.

Dentre as subclasses descritas, os filossilicatos e tectossilicatos merecem atenção particular no contexto deste trabalho. É a essas classes que pertencem as argilas e as zeólitas, materiais amplamente explorados em aplicações biomédicas e que serão discutidos em maior profundidade nas seções seguintes.

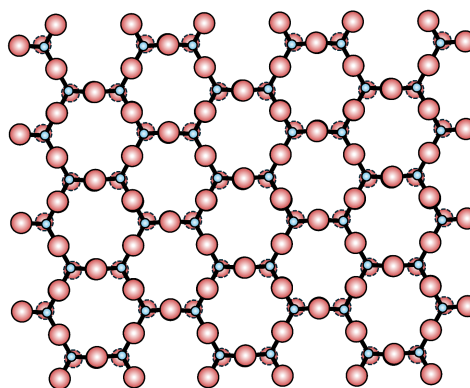


Figura 2.16: Exemplo de arranjo lamelar característico dos filossilicatos, resultante da polimerização bidimensional dos tetraedros estruturais. Os círculos azuis representam átomos de silício e os círculos vermelhos representam átomos de oxigênio. Fonte: Adaptação de Klein e Dutrow¹⁰⁹

2.4.1 Zeólitas

O primeiro mineral zeolítico, a estilbita, foi descrito em 1756 por Axel Fredrik Cronstedt, mineralogista sueco que observou a liberação de vapor quando o mineral era submetido a aquecimento. Esse fenômeno decorria da dessorção da água previamente retida em sua estrutura, levando Cronstedt a cunhar o termo “zeólita”, derivado das palavras gregas *zeo* (ferver) e *lithos* (pedra), em alusão ao aparente comportamento de “ebulição” apresentado pelo material quando aquecido¹¹³. Atualmente, mais de 200 estruturas cristalinas zeolíticas distintas já foram identificadas, das quais aproximadamente 40 ocorrem naturalmente, enquanto as demais são obtidas por métodos sintéticos^{84, 114}. Entre as espécies naturais mais conhecidas destacam-se a clinoptilolita e a chabazita, ao passo que, entre as sintéticas, podemos citar as zeólitas A, X e Y^{84, 115, 116}.

As zeólitas apresentam a polimerização tridimensional típica dos tectossilicatos e são tradicionalmente descritas como *aluminossilicatos* cristalinos microporosos. A presença de alumínio advém da substituição isomórfica de átomos de silício por alumínio, razão pela qual seus tetraedros constituintes são frequentemente representados pela notação TO_4 , em que T corresponde a um átomo de Si ou Al (como a distribuição dessas substituições na rede cristalina é, em geral, aleatória, os tetraedros de alumínio costumam ser omitidos nas ilustrações estruturais)¹¹⁷. Cabe destacar, entretanto, que não há na literatura uma definição única e universalmente aceita de zeólitas. Há, por exemplo, zeólitas sintéticas e naturais compostas exclusivamente por tetraedros de silício^{118, 119}. Embora não contenham alumínio, esses materiais ainda são classificados como zeólitas em virtude da característica que melhor define essa classe de materiais: a presença de uma estrutura cristalina tridimensional aberta e porosa. Para compreender a origem dessa porosidade, é necessário analisar a forma como os tetraedros se organizam na rede cristalina.

Nas zeólitas, os tetraedros TO_4 associam-se formando arranjos geométricos recorrentes

tes denominados unidades secundárias de construção (*Secondary Building Units*; SBUs)¹²⁰. Essas unidades podem assumir diferentes configurações estruturais, incluindo anéis simples, anéis duplos, poliedros e arranjos mais complexos, que se conectam de diferentes maneiras para originar sistemas tridimensionais de canais e cavidades (note que a célula unitária de uma zeólita contém sempre um número inteiro dessas unidades estruturais)¹¹⁷. Atualmente, são reconhecidos 23 tipos distintos de SBUs (Figura 2.17)⁸⁴.

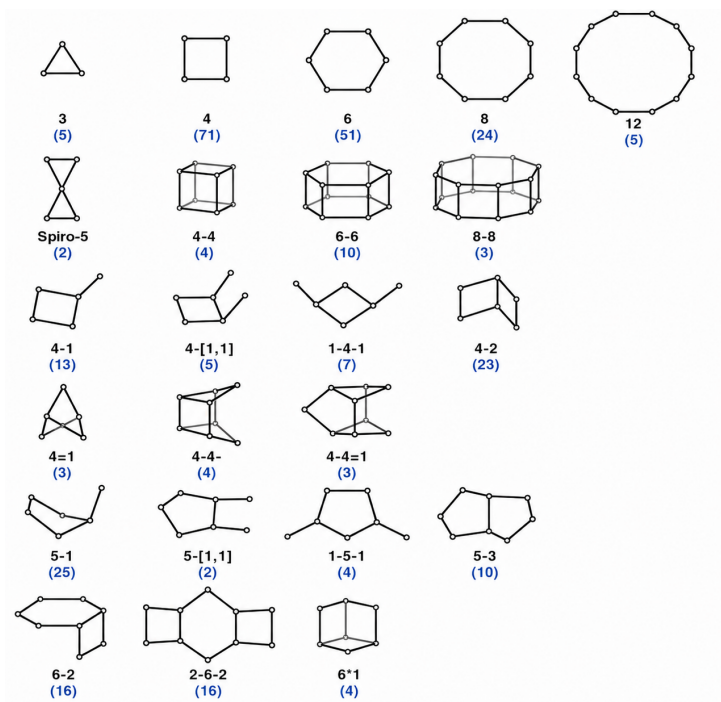


Figura 2.17: Unidades secundárias de construção (SBUs) que compõem estruturas zeolíticas. Fonte: Adaptação de Moshoeshoe, Nadiye-Tabbiruka e Obuseng¹¹⁷

A combinação dessas unidades é responsável pela formação da rede porosa característica das zeólitas (Figura 2.18). De fato, o número de tetraedros que compõe um determinado anel influencia diretamente as dimensões das aberturas formadas, de modo que anéis constituídos por um maior número de tetraedros tendem a originar poros de diâmetro maior^{121, 122}.

Voltando à composição química das zeólitas, uma consequência direta da substituição de Si^{4+} por Al^{3+} diz respeito ao balanço de cargas da estrutura. Devido ao menor número de oxidação do alumínio em relação ao silício, os tetraedros de alumínio apresentam carga líquida negativa ($-1e$). Essa carga negativa é compensada pela presença de espécies catiônicas que ocupam os poros e cavidades da estrutura, denominadas cátions de compensação ou íons extra-rede (por exemplo, Na^+ , K^+ , NH_4^+ , H^+ , Ca^{2+} , Sr^{2+} e Mg^{2+})^{123, 124}. De forma análoga, a incorporação de elementos com número de oxidação superior ao do silício, como o fósforo (P^{+5}) poderia, a princípio, levar à formação de estruturas com carga positiva, demandando a presença de espécies aniônicas de compensação. Esses íons, embora participem da estabilização eletrostática da estrutura cristalina, encontram-se

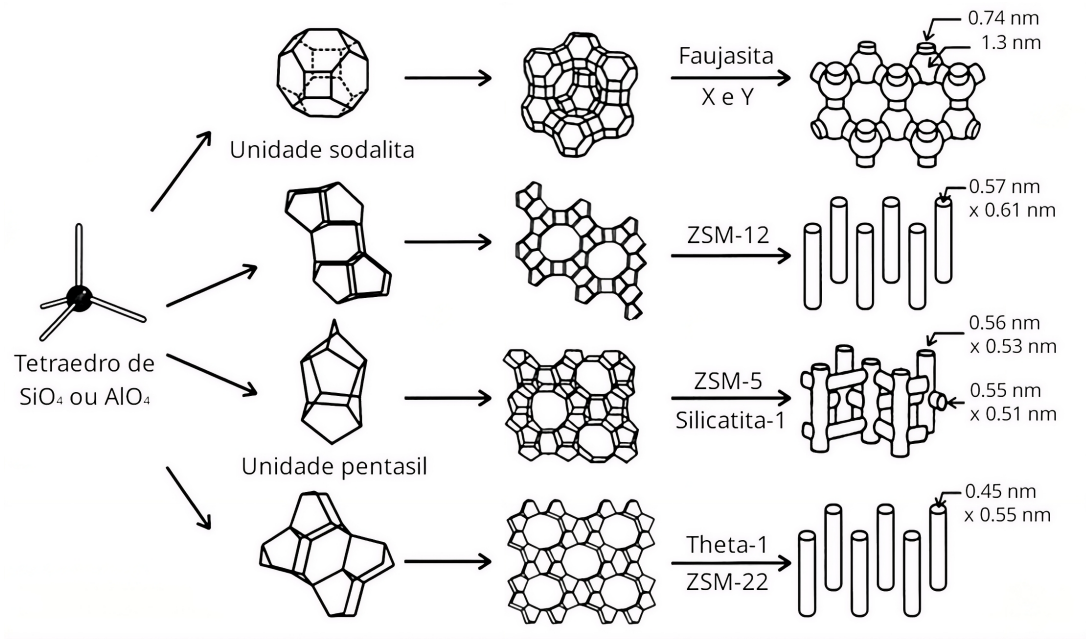


Figura 2.18: Unidades estruturais resultantes de combinações entre as SBUs e estruturas zeolíticas formadas. Fonte: Adaptação de Weitkamp¹²⁰

fracamente ligados à rede e podem ser facilmente substituídos por outras espécies iônicas por meio de processos denominados troca iônica (Figura 2.19)^{124–126}.

Considere, por exemplo, a zeólita Faujasita. Nessa estrutura, ocorre frequentemente a substituição isomórfica de Si por Al, e a razão entre esses elementos determina a classificação de seus análogos sintéticos como zeólita X ($1.0 \leq \frac{\text{Si}}{\text{Al}} \leq 1.5$) ou zeólita Y ($\frac{\text{Si}}{\text{Al}} > 1.5$)¹²⁷. Considerando que o número N_i de cátions de compensação ($\text{NOX} = z_i$) é diretamente proporcional ao número de átomos de alumínio na rede (N_{Al}), de forma que

$$\sum_i z_i N_i = N_{\text{Al}}, \quad (2.2)$$

conclui-se que zeólitas com maior teor de alumínio apresentam maior densidade de carga negativa na rede cristalina e, conseqüentemente, maior capacidade de troca iônica. Dessa forma, a zeólita X tende a apresentar maior sensibilidade a processos de troca iônica quando comparada à zeólita Y, característica que influencia diretamente suas propriedades físico-químicas. Note que, apesar da substituição de Si por Al ser a mais comum em materiais zeolíticos, ela não é a única possibilidade. De fato, existem na literatura estruturas em que outros elementos ocupam posições tetraédricas da rede (e.g. Ti^{4+} , B^{3+} , Ga^{3+})^{128, 129}.

Com relação às propriedades elétricas de superfície, materiais zeolíticos tendem a apresentar carga líquida negativa em ampla faixa de pH, conforme discutido na seção 2.3.2. À primeira vista, poderia ser tentador atribuir essa carga exclusivamente à substituição isomórfica de Si por Al. Entretanto, como discutido anteriormente, a carga negativa do

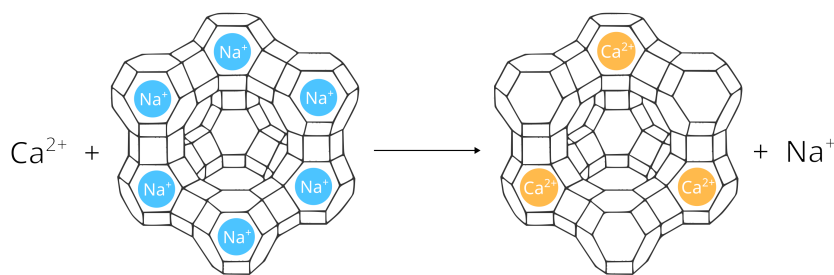


Figura 2.19: Representação esquemática de troca iônica em zeólita Faujasita. Fonte: Adaptação de Tekin e Bac¹²⁵

framework é compensada pela presença de cátions extra-rede, de modo que sua contribuição direta para a carga superficial líquida não seja imediatamente evidente (ainda que potencialmente haja uma contribuição devido à mobilidade desses íons, o que pode gerar desbalanços de carga)¹³⁰. Na verdade, este comportamento é geralmente atribuído à presença de grupos silanol (Si–OH) de superfície, que podem sofrer desprotonação originando sítios Si–O[−]^{131–134}. Evidências nesse sentido podem ser encontradas no comportamento eletrocinético do quartzo, por exemplo (apesar de ser um tectossilicato denso, e não uma zeólita). Ao investigarem seu potencial zeta, Vidyadhar, Kumari e Bhagat¹³⁵ observaram valores negativos mesmo em pH próximo de 2. Como o quartzo consiste essencialmente em SiO₂ e não apresenta substituição isomórfica significativa, a origem desse potencial elétrico deve estar associada aos grupos químicos presentes na superfície. Embora a extrapolação para materiais zeolíticos deva ser feita com cautela, esse resultado sugere que a química superficial desempenha papel importante na determinação das propriedades eletrostáticas de silicatos. Cabe destacar, entretanto, que a acidez desses grupos depende fortemente de seu ambiente químico local, não sendo possível estabelecer um único valor de pK_a representativo para todas as estruturas zeolíticas. Embora existam relativamente poucos estudos dedicados à caracterização ácido-base desses sítios (em silicatos cristalinos, de forma geral), Horvath e Dolník¹³⁶ identificaram, na superfície do quartzo, grupos silanol ácidos (pK_a = 2.5), neutros (pK_a = 6.4) e levemente básicos (pK_a = 8.8).

Em virtude de suas características estruturais e químicas, os materiais zeolíticos encontram aplicações em diversos setores, incluindo agricultura, catálise, separação de gases, remediação ambiental e, obviamente, biomedicina^{124, 137–140}. Algumas topologias, entretanto, destacam-se por sua ampla utilização tecnológica e relevância econômica. Essas estruturas são frequentemente agrupadas sob a denominação *Big Five*, expressão utilizada para designar cinco das topologias zeolíticas mais exploradas comercialmente: FAU (e.g. Faujasita), MOR (e.g. Mordenita), BEA (e.g. Beta), FER (e.g. Ferrierita) e MFI (e.g. ZSM-5) (Figura 2.20)¹⁴¹.

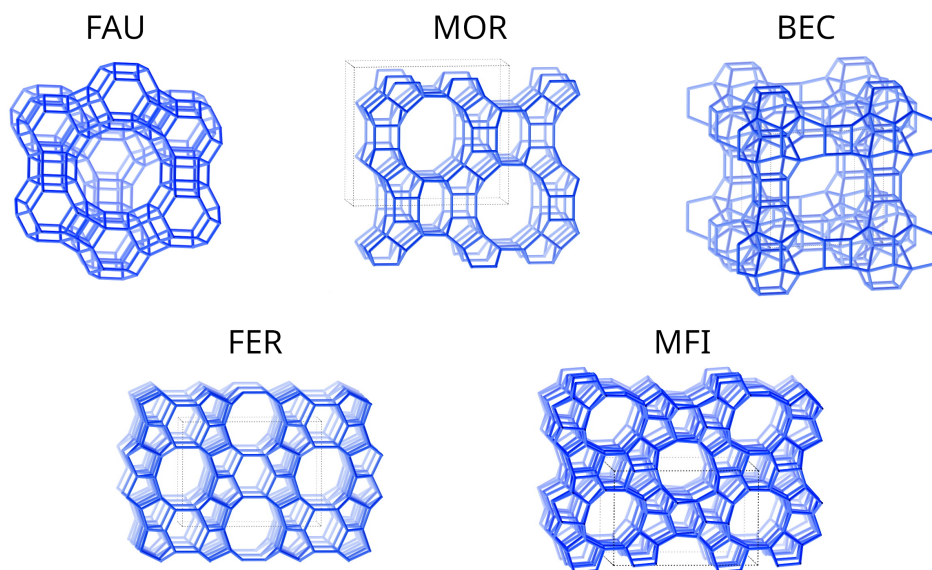


Figura 2.20: Representação das topologias zeolíticas frequentemente agrupadas sob a denominação *Big Five* devido à sua ampla utilização tecnológica e comercial. A topologia BEC é apresentada como modelo estrutural relacionado à zeólita Beta. Fonte: Adaptação de Baerlocher, McCusker e Olson⁸⁴.

2.4.2 Argilas

As argilas são filossilicatos tradicionalmente descritos como aluminossilicatos, assim como as zeólitas. No entanto, é importante distinguir o papel desempenhado pelos átomos de alumínio em cada uma dessas classes. Enquanto nas zeólitas sua presença decorre, predominantemente, da substituição isomórfica de átomos de silício nos tetraedros da rede, nas argilas o alumínio encontra-se, em geral, compondo folhas octaédricas da própria estrutura cristalina (Figura 2.21). Assim, embora ambas sejam constituídas essencialmente por silício, oxigênio e alumínio, esses elementos desempenham funções estruturais distintas em cada material. Note, entretanto, que isso não significa que fenômenos de substituição isomórfica estejam ausentes em argilas. Assim como ocorre em zeólitas, átomos de Si^{4+} podem ser substituídos por Al^{3+} nas folhas tetraédricas, enquanto cátions como Mg^{2+} , Fe^{2+} ou Fe^{3+} podem substituir parcialmente o alumínio nas folhas octaédricas. Essas substituições alteram o balanço de cargas da estrutura e estão diretamente relacionadas à presença de cargas permanentes nas lamelas, bem como à capacidade de troca iônica apresentada por diversos minerais argilosos^{142, 143}.

A estrutura cristalina das argilas é formada, essencialmente, pela associação periódica de dois tipos de unidades “bidimensionais”: folhas tetraédricas (T), constituídas pelos tetraedros de SiO_2 (como se esperaria para filossilicatos), e folhas octaédricas (O), compostas por cátions como Al^{3+} , Mg^{2+} ou Fe^{3+} coordenados a seis átomos de oxigênio e/ou grupos hidroxila. O oxigênio “livre” de cada tetraedro estabelece a ligação entre

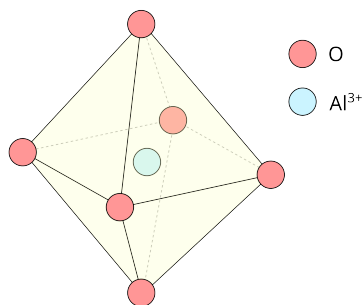


Figura 2.21: Átomo de alumínio em coordenação octaédrica, como observado em minerais argilosos. Fonte: Adaptação de Selvamohamed et al.¹⁴⁴

ambas as folhas, originando as unidades lamelares características desses materiais^{142, 145}. Dependendo da sequência de empilhamento dessas folhas, dois arranjos estruturais principais definem a região intralamelar: *TO* (1:1) e *TOT* (2:1), conforme ilustrado na Figura 2.22.

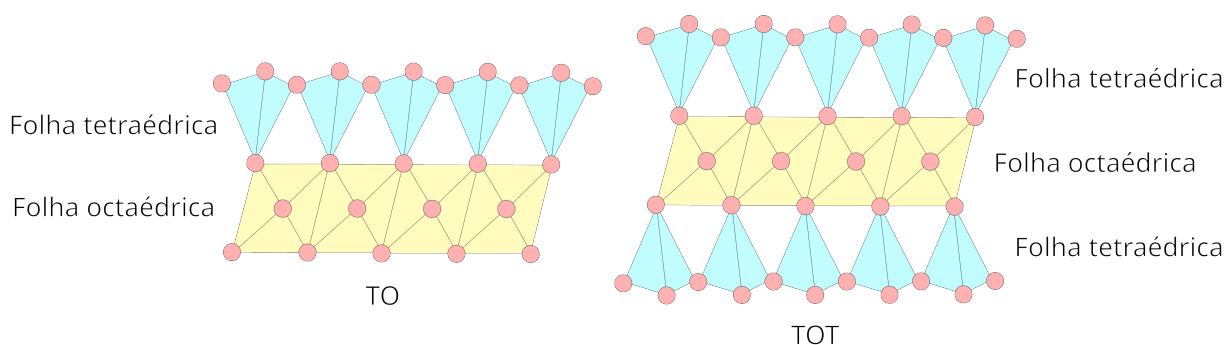


Figura 2.22: Estrutura lamelar de minerais argilosos *TO* (1:1) e *TOT* (2:1). Fonte: Adaptação de Sivakugan¹⁴⁶

Nos minerais do tipo *TO*, cada folha tetraédrica encontra-se fortemente ligada a uma folha octaédrica por ligações de hidrogênio na região interlamelar. Como consequência, praticamente não ocorre intercalação de água ou de espécies químicas entre as lamelas, conferindo baixa capacidade de expansão e reduzida capacidade de troca iônica. A caulinita (Figura 2.23) constitui o exemplo mais representativo dessa classe¹⁴⁷.

Nas argilas do tipo *TOT*, por outro lado, cada folha octaédrica encontra-se “prensada” entre duas folhas tetraédricas. As interações entre lamelas adjacentes são significativamente mais fracas e, comumente, ocorrem por meio de cátions de compensação presentes no espaço interlamelar. Essa característica permite a intercalação de moléculas de água e de diferentes espécies químicas, possibilitando expansão da estrutura, fenômeno conhecido como inchamento (*swelling*)^{143, 147}. Observe que a presença desses cátions de compensação pressupõe que cada lamela possua carga permanente negativa, que originaria-se justamente da substituição isomórfica de Si^{4+} por íons de menor valência (e.g. Al^{3+} , Fe^{3+}) nas folhas tetraédricas, ou mesmo de substituições análogas nas folhas octaédricas (e.g. $\text{Al}^{3+} \longrightarrow \text{Mg}^{2+}$, $\text{Al}^{3+} \longrightarrow \text{Fe}^{2+}$).

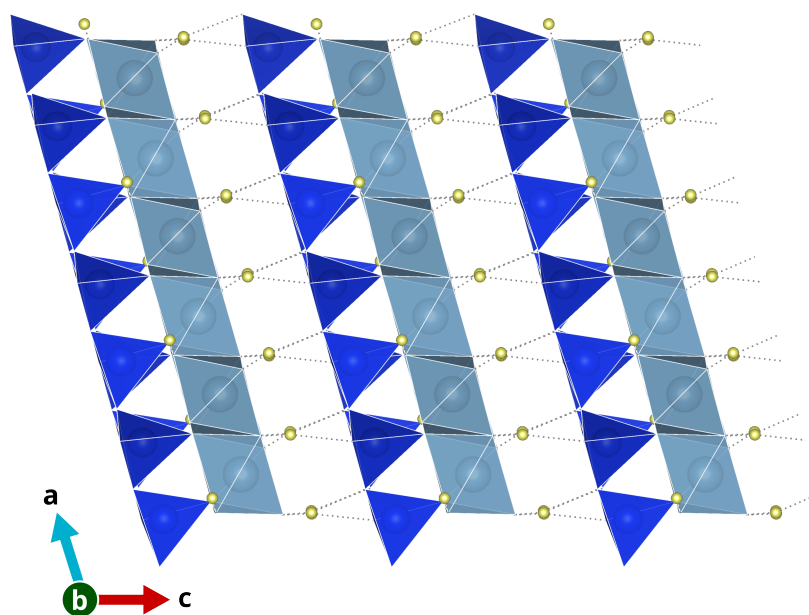


Figura 2.23: Estrutura cristalográfica da caulinita, evidenciando seu caráter lamelar. Os tetraedros de silício estão representados em azul, e os átomos de alumínio em coordenação octaédrica em azul claro. Os átomos de hidrogênio estão representados em amarelo, e as pontes de hidrogênio em linhas pontilhadas. Fonte: Elaborado pelo autor utilizando o software VESTA a partir do arquivo CIF obtido de Gražulis et al.¹⁴⁸.

A montmorilonita pode ser citada como um dos principais representantes desse grupo (Figura 2.11). Pertencente à família das esmectitas, sua estrutura apresenta substituições isomórficas tanto nas folhas tetraédricas quanto nas octaédricas, gerando carga negativa permanente nas lamelas. Essa carga é compensada por cátions, como Na^+ e Ca^{2+} , localizados na região interlamelar, os quais permanecem relativamente fracamente ligados à estrutura e podem ser facilmente substituídos por outras espécies iônicas¹⁴⁹. De maneira análoga ao discutido para as zeólitas, a presença desses íons de compensação confere à montmorilonita alta capacidade de troca iônica (de até $1500 \text{ mmol}_c \text{ kg}^{-1}$)^{150, 151}.

Além disso, a presença de cátions de compensação na região interlamelar confere a essa região caráter hidrofílico, devido à interação eletrostática entre a carga positiva desses íons e o dipolo permanente das moléculas de água. A hidratação dessas espécies promove a expansão das lamelas e aumenta o espaçamento basal do material¹⁵². Essa característica é amplamente explorada por meio de processos de intercalação, nos quais diferentes espécies químicas, como sais inorgânicos, íons metálicos, aminas quaternárias, polímeros, fármacos, aminoácidos, proteínas e surfactantes, são introduzidas entre as lamelas com o objetivo de aumentar o espaçamento basal, modificar propriedades físico-químicas ou possibilitar a liberação controlada de moléculas de interesse^{153, 154}. Cabe destacar, entretanto, que a intercalação não é uma característica exclusiva das esmectitas. Argilas do tipo *TO*, como a caulinita, também podem ser submetidas a esse tipo de modificação, embora a forte rede de ligações de hidrogênio entre suas lamelas possa demandar estratégias mais

elaboradas^{153, 155, 156}.

Em argilas do tipo *TOT* que não apresentam substituição isomórfica significativa, as lamelas são eletricamente neutras e, portanto, não há cátions de compensação ocupando o espaço interlamelar. Nessas condições, a interação entre lamelas adjacentes ocorre predominantemente por forças de van der Waals. Esse é o caso do talco ($\text{Mg}_3\text{Si}_4\text{O}_{10}(\text{OH})_2$)¹⁵⁷. A baixa intensidade dessas interações facilita o cisalhamento entre as lamelas, resultando em baixo coeficiente de atrito e direções preferenciais de deslizamento, características que justificam seu emprego tradicional como lubrificante sólido¹⁵⁸.

Podemos notar, portanto, que o comportamento das argilas é fortemente influenciado por sua estrutura cristalina e pelas interações decorrentes de sua organização estrutural. O arranjo em camadas, as substituições isomórficas e a presença de cargas estruturais determinam propriedades como a capacidade de troca iônica, a interação com moléculas e íons, a hidratação interlamelar e capacidade de expansão. Essas características, associadas à elevada área superficial, boa biocompatibilidade, baixa toxicidade e possibilidade de modificação química, tornam esses materiais particularmente atrativos para aplicações farmacêuticas e biomédicas, incluindo sistemas de liberação controlada de fármacos, engenharia de tecidos, agentes antimicrobianos e materiais hemostáticos^{143, 147, 152, 159, 160}. Convém destacar que os parâmetros apresentados nesta seção representam apenas características gerais dos principais grupos de minerais argilosos e são suficientes para estabelecer uma visão comparativa de suas propriedades. Entretanto, o comportamento de um material específico pode ser influenciado por diversos outros fatores estruturais, como a distribuição e a natureza das substituições isomórficas, a presença de vacâncias cristalinas, defeitos estruturais, e etc.

2.5 Síntese de silicatos

Nas seções anteriores foram discutidas as principais características estruturais e físico-químicas dos silicatos, com ênfase nas zeólitas e argilas. Também foi mostrado, na seção 2.3.2, que esses materiais apresentam amplo potencial para aplicações biomédicas, além de encontrarem utilização consolidada em diferentes setores industriais. A consolidação dessas aplicações está diretamente relacionada ao desenvolvimento de métodos sintéticos capazes de produzir materiais com composição, estrutura cristalina, densidade de defeitos, porosidade e morfologia controladas, uma vez que essas características determinam, em grande medida, suas propriedades físico-químicas e, conseqüentemente, seu desempenho em cada aplicação de interesse^{84, 161–163}.

Os primeiros estudos sistemáticos sobre a síntese de silicatos foram conduzidos por Barrer¹⁶⁴ no final da década de 1940, por meio da transformação hidrotermal de fases minerais em presença de diferentes sais para preparo de zeólitas¹⁶⁴. Poucos anos mais tarde, Breck et al.¹⁶⁵ revolucionaram esse campo ao substituir precursores minerais por

géis altamente reativos e condições brandas de cristalização, estratégia que possibilitou a síntese de diversas novas estruturas zeolíticas, incluindo as zeólitas A e X, e estabeleceu as bases da síntese moderna desses materiais^{166–168}.

Embora silicatos possam ser obtidos por diferentes rotas sintéticas, incluindo processos no estado sólido¹⁶⁹ e síntese assistida por micro-ondas¹⁷⁰, métodos de química *sol-gel* seguidos por cristalização hidrotérmica permanece como uma das principais estratégias para a obtenção de silicatos cristalinos (Figura 2.24)^{171–173}. De forma geral, esse processo consiste na dispersão em meio aquoso dos precursores de silício assim como os outros reagentes que comporão o meio reacional, originando um sistema coloidal (*sol*) que evolui, por sucessivas reações de hidrólise e condensação, para uma rede tridimensional contínua (*gel*)¹⁶². No contexto da síntese de zeólitas, esse gel silicático constitui um precursor amorfo cuja composição química, grau de polimerização e organização local influenciam diretamente a nucleação e a cristalização^{161, 162}. A cristalização ocorre comumente através de tratamento hidrotérmico (Figura 2.24), processo que consiste na cristalização de espécies silicáticas em meio aquoso, com fornecimento de energia via calor e, frequentemente, em sistemas fechados nos quais a pressão autógena favorece a dissolução, reorganização e crescimento das fases cristalinas^{162, 174}.

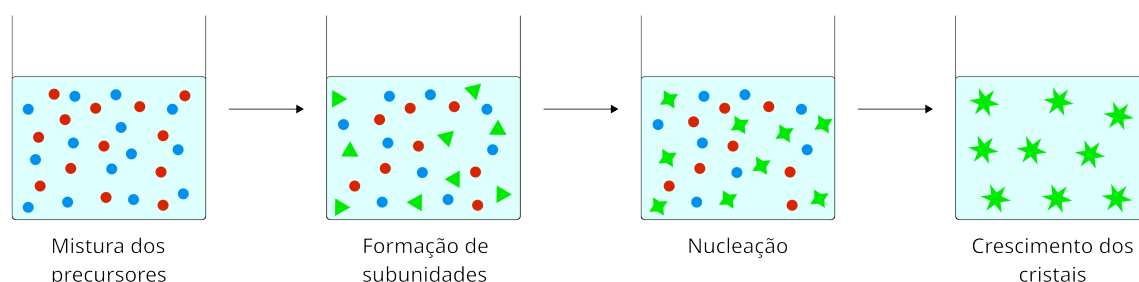


Figura 2.24: Etapas de um típico processo de síntese hidrotérmica via química sol-gel.
Fonte: Adaptação de Derbe, Temesgen e Bitew¹⁷⁵

O produto obtido depende simultaneamente de diversos parâmetros experimentais, incluindo a composição do gel de síntese, a natureza das fontes de silício e alumínio, o pH do meio reacional, a concentração de agentes mineralizantes, a temperatura, o tempo de cristalização e o envelhecimento do gel precursor. A interação entre esses fatores determina tanto a fase cristalina formada quanto propriedades como tamanho de cristal, grau de cristalinidade, composição química e defeitos estruturais^{162, 163}. Dentre os diversos fatores envolvidos na síntese hidrotérmica de silicatos, dois merecem destaque especial no contexto desta tese. O primeiro corresponde ao emprego de agentes direcionadores de estrutura, fundamentais para o controle da cristalização e da topologia obtida. O segundo diz respeito ao desenvolvimento de rotas sintéticas ambientalmente mais sustentáveis, motivadas pela crescente busca por processos capazes de reduzir custos, consumo energético e impacto ambiental sem comprometer as propriedades dos materiais obtidos. Esses aspectos serão discutidos nas seções seguintes.

2.5.1 Agentes direcionadores de estrutura

Dentre os diversos parâmetros capazes de influenciar a cristalização de materiais silicatos, o emprego de agentes direcionadores de estrutura (*Structure-Directing Agents*; SDAs) representa um dos fatores mais importantes na determinação da topologia cristalina obtida ao final da síntese. Em termos gerais, os SDAs consistem em espécies químicas, frequentemente orgânicas, capazes de interagir com as unidades silicáticas presentes no gel de síntese e direcionar sua organização durante o processo de nucleação e crescimento. Reforçando o que foi mencionado na seção anterior, esse fenômeno de direcionamento estrutural não atua de forma isolada, mas em conjunto com outros parâmetros do meio de síntese¹⁷⁶. Também cabe ressaltar que, dentre os materiais silicáticos, a denominação *SDA* é empregada predominantemente na literatura de zeólitas, embora existam relatos de sua utilização na síntese de materiais lamelares, por exemplo¹⁷⁷. Daremos destaque nessa seção, portanto, à literatura de materiais zeolíticos.*

Historicamente, a utilização de moléculas orgânicas como agentes direcionadores representou um marco no desenvolvimento de silicatos sintéticos. Embora os primeiros estudos sobre síntese de silicatos remontem aos trabalhos pioneiros de Barrer¹⁶⁴, foi somente em 1961 que Barrer e Denny¹⁷⁸ demonstraram o emprego de aminas quaternárias durante a síntese de zeólitas, estabelecendo uma estratégia que permanece como um dos principais fundamentos da síntese moderna desses materiais^{176, 179}.

Os SDAs podem atuar por diferentes mecanismos durante a cristalização. Um dos mais importantes consiste na complementaridade estereoquímica e energética entre a molécula orgânica e a estrutura em formação, de modo que o SDA estabiliza preferencialmente determinadas cavidades e unidades estruturais, fenômeno tradicionalmente associado ao denominado *template effect*¹⁸⁰. Como consequência, essas espécies favorecem a formação de topologias específicas, influenciando características como a conectividade da rede cristalina e as dimensões dos poros¹⁷⁹.

A eficiência com que um SDA exerce essas funções depende de suas características moleculares, incluindo geometria, tamanho, carga, rigidez conformacional, polaridade e hidrofobicidade. Esses parâmetros governam as interações entre a molécula orgânica e as espécies presentes no gel precursor, afetando tanto a nucleação quanto o crescimento cristalino. Dessa forma, o desenvolvimento racional de novos agentes direcionadores tornou-se uma estratégia fundamental para acessar estruturas inéditas ou de difícil obtenção, bem como para controlar as propriedades estruturais dos silicatos sintetizados^{181, 182}.

Um exemplo ilustrativo do efeito direcionador dessas moléculas pode ser observado na síntese do material zeolítico SAPO-37, um silicoaluminofosfato que cristaliza na topologia FAU¹⁸³. Como demonstrado por Saldarriaga, Saldarriaga e Davis¹⁸³, esse material

*Na síntese de argilas, essas espécies químicas são comumente utilizadas como intercaladores, exercendo papel distinto.

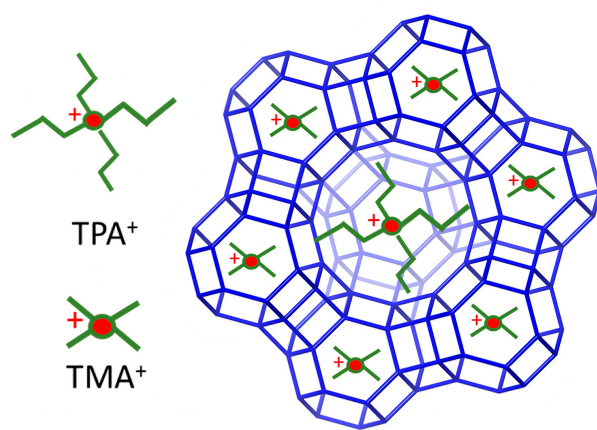


Figura 2.25: Síntese do material zeolítico SAPO-37 (FAU) utilizando a estratégia de *co-templating*: moléculas de TPA^+ direcionam a formação das *supercages*, enquanto moléculas de TMA^+ direcionam a formação das gaiolas sodalita. Fonte: Pour e Sebakhy¹⁸⁵

pode ser obtido por meio da estratégia denominada *co-templating*, na qual dois ou mais agentes direcionadores atuam de maneira cooperativa durante a cristalização, favorecendo simultaneamente a formação de diferentes unidades secundárias de construção (SBUs) que compõem a estrutura final. Durante a síntese, os autores empregam simultaneamente os cátions TMA^+ (tetrametilamônio) e TPA^+ (tetrapropilamônio) como agentes direcionadores (Figura 2.25). Devido às diferenças em suas dimensões moleculares, cada espécie apresenta maior afinidade por uma cavidade específica da estrutura FAU. O cátion TPA^+ , de maior volume molecular, favorece a formação das *supercages*, enquanto o cátion TMA^+ , significativamente menor, direciona preferencialmente a formação das gaiolas sodalita¹⁸⁴. Dessa forma, a arquitetura tridimensional característica da topologia FAU emerge da atuação cooperativa desses dois agentes direcionadores. Essa seletividade também se manifesta na cristalização em relação à composição do meio reacional. Em particular, a razão molar $\frac{\text{TMA}^+}{\text{TPA}^+}$ constitui um parâmetro crítico para a obtenção do SAPO-37. Variações nessa razão faz com que o sistema passe a favorecer a cristalização de outras fases, como SAPO-20 e SAPO-5, evidenciando que pequenas alterações na natureza ou na concentração dos SDAs podem modificar significativamente o caminho de cristalização¹⁸⁴.

A presença de agentes direcionadores orgânicos também mostrou-se indispensável para a obtenção de zeólitas com elevadas razões $\frac{\text{Si}}{\text{Al}}$. Como esses cátions apresentam menor densidade de carga do que os pequenos cátions inorgânicos, eles são menos eficientes em compensar as cargas negativas na estrutura. Assim, a cristalização tende a favorecer estruturas que requerem menor compensação eletrostática, o que resulta em uma menor incorporação de átomos de Al na rede cristalina^{181, 185, 186}. Esse efeito pode ser ilustrado pela evolução da família LTA. Na síntese dessa zeólita, a utilização de cátions tetrametilamônio (TMA^+) permitiu elevar a razão $\frac{\text{Si}}{\text{Al}}$ de 1 para 3, indicando que a incorporação de alumínio à rede cristalina é reduzida na presença do SDA orgânico¹⁸⁷. Posteriormente, substituindo parte do TMA^+ por cátions tetraetilamônio (TEA^+), de maior volume molecular, foi

possível elevar essa razão para aproximadamente 9, originando a zeólita UZM-9¹⁸⁷. A influência dos SDAs sobre a composição química da rede tornou-se ainda mais evidente com a obtenção da zeólita ITQ-29, uma LTA de puro silício ($\frac{\text{Si}}{\text{Al}} \rightarrow \infty$), sintetizada por meio da utilização de um SDA supramolecular¹⁸⁸.

Como mencionado, os SDAs também podem ser empregados para controlar as dimensões dos poros produzidos durante a cristalização. As zeólitas convencionais são materiais intrinsecamente microporosos (diâmetro de poro < 2 nm), característica que frequentemente limita sua aplicação em processos envolvendo moléculas grandes¹⁸⁵. Dessa forma, a obtenção de zeólitas contendo poros largos e extralargos, formados por anéis de 14 T, 18 T, 20 T, 28 T e 30 T, tornou-se uma das principais estratégias para contornar essas limitações^{189–191}.

Uma das maneiras de racionalizar a propriedade “porogênica” de um SDA consiste em relacionar seu tamanho com sua composição química. No caso de aminas quaternárias, por exemplo, uma estimativa inicial pode ser obtida pela razão entre o número de átomos de carbono e o número de átomos de nitrogênio ($\frac{\text{C}}{\text{N}}$). Investigando a síntese de germanossilicatos, Jiang et al.¹⁹² observaram que SDAs relativamente pequenos (ou mesmo de grande tamanho, mas flexíveis) tendem a direcionar a formação das chamadas estruturas padrão (*default structures*), como Beta, ITQ-7 e ITQ-17. Em contrapartida, à medida que SDAs mais rígidos e progressivamente maiores foram empregados, estruturas significativamente mais abertas passaram a ser obtidas. Enquanto os menores SDAs estudados ($\frac{\text{C}}{\text{N}} = 13$ e 14) produziram exclusivamente as estruturas Beta, ITQ-7 e ITQ-17, moléculas de dimensões ligeiramente superiores, ainda com $\frac{\text{C}}{\text{N}} = 14$, direcionaram a cristalização da zeólita ITQ-21, cuja densidade estrutural (*framework density*; $\text{FD} = \frac{T_{\text{átomos}}}{\text{volume}}$) é inferior à da ITQ-17 ($\text{FD} = 11.6$ e 14.6, respectivamente). O aumento adicional do tamanho molecular do SDA levou à obtenção da zeólita ITQ-44 ($\frac{\text{C}}{\text{N}} = 15$; $\text{FD} = 10.9$), caracterizada por um sistema de poros extragrandes constituído por anéis $18 \text{ T} \times 12 \text{ T} \times 12 \text{ T}$. Utilizando outro SDA com a mesma razão $\frac{\text{C}}{\text{N}} = 15$, foram obtidas simultaneamente as zeólitas ITQ-44, ITQ-15, contendo poros $14 \text{ T} \times 12 \text{ T}$, e a nova zeólita meso-microporosa ITQ-43, caracterizada por um sistema de poros $28 \text{ T} \times 12 \text{ T} \times 12 \text{ T}$. Finalmente, o maior SDA investigado pelos autores ($\frac{\text{C}}{\text{N}} = 17$) direcionou a cristalização da zeólita mesoporosa ITQ-37¹⁹².

É importante destacar que, apesar dos avanços no entendimento dos mecanismos envolvidos no direcionamento estrutural e do desenvolvimento de modelos capazes de orientar de forma cada vez mais racional o planejamento das rotas sintéticas¹⁶³, a predição do efeito de um determinado SDA (assim como da interação entre os diversos parâmetros envolvidos na cristalização) ainda permanece, em grande medida, baseada em procedimentos empíricos de tentativa e erro. Isso evidencia que, embora importantes progressos tenham sido alcançados, o desenvolvimento de novas estruturas zeolíticas e de novas rotas sintéticas continua representando um dos principais desafios da química de materiais.

2.5.2 Emprego de biomassa na síntese de silicatos

A síntese de materiais envolve não apenas aspectos relacionados à composição química e à estrutura cristalina obtida, mas também questões associadas ao consumo energético, à utilização de matérias-primas renováveis, à disponibilidade de recursos minerais e à geração de resíduos ao longo do processo de produção. De fato, a síntese de silicatos a partir de resíduos de biomassa tem recebido atenção crescente nas últimas décadas, sobretudo por possibilitar a substituição parcial ou total de reagentes convencionais por fontes naturais, promovendo a valorização de resíduos agroindustriais e contribuindo para os princípios da economia circular. Além dos benefícios ambientais associados à redução da disposição de resíduos em aterros ou à sua queima indiscriminada, essas estratégias podem reduzir significativamente o custo dos precursores empregados na síntese.

De maneira geral, entende-se por biomassa toda matéria de origem biológica, vegetal, animal ou microbiana, incluindo resíduos provenientes da agricultura, da indústria alimentícia, da silvicultura e até mesmo de atividades urbanas^{193, 194}. Em razão de sua ampla disponibilidade e renovabilidade, biomassa tem sido amplamente investigada como fonte alternativa de energia, combustíveis, materiais carbonáceos e precursores inorgânicos de interesse tecnológico^{193, 195, 196}. Estima-se, inclusive, que sua contribuição para a matriz mundial de energia renovável continue crescendo nas próximas décadas, impulsionando o desenvolvimento de tecnologias capazes de converter resíduos de baixo valor econômico em produtos de maior valor agregado^{196, 197}.

Trazendo essa abordagem para a síntese de materiais avançados, diferentes tipos de biomassa podem atuar como fontes naturais de elementos constituintes de materiais silicatos, ainda que, atualmente, a maior parte dos estudos concentra-se na obtenção de sílica amorfa a partir de resíduos vegetais ricos em silício. A utilização de biomassa como fonte de silício fundamenta-se na capacidade de diversas espécies vegetais de absorver ácidos silícicos (H_4SiO_4) presentes no solo e acumulá-los em seus tecidos durante o crescimento. Esse silício desempenha importante papel fisiológico nas plantas, aumentando sua resistência ao ataque de patógenos, ao estresse salino, à toxicidade por metais e à deficiência hídrica¹⁹⁸. Após tratamentos térmicos controlados, a fração orgânica pode ser removida, permanecendo apenas a cinza rica em SiO_2 , frequentemente na forma amorfa, que pode potencialmente ser empregada diretamente como precursor em sínteses hidrotérmicas ou submetida a etapas adicionais de purificação¹⁹⁹.

Diversos resíduos agrícolas têm sido explorados para essa finalidade, como a casca de arroz, sabugo de milho, folhas de bambu, bagaço de cana-de-açúcar e casca de coco^{200–203}. Entre eles, a casca de arroz representa um dos exemplos mais estudados, uma vez que corresponde a aproximadamente 20% da massa do grão e, após combustão controlada, origina uma cinza contendo aproximadamente 85 – 98% de SiO_2 , dependendo das condições de calcinação e da composição original da biomassa²⁰⁴. A temperatura de combustão exerce

influência direta sobre a reatividade desse precursor. Em geral, temperaturas inferiores a aproximadamente 600 °C preservam a sílica predominantemente amorfa, enquanto temperaturas mais elevadas favorecem sua cristalização, reduzindo sua solubilidade em meio alcalino e, conseqüentemente, sua reatividade durante a síntese hidrotermal²⁰⁵. Adicionalmente, tratamentos de lixiviação ácida são frequentemente empregados para remover impurezas metálicas e elevar a pureza da sílica para valores superiores a 99%²⁰⁵. A maior reatividade da sílica amorfa em relação ao quartzo está associada à sua estrutura desordenada, que apresenta maior energia livre e maior susceptibilidade à dissolução, favorecendo a formação de espécies reativas durante procedimentos de síntese²⁰⁶.

Diversos trabalhos demonstram a viabilidade dessa abordagem. Ng et al.²⁰⁷, por exemplo, obtiveram cinzas de folhas de bambu contendo aproximadamente 99.4% de SiO₂ após tratamentos ácido e térmico, empregando esse material como única fonte de silício para a síntese hidrotérmica da zeólita A. Os autores verificaram que parâmetros como composição do gel, temperatura e tempo de cristalização influenciaram significativamente a pureza da fase obtida, a morfologia e a distribuição de tamanho dos cristais²⁰⁷. Em outro exemplo, He et al.²⁰⁸ converteram cinzas volantes (*fly ashes*; produzidas a partir da queima de carvão mineral²⁰⁹) no material zeolítico sodalita por síntese hidrotérmica, obtendo um adsorvente com capacidade significativamente superior para remoção de metais pesados quando comparado ao resíduo original, demonstrando o potencial de agregação de valor a resíduos industriais²⁰⁸.

Note que o potencial da biomassa não se restringe à obtenção de sílica. Diferentes resíduos naturais podem atuar como fontes de outros elementos constituintes dos silicatos. Um exemplo representativo foi apresentado por Anjaneyulu e Sasikumar²¹⁰, que sintetizaram wollastonita (CaSiO₃) empregando cascas de ovos como fonte de cálcio e glicina como combustível em uma rota sol-gel seguida por calcinação, obtendo um material monofásico constituído por partículas nanométricas²¹⁰. Estratégias dessa natureza evidenciam que resíduos biológicos podem substituir simultaneamente diferentes reagentes convencionais, ampliando o potencial da síntese sustentável de silicatos para além da simples substituição das fontes de silício.

Apesar das vantagens apresentadas, a utilização de biomassa ainda impõe desafios relevantes. A composição química desses resíduos pode variar significativamente em função de sua origem, dos processos biológicos envolvidos em sua formação e dos tratamentos aplicados antes de sua utilização. Essa variabilidade pode dificultar a reprodutibilidade das rotas sintéticas quando se deseja obter materiais de composição rigorosamente controlada, especialmente em sistemas em que a cristalização é particularmente sensível à composição do meio reacional. Nesses casos, pequenas quantidades de espécies imprevistas podem interferir na especiação em solução, na cinética de nucleação, no crescimento cristalino e, conseqüentemente, favorecer a formação de impurezas. Ainda assim, a literatura atual demonstra que o aproveitamento de biomassa representa uma das estratégias mais

promissoras para o desenvolvimento de rotas sustentáveis de síntese, conciliando redução de impactos ambientais, valorização de resíduos e produção de materiais avançados destinados às mais diversas aplicações tecnológicas e biomédicas.

2.6 Cicatrização: Processos pós-hemostasia

A formação do coágulo não marca o fim da resposta fisiológica a uma lesão, mas o início de uma série de eventos coordenados destinados ao restabelecimento da integridade tecidual. Uma vez estabelecida a hemostasia, inicia-se o processo de cicatrização, tradicionalmente dividido em três etapas: inflamação, proliferação e maturação. Como ilustrado na Figura 2.26, essas fases não ocorrem de forma estritamente sequencial, havendo períodos de concomitância²¹¹.

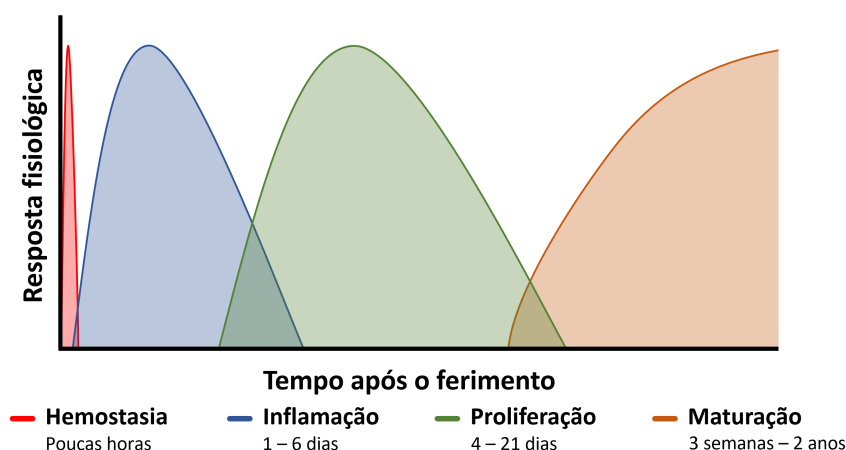


Figura 2.26: Etapas do processo de cicatrização. Fonte: Adaptação de Przekora²¹¹

A fase inflamatória (Figura 2.27) constitui a primeira etapa do processo de cicatrização e dura aproximadamente de 1 – 6 dias. Nesse período, células do sistema imune, como neutrófilos e monócitos, são recrutadas para o local da lesão em resposta a citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas liberadas por plaquetas e células danificadas²¹². Os neutrófilos atuam inicialmente na remoção de restos celulares e microrganismos por fagocitose. Em seguida, os monócitos diferenciam-se em macrófagos, que dão continuidade a esse processo e passam a secretar fatores de crescimento, como o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) e o fator de crescimento transformador beta ($TGF-\beta$), preparando o microambiente para a fase proliferativa²¹³.

A fase proliferativa (Figura 2.27) ocorre aproximadamente entre 4 – 21 dias após a lesão e caracteriza-se pela formação do tecido de granulação. Nesse estágio, fibroblastos, queratinócitos e células endoteliais são ativados por fatores de crescimento, como o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e o $TGF-\beta$ ^{213, 214}. Os fibroblastos migram para a região lesionada e iniciam a síntese de colágeno tipo III e de outros componentes da matriz extracelular. Paralelamente, a angiogênese, mediada principalmente pelo VEGF,

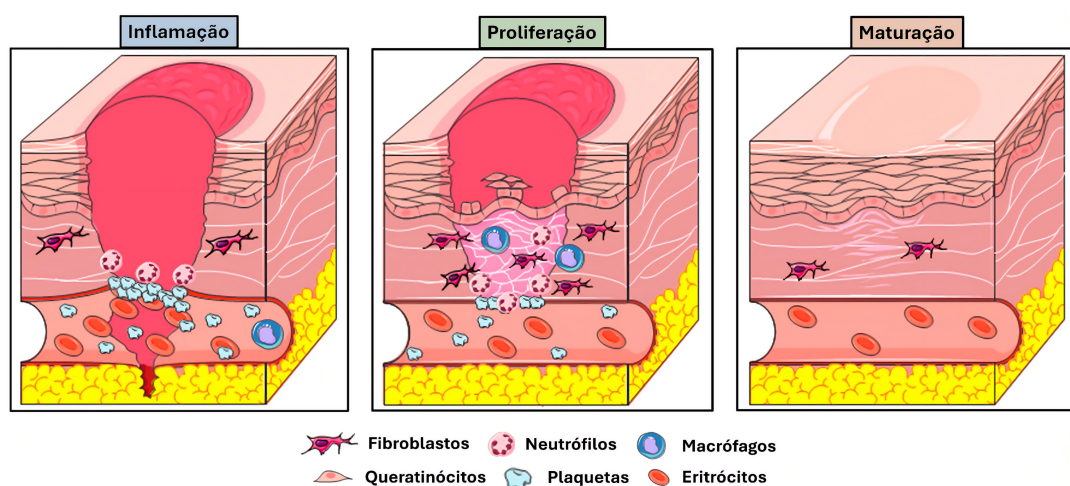


Figura 2.27: Representação simplificada das fases do processo de cicatrização. Fonte: Adaptação de Gushiken et al.²¹²

promove a formação de novos vasos sanguíneos, assegurando o suprimento de oxigênio e nutrientes necessários à intensa atividade celular característica dessa fase²¹⁵.

É sabido que íons Zn^{2+} desempenham papel relevante ao longo de todo o processo de cicatrização, participando da modulação da resposta inflamatória e da atividade de diversas enzimas antioxidantes. Entretanto, sua atuação torna-se particularmente importante durante a fase proliferativa. Esses íons participam da ativação e proliferação de fibroblastos e queratinócitos e atuam como cofatores de enzimas envolvidas na replicação de DNA e na síntese proteica, processos fundamentais para a proliferação celular^{216, 217}. Além disso, o zinco regula a atividade das metaloproteinases da matriz (MMPs), responsáveis pela remodelação da matriz extracelular e pela criação de condições favoráveis ao crescimento celular²¹⁷. Como consequência, deficiências desse elemento podem comprometer a síntese de colágeno, retardando a formação de tecido de granulação e a reepitelização.

A fase de maturação (Figura 2.27), também denominada fase de remodelação, corresponde à etapa final do reparo tecidual. Inicia-se aproximadamente 21 dias após a lesão e pode se estender por meses ou até anos. Durante esse período, o colágeno tipo III inicialmente depositado é gradualmente substituído por colágeno tipo I, que confere maior resistência mecânica ao tecido²¹⁸. Simultaneamente, a matriz extracelular é remodelada pela ação das MMPs, enquanto miofibroblastos promovem a contração da ferida. O excesso de vascularização é progressivamente reduzido e o tecido cicatricial adquire suas características finais²¹³.

2.7 Controle de infecções

Como discutido anteriormente, o processo de cicatrização consiste em uma sequência coordenada de eventos biológicos que envolvem inflamação, proliferação e maturação. A

presença de microrganismos no sítio lesionado pode interferir diretamente nessas etapas, uma vez que a resposta inflamatória desencadeada pela infecção tende a permanecer ativa por períodos prolongados, levando à produção excessiva de espécies reativas, enzimas proteolíticas e mediadores inflamatórios que comprometem a migração celular, a deposição de matriz e a reorganização do tecido recém-formado. Dessa forma, além do dano inicial causado pela própria lesão, a colonização microbiana pode transformar o processo regenerativo em um estado inflamatório persistente, retardando o fechamento da ferida e favorecendo o desenvolvimento de feridas crônicas^{219, 220}.

Via de regra, os mesmos ferimentos abertos associados a hemorragias são particularmente suscetíveis à contaminação microbiana, uma vez que a ruptura da barreira epitelial expõe tecidos internos a microrganismos presentes no ambiente. De fato, toda ferida torna-se contaminada logo após sua formação. Entretanto, a simples presença de microrganismos não implica, necessariamente, o estabelecimento de uma infecção. A evolução do estado microbiológico da ferida é atualmente descrita pelo conceito de *wound infection continuum*, que estabelece uma progressão contínua desde a contaminação até a infecção sistêmica^{221, 222}. Durante as fases iniciais, os microrganismos permanecem restritos à superfície da lesão e coexistem com o hospedeiro sem provocar resposta inflamatória significativa. Contudo, com o avanço da colonização microbiana inicia-se a invasão tecidual e surgem manifestações clínicas de infecção, como eritema, secreção purulenta e atraso na cicatrização. Caso esse processo não seja controlado, a infecção pode disseminar-se para tecidos adjacentes ou alcançar a circulação sanguínea e linfática, distribuindo-se pelo corpo todo²²³⁻²²⁵.

Embora avanços significativos tenham sido alcançados no controle de agentes infecciosos por meio do desenvolvimento de terapias antimicrobianas, a eficácia desses tratamentos tem sido progressivamente comprometida pelo aumento da resistência microbiana. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), a resistência antimicrobiana representa uma das principais ameaças à saúde global, uma vez que microrganismos anteriormente suscetíveis a determinados agentes terapêuticos passaram a apresentar suscetibilidade reduzida ou resistência completa aos tratamentos disponíveis²²⁶. Os impactos desse fenômeno são particularmente relevantes em ambientes hospitalares, nos quais a alta concentração de pacientes imunocomprometidos, a realização frequente de procedimentos invasivos e a utilização de dispositivos médicos favorecem a disseminação de patógenos. Como consequência, infecções associadas ao atendimento hospitalar (*Healthcare-Associated Infections*; HAIs), incluindo infecções relacionadas a implantes, cateteres e feridas cirúrgicas, são frequentemente responsáveis por complicações clínicas, prolongamento das internações e aumento dos custos hospitalares^{227, 228}.

Desde a descoberta da penicilina em 1928 por Alexander Fleming, o controle de infecções esteve fortemente associado ao emprego de antibióticos, moléculas capazes de interferir em processos essenciais para a sobrevivência bacteriana, como síntese da parede

celular, replicação do DNA, síntese proteica e metabolismo energético²²⁹. Entretanto, o uso intensivo e, muitas vezes, indiscriminado desses compostos exerceu forte pressão seletiva sobre populações microbianas, favorecendo a seleção e disseminação de mecanismos de resistência. Em geral, antibióticos convencionais de baixa massa molecular são projetados para atuar sobre um único alvo molecular ou uma única via bioquímica essencial ao microrganismo²³⁰. Esse mecanismo de ação altamente específico, baseado em um único alvo molecular os torna particularmente vulneráveis ao surgimento de resistência, uma vez que alterações em um único alvo molecular podem ser suficientes para comprometer sua atividade. De fato, a primeira observação de resistência à penicilina foi relatada em 1940 por Abraham e Chain²³¹, apenas doze anos após sua descoberta e antes mesmo de sua ampla introdução na prática clínica²²⁹. A resistência foi identificada em uma cepa da bactéria *B. coli*, e foi atribuída à produção de uma enzima que à época recebeu o nome pouco criativo de *penicilinase*, capaz de hidrolisar a penicilina. Poucos anos depois, cepas hospitalares de *Staphylococcus aureus* resistentes à penicilina já haviam sido identificadas²³², marcando o início de um problema que se intensificaria nas décadas seguintes. Atualmente, estima-se que a resistência antimicrobiana seja responsável por aproximadamente 700 mil mortes anuais e que esse número possa atingir 20 milhões de mortes por ano até 2050, caso medidas efetivas não sejam adotadas^{233–235}.

Além do surgimento de resistência antimicrobiana, muitas terapias antimicrobianas convencionais apresentam limitações relacionadas à dificuldade de alcançar populações bacterianas organizadas em biofilmes ou microrganismos sequestrados no interior das células hospedeiras²³⁶. Para fins de contextualização, biofilmes consistem em comunidades estruturadas de microrganismos aderidas entre si e a uma superfície, envolvidas por uma matriz extracelular composta por polissacarídeos, proteínas, lipídios e ácidos nucleicos extracelulares^{237, 238}. Embora possam ser constituídos por uma única espécie, são frequentemente formados por comunidades microbianas multiespécies²³⁹. Essa organização confere aos microrganismos um microambiente protetor que dificulta a difusão de agentes antimicrobianos, reduz sua suscetibilidade à ação do sistema imune e favorece o estabelecimento de infecções persistentes.

Diante desse cenário, diversos compostos vêm sendo investigados como alternativas ou complementos aos antibióticos convencionais, dentre os quais podemos destacar os metais^{240, 241}.

2.7.1 Metais

Os íons metálicos desempenham papel fundamental nos processos biológicos de praticamente todos os organismos vivos. Em bactérias, enzimas contendo sítios metálicos catalisam aproximadamente metade de todas as reações bioquímicas, tornando indispensável a manutenção da homeostase desses elementos em uma estreita faixa de concentração:

suficientemente alta para suprir as demandas metabólicas, mas baixa o bastante para evitar efeitos tóxicos²⁴². Embora o conhecimento acerca da participação dos metais nos processos celulares permaneça em constante evolução, sabe-se atualmente que os metais de transição da primeira série (manganês (Mn), ferro (Fe), cobalto (Co), níquel (Ni), cobre (Cu) e zinco (Zn)) são essenciais para a maioria dos organismos²⁴³. Essa dependência é tão marcante que o próprio sistema imunológico do hospedeiro a explora como mecanismo de defesa contra infecções por meio da modulação da disponibilidade desses elementos, fenômeno conhecido como imunidade nutricional^{244–247}. Um exemplo é a proteína lipocalina, responsável por dificultar a aquisição de ferro pelas bactérias ao sequestrar os sideróforos utilizados para capturar esse metal no ambiente²⁴⁸. De forma semelhante, a calprotectina promove a restrição de manganês nos sítios de infecção²⁴⁹, enquanto mecanismos adicionais, como a quelação extracelular e o transporte intracelular desse elemento, também contribuem para reduzir sua disponibilidade ao redor das bactérias invasoras^{244, 250}.

A estreita relação entre metais e metabolismo microbiano faz com que esses elementos sejam explorados terapeuticamente há milhares de anos²⁵¹. No início do século XX, por exemplo, o composto arsenical *Salvarsan* tornou-se o primeiro tratamento efetivo para a sífilis, doença bacteriana causada por *Treponema pallidum*²⁵². Da mesma forma, compostos à base de antimônio vêm sendo empregados há séculos no tratamento da leishmaniose, permanecendo os antimoniais pentavalentes [Sb(V)] como uma das principais opções terapêuticas para essa doença^{253, 254}. Esses exemplos ilustram que a utilização de metais com finalidade antimicrobiana antecede em muito o desenvolvimento dos antibióticos modernos e continua despertando interesse no desenvolvimento de novos agentes terapêuticos. A diversidade de metais atualmente investigados para aplicações antimicrobianas é apresentada na Figura 2.28, que destaca os elementos presentes em compostos submetidos ao programa CO-ADD (*Community for Open Antimicrobial Drug Discovery*) até o ano de 2020.

De maneira geral, a atividade antimicrobiana dos metais distingue-se por seu caráter multifacetado. Diferentemente da maioria dos antibióticos convencionais, cuja ação está associada à inibição de um alvo molecular específico, espécies metálicas são capazes de interferir simultaneamente em diferentes processos celulares, comprometendo a integridade estrutural da célula, o metabolismo energético e a estabilidade de biomoléculas essenciais. Como consequência, a aquisição de resistência torna-se significativamente mais complexa, uma vez que a sobrevivência bacteriana passa a depender da adaptação simultânea a múltiplos mecanismos de toxicidade²⁵⁵.

Dentre os diversos metais investigados para aplicações antimicrobianas, a prata merece destaque tanto sob a perspectiva histórica quanto em aplicações biomédicas contemporâneas^{256–259}. Atualmente, compostos à base de prata são empregados em uma ampla variedade de produtos médicos, incluindo curativos, pomadas, cateteres e revestimentos para dispositivos biomédicos²⁶⁰. Embora a prata possa ser incorporada sob diferentes formas químicas, considera-se que sua atividade antimicrobiana decorra

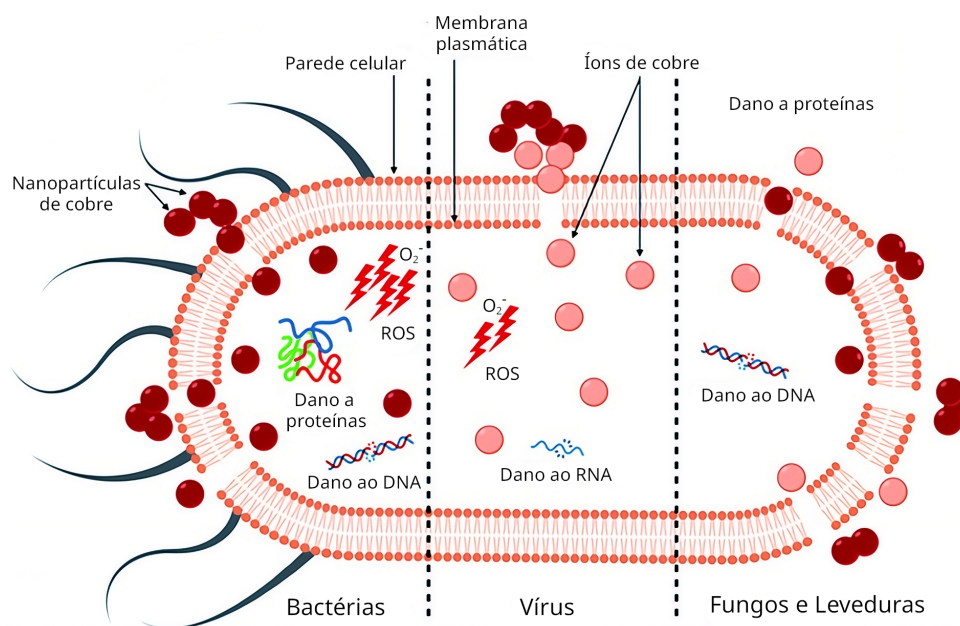


Figura 2.29: Mecanismos de ação antimicrobiana de nanopartículas de cobre. Fonte: Adaptação de Salah, Parkin e Allan²⁷³

material sólido registrado pela *U.S. Environmental Protection Agency* (EPA) como possuidor de propriedades antimicrobianas intrínsecas²⁶⁷. Na área biomédica, materiais à base de cobre também vêm despertando interesse crescente para o desenvolvimento de curativos e revestimentos para dispositivos médicos, havendo relatos de formulações com desempenho antimicrobiano superior ao de materiais análogos contendo prata²⁶⁸.

Assim como observado para a prata, a atividade antimicrobiana do cobre resulta da atuação simultânea de diferentes mecanismos de toxicidade. Entre os principais mecanismos descritos na literatura destacam-se danos à membrana celular, inibição de proteínas e enzimas essenciais, desregulação da homeostase redox e indução da formação de espécies reativas de oxigênio, os quais atuam de forma complementar comprometendo a integridade estrutural e o metabolismo bacteriano^{268, 269}. Além disso, diversos estudos demonstram que espécies cúpricas podem atuar de forma sinérgica com antibióticos e agentes antifúngicos, potencializando sua atividade antimicrobiana e ampliando o espectro de ação desses compostos^{270–272}. Os principais mecanismos propostos para explicar a atividade antimicrobiana de nanopartículas de cobre são apresentados na Figura 2.29.

Apesar da eficácia apresentada por espécies metálicas, é importante reconhecer que elas também estão sujeitas aos processos evolutivos que conduzem ao surgimento de tolerância microbiana. No caso do cobre, estudos genéticos demonstram que bactérias podem responder à exposição prolongada por meio da ativação de sistemas específicos de transporte, homeostase e efluxo, capazes de reduzir a concentração intracelular do metal e, conseqüentemente, sua toxicidade²⁷⁴. De forma semelhante, mecanismos de tolerância também já foram descritos para a prata, embora a ocorrência de resistência a espécies metálicas permaneça significativamente menos frequente do que aquela observada para

antibióticos convencionais²⁷⁵. Esses resultados não reduzem o potencial dos metais como agentes antimicrobianos, mas evidenciam que o desenvolvimento de novos materiais deve considerar não apenas sua atividade biológica imediata, como também estratégias capazes de modular a disponibilidade e a liberação dos íons metálicos, conciliando elevada eficácia antimicrobiana com menor pressão seletiva sobre as populações microbianas.

Por fim, é importante ressaltar que nenhum agente antimicrobiano conhecido pode ser considerado completamente imune ao surgimento de resistência microbiana. A evolução constitui uma consequência inerente da pressão seletiva exercida sobre populações bacterianas, independentemente da natureza do agente utilizado. Nesse contexto, a principal vantagem dos materiais metálicos não reside na impossibilidade de seleção de cepas resistentes, mas no fato de sua ação multifacetada elevar substancialmente a barreira evolutiva necessária para o desenvolvimento de mecanismos adaptativos. Dessa forma, o desenvolvimento de novos materiais antimicrobianos deve concentrar-se não apenas na maximização da atividade biológica, mas também em estratégias capazes de reduzir a pressão seletiva exercida sobre os microrganismos, conciliando elevada eficácia com maior robustez frente aos processos evolutivos.

2.8 Materiais multifuncionais

A ciência dos materiais se baseia na premissa de que a composição química, a estrutura e a microestrutura de uma substância podem ser manipuladas de forma controlada para produzir materiais com propriedades físico-químicas específicas, visando desempenho superior em determinada aplicação. Nas últimas décadas, entretanto, a simples otimização de uma propriedade isolada deixou de constituir o principal objetivo de muitos projetos de materiais. Em seu lugar, surgiu o conceito de materiais multifuncionais, sistemas capazes de reunir, em uma única plataforma, diferentes funções que atuam de forma complementar para atender simultaneamente a múltiplas demandas de uma aplicação^{276, 277}. É importante notar que a presença simultânea de diferentes propriedades não garante, por si só, um comportamento multifuncional eficiente. O desempenho do sistema passa a depender também das interações existentes entre os diferentes mecanismos de atuação, que podem ocorrer de forma cooperativa ou antagônica. Dessa forma, a avaliação de materiais multifuncionais exige uma abordagem integrada, na qual o comportamento do conjunto não pode ser previsto apenas a partir das propriedades individuais de cada componente²⁷⁷.

Esse conceito tem sido explorado em diferentes áreas da ciência dos materiais. Em catálise, por exemplo, podemos citar sistemas que combinam atividade catalítica com propriedades magnéticas e capacidade de monitoramento remoto de temperatura, enquanto outros integram diferentes tipos de sítios catalíticos ativos em um mesmo sólido, permitindo a realização de reações em cascata^{278, 279}. No contexto biomédico, entretanto, a incorporação de múltiplas funções torna-se particularmente relevante em virtude da

complexidade dos sistemas biológicos.

Como discutido anteriormente, a regeneração tecidual, por exemplo, envolve uma sequência coordenada de eventos fisiológicos, na qual diferentes processos ocorrem de maneira simultânea e interdependente. Em consequência, materiais destinados ao tratamento de lesões raramente precisam desempenhar apenas uma única função. Além de controlar possíveis infecções, esses materiais frequentemente devem favorecer a proliferação celular, estimular a angiogênese, modular a resposta inflamatória, absorver exsudatos e manter um ambiente adequado para a regeneração do tecido lesionado. A integração dessas diferentes funcionalidades em um único material constitui, portanto, uma estratégia particularmente promissora para aplicações em engenharia de tecidos e cicatrização de feridas^{280, 281}.

Diversos trabalhos ilustram essa abordagem. Merrell et al.²⁸², por exemplo, prepararam nanofibras de policaprolactona (PCL) contendo curcumina, reunindo em um único sistema propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias e antimicrobianas²⁸². Em outro estudo, Nasef et al.²⁸³ desenvolveram uma membrana de hidrogel baseada em PVA e quitosana contendo nanopartículas de prata e vitamina E. Nesse caso, a prata conferiu atividade antimicrobiana, enquanto a vitamina E contribuiu para minimizar o estresse oxidativo, resultando em um material com propriedades promissoras para aplicações como curativo^{283, 284}.

Outro exemplo do conceito de multifuncionalidade são os chamados materiais teranósticos (*theranostic materials*), projetados para integrar, em uma única plataforma, funções terapêuticas e diagnósticas. Nesses sistemas, além de atuar diretamente no tratamento da doença, o material fornece informações sobre seu estado ou sobre a evolução do processo patológico, permitindo monitoramento em tempo real. Mingot et al.²⁸⁵, por exemplo, desenvolveram uma espuma de poliuretano funcionalizada com nanopartículas core/shell de ouro-quitosana (Au/CS) ou prata-lignina fenolada (Ag/PL), recobertas por um hidrogel termossensível, constituindo uma plataforma teranóstica para o monitoramento e o tratamento de infecções bacterianas. A função diagnóstica foi baseada na detecção *in situ* de biofilmes bacterianos por Espectroscopia Raman Amplificada por Superfície (*Surface-Enhanced Raman Spectroscopy*; SERS), utilizando moléculas repórteres imobilizadas sobre as nanopartículas metálicas. A função terapêutica foi obtida pela combinação da atividade antimicrobiana intrínseca das nanopartículas com a ablação fototérmica induzida por irradiação no infravermelho próximo (NIR), que potencializou significativamente a eliminação de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* sem promover aquecimento macroscópico do dispositivo. Os autores destacam que essa estratégia permite integrar a detecção e a erradicação bacteriana em uma única plataforma, representando uma abordagem promissora para o tratamento de infecções associadas a implantes biomédicos. No campo dos materiais zeolíticos, Vilaca et al.²⁸⁶ propuseram um nanocompósito híbrido constituído por uma zeólita NaY funcionalizada com nanopartículas superparamagnéticas de magnetita (Fe_3O_4), visando o desenvolvimento de uma plataforma para aplicações

teranósticas. Nesse sistema, as nanopartículas de magnetita atuaram como agentes de contraste para ressonância magnética, enquanto a zeólita foi empregada como uma plataforma com reconhecida capacidade de encapsulamento e liberação de fármacos, previamente demonstrada na literatura. Embora o trabalho tenha validado experimentalmente apenas a funcionalidade de imageamento por MRI, os autores propuseram que a combinação dessa capacidade diagnóstica com o potencial de entrega de fármacos e de hipertermia magnética conferiria ao material características promissoras para futuras aplicações teranósticas.

Em síntese, a estratégia de desenvolvimento de materiais multifuncionais amplia significativamente o espaço de projeto de novos sistemas, ao mesmo tempo em que evidencia a necessidade de compreender e controlar as interações entre diferentes funções em um mesmo material.

Capítulo 3

Artigo I: De biomassa a materiais hemostáticos

Neste capítulo é apresentado um trabalho publicado por nosso grupo de pesquisa em setembro de 2025 na revista *European Journal of Inorganic Chemistry*. O artigo aborda um problema ainda pouco explorado na literatura: o desenvolvimento de materiais silicatos ricos em cálcio obtidos a partir de resíduos de biomassa inorgânica para aplicação como agentes hemostáticos. Embora o emprego de materiais inorgânicos na contenção de hemorragias já seja conhecido, inexistiam, até onde foi possível verificar, estudos demonstrando a síntese de silicatos cristalinos de cálcio derivados de casca de ovo e avaliando sistematicamente a relação entre sua estrutura, propriedades físico-químicas e desempenho na promoção da coagulação sanguínea. O trabalho busca preencher essa lacuna, conciliando sustentabilidade, baixo custo e funcionalidade. Íons Ca^{2+} desempenham papel fundamental na coagulação sanguínea, como discutido na seção 2.2.1, tornando esses materiais candidatos promissores para essa aplicação.

A estratégia adotada para obtenção de rotas viáveis para síntese hidrotermal desses materiais foi o uso de moléculas orgânicas conhecidas por sua ação direcionadora de estrutura na cristalização de silicatos (vide seção 2.5). No presente artigo, as moléculas em questão são os hidróxidos das aminas quaternárias tetraetilamônio ($\text{TEA} \cdot \text{OH}$), tetrapropilamônio ($\text{TPA} \cdot \text{OH}$) e tetrabutylamônio ($\text{TBA} \cdot \text{OH}$).

Como será discutido ao longo do capítulo, determinadas condições de síntese conduziram à formação de fases pouco promissoras para aplicações hemostáticas, enquanto outras favoreceram a cristalização da rhodesita. Um dos principais resultados do trabalho foi demonstrar que a utilização de moléculas direcionadoras de estrutura possibilita obter variantes desse silicato com características texturais substancialmente distintas daquelas descritas para a rhodesita convencional. Embora esse mineral seja tradicionalmente considerado um material não poroso, os materiais sintetizados apresentaram mesoporosidade e áreas superficiais significativamente superiores às previamente reportadas para essa fase cristalina. Esse resultado evidencia que a estratégia sintética empregada modifica não apenas a fase obtida, mas também sua organização estrutural, produzindo materiais potencialmente mais eficientes para aplicações que dependem de elevada área superficial.

Além da caracterização estrutural, morfológica e textural dos materiais sintetizados, o trabalho avaliou seu desempenho por meio de diferentes ensaios de coagulação sanguínea. Os resultados obtidos permitiram correlacionar propriedades físico-químicas dos materiais com sua performance hemostática, evidenciando o potencial de cálcio-silicatos cristalinos

derivados de resíduos como agentes hemostáticos de baixo custo e elevado valor agregado.

O material suplementar submetido junto ao artigo está disponível nesta tese no Apêndice A.

Biomass-Derived Porous Crystalline Calcium–Silicates Synthesized from Chicken Eggshell Waste Using Organic Amine Templates: A Case Study for Potential Hemostatic Application

Guilherme de Paula Guarnieri^[a], Oscar Antonio Niño Santisteban^[a], Erick Paiva Cancelli^[a], Eduardo Ribeiro de Azevedo^[b], Ivana Conte Cosentino^[c], Lucildes Pita Mercuri^[d], Marcelo Larami Santoro^[e], Moacir Fernandes de Godoy^[f] and José Geraldo Nery^{*[a]}

^[a] Department of Physics, São Paulo State University, Cristóvão Colombo Street 2265, Jardim Nazareth, São José do Rio Preto, SP 15054-000, Brazil. * geraldo.nery@unesp.br

^[b] São Carlos Institute of Physics, University of São Paulo, Av. Trab. São Carlense 400, Parque Arnold Schmidt, São Carlos, SP 13566-590, Brazil.

^[c] Institute for Energy and Nuclear Research, University of São Paulo, Prof. Lineu Prestes Avenue 2242, Cidade Universitária, Butantã, São Paulo, SP 05508-000, Brazil.

^[d] Department of Exact and Earth Sciences, Faculty of Chemistry, Federal University of São Paulo, Prof. Artur Riedel Street 275, Eldorado, Diadema, SP 09972-270, Brazil.

^[e] Central Animal Facility and Higher School of the Butantan Institute, State Health Department of São Paulo, Av. Vital Brasil 1500, Butantã, São Paulo, SP 05503-900, Brazil.

^[f] Department of Cardiology and Vascular Surgery, Medicine Faculty of São José do Rio Preto, Av. Brg. Faria Lima 5416, Vila São Pedro, São José do Rio Preto, SP 15090-000, Brazil.

Supporting information for this article is given via a link at the end of the document.

Abstract: Uncontrollable hemorrhage is a major cause of mortality in accidents, trauma, and medical procedures, highlighting the need for effective hemostatic agents. Zeolites and similar materials are promising due to their adsorption properties and ability to concentrate coagulation factors. This study reports the synthesis of calcium–silicates from chicken eggshell waste using TEA·OH, TPA·OH, and TBA·OH as templates. TPA·OH and TBA·OH directed the formation of rhodesite, a fibrous calcium–silicate, while TEA·OH resulted in quartz. Materials synthesized with TPA·OH and TBA·OH had surface areas of $53.3 - 100.3 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ and mesopores ranging from $5.7 - 27.7 \text{ nm}$ with pore volumes of $0.018 - 0.11 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$. *in vitro* coagulation assays (PT, aPTT) revealed that CaZ-3 and CaZ-4 activate factors within the contact system. The recalcification assay showed a significant reduction in clotting time, indicating action via the intrinsic pathway. Thromboelastographic analysis confirmed high hemostatic performance: the material prepared with TBA·OH showed a shorter clot formation time ($R = 1.8 \pm 0.5 \text{ min}$) and higher maximum clot strength ($MA = 52.1 \pm 1.3 \text{ mm}$) than QuikClot, demonstrating its potential as an effective, waste-derived hemostatic agent.

3.1 Introduction

Hemorrhage, defined as uncontrolled and excessive bleeding, is a condition that may be caused by physical traumas, surgical complications, or underlying physiological abnormalities. It constitutes a critical medical emergency, demanding immediate attention and effective intervention^{2, 3}. The complexities inherent in managing hemorrhagic events arise from the intricate interplay of various physiological systems, such as the coagulation cascade, platelet function, and vascular dynamics, which collectively contribute to the delicate balance between clot formation and bleeding control in the human body²⁸⁷. Despite advances in surgical techniques and medical interventions, managing hemorrhage continues to present significant hurdles, particularly in scenarios where conventional methods are insufficient or impractical^{4, 288}. In these cases, hemostatic agents can be employed to promote coagulation, helping to control the bleeding. In a broader context, hemostatic agents must fulfill criteria such as prompt action, non-antigenicity, ease of application and removal, cost-effectiveness, stability, transportability, and minimal side effects. Over the past decades, comprehensive reviews detailing the action mechanisms, functionality, mode of delivery, and clinical studies of available topical hemostatic agents have been published in the literature^{97, 289}. Topical hemostatic agents can be categorized into three classes: mucoadhesive agents, procoagulant supplementers, and factor concentrators. Due to their adsorption properties and ability to concentrate coagulation factors and platelets in hemorrhaging blood, zeolites stand out as excellent hemostatic agents.

Over the past two decades, various inorganic biomaterials, including zeolites, have been developed. Zeolites are crystalline aluminosilicates with a porous structure that promotes water adsorption, thereby concentrating platelets and clotting factors at the application site²⁹⁰. Additionally, their negatively charged surface can activate positively charged factor XII, initiating the endogenous coagulation cascade⁸⁸. Recent studies have elucidated additional molecular mechanisms, such as the capability of calcium-exchanged zeolites to serve as a solid-phase scaffold for the formation of prothrombinase-like complexes by interacting with coagulation factor Xa, leading to the production of significantly elevated levels of thrombin in comparison to platelet-based activation^{89, 291}. Although the mechanisms of zeolite-induced hemostasis are not fully comprehended yet, these unique characteristics led to the development of the first commercial zeolite-based hemostatic product, introduced in 2002 as first-aid equipment for the U.S. military under the tradename QuikClot®. More recently, other inorganic materials, such as mesoporous silica, graphene oxides (GO), graphene/montmorillonite composite sponges (GMCS), and graphene-immobilized montmorillonite (MMT), have been synthesized and systematically investigated for their hemostatic properties^{56, 87}. Nevertheless, it is important to note that these hemostatic agents based on inorganic biomaterials have advantages and disadvantages, as widely discussed in the literature^{290, 292–294}. It has been pointed out that there

are challenges in the preparation of active inorganic-based biomaterials with enhanced hemostatic properties, taking into consideration both functional and application aspects²⁹². Inorganic biomaterial-based hemostatic agents present both advantages and limitations, with challenges persisting in the design of functionally optimized materials for clinical use. Although not addressed in this study, emerging tools such as artificial intelligence (AI) and machine learning (ML) may, in future research, support the rational design of inorganic nanostructures with improved biocompatibility and hemostatic efficacy^{295–297}.

Historically, a challenge in employing zeolites as hemostatic agents has been the exothermic reaction that can raise the temperature in the vicinity of the application site by as much as 90 °C, potentially causing severe tissue damage (such as burns). Techniques that have been employed to overcome this problem include pre-hydrating the zeolite to decrease the exothermicity of water absorption^{290, 298}, the incorporation of other minerals such as bentonite²⁹⁹ or phyllosilicates (smectite³⁰⁰, kaolin²⁹⁰, halloysite³⁰¹), or reducing the zeolite particle size to the nanometric scale, thereby minimizing heat generation⁹². The human blood coagulation system is a complex network of interconnected glycoproteins that, upon activation, initiate a cascade of enzymatic reactions culminating in the formation of fibrin. This process, known as hemostasis, is essential for the cessation of bleeding. Hemostasis exemplifies a molecular machinery paradigm, where the orchestrated assembly of substrates, enzymes, protein cofactors, and calcium ions on a phospholipid interface drastically accelerates coagulation rates³⁰².

Calcium ions play a pivotal role in triggering the coagulation cascade, as illustrated in Figure 3.1²⁹⁰. At a molecular level, hemostasis entails a sequence of events primarily governed by serine proteases within the coagulation cascade, ultimately resulting in the conversion of fibrinogen to fibrin by thrombin. Upon vessel injury, extravasated blood encounters abundant tissue factor (TF) within the surrounding tissues. TF, acting as a cofactor, forms a complex with factor VIIa, initiating the extrinsic pathway of coagulation.

Although there are around 258 zeolites with different frameworks that confer unusual and interesting topologies and structures of channels and cavities⁸⁴, only five of them are produced in large amounts for a wide range of applications. This group of zeolites is known as the “Big Five” (FER, MOR, MFI, FAU, and BEA)³⁰³, with only FAU zeolites having been used as hemostatic agents^{304, 305}, despite the small quantity of extra-framework calcium cations, when compared to the natural counterpart. However, calcium-rich zeolites such as wairakite, scolecite, and gismondine occur worldwide as major constituents of submarine volcanic sediments and as alteration products of volcanic glass in low-grade metavolcanics and metaclastics³⁰⁶. These natural calcium zeolites have been known since the early years of the twentieth century, with several reports having described their crystallographic structures, thermodynamic behaviors under different synthesis conditions, and industrial applications³⁰⁷.

It is also interesting to notice that in the Database of Zeolite Structures⁸⁴, none of

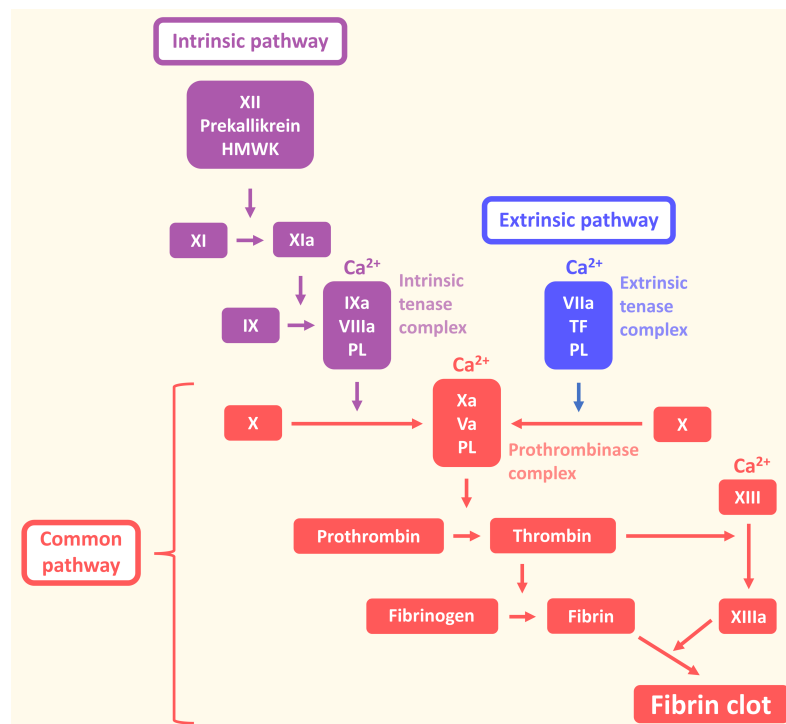


Figure 3.1: General scheme of the coagulation cascade. Adapted from references (28, 29).

the listed calcium zeolites have been synthesized utilizing biomass waste as the calcium source^{84, 306–309}. Therefore, the present investigation addresses two crucial questions: Is it possible to synthesize zeolite-analogue calcium–silicate materials using an abundant inorganic biomass (in this case, chicken eggshell waste) as a source of calcium cations? If so, how would these materials perform in hemostatic applications compared to the ones already available in the market and currently used in hospitals and emergency centers?

Numerous reports in scientific literature have explored the diverse applications of eggshell waste across several fields^{310, 311}. In environmental applications, eggshell waste is used for organic compound adsorption, as well as the adsorption of nitrogen, fluoride, phosphate, soil pollutants, and radioactive metals. It also aids in sludge solubilization, biomass production, and the fabrication of magnetic eggshell adsorbents. In engineering, eggshells are incorporated into plastics, material applications, and nanoparticle synthesis. In chemical processes, they are employed in the development of plant growth promoters for fertilizers, enhancement of food processing and production, sourcing of active calcium and carbon, extraction of soluble proteins, and sourcing of organic calcium and ultrafine active calcium carbonate, with additional roles in biodiesel oil catalysis. In the biomedical domain, eggshell waste has emerged as a versatile precursor for the synthesis of calcium-based compounds such as calcium lactate and calcium phosphate. Moreover, it has been effectively employed in the fabrication of regenerative scaffolds, targeted drug delivery systems, and electrochemical biosensors^{312–316}.

Nonetheless, to the best of our knowledge, the synthesis of porous crystalline

calcium–silicate materials prepared with chicken eggshell waste, for application as a topical hemostatic agent, is a previously unexplored field of research, which is addressed by the findings of this study.

3.2 Experimental Section

Synthetic Procedures

Chemicals. The preparation of the calcium–silicates employed the following chemicals: distilled water (H_2O), sodium hydroxide pellets (NaOH), calcium carbonate (CaCO_3), Ludox-40, tetraethylammonium hydroxide solution ($\text{TEA} \cdot \text{OH}$, 20 wt.% in H_2O), tetrapropylammonium hydroxide solution ($\text{TPA} \cdot \text{OH}$, 1.0 M in H_2O), and tetrabutylammonium hydroxide solution ($\text{TBA} \cdot \text{OH}$, 40 wt.% in H_2O). CaCO_3 was obtained from empty chicken eggshell waste, collected from the Doçura bakery in São José do Rio Preto (São Paulo state, Brazil). The eggshells were washed with warm tap water to remove unwanted material adhered on the surface, rinsed thoroughly with distilled water, and dried in a hot air oven at 100°C for 24 h. The eggshells were then finely crushed using a blender and passed through a $60\ \mu\text{m}$ mesh sieve.

Syntheses of the Calcium–silicates. Four different materials were synthesized in this work, according to the same synthesis procedure, but with differences in terms of the structure-directing agent (SDA). The materials were named CaZ-1 (no SDA), CaZ-2 ($\text{TEA} \cdot \text{OH}$ as SDA), CaZ-3 ($\text{TPA} \cdot \text{OH}$ as SDA), and CaZ-4 ($\text{TBA} \cdot \text{OH}$ as SDA). The reagents used for the syntheses were calcium carbonate (CaCO_3) from pristine chicken eggshells, sodium hydroxide (NaOH), Ludox-40 (source of silica), $\text{TEA} \cdot \text{OH}$, $\text{TPA} \cdot \text{OH}$, $\text{TBA} \cdot \text{OH}$, and distilled water (H_2O). In a typical synthesis, 3.9 g of NaOH , 0.42 g of CaCO_3 , 17.4 g of Ludox-40, and 26.7 g of H_2O were added to a Teflon flask and stirred until obtaining a clear homogeneous solution. Addition was then made of 10.6 g of $\text{TEA} \cdot \text{OH}$ (for CaZ-2), 14.2 g of $\text{TPA} \cdot \text{OH}$ (for CaZ-3), or 9.1 g of $\text{TBA} \cdot \text{OH}$ (for CaZ-4), and the mixture was left under stirring for 1 h. The clear homogeneous gel formed was transferred to a Teflon-lined autoclave and heated under autogenous pressure for 72 h at 200°C in a hot air oven. The product was washed with deionized water, collected by vacuum filtration, and dried in an oven at 80°C for around 24 h.

Physicochemical Characterization

X-Ray Diffraction. X-ray diffractograms of the synthesized materials were acquired using a MiniFlex II diffractometer (Rigaku) equipped with a graphite monochromator and a rotary anode source consisting of a flat plate in Bragg-Brentano geometry. The

instrument was operated with Cu K α radiation (wavelength = 1.5418 Å), at 40 kV and 15 mA. The diffractograms were recorded in the 2θ range 3 – 50°, at a scan speed of 2° min⁻¹ (2θ).

Scanning and Transmission Electron Microscopy (SEM and TEM). SEM images were obtained using a FESEM JSM-7401F instrument (JEOL). Due to the non-conductive nature of the calcium-silicates, the samples were coated with a thin layer of gold prior to the analyses. Scanning electron microscopy (SEM) images were recorded using FEI Magellan 400 L and Philips XL-30 FEG instruments, both coupled to energy dispersive X-ray (EDS) analyzers and operated with adjustable electron beam voltages from 5 to 25 kV. Prior to the analysis, a thin coating of gold was deposited on the samples. TEM images were acquired with an FEI Tecnai G2 F20 instrument. HRTEM images and corresponding EDX maps were obtained using an FEI Tecnai G2 F20 instrument equipped with an energy-dispersive X-ray spectrometer (EDX) with a super ultra-thin window (SUTW). The experiments were carried out at the Structural Characterization Laboratory of the Federal University of São Carlos (LCE/DEMa/UFSCar).

Solid State NMR-MAS. Magic-angle spinning (MAS) solid-state (SS) NMR spectra of ²⁹Si³¹⁷ were obtained at the São Carlos Institute of Physics, University of São Paulo, using a Bruker Avance spectrometer operating with a static field of 9.4 T. The instrument was equipped with a 7 mm double resonance Jackobsen design probe head, with a pneumatic sample rotation system, providing frequency stability greater than 2 Hz. Single-pulse excitation experiments under MAS (²⁹Si SPEMAS) were performed at 6 kHz MAS frequency, using a recycle delay of 20 s to achieve more quantitative ²⁹Si spectra. Experiments with ¹H–²⁹Si cross-polarization (¹H–²⁹Si CPMAS) were performed with a power ramp (80 – 100%) in the ¹H radiofrequency channel, MAS frequency of 6 kHz, and 5 s recycle delay. In both CPMAS and SPEMAS experiments, ¹H decoupling was achieved using a SPINAL-64 decoupling pulse sequence, with a field of 60 kHz, during an acquisition time of 15 ms. Zirconia rotors were used in all the experiments, with the absence of background signals confirmed by measuring empty rotors. The ²⁹Si chemical shifts were calibrated using kaolinite as an external reference.

Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectroscopy (ICP-OES). ICP-OES elemental analysis was performed using a Spectro Arcos spectrometer. Sample digestion was carried out with concentrated hydrofluoric acid, followed by heating on a digester block to ensure complete dissolution of the material.

Phase contrast microscopy. Phase contrast images were obtained using a BX60 microscope (Olympus, New York, USA). For these analyses, 170 µL of whole blood, collected

in tubes containing sodium citrate (4% *v/v*), was mixed with 10 μL of an aqueous 0.2 M CaCl_2 solution to counteract the anticoagulant effect of calcium chelation effect induced by sodium citrate. Subsequently, 0.25 mg of each calcium–silicate material was introduced into the blood, and an aliquot of this mixture was deposited onto glass microscope slides. The slides were then immediately placed under the microscope for structural assessment.

Fourier-Transform Infrared Spectroscopy (FTIR). FTIR spectra were acquired using a Shimadzu IRTracer-100 spectrometer, in the range $400 - 4000 \text{ cm}^{-1}$, with resolution of 4 cm^{-1} , step size of 1 cm^{-1} , and averaging of 64 scans. The samples were prepared as KBr pellets containing about 10% by weight of the test material.

Textural Characterization. Textural characterization of the synthesized calcium–silicates was performed using a Micromeritics ASAP 2020 Plus automatic adsorption apparatus (Accelerated Surface Area and Porosimetry System). Prior to determination of the adsorption isotherm, the samples (approximately 0.1 g) were outgassed for 12 – 16 h at 150°C , until the residual pressure was lower than $5.0 \mu\text{m Hg}$. Since the samples presented microporosity, a second stage of outgassing with heating was applied after transfer to the instrument port for analysis, to ensure that the micropores were free from moisture or contamination with other vapors. The specific surface area (*S*) values were calculated according to the Brunauer-Emmet-Teller (BET) model³¹⁸. Close to partial pressure $\frac{P}{P_0} = 1$, N_2 condenses in the entire available pore volume (at the end point), so the isotherm provides an indication of the total pore volume. To determine the mesopore scale pore size distribution, the Barret-Joyner-Halenda (BJH) mathematical model was applied, based on the Kelvin equation³¹⁹. For the micropore scale, the average diameter was determined using the Horvath–Kawazoe (H–K) method, which was developed to determine the pore size distribution of graphitic cracks in microporous carbons, using N_2 adsorption measurements at 77 K ³²⁰.

Thermogravimetry (TGA/DTG). Thermogravimetric analyses were performed using a TGA-51 thermobalance (Shimadzu, Japan), under a dynamic air atmosphere (50 mL min^{-1}), with the sample (12 – 17 mg) placed in a platinum pan and heated at a rate (β) of $10^\circ\text{C min}^{-1}$.

Differential Scanning Calorimetry (DSC). DSC analyses employed a DSC Q20 analyzer (TA Instruments), with the sample placed in an aluminum pan and heated from 25 to 400°C , at 5°C min^{-1} , under a flow of nitrogen.

Zeta Potential (ζ). Zeta potential data were obtained using a Nano ZS instrument (Malvern Instruments, Herrenberg, Germany). The zeta potential values were inferred

from the electrophoretic mobility measurements with application of the Smoluchowski equation^{88, 133, 321}. Approximately 2 mg portions of the prepared calcium–silicates were suspended in 2 mL of 2.5 mM calcium nitrate solution (1 wt.%) at pH ranging from 1 to 12 (adjusted with 0.25 M solutions of NaOH and HNO₃).

Thromboelastographic Assays

Thromboelastography assays were conducted using a TEG® 5000 system (Haemonetics, Niles, IL, USA) with volunteers who were physically healthy and had no history of blood disorders. This analysis was performed to obtain *in vitro* clotting parameters for whole human blood exposed to the synthesized calcium–silicate hemostatic materials. All participants provided informed consent prior to blood donation. The study was approved by the Research Ethics Committee of FAMERP (São José do Rio Preto Medical School) under protocol number CAAE 48358215.9.0000.5415. For each assay, a 20 µL aliquot of an aqueous 0.2 M CaCl₂ solution was added into the TEG sample cup. Separately, 340 µL of whole blood was mixed with 0.5 mg of each calcium–silicate material. The mixture was directly introduced into the TEG sample cup containing the 0.2 M CaCl₂ solution. The test was then conducted under standard conditions, with coagulation parameters recorded alongside the corresponding TEG curves.

in vitro evaluation of coagulant activity

CaZ-3, CaZ-4, and Quickclot were dissolved in Tyrode buffer (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 3.0 mM NaH₂PO₄, 10 mM HEPES, 5.6 mM dextrose, 1 mM MgCl₂, 2 mM CaCl₂, pH 7.4) at the concentration of 1 mg mL⁻¹. Evaluation of coagulant activity was based on the degree of shortening or prolongation of clotting times of prothrombin time (PT, WAMA, Brazil), activated partial thromboplastin time (aPTT, WAMA, Brazil), or recalcification time of pooled citrated human plasma³²². For PT assays, aliquots of 50 µL of the plasma sample were incubated with 50 µL of material suspension or vehicle control (Tyrode buffer, negative control), incubated at 37 °C for 2 min; following incubation 100 µL of PT reagent was added, and the clotting time recorded. For the recalcification time, aliquots of 50 µL of the plasma sample were incubated with 50 µL of material suspension or vehicle control (Tyrode buffer, negative control), incubated at 37 °C for 2 min; following incubation, then 50 µL of 25 mM CaCl₂ was added, and the clotting time recorded. For aPTT assays, aliquots of 50 µL of the plasma sample were incubated with 50 µL of material suspension or vehicle control (Tyrode buffer, negative control) and 50 µL of aPTT reagent; following incubation at 37 °C for 3 min, 50 µL of 25 mM CaCl₂ was added and the clotting time recorded. Clotting times were determined in a coagulometer Coagmaster 2.0 (WAMA, Brazil), and recorded up to a maximum of 200 s.

Statistical Analysis

Descriptive statistical analysis of the synthesized materials was conducted using mean values and standard deviations. For inferential statistical analysis, one-way ANOVA was employed to compare the mean values of each group at a significance level of $p \leq 0.05$. When statistically significant differences were identified, multiple comparisons were carried out using the Tukey-Kramer *post hoc* test.

3.3 Results and Discussion

The X-ray diffractograms for CaZ-3 and CaZ-4 (Figure 3.2) showed Bragg reflections in the 2θ range $7.5^\circ - 35.6^\circ$, which closely matched those of rhodesite (JCPDS 22-1253). Rhodesite, a known natural fibrous calcium-silicate, has the chemical formula $(\text{Ca}, \text{Na}_2, \text{K}_2)_8\text{Si}_{16}\text{O}_{40} \cdot 11\text{H}_2\text{O}$ and an orthorhombic unit cell ($a = 23.8 \text{ \AA}$, $b = 6.54 \text{ \AA}$, $c = 7.05 \text{ \AA}$, $\beta = 90^\circ$). The experimental results were consistent with the data reported by Gard *et al.*³²³ and Hesse *et al.*³²⁴. There are only a few reports in the literature of the synthesis of a rhodesite-like calcium-silicate, such as in the work of Rocha *et al.*³²⁵, who described the synthesis of “AV-2” using calcium nitrate as a calcium source. The diffractograms for CaZ-3 and CaZ-4 matched those reported by Rocha *et al.*, where rhodesite was considered to consist of silicate double layers, chains of edge-sharing $[\text{Ca}(\text{O}, \text{OH}_2)_6]$ octahedra, and potassium cations and water molecules within the pores of the silicate double layers^{326, 327}. However, to the best of our knowledge, until now there have been no reports in the literature of synthesis routes to obtain rhodesite using CaCO_3 derived from chicken eggshells. It is well known that $\text{TEA} \cdot \text{OH}$, $\text{TPA} \cdot \text{OH}$, and $\text{TBA} \cdot \text{OH}$ can direct the crystallization of several zeolites with different topologies, such as ETR, MFI, BEA, SZR, and MEL³²⁸. At the present stage of the research, it is not possible to know precisely how $\text{TPA} \cdot \text{OH}$ and $\text{TBA} \cdot \text{OH}$ affected the crystallization process and favored the formation of rhodesite. Unlike $\text{TPA} \cdot \text{OH}$ and $\text{TBA} \cdot \text{OH}$, the $\text{TEA} \cdot \text{OH}$ organic template (used for CaZ-2) did not effectively contribute to rhodesite synthesis, with the material obtained using this organic molecule being ascribed to a quartz phase (JCPDS 46-1045) and a calcite phase (JCPDS 05-0586). Synthesis in the absence of any organic template led to the formation of a material (CaZ-1) corresponding to calcite (JCPDS 05-0586). Some reflections in the diffractograms for CaZ-1 and CaZ-2, mainly those at 2θ lower than 25° , could not be assigned to any known phases, according to searches in the JCPDS database.

Some reflections in the diffractograms for CaZ-1 and CaZ-2, mainly those at 2θ lower than 25° , could not be assigned to any known phases, according to searches in the JCPDS database. See Supplementary Material (Figure B3.1) for all materials' XRD data.

The SEM and TEM analyses of the materials provide comprehensive insights into their morphological and structural characteristics. The SEM micrographs (Figure 3.3)

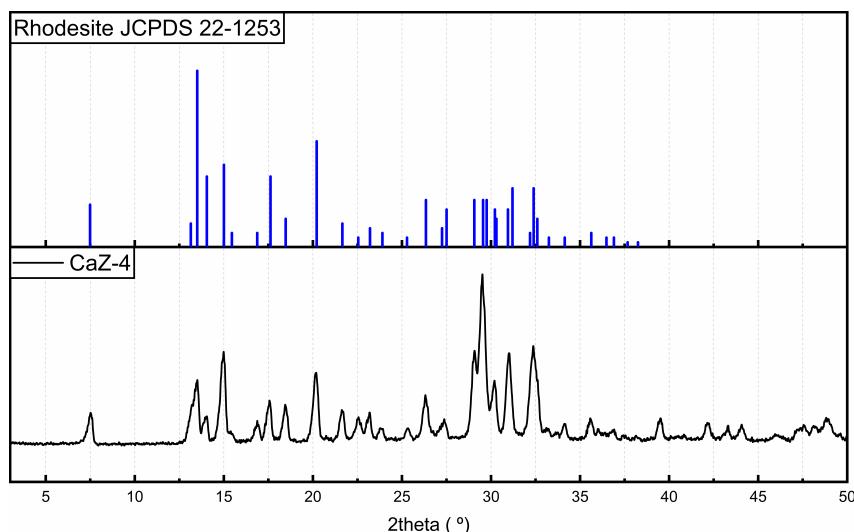


Figure 3.2: X-ray diffraction (XRD) pattern of CaZ-4, compared with the simulated diffractogram of natural calcium-silicate rhodesite, based on the JCPDS database. The y-axis represents intensity in arbitrary units.

illustrate that CaZ-4 comprises well-defined microcrystals with a pronounced needle-like (acicular) morphology, exhibiting lengths varying from approximately 3 μm to 20 μm . This morphology closely mirrors that of rhodesite crystals, as previously documented by Gard *et al.*³²³ and Hesse *et al.*³²⁴. Micrographs of CaZ-3 display similar crystal morphologies. Conversely, the materials CaZ-1 and CaZ-2 predominantly consist of plate-like microcrystals interspersed with substantial quantities of debris, indicative of a comparatively lower degree of crystallinity. See Supplementary Material (Figure B3.2) for all SEM images.

The TEM investigation of CaZ-4 (Figure 3.3B-C) substantiates its structural resemblance to rhodesite, confirming the presence of a framework comprising double layers of vertex-sharing SiO_4 tetrahedra. This observation aligns with the well-established crystal structure of rhodesite, a microporous tectosilicate characterized by alternating layers of double silicon tetrahedra (SiO_4) and intercalated cationic sheets. These sheets predominantly consist of calcium (Ca^{2+}) and potassium (K^+), with water molecules occupying the intracrystalline cavities, as reported by Hesse *et al.*³²⁴, Rocha and Anderson³²⁷, Ferraris *et al.*^{329, 330}, and Geng *et al.*³³¹. In conclusion, the SEM and TEM analyses unequivocally confirm that the morphological and structural attributes of CaZ-4 closely align with those of rhodesite, reaffirming the consistency of its crystalline framework with the microporous tectosilicate structure described in the literature. The observed disparities in morphology and crystallinity between CaZ-4 and the other materials (CaZ-1, CaZ-2, and CaZ-3) underscore the critical influence of synthesis conditions on their structural evolution.

The ^1H – ^{29}Si CPMAS and the deconvoluted single-pulse excitation under magic angle spinning (^{29}Si SPEMAS) spectra of CaZ-4 are presented in Figure 3.4A-B. The deconvolution reveals three distinct resonance signals centered at $\delta = -108$ ppm, $\delta = -96.2$ ppm, and $\delta = -95.1$ ppm, each with a linewidth of 0.9 ppm. These signals correspond

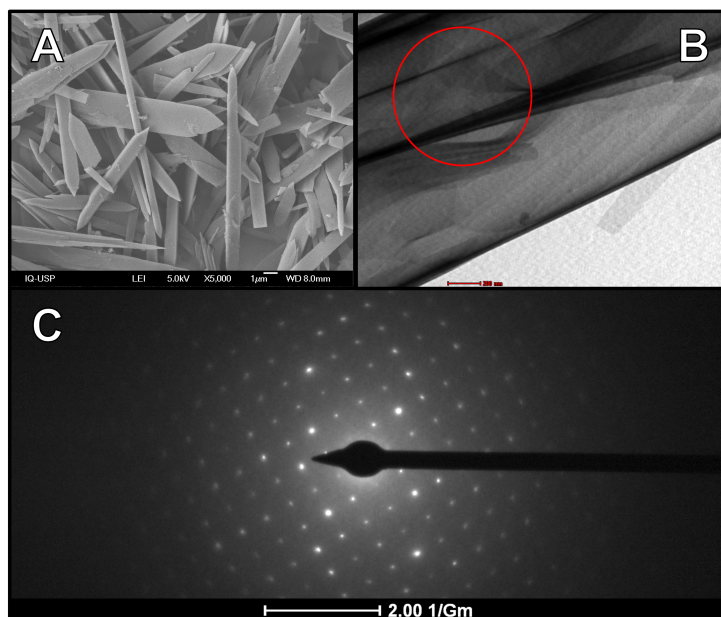


Figure 3.3: Electron micrographs of CaZ-4. (A) Scanning electron microscopy (SEM) image; (B) transmission electron microscopy (TEM) image; (C) selected area electron diffraction (SAED) pattern corresponding to the region marked with a red circle in (B).

to three non-equivalent Si sites in CaZ-4, exhibiting relative populations in a 1 : 2 : 1 ratio. This distribution aligns closely with findings reported by Rocha *et al.*³²⁵. Specifically, the resonance at -96.3 ppm is attributed to Si(1) sites, which constitute two-thirds of the total population, while the signal at -95.1 ppm corresponds to Si(3) sites, representing the remaining one-third. Rocha *et al.*³²⁵ describe these Si(1) and Si(3) sites as belonging to $[\text{SiO}_4]$ tetrahedra that share three of their vertices with adjacent $[\text{SiO}_4]$ tetrahedra and one vertex with a $[\text{Ca}(\text{O}, \text{OH}_2)_6]$ octahedron. The third signal, centered at -108.0 ppm, is assigned to Si(2) sites, which represent $[\text{SiO}_4]$ tetrahedra sharing all four vertices with adjacent $[\text{SiO}_4]$ tetrahedra. These results reinforce the structural understanding of CaZ-4 and provide further evidence for the arrangement of its silicon sites, consistent with the crystalline framework previously described in the literature^{324, 327, 329, 330}.

Figure 3.5 shows the FTIR spectra for CaZ-4. Absorption bands in the wavenumber range $400 - 1200 \text{ cm}^{-1}$ were associated with the vibrational modes of TO_4 , the basic tetrahedral units that form zeolite frameworks, where T represents a silicon or aluminum atom^{332, 333}. A strong absorption band at 694 cm^{-1} corresponded to a bending mode of O–Si–O, while a broad band at around $1000 - 1200 \text{ cm}^{-1}$ could be assigned to symmetric stretching of Si–O–Si. A band at 433 cm^{-1} was attributed to an O–Ca–O non-bridging bending mode^{334–336}. Bands at around 877 , 1430 , and 2530 cm^{-1} , which were more prominent for CaZ-1, were associated with the vibrational modes of calcium carbonate³³⁷, probably corresponding to a fraction of calcium carbonate that was not consumed during the syntheses. This corroborated the Bragg reflections associated with calcite in the X-ray diffractograms (Figure 3.2), which also indicated a remaining calcite phase. Bands at

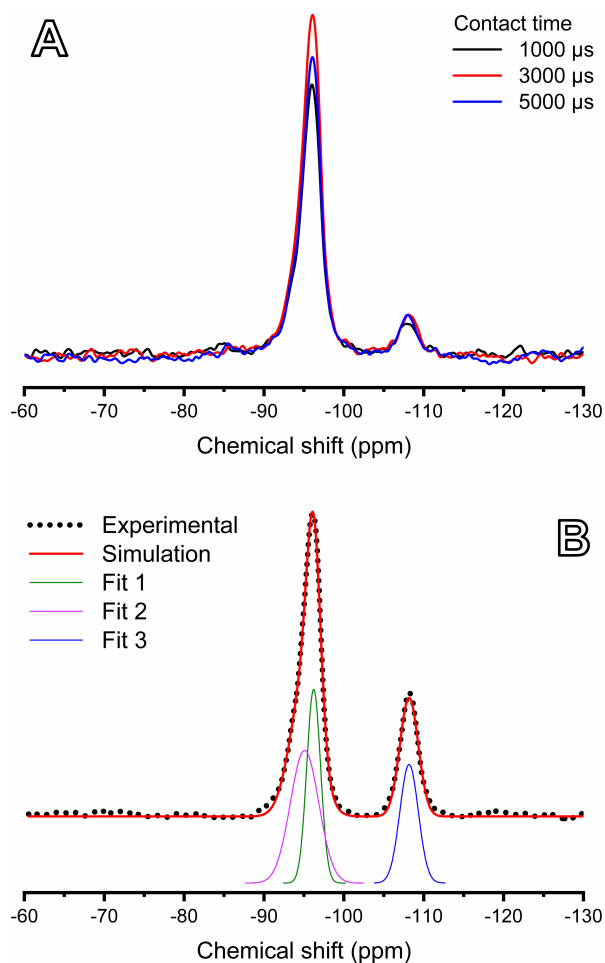


Figure 3.4: Solid-state NMR spectra of CaZ-4: (A) cross-polarization magic angle spinning ($^1\text{H}-^{29}\text{Si}$ CPMAS) spectrum; (B) single-pulse excitation magic angle spinning (^{29}Si SPEMAS) spectrum with peak deconvolution.

around 3600 and 1634 cm^{-1} were related to the water molecules present in the samples, either as structural H_2O or as moisture deposited onto the sample surfaces, with the band at 1634 cm^{-1} attributed to $\text{H}-\text{O}-\text{H}$ bending³³⁸ and the one at 3600 cm^{-1} assigned to $\text{O}-\text{H}$ stretching vibrations³³⁹. See the Supplementary Material (Figures B3.3 and B3.4) for the full range ($4000 - 400\text{ cm}^{-1}$) and inset FTIR spectra of all synthesized materials.

Elemental analysis by ICP-OES, focusing on the mass contributions of silicon, calcium, and sodium, revealed silicon (Si) as the predominant component in the chemical composition of CaZ-4, comprising $32.0 \pm 0.04\%$ of its total mass — a characteristic feature of silicate materials. Calcium (Ca) accounted for $10.1 \pm 0.1\%$, while sodium (Na) contributed $3.3 \pm 0.1\%$, yielding a molar ratio of $1.0\text{Ca} : 4.6\text{Si} : 0.6\text{Na}$. This stoichiometry aligns with that typically observed in calcium-silicates such as rhodesite. Similar results were reported for the rhodesite-analogous material “AV-2” by Rocha *et al.*^{327, 340}, who determined (through ICP-AES) a “calcium: sodium” molar ratio of $1.0\text{Ca} : 0.6\text{Na}$, closely matching the proportions found in CaZ-4. Furthermore, Rocha *et al.*³²⁵ described “AV-2” as having an ideal chemical formula of $\text{HKCa}_2-\text{Si}_8\text{O}_{19} \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, which yields a molar ratio

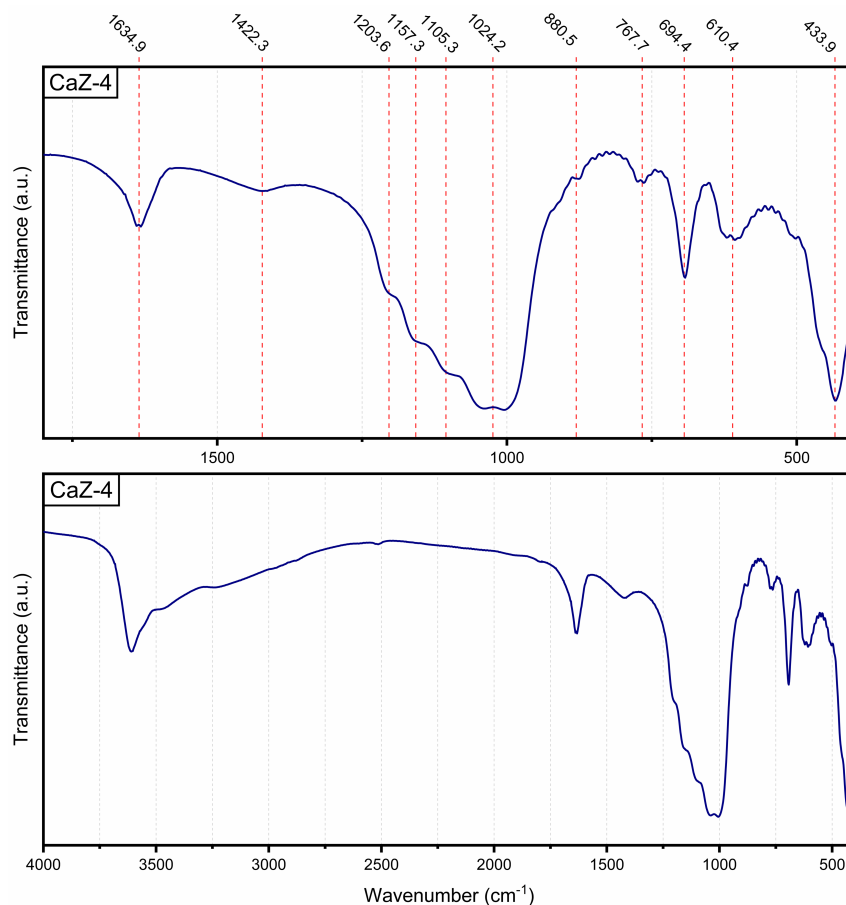


Figure 3.5: FTIR spectrum of CaZ-4, with magnified view of the $1800 - 400 \text{ cm}^{-1}$ region highlighting key vibrational bands.

of $1.0\text{Ca} : 4.0\text{Si}$, further corroborating the present findings.

Considering the textural properties of the synthesized materials, the nitrogen adsorption–desorption isotherms obtained after calcination at 800°C were classified as type IV according to the IUPAC classification, characteristic of mesoporous materials, although some microporosity was also observed. The H1-type hysteresis loops suggest capillary condensation in uniform mesopores. Figure 3.6 shows the N_2 adsorption isotherms and corresponding pore size distributions for CaZ-4. Surface areas for CaZ-2 ($53.3 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$), CaZ-3 ($72.2 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$), and CaZ-4 ($100.3 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$) are consistent with those reported for related synthetic zeolitic and layered materials. In contrast, CaZ-1, synthesized without the use of an organic template, exhibited a substantially lower surface area of $2.9 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$. Across all synthesized samples, the predominant pore volume was associated with pores centered around $D_{\text{max}} = 20 \text{ \AA}$, and the total pore volume remained relatively constant, averaging $0.10 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$ (see Supplementary Material, Figures B3.5 – B3.7 and Table B3.1).

Despite confirmation of the rhodesite framework through XRD, TEM, and ^{29}Si NMR analyses, the observed mesoporosity is not intrinsic to the ideal crystalline structure but rather arises from the synthetic methodology. Unlike natural rhodesite, which crystallizes slowly under hydrothermal equilibrium to form dense, compact crystals, the materials

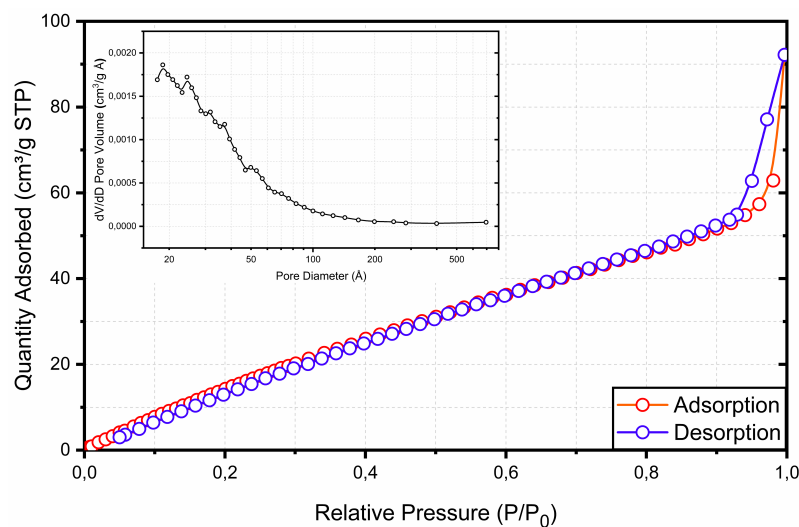


Figure 3.6: Nitrogen adsorption–desorption isotherm of CaZ-4.

synthesized here likely experienced rapid nucleation and kinetic growth. These conditions might have favored the formation of nanocrystalline aggregates and incomplete densification, resulting in interparticle mesoporosity while maintaining the local rhodesite lattice at the atomic scale. This hierarchical organization — crystalline at the unit cell level but porous at the mesoscale — is well documented in synthetic mineral chemistry under non-equilibrium synthesis conditions^{341, 342}.

Comparatively, the surface areas reported here exceed those observed for the AV-2 material synthesized without organic templates by Rocha *et al.* ($14 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$)^{325, 340}. Although the precise mechanistic role of $\text{TPA} \cdot \text{OH}$ and $\text{TBA} \cdot \text{OH}$ in influencing rhodesite crystallization remains to be fully elucidated, their presence likely facilitates the formation of a more open aggregate structure with enhanced surface area, a feature potentially beneficial for applications requiring rapid fluid absorption or hemostatic functionality. While the surface areas of these calcium–silicate materials are lower than those typically reported for ion-exchanged zeolite A ($280 - 650 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$)²⁹³, they align well with the textural properties of layered clay-based hemostatic agents such as kaolin, montmorillonite, pillared montmorillonite, saponite, and hydrotalcite, all of which have demonstrated effective biomedical performance.

While the precise influence of $\text{TPA} \cdot \text{OH}$ and $\text{TBA} \cdot \text{OH}$ on the crystallization process and the formation of rhodesite remains uncertain, their presence likely fosters the development of rhodesite with enhanced surface area, potentially augmenting the hemostatic properties of the material. Despite the lower surface areas of the calcium–silicates compared to those reported for ion-exchanged zeolite A (LTA) by Stucky *et al.*⁹², falling within the range of $280 - 650 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$, they align with the surface areas of various layered clay-based hemostatic agents such as Kaolin, Montmorillonite, Pillared Montmorillonite, saponite, and hydrotalcite, as well as thromboelastographic parameters

reported in the literature²⁹³.

The TG and DTG curves for the synthesized calcium-silicates revealed differences in the thermal decomposition profiles. Figure 3.7 shows the thermal decomposition curve of CaZ-4. See Supplementary Material (Figures B3.8 – B3.10) for all TG and DTG curves.

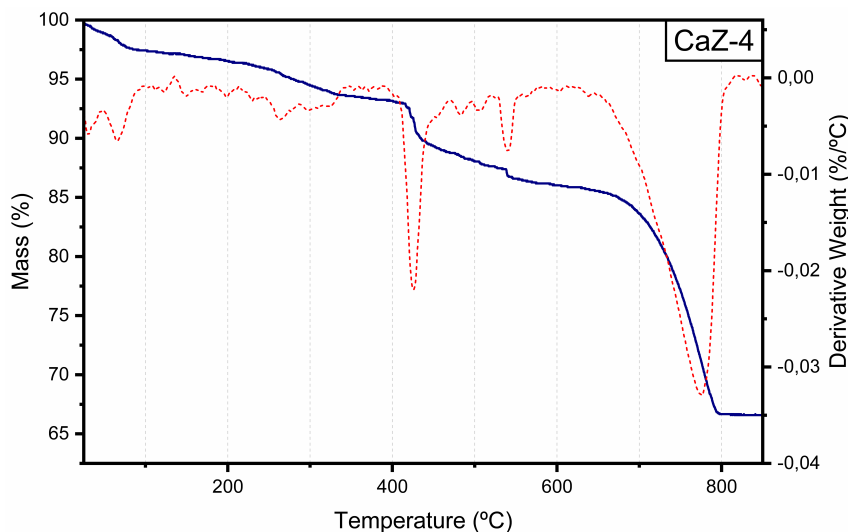


Figure 3.7: Thermogravimetric (TG, blue line) and derivative thermogravimetric (DTG, red dotted line) curves of CaZ-4.

The DTG curves showed two initial events between 23 and 95 °C, corresponding to the release of free water present in all four samples. The TG curve for CaZ-3, synthesized in the presence of $\text{TPA} \cdot \text{OH}$, was indicative of slower thermal decomposition and, consequently, greater thermal stability, compared to the other materials. The TG curves showed that CaZ-2, prepared with $\text{TEA} \cdot \text{OH}$, presented the lowest thermal stability, while similar thermal stabilities were observed for CaZ-1 (no SDA) and CaZ-4 (prepared with $\text{TBA} \cdot \text{OH}$). In the 25 – 600 °C temperature range, where most of the thermodynamic events occurred for all the materials, CaZ-1 displayed a mass loss of approximately 16%, while CaZ-2, CaZ-3, and CaZ-4 presented mass losses ranging from 13.2% to 13.9% (Table S1). These values corresponded to the stages of dehydration and thermal decomposition of the structure-directing agent, as well as some organic impurities from the chicken eggshells used as the CaCO_3 source. For all samples, the TG/DTG curves showed a distinct mass loss between 600 and 850 °C, due to the thermal decomposition of CaCO_3 , resulting in the release of CO_2 . Based on the % CO_2 released, stoichiometric calculations ($\text{CaCO}_3 \longrightarrow \text{CaO} + \text{CO}_2$) were performed to determine the amount of CaCO_3 present in each material (Table ST2).

The other parameters determined were the temperature at the extrapolated beginning of the thermal decomposition of CaCO_3 , obtained from the TGA curve (Tonset-TGA), and the peak temperature in the DTG curve, indicating the point at which the mass loss rate was at a maximum (Tpeak-DTG). The calculated amount of CaCO_3 increased proportionally with the molar masses of the structure-directing agents used in the synthesis

of the materials. Table B3.2, which can be found in the Supplementary Material, provides the full data extracted from the TG/DTG curves of the samples.

In the first heating, the DSC curve of CaZ-1 showed two endothermic events between 80 and 150 °C, related to dehydration. However, CaZ-2, CaZ-3, and CaZ-4 only showed endothermic events above 250 °C. For all the materials, the second heating curve showed an endothermic peak below 120 °C, which could be attributed to the disruption of N₂ derived from the gaseous atmosphere adsorbed when the sample was cooled, since the DSC curve showed an exothermic event. The DSC curves were obtained up to 400 °C, which meant that it was not possible to observe the enthalpic event related to the thermal decomposition of CaCO₃. The DSC curves for all the materials can be found in the Supplementary Material (Figures B3.11 – B3.14).

Among other physical properties, the surface electrical potential of a solid hemostatic agent is fundamental for its application as a procoagulant or anticoagulant material. It is known that solids with a net negative surface charge promote coagulation by a process known as the “glass effect”, whereby polar surfaces activate the intrinsic pathway of the blood clotting cascade by contact activation³⁴³. The autocatalytic activation of clotting factors XII, XI, prekallikrein, and high molecular weight kininogen is initiated by exposure of blood to a polar surface, which in turn activates the feedback mechanisms responsible for the association of thrombin and the polymerization of fibrin^{343, 344}. Surface area is also a crucial parameter in the chemical dynamics for immobilizing participants of surface-dependent clotting reactions and Ca²⁺ ions, which are cofactors that help to orientate protein assemblies and enzymes responsible for fibrin production³⁴⁵.

Several zeolites are used for hemostatic applications, due to their ability to maintain a net negative surface charge when immersed in blood⁸⁸. Many factors can influence the net surface charge of a solid particle, including the pH of the medium. At high pH (high OH⁻ concentration), many of the silanol groups present on the surfaces of these solid silicate particles may be deprotonated, with the resulting SiO⁻ groups conferring a net negative surface charge. In low pH media (high H⁺ concentration), these groups are more likely to be protonated, resulting in a net positive surface charge¹³³. At the isoelectric point, defined as the pH at which there is a balance between the positive and negative charges, the material has a neutral surface with null electrical potential. Although zeta potential is not a direct measurement of the surface electrical potential, it provides valuable insights into particle surface charge and its behavior under different pH conditions.

As shown in Figure 3.8, all the synthesized materials presented a net negative charge across a very broad pH range. In fact, the isoelectric points (0.0 mV zeta potential) for CaZ-3 and CaZ-4 were at pH 1.0, while those for CaZ-1 and CaZ-2 were slightly below the pH range tested, although data extrapolation indicated that they would present a neutral surface at pH 0.0 – 1.0. In the pH range 1.5 – 12.0, all the materials presented net negative surface charges, with all of them showing the most negative zeta potential

values at pH 3.0 (-21.9 ± 1.8 , -19.5 ± 2.3 , -34.5 ± 1.8 , and -35.3 ± 1.3 mV for CaZ-1, CaZ-2, CaZ-3, and CaZ-4, respectively). At pH 7.0 (approximately the pH of blood), the zeta potential values were -17.2 ± 1.4 mV (CaZ-1), -18.5 ± 0.9 mV (CaZ-2), -16.2 ± 0.6 mV (CaZ-3), and -15.6 ± 0.5 mV (CaZ-4). The zeta potentials were similar for CaZ-1 and CaZ-2, as well as for CaZ-3 and CaZ-4. This was consistent with the XRD and FTIR results showing clear similarity between CaZ-1 and CaZ-2, as well as between CaZ-3 and CaZ-4. Detailed zeta potential data are provided in Supplementary Material (Table B3.3).

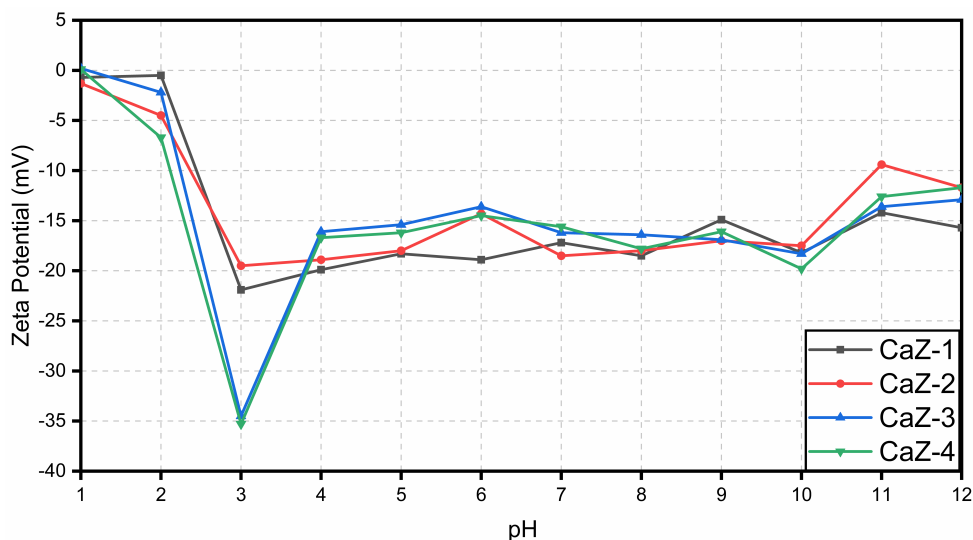


Figure 3.8: Zeta potential (mV) of CaZ-1, CaZ-2, CaZ-3, and CaZ-4 as a function of pH.

The *in vitro* hemostatic properties of CaZ-3 and CaZ-4, synthetic analogs of rhod-site, were initially assessed using blood plasma to elucidate their coagulation activation pathway. The first stage of evaluation focused on determining whether these materials exert a direct coagulant effect on citrated human plasma. For this assay, 50 μ L of the plasma sample was incubated with 100 μ L of material suspension or vehicle (control) at 37 $^{\circ}$ C, and the clotting time was recorded. None of the materials (QuikClot, CaZ-3 or CaZ-4) induced clot formation in plasma sample under these conditions within the 200 s limit when compared to control, indicating no direct coagulant activity under low calcium concentrations. Thereafter, the recalcification time test was used to evaluate the procoagulant activity of materials under higher CaCl_2 concentration conditions (8 mM CaCl_2 , final concentration). Table 3.1 shows that all three materials exhibited coagulant activity, as evidenced by the reduction in the clotting time in comparison with the vehicle. Among the materials, QuikClot exhibited the highest procoagulant activity ($\approx 65\%$ reduction in the clotting time), followed by CaZ-4 ($\approx 51\%$ reduction) and CaZ-3 ($\approx 47\%$ reduction). However, if prior to adding 8 mM CaCl_2 , plasma was preactivated with the aPTT reagent (ellagic acid and phospholipids), the reduction in clotting time was less pronounced (11 – 17% reduction) for all materials. Similar results were observed when the materials were preincubated with plasma, followed by the addition of the PT reagent (thromboplastin

and calcium) was added.

Table 3.1: Coagulation data obtained for recalcification time, prothrombin time (PT) and activated partial thromboplastin time (aPTT). The Control corresponds to blood plasma incubated with Tyrode buffer.

Material	Recalcification time (s)	PT (s)	aPTT (s)
Control	167.5 ± 10.4	16.5 ± 0.6	41.2 ± 1.9
QuikClot	57.8 ± 0.9	14.8 ± 0.0	33.8 ± 0.3
CaZ-3	89.5 ± 0.8	14.1 ± 0.1	36.4 ± 0.5
CaZ-4	82.4 ± 1.1	14.8 ± 0.3	34.4 ± 0.5

Results are representative of duplicate experiments.

Since the most significant reduction in clotting time was observed in the recalcification time assay, rather than in PT or aPTT assays, these findings indicate that all materials primarily activate coagulation factors through the intrinsic pathway of the coagulation cascade. This is consistent with previously reported data on silicate materials in the literature^{88, 290, 292}.

To further assess the coagulant action of the synthesized materials, the *in vitro* hemostatic activities of the zeolitic materials were evaluated by thromboelastography (TEG), which provides a global estimation of hemostasis by quantitatively measuring the viscoelastic changes in whole blood during the coagulation process, where the main parameters considered are R, α , K, and MA. The time until the curve of the clot strength splits, R, represents the time for initial detection of clot formation. The α parameter is the angle between the tangent to the rising curve and the horizontal. The K parameter is related to the rate of coagulation, while MA is the maximum amplitude of the viscosity curve split, representing the maximum clot strength. The tests showed that all the synthesized calcium-silicate materials were able to promote faster clot formation ($R = 1.8$ min) and higher maximum clot strength ($MA = 52.1$ mm), compared to the commercial QuikClot material ($R = 2.7$ min, $MA = 47.5$ mm; $p \leq 0.05$). Figure 3.9 shows the TEG plots for all the calcium-silicates prepared in this study. The thromboelastographic parameter values are shown in Table 3.2.

The values obtained for R and MA were superior to, or close to, those reported in the literature for topical hemostatic agents based on zeolites and other inorganic materials (Table 3.3). The initial clot formation time (R parameter) was consistent with previous observations for hemostatic agents based on faujasite zeolite^{87, 346}, LTA zeolite⁹², mesoporous silica spheres³⁴⁷, and mesoporous silica nanoparticles³⁴⁸. Similarly, the maximum clot strength (MA parameter) values for the calcium-silicates prepared here were within the range reported for other hemostatic agents based on zeolites^{87, 92, 346}.

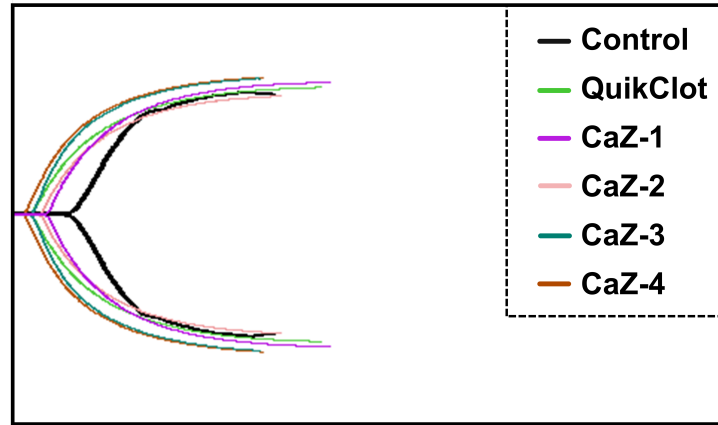


Figure 3.9: Thromboelastography (TEG® 5000, Haemonetics, Niles, IL, USA) curves of human blood after contact with QuikClot and calcium silicate materials CaZ-1, CaZ-2, CaZ-3, and CaZ-4. The control curve corresponds to human blood without exposure to any hemostatic agent.

Table 3.2: Clotting kinetic parameters (R, K, α , and MA) for human blood using the hemostatic agents QuikClot and the synthesized calcium–silicate materials. The control corresponds to human blood not exposed to the hemostatic agents.

Material	R (min)	K (min)	Alpha Angle (°)	MA (mm)
Control	7.4 ± 0.8	3.3 ± 0.5	48.5 ± 6.6	46.6 ± 2.4
QuikClot	2.7 ± 0.4	3.6 ± 0.3	54.6 ± 6.8	47.5 ± 0.9
CaZ-1	4.5 ± 0.7	3.2 ± 0.6	55.5 ± 5.9	49.2 ± 1.7
CaZ-2	3.8 ± 0.3	3.6 ± 0.2	54.9 ± 5.7	44.9 ± 3.3
CaZ-3	2.7 ± 0.4	2.6 ± 0.2	60.3 ± 6.1	51.5 ± 2.0
CaZ-4	1.8 ± 0.5	2.8 ± 0.4	56.8 ± 5.7	52.1 ± 1.3

Table 3.3: Comparison of thromboelastographic parameters reported in the literature for inorganic hemostatic agents.

Material	R (min)	MA (mm)
FAU ⁸⁷	3.2 ± 0.7	53.6 ± 2.6
Nano-FAU ⁸⁷	2.4 ± 0.6	61.2 ± 2.3
CaO/Sodium dodecyl sulfate (SDS) + 1% NaY ³⁴⁶	7.2 ± 0.9	52.1 ± 1.4
CaO/Sodium dodecyl sulfate (SDS) + 5% NaY ³⁴⁶	6.2 ± 0.3	53.9 ± 1.8
Ba-Exchanged LTA Zeolite ⁹²	1.8 ± 0.2	76.9 ± 1.2
Sr-Exchanged LTA Zeolite ⁹²	2.1 ± 0.2	73.7 ± 2.6

Pure Mesoporous Silica Spheres (MSS) ³⁴⁷	3.6 ± 0.4	58.7 ± 1.7
AgCaMSS (MSS doped with silver and calcium) ³⁴⁷	2.9 ± 0.2	66.0 ± 3.3
Mesoporous Silica Nanoparticles (MSN) ³⁴⁸	6.9 ± 0.3	67.3 ± 2.1
CaMSN (MSN doped with calcium) ³⁴⁸	4.5 ± 0.3	73.5 ± 3.6
CaZ-4 (prepared with chicken eggshell waste in this study)	1.8 ± 0.5	52.1 ± 1.3

Phase-contrast microscopy was utilized to assess the interaction between red blood cells and CaZ-4, the calcium–silicate material synthesized in this study that exhibited the highest coagulant efficiency. Figure B3.15A (See Supplementary Material) depicts red blood cells in pure whole blood prior to the addition of CaZ-4, displaying their characteristic morphology, including a circular shape, biconcave structure, and a diameter of $6 - 8 \mu\text{m}$ ⁸⁷. Following exposure to CaZ-4, the red blood cells aggregate, forming a dense clot that appears as a solid mass of blood cells, as illustrated in Figure B3.15B. This observation confirms clot formation, underscores the capacity of calcium–silicate materials to accelerate blood coagulation, and corroborates the findings from thromboelastographic assays.

3.4 Conclusions

- Under specific physicochemical conditions, utilizing $\text{TBA} \cdot \text{OH}$ and $\text{TPA} \cdot \text{OH}$ as organic templates, chicken eggshell waste can serve as a precursor for synthesizing rhodesite calcium–silicate;
- When $\text{TEA} \cdot \text{OH}$ was employed under the same sol-gel conditions, the resulting material consisted of quartz and unidentified crystalline phases;
- BET- N_2 analysis of the calcium–silicates synthesized with $\text{TBA} \cdot \text{OH}$ and $\text{TPA} \cdot \text{OH}$ revealed surface areas of 100.3 and $72.2 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$, pore volumes of 0.11 and $0.10 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$, and pore diameters of 57.1 and $67.4 \text{ \AA}$, respectively;
- Rhodesite synthesized using $\text{TBA} \cdot \text{OH}$ as an organic template exhibited a sixfold increase in surface area compared to the rhodesite synthesized by Rocha *et al.* in the absence of an organic structure-directing agent;
- *in vitro* PT and aPTT assays demonstrated that CaZ-3 and CaZ-4 primarily activate coagulation factors within the contact system, consistent with silicate-based materials. The pronounced reduction in clotting time observed in the recalcification assay suggests that their hemostatic action is driven by the intrinsic coagulation pathway;

- The thromboelastographic parameters for the material synthesized using TBA · OH were: $R = 1.8$ min (latency time for initial fibrin formation at 2 mm clot amplitude), $K = 2.8$ min (time for clot growth to 20 mm), $\alpha = 56.8^\circ$ (rate of thrombin generation and fibrin formation), and $MA = 52.1$ mm (maximum clot strength reflecting fibrin elasticity and platelet adhesion);
 - These thromboelastographic values surpassed those of the commercially available zeolite-based hemostatic agent QuikClot ($R = 2.7$ min, $K = 3.6$ min, $\alpha = 54.6^\circ$, $MA = 47.5$ mm), highlighting superior hemostatic performance;
 - The results demonstrate the feasibility of synthesizing calcium–silicate materials from chicken eggshell waste, offering a sustainable approach for developing effective and safe hemostatic agents.
-

Capítulo 4

Artigo II: Hemostasia e ação antimicrobiana

Neste capítulo é apresentado um trabalho publicado por nosso grupo de pesquisa em abril de 2026 na revista *Chemistry — An Asian Journal*. O artigo explora o conceito de materiais multifuncionais aplicados à biomedicina, partindo da premissa de que processos fisiológicos raramente ocorrem de forma isolada. Conforme discutido na seção 2.8, a resposta do organismo a um ferimento envolve uma sucessão de eventos parcialmente sobrepostos (vide seção 2.6), sendo a hemostasia apenas a etapa inicial. As fases subsequentes da cicatrização dependem de um ambiente favorável à regeneração tecidual, tornando igualmente importante o controle de infecções. Nesse contexto, o desenvolvimento de materiais capazes de atuar simultaneamente na contenção do sangramento e na prevenção da proliferação microbiana representa um dos principais desafios da pesquisa em biomateriais para tratamento emergencial de ferimentos.

Os materiais investigados neste estudo são zeólitas nanométricas do tipo Faujasita (X) submetidas à troca iônica com diferentes metais de relevância biomédica. Embora diversos trabalhos relatem a atividade hemostática ou antimicrobiana de materiais zeolíticos, essas propriedades são frequentemente avaliadas de forma independente, dificultando compreender como modificações químicas destinadas a otimizar uma função afetam a outra. O principal objetivo deste trabalho foi preencher essa lacuna por meio de uma investigação sistemática da influência da troca iônica sobre a estrutura, as propriedades superficiais e a resposta biológica desses materiais. Mais do que comparar diferentes íons, o estudo busca estabelecer relações entre composição química, propriedades físico-químicas e bioatividade, fornecendo uma base racional para o projeto de biomateriais multifuncionais.

Como será discutido ao longo do capítulo, a troca iônica mostrou-se uma estratégia simples e versátil para modular o comportamento biológico das zeólitas, revelando que diferentes cátions promovem respostas distintas e, por vezes, antagônicas. Enquanto a incorporação de cálcio intensificou a atividade hemostática, a troca com prata conferiu expressiva atividade antimicrobiana, porém à custa da redução da eficiência na coagulação sanguínea. Esses resultados evidenciam que a otimização de materiais multifuncionais exige o equilíbrio entre diferentes mecanismos de atuação, e não a maximização isolada de uma única propriedade.

Além da caracterização estrutural, morfológica, textural e superficial dos materiais, o trabalho combinou ensaios de coagulação sanguínea, atividade antimicrobiana e citotoxicidade para correlacionar as modificações promovidas pela troca iônica com suas

consequências biológicas. Embora limitado a experimentos *in vitro*, o estudo estabelece princípios de projeto para o desenvolvimento de biomateriais capazes de integrar múltiplas funcionalidades, oferecendo diretrizes para futuras investigações *in vivo* e para a concepção de sistemas terapêuticos mais complexos.

O material suplementar submetido junto ao artigo está disponível nesta tese no Apêndice B.

Nanometric Faujasite (FAU) Zeolite Ion-Exchanged with Metal Ions for Hemostatic and Antimicrobial Applications: A Thromboelastographic and Microbiological Study

Guilherme de Paula Guarnieri^{#[a]}, Juliana Bergamasco Laurenti^{#[a]}, Beatriz Crespo^[b], Edivandra Buzato Silva^[b], Taiza Maschio-Lima^[b], Vilson Serafim Júnior^[c], Eny Maria Goloni-Bertollo^[c], Moacir Fernandes de Godoy^[d], Margarete Teresa Gottardo de Almeida^[b] and José Geraldo Nery^{*[a]}

[a] Department of Physics, São Paulo State University, Cristóvão Colombo Street 2265, Jardim Nazareth, São José do Rio Preto, SP 15054-000, Brazil. * geraldo.nery@unesp.br

[b] Laboratory of Microbiology, Faculty of Medicine of São José do Rio Preto, Brigadeiro Faria Lima Avenue 5416, Vila São Pedro, São José do Rio Preto, SP 15090-000, Brazil.

[c] Genetics and Molecular Biology Research Unit, Faculty of Medicine of São José do Rio Preto, Brigadeiro Faria Lima Avenue 5416, Vila São Pedro, São José do Rio Preto, SP 15090-000, Brazil.

[d] Department of Cardiology and Vascular Surgery, Medicine Faculty of São José do Rio Preto, Av. Brg. Faria Lima 5416, Vila São Pedro, São José do Rio Preto, SP 15090-000, Brazil.

These authors contributed equally to this work.

Supporting information for this article is given via a link at the end of the document.

Abstract: Integrating antimicrobial functionality with the intrinsic clot-promoting properties of zeolites represents a promising strategy for next-generation wound-care materials, where rapid hemorrhage control must be coupled with infection prevention. Here, we investigate nanocrystalline Faujasite (NanoFAU) and its ion-exchanged derivatives to elucidate how extra-framework cation identity governs the balance between hemostatic and antimicrobial performance. NanoFAU samples exchanged with Ag^+ , Ba^{2+} , Ca^{2+} , and Mg^{2+} were comprehensively characterized by XRD, SEM/HRTEM/EDS, AFM, BET surface area analysis, ^{29}Si MAS NMR and FT-IR spectroscopy, confirming preservation of the FAU framework and successful cation substitution. All ion-exchanged materials exhibited isoelectric points below physiological blood pH, consistent with negatively charged, procoagulant surfaces. Thromboelastography revealed that Ca^{2+} -exchanged NanoFAU (NanoFAU-Ca) achieved the most pronounced hemostatic response ($R = 1.1$ min; $K = 1.2$ min; $MA = 60.3$ mm), whereas Ag^+ -exchanged NanoFAU (NanoFAU-Ag) provided strong antimicrobial activity against *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) and *Candida albicans* (ATCC 90028), displaying bactericidal and fungistatic effects, respectively. Importantly, NanoFAU-Ag maintained cell viability above the ISO 10993-5 cytotoxicity threshold in HaCaT keratinocytes. These findings demonstrate that ion exchange enables rational tuning of nanocrystalline Faujasite to achieve complementary hemostatic and antimicrobial functionalities while preserving cytocompatibility, establishing NanoFAU as a versatile inorganic platform for multifunctional wound management and supporting future *in vivo* evaluation.

4.1 Introduction

Zeolites are crystalline aluminosilicates composed of periodic three-dimensional frameworks of cages and channels with molecular-scale dimensions. Owing to their well-defined porosity, high surface area, and tunable framework chemistry, zeolites are extensively employed in industrial applications as catalysts, adsorbents, and ion exchangers. In parallel, zeolite thin films and nanostructured forms have attracted considerable interest for advanced technologies, including selective membranes, chemical sensors, and microelectronic devices^{349–352}. Structurally, zeolites are constructed from corner-sharing $[\text{SiO}_4]$ and $[\text{AlO}_4]$ tetrahedra interconnected via oxygen bridges, generating extended nanoporous networks with large internal voids and interconnected channels. This distinctive topology underpins their high sorption capacity and ion-exchange versatility^{124, 353}.

In recent years, zeolites have also gained increasing attention in the biomedical field, motivated by their intrinsic biocompatibility, structural stability under physiological conditions, and capacity to host and release functional species in a controlled manner^{124, 305, 354}. Among these applications, dehydrated zeolite powders have been widely explored as topical hemostatic agents for the rapid management of severe hemorrhage. A notable example is QuikClot®, a zeolite-based material deployed during the Iraq War in 2003 for emergency bleeding control²⁸⁹. Acting as molecular sieves, zeolites rapidly adsorb water from blood at wound sites, thereby concentrating clotting factors, platelets, and erythrocytes and accelerating activation of the coagulation cascade. This effect can be further modulated by the release of biologically relevant cations, such as Ca^{2+} , which play a central role in multiple steps of the coagulation process^{305, 355–357}.

Beyond water adsorption-driven mechanisms, accumulating evidence suggests that zeolites may actively participate in coagulation at the molecular level. Owing to their negatively charged surfaces — originating from framework Al substitution and deprotonated silanol groups with low pK_a values³⁵⁸ — zeolites can function as so-called “inorganic platelets” upon contact with whole blood at physiological pH (~ 7.4). These negatively charged interfaces promote the assembly of prothrombinase complexes in a manner analogous to the phospholipid surfaces of activated platelets, enhancing the conversion of prothrombin to thrombin and accelerating fibrin formation^{89, 294}.

A key advantage of zeolites lies in the tunability of their physicochemical properties through framework composition and post-synthetic modification. Isomorphic substitution of Si^{4+} by Al^{3+} within the tetrahedral framework generates a permanent negative charge that is compensated by extra-framework cations. Although these cations are an integral part of the crystallographic structure, they can be readily replaced by alternative ions via ion-exchange processes¹²⁴. While ion exchange is generally straightforward from a synthetic perspective, it can profoundly alter surface chemistry, hydration behavior, and biological response, often in complex and non-linear ways. For example, exchange of zeolite

LTA-5A with Ag^+ not only imparts pronounced antimicrobial activity but also significantly reduces the enthalpy of hydration — from approximately 680 J g^{-1} to 420 J g^{-1} — thereby mitigating excessive heat release during water adsorption, a critical safety consideration for topical hemostatic applications⁹². Although direct temperature-rise measurements were not performed in the present study, prior calorimetric analysis and the altered hydration dynamics of nanometric zeolites support the expectation that nanoscale systems may further attenuate localized thermal effects due to enhanced heat dissipation and modified water adsorption behavior⁹².

In biomaterials research, ion exchange has been widely exploited to introduce antimicrobial functionality into inorganic matrices through incorporation of metal ions such as Ag^+ and Cu^{2+} , which can be released in a controlled fashion upon exposure to physiological fluids^{359–363}. Zeolite-based antimicrobial materials have demonstrated efficacy against a broad spectrum of clinically relevant microorganisms, including *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, and *Candida albicans*^{359, 364–367}. The renewed interest in metal-based antimicrobials is driven by the accelerating global crisis of antibiotic resistance, as metal ions typically exert antimicrobial activity through multiple, non-specific mechanisms — such as membrane disruption, protein inactivation, and oxidative stress induction — therefore reducing the likelihood of resistance development compared to conventional antibiotics that target specific biochemical pathways^{250, 368}.

However, the simultaneous integration of hemostatic and antimicrobial functionalities within a single inorganic platform presents significant physicochemical and biological challenges. Metal ions that confer antimicrobial activity — particularly Ag^+ — can interfere with coagulation processes by interacting with plasma proteins, altering fibrin polymerization, or perturbing platelet-fibrin interactions. Moreover, antimicrobial ion release must be sufficient to inhibit microbial growth while remaining below cytotoxic thresholds for mammalian cells. Changes in surface charge, hydration behavior, and ion mobility introduced during ion exchange may therefore enhance one biological function while inadvertently suppressing another. Achieving a balanced multifunctional profile thus requires careful control of ionic identity and framework chemistry, rather than simple incorporation of antimicrobial species.

In this work, we investigate the concurrent hemostatic and antimicrobial properties of nanocrystalline Faujasite (FAU) zeolites before and after ion exchange with Ag^+ , Ba^{2+} , Ca^{2+} , and Mg^{2+} . These cations were selected based on their documented roles in coagulation pathways or antimicrobial activity^{89, 369–371}. Hemostatic performance was quantitatively assessed by thromboelastography, while antimicrobial efficacy was evaluated using minimum inhibitory concentration (MIC) assays against *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans*, two clinically relevant pathogens frequently associated with wound infections. The results presented herein provide a structure-function framework for understanding how ion exchange modulates the dual biological activity of FAU nanozeolites

and establish a foundation for future *in vivo* studies aimed at evaluating their performance under physiological conditions.

4.2 Experimental Section

Synthesis and Physicochemical Characterization of the Nanocrystalline Zeolites

Synthesis of Nanocrystalline Faujasite (NanoFAU). Nanocrystalline Faujasite zeolite (NanoFAU) was synthesized following the procedure reported by Zhan *et al.*¹, with minor modifications. In a typical synthesis, sodium hydroxide was first dissolved in deionized water under continuous stirring. Sodium aluminate was then added gradually to the alkaline solution, and the mixture was stirred at room temperature for 15 min until a clear and homogeneous solution was obtained. Subsequently, fumed silica was introduced as the silica source, yielding a viscous suspension that was maintained under constant agitation at 60 °C for 48 h to promote nucleation and crystallization of the FAU framework. After crystallization, the solid product was recovered by centrifugation at 13 400 rpm, thoroughly washed with deionized water until neutral pH was achieved, and dried in a convection oven at 40 °C for 16 h. The overall molar composition of the synthesis gel was 5.5Na₂O : 1.0Al₂O₃ : 4.0SiO₂ : 190H₂O.

Ion Exchange with Metal Ions. Ion exchange of the as-synthesized NanoFAU was carried out using aqueous solutions of copper nitrate, magnesium chloride, and silver nitrate (0.5 M). The procedure was adapted from Vasconcellos *et al.*³⁷². In a typical experiment, 1.0 g of NanoFAU was dispersed in 30 mL of the corresponding metal salt solution in a Teflon-lined vessel and maintained at 90 °C for 12 h under gentle magnetic stirring to promote cation exchange. After completion of the exchange process, the solid products were recovered by centrifugation at 13 400 rpm, washed repeatedly with deionized water (three cycles) to remove non-incorporated ions, and dried in a convection oven at 40 °C for 16 h. The resulting materials are hereafter denoted as metal-exchanged NanoFAU.

X-ray Diffraction (XRD). Powder X-ray diffraction (XRD) patterns of the synthesized materials were recorded on a Rigaku MiniFlex II diffractometer (Rigaku Corporation, Tokyo, Japan) operating in Bragg–Brentano reflection geometry with a flat-plate sample holder. The instrument was equipped with a Cu K α radiation source ($\lambda = 1.5418 \text{ \AA}$) and operated at 40 kV and 15 mA. A graphite monochromator was employed to ensure monochromatic radiation. Diffraction data were collected over a 2θ range of 3 – 50°, using a step size of 0.02° (2θ) and a counting time of 10 s per step.

Scanning / Transmission Electron Microscopy (SEM and TEM) and Energy-Dispersive X-ray Spectroscopy (EDS). The morphology and particle size distribution of the zeolite samples were examined by scanning electron microscopy (SEM) using a Philips XL30 FEG microscope operated at accelerating voltages between 5 and 25 kV. Prior to imaging, the samples were sputter-coated with a thin gold layer to minimize surface charging. SEM analyses were carried out at the Structural Characterization Laboratory of the Federal University of São Carlos (LCE/DEMa/UFSCar), São Carlos, Brazil. Elemental composition and ion-exchange efficiency were evaluated by energy-dispersive X-ray spectroscopy (EDS) using an EVEX EDS detector coupled to the SEM system at LCE/DEMa/UFSCar. For quantitative analysis, the relative atomic percentages obtained by EDS were used.

High-resolution transmission electron microscopy (HRTEM) images were acquired using an FEI Tecnai G2 F20 microscope operated at 200 kV at the Structural Characterization Laboratory of the Federal University of São Carlos (LCE/DEMa/UFSCar), São Carlos, Brazil. The oxide compositions reported in Table 4.1 were calculated from the atomic percentages obtained by EDS. Considering that the concentration of charge-compensating extra-framework cations is stoichiometrically related to the number of framework $[\text{AlO}_4]^-$ units, the compositions were normalized with respect to Al_2O_3 . This normalization enabled quantitative estimation of the ion-exchange degree by comparing the Na^+ content of the exchanged samples with that of the parent NanoFAU. The exchange degree was thus expressed as the percentage of Na^+ removed relative to the original material.

Atomic Force Microscopy (AFM). Atomic force microscopy (AFM) analyses were performed using an NX-10 scanning probe microscope (Park Systems) operated in tapping mode under ambient conditions. Measurements were conducted using a PPP-CNDH silicon cantilever (Park Systems) with a nominal resonance frequency of approximately 320 kHz and a spring constant of 42 N m^{-1} . For sample preparation, the zeolite powders were dispersed in distilled water, drop-cast onto freshly cleaved mica substrates, and dried under high vacuum prior to analysis. AFM images were processed and quantitatively analyzed using Gwyddion software (32-bit version). All AFM measurements were carried out at the National Nanotechnology Laboratory (LNNano), Brazilian Center for Research in Energy and Materials (CNPEM), Campinas, Brazil.

Determination of the Isoelectric Point by Zeta Potential Analysis. The isoelectric point (IEP) of the synthesized nanozeolites was determined from zeta potential measurements using a Malvern Zetasizer Nano ZS instrument. The experimental protocol was adapted from Ostomel *et al.*⁸⁸. This analysis was performed to evaluate the surface charge behavior of the zeolitic materials and to infer their procoagulant or anticoagulant tendencies based on the pH value corresponding to the IEP. Due to the colloidal com-

plexity and heterogeneous composition of whole blood, direct *in situ* measurements of zeta potential are not feasible. Consequently, surface charge characteristics were assessed indirectly through electrophoretic mobility measurements in aqueous media, which provide a well-established and widely accepted proxy for probing the electrostatic properties of solid–liquid interfaces under controlled conditions³⁷³. For zeolitic systems in particular, zeta potential analysis has been shown to be sensitive to framework composition, extra-framework cation identity, and pH, thereby enabling meaningful comparison of surface charge behavior across different ion-exchanged materials³⁷⁴. To approximate physiological ionic conditions, measurements were conducted in the presence of CaCl_2 as a supporting electrolyte, reproducing calcium ion concentrations representative of blood serum³⁷⁵. The presence of divalent cations is especially relevant, as Ca^{2+} plays a central role in both coagulation cascades and surface-mediated protein adsorption processes: previous studies have demonstrated that calcium-containing zeolites exhibit distinct surface charge characteristics and protein interaction patterns that can modulate contact activation and thrombin generation^{89, 376–378}. For each analysis, approximately 2 mg of zeolite sample was dispersed in 60 mL of a 0.03 mol L^{-1} aqueous CaCl_2 solution and sonicated for 10 min to ensure homogeneous dispersion. Zeta potential values were recorded as a function of pH over the range of 2 – 12. pH adjustments were performed by titration with standardized 0.25 mol L^{-1} HCl and NaOH solutions. The IEP was determined as the pH at which the zeta potential crossed zero.

Textural Characterization by N_2 Adsorption–Desorption. Nitrogen adsorption–desorption measurements were carried out to evaluate the textural properties of the synthesized zeolites, including specific surface area, total pore volume, micropore volume, and pore size distribution. Adsorption isotherms were recorded at 77 K (liquid nitrogen temperature) using a Quantachrome Nova 2000e surface area analyzer. Prior to analysis, the samples were degassed under vacuum at 150°C for 4 h to remove physisorbed moisture and residual surface species. Degassing conditions were selected to ensure complete desorption of weakly bound species while preserving the structural integrity of the FAU framework. The specific surface area was calculated using the Brunauer–Emmett–Teller (BET) method within the relative pressure ($\frac{P}{P_0}$) range consistent with BET applicability criteria. The total pore volume was determined from the amount of nitrogen adsorbed at $\frac{P}{P_0} \approx 0.99$. Micropore volume was estimated using the Saito–Foley (SF) method, while mesopore volume and pore size distribution were evaluated using the Barrett–Joyner–Halenda (BJH) model applied to the adsorption branch of the isotherm. Textural parameters were calculated in accordance with IUPAC recommendations for gas physisorption analysis^{379, 380}. All measurements were performed at the Center for Ceramic Coatings (CRC), Federal University of São Carlos (UFSCar), São Carlos, Brazil.

²⁹Si Magic Angle Spinning Nuclear Magnetic Resonance (²⁹Si MAS NMR)

Solid-state nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy was employed to investigate the local silicon environments in the synthesized zeolitic materials. ²⁹Si MAS NMR experiments were performed on a Bruker Avance III 400 spectrometer operating at a magnetic field strength of 9.4 T, corresponding to a Larmor frequency of 79.5 MHz for ²⁹Si nuclei. The spectrometer was equipped with a 4 mm double-resonance MAS probe suitable for broadband heteronuclear experiments. Samples were packed into 4 mm zirconia rotors fitted with Kel-F caps and spun at a magic angle spinning (MAS) frequency of 10 kHz under ambient conditions. The MAS frequency and angle were calibrated using the ⁷⁹Br resonance of a KBr standard, and magnetic field homogeneity was optimized by minimizing the linewidth of the spinning sidebands. When required, the probe configuration allowed stable spinning at frequencies up to 15 kHz. Time-domain signals were Fourier transformed into frequency-domain spectra using SpinWorks software. Owing to the high operational costs and significant spectrometer time associated with solid-state NMR measurements, ²⁹Si MAS NMR experiments were performed selectively on representative samples rather than on the complete sample set.

Coagulation Evaluation

Thromboelastography (TEG). The coagulation performance of the zeolitic materials was evaluated by thromboelastography (TEG) using a Haemoscope TEG 5000 thrombelastograph. TEG provides a dynamic and quantitative assessment of the viscoelastic evolution of whole blood during clot initiation, propagation, and stabilization. The method enables extraction of key kinetic and mechanical parameters of the coagulation cascade, including the reaction time (R), corresponding to the onset of fibrin formation; the clot formation time (K); the α -angle, reflecting the rate of fibrin polymerization and clot strengthening; and the maximum amplitude (MA), which represents the ultimate clot strength determined primarily by platelet-fibrin interactions. Citrated whole blood was employed to prevent premature coagulation. For each assay, a 20 μ L aliquot of an aqueous 0.2 M CaCl₂ solution (for recalcification) was added into the TEG sample cup. Separately, 340 μ L of citrated whole blood was mixed with 0.5 mg of each zeolitic material. The mixture was then directly introduced into the TEG sample cup containing the 0.2 M CaCl₂ solution. Measurements were conducted under standard operating conditions for whole-blood TEG analysis. Each assay was performed in triplicate and repeated across three independent experimental runs to ensure reproducibility and statistical robustness. The thromboelastograph continuously recorded viscoelastic changes throughout clot formation, producing characteristic TEG tracings that were used for quantitative comparison of clot initiation kinetics and mechanical stability among the different zeolitic formulations. All procedures involving human blood samples were conducted in accordance with established ethical standards and were

approved by the Research Ethics Committee of the São José do Rio Preto Medical School (FAMERP) under protocol number CAAE 48358215.9.0000.5415.

Phase-Contrast Microscopy. Phase-contrast optical microscopy was employed to qualitatively assess the interaction between the zeolitic materials and whole blood, with particular emphasis on fibrin network formation and cellular aggregation phenomena. Imaging was performed using an Olympus BX60 optical microscope operated in phase-contrast mode. For each experiment, 170 μL of citrated whole blood (collected in tubes containing 4% *v/v* sodium citrate as anticoagulant) was deposited onto a clean glass microscope slide. Coagulation was reinitiated by the addition of 10 μL of a 0.2 mol L^{-1} CaCl_2 saline solution, restoring calcium ions previously chelated by citrate and reactivating calcium-dependent steps of the coagulation cascade. Subsequently, 0.25 mg of the respective zeolite material was introduced into the recalcified blood sample and gently mixed to ensure homogeneous contact. The prepared samples were immediately examined under phase-contrast illumination to monitor the early stages of clot development. Particular attention was given to fibrin strand formation, platelet and erythrocyte aggregation, and the spatial organization of blood components in proximity to the zeolitic particles. Phase-contrast microscopy was selected as it enables visualization of unstained biological specimens, thereby preserving native clot morphology and minimizing sample perturbation. All microscopy analyses were performed at the Multiuser Center for Microscopy and Microanalysis, IBILCE/UNESP, São José do Rio Preto, Brazil.

Antimicrobial Activity of Nanozeolites

Minimum Inhibitory Concentration (MIC) Determination Against ATCC Strains. The antimicrobial activity of NanoFAU and its ion-exchanged derivatives with silver and magnesium (NanoFAU-Ag and NanoFAU-Mg) was evaluated against *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) and *Candida albicans* (ATCC 90028). Minimum inhibitory concentration (MIC) assays were performed using the broth microdilution method in sterile 96-well microplates, following the recommendations of the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) guideline M27-S4³⁸¹. All experiments were conducted in triplicate to ensure reproducibility. For each material, aqueous suspensions were prepared at three concentrations (0.1 g, 0.01 g, and 0.001 g), followed by sonication for 30 min to ensure homogeneous dispersion of the zeolitic particles. Aliquots (100 μL) of each suspension were transferred to individual wells, and RPMI 1640 culture medium (Sigma®) was added to achieve the final assay volume. Each row of the microplate corresponded to a single zeolite concentration and formulation (NanoFAU-Ag or NanoFAU-Mg), tested in triplicate, and included appropriate sterility controls (medium only) and growth controls (inoculated medium without zeolite). Microbial inocula were prepared

from fresh 24 h cultures grown at 36.5 °C and standardized to the turbidity of a 1.0 McFarland standard. Subsequently, 100 µL of the standardized inoculum was added to each well, and the plates were incubated at 36.5 °C for 24 h under aerobic conditions. Following incubation, microbial metabolic activity was assessed by the addition of 20 µL of a 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC) solution (0.1 g dissolved in 5 µL sterile distilled water) to each well as a redox indicator. Colorimetric changes were visually monitored to evaluate cell viability. To further confirm microbial inhibition or survival, aliquots from each well were subcultured onto Mueller–Hinton agar plates (Sigma®) and incubated at 36.5 °C for an additional 24 h.

Minimum Inhibitory Concentration (MIC) of NanoFAU and NanoFAU-Ag Against ATCC Strains.

The antimicrobial activity of NanoFAU and its silver ion-exchanged derivative (NanoFAU-Ag) was evaluated against *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) and *Candida albicans* (ATCC 90028). Minimum inhibitory concentration (MIC) assays were performed in sterile 96-well microplates using the broth microdilution method in accordance with the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) guideline M27-S4³⁸¹. All experiments were conducted in triplicate. Microbial inocula were prepared from fresh 24 h cultures grown at 36.5 °C and adjusted to a turbidity equivalent to a 1.0 McFarland standard. The standardized suspensions were subsequently diluted in RPMI 1640 culture medium to obtain the working inoculum concentration recommended for broth microdilution assays. Serial two-fold dilutions of NanoFAU and NanoFAU-Ag were prepared in RPMI medium, resulting in final concentration ranges of 500 – 3.90 mg mL⁻¹ for NanoFAU and 1.00 – 0.007 mg mL⁻¹ for NanoFAU-Ag. In each well, 100 µL of the zeolite suspension was combined with 100 µL of the standardized microbial inoculum, yielding a total reaction volume of 200 µL per well. Microplates were incubated at 36.5 °C for 24 h under aerobic conditions. Following incubation, microbial metabolic activity was assessed by adding 20 µL of a 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC) solution (0.1 g dissolved in 5 mL sterile distilled water) to each well as a redox indicator. The absence of color development was interpreted as inhibition of microbial metabolic activity. To confirm growth inhibition, aliquots from each well were subcultured onto Mueller–Hinton agar plates and incubated for an additional 24 h at 36.5 °C.

Agar Diffusion Assay for Zeolitic Inhibition of *S. aureus* and *C. albicans*.

The antimicrobial activity of selected ion-exchanged zeolites was further assessed using the agar well diffusion method as a complementary qualitative assay. Suspensions of NaFAU-Mg and NaFAU-Ag were prepared in sterile aqueous medium at a concentration of 0.4 mg mL⁻¹. Microbial inocula of *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) and *Candida albicans* (ATCC 90028) were obtained from fresh 24 h cultures and adjusted to a turbidity equivalent to a 1.0 McFarland standard. The standardized inocula were uniformly spread

onto Mueller–Hinton agar plates using the spread-plate technique with a Drigalski loop to ensure homogeneous bacterial or fungal lawns. Wells were then aseptically cut into the agar surface, and defined volumes of the zeolite suspensions were introduced into each well. The plates were incubated at 36.5 °C for 24 h under aerobic conditions, after which the diameters of the inhibition zones were measured. In a second set of experiments, NaFAU, NaFAU-Ca, NaFAU-Ag, and a physical mixture of NaFAU-Ca and NaFAU-Ag were evaluated against *S. aureus* at zeolite concentrations of 0.4 and 0.8 mg mL⁻¹. Sample preparation, inoculum standardization, agar inoculation, incubation, and inhibition zone measurements were performed following the same procedure described above. It is noted that, for insoluble particulate materials such as zeolites, inhibition zones in agar diffusion assays primarily reflect the diffusion of released ionic species rather than the migration of solid particles. Accordingly, the agar diffusion method was employed here as a qualitative tool to visualize antimicrobial effects and to complement the quantitative MIC results obtained by broth microdilution.

Cytotoxicity of the Nanozeolites

Cytotoxicity Assessment of Silver-Exchanged Zeolite. The *in vitro* cytocompatibility of the silver-exchange zeolite was evaluated using an extract-based assay in accordance with established biomaterials testing principles and consistent with ISO 10993-5 guidelines for biological evaluation of medical materials. An extraction protocol was employed to assess the potential cytotoxic effects of soluble species released from the material, including silver ions, under physiological-like conditions. Zeolite extracts were prepared by incubating 1 mg of the material in 1 mL of Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), corresponding to an extraction ratio of 1 mg mL⁻¹, at 37 °C for 24 h under sterile conditions. Following incubation, suspensions were centrifuged to sediment particulate matter, and the supernatants were collected and filtered through a 0.22 µm membrane to ensure complete removal of residual solid particles. The resulting conditioned medium was considered the stock extract (1 mg mL⁻¹) and was subsequently serially diluted in complete culture medium to obtain final test concentrations ranging from 1000 to 3.9 µg mL⁻¹. Cell culture and viability assays were performed following the protocol described by Mena-Silva *et al.*³⁸², with adaptations. Immortalized human keratinocytes (HaCaT cell line)³⁸³, widely used as an epithelial model for skin-contact biomaterials, were cultured in DMEM supplemented with 10% fetal bovine serum and 1% antibiotic/antifungal solution. Cells were maintained at 37 °C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂. For viability testing, cells were seeded into 96-well plates at a density of 7 × 10³ cells per well and allowed to adhere for 24 h to reach logarithmic growth phase. The culture medium was then replaced with medium containing the zeolite extracts at the specified concentrations, and cells were incubated for an additional 24 h. Cell metabolic activity was quantified using the MTS

assay (CellTiter 96®AQueous One Solution Cell Proliferation Assay, Promega®), which measures mitochondrial enzymatic reduction of the tetrazolium compound to a soluble formazan product. After 24 h exposure, 20 μ L of MTS reagent was added to each well, and plates were incubated at 37 °C for 1 h according to the manufacturer's instructions. Absorbance was measured at 450 nm using a Multiskan microplate reader. All experiments were performed in triplicate and repeated independently to ensure reproducibility. Cell viability was calculated as a percentage relative to the negative control (untreated cells), which was defined as 100% viability. According to ISO 10993-5 criteria, materials are considered non-cytotoxic when cell viability remains above 70% of the negative control. Statistical analysis was performed using one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Dunnett's *post hoc* test to compare treated groups with the control. Differences were considered statistically significant at $p \leq 0.05$.

4.3 Results and Discussion

Structural Analysis by X-Ray Diffraction

The structural properties of the synthesized materials were primarily evaluated by powder X-ray diffraction (XRD). Figure 4.1 displays the diffraction patterns of the sodium form of nanocrystalline Faujasite (NanoFAU) and its ion-exchanged derivatives. The pristine NanoFAU sample exhibits a diffraction pattern fully consistent with the Faujasite (FAU) framework, in excellent agreement with reference data reported for nanocrystalline NaX-type materials¹. The characteristic Bragg reflections observed at $2\theta \approx 6.1^\circ$, 9.9° , 11.7° , 15.3° , 20.0° , 23.3° , 26.5° and 31.1° confirm the successful formation of the FAU structure and indicate a high degree of crystallinity despite the nanometric crystal size.

Ion exchange with divalent magnesium (NanoFAU-Mg) did not induce detectable changes in peak positions, indicating preservation of the FAU lattice parameters. The diffraction pattern remains essentially identical to that of the parent NanoFAU, apart from a moderate and systematic reduction in peak intensities. A similar behavior was observed for the calcium-exchanged sample (NanoFAU-Ca). In both cases, the attenuation of Bragg intensities can be attributed to increased X-ray scattering disorder associated with partial replacement of Na^+ by divalent cations, as well as subtle changes in electron density distribution within the supercages, rather than to framework collapse. These results indicate that exchange with alkaline-earth cations of moderate ionic radius and hydration energy preserves the long-range crystallographic order of the FAU framework.

In contrast, ion exchange with silver (NanoFAU-Ag) resulted in pronounced modifications of the diffraction pattern. Several characteristic reflections, notably those at $2\theta \approx 9.8^\circ$, 11.6° , 15.3° , 20.0° , and 26.6° , are severely attenuated or no longer discernible, accompanied by a substantial decrease in the intensity of the remaining peaks. This

behavior indicates a significant loss of long-range crystalline order, consistent with partial amorphization or increased structural disorder at the nanocrystal scale. The disruption induced by Ag^+ exchange is likely associated with the high polarizability, distinct coordination preferences, and strong framework–cation interactions of silver ions, which can locally distort the aluminosilicate lattice and destabilize periodic ordering.

A comparable, albeit less pronounced, effect was observed for the barium-exchanged sample (NanoFAU-Ba), which exhibits attenuation or loss of reflections at $2\theta \approx 9.8^\circ$, 15.3° , and 20.0° , together with a general reduction in diffraction intensity. Given the large ionic radius and lower hydration energy of Ba^{2+} relative to Ca^{2+} and Mg^{2+} , these results suggest that steric effects and reduced mobility within the FAU supercages contribute to framework strain and partial loss of crystallographic coherence.

Overall, the XRD results demonstrate that the structural stability of NanoFAU upon ion exchange is strongly dependent on the nature of the compensating cation. While exchange with Mg^{2+} and Ca^{2+} preserves the FAU framework with only minor reductions in crystallinity, incorporation of Ag^+ and Ba^{2+} induces significant disruption of long-range order. Importantly, the persistence of residual FAU reflections in the latter samples indicates that the framework is not completely collapsed, but rather transformed into a more disordered or defect-rich state, a feature that may have direct implications for ion release behavior and biofunctional performance discussed in subsequent sections.

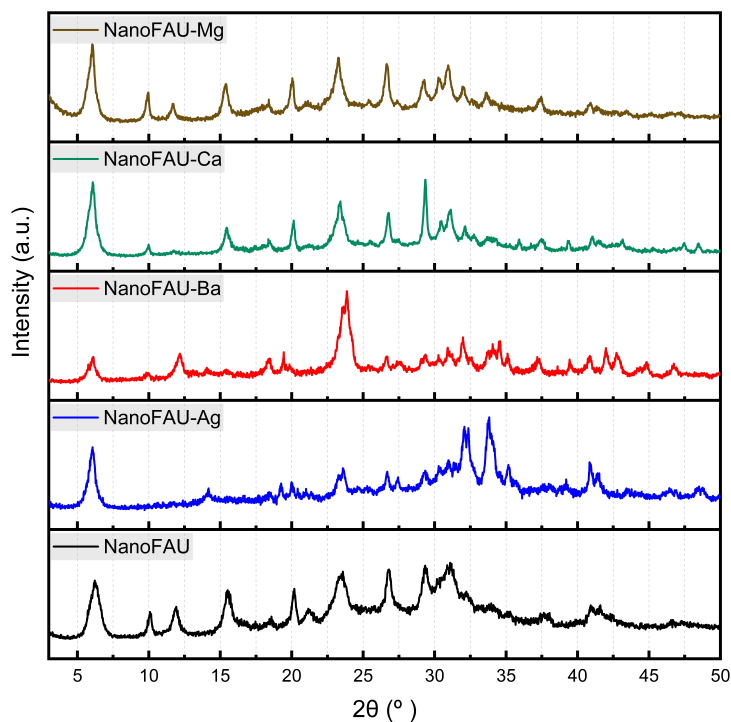


Figure 4.1: Powder X-ray diffraction (XRD) patterns of nanocrystalline Faujasite in the sodium form (NanoFAU) and its ion-exchanged derivatives (Mg^{2+} , Ca^{2+} , Ag^+ , and Ba^{2+}).

FTIR Analysis

Fourier-transform infrared (FT-IR) spectroscopy was employed to examine the framework integrity of nanocrystalline Faujasite in its sodium form (NanoFAU) and after ion exchange with different cations. The FAU structure consists of interconnected TO_4 tetrahedra ($T = \text{Si}$ or Al), whose vibrational modes generate characteristic absorption bands in the mid- and far-infrared regions. These vibrations are commonly classified as internal modes of the TO_4 tetrahedra and external modes associated with framework linkages and ring structures³³².

The fundamental framework vibrations of aluminosilicate zeolites occur predominantly in the $1300 - 400 \text{ cm}^{-1}$ region, which defines the structural fingerprint of the FAU topology^{332, 384}. In this range, the most prominent bands correspond to asymmetric T–O–T stretching vibrations (typically $1250 - 950 \text{ cm}^{-1}$), symmetric stretching modes (approximately $820 - 750 \text{ cm}^{-1}$), and bending or linkage vibrations in the $650 - 420 \text{ cm}^{-1}$ region. External vibrations associated with double six-membered rings and pore-opening structures are generally observed below 600 cm^{-1} ^{332, 384}.

As shown in Figure 4.2, the FT-IR spectra of NanoFAU and its ion-exchanged derivatives display well-defined absorption bands at approximately 980 , 750 , 670 , 560 , and 460 cm^{-1} . The band centered near 980 cm^{-1} is attributed to asymmetric stretching of T–O–T linkages, while features at $750 - 670 \text{ cm}^{-1}$ arise from symmetric stretching modes of the tetrahedral units. The bands at $\sim 560 \text{ cm}^{-1}$ and $\sim 460 \text{ cm}^{-1}$ are characteristic of double-ring vibrations and T–O bending modes, respectively, confirming preservation of the FAU framework^{332, 384}.

Broad absorption bands observed at $1630 - 1650 \text{ cm}^{-1}$ and $3400 - 3500 \text{ cm}^{-1}$ correspond to H–O–H bending and O–H stretching vibrations of physisorbed and intracrystalline water molecules confined within the zeolitic cavities. The persistence of these bands is consistent with the hydrophilic character of the aluminosilicate framework.

Importantly, ion exchange with Mg^{2+} , Ca^{2+} , Ag^+ , and Ba^{2+} did not induce significant shifts in the principal framework vibration frequencies within the accessible spectral range ($400 - 4000 \text{ cm}^{-1}$), indicating that the tetrahedral aluminosilicate skeleton remained largely intact after cation substitution. The low-frequency region below 400 cm^{-1} , where cation–framework interactions and extra-framework metal–oxygen vibrations are typically observed, was not accessible under the present experimental conditions^{332, 384}. Nonetheless, a systematic attenuation of band intensities was noted for certain exchanged samples, particularly NanoFAU-Ag, suggesting increased structural disorder or modification of local electronic environments, in agreement with the XRD results.

All NanoFAU samples, including the sodium form and ion-exchanged derivatives, exhibited an additional absorption feature in the $1400 - 1490 \text{ cm}^{-1}$ region. This band is not commonly reported for microcrystalline Faujasite materials. A similar unassigned

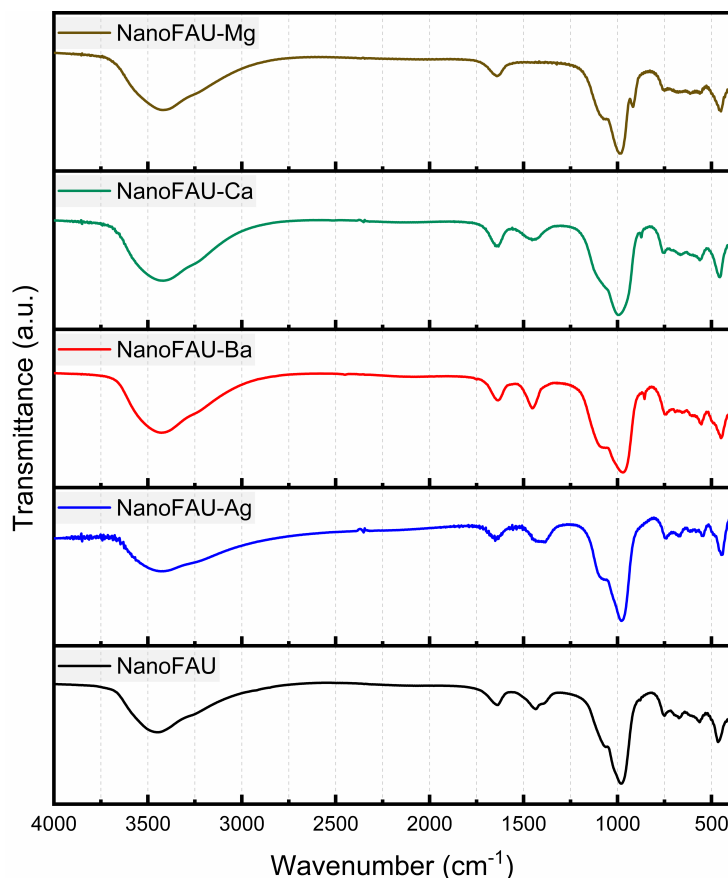


Figure 4.2: Fourier-transform infrared (FT-IR) spectra of nanocrystalline Faujasite in the sodium form (NanoFAU) and its ion-exchanged derivatives (Mg^{2+} , Ca^{2+} , Ag^+ , and Ba^{2+}).

feature has been described for nanometric FAU-type zeolites (NanoX) by Azizi *et al.*³⁸⁵. In the present case, this band may be tentatively attributed to surface-related species, possibly associated with an increased density of silanol (Si-OH) and aluminol (Al-OH) groups resulting from the high surface-to-volume ratio characteristic of nanocrystalline zeolites. Alternatively, weak contributions from residual carbonate species adsorbed from atmospheric CO_2 cannot be completely excluded. Further investigation would be required to definitively assign this feature.

Morphology and Elemental Composition

To investigate the morphology, particle size, and compositional characteristics of the synthesized materials, scanning and transmission electron microscopy (SEM/HRTEM), atomic force microscopy (AFM), and energy-dispersive X-ray spectroscopy (EDS) were employed in a complementary manner.

Representative SEM and HRTEM images of the as-synthesized nanocrystalline Faujasite (NanoFAU) are presented in Figure 4.3. SEM analysis (Figure 4.3a–b) reveals that the material consists of secondary aggregates ranging from approximately 0.3 to

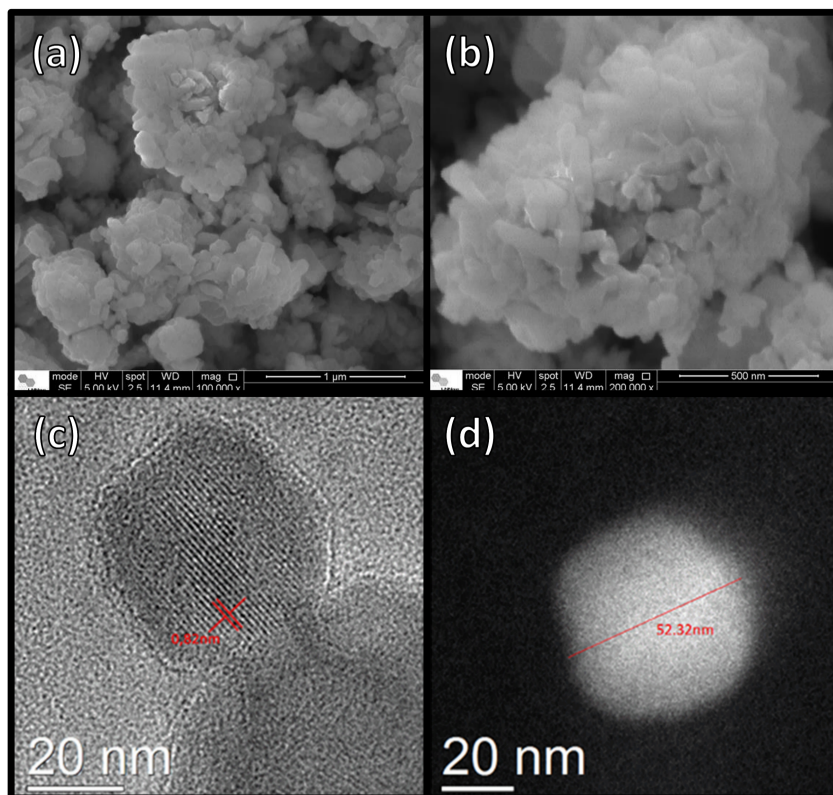


Figure 4.3: SEM (a,b) and HRTEM (c,d) images of nanocrystalline Faujasite (NanoFAU). SEM reveals aggregated assemblies composed of primary nanocrystals. HRTEM shows well-resolved lattice fringes ($d \approx 0.82$ nm) characteristic of the FAU framework, while dark-field TEM indicates representative particle size of approximately 52 nm, corroborating the data reported by Zhan *et al.*¹ when first describing the synthetic route adopted in this work.

1 μm , formed by the assembly of primary nanocrystals. Higher-magnification SEM images clearly show that the aggregate surfaces are composed of discrete nanosized domains with estimated diameters in the 30 – 80 nm range, confirming the nanometric nature of the synthesized zeolite.

High-resolution TEM analysis (Figure 4.3c) further demonstrates well-defined lattice fringes, indicating high crystallographic order at the nanoscale. The measured interplanar spacing of approximately 0.82 nm is consistent with characteristic lattice planes of FAU-type zeolites, such as the (331) or (220) reflections, confirming preservation of the Faujasite framework after nanocrystal formation. The absence of amorphous regions supports the high structural integrity of the material. Furthermore, particle size analysis from TEM images (Figure 4.3d) shows individual crystals with diameters centered around ~ 50 nm (representative particle: 52.32 nm), corroborating the data reported by Zhan *et al.*¹ when first describing the synthetic route adopted in this work.

Complementary AFM analysis (Figure C4.1, See Supporting Information) provides additional insight into the surface topography of the NanoFAU aggregates. The AFM height maps reveal densely packed nanocrystals with relatively smooth surface features at

the micrometer scale. Although AFM can, in principle, resolve fine surface details, the extensive agglomeration observed in both SEM and AFM images limits the extraction of individual particle boundaries and precise surface roughness parameters. Nevertheless, the AFM data are fully consistent with the particle size and aggregation state inferred from electron microscopy.

Elemental composition and ion-exchange efficiency were assessed by energy-dispersive X-ray spectroscopy (EDS). Figure 4.4 and Table 4.1 summarize the atomic percentages and normalized oxide compositions of NanoFAU and its ion-exchanged derivatives. As expected, all samples exhibit aluminum and silicon as the principal framework-forming elements, confirming the integrity of the aluminosilicate FAU backbone. Sodium is detected in the parent NanoFAU sample as the charge-compensating extra-framework cation, in agreement with the alkaline hydrothermal synthesis conditions employed.

Although EDS is inherently surface-sensitive, compositional bias is not expected to significantly affect the present analysis for two reasons: (i) the high surface-to-volume ratio of the nanoparticles ensures that near-surface composition is representative of the bulk, and (ii) the electron beam penetration depth is comparable to the particle dimensions, enabling effective sampling of the entire nanocrystal volume. Consequently, EDS provides a reliable semi-quantitative assessment of cation exchange in these materials.

To enable a chemically meaningful comparison of ion-exchange efficiency among different samples, oxide compositions were normalized to Al_2O_3 (Table 4.1). This normalization is justified because the number of extra-framework charge-compensating cations is directly proportional to the number of framework $[\text{AlO}_4]^-$ units. The normalized compositions clearly reveal a systematic decrease in Na_2O content accompanied by the incorporation of the corresponding exchange cations (Ca^{2+} , Mg^{2+} , Ba^{2+} , or Ag^+), confirming the success of the ion-exchange process.

Among the exchanged samples, NanoFAU-Ag exhibits complete replacement of Na^+ by Ag^+ , corresponding to 100% exchange efficiency within experimental uncertainty. This behavior is consistent with the well-documented high selectivity of Ag^+ toward zeolitic frameworks, attributed to its strong polarizing power and high affinity for negatively charged framework sites^{386, 387}. In contrast, partial exchange is observed for divalent cations, with exchange efficiencies of approximately 84.6% for Ca^{2+} , 61.5% for Mg^{2+} , and 92.3% for Ba^{2+} . These differences reflect the combined influence of ionic radius, hydration energy, and mobility within the FAU supercages.

Notably, the apparent deviation from ideal charge compensation observed for NanoFAU-Mg suggests a more complex distribution of Mg^{2+} species, potentially involving partial hydration or heterogeneous site occupancy. This behavior will be further discussed in the context of the zeta potential and isoelectric point measurements, where surface charge effects become particularly relevant.

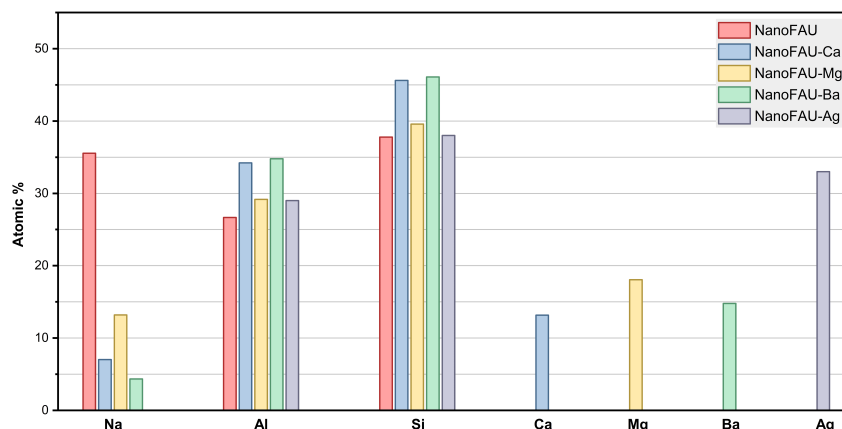


Figure 4.4: Elemental composition (atomic %) of nanocrystalline NaX and its ion-exchanged derivatives, as determined by energy-dispersive X-ray spectroscopy (EDS) within the analyzed region.

²⁹Si MAS NMR and Framework Integrity

Figure 4.5 presents the solid-state ²⁹Si magic-angle spinning (MAS) NMR spectra of nanocrystalline Faujasite in its sodium form (NanoFAU) and after ion exchange with Ca²⁺, Mg²⁺, Ag⁺, and Ba²⁺. In all samples, the spectra are dominated by multiple resonances characteristic of silicon atoms in different local aluminosilicate environments within the FAU framework. The observed chemical shifts are in excellent agreement with those reported for Faujasite-type zeolites in the literature^{388, 389}.

For the parent NanoFAU sample, five distinct resonances are clearly resolved. The signal centered at approximately −84 ppm is assigned to Si atoms coordinated to four aluminum neighbors through oxygen bridges, denoted as Si(0 Si, 4 Al). Peaks at −89, −94, −99, and −103 ppm correspond to Si(1 Si, 3 Al), Si(2 Si, 2 Al), Si(3 Si, 1 Al), and fully siliceous Si(4 Si, 0 Al) environments, respectively. The presence of this full distribution of Q⁴(nAl) species confirms the characteristic aluminum ordering of the FAU framework and indicates the absence of framework dealumination during synthesis.

Upon ion exchange, the overall spectral features remain largely preserved for NanoFAU-Ca, NanoFAU-Mg, and NanoFAU-Ag. No significant changes in the number of resonances or their relative positions are observed, indicating that substitution of Na⁺ by these cations does not perturb the tetrahedral coordination of silicon or the long-range framework connectivity. This observation corroborates the XRD and FT-IR results, collectively demonstrating that ion exchange proceeds without disruption of the aluminosilicate skeleton.

A slight but systematic upfield shift (approximately 1 – 2 ppm) is observed for NanoFAU-Ba, with resonances appearing at −86, −90, −95, −100, and −104 ppm. These subtle changes are attributed to the influence of Ba²⁺ cations on the local electronic environment of the framework oxygen atoms, which indirectly affects the shielding of

Table 4.1: Compositional data extracted from the EDS spectra. The oxide formulas were normalized to Al_2O_3 . Exchanged Na^+ was determined from the normalized oxide formulas and represents the proportion of Na^+ ions removed in the ion-exchanged samples relative to the original NanoFAU.

Sample	Na	Al	Si	Ca	Mg	Ba	Ag	Oxide formula	Exchanged Na^+
NanoFAU	35.5	26.7	37.8	—	—	—	—	$1.0\text{Al}_2\text{O}_3 : 2.8\text{SiO}_2 : 1.3\text{Na}_2\text{O}$	—
NanoFAU-Ca	7.0	34.2	45.6	13.1	—	—	—	$1.0\text{Al}_2\text{O}_3 : 2.7\text{SiO}_2 : 0.2\text{Na}_2\text{O} : 0.8\text{CaO}$	84.6%
NanoFAU-Mg	13.8	29.0	39.3	—	17.9	—	—	$1.0\text{Al}_2\text{O}_3 : 2.7\text{SiO}_2 : 0.5\text{Na}_2\text{O} : 1.2\text{MgO}$	61.5%
NanoFAU-Ba	4.3	34.8	46.1	—	—	14.8	—	$1.0\text{Al}_2\text{O}_3 : 2.6\text{SiO}_2 : 0.1\text{Na}_2\text{O} : 0.9\text{BaO}$	92.3%
NanoFAU-Ag	—	29.0	38.0	—	—	—	33.0	$1.0\text{Al}_2\text{O}_3 : 2.6\text{SiO}_2 : 0.0\text{Na}_2\text{O} : 1.1\text{Ag}_2\text{O}$	100.0%

neighboring silicon nuclei. Given the large ionic radius and lower hydration energy of Ba^{2+} relative to Ca^{2+} and Mg^{2+} , stronger electrostatic interactions with framework oxygen atoms are expected. Importantly, the magnitude of these shifts is small and does not indicate framework rearrangement, dealumination, or changes in silicon coordination.

Overall, the ^{29}Si MAS NMR results unequivocally demonstrate that the FAU framework remains structurally intact after ion exchange with all investigated cations. The persistence of well-resolved $\text{Q}^4(\text{nAl})$ environments confirms that cation substitution primarily affects extra-framework sites, while the tetrahedral aluminosilicate network is preserved. These findings provide a critical structural basis for interpreting subsequent variations in surface charge, textural properties, and biological performance.

Textural Properties, Hierarchical Porosity, and Surface Charge

Nitrogen adsorption–desorption isotherms of NanoFAU (Figure C4.2, See Supporting Information) exhibit a Type IV profile according to IUPAC classification, characterized by a distinct hysteresis loop at intermediate-to-high relative pressures ($\frac{P}{P_0}$). This behavior indicates the presence of mesoporosity in addition to the intrinsic microporosity of the FAU framework. The hysteresis loop is consistent with interparticle mesopores formed by aggregation of nanocrystals, as observed in SEM and AFM analyses.

Although classical Type I uptake associated with purely microporous zeolites is not sharply resolved, this does not indicate loss of intrinsic FAU microporosity. Rather, the dominant mesoporous contribution reflects the nanocrystalline nature of the material and the formation of intercrystallite voids. The preservation of the aluminosilicate framework microporosity is independently confirmed by XRD and ^{29}Si MAS NMR, which demonstrate

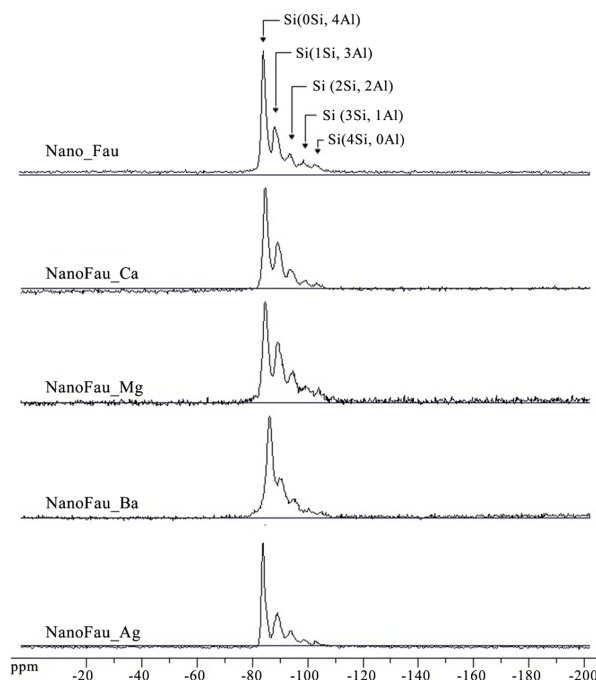


Figure 4.5: Solid-state ^{29}Si magic-angle spinning (MAS) NMR spectra of nanocrystalline Faujasite (NanoFAU) in the sodium form and its ion-exchanged derivatives (Ca^{2+} , Mg^{2+} , Ba^{2+} , and Ag^{+}).

structural integrity and absence of framework collapse or dealumination.

BJH pore size distribution analysis (Figure C4.3, See Supporting Information) reveals a broad distribution with a significant contribution in the 20 – 50 nm range, attributable to interparticle mesopores. A pronounced feature centered at an apparent pore radius of ~ 1.7 nm is also observed. This contribution arises from the convolution of framework-defined micropores with narrow interparticle voids, characteristic of aggregated nanocrystals. The resulting architecture can therefore be described as hierarchical micro-mesoporous.

From a functional perspective, such hierarchical porosity is advantageous for blood-contacting applications. The combination of intrinsic micropores and mesoscopic interparticle voids facilitates rapid fluid uptake, high accessible surface area, and enhanced adsorption of plasma proteins and clotting factors, while maintaining the capacity for controlled release of exchangeable cations.

Surface Charge and Isoelectric Behavior

Surface charge density critically governs the interaction between inorganic materials and biological systems, particularly in the context of blood coagulation. The electrostatic behavior of the materials was evaluated through zeta potential measurements as a function of pH in CaCl_2 solution (Figure 4.6), approximating physiological ionic conditions.

In zeolitic systems, surface charge arises from protonation–deprotonation equilibria

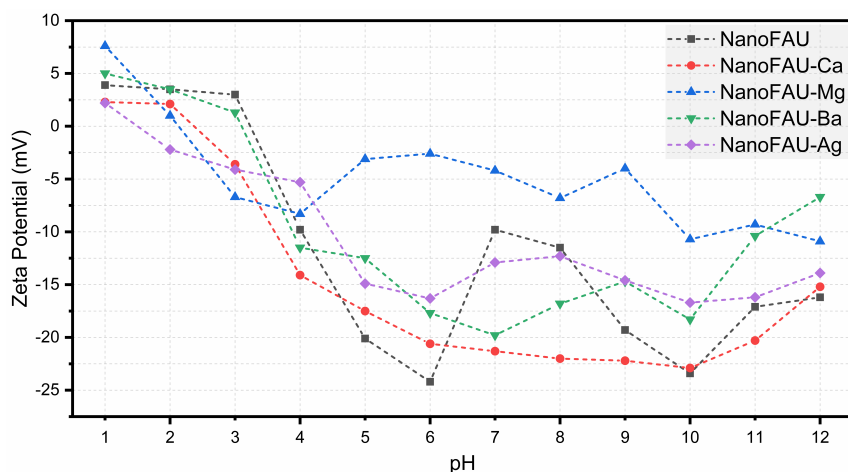


Figure 4.6: Zeta potential profiles of nanocrystalline Faujasite in the sodium form (NanoFAU) and its ion-exchanged derivatives (Ca^{2+} , Mg^{2+} , Ba^{2+} , and Ag^{+}) as a function of pH, measured in CaCl_2 solution, highlighting their respective isoelectric points.

of surface silanol and aluminol groups. At pH values above the isoelectric point (IEP), deprotonation leads to negatively charged SiO^- and AlO^- sites, whereas at pH values below the IEP the surface becomes neutral or positively charged^{292, 374}. The relative position of the IEP with respect to physiological blood pH (~ 7.4) is particularly relevant for predicting hemostatic behavior^{88, 390}.

All ion-exchanged samples exhibit a downward shift of the IEP relative to the parent NanoFAU (IEP ≈ 3.2). Specifically, the IEP values are approximately 2.5 (NanoFAU-Ca), 2.3 (NanoFAU-Mg), 3.1 (NanoFAU-Ba), and 1.5 (NanoFAU-Ag). Consequently, under physiological conditions all materials possess a net negative surface charge, favoring electrostatic interactions with positively charged domains of coagulation factors.

It is worth noting that NanoFAU-Mg displays relatively more positive zeta potential values across a broad pH range. This behavior is consistent with its non-ideal charge compensation inferred from normalized oxide composition ($1.0\text{Al}_2\text{O}_3 : 2.7\text{SiO}_2 : 0.5\text{Na}_2\text{O} : 1.2\text{MgO}$), which implies an effective excess of extra-framework cationic charge. This excess likely contributes to partial surface charge neutralization and modifies the electrokinetic profile.

Collectively, these results demonstrate that ion exchange not only preserves the structural integrity of the FAU framework but also modulates both hierarchical porosity and surface charge characteristics. These physicochemical modifications provide the mechanistic foundation for the distinct hemostatic and antimicrobial behaviors observed among the NanoFAU derivatives.

Thromboelastographic Evaluation

The hemostatic performance of nanocrystalline Faujasite (NanoFAU) and its ion-exchanged derivatives was systematically evaluated by thromboelastography (TEG), a technique that

provides real-time, quantitative assessment of the viscoelastic evolution of clot formation in whole blood. Citrated whole blood without zeolite addition was used as the control, enabling direct comparison with samples treated with NanoFAU, NanoFAU-Ca, NanoFAU-Mg, NanoFAU-Ba, and NanoFAU-Ag. Representative TEG tracings are shown in Figure 4.7, and the corresponding quantitative parameters are summarized in Table 4.2.

The analyzed TEG parameters included the reaction time (R), reflecting the latency to initial fibrin formation; the clot formation time (K), associated with clot propagation kinetics; the α -angle, indicative of the rate of fibrin network growth; and the maximum amplitude (MA), which reflects the final clot strength arising from fibrin–platelet interactions.

Relative to the control, all zeolitic materials significantly accelerated the initiation of coagulation, as evidenced by a pronounced reduction in R values. Pristine NanoFAU reduced the R time from (8.6 ± 0.7) min (control) to (2.4 ± 0.1) min, confirming its intrinsic procoagulant activity. This effect was further modulated by ion exchange. Among the derivatives, NanoFAU-Ca exhibited the most pronounced acceleration of clot initiation, with an R value of (1.1 ± 0.2) min, approaching the lower limit of the physiological reference range and well below the threshold considered critical for rapid hemorrhage control.

NanoFAU-Mg also demonstrated enhanced coagulation kinetics, with reduced R $((2.1 \pm 0.2)$ min) and K $((1.1 \pm 0.2)$ min) values and an increased α -angle $((76.5 \pm 2.2)^\circ)$, indicating efficient fibrin build-up. However, a modest reduction in MA $((53.5 \pm 5.7)$ mm) suggests that, although clot initiation and propagation were accelerated, the final clot strength was not proportionally enhanced. A similar trend was observed for NanoFAU-Ba, which displayed slightly prolonged R values $((2.7 \pm 0.2)$ min) relative to NanoFAU-Ca and NanoFAU-Mg, combined with reduced Ma $((50.9 \pm 3.4)$ mm), indicating weaker clot stabilization.

In contrast, NanoFAU-Ag induced the most substantial impairment of clot formation. This sample exhibited prolonged R $((3.4 \pm 0.5)$ min) and K $((2.5 \pm 0.6)$ min) times, accompanied by a marked decrease in α -angle $((60.0 \pm 2.4)^\circ)$ and a pronounced reduction in MA $((42.4 \pm 6.4)$ mm). The significant decrease in MA indicates compromised clot mechanical integrity, likely arising from disrupted fibrin polymerization and weakened platelet–fibrin interactions. These findings suggest that, although silver ion exchange confers strong antimicrobial functionality, it negatively interferes with the coagulation cascade.

Statistical analysis by one-way ANOVA revealed highly significant differences in R values among all treated samples relative to the control ($p < 0.0001$), with NanoFAU-Ca exhibiting the most pronounced effect. Significant differences were also observed for K and α -angle ($p < 0.005$). In contrast, despite clear numerical trends, MA differences did not reach statistical significance, reflecting the larger variability inherent to clot strength measurements.

Importantly, the thromboelastographic findings were corroborated by phase-contrast microscopy, which provided direct qualitative evidence of clot formation at the cellular level. As shown in Figures C4.4 – C4.6 (See Supporting Information), whole blood exposed to NanoFAU and its ion-exchanged derivatives exhibited pronounced red blood cell aggregation and the formation of fibrin-rich clot structures, in clear contrast to the control. These microstructural observations confirm that the accelerated coagulation kinetics detected by TEG arise from genuine fibrin network formation and cellular organization, rather than from purely physicochemical alterations of blood viscoelasticity.

The strong clot-accelerating behavior observed here is consistent with the growing body of evidence that inorganic surfaces can be “functionally procoagulant” when engineered for rapid, localized contact activation and factor enrichment at the wound interface. Recent reviews emphasize that next-generation hemostats increasingly leverage high surface area, tailored surface charge, and hierarchical porosity — features shared by nanozeolites, mesoporous silicas, and certain clay/mineral platforms — to concentrate proteins and promote intrinsic pathway activation without relying on biological coagulants^{89, 292, 390, 391}. It is already well established that polar inorganic surfaces, such as oxides and silicate-based materials, can accelerate blood coagulation via the so-called “glass effect”^{88, 292, 374}. In this context, negatively charged surfaces act as contact activators for coagulation factor XII (FXII), initiating the intrinsic pathway. FXII activation occurs through electrostatic interactions between negatively charged surfaces and positively charged residues on the heavy chain of the zymogen, inducing conformational changes that promote autoactivation and subsequent proteolytic cleavage^{290, 376, 377}.

Beyond the traditional description of “negatively charged surface + Ca^{2+} supplementation”, protein adsorption (and subsequent corona formation) and surface-mediated assembly of coagulation complexes are now also recognized as decisive contributors to the hemostatic response of calcium-containing inorganic materials^{294, 390}. Recently, Shang *et al.*⁸⁹ reported that Ca-exchanged Y zeolite surfaces can “mimic” certain platelet functions by serving as platforms for prothrombinase complex assembly, effectively acting as “inorganic platelets”. Notably, the zeolite-assembled prothrombinase complexes displayed enhanced activity, and the presence of Ca^{2+} was essential for efficient complex formation, consistent with its established physiological role in coagulation. Further adding to the complexity of these systems, several studies have shown that metal ions can directly modulate coagulation protein interactions and contact activation³⁹². Mutch, Waters, and Morrissey³⁷⁸, for instance, demonstrated that divalent metal ions immobilized on surfaces strongly interact with FXI, FXII, and high-molecular-weight kininogen, affecting activation of the contact pathway.

These concepts align with our findings that ion identity (e.g., Ca^{2+} vs. Ag^+) can enhance early clotting kinetics while also modulating clot mechanics, highlighting the need to treat “procoagulant performance” as a coupled outcome of porosity-driven factor

concentration and ion/surface-regulated protein interactions^{89, 294, 390}.

Taken together, the combined thromboelastographic and microscopic evidence demonstrates that nanocrystalline Faujasite exhibits strong intrinsic hemostatic activity, which can be further tuned by ion exchange. Among the tested materials, NanoFAU-Ca emerged as the most promising candidate for rapid hemorrhage control, combining accelerated clot initiation with preserved clot strength. Conversely, NanoFAU-Ag, while advantageous for antimicrobial purposes, significantly compromises coagulation performance, underscoring the need to balance hemostatic and antimicrobial functionalities in the rational design of multifunctional wound-care materials.

It is important to distinguish intentional, localized procoagulant activity designed for topical hemostasis from broader systemic hemocompatibility requirements. According to ISO 10993-4, comprehensive hemocompatibility evaluation of blood-contacting materials includes assessment of hemolysis, platelet activation, coagulation pathway perturbation, and complement activation, particularly for devices intended for prolonged intravascular exposure³⁹³. In the present study, the materials are intended for topical application, where controlled surface-mediated coagulation at the wound interface represents a desired therapeutic outcome rather than an indicator of pathological thrombogenicity. While dedicated hemolysis and platelet activation assays represent important next steps toward full translational validation, the absence of abnormal thromboelastographic signatures and the preservation of physiologically relevant clot strength parameters indicate that the materials do not induce uncontrolled coagulation under the investigated conditions.

Table 4.2: Thromboelastographic (TEG) parameters of citrated whole blood in the absence of zeolite (control) and after treatment with nanocrystalline Faujasite (NanoFAU) and its ion-exchanged derivatives (NanoFAU-Ca, NanoFAU-Mg, NanoFAU-Ba, and NanoFAU-Ag). Reaction time (R), clot formation time (K), α -angle, and maximum amplitude (MA) were extracted from TEG tracings and are reported as mean $\pm$ standard deviation ($n = 3$).

	R (min)	K (min)	Alpha Angle (°)	MA (mm)
Reference value	5 – 10	1 – 3	45 – 74	54 – 62
Control	8.6 $\pm$ 0.7	3.5 $\pm$ 0.6	49.7 $\pm$ 6.8	53.6 $\pm$ 2.4
NanoFAU	2.4 $\pm$ 0.1	1.2 $\pm$ 0.0	73.9 $\pm$ 0.5	61.2 $\pm$ 1.6
NanoFAU-Ca	1.1 $\pm$ 0.2	1.2 $\pm$ 0.1	75.1 $\pm$ 2.3	60.3 $\pm$ 1.6
NanoFAU-Mg	2.1 $\pm$ 0.2	1.1 $\pm$ 0.2	76.5 $\pm$ 2.2	53.5 $\pm$ 5.7
NanoFAU-Ba	2.7 $\pm$ 0.2	1.0 $\pm$ 0.1	75.6 $\pm$ 0.3	50.9 $\pm$ 3.4
NanoFAU-Ag	3.4 $\pm$ 0.5	2.5 $\pm$ 0.6	60.0 $\pm$ 2.4	42.4 $\pm$ 6.4

Another practical motivation for nanoscale inorganic hemostats is mitigation of heat-related tissue injury historically associated with strongly exothermic water adsorption in

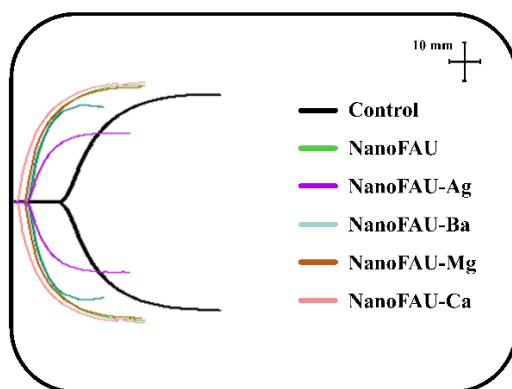


Figure 4.7: Thromboelastography (TEG) curves of citrated whole blood before zeolite addition (control) and after treatment with nanocrystalline Faujasite (NanoFAU) and its ion-exchanged derivatives (NanoFAU-Ca, NanoFAU-Mg, NanoFAU-Ba, and NanoFAU-Ag).

dehydrated zeolite powders. While direct temperature-rise measurements were outside the scope of this work, prior calorimetric evidence shows that ion exchange can substantially reduce hydration enthalpy in zeolitic systems, supporting a materials-design pathway to lower heat release during use^{87, 92}. More broadly, the field is converging on porous inorganic architectures (including mesoporous silica microspheres) that combine rapid fluid uptake with improved thermal handling, reinforcing the translational relevance of nano-/mesoporous designs for emergency hemostasis³⁹¹.

Antimicrobial Activity and Cytocompatibility

The antimicrobial performance of nanocrystalline Faujasite (NanoFAU) and its ion-exchanged derivatives was systematically evaluated against *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans* using broth microdilution (MIC), agar diffusion assays, and post-incubation subculturing to discriminate between bacteriostatic/fungistatic and bactericidal effects.

Unmodified NanoFAU exhibited no detectable antimicrobial activity against either *S. aureus* or *C. albicans* at concentrations up to 0.1 g (Table 4.3), confirming that the sodium form of the zeolite framework is biologically inert with respect to microbial inhibition. Similarly, NanoFAU-Mg showed no inhibitory effect at any tested concentration, indicating that magnesium incorporation does not confer antimicrobial functionality under the present experimental conditions.

In contrast, silver-exchanged NanoFAU (NanoFAU-Ag) displayed pronounced antimicrobial activity against both microorganisms. In the microdilution assay (Table 4.4), NanoFAU-Ag inhibited *S. aureus* growth at concentrations as low as 1.0 and 0.5 mg mL⁻¹, representing a reduction of more than two orders of magnitude relative to the concen-

trations required for growth inhibition by unmodified NanoFAU ($250 - 500 \text{ mg mL}^{-1}$). Subculturing aliquots from inhibited wells onto Mueller–Hinton agar yielded no colony growth, demonstrating that the antibacterial effect of NanoFAU-Ag against *S. aureus* is bactericidal.

For *C. albicans*, NanoFAU-Ag also inhibited growth at 1.0 and 0.5 mg mL^{-1} in the microdilution assay. However, subsequent subculturing revealed colony formation at all concentrations, including those initially showing inhibition. This behavior indicates a fungistatic effect, whereby fungal proliferation is suppressed only during direct contact with the silver-exchanged zeolite. The absence of irreversible growth inhibition highlights a pathogen-dependent response to silver ion release.

Table 4.3: Antimicrobial activity of NanoFAU and its ion-exchanged derivatives (NanoFAU-Ag, NanoFAU-Cu, and NanoFAU-Mg) at concentrations of 0.1 g , 0.01 g , and 0.001 g against *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans*.

Material	Inhibitory concentration (g)	
	<i>S. aureus</i>	<i>C. albicans</i>
NanoFAU	NI	NI
	0.1	0.1
NanoFAU-Ag	0.01	0.01
	0.001	0.001
NanoFAU-Mg	NI	NI

NI: No inhibition

Table 4.4: Inhibitory concentrations of zeolites against *S. aureus* and *C. albicans* observed in the microdilution antimicrobial susceptibility test.

Material	Inhibitory concentration (mg)	
	<i>S. aureus</i>	<i>C. albicans</i>
NanoFAU	500	NI
	250	NI
NanoFAU-Ag	1	1
	0.5	0.5

NI: No inhibition

The antimicrobial activity was further corroborated by agar diffusion assays (Figures 4.8 and 4.9). NanoFAU-AgAg was the only material that produced clear inhibition halos against both microorganisms. Against *C. albicans*, NanoFAU-Ag generated a halo of 19.8 mm (Figure 4.8a), whereas all other materials — including NanoFAU, NanoFAU-

Mg, NanoFAU-Zn, and NanoFAU-Cu — showed no detectable inhibition. For *S. aureus*, NanoFAU-Ag produced a pronounced inhibition zone of approximately 25 mm (Figure 4.9b). Additional assays conducted at two zeolite concentrations (0.4 and 0.8 mg mL^{-1}) confirmed that NanoFAU-Ag consistently inhibited *S. aureus*, with inhibition halos ranging from 22 to 23 mm (Figure 4.9). A physical mixture of NanoFAU-Ca and NanoFAU-Ag exhibited inhibition halos comparable to NanoFAU-Ag alone, whereas NanoFAU-Ca by itself showed no antibacterial effect. These results demonstrate that the antimicrobial activity of the composite formulation arises exclusively from the silver-exchanged component and is largely independent of the zeolite concentration within the investigated range.

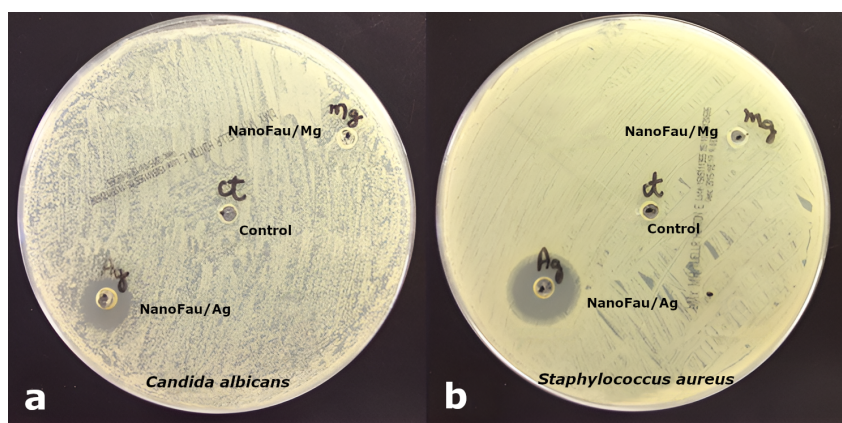


Figure 4.8: Representative inhibition halos observed in agar diffusion assays using nanometric zeolite suspensions (4 mg mL^{-1}). (a) Antifungal activity against *Candida albicans*: NanoFAU-Zn (no inhibition), NanoFAU-Mg (no inhibition), NanoFAU-Ag (inhibition halo: 19.8 mm), NanoFAU-Cu (no inhibition), and growth control (CT). (b) Antibacterial activity against *Staphylococcus aureus*: NanoFAU-Zn (no inhibition), NanoFAU-Mg (no inhibition), NanoFAU-Ag (inhibition halo: 25 mm), NanoFAU-Cu (no inhibition), and growth control (CT).

The observed antimicrobial activity of NanoFAU-Ag can be directly attributed to the presence of silver ions within the Faujasite framework. Zeolites act as reservoirs for Ag^+ ions, which can be gradually released via ion exchange with competing cations present in biological media^{111, 360, 394, 395}. Once released, silver ions exert antimicrobial effects through multiple, non-specific mechanisms, including disruption of membrane integrity, inactivation of essential thiol-containing enzymes, interference with nucleic-acid replication, and induction of oxidative stress via reactive oxygen species generation^{111, 359, 396–398}.

Beyond simple ion release, the antimicrobial efficacy of NanoFAU-Ag reflects the zeolite acting as a release-modulating matrix under ionic competition, enabling sustained local Ag^+ availability rather than an uncontrolled burst dose. Contemporary mechanistic studies emphasize that Ag-zeolite activity arises from the interplay between (i) Ag^+ release kinetics governed by ion-exchange equilibria and hydration behavior, and (ii) multi-target microbial damage pathways, including membrane disruption, enzyme inactivation, nucleic-acid interference, and oxidative stress processes^{250, 360, 368, 394}. Importantly, recent work

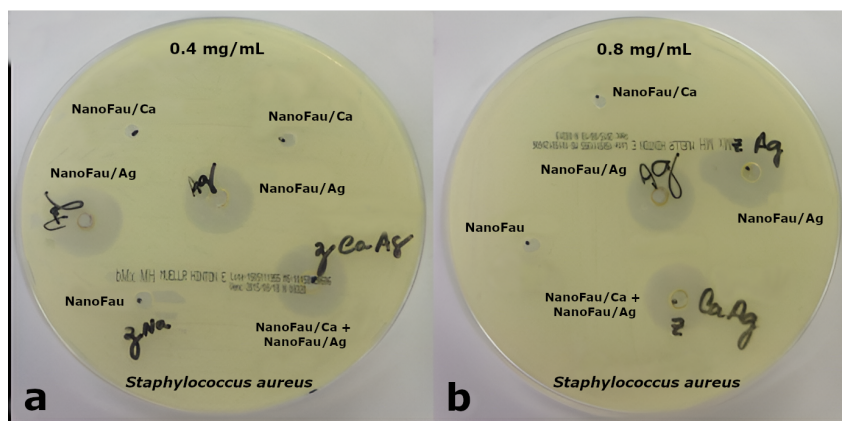


Figure 4.9: Antibacterial activity of zeolite-based materials against *Staphylococcus aureus* evaluated by the agar diffusion method. (a) At 0.4 mg mL^{-1} : NanoFAU (no inhibition), NanoFAU-Ca (no inhibition), NanoFAU-Ag (inhibition halo: 23 mm), and NanoFAU-Ca + NanoFAU-Ag (inhibition halo: 24 mm). (b) At 0.8 mg mL^{-1} : NanoFAU (no inhibition), NanoFAU-Ca (no inhibition), NanoFAU-Ag (inhibition halo: 22 mm), and NanoFAU-Ca + NanoFAU-Ag (inhibition halo: 22 mm).

also supports a role for ROS-associated oxidative activity in Ag-exchanged zeolites under aerobic conditions, with measurable coupling between oxidative processes and antimicrobial efficacy that depends on zeolite structure, Ag loading, and environmental conditions³⁹⁴. In parallel, antibiofilm activity has been documented for Ag-ion-exchanged zeolites in contemporary microbiological models, reinforcing their relevance for wound-infection control, where biofilm formation represents a major clinical barrier^{360, 394–397, 399}.

The pathogen-dependent response observed in this study — bactericidal against *Staphylococcus aureus* and fungistatic against *Candida albicans* — is consistent with previous reports indicating that microbial susceptibility to silver-based materials is influenced by differences in cell wall architecture, metabolic activity, and oxidative stress tolerance^{394, 395}. The robust antimicrobial response of NanoFAU-Ag, combined with the absence of activity in sodium- and magnesium-exchanged zeolites, confirms that silver incorporation is both necessary and sufficient to impart antimicrobial functionality to nanocrystalline Faujasite.

Cytocompatibility Assessment

The cytotoxicity of NanoFAU-Ag was evaluated in human keratinocyte (HaCaT) cells after 24 h exposure using the MTS assay. As shown in Figure 4.10, cell viability remained above 70% across all tested concentrations (1000 to $3.9 \mu\text{g mL}^{-1}$), with no statistically significant differences relative to the negative control (one-way ANOVA followed by Dunnett's *post hoc* test, $p > 0.05$).

According to ISO 10993-5, materials that reduce cell viability below 70% are classified as cytotoxic. Under the conditions investigated here, NanoFAU-Ag did not meet this criterion, indicating a favorable *in vitro* biocompatibility profile toward epithelial cells.

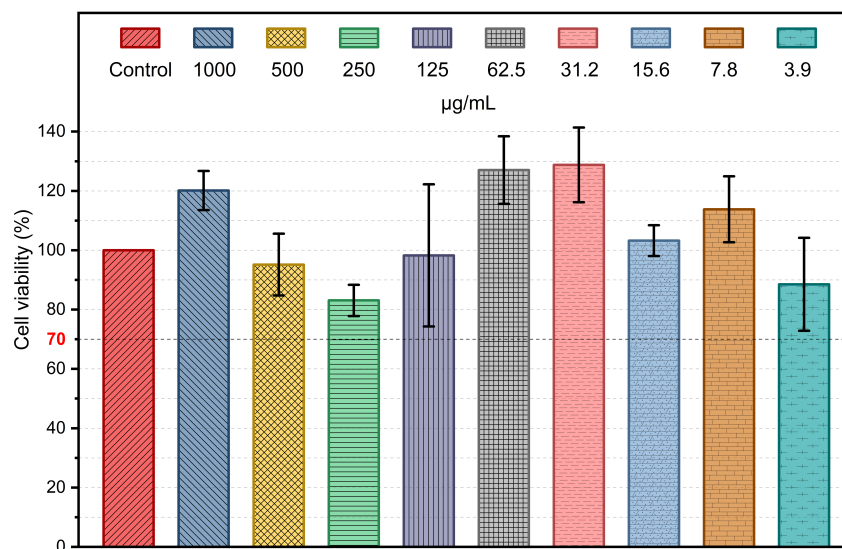


Figure 4.10: Cell viability (%) of HaCaT cells after 24 h exposure to silver-exchanged zeolite at concentrations ranging from 1000 to $3.9 \mu\text{g mL}^{-1}$. Data represent mean $\pm$ SD ($n = 3$). Statistical analysis was performed using one-way ANOVA followed by Dunnett's *post hoc* test. ns: not significant ($p > 0.05$). The dashed line represents the 70% viability threshold according to ISO 10993-5.

Given that HaCaT keratinocytes are a well-established model for human epidermal tissue, these results support the suitability of silver-exchanged Faujasite for applications involving direct contact with skin or wound environments.

4.4 Conclusions

Nanocrystalline Faujasite (NanoFAU) and its ion-exchanged derivatives were demonstrated to constitute a tunable inorganic biomaterial platform capable of integrating hemostatic and antimicrobial functionalities within a single framework. Structural characterization confirmed preservation of the FAU lattice upon ion exchange, while surface charge analysis revealed physiologically relevant negative surface potentials consistent with contact-activation-mediated coagulation.

Thromboelastographic evaluation identified calcium exchange as the most effective strategy for enhancing clot initiation and propagation, with NanoFAU-Ca exhibiting rapid clot formation ($R = 1.1 \text{ min}$) and preserved clot strength ($MA = 60.3 \text{ mm}$). In contrast, silver exchange conferred potent antimicrobial activity, producing bactericidal effects against *Staphylococcus aureus* and fungistatic inhibition of *Candida albicans*, while maintaining cytocompatibility above ISO 10993-5 thresholds. These findings highlight a cation-dependent trade-off between maximal coagulation efficiency and antimicrobial potency, underscoring the importance of ion identity in governing multifunctional performance. Overall, ion exchange emerges as a straightforward and effective strategy for rationally tailoring the biological behavior of nanocrystalline Faujasite. By decoupling

and selectively optimizing coagulation and antimicrobial responses, NanoFAU derivatives represent promising candidates for advanced topical hemostats requiring simultaneous hemorrhage control and infection mitigation. Future studies focusing on *in vivo* validation and controlled ion-release kinetics will be critical for translational development.

Capítulo 5

Conclusões Gerais e Perspectivas Futuras

Ao longo desta tese foram investigadas diferentes estratégias para o desenvolvimento de materiais silicatos destinados a aplicações biomédicas, tendo como objetivo principal compreender como modificações estruturais, texturais e químicas influenciam seu desempenho biológico, especialmente no contexto da hemostasia e da atividade antimicrobiana. Embora os estudos apresentados tenham seguido abordagens distintas, ambos foram conduzidos a partir de uma mesma premissa: a de que o desempenho desses materiais é o resultado de um conjunto de propriedades físico-químicas que podem ser racionalmente controladas por meio da síntese e da modificação de sua estrutura.

No primeiro estudo, foi demonstrado que a utilização de resíduos de biomassa inorgânica representa uma alternativa viável para a obtenção de silicatos de cálcio com potencial aplicação como agentes hemostáticos. Mais do que evidenciar a possibilidade de empregar uma matéria-prima de baixo custo e maior apelo ambiental, os resultados mostraram que a escolha dos agentes direcionadores de estrutura exerce influência direta sobre a formação das fases cristalinas e sobre propriedades texturais, como área superficial e porosidade, refletindo-se no desempenho observado nos ensaios de coagulação. Até onde pôde-se verificar, esse trabalho representa o primeiro estudo reportado na literatura em que resíduos de biomassa inorgânica ricos em cálcio, especificamente cascas de ovos de galinha, foram utilizados na síntese de materiais silicatos ricos em cálcio destinados a aplicações biomédicas. Os resultados reforçam a importância do controle das condições de síntese como ferramenta para o desenvolvimento racional de biomateriais, evidenciando que pequenas modificações no processo podem produzir alterações significativas nas propriedades finais do material.

De maneira complementar, o segundo estudo demonstrou que a composição química dos silicatos também pode ser explorada como um parâmetro de projeto. A modificação de zeólitas do tipo Faujasita por troca iônica permitiu modular as propriedades hemostáticas e antimicrobianas, evidenciando que a incorporação de diferentes espécies metálicas constitui uma estratégia versátil para atribuir novas funcionalidades a um mesmo sistema. Ainda que a modulação através de troca iônica seja uma técnica já amplamente consolidada em ciência de zeólitas, o trabalho propõe a avaliação em um mesmo desenho experimental das propriedades hemostáticas e antimicrobianas dos materiais, possibilitando estabelecer correlações diretas entre as modificações químicas introduzidas e o desempenho funcional obtido em ambas as frentes de aplicação “simultaneamente”. Nesse contexto, os resultados

obtidos sugerem que a multifuncionalidade pode ser alcançada não apenas pela combinação de diferentes materiais, mas também pelo ajuste criterioso de sua composição química, preservando sua estrutura cristalina e explorando as possibilidades oferecidas pela própria arquitetura zeolítica.

Naturalmente, os resultados obtidos também evidenciam que diversas questões permanecem em aberto. Os ensaios realizados permitiram estabelecer correlações importantes entre propriedades físico-químicas e comportamento biológico *in vitro*; entretanto, a compreensão dos mecanismos moleculares responsáveis por essas respostas ainda demanda investigação adicional. Da mesma forma, estudos envolvendo modelos biológicos mais complexos, incluindo avaliações *in vivo*, tornam-se etapas fundamentais para validar o potencial translacional dos materiais desenvolvidos e compreender aspectos relacionados à biocompatibilidade, biodegradação, resposta inflamatória e regeneração tecidual.

Além disso, as estratégias exploradas ao longo desta tese representam apenas uma fração das possibilidades atualmente disponíveis para o desenvolvimento de biomateriais silicatos. A combinação entre diferentes rotas de síntese, agentes direcionadores de estrutura, processos de funcionalização química e incorporação de novas espécies metálicas constitui um espaço de investigação ainda amplamente inexplorado. Particularmente promissora parece ser a integração dessas diferentes abordagens em um mesmo sistema, permitindo controlar simultaneamente estrutura cristalina, propriedades texturais, composição química e liberação de espécies bioativas. Essa perspectiva abre caminho para o desenvolvimento de materiais capazes de atuar não apenas no controle imediato de hemorragias e infecções, mas também nas etapas subsequentes do processo de cicatrização, contribuindo para a regeneração adequada do tecido lesionado.

Por fim, entendemos que a principal contribuição desta tese não reside na proposição de um único material para aplicação biomédica, mas na demonstração de duas estratégias de desenvolvimento de biomateriais. A primeira consiste na utilização de biomassa inorgânica como matéria-prima para a síntese de silicatos de cálcio com potencial aplicação hemostática; a segunda, na demonstração de que modificações químicas promovidas por troca iônica podem ser empregadas para modular simultaneamente propriedades hemostáticas e antimicrobianas em materiais zeolíticos. Ao estabelecer relações entre processamento, estrutura, composição e funcionalidade, este trabalho contribui para a compreensão de como diferentes estratégias de síntese e modificação química influenciam o desempenho desses materiais, oferecendo fundamentos para o desenvolvimento de novas plataformas voltadas ao controle de hemorragias e infecções.

Referências

- 1 ZHAN, B.-Z. et al. A novel, organic-additive-free synthesis of nanometer-sized nax crystals. *Chemical Communications*, Royal Society of Chemistry, n. 13, p. 1176–1177, 2001.
- 2 EASTRIDGE, B. J. et al. Death on the battlefield (2001–2011): implications for the future of combat casualty care. *Journal of trauma and acute care surgery*, LWW, v. 73, n. 6, p. S431–S437, 2012.
- 3 MITRA, B. et al. Long-term outcomes of patients receiving a massive transfusion after trauma. *Shock*, LWW, v. 42, n. 4, p. 307–312, 2014.
- 4 KAUVAR, D. S.; LEFERING, R.; WADE, C. E. Impact of hemorrhage on trauma outcome: an overview of epidemiology, clinical presentations, and therapeutic considerations. *Journal of Trauma and Acute Care Surgery*, LWW, v. 60, n. 6, p. S3–S11, 2006.
- 5 BRENNER, A. et al. Outcome measures in clinical trials of treatments for acute severe haemorrhage. *Trials*, Springer, v. 19, n. 1, p. 533, 2018.
- 6 COKELET, G.; MEISELMAN, H. Handbook of hemorheology and hemodynamics. *Macro-and micro-rheological properties of blood*. IOS Press Washington DC, p. 45–71, 2007.
- 7 PACELLA, H. E. et al. Darcy permeability of hollow fiber bundles used in blood oxygenation devices. *Journal of membrane science*, Elsevier, v. 382, n. 1-2, p. 238–242, 2011.
- 8 VINCENT, J.-L.; BACKER, D. D. Circulatory shock. *New England Journal of Medicine*, Massachusetts Medical Society, v. 369, n. 18, p. 1726–1734, 2013.
- 9 DUNN, J. O.; MYTHEN, M. G.; GROCOTT, M. P. Physiology of oxygen transport. *BJA Education*, Elsevier, v. 16, n. 10, p. 341–348, 2016.
- 10 SPAHN, D.; ROSSAINT, R. Coagulopathy and blood component transfusion in trauma. *British journal of anaesthesia*, Elsevier, v. 95, n. 2, p. 130–139, 2005.
- 11 FERRARA, A. et al. Hypothermia and acidosis worsen coagulopathy in the patient requiring massive transfusion. *The American journal of surgery*, Elsevier, v. 160, n. 5, p. 515–518, 1990.
- 12 DYER, M.; NEAL, M. D. Defining the lethal triad. In: *Damage Control Management in the Polytrauma Patient*. [S.l.]: Springer, 2017. p. 41–53.
- 13 VEELLEN, M. J. van; MAEDER, M. B. Hypothermia in trauma. *International journal of environmental research and public health*, MDPI, v. 18, n. 16, p. 8719, 2021.
- 14 VERSTEEG, H. H. et al. New fundamentals in hemostasis. *Physiological reviews*, American Physiological Society Bethesda, MD, v. 93, n. 1, p. 327–358, 2013.

- 15 GREEN, D. Coagulation cascade. *Hemodialysis International*, Wiley Online Library, v. 10, n. S2, p. S2–S4, 2006.
- 16 SMITH, S. A. The cell-based model of coagulation. *Journal of veterinary emergency and critical care*, Wiley Online Library, v. 19, n. 1, p. 3–10, 2009.
- 17 DAVIE, E. W.; RATNOFF, O. D. Waterfall sequence for intrinsic blood clotting. *Science*, American Association for the Advancement of Science, v. 145, n. 3638, p. 1310–1312, 1964.
- 18 MACFARLANE, R. An enzyme cascade in the blood clotting mechanism, and its function as a biochemical amplifier. *Nature*, Nature Publishing Group UK London, v. 202, n. 4931, p. 498–499, 1964.
- 19 HOFFMAN, M.; MONROE, D. M. Coagulation 2006: a modern view of hemostasis. *Hematology/oncology clinics of North America*, Elsevier, v. 21, n. 1, p. 1–11, 2007.
- 20 HEINZ, S.; BRASPENNING, J. Measurement of blood coagulation factor synthesis in cultures of human hepatocytes. In: *Protocols in In Vitro Hepatocyte Research*. [S.l.]: Springer, 2014. p. 309–316.
- 21 PARK, S.; PARK, J. K. Back to basics: the coagulation pathway. *Blood research*, Springer, v. 59, n. 1, p. 35, 2024.
- 22 THOMAS, M. R.; STOREY, R. F. The role of platelets in inflammation. *Thrombosis and haemostasis*, Schattauer GmbH, v. 114, n. 09, p. 449–458, 2015.
- 23 JENNINGS, L. K. Mechanisms of platelet activation: need for new strategies to protect against platelet-mediated atherothrombosis. *Thrombosis and haemostasis*, Schattauer GmbH, v. 102, n. 08, p. 248–257, 2009.
- 24 CLEMETSON, K. J. Platelets and primary haemostasis. *Thrombosis research*, Elsevier, v. 129, n. 3, p. 220–224, 2012.
- 25 YUN, S.-H. et al. Platelet activation: the mechanisms and potential biomarkers. *BioMed research international*, Wiley Online Library, v. 2016, n. 1, p. 9060143, 2016.
- 26 JOUDA, H.; MURILLO, L. L.; WANG, T. Current progress in vascular engineering and its clinical applications. *Cells*, MDPI, v. 11, n. 3, p. 493, 2022.
- 27 OSTERUD, B.; RAPAPORT, S. I. Activation of factor ix by the reaction product of tissue factor and factor vii: additional pathway for initiating blood coagulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 74, n. 12, p. 5260–5264, 1977.
- 28 HOFFMAN, M.; MONROE, D. M. A cell-based model of hemostasis. *Thrombosis and haemostasis*, Schattauer GmbH, v. 85, n. 06, p. 958–965, 2001.
- 29 SMITH, S. A.; TRAVERS, R. J.; MORRISSEY, J. H. How it all starts: Initiation of the clotting cascade. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology*, Taylor & Francis, v. 50, n. 4, p. 326–336, 2015.
- 30 MORRISSEY, J.; JR, G. B. Tissue factor and the initiation and regulation (tfpi) of coagulation. *Hemostasis and Thrombosis: Basic Principles and Clinical Practice*, 6th ed.; Marder, VJ, Aird, WC, Bennett, JS, Schulman, S., White, GC, Eds, p. 163–178, 2013.

- 31 NEMERSON, Y.; REPKE, D. Tissue factor accelerates the activation of coagulation factor vii: the role of a bifunctional coagulation cofactor. *Thrombosis research*, Elsevier, v. 40, n. 3, p. 351–358, 1985.
- 32 KONDO, S.; KISIEL, W. Regulation of factor viia activity in plasma: evidence that antithrombin iii is the sole plasma protease inhibitor of human factor viia. *Thrombosis research*, Elsevier, v. 46, n. 2, p. 325–335, 1987.
- 33 SILVERBERG, M. et al. Autoactivation of human hageman factor. demonstration utilizing a synthetic substrate. *Journal of Biological Chemistry*, Elsevier, v. 255, n. 15, p. 7281–7286, 1980.
- 34 TANKERSLEY, D. L.; FINLAYSON, J. Kinetics of activation and autoactivation of human factor xii. *Biochemistry*, ACS Publications, v. 23, n. 2, p. 273–279, 1984.
- 35 MÜLLER, F.; GAILANI, D.; RENNE, T. Factor xi and xii as antithrombotic targets. *Current opinion in hematology*, LWW, v. 18, n. 5, p. 349–355, 2011.
- 36 SCHENONE, M.; FURIE, B. C.; FURIE, B. The blood coagulation cascade. *Current opinion in hematology*, LWW, v. 11, n. 4, p. 272–277, 2004.
- 37 LORAND, L. Factor xiii: structure, activation, and interactions with fibrinogen and fibrin. *Annals of the New York Academy of Sciences*, Wiley Online Library, v. 936, n. 1, p. 291–311, 2001.
- 38 SUNDARAM, C. P.; KEENAN, A. C. Evolution of hemostatic agents in surgical practice. *Indian Journal of Urology*, Medknow, v. 26, n. 3, p. 374–378, 2010.
- 39 YU, P.; ZHONG, W. Hemostatic materials in wound care. *Burns & Trauma*, Oxford University Press, v. 9, p. tkab019, 2021.
- 40 PALM, M. D.; ALTMAN, J. S. Topical hemostatic agents: a review. *Dermatologic Surgery*, LWW, v. 34, n. 4, p. 431–445, 2008.
- 41 TOMPECK, A. J. et al. A comprehensive review of topical hemostatic agents: the good, the bad, and the novel. *Journal of Trauma and Acute Care Surgery*, LWW, v. 88, n. 1, p. e1–e21, 2020.
- 42 SPOTNITZ, W. D. Active and mechanical hemostatic agents. *Surgery*, Elsevier, v. 142, n. 4, p. S34–S38, 2007.
- 43 SUNG, Y. K.; LEE, D. R.; CHUNG, D. J. Advances in the development of hemostatic biomaterials for medical application. *Biomaterials research*, BioMed Central London, v. 25, n. 1, p. 37, 2021.
- 44 ZHENG, C. et al. Research status and development potential of composite hemostatic materials. *Journal of Materials Chemistry B*, Royal Society of Chemistry, v. 8, n. 25, p. 5395–5410, 2020.
- 45 KHOSHMOHABAT, H. et al. A review of the application of cellulose hemostatic agent on trauma injuries. *Open Access Emergency Medicine*, Taylor & Francis, p. 171–177, 2019.

- 46 WANG, X.; YAN, Y.; ZHANG, R. A comparison of chitosan and collagen sponges as hemostatic dressings. *Journal of Bioactive and Compatible Polymers*, Sage Publications Sage CA: Thousand Oaks, CA, v. 21, n. 1, p. 39–54, 2006.
- 47 WANG, T. et al. Biocompatibility, hemostatic properties, and wound healing evaluation of tilapia skin collagen sponges. *Journal of Bioactive and Compatible Polymers*, Sage Publications Sage UK: London, England, v. 36, n. 1, p. 44–58, 2021.
- 48 GHEORGHIȚĂ, D. et al. Chitosan-based biomaterials for hemostatic applications: a review of recent advances. *International journal of molecular sciences*, MDPI, v. 24, n. 13, p. 10540, 2023.
- 49 SANDRI, G. et al. Chitosan/glycosaminoglycan scaffolds for skin reparation. *Carbohydrate polymers*, Elsevier, v. 220, p. 219–227, 2019.
- 50 YE, Q. et al. Chitosan/polyvinyl alcohol/lauramidopropyl betaine/2d-hof mixed film with abundant hydrogen bonds acts as high mechanical strength artificial skin. *Macromolecular bioscience*, Wiley Online Library, v. 21, n. 12, p. 2100317, 2021.
- 51 FILHO, S. H. Á. et al. Comparison between poliglecaprone and chitosan absorbable sutures in laparorrhaphy and cecorrhaphy in rabbits. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, Wiley Online Library, v. 107, n. 6, p. 2102–2108, 2019.
- 52 YANG, Y. et al. Bacterial inhibition potential of quaternised chitosan-coated vicryl absorbable suture: An in vitro and in vivo study. *Journal of orthopaedic translation*, Elsevier, v. 8, p. 49–61, 2017.
- 53 SHI, C. et al. Therapeutic potential of chitosan and its derivatives in regenerative medicine. *Journal of Surgical research*, Elsevier, v. 133, n. 2, p. 185–192, 2006.
- 54 ISLAM, M. A. et al. Mucoadhesive chitosan derivatives as novel drug carriers. *Current pharmaceutical design*, Bentham Science Publishers, v. 21, n. 29, p. 4285–4309, 2015.
- 55 TURCSÁNYI, Á.; VARGA, N.; CSAPÓ, E. Chitosan-modified hyaluronic acid-based nanosized drug carriers. *International journal of biological macromolecules*, Elsevier, v. 148, p. 218–225, 2020.
- 56 GUO, Y. et al. Recent advances in the medical applications of hemostatic materials. *Theranostics*, v. 13, n. 1, p. 161, 2023.
- 57 ALEMU, D.; GETACHEW, E.; MONDAL, A. K. Study on the physicochemical properties of chitosan and their applications in the biomedical sector. *International Journal of Polymer Science*, Wiley Online Library, v. 2023, n. 1, p. 5025341, 2023.
- 58 HU, Z. et al. Chitosan-based composite materials for prospective hemostatic applications. *Marine drugs*, MDPI, v. 16, n. 8, p. 273, 2018.
- 59 CRINI, G.; LICHTFOUSE, E. *Sustainable agriculture reviews 35: Chitin and chitosan: History, fundamentals and innovations*. [S.l.]: Springer, 2019.
- 60 JIMÉNEZ-GÓMEZ, C. P.; CECILIA, J. A. Chitosan: a natural biopolymer with a wide and varied range of applications. *Molecules*, MDPI, v. 25, n. 17, p. 3981, 2020.

- 61 LUPU, C.; CALB, M. Changes in the platelet surface charge in rabbits with experimental hypercholesterolemia. *Atherosclerosis*, Elsevier, v. 72, n. 1, p. 77–82, 1988.
- 62 WINKEL, J. v. et al. Red blood cell surface charge and alcian blue binding. *Nephrology Dialysis Transplantation*, Oxford University Press, v. 2, n. 4, p. 280–281, 1987.
- 63 BRIEDÉ, J. J. et al. Heterogeneity in microparticle formation and exposure of anionic phospholipids at the plasma membrane of single adherent platelets. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, Elsevier, v. 1451, n. 1, p. 163–172, 1999.
- 64 HATTORI, H.; ISHIHARA, M. Changes in blood aggregation with differences in molecular weight and degree of deacetylation of chitosan. *Biomedical materials*, IOP Publishing, v. 10, n. 1, p. 015014, 2015.
- 65 CHEN, K.-Y. et al. Hemostatic enhancement via chitosan is independent of classical clotting pathways—a quantitative study. *Polymers*, MDPI, v. 12, n. 10, p. 2391, 2020.
- 66 CHEN, K. et al. Mechanics for the adhesion and aggregation of red blood cells on chitosan. *Journal of mechanics*, Cambridge University Press Cambridge, UK, v. 34, n. 5, p. 725–732, 2018.
- 67 KHAN, M. A.; MUJAHID, M. A review on recent advances in chitosan based composite for hemostatic dressings. *International journal of biological macromolecules*, Elsevier, v. 124, p. 138–147, 2019.
- 68 Willy O. Herrmann e Wolfram Haehnel. *Process for the Preparation of Polymerized Vinyl Alcohol and Its Derivatives*. 1928. US1672156A. Filed July 17, 1925. Priority date July 19, 1924.
- 69 NAGARKAR, R.; PATEL, J. et al. Polyvinyl alcohol: A comprehensive study. *Acta Sci. Pharm. Sci.*, v. 3, n. 4, p. 34–44, 2019.
- 70 BHATIA, M. S. et al. Chemical modification of pectins, characterization and evaluation for drug delivery. *Scientia Pharmaceutica*, Austrian Pharmaceutical Society, v. 76, n. 4, p. 775–784, 2008.
- 71 ABUALSOUD, B. M. et al. Pectin-based composites: a promising approach for tissue engineering and wound healing. *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials*, Taylor & Francis, v. 75, n. 1, p. 69–96, 2026.
- 72 FREITAS, C. M. P. et al. Structure and applications of pectin in food, biomedical, and pharmaceutical industry: A review. *Coatings*, MDPI, v. 11, n. 8, p. 922, 2021.
- 73 CAMPO, K. N. Rubio-Martin del et al. From nature to science: A review of the applications of pectin-based hydrogels. *Macromol*, MDPI, v. 5, n. 4, p. 58, 2025.
- 74 SINHA, D. et al. Tuned gum ghatti and pectin for green synthesis of novel wound dressing material: Engineering aspects and in vivo study. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, Elsevier, v. 76, p. 103730, 2022.
- 75 EINHORN-STOLL, U. Pectin-water interactions in foods—from powder to gel. *Food hydrocolloids*, Elsevier, v. 78, p. 109–119, 2018.

- 76 POPOV, S. et al. Effect of cross-linking cations on in vitro biocompatibility of apple pectin gel beads. *International Journal of Molecular Sciences*, MDPI, v. 23, n. 23, p. 14789, 2022.
- 77 ZHANG, B. et al. Modulation of calcium-induced gelation of pectin by oligoguluronate as compared to alginate. *Food Research International*, Elsevier, v. 116, p. 232–240, 2019.
- 78 CAO, L. et al. Egg-box model-based gelation of alginate and pectin: A review. *Carbohydrate polymers*, Elsevier, v. 242, p. 116389, 2020.
- 79 CHAN, S. Y. et al. Pectin as a rheology modifier: Origin, structure, commercial production and rheology. *Carbohydrate polymers*, Elsevier, v. 161, p. 118–139, 2017.
- 80 GOUNDEN, V.; SINGH, M. Hydrogels and wound healing: current and future prospects. *Gels*, MDPI, v. 10, n. 1, p. 43, 2024.
- 81 VIGNESWARARAJAH, V.; THAVARAJAH, N.; FERNANDO, X. Synthesis of pectin hydrogels from grapefruit peel for the adsorption of heavy metals from water. *Technologies*, MDPI, v. 13, n. 9, p. 403, 2025.
- 82 KATTI, K. S. et al. Nanoclays in medicine: a new frontier of an ancient medical practice. *Materials Advances*, Royal Society of Chemistry, v. 3, n. 20, p. 7484–7500, 2022.
- 83 DEVLIN, J. J. et al. Comparison of chitoflex®, celox™, and quikclot® in control of hemorrhage. *The Journal of emergency medicine*, Elsevier, v. 41, n. 3, p. 237–245, 2011.
- 84 BAERLOCHER, C.; MCCUSKER, L. B.; OLSON, D. H. *Atlas of zeolite framework types*. [S.l.]: Elsevier, 2007.
- 85 ACHNECK, H. E. et al. A comprehensive review of topical hemostatic agents: efficacy and recommendations for use. *Annals of surgery*, LWW, v. 251, n. 2, p. 217–228, 2010.
- 86 ALAM, H. B. et al. Hemorrhage control in the battlefield: role of new hemostatic agents. *Military medicine*, Oxford University Press, v. 170, n. 1, p. 63–69, 2005.
- 87 LAURENTI, J. B. et al. Enhanced pro-coagulant hemostatic agents based on nanometric zeolites. *Microporous and Mesoporous Materials*, Elsevier, v. 239, p. 263–271, 2017.
- 88 OSTOMEL, T. A. et al. Metal oxide surface charge mediated hemostasis. *Langmuir*, ACS Publications, v. 23, n. 22, p. 11233–11238, 2007.
- 89 SHANG, X. et al. Unusual zymogen activation patterns in the protein corona of ca-zeolites. *Nature Catalysis*, Nature Publishing Group UK London, v. 4, n. 7, p. 607–614, 2021.
- 90 RAHMAN, M. et al. Nanoparticle and protein corona. In: *Protein-Nanoparticle Interactions: The Bio-Nano Interface*. [S.l.]: Springer, 2013. p. 21–44.
- 91 GARCÍA-ÁLVAREZ, R.; VALLET-REGÍ, M. Hard and soft protein corona of nanomaterials: analysis and relevance. *Nanomaterials*, MDPI, v. 11, n. 4, p. 888, 2021.

- 92 OSTOMEL, T. A. et al. Host-guest composites for induced hemostasis and therapeutic healing in traumatic injuries. *Journal of thrombosis and thrombolysis*, Springer, v. 22, n. 1, p. 55–67, 2006.
- 93 WRIGHT, J. K. et al. Thermal injury resulting from application of a granular mineral hemostatic agent. *Journal of Trauma and Acute Care Surgery*, LWW, v. 57, n. 2, p. 224–230, 2004.
- 94 HURTADO, T. R.; WISENBAUGH, T. *Superficial partial-thickness (2nd-degree) burn from zeolite mineral hemostatic agent (QuickClot)*. [S.l.]: MOSBY, INC 11830 WESTLINE INDUSTRIAL DR, ST LOUIS, MO 63146-3318 USA, 2005. 297–+ p.
- 95 BASADONNA, G. Quikclot combat gauze for hemorrhage control. *Prehospital and disaster medicine*, Cambridge University Press, v. 27, n. 2, p. 217–217, 2012.
- 96 WANG, H. et al. Characterization and thermal behavior of kaolin. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, Springer, v. 105, n. 1, p. 157–160, 2011.
- 97 PUSATERI, A. E. et al. Making sense of the preclinical literature on advanced hemostatic products. *Journal of Trauma and Acute Care Surgery*, LWW, v. 60, n. 3, p. 674–682, 2006.
- 98 ZHONG, Y. et al. Application and outlook of topical hemostatic materials: a narrative review. *Annals of Translational Medicine*, v. 9, n. 7, p. 577, 2021.
- 99 WANG, L. et al. Hemostatic nanotechnologies for external and internal hemorrhage management. *Biomaterials science*, Royal Society of Chemistry, v. 8, n. 16, p. 4396–4412, 2020.
- 100 KOTAL, M.; BHOWMICK, A. K. Polymer nanocomposites from modified clays: Recent advances and challenges. *Progress in Polymer Science*, Elsevier, v. 51, p. 127–187, 2015.
- 101 MAHESH, K. V. et al. Synthesis and characterization of organomodified na-mmt using cation and anion surfactants. *Frontiers of Chemistry in China*, Springer, v. 6, n. 2, p. 153–158, 2011.
- 102 ZHU, R. et al. Adsorbents based on montmorillonite for contaminant removal from water: A review. *Applied Clay Science*, Elsevier, v. 123, p. 239–258, 2016.
- 103 YANG, Y. et al. Progress and future prospects of hemostatic materials based on nanostructured clay minerals. *Biomaterials science*, Royal Society of Chemistry, v. 11, n. 23, p. 7469–7488, 2023.
- 104 SACHS-BARRABLE, K.; DARLINGTON, J. W.; WASAN, K. M. The effect of two novel cholesterol-lowering agents, disodium ascorbyl phytostanol phosphate (dapp) and nanostructured aluminosilicate (nsas) on the expression and activity of p-glycoprotein within caco-2 cells. *Lipids in Health and Disease*, Springer, v. 13, n. 1, p. 153, 2014.
- 105 SEMBEROVA, J. et al. Carbon nanotubes activate blood platelets by inducing extracellular ca^{2+} influx sensitive to calcium entry inhibitors. *Nano letters*, ACS Publications, v. 9, n. 9, p. 3312–3317, 2009.

- 106 SOKOLOV, A. et al. Functionalization of single-walled carbon nanotubes regulates their effect on hemostasis. In: *Journal of Physics: Conference Series*. [S.l.: s.n.], 2011. v. 291, n. 1, p. 012054.
- 107 ZHANG, K. et al. Cryo-em structure of a 40 kda sam-iv riboswitch rna at 3.7 Å resolution. *Nature communications*, Nature Publishing Group UK London, v. 10, n. 1, p. 5511, 2019.
- 108 LIU, Y. et al. Recent advances in topical hemostatic materials. *ACS Applied Bio Materials*, ACS Publications, v. 7, n. 3, p. 1362–1380, 2024.
- 109 KLEIN, C.; DUTROW, B. *Manual de ciência dos minerais*. [S.l.]: Bookman Editora, 2009.
- 110 SHAMIRYAN, D. et al. Low-k dielectric materials. *Materials today*, Elsevier, v. 7, n. 1, p. 34–39, 2004.
- 111 DUTTA, P.; WANG, B. Zeolite-supported silver as antimicrobial agents. *Coordination Chemistry Reviews*, Elsevier, v. 383, p. 1–29, 2019.
- 112 GHOBARKAR, H.; SCHÄF, O.; GUTH, U. Zeolites—from kitchen to space. *Progress in Solid State Chemistry*, Elsevier, v. 27, n. 2-4, p. 29–73, 1999.
- 113 JACOBS, P. et al. *Introduction to zeolite science and practice*. [S.l.]: Elsevier, 2001. v. 137.
- 114 ALOTAIBI, A. M. An overview of zeolites: from historical background to diverse applications. *Molecules*, MDPI, v. 30, n. 20, p. 4036, 2025.
- 115 ČEJKA, J.; MORRIS, R. E.; NACHTIGALL, P. *Zeolites in catalysis: properties and applications*. [S.l.]: Royal Society of Chemistry, 2017.
- 116 PETROV, I.; MICHALEV, T. Synthesis of zeolite a: a review. *Nauchni trudove na rusenskija universitet*, v. 51, n. 9.1, p. 30–35, 2012.
- 117 MOSHOESHOE, M.; NADIYE-TABBIRUKA, M. S.; OBUSENG, V. A review of the chemistry, structure, properties and applications of zeolites. *Am. J. Mater. Sci*, v. 7, n. 5, p. 196–221, 2017.
- 118 WRAGG, D. S.; MORRIS, R. E.; BURTON, A. W. Pure silica zeolite-type frameworks: a structural analysis. *Chemistry of Materials*, ACS Publications, v. 20, n. 4, p. 1561–1570, 2008.
- 119 MI, Z. et al. Synthesis of pure silica zeolites. *Chemical Research in Chinese Universities*, Springer, v. 38, n. 1, p. 9–17, 2022.
- 120 WEITKAMP, J. Zeolites and catalysis. *Solid state ionics*, Elsevier, v. 131, n. 1-2, p. 175–188, 2000.
- 121 CORMA, A. et al. A zeolite with interconnected 8-, 10-and 12-ring pores and its unique catalytic selectivity. *Nature Materials*, Nature Publishing Group UK London, v. 2, n. 7, p. 493–497, 2003.

- 122 GAO, Z. R. et al. Interchain-expanded extra-large-pore zeolites. *Nature*, Nature Publishing Group UK London, v. 628, n. 8006, p. 99–103, 2024.
- 123 WANG, S.; PENG, Y. Natural zeolites as effective adsorbents in water and wastewater treatment. *Chemical engineering journal*, Elsevier, v. 156, n. 1, p. 11–24, 2010.
- 124 KORDALA, N.; WYSZKOWSKI, M. Zeolite properties, methods of synthesis, and selected applications. *Molecules*, MDPI, v. 29, n. 5, p. 1069, 2024.
- 125 TEKIN, R.; BAC, N. Antimicrobial behavior of ion-exchanged zeolite x containing fragrance. *Microporous and Mesoporous Materials*, Elsevier, v. 234, p. 55–60, 2016.
- 126 LI, C. et al. Ion exchange: an essential piece in the fabrication of zeolite adsorbents. *Physical Chemistry Chemical Physics*, Royal Society of Chemistry, v. 27, n. 30, p. 15819–15834, 2025.
- 127 LI, J. et al. Regulation of the si/al ratios and al distributions of zeolites and their impact on properties. *Chemical Science*, Royal Society of Chemistry, v. 14, n. 8, p. 1935–1959, 2023.
- 128 AIELLO, R. et al. Isomorphous substitution in zeolites. *Comptes Rendus Chimie*, Elsevier, v. 8, n. 3-4, p. 321–329, 2005.
- 129 PETELSKI, A. N.; PERUCHENA, N. M.; ZALAZAR, M. F. Acidity of isomorphic substituted zeolites with b, al and ga revisited. *ChemPhysChem*, Wiley Online Library, v. 25, n. 9, p. e202400080, 2024.
- 130 LIM, K. H.; GREY, C. P. Characterization of extra-framework cation positions in zeolites nax and nay with very fast ^{23}Na mas and multiple quantum mas nmr spectroscopy. *Journal of the American Chemical Society*, ACS Publications, v. 122, n. 40, p. 9768–9780, 2000.
- 131 ABDELKRIM, S. et al. Conversion of natural clay into na-a (lta) zeolite adsorbent for efficient heavy metals adsorption from aqueous solution: Kinetic and isotherm studies. *Processes*, MDPI, v. 13, n. 10, p. 3060, 2025.
- 132 KIEU, T. T. et al. Surface modification of zeolite by cationic surfactant and the application on adsorptive removal of azo dye ponceau 4r. *Journal of Molecular Structure*, Elsevier, v. 1304, p. 137619, 2024.
- 133 KUZNIATSOVA, T. et al. Zeta potential measurements of zeolite y: Application in homogeneous deposition of particle coatings. *Microporous and mesoporous materials*, Elsevier, v. 103, n. 1-3, p. 102–107, 2007.
- 134 YANG, W. et al. Layer-by-layer assembly of nanozeolite based on polymeric microsphere: zeolite coated sphere and hollow zeolite sphere. *Journal of Macromolecular Science, Part A*, Taylor & Francis, v. 39, n. 6, p. 509–526, 2002.
- 135 VIDYADHAR, A.; KUMARI, N.; BHAGAT, R. Flotation of quartz and hematite: adsorption mechanism of mixed cationic/anionic collector systems. In: *Proceedings of the XXVI International Mineral Processing Congress (IMPC-2012)*, New Delhi, India. [S.l.: s.n.], 2012. p. 24–28.

- 136 HORVATH, J.; DOLNÍK, V. Polymer wall coatings for capillary electrophoresis. *Electrophoresis*, Wiley Online Library, v. 22, n. 4, p. 644–655, 2001.
- 137 CAO, Z.; ANJIKAR, N. D.; YANG, S. Small-pore zeolite membranes: a review of gas separation applications and membrane preparation. *Separations*, MDPI, v. 9, n. 2, p. 47, 2022.
- 138 MAGALHÃES, L. F. de; SILVA, G. R. da; PERES, A. E. C. Zeolite application in wastewater treatment. *Adsorption Science & Technology*, Hindawi, v. 2022, p. 4544104, 2022.
- 139 ZHANG, H. et al. Zeolites in catalysis: sustainable synthesis and its impact on properties and applications. *Catalysis Science & Technology*, Royal Society of Chemistry, v. 12, n. 19, p. 6024–6039, 2022.
- 140 KHAN, M. R.; TARAFDER, M. A.; PRITI, M. S. Potential use of zeolites in agriculture: A review. *SAARC Journal of Agriculture*, v. 22, n. 1, p. 17–30, 2024.
- 141 ZAITCEVA, O. et al. Post-modified fau zeolites as efficient catalysts for the synthesis of coumarins. *Catalysis Today*, Elsevier, v. 367, p. 111–116, 2021.
- 142 SANDRI, G. et al. Clay minerals for tissue regeneration, repair, and engineering. In: *Wound healing biomaterials*. [S.l.]: Elsevier, 2016. p. 385–402.
- 143 NOMICISIO, C. et al. Natural and synthetic clay minerals in the pharmaceutical and biomedical fields. *Pharmaceutics*, MDPI, v. 15, n. 5, p. 1368, 2023.
- 144 SELVAMOHAMED, S. et al. Insights of nanoclay as a soil conditioner: Enhancing soil physical properties for sustainable soil health. *Plant Science Today*, v. 12, p. 10482, 2025.
- 145 KUMARI, N.; MOHAN, C. Basics of clay minerals and their characteristic properties. *Clay Clay Miner*, IntechOpen London, UK, v. 24, n. 1, p. 1–29, 2021.
- 146 SIVAKUGAN, N. Basic structural units of clay minerals. *claymin. ppt (Editor)*, Power Point. James Cook University, Townsville. Australia, 2001.
- 147 BIANCHI, E. et al. Inorganic nanomaterials in tissue engineering. *Pharmaceutics*, MDPI, v. 14, n. 6, p. 1127, 2022.
- 148 GRAŽULIS, S. et al. Crystallography open database (cod): an open-access collection of crystal structures and platform for world-wide collaboration. *Nucleic Acids Research*, v. 40, n. D1, p. D420–D427, 2012.
- 149 DAS, P. et al. Current synthesis and characterization techniques for clay-based polymer nano-composites and its biomedical applications: A review. *Environmental research*, Elsevier, v. 212, p. 113534, 2022.
- 150 MEIER, L. P.; NÜESCH, R. The lower cation exchange capacity limit of montmorillonite. *Journal of colloid and interface science*, Elsevier, v. 217, n. 1, p. 77–85, 1999.

- 151 BHATTI, U. H. et al. Ion-exchanged montmorillonite as simple and effective catalysts for efficient co₂ capture. *Chemical Engineering Journal*, Elsevier, v. 413, p. 127476, 2021.
- 152 GARCÍA-VILLÉN, F. et al. Clay minerals as bioink ingredients for 3d printing and 3d bioprinting: application in tissue engineering and regenerative medicine. *Pharmaceutics*, MDPI, v. 13, n. 11, p. 1806, 2021.
- 153 REDDY, K. R. et al. Recent advances in layered clays–intercalated polymer nanohybrids: synthesis strategies, properties, and their applications. *Modified clay and zeolite nanocomposite materials*, Elsevier, p. 197–218, 2019.
- 154 BISIO, C. et al. Recent advances and perspectives for intercalation layered compounds. part 2: applications in the field of catalysis, environment and health. *Dalton Transactions*, Royal Society of Chemistry, v. 53, n. 35, p. 14551–14581, 2024.
- 155 NETO, J. C. de M. et al. Kaolinite review: intercalation and production of polymer nanocomposites. *Engineered Science*, Engineered Science Publisher, v. 17, n. 11, p. 28–44, 2021.
- 156 HUANG, H.-J. et al. Clay nanosheets simultaneously intercalated and stabilized by pegylated chitosan as drug delivery vehicles for cancer chemotherapy. *Carbohydrate Polymers*, Elsevier, v. 302, p. 120390, 2023.
- 157 VASIĆ, B. et al. Two-dimensional talc as a van der waals material for solid lubrication at the nanoscale. *Nanotechnology*, IOP Publishing, v. 32, n. 26, p. 265701, 2021.
- 158 RUDENKO, P.; BANDYOPADHYAY, A. Talc as friction reducing additive to lubricating oil. *Applied surface science*, Elsevier, v. 276, p. 383–389, 2013.
- 159 KEVADIYA, B. D.; BAJAJ, H. C. The layered silicate, montmorillonite (mmt) as a drug delivery carrier. *Key Engineering Materials*, Trans Tech Publ, v. 571, p. 111–132, 2013.
- 160 DAWSON, J. I.; OREFFO, R. O. Clay: new opportunities for tissue regeneration and biomaterial design. *Advanced Materials*, Wiley Online Library, v. 25, n. 30, p. 4069–4086, 2013.
- 161 CEJKA, J.; CORMA, A.; ZONES, S. *Zeolites and catalysis: synthesis, reactions and applications*. [S.l.]: John Wiley & Sons, 2010.
- 162 CUNDY, C. S.; COX, P. A. The hydrothermal synthesis of zeolites: Precursors, intermediates and reaction mechanism. *Microporous and mesoporous materials*, Elsevier, v. 82, n. 1-2, p. 1–78, 2005.
- 163 LI, Y.; YU, J. New stories of zeolite structures: their descriptions, determinations, predictions, and evaluations. *Chemical reviews*, ACS Publications, v. 114, n. 14, p. 7268–7316, 2014.
- 164 BARRER, R. M. 33. synthesis of a zeolitic mineral with chabazite-like sorptive properties. *Journal of the Chemical Society (Resumed)*, Royal Society of Chemistry, p. 127–132, 1948.

- 165 BRECK, D. W. et al. Crystalline zeolites. i. the properties of a new synthetic zeolite, type a. *Journal of the American chemical society*, ACS Publications, v. 78, n. 23, p. 5963–5972, 1956.
- 166 RABO, J. A.; SCHOONOVER, M. W. Early discoveries in zeolite chemistry and catalysis at union carbide, and follow-up in industrial catalysis. *Applied Catalysis A: General*, Elsevier, v. 222, n. 1-2, p. 261–275, 2001.
- 167 BRECK, D.; EVERSOLE, W.; MILTON, R. New synthetic crystalline zeolites. *Journal of the American Chemical Society*, ACS Publications, v. 78, n. 10, p. 2338–2339, 1956.
- 168 SHERMAN, J. D. Synthetic zeolites and other microporous oxide molecular sieves. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, The National Academy of Sciences, v. 96, n. 7, p. 3471–3478, 1999.
- 169 WANG, Y. et al. Synthesis of hierarchical zsm-5 zeolites by solid-state crystallization and their catalytic properties. *Journal of Catalysis*, Elsevier, v. 349, p. 53–65, 2017.
- 170 ZENG, X. et al. Microwave synthesis of zeolites and their related applications. *Microporous and Mesoporous Materials*, Elsevier, v. 323, p. 111262, 2021.
- 171 BIAN, Z.; KAWI, S. Preparation, characterization and catalytic application of phyllosilicate: A review. *Catalysis Today*, Elsevier, v. 339, p. 3–23, 2020.
- 172 NARAYANAN, S. et al. Recent advances in the synthesis and applications of mordenite zeolite—review. *RSC advances*, Royal Society of Chemistry, v. 11, n. 1, p. 250–267, 2021.
- 173 YANG, G.; PARK, S.-J. Conventional and microwave hydrothermal synthesis and application of functional materials: A review. *Materials*, MDPI, v. 12, n. 7, p. 1177, 2019.
- 174 MING, D. W.; MUMPTON, F. A. Zeolites in soils. *Minerals in soil environments*, Wiley Online Library, v. 1, p. 873–911, 1989.
- 175 DERBE, T.; TEMESGEN, S.; BITEW, M. A short review on synthesis, characterization, and applications of zeolites. *Advances in Materials Science and Engineering*, Wiley Online Library, v. 2021, n. 1, p. 6637898, 2021.
- 176 LI, J.; CORMA, A.; YU, J. Synthesis of new zeolite structures. *Chemical Society Reviews*, Royal Society of Chemistry, v. 44, n. 20, p. 7112–7127, 2015.
- 177 IKEDA, T. et al. Synthesis and crystal structure of a layered silicate hus-1 with a halved sodalite-cage topology. *Inorganic Chemistry*, ACS Publications, v. 50, n. 6, p. 2294–2301, 2011.
- 178 BARRER, R.; DENNY, P. 201. hydrothermal chemistry of the silicates. part ix. nitrogenous aluminosilicates. *Journal of the Chemical Society (Resumed)*, Royal Society of Chemistry, p. 971–982, 1961.
- 179 GÓMEZ-HORTIGÜELA, L.; CAMBLOR, M. Á. Introduction to the zeolite structure-directing phenomenon by organic species: general aspects. In: *Insights into the chemistry of organic structure-directing agents in the synthesis of zeolitic materials*. [S.l.]: Springer, 2017. p. 1–41.

- 180 LOK, B.; CANNAN, T.; MESSINA, C. The role of organic molecules in molecular sieve synthesis. *Zeolites*, Elsevier, v. 3, n. 4, p. 282–291, 1983.
- 181 MOLINER, M.; REY, F.; CORMA, A. Towards the rational design of efficient organic structure-directing agents for zeolite synthesis. *Angewandte Chemie International Edition*, Wiley Online Library, v. 52, n. 52, p. 13880–13889, 2013.
- 182 JIANG, J.; YU, J.; CORMA, A. Extra-large-pore zeolites: bridging the gap between micro and mesoporous structures. *Angewandte Chemie International Edition*, Wiley Online Library, v. 49, n. 18, p. 3120–3145, 2010.
- 183 SALDARRIAGA, L. Sierra de; SALDARRIAGA, C.; DAVIS, M. E. Investigations into the nature of a silicoaluminophosphate with the faujasite structure. *Journal of the American Chemical Society*, ACS Publications, v. 109, n. 9, p. 2686–2691, 1987.
- 184 FRANCO, M. et al. Crystallization kinetics of sapo-37. *Zeolites*, Elsevier, v. 12, n. 4, p. 386–394, 1992.
- 185 POUR, Z. A.; SEBAKHY, K. O. A review on the effects of organic structure-directing agents on the hydrothermal synthesis and physicochemical properties of zeolites. *Chemistry*, MDPI, v. 4, n. 2, p. 431–446, 2022.
- 186 YABUSHITA, M.; OSUGA, R.; MURAMATSU, A. Control of location and distribution of heteroatoms substituted isomorphously in framework of zeolites and zeotype materials. *CrystEngComm*, Royal Society of Chemistry, v. 23, n. 36, p. 6226–6233, 2021.
- 187 MARTÍNEZ, C.; CORMA, A. Inorganic molecular sieves: Preparation, modification and industrial application in catalytic processes. *Coordination Chemistry Reviews*, Elsevier, v. 255, n. 13–14, p. 1558–1580, 2011.
- 188 CORMA, A. et al. Supramolecular self-assembled molecules as organic directing agent for synthesis of zeolites. *Nature*, Nature Publishing Group UK London, v. 431, n. 7006, p. 287–290, 2004.
- 189 ROLLMANN, L. D. et al. On the role of small amines in zeolite synthesis. *The Journal of Physical Chemistry B*, ACS Publications, v. 103, n. 34, p. 7175–7183, 1999.
- 190 CORMA, A. et al. Itq-15: The first ultralarge pore zeolite with a bi-directional pore system formed by intersecting 14-and 12-ring channels, and its catalytic implications. *Chemical communications*, Royal Society of Chemistry, n. 12, p. 1356–1357, 2004.
- 191 CORMA, A. et al. A large-cavity zeolite with wide pore windows and potential as an oil refining catalyst. *Nature*, Nature Publishing Group UK London, v. 418, n. 6897, p. 514–517, 2002.
- 192 JIANG, J. et al. Investigation of extra-large pore zeolite synthesis by a high-throughput approach. *Chemistry of Materials*, ACS Publications, v. 23, n. 21, p. 4709–4715, 2011.
- 193 BONECHI, C. et al. Biomass: an overview. *Bioenergy systems for the future*, Elsevier, p. 3–42, 2017.

- 194 RAMALINGAM, G. et al. Biomass and waste derived silica, activated carbon and ammonia-based materials for energy-related applications—a review. *Fuel*, Elsevier, v. 355, p. 129490, 2024.
- 195 GHOSH, U. et al. Biomass energy potential in india: a review. *Int J Eng Res Technol*, v. 9, p. 42–45, 2021.
- 196 MUKHERJEE, A. et al. Synthesis of biochar from lignocellulosic biomass for diverse industrial applications and energy harvesting: effects of pyrolysis conditions on the physicochemical properties of biochar. *Frontiers in Materials*, Frontiers Media SA, v. 9, p. 870184, 2022.
- 197 ANUPAM, K. et al. Preparation, characterization and optimization for upgrading leucaena leucocephala bark to biochar fuel with high energy yielding. *Energy*, Elsevier, v. 106, p. 743–756, 2016.
- 198 SAHEBI, M. et al. Importance of silicon and mechanisms of biosilica formation in plants. *BioMed research international*, Wiley Online Library, v. 2015, n. 1, p. 396010, 2015.
- 199 FERNANDES, I. J. et al. Characterization of silica produced from rice husk ash: comparison of purification and processing methods. *Materials research*, SciELO Brasil, v. 20, n. Supl 2, p. 512–518, 2017.
- 200 PIEŁA, A. et al. Biogenic synthesis of silica nanoparticles from corn cobs husks. dependence of the productivity on the method of raw material processing. *Bioorganic Chemistry*, Elsevier, v. 99, p. 103773, 2020.
- 201 IRZAMAN; OKTAVIANI, N.; IRMANSYAH. Ampel bamboo leaves silicon dioxide (sio₂) extraction. In: IOP PUBLISHING. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*. [S.l.], 2018. v. 141, n. 1, p. 012014.
- 202 TEIXEIRA, L. et al. *Obtaining biogenic silica from sugarcane bagasse and leaf ash. Waste Biomass Valorization*. 2020; 12 (6): 3205–21.
- 203 AZLIN, M. N.; SYUFIANA, S. S. The preparation and characterization of silica from coconut husk. In: IOP PUBLISHING. *Journal of Physics: Conference Series*. [S.l.], 2022. v. 2266, n. 1, p. 012011.
- 204 GUNARATHNE, D. S. et al. Resource recovery from bio-based production processes in developing asia. *Sustainable Production and Consumption*, Elsevier, v. 17, p. 196–214, 2019.
- 205 HAMIDU, I. et al. Synthesis of silica and silicon from rice husk feedstock: A review. *Heliyon*, Elsevier, v. 11, n. 4, 2025.
- 206 TCHANANG, G. et al. Synthesis of reactive silica from kaolinitic clay: Effect of process parameters. *Applied Clay Science*, Elsevier, v. 207, p. 106087, 2021.
- 207 NG, E.-P. et al. Hydrothermal synthesis of zeolite a from bamboo leaf biomass and its catalytic activity in cyanoethylation of methanol under autogenic pressure and air conditions. *Materials Chemistry and Physics*, Elsevier, v. 201, p. 78–85, 2017.

- 208 HE, K. et al. Removal of heavy metal ions from aqueous solution by zeolite synthesized from fly ash. *Environmental Science and Pollution Research*, Springer, v. 23, n. 3, p. 2778–2788, 2016.
- 209 SILVA, N. et al. Caracterização de cinzas volantes para aproveitamento cerâmico. *Cerâmica*, SciELO Brasil, v. 45, p. 184–187, 1999.
- 210 ANJANEYULU, U.; SASIKUMAR, S. Bioactive nanocrystalline wollastonite synthesized by sol–gel combustion method by using eggshell waste as calcium source. *Bulletin of Materials Science*, Springer, v. 37, n. 2, p. 207–212, 2014.
- 211 PRZEKORA, A. A concise review on tissue engineered artificial skin grafts for chronic wound treatment: can we reconstruct functional skin tissue in vitro? *Cells*, MDPI, v. 9, n. 7, p. 1622, 2020.
- 212 GUSHIKEN, L. F. S. et al. Cutaneous wound healing: An update from physiopathology to current therapies. *Life*, MDPI, v. 11, n. 7, p. 665, 2021.
- 213 GONZALEZ, A. C. d. O. et al. Wound healing-a literature review. *Anais brasileiros de dermatologia*, SciELO Brasil, v. 91, p. 614–620, 2016.
- 214 LI, J.; CHEN, J.; KIRSNER, R. Pathophysiology of acute wound healing. *Clinics in dermatology*, Elsevier, v. 25, n. 1, p. 9–18, 2007.
- 215 GOSWAMI, A. G. et al. An appraisal of vascular endothelial growth factor (vegf): the dynamic molecule of wound healing and its current clinical applications. *Growth Factors*, Taylor & Francis, v. 40, n. 3-4, p. 73–88, 2022.
- 216 LANSDOWN, A. B. et al. Zinc in wound healing: theoretical, experimental, and clinical aspects. *Wound repair and regeneration*, Wiley Online Library, v. 15, n. 1, p. 2–16, 2007.
- 217 LIN, P.-H. et al. Zinc in wound healing modulation. *Nutrients*, MDPI, v. 10, n. 1, p. 16, 2017.
- 218 SINGH, D.; RAI, V.; AGRAWAL, D. K. Regulation of collagen i and collagen iii in tissue injury and regeneration. *Cardiology and cardiovascular medicine*, v. 7, n. 1, p. 5, 2023.
- 219 RAZIYEVA, K. et al. Immunology of acute and chronic wound healing. *Biomolecules*, MDPI, v. 11, n. 5, p. 700, 2021.
- 220 ZHAO, G. et al. Biofilms and inflammation in chronic wounds. *Advances in wound care*, SAGE Publications Sage CA: Los Angeles, CA, v. 2, n. 7, p. 389–399, 2013.
- 221 GARDNER, S. E.; FRANTZ, R. A. Wound bioburden and infection-related complications in diabetic foot ulcers. *Biological research for nursing*, SAGE Publications Sage CA: Los Angeles, CA, v. 10, n. 1, p. 44–53, 2008.
- 222 SWANSON, T. et al. Iwii wound infection in clinical practice consensus document: 2022 update. *Journal of wound care*, MA Healthcare London, v. 31, n. Sup12, p. S10–S21, 2022.

- 223 GARDNER, S. E.; FRANTZ, R. A.; DOEBBELING, B. N. The validity of the clinical signs and symptoms used to identify localized chronic wound infection. *Wound repair and regeneration*, Wiley Online Library, v. 9, n. 3, p. 178–186, 2001.
- 224 BOWLER, P.; DUERDEN, B.; ARMSTRONG, D. G. Wound microbiology and associated approaches to wound management. *Clinical microbiology reviews*, American Society for Microbiology, v. 14, n. 2, p. 244–269, 2001.
- 225 FUKUTA, Y. et al. Infectious diseases management in wound care settings: common causative organisms and frequently prescribed antibiotics. *Advances in Skin & Wound Care*, LWW, v. 35, n. 10, p. 535–543, 2022.
- 226 ORGANIZATION, W. H. *Global antimicrobial resistance and use surveillance system (GLASS) report 2022*. [S.l.]: World Health Organization, 2022.
- 227 STEWART, S. et al. Impact of healthcare-associated infection on length of stay. *Journal of Hospital Infection*, Elsevier, v. 114, p. 23–31, 2021.
- 228 EMERSON, C. B. et al. Healthcare-associated infection and hospital readmission. *Infection Control & Hospital Epidemiology*, Cambridge University Press, v. 33, n. 6, p. 539–544, 2012.
- 229 LOBANOVSKA, M.; PILLA, G. Penicillin's discovery and antibiotic resistance: lessons for the future? *The Yale journal of biology and medicine*, v. 90, n. 1, p. 135, 2017.
- 230 MORENS, D. M.; FOLKERS, G. K.; FAUCI, A. S. The challenge of emerging and re-emerging infectious diseases. *Nature*, Nature Publishing Group UK London, v. 430, n. 6996, p. 242–249, 2004.
- 231 ABRAHAM, E. P.; CHAIN, E. An enzyme from bacteria able to destroy penicillin. *Nature*, Nature Publishing Group UK London, v. 146, n. 3713, p. 837–837, 1940.
- 232 RAMMELKAMP, C. H.; MAXON, T. Resistance of staphylococcus aureus to the action of penicillin. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, SAGE Publications Sage UK: London, England, v. 51, n. 3, p. 386–389, 1942.
- 233 KAMER, A. M. A. et al. Surfactant nanovesicles for augmented antibacterial activity against carbapenemase resistant enterobacteriaceae and extended spectrum beta-lactamases producing bacteria: in vitro and in vivo evaluation. *BMC microbiology*, Springer, v. 23, n. 1, p. 73, 2023.
- 234 DARBY, E. M. et al. Molecular mechanisms of antibiotic resistance revisited. *Nature Reviews Microbiology*, Nature Publishing Group UK London, v. 21, n. 5, p. 280–295, 2023.
- 235 SAIKIA, S.; CHETIA, P. Antibiotics: from mechanism of action to resistance and beyond. *Indian Journal of Microbiology*, Springer, v. 64, n. 3, p. 821–845, 2024.
- 236 KAIM, A. H. et al. Mr imaging with ultrasmall superparamagnetic iron oxide particles in experimental soft-tissue infections in rats. *Radiology*, Radiological Society of North America, v. 225, n. 3, p. 808–814, 2002.
- 237 O'TOOLE, G.; KAPLAN, H. B.; KOLTER, R. Biofilm formation as microbial development. *Annual Reviews in Microbiology*, Annual Reviews 4139 El Camino Way, PO Box 10139, Palo Alto, CA 94303-0139, USA, v. 54, n. 1, p. 49–79, 2000.

- 238 VERT, M. et al. Terminology for biorelated polymers and applications (iupac recommendations 2012). *Pure and Applied Chemistry*, v. 84, n. 2, p. 377, 2012.
- 239 MAZZA, M. G. The physics of biofilms—an introduction. *Journal of Physics D: Applied Physics*, IOP Publishing, v. 49, n. 20, p. 203001, 2016.
- 240 CZAPLEWSKI, L. et al. Alternatives to antibiotics—a pipeline portfolio review. *The Lancet infectious diseases*, Elsevier, v. 16, n. 2, p. 239–251, 2016.
- 241 RIMA, M. et al. Antimicrobial peptides: a potent alternative to antibiotics. *Antibiotics*, MDPI, v. 10, n. 9, p. 1095, 2021.
- 242 CHANDRANGSU, P.; RENSING, C.; HELMANN, J. D. Metal homeostasis and resistance in bacteria. *Nature Reviews Microbiology*, Nature Publishing Group UK London, v. 15, n. 6, p. 338–350, 2017.
- 243 PALMER, L. D.; SKAAR, E. P. Transition metals and virulence in bacteria. *Annual review of genetics*, Annual Reviews, v. 50, n. 1, p. 67–91, 2016.
- 244 KEHL-FIE, T. E.; SKAAR, E. P. Nutritional immunity beyond iron: a role for manganese and zinc. *Current opinion in chemical biology*, Elsevier, v. 14, n. 2, p. 218–224, 2010.
- 245 DJOKO, K. Y. et al. The role of copper and zinc toxicity in innate immune defense against bacterial pathogens. *Journal of Biological Chemistry*, Elsevier, v. 290, n. 31, p. 18954–18961, 2015.
- 246 PEIN, J. B. von et al. An alloy of zinc and innate immunity: Galvanising host defence against infection. *Cellular microbiology*, Wiley Online Library, v. 23, n. 1, p. e13268, 2021.
- 247 HOOD, M. I.; SKAAR, E. P. Nutritional immunity: transition metals at the pathogen–host interface. *Nature Reviews Microbiology*, Nature Publishing Group UK London, v. 10, n. 8, p. 525–537, 2012.
- 248 FLO, T. H. et al. Lipocalin 2 mediates an innate immune response to bacterial infection by sequestering iron. *Nature*, Nature Publishing Group UK London, v. 432, n. 7019, p. 917–921, 2004.
- 249 CORBIN, B. D. et al. Metal chelation and inhibition of bacterial growth in tissue abscesses. *Science*, American Association for the Advancement of Science, v. 319, n. 5865, p. 962–965, 2008.
- 250 FREI, A. et al. Metals to combat antimicrobial resistance. *Nature Reviews Chemistry*, Nature Publishing Group UK London, v. 7, n. 3, p. 202–224, 2023.
- 251 ALEXANDER, J. W. History of the medical use of silver. *Surgical infections*, SAGE Publications Sage CA: Los Angeles, CA, v. 10, n. 3, p. 289–292, 2009.
- 252 GASSER, G. Metal complexes and medicine: A successful combination. *Chimia*, v. 69, n. 7-8, p. 442–442, 2015.

- 253 HALDAR, A. K.; SEN, P.; ROY, S. Use of antimony in the treatment of leishmaniasis: current status and future directions. *Molecular biology international*, Wiley Online Library, v. 2011, n. 1, p. 571242, 2011.
- 254 EVANS, A.; KAVANAGH, K. A. Evaluation of metal-based antimicrobial compounds for the treatment of bacterial pathogens. *Journal of Medical Microbiology*, Microbiology Society, v. 70, n. 5, p. 001363, 2021.
- 255 WANG, C. et al. Metal-based approaches for the fight against antimicrobial resistance: Mechanisms, opportunities, and challenges. *Journal of the American Chemical Society*, ACS Publications, v. 147, n. 15, p. 12361–12380, 2025.
- 256 ABRAM, S.-L.; FROMM, K. M. Handling (nano) silver as antimicrobial agent: therapeutic window, dissolution dynamics, detection methods and molecular interactions. *Chemistry–A European Journal*, Wiley Online Library, v. 26, n. 48, p. 10948–10971, 2020.
- 257 CIRIMINNA, R.; ALBO, Y.; PAGLIARO, M. New antivirals and antibacterials based on silver nanoparticles. *ChemMedChem*, Wiley Online Library, v. 15, n. 17, p. 1619–1623, 2020.
- 258 SIM, W. et al. Antimicrobial silver in medicinal and consumer applications: a patent review of the past decade (2007–2017). *Antibiotics*, MDPI, v. 7, n. 4, p. 93, 2018.
- 259 ECKHARDT, S. et al. Nanobio silver: its interactions with peptides and bacteria, and its uses in medicine. *Chemical reviews*, ACS Publications, v. 113, n. 7, p. 4708–4754, 2013.
- 260 ATIYEH, B. S. et al. Effect of silver on burn wound infection control and healing: review of the literature. *burns*, Elsevier, v. 33, n. 2, p. 139–148, 2007.
- 261 XIU, Z.-m. et al. Negligible particle-specific antibacterial activity of silver nanoparticles. *Nano letters*, ACS Publications, v. 12, n. 8, p. 4271–4275, 2012.
- 262 DURÁN, N. et al. Silver nanoparticles: A new view on mechanistic aspects on antimicrobial activity. *Nanomedicine: nanotechnology, biology and medicine*, Elsevier, v. 12, n. 3, p. 789–799, 2016.
- 263 KOHANSKI, M. A. et al. A common mechanism of cellular death induced by bactericidal antibiotics. *Cell*, Elsevier, v. 130, n. 5, p. 797–810, 2007.
- 264 FOTI, J. J. et al. Oxidation of the guanine nucleotide pool underlies cell death by bactericidal antibiotics. *Science*, American Association for the Advancement of Science, v. 336, n. 6079, p. 315–319, 2012.
- 265 LIU, Y.; IMLAY, J. A. Cell death from antibiotics without the involvement of reactive oxygen species. *Science*, American Association for the Advancement of Science, v. 339, n. 6124, p. 1210–1213, 2013.
- 266 PARK, H.-J. et al. Silver-ion-mediated reactive oxygen species generation affecting bactericidal activity. *Water research*, Elsevier, v. 43, n. 4, p. 1027–1032, 2009.
- 267 GRASS, G.; RENSING, C.; SOLIOZ, M. Metallic copper as an antimicrobial surface. *Applied and environmental microbiology*, American Society for Microbiology, v. 77, n. 5, p. 1541–1547, 2011.

- 268 ARENDSSEN, L.; THAKAR, R. Ah sultan the use of copper as an antimicrobial agent in health care, including obstetrics and gynecology., 2019, 32, p. e00125-18. DOI: <https://doi.org/10.1128/CMR>, p. 00125–18.
- 269 WIEBELHAUS, N. et al. Protein folding stability changes across the proteome reveal targets of cu toxicity in e. coli. *ACS chemical biology*, ACS Publications, v. 16, n. 1, p. 214–224, 2020.
- 270 SHAMS, S. et al. Antifungal effect of gatifloxacin and copper ions combination. *The Journal of Antibiotics*, Nature Publishing Group, v. 67, n. 7, p. 499–504, 2014.
- 271 MANNING, T. et al. The copper (ii) ion as a carrier for the antibiotic capreomycin against mycobacterium tuberculosis. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, Elsevier, v. 24, n. 3, p. 976–982, 2014.
- 272 DALECKI, A. G. et al. Disulfiram and copper ions kill mycobacterium tuberculosis in a synergistic manner. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, American Society for Microbiology 1752 N St., NW, Washington, DC, v. 59, n. 8, p. 4835–4844, 2015.
- 273 SALAH, I.; PARKIN, I. P.; ALLAN, E. Copper as an antimicrobial agent: recent advances. *RSC advances*, Royal Society of Chemistry, v. 11, n. 30, p. 18179–18186, 2021.
- 274 GUGALA, N. et al. Using a chemical genetic screen to enhance our understanding of the antimicrobial properties of copper. *Metallomics*, Oxford University Press, v. 14, n. 1, p. mfab071, 2022.
- 275 KAUR, I. et al. Role of horizontally transferred copper resistance genes in staphylococcus aureus and listeria monocytogenes. *Microbiology*, Microbiology Society, v. 168, n. 4, p. 001162, 2022.
- 276 ABDELHAMID, H. N. An introductory review on advanced multifunctional materials. *Heliyon*, Elsevier, v. 9, n. 7, 2023.
- 277 LENDLEIN, A.; TRASK, R. S. *Multifunctional materials: concepts, function-structure relationships, knowledge-based design, translational materials research*. [S.l.]: IOP Publishing, 2018. 010201 p.
- 278 FARPÓN, M. G. et al. Multifunctional materials for catalyst-specific heating and thermometry in tandem catalysis. *Journal of Materials Chemistry A*, Royal Society of Chemistry, v. 11, n. 37, p. 19854–19859, 2023.
- 279 HUANG, Y.-B. et al. Multifunctional metal–organic framework catalysts: synergistic catalysis and tandem reactions. *Chemical Society Reviews*, Royal Society of Chemistry, v. 46, n. 1, p. 126–157, 2017.
- 280 PRAKASHAN, D.; ROBERTS, A.; GANDHI, S. Recent advancement of nanotherapeutics in accelerating chronic wound healing process for surgical wounds and diabetic ulcers. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, Taylor & Francis, v. 39, n. 2, p. 1059–1087, 2023.
- 281 HU, Y. et al. Multifunctional antibacterial hydrogels for chronic wound management. *Biomaterials science*, Royal Society of Chemistry, v. 12, n. 10, p. 2460–2479, 2024.

- 282 MERRELL, J. G. et al. Curcumin loaded poly (ϵ -caprolactone) nanofibers: diabetic wound dressing with antioxidant and anti-inflammatory properties. *Clinical and experimental pharmacology & physiology*, v. 36, n. 12, p. 1149, 2009.
- 283 NASEF, M. M. et al. Engineered bioactive polymeric surfaces by radiation induced graft copolymerization: Strategies and applications. *Polymers*, MDPI, v. 13, n. 18, p. 3102, 2021.
- 284 SOYLU, Z. et al. Multifunctional polymeric wound dressings. *Polymer Bulletin*, Springer, v. 82, n. 11, p. 5325–5383, 2025.
- 285 MINGOT, J. et al. Theranostic nano-enabled polyurethane eso-sponges coupled to surface enhanced raman scattering for detection and control of bacteria killing. *Chemical Engineering Journal*, Elsevier, v. 497, p. 154617, 2024.
- 286 VILACA, N. et al. Synthesis, characterization and in vitro validation of a magnetic zeolite nanocomposite with t 2-mri properties towards theranostic applications. *Journal of Materials Chemistry B*, Royal Society of Chemistry, v. 7, n. 21, p. 3351–3361, 2019.
- 287 MONROE, D. M.; HOFFMAN, M. What does it take to make the perfect clot? *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, Lippincott Williams & Wilkins, v. 26, n. 1, p. 41–48, 2006.
- 288 GRUEN, R. L. et al. Haemorrhage control in severely injured patients. *The Lancet*, Elsevier, v. 380, n. 9847, p. 1099–1108, 2012.
- 289 RHEE, P. et al. Quikclot use in trauma for hemorrhage control: case series of 103 documented uses. *Journal of Trauma and Acute Care Surgery*, LWW, v. 64, n. 4, p. 1093–1099, 2008.
- 290 POURSHAHRESTANI, S. et al. Inorganic hemostats: The state-of-the-art and recent advances. *Materials Science and Engineering: C*, Elsevier, v. 58, p. 1255–1268, 2016.
- 291 SHI, C. et al. Reversible high-affinity binding of coagulation factor xa to zeolites induces accelerated blood coagulation. *Advanced Science*, Wiley Online Library, v. 12, n. 22, p. 2417099, 2025.
- 292 ZHENG, Y. et al. Inorganic-based biomaterials for rapid hemostasis and wound healing. *Chemical Science*, Royal Society of Chemistry, v. 14, n. 1, p. 29–53, 2023.
- 293 BAKER, S. E. et al. Controlling bioprocesses with inorganic surfaces: layered clay hemostatic agents. *Chemistry of Materials*, ACS Publications, v. 19, n. 18, p. 4390–4392, 2007.
- 294 SHAO, H. et al. Application and progress of inorganic composites in haemostasis: a review. *Journal of Materials Science*, Springer, v. 59, n. 17, p. 7169–7192, 2024.
- 295 GUARNIERI, G. de P.; NERY, J. G. Reflections on the potential of applying artificial intelligence (ai) and machine learning (ml) for screening topical hemostatic agents based on inorganic solids for hemorrhage control. *Journal of Material Science and Technology Research*, v. 11, p. 90–98, 2024.

- 296 MERCHANT, A. et al. Scaling deep learning for materials discovery. *Nature*, Nature Publishing Group UK London, v. 624, n. 7990, p. 80–85, 2023.
- 297 PIHLAJAMÄKI, A. et al. Graphbnc: Machine learning-aided prediction of interactions between metal nanoclusters and blood proteins. *Advanced Materials*, Wiley Online Library, v. 36, n. 47, p. 2407046, 2024.
- 298 ARNAUD, F. et al. Exothermic reaction in zeolite hemostatic dressings: Quikclot acs and acs+®. *Annals of biomedical engineering*, Springer, v. 36, n. 10, p. 1708–1713, 2008.
- 299 KHOSHMOHABAT, H. et al. The effect of coolclot hemostatic agent on skin wound healing in rats. *Journal of Surgical Research*, Elsevier, v. 200, n. 2, p. 732–737, 2016.
- 300 WARD, K. R. et al. Comparison of a new hemostatic agent to current combat hemostatic agents in a swine model of lethal extremity arterial hemorrhage. *Journal of Trauma and Acute Care Surgery*, LWW, v. 63, n. 2, p. 276–284, 2007.
- 301 ALAVI, M. et al. The effect of a new impregnated gauze containing bentonite and halloysite minerals on blood coagulation and wound healing. *Blood Coagulation & Fibrinolysis*, LWW, v. 25, n. 8, p. 856–859, 2014.
- 302 SPRONK, H. M.; GOVERS-RIEMSLAG, J. W.; CATE, H. T. The blood coagulation system as a molecular machine. *Bioessays*, Wiley Online Library, v. 25, n. 12, p. 1220–1228, 2003.
- 303 FERNANDEZ, S.; OSTRAT, M. L.; ZHANG, K. Toward rational design of hierarchical beta zeolites: An overview and beyond. *AIChE Journal*, Wiley Online Library, v. 66, n. 9, p. e16943, 2020.
- 304 SERATI-NOURI, H. et al. Biomedical applications of zeolite-based materials: A review. *Materials Science and Engineering: C*, Elsevier, v. 116, p. 111225, 2020.
- 305 BACAKOVA, L. et al. *Applications of zeolites in biotechnology and medicine-a review*. *Biomater. Sci.* 6, 974- 989. 2018.
- 306 KISELEVA, I. et al. Thermochemical study of calcium zeolites—heulandite and stilbite. *American Mineralogist*, Mineralogical Society of America, v. 86, n. 4, p. 448–455, 2001.
- 307 WIRSCHING, U. Experiments on the hydrothermal formation of calcium zeolites. *Clays and Clay Minerals*, Cambridge University Press & Assessment, v. 29, n. 3, p. 171–183, 1981.
- 308 KHODABANDEH, S.; DAVIS, M. E. Alteration of perlite to calcium zeolites. *Microporous materials*, Elsevier, v. 9, n. 3-4, p. 161–172, 1997.
- 309 CHIPERA, S. J.; APPS, J. A. Geochemical stability of natural zeolites. *Reviews in mineralogy and geochemistry*, Mineralogical Society of America, v. 45, n. 1, p. 117–161, 2001.
- 310 AHMED, T. et al. *Biotechnological applications of eggshell: recent advances*. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 9, 675364. 2021.

- 311 SINGH, S. A. et al. Valorised calcium-rich biomass from fish waste and eggshells in the fabrication of antibacterial scaffold for wound healing applications: a review. *Waste and Biomass Valorization*, Springer, v. 15, n. 4, p. 1917–1941, 2024.
- 312 PANDIT, P. R.; FULEKAR, M. Egg shell waste as heterogeneous nanocatalyst for biodiesel production: optimized by response surface methodology. *Journal of environmental management*, Elsevier, v. 198, p. 319–329, 2017.
- 313 SHARMA, G. et al. Biomass as a sustainable resource for value-added modern materials: a review. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, Wiley Online Library, v. 14, n. 3, p. 673–695, 2020.
- 314 TOBÍO-PÉREZ, I. et al. Biomass-based heterogeneous catalysts for biodiesel production: A comprehensive review. *International Journal of Energy Research*, Wiley Online Library, v. 46, n. 4, p. 3782–3809, 2022.
- 315 HABTE, L. et al. Synthesis of nano-calcium oxide from waste eggshell by sol-gel method. *Sustainability*, MDPI, v. 11, n. 11, p. 3196, 2019.
- 316 GOUVEIA, M. E. T. et al. Eggshell-based unconventional biomaterials for medical applications. *Advanced NanoBiomed Research*, Wiley Online Library, v. 5, n. 2, p. 2400120, 2025.
- 317 ENGELHARDT, G.; KOLLER, H. 29si nmr of inorganic solids. In: *Solid-State NMR II: Inorganic Matter*. [S.l.]: Springer, 1994. p. 1–29.
- 318 BRUNAUER, S.; EMMETT, P. H.; TELLER, E. Adsorption of gases in multimolecular layers. *Journal of the American chemical society*, ACS Publications, v. 60, n. 2, p. 309–319, 1938.
- 319 BARRETT, E. P.; JOYNER, L. G.; HALENDA, P. P. The determination of pore volume and area distributions in porous substances. i. computations from nitrogen isotherms. *Journal of the American Chemical society*, ACS Publications, v. 73, n. 1, p. 373–380, 1951.
- 320 HORVÁTH, G.; KAWAZOE, K. Method for the calculation of effective pore size distribution in molecular sieve carbon. *Journal of Chemical Engineering of Japan*, The Society of Chemical Engineers, Japan, v. 16, n. 6, p. 470–475, 1983.
- 321 ALKAN, M.; DEMIRBAŞ, Ö.; DOĞAN, M. Electrokinetic properties of sepiolite suspensions in different electrolyte media. *Journal of Colloid and Interface Science*, Elsevier, v. 281, n. 1, p. 240–248, 2005.
- 322 SANTORO, M. L. et al. Comparison of the biological activities in venoms from three subspecies of the south american rattlesnake (*crotalus durissus terrificus*, *c. durissus cascavella* and *c. durissus collilineatus*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology*, Elsevier, v. 122, n. 1, p. 61–73, 1999.
- 323 GARD, J.; TAYLOR, H.; CHALMERS, R. An investigation of two new minerals: rhodesite and mountainite. *Mineralogical magazine and journal of the Mineralogical Society*, Cambridge University Press, v. 31, n. 239, p. 611–623, 1957.

- 324 LIEBAU, F.; HESSE, K.-F. Crystal structure of rhodesite, $hk1-xnax+2yca2-y\{1B, 3, 22\infty\}[si8o19] \cdot (6-z) h2o$, from three localities and its relation to other silicates with dreier double layers. *Zeitschrift für Kristallographie-Crystalline Materials*, De Gruyter Oldenbourg, v. 199, n. 1-4, p. 25–48, 1992.
- 325 ROCHA, J. et al. Synthesis and structural characterization of microporous yttrium and calcium silicates. *The Journal of Physical Chemistry B*, ACS Publications, v. 102, n. 24, p. 4739–4744, 1998.
- 326 MUNHA, R. F. et al. Synthesis and structure of new microporous nd (iii) silicates of the rhodesite group. *Zeitschrift für Kristallographie-Crystalline Materials*, De Gruyter, v. 230, n. 5, p. 353–362, 2015.
- 327 ROCHA, J.; ANDERSON, M. W. Microporous titanosilicates and other novel mixed octahedral-tetrahedral framework oxides. *European Journal of Inorganic Chemistry*, Wiley Online Library, v. 2000, n. 5, p. 801–818, 2000.
- 328 BAI, R. et al. Simple quaternary ammonium cations-templated syntheses of extra-large pore germanosilicate zeolites. *Chemistry of Materials*, ACS Publications, v. 28, n. 18, p. 6455–6458, 2016.
- 329 FERRARIS, G.; GULA, A. Polysomatic aspects of microporous minerals–heterophyllosilicates, palysepioles and rhodesite-related structures. *Reviews in mineralogy and geochemistry*, Mineralogical Society of America, v. 57, n. 1, p. 69–104, 2005.
- 330 FERRARIS, G. et al. The crystal structure of seidite-(ce), $na_4(ce, sr)_2\{Ti(OH)_2(Si_8O_{18})\}(o, oh, f)_4 \cdot 5h_2o$, a modular microporous titanosilicate of the rhodesite group. *The Canadian Mineralogist*, Mineralogical Association of Canada, v. 41, n. 5, p. 1183–1192, 2003.
- 331 GENG, G. et al. Atomistic structure of alkali-silica reaction products refined from x-ray diffraction and micro x-ray absorption data. *Cement and concrete research*, Elsevier, v. 129, p. 105958, 2020.
- 332 FLANIGEN, E.; KHATAMI, H.; SZYMANSKI, H. *Infrared Structural Studies of Zeolite Frameworks*(pp. 201–229). 1974.
- 333 KRÓL, M. et al. Spectroscopic investigation of hydrothermally synthesized zeolites from expanded perlite. *Microporous and mesoporous materials*, Elsevier, v. 196, p. 216–222, 2014.
- 334 CHOUDHARY, R.; KOPPALA, S.; SWAMIAPPAN, S. Bioactivity studies of calcium magnesium silicate prepared from eggshell waste by sol–gel combustion synthesis. *Journal of Asian Ceramic Societies*, Taylor & Francis, v. 3, n. 2, p. 173–177, 2015.
- 335 CHOUDHARY, R. et al. Impact of forsterite addition on mechanical and biological properties of composites. *Journal of Asian ceramic societies*, Taylor & Francis, v. 8, n. 4, p. 1051–1065, 2020.
- 336 SOBHANI, A.; SALIMI, E. Low temperature preparation of diopside nanoparticles: in-vitro bioactivity and drug loading evaluation. *Scientific Reports*, Nature Publishing Group UK London, v. 13, n. 1, p. 16330, 2023.

- 337 ANDERSEN, F. A. et al. Infrared spectra of amorphous and crystalline calcium carbonate. *Acta Chem. Scand*, v. 45, n. 10, p. 1018–1024, 1991.
- 338 ELDERDERI, S. et al. Atr-ir spectroscopy for rapid quantification of water content in deep eutectic solvents. *Journal of Molecular Liquids*, Elsevier, v. 311, p. 113361, 2020.
- 339 CHENG, F. et al. Ftir analysis of water structure and its influence on the flotation of arcanite (K_2SO_4) and epsomite ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$). *International Journal of Mineral Processing*, Elsevier, v. 122, p. 36–42, 2013.
- 340 LIMA, S. et al. Isomerization of d-glucose to d-fructose over metallosilicate solid bases. *Applied Catalysis A: General*, Elsevier, v. 339, n. 1, p. 21–27, 2008.
- 341 KRESGE, a. C. et al. Ordered mesoporous molecular sieves synthesized by a liquid-crystal template mechanism. *nature*, Nature Publishing Group UK London, v. 359, n. 6397, p. 710–712, 1992.
- 342 CORMA, A. From microporous to mesoporous molecular sieve materials and their use in catalysis. *Chemical reviews*, ACS Publications, v. 97, n. 6, p. 2373–2420, 1997.
- 343 GRIFFIN, J. H. Role of surface in surface-dependent activation of hageman factor (blood coagulation factor xii). *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 75, n. 4, p. 1998–2002, 1978.
- 344 STUCKY, G. D. et al. *Inorganic materials for hemostatic modulation and therapeutic wound healing*. [S.l.]: Google Patents, 2010. US Patent 7,858,123.
- 345 HOFFMAN, M. Remodeling the blood coagulation cascade. *Journal of thrombosis and thrombolysis*, Springer, v. 16, n. 1, p. 17–20, 2003.
- 346 EDWARDS, J. V.; PREVOST, N. T.; CINTRON, M. S. A comparison of hemostatic activities of zeolite-based formulary finishes on cotton dressings. *Journal of Functional Biomaterials*, MDPI, v. 14, n. 5, p. 255, 2023.
- 347 DAI, C. et al. Degradable, antibacterial silver exchanged mesoporous silica spheres for hemorrhage control. *Biomaterials*, Elsevier, v. 30, n. 29, p. 5364–5375, 2009.
- 348 DING, S. et al. Ca-ga double doping strategy to fabricate hemostatic mesoporous silica nanoparticles (msn) with antibacterial activity. *Silicon*, Springer, v. 13, n. 11, p. 4033–4045, 2021.
- 349 DUSSELIER, M.; DAVIS, M. E. Small-pore zeolites: synthesis and catalysis. *Chemical reviews*, ACS Publications, v. 118, n. 11, p. 5265–5329, 2018.
- 350 GASCON, J. et al. Practical approach to zeolitic membranes and coatings: state of the art, opportunities, barriers, and future perspectives. *Chemistry of Materials*, ACS Publications, v. 24, n. 15, p. 2829–2844, 2012.
- 351 CHEN, L.-H. et al. Hierarchically structured zeolites: from design to application. *Chemical reviews*, ACS Publications, v. 120, n. 20, p. 11194–11294, 2020.
- 352 SHAMZHY, M. et al. New trends in tailoring active sites in zeolite-based catalysts. *Chemical Society Reviews*, Royal Society of Chemistry, v. 48, n. 4, p. 1095–1149, 2019.

- 353 HRACHOVCOVÁ, K. et al. Modified alkali activated zeolite foams with improved textural and mechanical properties. *Minerals*, MDPI, v. 10, n. 5, p. 483, 2020.
- 354 DERA KHSHANKHAH, H. et al. Biomedical applications of zeolitic nanoparticles, with an emphasis on medical interventions. *International journal of nanomedicine*, Taylor & Francis, p. 363–386, 2020.
- 355 ZARRINTAJ, P. et al. Zeolite in tissue engineering: Opportunities and challenges. *MedComm*, Wiley Online Library, v. 1, n. 1, p. 5–34, 2020.
- 356 LIU, L. et al. Recent advances in materials for hemostatic management. *Biomaterials science*, Royal Society of Chemistry, v. 9, n. 22, p. 7343–7378, 2021.
- 357 WANG, M. et al. Hemostatic and antibacterial calcium–copper zeolite gauze for infected wound healing. *RSC advances*, Royal Society of Chemistry, v. 14, n. 2, p. 878–888, 2024.
- 358 DANCHENKO, Y. et al. Investigation of the surface properties of quartz-based dispersed materials. In: IOP PUBLISHING. *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*. [S.l.], 2021. v. 1164, n. 1, p. 012021.
- 359 MALIC, S. et al. Zeolite-embedded silver extends antimicrobial activity of dental acrylics. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, Elsevier, v. 173, p. 52–57, 2019.
- 360 SANCHEZ-LOPEZ, P. et al. Antimicrobial and virus adsorption properties of y-zeolite exchanged with silver and zinc cations. *ACS omega*, ACS Publications, v. 9, n. 7, p. 7554–7563, 2024.
- 361 CHEN, S. et al. Superior ion release properties and antibacterial efficacy of nanostructured zeolites ion-exchanged with zinc, copper, and iron. *RSC advances*, Royal Society of Chemistry, v. 8, n. 66, p. 37949–37957, 2018.
- 362 YAO, G. et al. Antimicrobial activity of x zeolite exchanged with Cu^{2+} and Zn^{2+} on escherichia coli and staphylococcus aureus. *Environmental Science and Pollution Research*, Springer, v. 26, n. 3, p. 2782–2793, 2019.
- 363 MA, Y.; HOU, J. Preparation and antibacterial activity of nano copper oxide-loaded zeolite 10x. *International Journal of Molecular Sciences*, MDPI, v. 23, n. 15, p. 8421, 2022.
- 364 PARTOAZAR, A. et al. Antibiofilm activity of natural zeolite supported nanozno: inhibition of esp gene expression of enterococcus faecalis. *Nanomedicine*, Taylor & Francis, v. 14, n. 6, p. 675–687, 2019.
- 365 LI, W. et al. Novel dental adhesive containing silver exchanged emt zeolites against cariogenic biofilms to combat dental caries. *Microporous and Mesoporous Materials*, Elsevier, v. 299, p. 110113, 2020.
- 366 SCACCHETTI, F. A. et al. Antimicrobial properties of composites of chitosan-silver doped zeolites. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, American Scientific Publishers, v. 20, n. 10, p. 6295–6304, 2020.

- 367 HAO, J. et al. Antimicrobial and mechanical effects of zeolite use in dental materials: a systematic review. *Acta stomatologica Croatica: International journal of oral sciences and dental medicine*, Sveučilište u Zagrebu Stomatološki fakultet, v. 55, n. 1, p. 76–89, 2021.
- 368 MURRAY, C. J. et al. Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. *The lancet*, Elsevier, v. 399, n. 10325, p. 629–655, 2022.
- 369 THAKUR, N. et al. A comprehensive review on biosynthesis of magnesium oxide nanoparticles, and their antimicrobial, anticancer, antioxidant activities as well as toxicity study. *Inorganic Chemistry Communications*, Elsevier, v. 146, p. 110156, 2022.
- 370 SHAH, A. A. et al. Antibacterial and antibiofilm activity of barium titanate nanoparticles. *Materials Letters*, Elsevier, v. 229, p. 130–133, 2018.
- 371 SOFI, M. A. et al. An overview of antimicrobial and anticancer potential of silver nanoparticles. *Journal of King Saud University-Science*, Elsevier, v. 34, n. 2, p. 101791, 2022.
- 372 VASCONCELLOS, A. de et al. Synergistic effect in the catalytic activity of lipase rhizomucor miehei immobilized on zeolites for the production of biodiesel. *Microporous and Mesoporous Materials*, Elsevier, v. 163, p. 343–355, 2012.
- 373 OSTOMEL, T. A.; SHI, Q.; STUCKY, G. D. Oxide hemostatic activity. *Journal of the American Chemical Society*, ACS Publications, v. 128, n. 26, p. 8384–8385, 2006.
- 374 LIU, X. et al. Zeta potential of beta zeolites: Influence of structure, acidity, ph, temperature and concentration. *Molecules*, MDPI, v. 23, n. 4, p. 946, 2018.
- 375 FISHER, M. L. et al. Effect of silica nanoparticle size on the stability of alumina/silica suspensions. *Journal of the American Ceramic Society*, Wiley Online Library, v. 84, n. 4, p. 713–718, 2001.
- 376 SCHMAIER, A. H. The contact activation and kallikrein/kinin systems: pathophysiologic and physiologic activities. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, Elsevier, v. 14, n. 1, p. 28–39, 2016.
- 377 NAUDIN, C. et al. Factor xii contact activation. In: THIEME MEDICAL PUBLISHERS. *Seminars in thrombosis and hemostasis*. [S.l.], 2017. v. 43, n. 08, p. 814–826.
- 378 MUTCH, N.; WATERS, E.; MORRISSEY, J. Immobilized transition metal ions stimulate contact activation and drive factor xii-mediated coagulation. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, Elsevier, v. 10, n. 10, p. 2108–2115, 2012.
- 379 SING, K. S. Reporting physisorption data for gas/solid systems with special reference to the determination of surface area and porosity (recommendations 1984). *Pure and applied chemistry*, De Gruyter, v. 57, n. 4, p. 603–619, 1985.
- 380 THOMMES, M. et al. Physisorption of gases, with special reference to the evaluation of surface area and pore size distribution (iupac technical report). *Pure and applied chemistry*, De Gruyter, v. 87, n. 9-10, p. 1051–1069, 2015.

- 381 Clinical and Laboratory Standards Institute. *Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; Fourth Informational Supplement*. Wayne, Pennsylvania, 2012.
- 382 MENA-SILVA, D. et al. Zeolite nanoparticles loaded with 2-methoxystradiol as a novel drug delivery system for the prostate cancer therapy. *International Journal of Molecular Sciences*, MDPI, v. 24, n. 13, p. 10967, 2023.
- 383 BOUKAMP, P. et al. Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. *The Journal of cell biology*, v. 106, n. 3, p. 761–771, 1988.
- 384 PARRA-HUERTAS, R. A. et al. Synthesis and characterization of faujasite-na from fly ash by the fusion-hydrothermal method. *Boletín de la Sociedad Española de Cerámica y Vidrio*, Elsevier, v. 62, n. 6, p. 527–542, 2023.
- 385 AZIZI, S. N.; GHASEMI, S.; KAVIAN, S. Synthesis and characterization of nax nanozeolite using stem sweep as silica source and application of ag-modified nanozeolite in electrocatalytic reduction of h₂o₂. *Biosensors and Bioelectronics*, Elsevier, v. 62, p. 1–7, 2014.
- 386 SHERRY, H. S. The ion-exchange properties of zeolites. i. univalent ion exchange in synthetic faujasite. *The Journal of Physical Chemistry*, ACS Publications, v. 70, n. 4, p. 1158–1168, 1966.
- 387 WANG, F. et al. Resolving the puzzle of single-atom silver dispersion on nanosized γ -al₂o₃ surface for high catalytic performance. *Nature communications*, Nature Publishing Group UK London, v. 11, n. 1, p. 529, 2020.
- 388 FYFE, C. et al. One-and two-dimensional high-resolution solid-state nmr studies of zeolite lattice structures. *Chemical reviews*, ACS Publications, v. 91, n. 7, p. 1525–1543, 1991.
- 389 ZHENG, M. et al. Advanced solid-state nmr spectroscopy and its applications in zeolite chemistry. *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*, Elsevier, v. 140, p. 1–41, 2024.
- 390 LI, X.-F. et al. Emerging materials for hemostasis. *Coordination Chemistry Reviews*, Elsevier, v. 475, p. 214823, 2023.
- 391 MOHAMED, S. S. Y. et al. New insights in large-pores mesoporous silica microspheres for hemostatic application. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, Springer, v. 36, n. 1, p. 18, 2025.
- 392 ABAZARI, M. et al. A comprehensive review on the hemostatic properties of metal-based materials and substances. *Biological Trace Element Research*, Springer, p. 1–25, 2026.
- 393 International Organization for Standardization. *Biological Evaluation of Medical Devices – Part 4: Selection of Tests for Interactions with Blood*. Geneva, Switzerland, 2017.

-
- 394 PAVLOVA, E. L. et al. Antimicrobial and oxidative activities of different levels of silver-exchanged zeolites x and zsm-5 and their ecotoxicity. *Pharmaceuticals*, MDPI, v. 17, n. 12, p. 1586, 2024.
- 395 CERRI, G. et al. Ag-and zn-clinoptilolite: a comparison of their in-vitro antibacterial activity against helicobacter pylori. *Environmental Geochemistry and Health*, Springer, v. 47, n. 12, p. 1–12, 2025.
- 396 CERRILLO, J.; PALOMARES, A.; REY, F. Silver exchanged zeolites as bactericidal additives in polymeric materials. *Microporous and Mesoporous Materials*, Elsevier, v. 305, p. 110367, 2020.
- 397 AMIN, Z.; WALY, N. A.; ARSHAD, S. E. Biofilm inhibition and antimicrobial properties of silver-ion-exchanged zeolite a against vibrio spp marine pathogens. *Applied Sciences*, MDPI, v. 11, n. 12, p. 5496, 2021.
- 398 KARATAŞ, H. et al. Silver nanoparticles in antibacterial research: Mechanisms, applications, and emerging perspectives. *International Journal of Molecular Sciences*, MDPI, v. 27, n. 2, p. 927, 2026.
- 399 SHIRANI, S. et al. Polyethylene-silver-zeolite composite coatings on stainless steel; corrosion resistance and antimicrobial characteristics. *Materials Today Communications*, Elsevier, p. 113874, 2025.
-

Apêndice A

Trabalhos publicados em coautoria

Os trabalhos apresentados neste apêndice foram publicados ao longo do período de desenvolvimento desta tese e representam parte das atividades de pesquisa realizadas durante o doutoramento. Embora nem todos estejam diretamente relacionados aos temas centrais discutidos nos capítulos principais, esses estudos estão inseridos no contexto mais amplo da ciência de materiais e apresentam relação com a linha de pesquisa desenvolvida, especialmente no que se refere à (i) síntese, modificação e caracterização físico-química de materiais silicatos, incluindo a investigação de parâmetros de síntese e estrutura, e (ii) desenvolvimento e avaliação de materiais destinados a aplicações biomédicas.

Em conjunto, esses trabalhos evidenciam a formação científica adquirida ao longo do doutoramento, bem como a diversidade de problemas investigados e de contribuições realizadas em colaboração com diferentes pesquisadores e grupos de pesquisa.

Covalent Immobilization of Laccase on Mesoporous Bismuth Silicate for High-Performance Biodegradation of Contaminants

European Journal of Inorganic Chemistry; Published: 20 February 2026

DOI: 10.1002/ejic.202500419

Erick Paiva Cancellla^[a], Guilherme de Paula Guarnieri^[a], Yuriy B. Lipisa^[b], Fábio Rogério de Moraes^[a], Adriano de Vasconcellos^[a], Giselle Maria Maciel^{*[c]} and José Geraldo Nery^{*[a]}

^[a] Department of Physics, São Paulo State University, São José do Rio Preto, São Paulo, Brazil.

* geraldo.nery@unesp.br

^[b] Department of Chemistry and Applied Biosciences, ETH Zürich, Zurich, Switzerland.

^[c] Department of Chemistry and Biology, Federal University of Technology – Paraná (UTFPR), Curitiba, Paraná, Brazil. * gmmaciel@utfpr.edu.br

Abstract: Bismuth silicate (BiSi-ext) was synthesized hydrothermally using tetrapropylammonium bromide (TPA · Br) as an organic structure-directing agent at 200 °C under autogenous pressure for 7 days. Soxhlet extraction of the template yielded phase-pure bismuth silicate, indexed to an orthorhombic unit cell ($a = 23.234 \text{ \AA}$, $b = 17.109 \text{ \AA}$, $c = 3.897 \text{ \AA}$), consistent with a highly anisotropic, layered framework. The material exhibited a high specific surface area ($310 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$) and mesopore volume ($0.36 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$). Covalent immobilization of *Myceliophthora thermophila* laccase onto the silanized, glutaraldehyde-activated support produced Lac-GA-APTES-BiSi-ext. Bioinformatic modeling revealed that immobilization at Lys188 expanded the active-site pocket volume from 342 to $423 \text{ \AA}^3$, enhancing substrate accessibility. The biocatalyst demonstrated improved thermal stability, reusability, and catalytic efficiency, achieving complete decolorization of Tectilon Blue 4R-01 and $\sim 73\%$ degradation of ibuprofen within 2 h at 40 °C. Mechanistically, laccase performs single-electron oxidation at the dye's secondary amine to generate N-centered radicals and $-\text{OH}$; these species — directly or via *in situ* H_2O_2 /Cu-assisted Fenton-like chemistry — drive aromatic hydroxylation, ring opening to muconic-type/polycarboxylated intermediates, and stepwise decarboxylation. These results establish Lac-GA-APTES-BiSi-ext as a robust, scalable, and eco-friendly platform for advanced wastewater remediation targeting pharmaceutical residues and recalcitrant dyes.

Synthesis and physicochemical characterization of a novel bismuth silicate templated by tetrapropylammonium bromide and polydi-allyldimethylammonium chloride

Journal of Materials Science; Published: 03 November 2025

DOI: 10.1007/s10853-025-11732-6

Erick Paiva Cancelli^[a], Guilherme de Paula Guarnieri^[a], Nader de Sousa Amadeu^[b], Martin Radtke^[b], Rodrigo Henrique Garcia^[c], Eduardo Ribeiro de Azevedo^[c], Ivana Conte Cosentino^[d], Yvonne Primerano Mascarenhas^[c] and José Geraldo Nery^{*[a]}

^[a] Department of Physics, São Paulo State University (UNESP), Campus of São José Do Rio Preto, São José Do Rio Preto, SP 15054-000, Brazil. * gerald.nery@unesp.br

^[b] Division 1.3 Structure Analysis, NMR Spectroscopy, BAM Federal Institute for Materials Research and Testing, Richard Willstaetter Str. 11, 12489 Berlin, Germany.

^[c] São Carlos Institute of Physics, University of São Paulo, São Carlos, SP 13566-590, Brazil.

^[d] Nuclear and Energy Research Institute (IPEN), Av. Prof. Lineu Prestes 2242, São Paulo, SP 05508-000, Brazil.

Abstract: A bismuth silicate (BiSi-1) was hydrothermally synthesized using tetrapropylammonium bromide (TPA·Br) as the organic structure-directing agent and shown by multi-scale characterization to be distinct from known Bi-silicates. Powder X-ray diffraction is indexable with an orthorhombic metric ($a = 23.234 \text{ \AA}$, $b = 17.109 \text{ \AA}$, $c = 3.897 \text{ \AA}$), consistent with a highly anisotropic, possibly layered framework. High-resolution TEM/SAED reveals nanocrystalline, plate-like domains assembled into sub-micrometric aggregates with locally oriented lamellae; lattice fringes ($0.27 - 0.32 \text{ nm}$) match the strongest XRD spacings. Solid-state NMR establishes a silica-rich network with a dominant Q_4 population (77%) and minor Q_3 (11%) and Q_2 (12%) sites; the contact-time dependence of ^1H to ^{29}Si cross-polarization is consistent with increasing proximal-proton density from Q_4 to Q_2 . Aging to 24 h sharpens the ^{29}Si lineshape, while calcination progressively removes the OSDA and vicinal hydroxyls; at 750°C , ^{29}Si spectra indicate framework densification/rearrangement. XANES/EXAFS places bismuth predominantly as Bi^{3+} in an oxide-like environment with a pronounced Bi–O first shell and no detectable Bi^0 or Bi–Br contributions. ICP–OES yields a reproducible Bi/Si atomic ratio of 1 : 3. Thermogravimetry shows stepwise desorption, dehydroxylation, and template removal, with thermal stability maintained to 750°C . Nitrogen sorption confirms mesoporosity in the as-made and Soxhlet-extracted solids (the latter exhibiting the highest surface area), whereas high-temperature calcination reduces porosity. Collectively, BiSi-1 emerges as a nanocrystalline, anisotropic Bi-silicate whose connectivity, local Bi–O environment, and accessible texture are tunable by aging and post-treatments, positioning it as a promising platform for heterogeneous catalysis and environmental remediation.

An adsorption agent based on chitosan–zeolite composite: environmental and radioactive liquid waste remediation

Environmental Science: Advances; Published: 30 January 2023

DOI: 10.1039/D2VA00148A

Leandro Goulart de Araujo^{*[a]}, Vinicius Litrenta Medeiros^[b], Guilherme de Paula Guarnieri^[b], Danilo Antonio da Silva^[b], Tamires Watanabe^[a], Júlio Takehiro Marumoa^[a] and José Geraldo Nery^[b]

^[a] Nuclear and Energy Research Institute (IPEN), Av. Prof. Lineu Prestes 2242, São Paulo, SP, Brazil. * lgoulart@alumni.usp

^[b] Department of Physics, Institute of Bioscience, Letters and Exact Sciences, São Paulo State University (UNESP), Campus of São José do Rio Preto, SP, Brazil.

Abstract: In this article, we present a chitosan–zeolite composite, which was synthesized and used as an adsorbent material for caesium (Cs) removal from aqueous media and real liquid radioactive organic waste (LROW). The compound was characterized by X-ray diffraction, Fourier transform infrared spectroscopy, and scanning electron microscopy techniques. The physicochemical characterization indicates the production of a composite. Adsorption experiments were first performed using the prepared solutions contaminated with Cs using full factorial design with two variables of interest: initial Cs concentration (C_{s0}) and adsorbent dosage (mg L^{-1}). The results indicated a high caesium removal rate with removal values above 93% and adsorption capacity of up to 10 mg g^{-1} . With the best experimental conditions according to our experimental domain, time was evaluated and equilibrium was reached in 180 min. Finally, the adsorbent material was tested as an adsorbent for Cs, Am, and U from LROW. When in contact with LROW, the removal rates (%) were 21.51 (^{137}Cs), 26.39 (^{241}Am), and 20.26 (U (total)). Although lower, this material indicated that it has the potential to be used for multi-elemental adsorption.

Syntheses of novel topical hemostatic agents based on pectin biopolymer aiming hemorrhage control: Thromboelastographic studies and non-homogeneous swelling effect

Materials Today Communications; Published: 24 November 2022

DOI: 10.1016/j.mtcomm.2022.104989

Oscar A.N. Santisteban^[a], Guilherme M. Sacco^[a], Guilherme De Paula Guarnieri^[b], Moacir Fernandes de Godoy^[b], Eduardo Ribeiro de Azevedo^[c] and José Geraldo Nery^{*[a]}

^[a] Department of Physics, São Paulo State University (UNESP), São José do Rio Preto, São Paulo 15054-000, Brazil. * geraldo.nery@unesp.br

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

^[c] São Carlos Institute of Physics, University of São Paulo, São Carlos, São Paulo 13566-590, Brazil.

Abstract: Topical hemostatic agents based on pectin biopolymer were synthesized and characterized by X-ray diffraction (XRD), Scanning Electronic Microscopy (SEM), Phase Contrast Microscopy, Infrared spectroscopy (FT-IR), Differential Scanning Calorimetry (DSC) and Solid State ^{13}C MAS NMR. The pectin biofilms were crosslinked with CaCl_2 using different concentrations of Ca^{2+} solutions ($4.5 \times 10^{-2} \text{ M}$, $2.7 \times 10^2 \text{ M}$, $4.5 \times 10^2 \text{ M}$). ^{13}C MAS NMR and FT-IR data revealed that crosslinking with Ca^{2+} was successfully achieved, in line with the formation of egg-box type structures. The anti-hemorrhagic effect caused by the interaction of the red blood cells with the pectin biofilm interface was showed in details by phase contrast microscopy. The images showed that higher Ca^{2+} concentration ($0.45 \times 10^2 \text{ M}$) positively favor the coagulation cascade by facilitating the migration and an orderly stacking of the red blood cells into the pectin biofilm scaffold. The hemostatic action of the prepared pectin biofilms were analyzed by Thromboelastography (TEG). The results indicated that the hemostatic action of the biofilms is as effective as that of the hybrid materials reported in the literature, indicating that these pectin biofilms have potential to become safe topic hemostat. It was also observed a non-homogeneous swelling effect caused by the interaction between the pectin biofilms interface and blood cells which induced a rapid bending and a bucking instability that swollen the pectin network.

Apêndice B

Material Suplementar do Artigo I

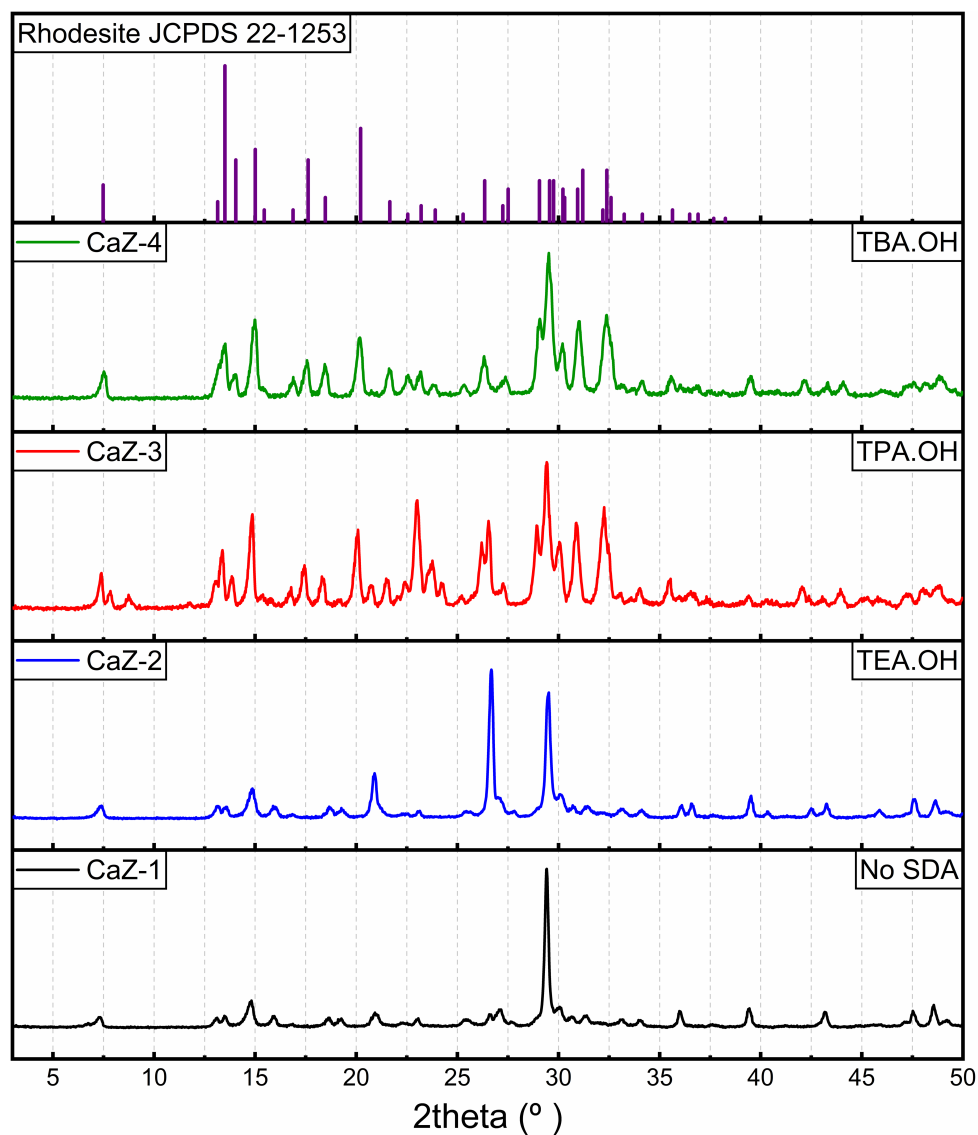


Figure B3.1: XRD patterns of CaZ-1, CaZ-2, CaZ-3, CaZ-4 and their comparison to the simulated diffractogram of the natural calcium-silicate rhodesite, according to JCPDS database. y-axis corresponds to intensity in arbitrary units.

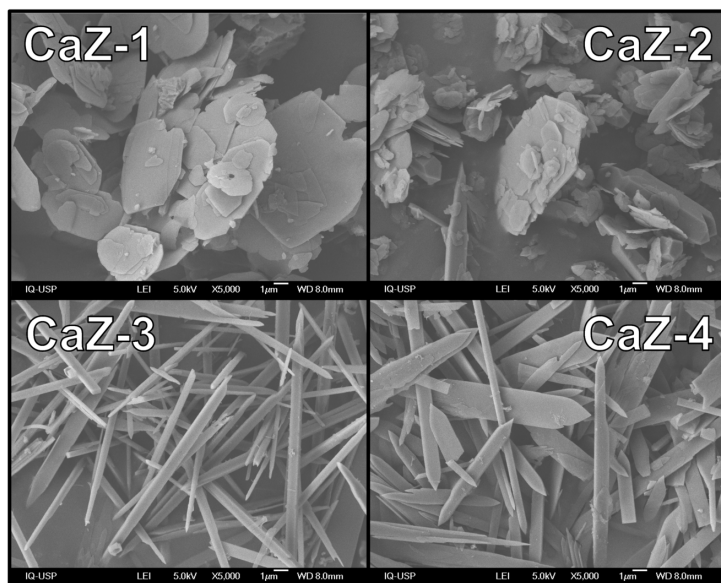


Figure B3.2: SEM images of CaZ-1, CaZ-2, CaZ-3 and CaZ-4 with 5000x magnification.

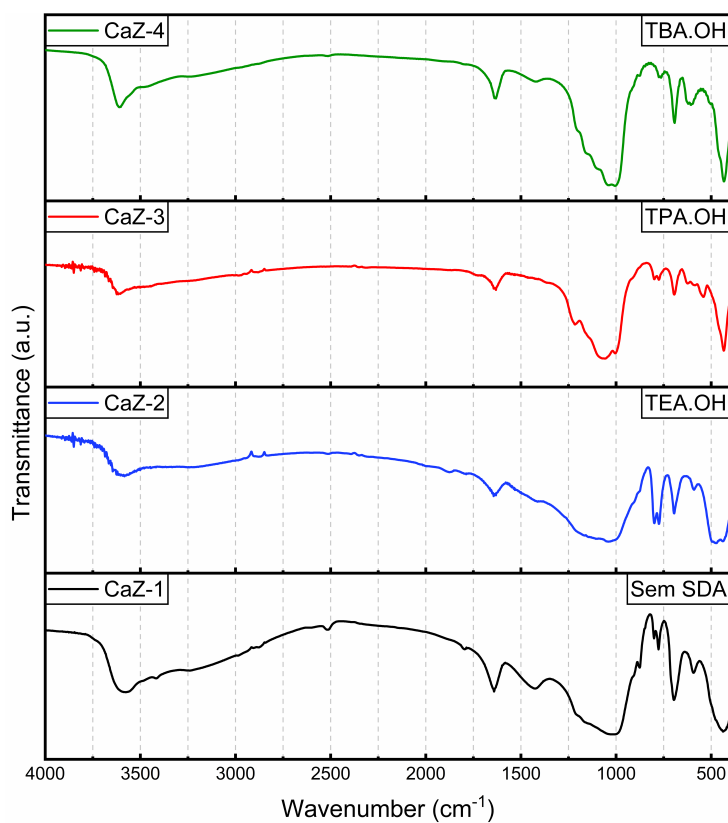


Figure B3.3: Full FTIR spectra obtained for CaZ-1, CaZ-2, CaZ-3, CaZ-4.

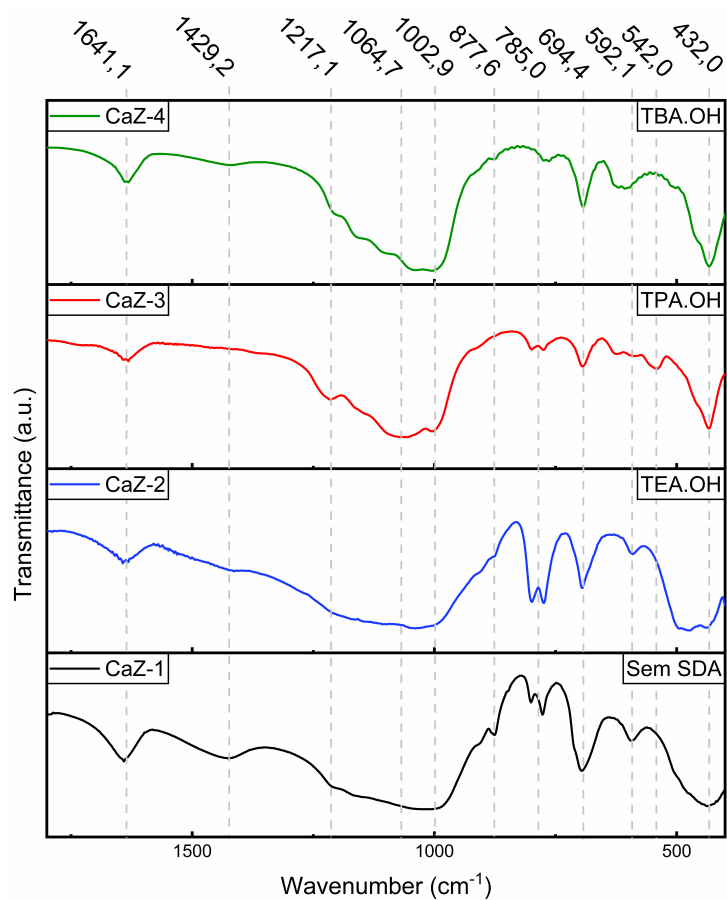


Figure B3.4: Amplification of the FTIR spectra obtained for CaZ-1, CaZ-2, CaZ-3, CaZ-4 in the region 1800 – 400 cm^{-1} .

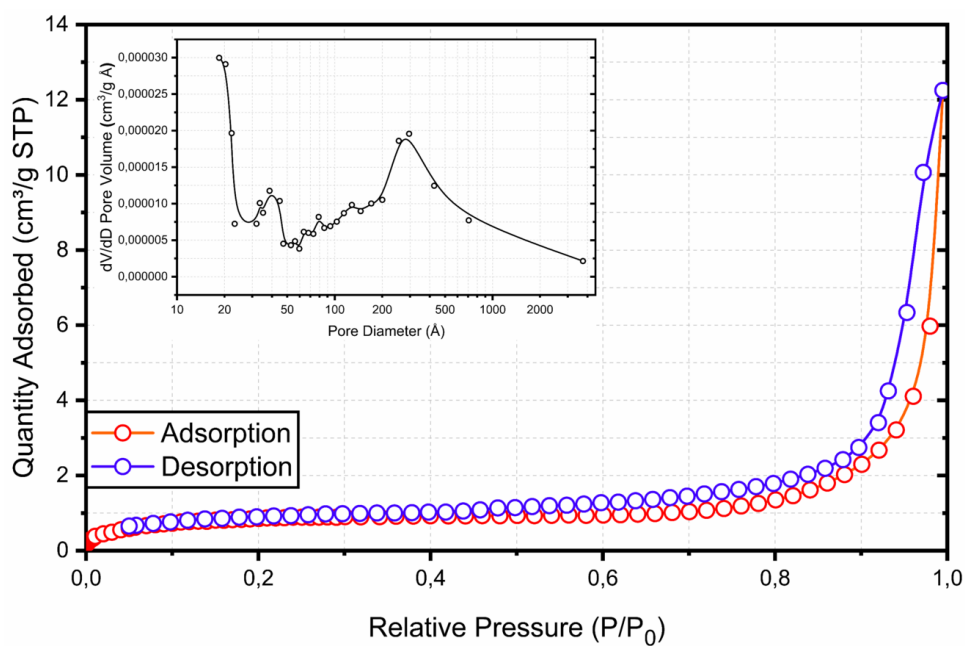


Figure B3.5: N_2 sorption isotherm for CaZ-1.

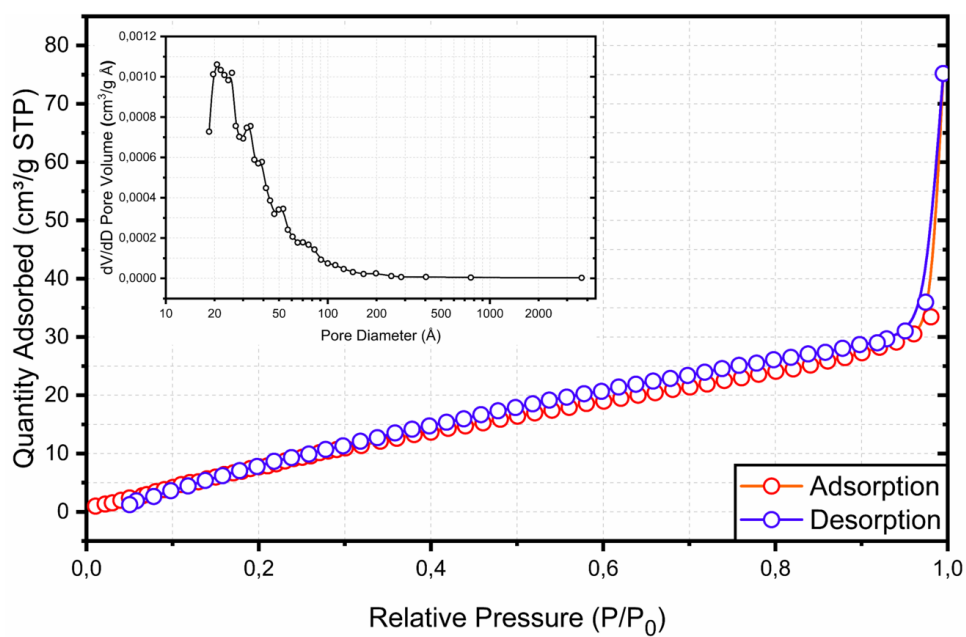


Figure B3.6: N_2 sorption isotherm for CaZ-2.

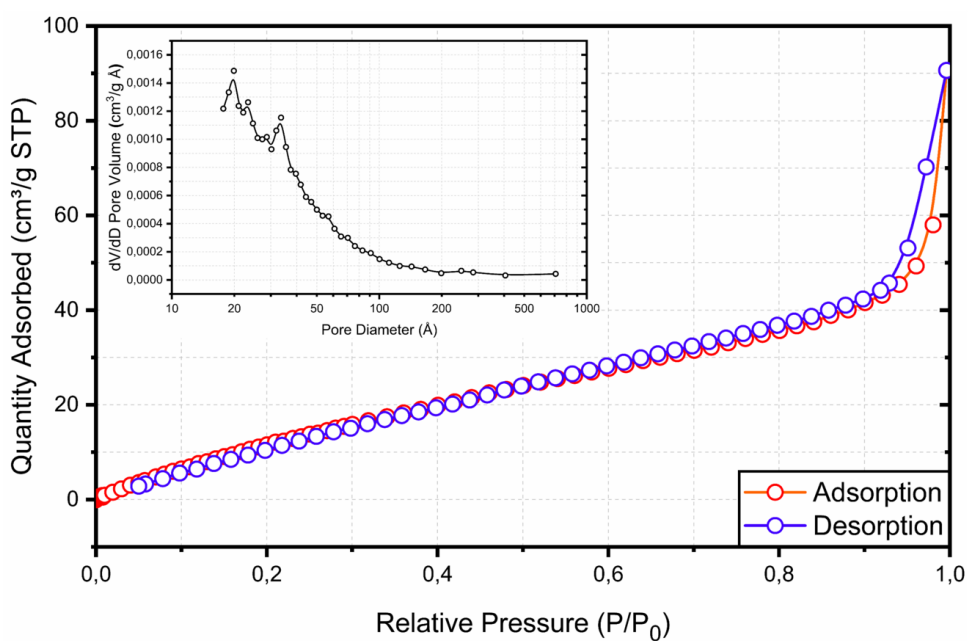


Figure B3.7: N_2 sorption isotherm for CaZ-3.

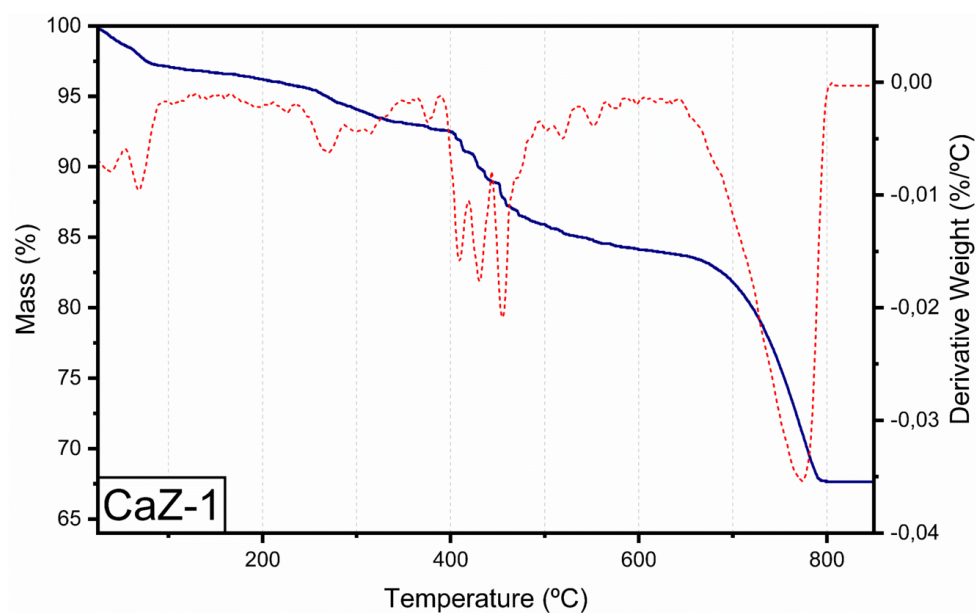


Figure B3.8: TG (blue line) and DTG (red dotted line) curves for CaZ-1.

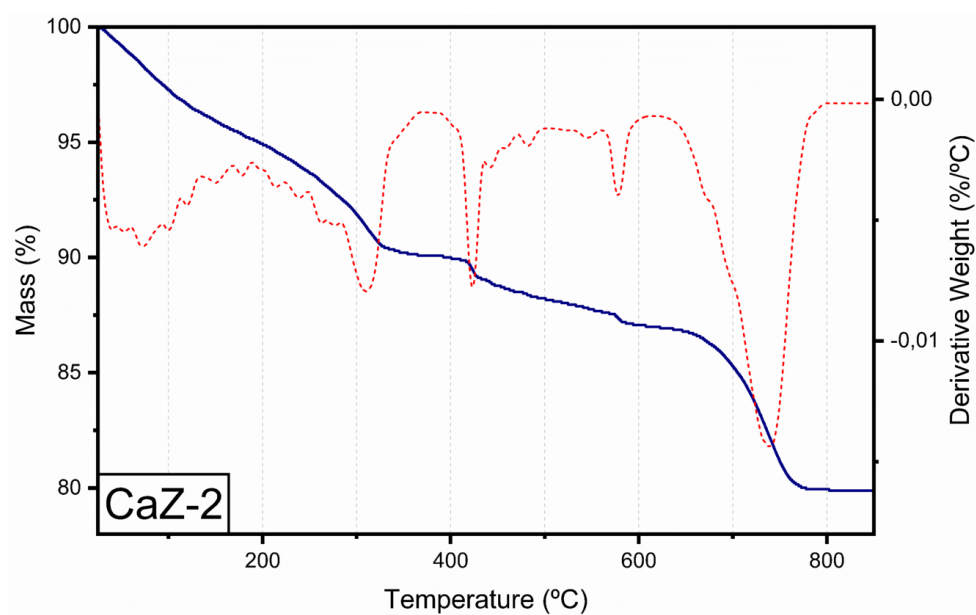


Figure B3.9: TG (blue line) and DTG (red dotted line) curves for CaZ-2.

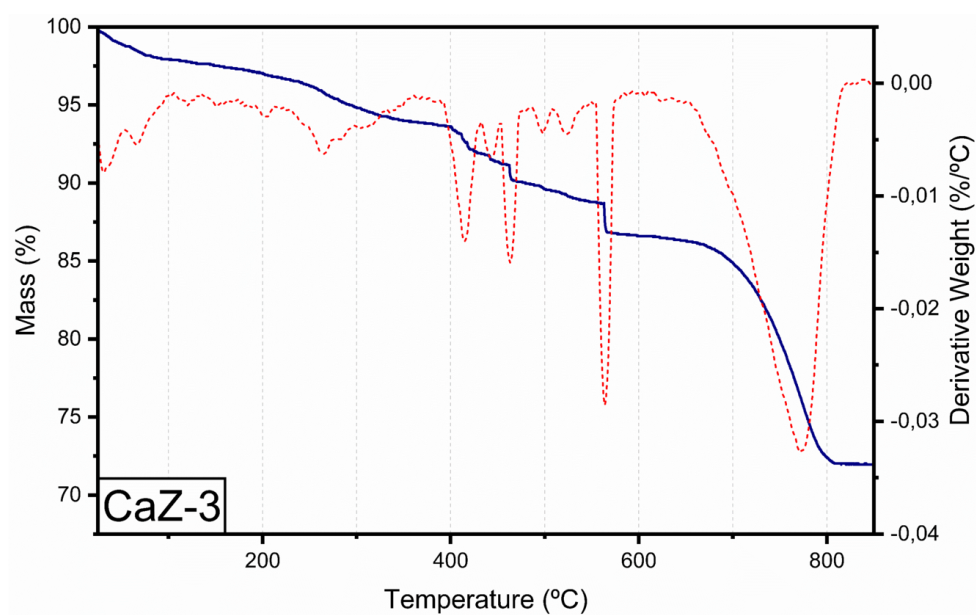


Figure B3.10: TG (blue line) and DTG (red dotted line) curves for CaZ-3.

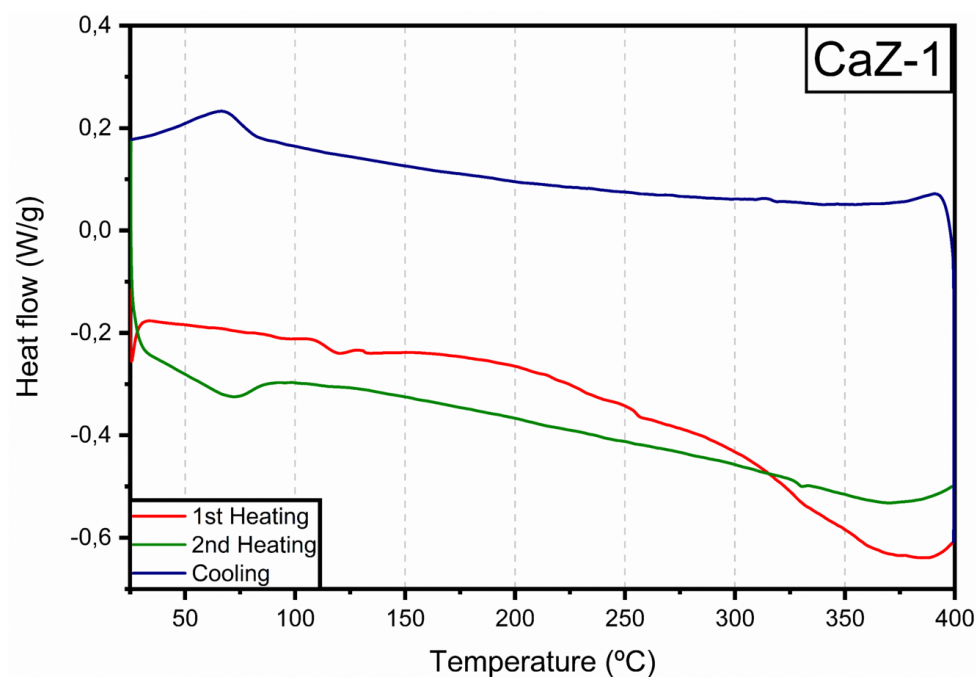


Figure B3.11: DSC curves for CaZ-1.

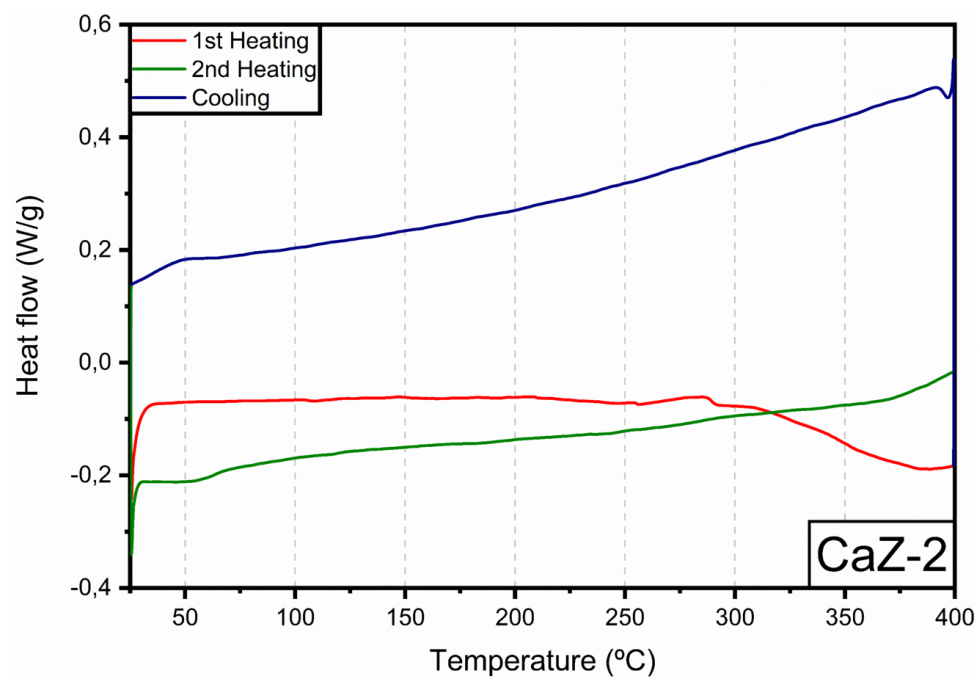


Figure B3.12: DSC curves for CaZ-2.

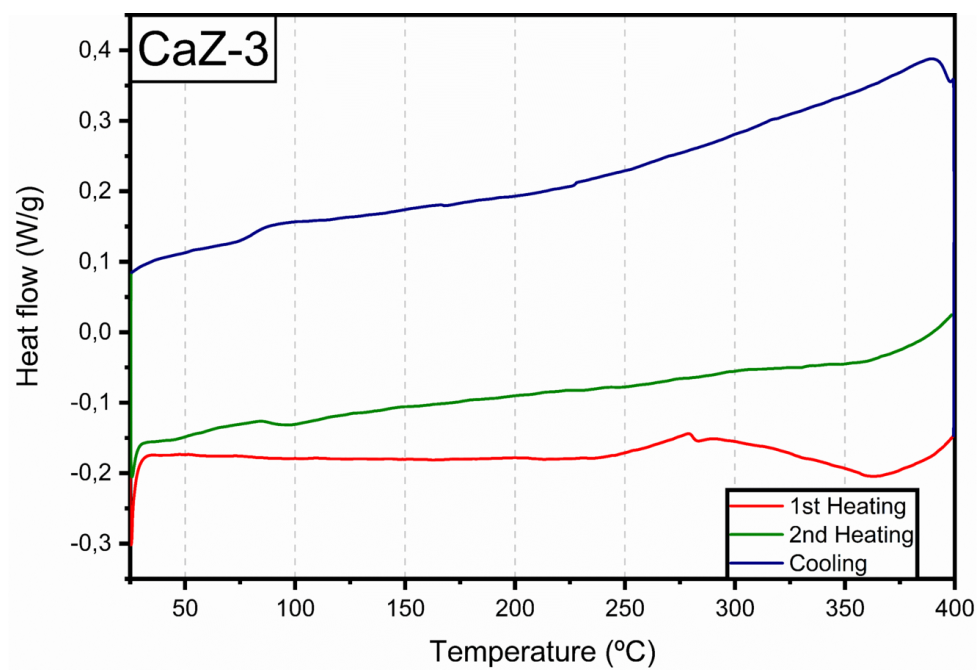


Figure B3.13: DSC curves for CaZ-3.

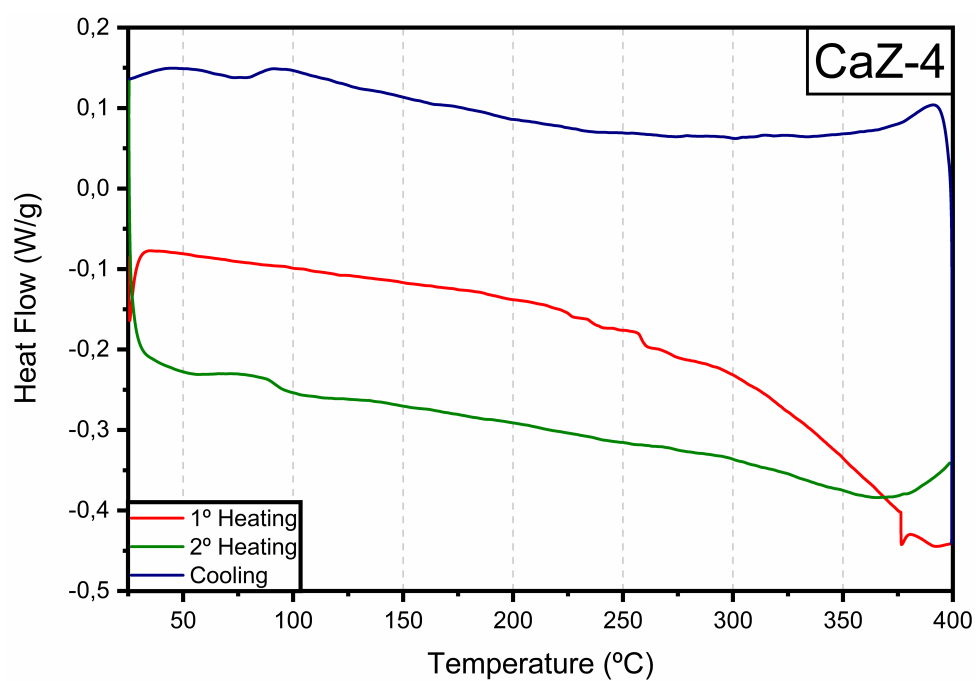


Figure B3.14: DSC curves for CaZ-4.

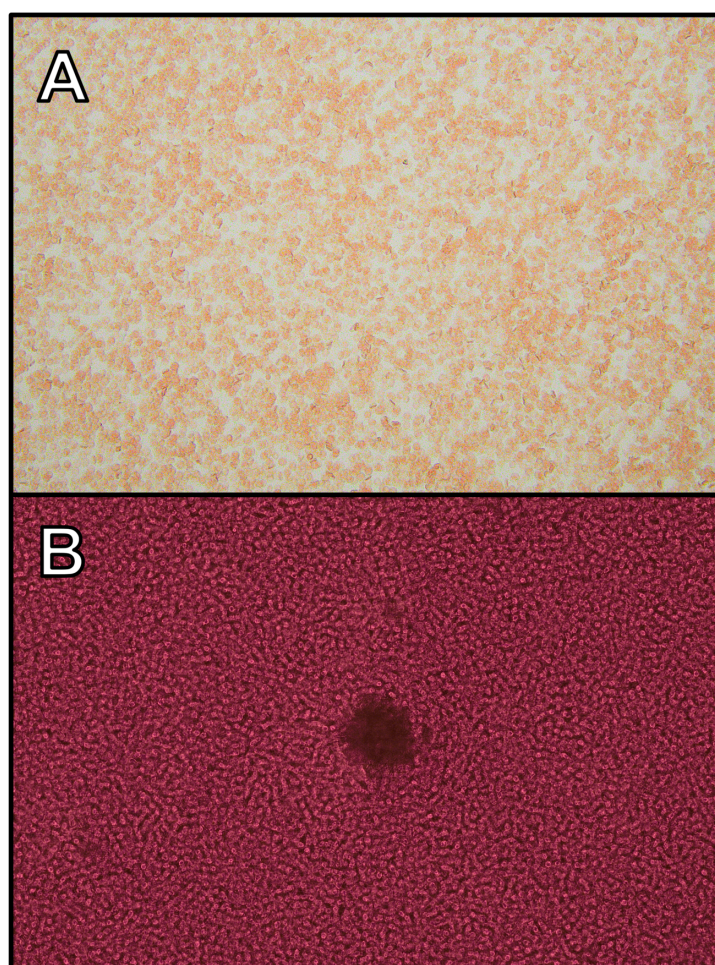


Figure B3.15: Phase contrast microscopy images (20x magnification) of whole blood: A) Control (pure blood); B) Blood after addition of CaZ-4.

Table B3.1: Textural properties of the synthesized calcium silicates.

Material	S_{BET} (m ² g ⁻¹)	V_{pores} (cm ³ g ⁻¹)	Φ_{pores} (Å)	D_{max} (Å)
CaZ-3	72.2	0.10	67.4	19.9
CaZ-4	100.3	0.11	57.1	18.6

Table B3.2: Mass variation ($\Delta m_{25-600^\circ\text{C}}$ (%) and $\Delta m_{600-900^\circ\text{C}}$ (%CO₂), amount of CaCO₃ (%) present, onset temperature ($T_{\text{onset-TG}}$ (°C)), and peak temperature ($T_{\text{peak-DTG}}$ (°C)) obtained from the TG and DTG thermal decomposition curves for all the synthesized materials.

Material	$\Delta m_{25-600^\circ\text{C}}$ (%)	$\Delta m_{600-900^\circ\text{C}}$ (%CO ₂)	CaCO ₃ (%)	$T_{\text{onset-TG}}$ (°C)	$T_{\text{peak-DTG}}$ (°C)
CaZ-1	15.9	16.4	37.3	719	775
CaZ-2	13.3	7.1	16.1	718	741
CaZ-3	13.3	14.7	33.5	720	773
CaZ-4	13.9	19.5	44.4	724	777

Table B3.3: Detailed Zeta Potential data for all materials in the analyzed pH range.

Zeta Potential (mV)				
pH	CaZ-1	CaZ-2	CaZ-3	CaZ-4
1.12	-0.7 ± 0.7	-1.3 ± 0.3	0.2 ± 1.0	0.1 ± 0.6
2.03	-0.5 ± 1.2	-4.5 ± 0.7	-2.2 ± 0.5	-6.7 ± 0.5
3.04	-21.9 ± 1.8	-19.5 ± 2.3	-34.5 ± 1.8	-35.3 ± 1.3
3.99	-19.9 ± 1.3	-18.9 ± 0.8	-16.1 ± 0.5	-16.7 ± 0.7
5.03	-18.3 ± 1.7	-18.0 ± 0.8	-15.4 ± 0.7	-16.2 ± 1.1
5.96	-18.9 ± 1.3	-14.3 ± 2.5	-13.6 ± 1.2	-14.5 ± 1.0
7.00	-17.2 ± 1.4	-18.5 ± 0.9	-16.2 ± 0.6	-15.6 ± 0.5
8.06	-18.5 ± 1.4	-18.0 ± 0.8	-16.4 ± 0.7	-17.8 ± 0.3
9.00	-14.9 ± 0.9	-17.0 ± 1.0	-16.9 ± 0.8	-16.1 ± 0.6
9.97	-18.2 ± 1.4	-17.5 ± 0.8	-18.3 ± 0.4	-19.8 ± 0.5
11.05	-14.2 ± 0.8	-9.4 ± 0.3	-13.6 ± 0.8	-12.6 ± 0.7
12.03	-15.7 ± 1.8	-11.7 ± 1.2	-12.9 ± 1.4	-11.7 ± 0.8

Apêndice C

Material Suplementar do Artigo II

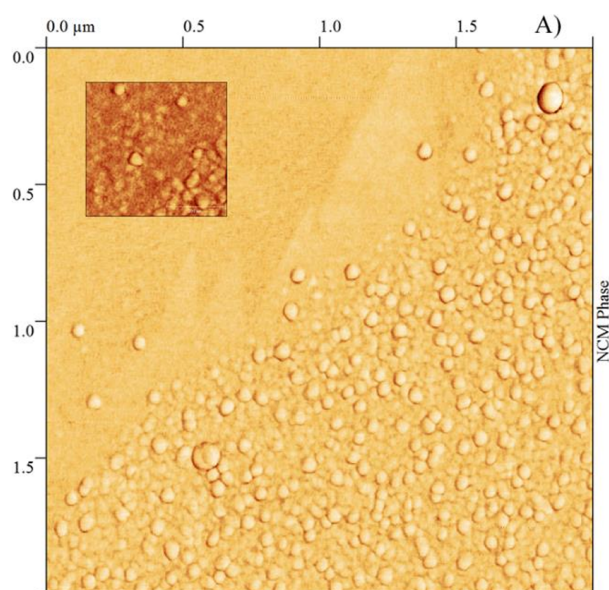


Figure C4.1: Atomic Force Microscopy image of NanoFAU.

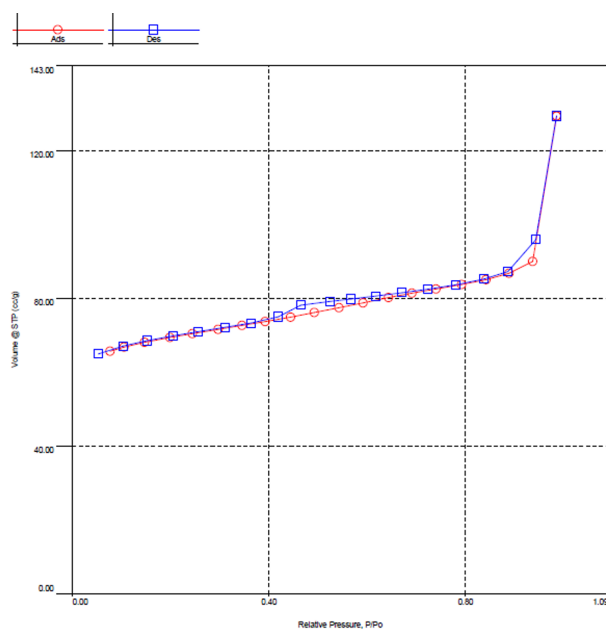


Figure C4.2: Adsorption and desorption isotherms of nanometric Faujasite zeolite (NanoFAU).

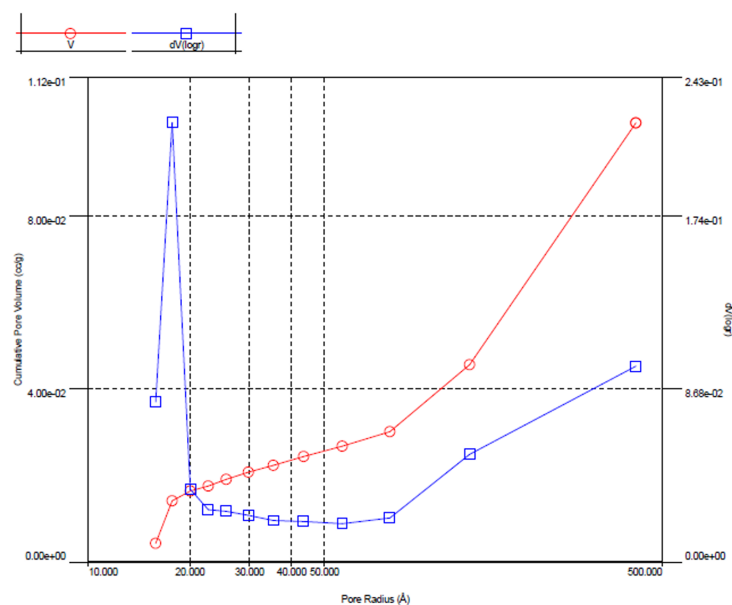


Figure C4.3: Pore size distribution curve of the NanoFAU material.

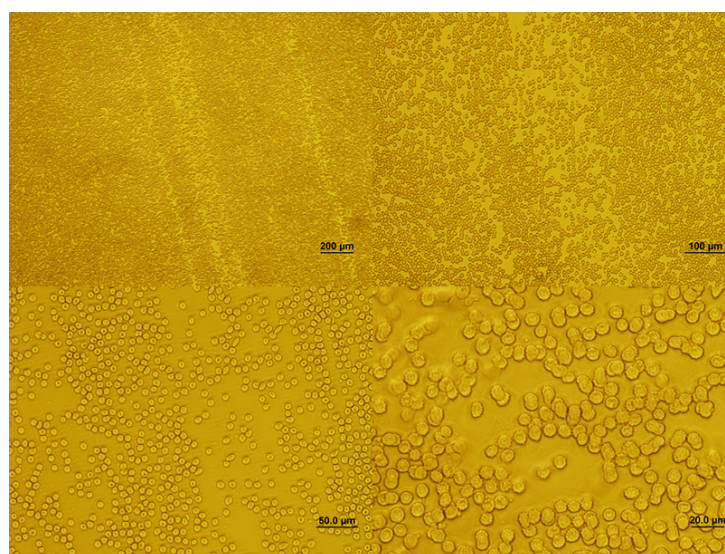


Figure C4.4: Images of whole blood before the addition of zeolites obtained by phase-contrast microscopy.

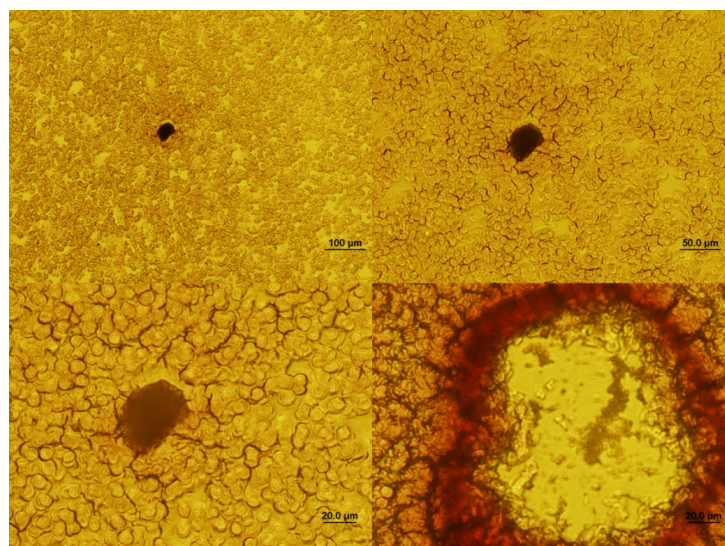


Figure C4.5: Images of whole blood after the addition of NanoFAU zeolites obtained by phase-contrast microscopy.

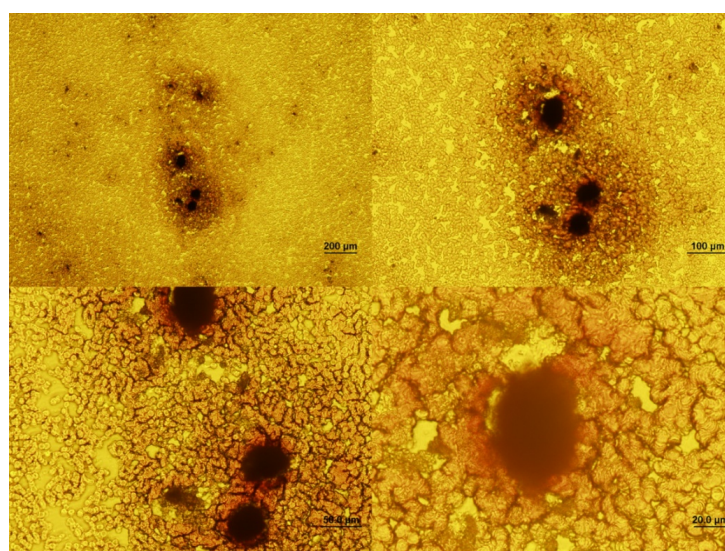


Figure C4.6: Images of whole blood after the addition of NanoFAU-Ca zeolites obtained by phase-contrast microscopy.

Dados Curriculares

Identificação	
Nome	Guilherme de Paula Guarnieri
Nascimento	25/04/1996
Nacionalidade	Brasileira
Nome em citações bibliográficas	Guarnieri, G.P / Guarnieri, Guilherme de Paula
Currículo Lattes	http://lattes.cnpq.br/7343654957630417
Orcid	https://orcid.org/0000-0003-0853-7075
Formação Acadêmica	
2022 – 2026	Doutorado em Biofísica Molecular Universidade Estadual Paulista (UNESP – Ibilce), São Paulo, Brasil <i>Bundesanstalt für Materialforschung und -prüfung (BAM)</i> , Berlim, Alemanha – Estágio PDSE (7 meses)
2018 – 2020	Mestrado em Biofísica Molecular Universidade Estadual Paulista (UNESP – Ibilce), São Paulo, Brasil
2014 – 2019	Graduação em Física Biológica Universidade Estadual Paulista (UNESP – Ibilce), São Paulo, Brasil
Produção Bibliográfica	
GUARNIERI, G. DE P.; LAURENTI, J. B.; CRESPO, B.; et al. Nanometric Faujasite (FAU) Zeolite Ion-Exchanged With Metal Ions for Hemostatic and Antimicrobial Applications: A Thromboelastographic and Microbiological Study. <i>Chemistry – An Asian Journal</i>, v. 21, n. 9, 2026. Wiley. CANCELLA, E. P.; DE PAULA GUARNIERI, G.; LIPISA, Y. B.; et al. Covalent Immobilization of Laccase on Mesoporous Bismuth Silicate for High-Performance Biodegradation of Contaminants. <i>European Journal of Inorganic Chemistry</i>, v. 29, n. 10, 2026. Wiley.	

CANCELLA, E. P.; DE PAULA GUARNIERI, G.; DE SOUSA AMADEU, N.; et al. Synthesis and physicochemical characterization of a novel bismuth silicate templated by tetrapropylammonium bromide and polydiallyldimethylammonium chloride. *Journal of Materials Science*, v. 60, n. 45, p. 22615–22635, 2025. Springer Science and Business Media LLC.

DE PAULA GUARNIERI, G.; SANTISTEBAN, O. A. N.; CANCELLA, E. P.; et al. Biomass-Derived Porous Crystalline Calcium-Silicates Synthesized from Chicken Eggshell Waste Using Organic Amine Templates: A Case Study for Potential Hemostatic Application. *European Journal of Inorganic Chemistry*, v. 28, n. 26, 2025. Wiley.

DE ARAUJO, L. G.; MEDEIROS, V. L.; GUARNIERI, G. DE P.; et al. An adsorption agent based on chitosan–zeolite composite: environmental and radioactive liquid waste remediation. *Environmental Science: Advances*, v. 2, n. 3, p. 484–494, 2023. Royal Society of Chemistry (RSC).

SANTISTEBAN, O. A. N.; SACCO, G. M.; GUARNIERI, G. D. P.; et al. Syntheses of novel topical hemostatic agents based on pectin biopolymer aiming hemorrhage control: Thromboelastographic studies and non-homogeneous swelling effect. *Materials Today Communications*, v. 33, p. 104989, 2022. Elsevier BV.

DE PAULA GUARNIERI, G.; DE VASCONCELLOS, A.; DE MORAES, F. R.; NERY, J. G. Application of Rare Earth Cation-Exchanged Nanozeolite as a Support for the Immobilization of Fungal Lipase and their Use in Biodiesel Production. *Nano- and Biocatalysts for Biodiesel Production*, 25. jun. 2021. Wiley.

Participação em eventos científicos

Escola de Nêutrons ISIS/Brazil (IPEN). 2024. (Oficina).

II Simpósio do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biomoleculares e Farmacológicas: Integração Interdisciplinar para Estudo de Ação de Moléculas Bioativas. Potencial hemostático de cálcio-silicatos sintetizados a partir de cascas de ovos de galinha. 2024. (Simpósio).

XXI B-MRS Meeting. Converting Waste Materials into Biomaterials: Enriched calcium zeolites synthed from chicken eggshells for hemostatic applications. 2023. (Congresso).

XXX Congresso de Iniciação Científica da Unesp. Análise por espectroscopia de infravermelho (FT-IR) de alterações estruturais em nanozeólitas induzidas por troca iônica com lantanídeos. 2018. (Congresso).

55º EXPO Rio Preto. Tradição, tecnologia e negócios. 2017. (Exposição).

VI Semana da Física. 2017. (Feira).

XXIX Congresso de Iniciação Científica da Unesp. Análises espectroscópicas por FT-IR das alterações estruturais em nanozeólitas induzidas por troca iônica com cátions lantanídeos.. 2017. (Congresso).

V Semana da Física. 2016. (Feira).

XXVIII Congresso de Iniciação Científica da Unesp. 2016. (Congresso).

III Semana da Física. 2014. (Feira).

VI Encontro sobre Ciência, Popularização da Ciência e Alfabetização Científica. 2014. (Encontro).

