



YASMIN CHALFOUN POMÁRICO DE SOUZA

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DE GÉIS
DERMATOLÓGICOS CONTENDO
CLINOPTILOLITA E SUA ASSOCIAÇÃO COM
ENROFLOXACINO E SAIS DE PRATA E ZINCO**

**LAVRAS – MG
2012**

YASMIN CHALFOUN POMÁRICO DE SOUZA

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DE GÉIS DERMATOLÓGICOS CONTENDO
CLINOPTILOLITA E SUA ASSOCIAÇÃO COM ENROFLOXACINO E
SAIS DE PRATA E ZINCO**

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de
Lavras, como parte das
exigências do Programa de
Pós-Graduação em Ciências
Veterinárias, área de
concentração em Clínica,
Cirurgia e Patologia, para a
obtenção do título de
“Mestre”.

Orientador:

Dr. Carlos Artur Lopes Leite

Coorientador:

Dr. Geraldo Márcio da Costa

**LAVRAS – MG
2012**

**Ficha Catalográfica Elaborada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca da UFLA**

Souza, Yasmin Chalfoun Pomárico de.

Avaliação *in vitro* de géis dermatológicos contendo clinoptilolita e sua associação com enrofloxacino e sais de prata e zinco / Yasmin Chalfoun Pomárico de Souza. – Lavras : UFLA, 2012.

64 p. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2012.

Orientador: Carlos Artur Lopes Leite.

Bibliografia.

1. Zeólita. 2. Ação antimicrobiana. 3. Dermatologia veterinária.
4. Propriedades. 5. Temperatura. I. Universidade Federal de Lavras.
II. Título.

CDD – 636.08951

YASMIN CHALFOUN POMÁRICO DE SOUZA

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DE GÉIS DERMATOLÓGICOS CONTENDO
CLINOPTILOLITA E SUA ASSOCIAÇÃO COM ENROFLOXACINO E
SAIS DE PRATA E ZINCO**

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de
Lavras, como parte das
exigências do Programa de
Pós-Graduação em Ciências
Veterinárias, área de
concentração em Clínica,
Cirurgia e Patologia, para a
obtenção do título de
“Mestre”.

APROVADA em 10 de fevereiro de 2012.

Dr. Carlos Artur Lopes Leite UFLA

Dr. Geraldo Márcio da Costa UFLA

Dr. Fernando Antônio Bretas Viana UFMG

Dr. Carlos Artur Lopes Leite
Orientador

**LAVRAS – MG
2012**

*Aos meus amados pais, Sara e Alberto, e
ao meu querido marido Fabrício.*

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus, por estar sempre ao meu lado.

À Universidade Federal de Lavras e ao Departamento de Medicina Veterinária, pela oportunidade concedida para a realização do Mestrado.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), pela concessão da bolsa de estudos.

Ao meu grande amigo e orientador, Dr. Carlos Artur, por ter sido uma das melhores pessoas que já cruzaram o meu caminho. Obrigada de coração pelos ensinamentos, pelas oportunidades e por acreditar no meu potencial. Ter sido sua orientada tanto na Graduação, quanto no Mestrado e ter a sua amizade será sempre motivo de muito orgulho para mim. Você é um verdadeiro educador que ama o que faz e esse é um grande exemplo a ser seguido. Por tudo isso eu serei sempre grata a você.

Ao meu querido amigo e coorientador Dr. Geraldo, por ter me dado a grande oportunidade de aprender um pouco da “arte” da microbiologia. Obrigada pelos ensinamentos, pela paciência, pela amizade, pela autorização da realização de parte do projeto em seu laboratório e pelas valiosas sugestões na realização deste projeto.

À Dra. Flávia Maria de Oliveira Borges Saad, pela participação na Banca de Qualificação do projeto, dando ótimas sugestões que enriqueceram nosso estudo e pela grande ajuda na obtenção do material utilizado.

À empresa Celta Brasil Ltda, na pessoa do zootecnista Gustavo Vaz Corrêa Maia, que forneceu a zeólita para os andamentos desta pesquisa.

Ao Dr. Luiz Simeão do Carmo, pesquisador da Fundação Ezequiel Dias (FUNED), que gentilmente nos cedeu as cepas utilizadas nesta pesquisa.

À professora Dra. Ruthnéa Aparecida Lázaro Muzzi, pela amizade, pelo apoio, incentivo e pelas oportunidades.

Ao professor Dr. Rodrigo Bernardes Nogueira pelos ensinamentos e oportunidades.

Ao professor Dr. Alex de Oliveira Ribeiro, do Centro Universitário de Lavras (UNILAVRAS), pelo auxílio com a análise estatística.

Ao colega Rafael Ambrósio Loures, pelo auxílio na etapa microbiológica.

A todos os meus colegas e amigos do Mestrado, em especial Camila, Clayton, Leonardo, Luciane, Priscila, Rosane e Willer. Dividir essa etapa com vocês foi uma alegria para mim.

A todos os Médicos Veterinários Residentes com os quais eu tive a oportunidade de trabalhar no Hospital Veterinário: Ingrid, Mariana, Rodrigo, Vânia, Camila, Guilherme, Moema, Daniela, Ana Carolina e Maria Elisa. Obrigada pela amizade, pela troca de experiências e conhecimentos construídos.

A todas as pessoas que trabalham duro para fazer o Hospital Veterinário funcionar com sucesso, em especial Sra. Meire, Srta. Érica, Sr. Maurício, Sra. Neide e Sra. Fátima, pelos quais tenho grande carinho e amizade.

Às ex-alunas da UFLA, hoje médicas veterinárias, Fabiane Ribeiro Costa Silva e Aline de Almeida Silva, pela grande ajuda na execução dos projetos de Nutrição Clínica.

Aos estagiários do Hospital Veterinário e aos alunos de Medicina Veterinária da UFLA com os quais tive a oportunidade de trabalhar. Vocês contribuíram imensamente para o meu crescimento como profissional.

Ao Bichento, pela doação do sangue utilizado em testes de coagulação.

A todos os pacientes e seus proprietários por contribuírem para o meu aprendizado como médica veterinária.

Ao meu querido marido, Fabrício, pelo amor e respeito e por ser um exemplo de inteligência e determinação. Obrigada por acreditar em mim e me incentivar sempre a lutar pelos meus objetivos.

Aos meus amados pais, Sara e Alberto, por todo o apoio e amor. Agradeço por acompanharem os meus sonhos e me ajudarem a ir à busca deles, incentivando-me sempre a me tornar uma pessoa melhor a cada dia, em todos os sentidos.

A toda minha família, que torce por mim, em especial minha querida avó Maria, minhas amadas tias Cecília e Rosemary, meu irmão Igor e minha cunhada Mirelle. Minhas vitórias sempre serão dedicadas a vocês.

Aos meus queridos amigos Aline, Victor, Letícia e Alex, agradeço pela amizade verdadeira e pelo carinho.

Aos meus queridos cães Nix e Massari, por representarem uma forma pura e real de amor e por suas lições de lealdade.

A todos que contribuíram para a realização deste trabalho e que torceram por mim, agradeço.

RESUMO

As zeólitas, associadas ou não a outros compostos, são amplamente utilizadas em vários campos da ciência, inclusive em medicina veterinária, como adsorventes, agentes coagulantes e antimicrobianos, entre outras aplicações. No entanto, não é possível encontrar registros de seu emprego na área de dermatologia de pequenos animais. Diante dos dados observados na literatura, objetivou-se, neste trabalho, verificar as propriedades da clinoptilolita, incorporada em gel, associada ou não aos íons de prata e zinco e ao antimicrobiano enrofloxacino, por meio de testes “*in vitro*”. O estudo foi composto de três etapas, sendo a primeira o preparo dos produtos; as demais visaram o teste de uma propriedade específica do medicamento. Foram manipulados 16 tipos de géis, com três concentrações de clinoptilolita (5%, 10% e 20%), associados ou não com sais de prata / zinco e/ou enrofloxacino. Na segunda etapa, confrontou-se um possível aumento de temperatura causado pela zeólita quando, em contato com a pele, relatado por outros pesquisadores. Para isso, foram utilizadas peças anatômicas de suínos (antebraço), cuja temperatura intradérmica foi monitorada com termômetro desde o momento inicial (zero - antes da aplicação dos produtos), até o momento 15 (15 minutos após a aplicação dos produtos), registrando, dessa forma, a temperatura a cada minuto. As peças foram mantidas em temperatura ambiente, que também foi monitorada nos mesmos períodos de tempo. No terceiro experimento, a eficácia antimicrobiana dos tratamentos foi testada contra dois micro-organismos de alta relevância clínica na área de dermatologia veterinária: *Staphylococcus intermedius* e *Pseudomonas aeruginosa*. Os compostos dos géis foram incorporados ao ágar Müeller-Hinton e depositados em placas de Petri. As bactérias foram inoculadas pelo método de superfície e incubadas a 37°C, por 24 horas. Após o período de incubação, foi avaliada a ocorrência de inibição ou não de crescimento. Na avaliação termométrica, não houve aumento da temperatura intradérmica significativo nos diferentes momentos e concentrações do produto. Os dados foram comparados por análise de variância, pelo teste de Kruskal-Wallis, com 5% de significância. Na avaliação microbiológica, observou-se que todas as preparações contendo prata e zinco e/ou enrofloxacino inibiram o crescimento de ambos os micro-organismos testados, confirmando o grande potencial da utilização do medicamento na área em questão. A partir dos resultados promissores, os pesquisadores sugerem a realização dos testes “*in vivo*”, dando continuidade à gênese de um novo recurso de tratamento de feridas ulceradas e piodermites na dermatologia de pequenos animais, e a realização de testes para outras áreas da clínica veterinária.

Palavras-chave: Clinoptilolita. Prata. Zinco. Enrofloxacino. Temperatura. Ação antimicrobiana.

ABSTRACT

Zeolites, associated or not to other compounds, are widely used in many science fields, including in veterinary, as adsorbents, clotting agents and antimicrobials, among other applications. However, it's not possible to find data of its use in small animals' dermatology. Based on literature data, in this study was aimed to verify the properties of clinoptilolite, incorporated in gel, associated or not to silver and zinc ions and to the antimicrobial enrofloxacin with *in vitro* trials. The study was made in three stages. The first was the preparation of the products; in the others stages, each specific property of the medicine was tested. Sixteen types of gel were made, with three different concentrations of clinoptilolite (5%, 10% and 20%), associated or not with silver / zinc salts and/or enrofloxacin. In the second stage, a possible temperature increase caused by the contact of the zeolite with the skin was tested as reported by other researchers. For that, anatomical parts of swine (forearms) were used. Their temperature was measured with the same thermometer since the initial moment (zero – before the products' application) until the moment 15 (15 minutes after the products' application), registering, this way, the temperature in each minute. The anatomical parts were kept in room temperature and also monitored in the same periods of time. In the third trial, the treatments' antimicrobial effectiveness was tested against two microorganisms of high clinical relevance in veterinary dermatology: *Staphylococcus intermedius* and *Pseudomonas aeruginosa*. The gel compounds were incorporated to Müeller Hinton agar and poured in Petri dishes. The bacteria were inoculated with the surface method and incubated in 98.6F at 24 hours. After this incubation period, the occurrence of growth inhibition or not was evaluated. In the thermometric evaluation, there wasn't any significant increase of the intradermal temperature in the different moments and concentrations. The data was compared by Kruskal-Wallis test, with 5% of significance. In the microbiological evaluation, it was observed that all the compositions containing silver and zinc and/or enrofloxacin inhibited both of the tested microorganisms' growth, confirming the great potential of the medicine's use in the area. From the promising results, the researchers suggest the implementation of *in vivo* trials, continuing the creation process of a new resource in the treatment of ulcerated wounds and pyoderma in small animals' dermatology and the implementation of trials to other areas of veterinary clinics.

Key-words: Clinoptilolite. Silver. Zinc. Enrofloxacin. Temperature. Antimicrobial action.

ZUSAMMENFASSUNG

Zeolithe, verbunden oder nicht auf andere Verbindungen, werden in vielen wissenschaftlichen Bereichen eingesetzt, darunter in der Veterinärmedizin, als Adsorbentien, Gerinnungswirkstoffe und Antibiotika, unter anderen Anwendungen. Allerdings ist es nicht möglich, Daten von ihrem Einsatz in kleinen Tieren Dermatologie finden. Basierend auf Daten aus der Literatur wurde in dieser Studie das Ziel, die Eigenschaften von Klinoptilolith, in Gel eingearbeitet, verbunden oder nicht, Silber- und Zink-Ionen und dem Antibiotikum Enrofloxacin mit in-vitro-Studien zu überprüfen. Die Studie wurde in drei Stufen. Die erste war die Herstellung der Produkte, bei den anderen Stufen, die jeweils spezifische Eigenschaft der Medizin getestet wurde. Sechzehn Arten von Gel wurden mit drei verschiedenen Konzentrationen von Klinoptilolith (5%, 10% und 20%), verbunden oder nicht mit Silber / Zink-Salze und / oder Enrofloxacin. In der zweiten Stufe eine mögliche Temperaturerhöhung durch den Kontakt des Zeoliths mit der Haut getestet wurde, wie von anderen Forschern berichtet verursacht. Dafür wurden anatomische Teile von Schweinen (Unterarme) verwendet. Bis zu dem Moment 15 (15 Minuten nach dem Produkte-Anwendung), Registrierung, auf diese Weise die Temperatur in jeder Minute - ihre Temperatur wurde mit dem gleichen-Thermometer seit dem ersten Moment (Null - vor dem Produkte-Anwendung) gemessen. Die anatomische Teile wurden in Raumtemperatur gehalten und auch in der gleichen Zeit überwacht. In der dritten Studie wurde die Behandlung antimikrobielle Wirksamkeit gegen zwei Mikroorganismen hoher klinischer Relevanz in der Veterinär Dermatologie getestet: *Staphylococcus intermedius* und *Pseudomonas aeruginosa*. Das Gel Verbindungen wurden Mueller-Hinton Agar aufgenommen und goss in Petrischalen. Die Bakterien wurden mit der Oberfläche Methode inokuliert und in 37°C, für 24 Stunden. Nach dieser Inkubationszeit wurde das Auftreten von Wachstumshemmung oder nicht ausgewertet. In der thermometrische Bewertung, es gab keine signifikante Erhöhung der intradermale Temperatur in den verschiedenen Momenten und Konzentrationen. Die Daten wurden von Kruskal-Wallis-Test verglichen mit 5% von Bedeutung. In der mikrobiologischen Auswertung wurde festgestellt, dass alle Zusammensetzungen mit Silber- und Zink- und / oder Enrofloxacin sowohl der getesteten Mikroorganismen das Wachstum gehemmt, bestätigt das große Potenzial des Medikaments die Nutzung in der Region. Von der viel versprechende Ergebnisse, empfehlen die Forscher die Umsetzung von *in vivo*-Studien.

Schlüsselwörter: Klinoptilolith. Silber. Zink. Enrofloxacin. Temperatur. Antimikrobielle Wirkung.

RESUMEN

Zeolitas, asociadas o no a otros compuestos, son ampliamente utilizados en muchos campos de la ciencia, incluso en veterinaria, como adsorbentes, agentes coagulantes y los antimicrobianos, entre otras aplicaciones. Sin embargo, no es posible encontrar los datos de su uso en dermatología de pequeños animales. Sobre la base de datos de la literatura, en este estudio tuvo como propósito verificar que las propiedades de la clinoptilolita, incorporada en gel, asociada o no a la plata y los iones de zinc y lo enrofloxacino con antibióticos en los ensayos *in vitro*. El estudio se realizó en tres etapas. La primera fue la elaboración de los productos, en las etapas de los demás, cada propiedad específica de la medicina se puso a prueba. Dieciséis tipos de gel se realizaron, con tres diferentes concentraciones de clinoptilolita (5%, 10% y 20%), asociada o no a las sales de plata / zinc y / o enrofloxacino. En la segunda etapa, un aumento de temperatura causado por el contacto de la zeolita con la piel ha sido probado según lo informado por otros investigadores. Para ello, las partes anatómicas de la especie porcina (antebrazos) se utilizaron. Su temperatura se midió con el termómetro mismo desde el momento inicial (cero - antes de la aplicación de producto) hasta el momento 15 (15 minutos después de la aplicación de producto), su registro, de esta manera, la temperatura en cada minuto. Las piezas anatómicas se mantuvieron a temperatura ambiente y también se controla en los mismos períodos de tiempo. En el tercer ensayo, la eficacia de los tratamientos antimicrobianos se puso a prueba en contra de dos microorganismos de relevancia clínica en dermatología veterinaria: *Staphylococcus intermedius* y *Pseudomonas aeruginosa*. Los compuestos de gel se incorporaron al agar Mueller Hinton y se vierte en placas de Petri. Las bacterias se inocularon con el método de la superficie y se incubó a 37°C, durante 24 horas. Después de este período de incubación, la incidencia de la inhibición del crecimiento o no fue evaluado. En la evaluación termométrica, no hubo un aumento significativo de la temperatura intradérmica en los diferentes momentos y concentraciones. Los datos fueron comparados por Kruskal-Wallis, con un 5% de significación. En la evaluación microbiológica, se observó que todas las composiciones que contienen plata y zinc y / o enrofloxacino inhibe tanto el crecimiento de los microorganismos ensayados, lo que confirma el gran potencial de uso del medicamento en el área. De los resultados prometedor, los investigadores sugieren la aplicación de juicios *in vivo*.

Palabras clave: Clinoptilolita. Plata. Zinc. Enrofloxacino. Temperatura. Acción antimicrobiana.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Géis armazenados em frascos de polietileno e embalados para estocagem	37
Figura 2	Peças anatômicas de suínos (membro anterior) utilizadas para avaliação termométrica dos géis	39
Figura 3	Termômetro utilizado para mensuração da temperatura ambiental	39
Figura 4	Termômetro digital utilizado para mensurar a temperatura das peças anatômicas	40
Figura 5	Aplicação do produto com <i>swab</i> estéril e utilização de gabarito para demarcação da área de espalhamento do produto.....	41
Figura 6	Sensor do cronômetro em posição intradérmica, logo abaixo do centro de espalhamento do produto	42
Figura 7	Espalhamento restrito do gel em área estabelecida pelo gabarito.....	42
Figura 8	Momento de realização de leitura termométrica intradérmica com auxílio de cronômetro digital	43
Figura 9	Placa de Petri com Ágar Müller-Hinton referente ao Tratamento 7	45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Medidas descritivas (média e desvio padrão) e resultado do teste de Kruskal-Wallis para variável “temperatura da peça”, com nível de significância de 5%	50
Tabela 2	Medidas descritivas (média e desvio padrão) e resultado do teste de Kruskal-Wallis para variável “temperatura do ambiente”, com nível de significância de 5%	50

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Composição dos géis testados e denominação dos tratamentos	36
Quadro 2	Crescimento macroscópico de cepas bacterianas testadas frente aos géis após 24 horas de incubação em ágar Müller-Hinton	51

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1	Amplitudes médias das temperaturas subcutâneas de peças anatômicas de membros de suínos tratadas com diferentes concentrações de géis	49
-----------	---	----

LISTA DE ABREVIATURAS

p. – página

v/v – volume / volume

LISTA DE SIGLAS

ACS – Advanced Clotting Sponge
ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CTC – capacidade de troca catiônica
DMV – Departamento de Medicina Veterinária
FDA – Food and Drug Administration
INMETRO – Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia
LTA – Linde Type A
LTX – Linde Type X
LTY – Linde Type Y
NS – não significativo
PABA – ácido paraminobenzoico
UFLA – Universidade Federal de Lavras

LISTA DE SÍMBOLOS

% - porcentagem
O – oxigênio
Si – silício
Al – alumínio
B – boro
Fe – ferro
P – fósforo
Co – cobalto
Å – angstrom (s)
°C – graus Celsius
g – grama (s)
g/kg – grama (s) por quilograma (s)
kg – quilograma (s)
® - marca registrada
ppb – partes por bilhão
Na – sódio
K – potássio
H₂O – água
H – hidrogênio
µm – micrômetro (s)
NaCl – cloreto de sódio
Ag – prata
NO₃ – nitrato
L – litro (s)
Zn – zinco
Cl – cloro
cm – centímetro (s)
cm² – centímetro (s) quadrado (s)
mL – mililitro (s)
µL – microlitro (s)
n – tempo em minutos
mm – milímetros

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	20
2	REFERENCIAL TEÓRICO	21
2.1	Histórico e tipos de zeólitas	21
2.2	Zeólitas e sua estrutura	22
2.3	Aplicações gerais das zeólitas	24
2.4	Aplicações das zeólitas nas ciências animais	25
2.5	Propriedade hemostática das zeólitas e sua aplicação	27
2.6	Propriedade antimicrobiana das zeólitas associadas à prata, zinco e antimicrobianos e suas aplicações	32
2.7	Justificativa para a escolha do antimicrobiano enrofloxacino e os micro-organismos testados: <i>Staphylococcus intermedius</i> e <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	33
3	MATERIAL E MÉTODOS	35
3.1	Preparo dos compostos de géis	35
3.2	Verificação de propriedades exotérmicas dos tratamentos ..	38
3.2.1	Base física da investigação	38
3.2.2	Material	38
3.2.3	Método	41
3.3	Verificação de propriedades antibacterianas dos tratamentos	43
3.3.1	Base física da investigação	43
3.3.2	Material	43
3.3.3	Método	44
3.4	Verificação de propriedades coagulantes dos tratamentos ...	46
3.4.1	Base física da investigação	46
3.4.2	Material	46
3.4.3	Método	46
3.5	Análise estatística	47
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
4.1	Propriedade exotérmica	47
4.2	Propriedade antimicrobiana	51
4.3	Propriedade coagulante	52
5	CONCLUSÃO	53
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	53
	REFERÊNCIAS	56

1 INTRODUÇÃO

As zeólitas são cerâmicas inorgânicas com alto poder de adsorção, especialmente em razão das suas características moleculares. A aplicação desses minerais é ampla em diversos setores industriais, como na engenharia, na metalurgia e na nutrição. Em medicina humana, as zeólitas são utilizadas comercialmente como substâncias anti-hemorragicas (principalmente para combatentes feridos), com um produto comercial registrado no mercado americano.

Além das aplicações em emergências hemorrágicas, as zeólitas também possuem capacidade adsorptiva de toxinas e vírus; já, quando associadas a outros compostos, exercem alta capacidade antibacteriana. Essas propriedades ainda são pouco exploradas, principalmente em função da intensa reação exotérmica de alguns desses compostos minerais ou mesmo do dano térmico aos tecidos quando na forma de pós.

A aplicação das zeólitas em medicina veterinária se restringe à área nutricional, como adsorventes de toxinas e controladora do crescimento microbiano gastrintérico. Na área dermatológica, nada se tem sobre sua real eficácia, especialmente nas feridas ulceradas, que possuem como característica a alta carga microbiana e grande concentração de toxinas tissulares e/ou bacterianas.

No presente trabalho, buscou-se avaliar as propriedades exotérmicas e antimicrobianas de géis compostos por três concentrações da zeólita clinoptilolita (5%, 10% e 20%), associados ou não com sais de prata / zinco e um antimicrobiano da classe das fluorquinolonas de segunda geração (enrofloxacino), tentando-se estabelecer uma formulação tópica dermatológica a ser utilizada em animais.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Histórico e tipos de zeólitas

Segundo Mumpton e Fishman (1977), as zeólitas foram descobertas em 1756, por Baron Axel Fredrick Cronstedt, um mineralogista sueco, que as nomeou a partir de palavras gregas, que significavam “pedras ferventes”. O termo foi aplicado a partir da observação de que, após o aquecimento rápido, as pedras começavam a saltitar à medida que a água se evaporava (MAIA, 2008).

No final da década de 1940, surgiram as primeiras zeólitas sintéticas (primordialmente a modernita). Em seguida, veio a produção comercial das zeólitas A ou LTA (“Linde Type A”, referente a “Linde Division” da organização Union Carbide), X (“Linde Type X”) e Y (“Linde Type Y”) (BRAGA; MORGON, 2007). Em 1962, as faujazitas sintéticas (X e Y) foram introduzidas, em escala industrial, para catalisarem o craqueamento do óleo cru (BRAGA; MORGON, 2007).

No final da década de 50, já havia mais de 2.000 ocorrências distintas de zeólitas naturais, descobertas em mais de 40 países. Dessa forma, foi possível que esses minerais fossem utilizados em diversas áreas industriais, que exploravam suas propriedades físico-químicas (SHINZATO, 2007).

A grande explosão ocorreu nas décadas de 1980 e 1990, com o desenvolvimento de espécies com microporos polimórficos baseados em aluminofosfatos e metalosílica (BRAGA; MORGON, 2007). No final da década de 1980, já se conheciam mais de 10.000 patentes relacionadas com a síntese das zeólitas (LUZ, 1995).

As zeólitas naturais se formam em locais onde cinza e rochas vulcânicas reagem com água alcalina (MAIA, 2008). Elas possuem menor custo de produção e são relativamente abundantes. Locais comercialmente explorados

nos Estados Unidos, Cuba, Hungria, Bulgária, Japão, Eslováquia, África do Sul, Itália, Rússia, Indonésia e Coreia, em geral, têm conteúdo zeolítico maior que 60%, podendo alcançar até 90%. A China é o maior produtor e também consumidor do mineral (RESENDE; MONTE; PAIVA, 2008).

A vantagem das zeólitas sintéticas é apresentar uniformidade no tamanho e forma dos canais, além de composição química pré-definida, evitando possíveis impurezas e variações dentro de um mesmo lote ou em lotes diferentes, em função dos fins a que se destinam. Considerando, entretanto, seu elevado custo, as zeólitas sintéticas são reservadas a aplicações que exigem características mais uniformes de estrutura e composição, como nos processos de catálise de hidrocarbonetos e na indústria de detergentes (BRAGA; MORGON, 2007; RESENDE; MONTE; PAIVA, 2008).

2.2 Zeólitas e sua estrutura

A definição atual de zeólita é toda substância cristalina com estrutura caracterizada por um arcabouço de tetraedros interligados, do tipo TO_4 ($T = Si, Al, B, Fe, P, Co$), unidos nos vértices por meio de átomos de oxigênio (MAIA, 2008), tendo uma estrutura infinita, aberta e tridimensional (MUMPTON, 1999, p. 3463). São caracterizadas pela habilidade de perder e ganhar água de forma reversível e trocar cátions constituintes, sem alterar sua estrutura de maneira significativa (MUMPTON; FISHMAN, 1977).

O arcabouço das zeólitas contém cavidades abertas, na forma de canais e “gaiolas”, normalmente ocupadas por moléculas de água e cátions extra-arcabouço, ou seja, cada tetraedro envolve um cátion (RESENDE; MONTE; PAIVA, 2008). As moléculas de água formam esferas de hidratação em torno dos cátions permutáveis (MUMPTON, 1999).

Com sua estrutura aberta, esses minerais podem acomodar uma grande variedade de íons positivos (como, por exemplo, sódio, potássio, cálcio e magnésio). Esses íons apresentam-se fracamente ligados à estrutura, podendo ser prontamente substituídos por outros da solução em contato. Essa capacidade é chamada de capacidade de troca catiônica (CTC) (MAIA, 2008).

A CTC é uma medida do número de cátions, por unidade de peso, disponíveis para troca por outros cátions, expressa em miliequivalentes por 100 gramas de material (RESENDE; MONTE; PAIVA, 2008). É decorrente da sua alta CTC que as zeólitas podem ser usadas na nutrição animal como agentes carreadores de micotoxinas e íons que poderiam causar problemas de intoxicação em animais em decorrência do excesso na dieta (MAIA, 2008).

A característica adsorptiva das zeólitas ocorre em razão da estrutura formada pelos pequenos poros, de cerca de 5Å de diâmetro (BRAGA; MORGON, 2007), que podem variar de 3 a 10Å (SHINZATO, 2007). Essa estrutura microporosa confere às zeólitas uma superfície interna muito grande, quando comparada à sua estrutura externa (MAIA, 2008).

O termo *peneira molecular* é adotado porque se sabe que moléculas muito grandes, ao passar pelos canais de entrada, são excluídas, permanecendo no exterior; as de tamanho compatível com a estrutura do poro conseguem entrar, ou seja, sua natureza microporosa permite a adsorção seletiva de moléculas e íons iguais ou menores em tamanho que a abertura dos poros (BRAGA; MORGON, 2007). Os canais têm dimensões suficientes para permitir a passagem de elementos selecionados (RESENDE; MONTE; PAIVA, 2008).

Quando ocorre aquecimento a 300 a 400°C por poucas horas, a água é removida e moléculas que têm o diâmetro efetivo pequeno o suficiente para passar pelos canais de entrada são prontamente adsorvidas para as superfícies internas das cavidades centrais desidratadas (MUMPTON; FISHMAN, 1977; MUMPTON, 1999; TOP, 2001).

O tamanho do poro corresponde à estrutura bidimensional da zeólita e é determinado pelo número de átomos tetraédricos ligados em sequência. As interações tridimensionais levam a diferentes geometrias, formando desde grandes cavidades internas até uma série de canais que atravessam todo o zeólita. Existe flexibilidade na formação de zeólitas de acordo com a aplicação de interesse, promovendo-se o controle seletivo da passagem de certas moléculas de acordo com suas formas e polaridades, originando um vasto campo de interesse comercial na aplicação dessas peneiras moleculares (BRAGA; MORGON, 2007).

2.3 Aplicações gerais das zeólitas

Diversos autores citam a aplicação das zeólitas nos mais variados campos. Mumpton (1999) citou a importância das zeólitas na engenharia civil, com destaque no dimensionamento de rochas e como componente de cimento e concreto. Esse pesquisador aponta, também, a aplicação desses minerais no tratamento da água e seus efluentes, na purificação de gases hidrocarbonetos, na agricultura, na nutrição e saúde animal, na horticultura e no tratamento de resíduos hídricos da criação de animais. É ressaltado, ainda, o emprego das zeólitas em produtos, como desodorantes e, por fim, sua aplicação médica.

Mumpton (1999) já escrevia sobre a importância das zeólitas na preparação de catalisadores para o refinamento de petróleo. Atualmente, estima-se que sem a utilização das zeólitas, o custo do refinamento do petróleo aumentaria cerca de 10 bilhões de dólares por ano (BRAGA; MORGON, 2007).

Em decorrência das suas propriedades únicas de adsorção e troca iônica, as zeólitas naturais, especialmente a clinoptilolita, têm uma ampla variedade de aplicações no tratamento de resíduos animais, incluindo o controle de odores, para criar um ambiente mais saudável para criações em confinamento, limpeza

de efluentes e controle da viscosidade e retenção de nutrientes no estrume de animais (ÖTKER; BALCIOGLU, 2005).

Cai et al. (2007) relataram o potencial da zeólita natural clinoptilolita para controlar íons de amônia nos efluentes. Eles verificaram que sua aplicação direta no estrume mostrou ser mais eficiente em reduzir as emissões de amônia; no entanto, constataram a adição por meio do alimento como uma aplicação mais prática.

Chrétien, Heafey e Scaiano (2010) trabalharam com o filtro solar supramolecular, no qual o oxibenzônio, substância de uso frequente na composição de filtros solares por suas propriedades de barreira dos raios ultravioleta, porém comumente causadora de reações alérgicas em seres humanos, foi encapsulada por zeólitas, evitando que a substância tivesse contato com a pele e preservando sua eficiência como barreira. O mesmo já havia sido feito por Chrétien, Migahed e Scaiano (2006), encapsulando o ácido paraminobenzoico (PABA) e alcançando os mesmos objetivos.

2.4 Aplicações das zeólitas nas ciências animais

As zeólitas são utilizadas na nutrição animal desde a década de 1960, visando à melhora do desempenho dos animais ou como ligante de toxinas para a prevenção de micotoxicoses e melhorar o ambiente de galpões de aves por meio da adsorção da amônia (DEDOUSSI et al., 2008).

Desde 1971, Mumpton e Fishman (1977) já vislumbravam que as propriedades de adsorção e troca iônica das zeólitas poderiam ser exploradas para tornar o uso do nitrogênio alimentar mais eficiente, diminuir doenças intestinais prevalentes em suínos e ruminantes jovens, controlar a umidade e quantidade de amônia no estrume dos animais, purificar águas utilizadas na

aquacultura e prover ar enriquecido com oxigênio para a respiração e o transporte de peixes, atualmente utilizado com frequência.

Prvuloviae et al. (2009) provaram que a adição de aluminossilicatos hidratados à dieta de animais, em taxas entre 5 a 50g/kg resultou em melhora no crescimento e utilização do alimento e redução na incidência e gravidade de diarreias.

Em experimentos nutricionais com suínos, Trckova et al. (2004) verificaram que a administração concomitante de clinoptilolita e antimicrobianos (enrofloxacino e salinomicina) resultou em formas menos graves de síndrome diarreica pós-desmame, com curso clínico mais curto, mortalidade diminuída no período de desmama e efeito positivo no ganho de peso em fase de engorda.

Segundo Maia (2008), as zeólitas absorveram o excesso de água no trato gastrointestinal e adsorveram toxinas, que são responsáveis pela hipersecreção de água e eletrólitos no lúmen intestinal, aumentando a matéria seca das fezes e reduzindo a incidência de diarreia nos animais. Sua alta porosidade permite absorver água em quantidades de 10 a 50% do seu volume (MAIA, 2008).

As zeólitas são utilizadas como adsorventes efetivos de agentes tóxicos, particularmente aflatoxinas dos alimentos, minimizando efetivamente seus efeitos adversos sobre o consumo alimentar, desempenho e conversão de nutrientes e reduzindo a concentração de micotoxinas no fígado de animais afetados.

Huwig et al. (2001) verificaram alta efetividade no uso das zeólitas na prevenção das aflatoxicoses, mas relataram eficácia limitada na presença de zearalenona, ocratoxina e tricotecenos.

2.5 Propriedade hemostática das zeólitas e sua aplicação

Em 2002, foi lançado no mercado americano um produto comercial denominado QuikClot[®] (Z-Medica Corporation Wallingford, CT, USA), que tinha suas propriedades hemostáticas primárias derivadas da zeólita. O produto realizava a ativação plaquetária e trabalhava na cascata de coagulação, uma vez que a zeólita específica utilizada continha cálcio, um cofator em vários passos da cascata. Além disso, facilitava um fenômeno amplamente conhecido como o “efeito vidro”, conhecido desde 1800, no qual o sangue coagula mais rápido quando em contato com vidro, uma vez que a carga negativa da superfície do material ativa uma proteína do início da cascata. No caso, a superfície da zeólita realizaria o mesmo efeito, e sua carga de superfície e ponto isoelétrico estabeleceriam uma rápida coagulação e forte formação de coágulos. Todos esses efeitos auxiliavam no estancamento de hemorragias (Z-MEDICA, 2008).

A composição do produto era baseada em minerais que promoviam a formação de coágulos por meio de uma reação exotérmica, resultando em absorção de água e concentração de fatores da coagulação, hemácias e plaquetas (ACHESON et al., 2005), tratando-se de um produto mineral inerte, composto de óxidos de silicone, alumínio, sódio, magnésio e pequenas quantidades de quartzo (RHEE et al., 2008).

O produto foi aprovado pelo Food and Drug Administration (FDA) para uso tópico somente para estancar hemorragias que não podiam ser controladas por medidas convencionais (LI et al., 2009).

Embora fosse efetivo quando aplicado corretamente, ele gerava calor considerável, podendo causar danos térmicos significativos ao tecido. Outra desvantagem era que, pela sua natureza granular, alguns grânulos de zeólita poderiam aderir muito proximamente aos tecidos, fazendo com que sua remoção de feridas profundas fosse difícil e demandasse muito tempo (LI et al., 2009).

Cox et al. (2009) afirmaram que os grânulos produziam uma reação exotérmica significativa e requeriam irrigação e debridamento para removê-los da ferida após a chegada ao hospital.

Li et al. (2009) demonstraram que a substituição de alguns íons cálcio por íons de prata e zinco na zeólita reduziu a reação exotérmica.

O produto adsorvia os componentes aquosos do sangue, mantendo-os no interior dos poros por meio de ligações de pontes de hidrogênio, conseqüentemente, concentrando fatores de coagulação e plaquetas; essa alteração promovia a interrupção do sangramento. Dessa adsorção de água resultaria a reação exotérmica, que poderia provocar lesões no tecido de aplicação e nos adjacentes a ele (ARNAUD et al., 2007).

A reação exotérmica pode anular rapidamente as reações de coagulação, porém pequenos aumentos de temperatura podem ter efeitos benéficos na formação dos coágulos. Outra hipótese é que a reação exotérmica promoveria cauterização dentro de minutos após sua aplicação. De qualquer forma, verificou-se que o aumento de temperatura acima da média fisiológica promovia danos aos tecidos (ARNAUD et al., 2007).

Em um trabalho realizado por Rhee et al. (2008), foram documentados 103 casos nos quais o QuikClot[®] foi utilizado com o objetivo de controlar a hemorragia em seres humanos. A eficácia, em geral, foi de 92%; a principal razão para a ineficiência ocorreu quando o produto não pôde ser aplicado na principal fonte da hemorragia. Apesar de o produto ter sido aprovado somente para uso tópico, existem relatos de 20 casos de uso intracorpóreo, nos quais a hemorragia não conseguia ser controlada, em situações de risco de morte. Nesses casos, houve sucesso no estancamento da hemorragia e nenhum dos pacientes desenvolveu complicações infecciosas.

No entanto, Plurad et al. (2009) observaram uma grande complicação decorrente do uso intracorpóreo do QuikClot[®] em seres humanos. Os

pesquisadores postularam que o calor produzido pela aplicação do produto resultou em necrose coagulativa tecidual e fibrose, levando à estenose e subsequente ruptura ureteral.

Em um relato de caso feito por Shanmugam e Robinson (2009), utilizou-se QuikClot[®] internamente nos tecidos, em uma situação de grande hemorragia pélvica, difícil de ser controlada. Eles relataram que todas as outras medidas para controle da hemorragia falharam e, diante da tentativa de salvar a vida do paciente, os cirurgiões optaram pelo uso do produto, que interrompeu a hemorragia imediatamente. Os pesquisadores afirmaram que os grânulos perdidos de zeólita puderam ser facilmente lavados, e que a lavagem com solução fisiológica os auxiliou na dissipação do calor. Eles ainda sugeriram a colocação desses grânulos em sachês, como forma de evitar que os mesmos ficassem soltos.

Margulis et al. (2005) utilizaram o QuikClot[®] durante um procedimento de nefrectomia parcial laparoscópica em suínos, com o objetivo de interromper o sangramento do parênquima renal e verificaram que nenhum procedimento hemostático adicional foi necessário. Na análise histopatológica, foi verificada a preservação do parênquima renal imediatamente abaixo da camada de aplicação e nenhum efeito deletério foi observado nesse tecido ou em órgãos próximos.

Wright et al. (2004) testaram o produto em suínos e verificaram que as feridas de pele nas quais o produto foi aplicado não foram completamente curadas em 30 dias, ocorrendo a formação de granulomas. Após aplicação no fígado e baço, verificou-se que as lesões hepáticas e esplênicas estavam espessamente revestidas por cicatrizes e tecido de granulação. Além disso, a aplicação causou um grande dano térmico, resultando em necrose dos tecidos.

Alam et al. (2004) propuseram o modelo experimental em suínos, com o objetivo de avaliar os produtos comerciais anti-hemorrágicos quanto à taxa de sobrevivência, perda sanguínea e quantificação da reação exotérmica. Após a

realização de ferida cirúrgica que ocasionou uma hemorragia abundante, os pesquisadores verificaram uma taxa de sobrevivência de 100% com o uso do QuikClot[®], porém encontraram temperaturas de até 57°C após a aplicação do produto.

No estudo de Arnaud et al. (2007), utilizando o modelo experimental de suínos proposto por Alam et al. (2004), com o objetivo de aferir tais elevações de temperatura, o pico de aumento de temperatura ocorreu um a dois minutos após sua aplicação, com o produto original em pó atingindo temperaturas médias de 58,1°C, diminuindo para 40°C após 60 minutos.

A primeira geração do QuikClot[®] foi retirada do mercado americano em 2008, sendo substituída pela segunda geração dos produtos (Z-MEDICA, 2012).

Arnaud et al. (2007) compararam a primeira e a segunda geração do QuikClot[®], o ACS[®] (Advanced Clotting Sponge), de mesma composição, porém empacotada em bolsas de malha para facilitar sua aplicação e remoção. Utilizando o modelo experimental proposto por Alam et al. (2004), ele apresentou a mesma eficácia no estancamento sanguíneo, mas com a mesma reação exotérmica indesejável, com temperaturas médias de 58,2°C. Arnaud et al. (2008), também seguindo o modelo experimental em suínos proposto por Alam et al. (2004), encontraram temperaturas de até 72°C com a utilização do ACS[®]. Alam et al. (2004) verificaram uma diminuição na eficácia do produto empacotado, com uma maior perda sanguínea e menor taxa de sobrevivência nos animais tratados com a zeólita empacotada. Os pesquisadores sugeriram a realização de estudos utilizando pacotes mais finos para tentar resolver esse problema.

Foi verificado que em contato com excesso de sangue (isto é, sangue não retirado da ferida), a reação exotérmica do ACS[®] foi relativamente atenuada quando comparada com o uso do mesmo na presença de umidade relativamente baixa (tanto sangue quanto tecidos moles úmidos e hidratados) (ARNAUD et al.,

2008). Os pesquisadores afirmaram que esse efeito depende de uma série de fatores, como área de superfície, porosidade e umidade residual dos grânulos utilizados (ARNAUD et al., 2007).

O produto foi reformulado como QuikClot ACS+[®], com a substância mineral inerte revestida por uma esponja, desta forma mantendo os grânulos fora da ferida. No entanto, o novo produto continuou gerando altas temperaturas (58°C), quando colocado em feridas (COX et al., 2009).

Arnaud et al. (2008) demonstraram que o ACS+[®] apresentou a mesma eficiência em estancamento de sangue que o ACS[®], porém com reduzida reação exotérmica quando em contato com feridas similares. O ACS+[®] causou aumento de temperatura entre 1,5 e 6,5°C, que durou menos do que 30 minutos; assim, o dano tecidual degenerativo em decorrência das queimaduras previamente observadas com o ACS[®], não foi detectado no ACS+[®], confirmando-se esse fato por exames histológicos.

O produto ACS+[®] ainda é utilizado por soldados e é vendido em mais de 20 países atualmente (Z-MEDICA, 2012).

Nessa segunda geração, também foi desenvolvido um produto destinado para o uso em civis, o QuikClot Sport[®], para uso de esportistas, com uma versão contendo sais de prata, visando à atividade antimicrobiana em feridas. O produto ainda é comercializado em lojas especializadas (Z-MEDICA, 2012).

Atualmente, a linha de produtos foi reformulada, e conta com diversas opções destinadas para militares, civis, animais e modalidades a serem empregadas em diversas áreas da saúde humana (cardiologia, dermatologia, radiologia, entre outras). A zeólita, componente chave dos produtos anteriores, foi substituída por produtos à base de caulim. A linha VetClot[®], é destinada ao controle da hemorragia em feridas traumáticas em animais de pequeno e grande porte. A linha militar conta também com uma bandagem embebida em caulim (Z-MEDICA, 2012).

2.6 Propriedade antimicrobiana das zeólitas associadas à prata, zinco e antimicrobianos e suas aplicações

Metais como prata e zinco possuem propriedades antimicrobianas de amplo espectro e sabe-se que a associação desses metais com as zeólitas prolonga seu efeito antimicrobiano (EGGER et al., 2009).

Os efeitos antimicrobianos dos íons de prata foram intensivamente estudados, porém o mecanismo de ação inibitório da prata sobre os microorganismos ainda não foi completamente compreendido. Foi proposta uma possibilidade na qual os íons de prata interagem com grupos dissulfeto e sulfidrila das enzimas, causando mudanças estruturais que levam à interrupção de processos metabólicos, seguida pela morte das células (EGGER et al., 2009).

Segundo Casemiro et al. (2008), cátions antimicrobianos, como a prata e o zinco, podem ser alojados dentro dos espaços vazios das zeólitas, e serem trocados, com o tempo, com outros cátions de seu ambiente. Neste trabalho, eles verificaram a atividade antimicrobiana bem sucedida das zeólitas associadas com prata e zinco contra a levedura *Candida albicans*.

A prata integrada à zeólita possui efeitos antimicrobianos em longo prazo contra inúmeros microorganismos, liberando, de forma contínua, pequenas quantidades (cerca de 10ppb) de íons de prata dentro da água. A zeólita age como uma bomba de íons, fornecendo a liberação de íons de prata controlada pelo tempo, na presença de umidade. Conforme a umidade aumenta e o ambiente se torna ideal para o crescimento de bactérias, mais prata é liberada. No entanto, há um limite máximo para essa taxa de liberação, mesmo sob condições de grande umidade (ABE et al., 2004).

Galeano, Korff e Nicholson (2003) utilizaram uma preparação de prata, zinco e zeólita em materiais de aço inoxidável, verificando a inativação de células vegetativas de *Bacillus anthracis*, *B. cereus* e *B. subtilis*, em condições

laboratoriais. Com a mesma preparação, Cowan et al. (2003) verificaram a eficiência antimicrobiana contra *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Listeria monocytogenes* em aço inoxidável.

Segundo Dedoussi et al. (2008), as zeólitas naturais têm sido aceitas como materiais promissores para a imobilização de microorganismos, em razão da sua grande porosidade e área de superfície. Em um estudo *in vitro* realizado por Ramu et al. (1997), demonstrou-se que a clinoptilolita pode adsorver a toxina da cólera e a enterotoxina termolábil de *Escherichia coli*. Clark et al. (1998) também provaram que a clinoptilolita tem excelente capacidade de adsorver o *Rotavirus* e *Coronavirus* bovino *in vitro*.

Kwakye-Awuah et al. (2007), em um estudo visando a avaliar a ação antimicrobiana da zeólita X associada à prata contra *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*, verificaram que nenhuma atividade bacteriana foi observada no tratamento com zeólita X sem a incorporação de íons de prata. Os íons de prata liberados pela zeólita é que foram responsáveis pela ação antimicrobiana contra todos os três microorganismos, sugerindo, novamente, que a zeólita X foi responsável somente pela liberação lenta e constante dos íons de prata, não possuindo ação antibacteriana quando isolada.

2.7 Justificativa para a escolha do antimicrobiano enrofloxacino e os microorganismos testados: *Staphylococcus intermedius* e *Pseudomonas aeruginosa*

As fluorquinolonas são um amplo grupo de agentes antibacterianos sintéticos, que têm grande aceitação tanto na medicina humana, quanto na medicina veterinária. São antimicrobianos bactericidas, agindo contra uma grande variedade de micro-organismos, pela sua capacidade de interferir no espiralamento do material cromossômico bacteriano (IHRKE; PAPICH;

DENANUELLE, 1999). Todas as fluorquinolonas são bactericidas e agem no mesmo sítio bacteriano: a DNA girase bacteriana (topoisomerase tipo II). As topoisomerasas catalisam a direção e extensão do espiralamento das cadeias de DNA. Essa enzima tem papel crucial em separar, cortar e desenrolar o DNA. A inibição do enrolamento da hélice de DNA fornece fragmentos, que depois são destruídos pelas exonucleases bacterianas (VANCUTSEM; BABISH; SHWARK, 1990).

A introdução das fluorquinolonas, como o enrofloxacino, há mais de 20 anos, ofereceu aos clínicos uma variedade de agentes antimicrobianos com atividade de amplo espectro. O enrofloxacino, da segunda geração de fluorquinolonas possui grande atividade antibacteriana não somente contra bactérias gram-negativas, mas também atividade contra algumas bactérias gram-positivas (RIBEIRO; LOPES; GAMEIRO, 2011). Segundo Vancutsem, Babisch e Shwark (1990), na década de 80, pesquisas a partir das primeiras quinolonas originaram as quinolonas de segunda geração, ou fluorquinolonas. A adição de uma molécula de flúor na posição seis de estrutura básica da quinolona e a substituição do anel de piperazina, na posição sete, aumentaram a atividade antibacteriana da quinolona, ganhando efetividade contra *Pseudomonas aeruginosa*, cocos gram-positivos, aumentando a extensão da absorção oral da droga e distribuição tecidual.

Culturas puras de *Staphylococcus intermedius* crescem da maioria das amostras retiradas de cães com piodermites. Normalmente, quando bactérias gram-negativas como *Proteus*, *Pseudomonas*, ou *Escherichia coli* são encontradas em piodermites, é porque cresceram juntamente com o *S. intermedius* e acredita-se que a condição dermatológica causada por esse micro-organismo cria um microambiente propício à invasão bacteriana secundária (IHRKE; PAPICH; DEMANUELLE, 1999).

Fluorquinolonas, como o enrofloxacino, são altamente efetivas no

controle de piodermites caninas, uma vez que possuem boa atividade contra *S. intermedius*, responsável pela maioria das piodermites em cães (IHRKE; PAPICH; DEMANUELLE, 1999). Ihrke, Papich e Demanuelle (1999) afirmam que a concentração inibitória mínima do enrofloxacino para *Staphylococcus intermedius* é de $0,125 \mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$.

Segundo Metry et al. (2011), o enrofloxacino possui atividade antimicrobiana contra a bactéria gram-negativa *Pseudomonas aeruginosa*. Ihrke, Papisch e Demanuelle (1999) afirmam que a concentração inibitória mínima do antimicrobiano para *P. aeruginosa* é de $2\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Como delineamento geral, esta pesquisa constou de quatro fases (ensaios *in vitro*):

- A) Preparo dos compostos de géis.
- B) Verificação de propriedades exotérmicas.
- C) Verificação de propriedades antibacterianas.
- D) Verificação de propriedades coagulantes.

3.1 Preparo dos compostos de géis

A zeólita escolhida para o teste foi a clinoptilolita - $(\text{Na}_4 \text{K}_4) (\text{Al}_8 \text{Si}_{40} \text{O}_{96}) \cdot 24 \text{H}_2\text{O}$ - na forma de pó (partículas menores que $150\mu\text{m}$).

Na formulação do gel, foi utilizado como veículo a hidroxietilcelulose (Natrozol® - Hercules Inc., Aqualon Division, USA), um gel não-iônico inerte e aprovado para uso dermatológico pelo FDA.

A incorporação dos ativos no gel foi feita em farmácia de manipulação devidamente autorizada pela Vigilância Sanitária Municipal, visando às boas práticas de manejo sugeridas pelo Ministério da Saúde/ANVISA.

Foram manipulados 16 tratamentos, constituídos da zeólita clinoptilolita, variando nas concentrações de 0%, 5%, 10% e 20%, associada ou não à prata e ao zinco e/ou ao antimicrobiano enrofloxacino, em concentrações constantes, conforme indicado no Quadro 1.

Quadro 1 Composição dos géis testados e denominação dos tratamentos

COMPOSIÇÃO / OBSERVAÇÕES	NOME
Somente o gel (Controle clinoptilolita)	Tratamento 1
Gel + Clinoptilolita 5%	Tratamento 2
Gel + Clinoptilolita 10%	Tratamento 3
Gel + Clinoptilolita 20%	Tratamento 4
Gel + Enrofloxacino 1% (Controle enrofloxacino)	Tratamento 5
Gel + Clinoptilolita 5% + Enrofloxacino 1%	Tratamento 6
Gel + Clinoptilolita 10% + Enrofloxacino 1%	Tratamento 7
Gel + Clinoptilolita 20% + Enrofloxacino 1%	Tratamento 8
Gel + Ag-Zn 1% (Controle Ag-Zn)	Tratamento 9
Gel + Clinoptilolita 5% + Ag 1% + Zn 1%	Tratamento 10
Gel + Clinoptilolita 10% + Ag 1% + Zn 1%	Tratamento 11
Gel + Clinoptilolita 20% + Ag 1% + Zn 1%	Tratamento 12
Gel + Enrofloxacino 1% + Ag 1% + Zn 1% (Controle enrofloxacino + Ag-Zn)	Tratamento 13
Gel + Clinoptilolita 5% + Enrofloxacino 1% + Ag 1% + Zn 1%	Tratamento 14
Gel + Clinoptilolita 10% + Enrofloxacino 1% + Ag 1% + Zn 1%	Tratamento 15
Gel + Clinoptilolita 20% + Enrofloxacino 1% + Ag 1% + Zn 1%	Tratamento 16

As formulações geradas foram estocadas em frascos de polietileno devidamente identificados (Figura 1), sob temperatura ambiente e livre de luminosidade.



Figura 1 Géis armazenados em frascos de polietileno e embalados para estocagem

Os ativos metálicos (prata e zinco) foram incorporados à zeólita, de acordo com metodologia proposta por Li et al. (2009), na qual 100g de clinoptilolita foram maceradas em solução de NaCl 20% a 100°C por duas horas. Foi realizada a decantação da solução e lavagem tripla com 500mL de água deionizada. Logo em seguida, foi feita a imersão de 100g de zeólita-Na em solução aquosa de AgNO_3 e $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$ a 0,1mol/L a 60°C por quatro horas. Foi realizada a decantação da solução, lavagem tripla com 500mL de água deionizada, desidratação da solução zeólita-Ag-Zn e incorporação em gel. Para finalizar, foi realizada a esterilização.

O enrofloxacino teve incorporação constante, sempre na proporção de 1% (v/v), seguindo a metodologia proposta por Ötker e Balcioglu (2005), na qual foi utilizado o enrofloxacino com 99,8% de pureza. Foi realizada a solubilização em água deionizada, na concentração de 1% (v/v) e o acerto de pH

(NaOH/HCl) = $5,27 \pm 0,5$.

3.2 Verificação de propriedades exotérmicas dos tratamentos

3.2.1 Base física da investigação

Esta fase da experimentação foi realizada no Laboratório de Otologia do Hospital Veterinário da Universidade Federal de Lavras, no Departamento de Medicina Veterinária.

3.2.2 Material

Foram utilizadas 16 peças anatômicas de suínos (membro anterior, região de antebraço - Figura 2). Todas as peças tinham tamanho e peso semelhantes, estando frescas e sendo adquiridas na mesma data e de um mesmo fornecedor. Elas foram mantidas em temperatura ambiente, que foi monitorada durante todo o período de experimentação por meio de termômetro ambiental (Digital Thermometer EP-11F[®] - Grand LkBf, Germany) (Figura 3).

A escolha de peças anatômicas ocorreu em decorrência das restrições éticas. Como o presente estudo se trata da primeira etapa de desenvolvimento de um produto inédito, ele foi inteiramente realizado *in vitro*, e somente quando o produto for comprovadamente seguro é que poderá ser testado em animais vivos, dando continuidade aos passos rumo à produção comercial. A escolha da espécie suína ocorreu de acordo com o modelo proposto por Alam et al. (2004), seguido por todos os outros trabalhos sobre o assunto.

Para a determinação da temperatura intradérmica foi utilizado um termômetro intradérmico digital (Instrutemp[®] Digital Thermometer ITDT801) (Figura 4) para todos os testes, evitando possíveis variações entre equipamentos

diferentes.



Figura 2 Peças anatômicas de suínos (membro anterior) utilizadas para avaliação termométrica dos géis



Figura 3 Termômetro utilizado para mensuração da temperatura ambiental



Figura 4 Termômetro digital utilizado para mensurar a temperatura das peças anatômicas

Para a contagem de tempo, foi utilizado cronômetro digital (Cronobio SW2018®).

Foram utilizados 32 *swabs* estéreis (Figura 5), um para cada um dos 16 tratamentos, testados em duplicata (Quadro 1). Após sua utilização, o *swab* era descartado, evitando, dessa forma, contaminação cruzada com outros tratamentos.

Foram feitos, em papel cartão preto, 32 gabaritos com circunferência de 1,5cm de raio, resultando em uma área livre para aplicação do produto de 4,7cm² (Figura 5).

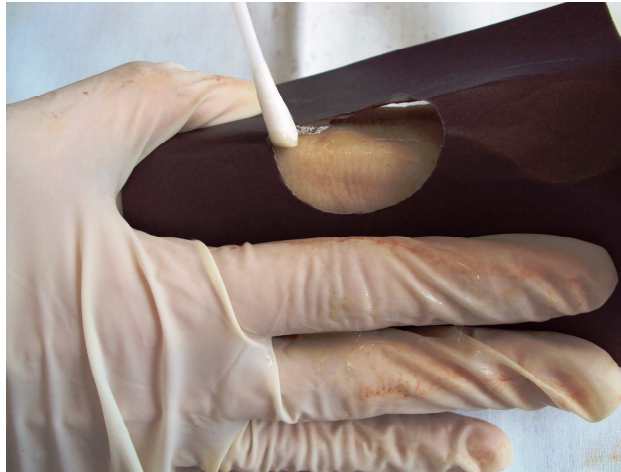


Figura 5 Aplicação do produto com *swab* estéril e utilização de gabarito para demarcação da área de espalhamento do produto

3.2.3 Método

Cada tratamento foi testado em duplicata, alternando posição de espalhamento e peça testada.

O termômetro intradérmico digital foi introduzido logo abaixo da epiderme, exatamente abaixo do centro do ponto no qual o produto seria espalhado (Figura 6).

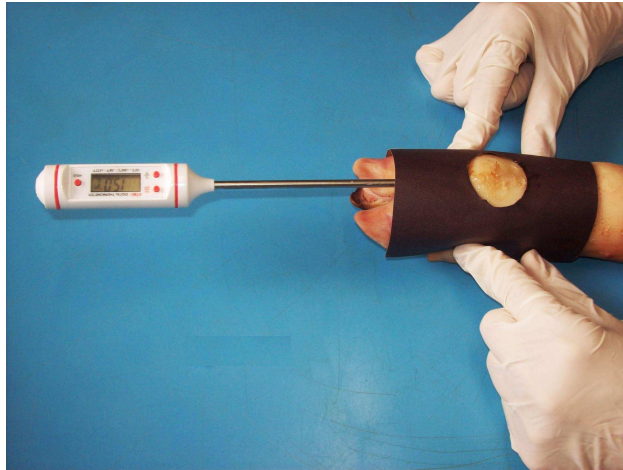


Figura 6 Sensor do termômetro em posição intradérmica, logo abaixo do centro de espalhamento do produto

Uma porção de cada composto era espalhada, com o auxílio de um *swab* estéril, na área circular pré-determinada pelo gabarito (Figura 7).

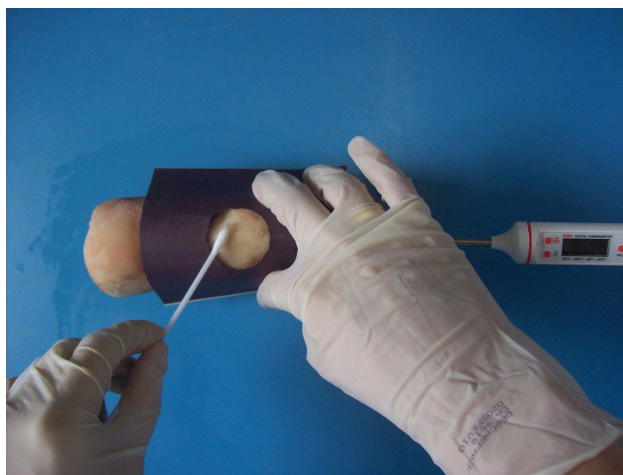


Figura 7 Espalhamento restrito do gel em área estabelecida pelo gabarito

As leituras termométricas de ambos os termômetros utilizados

(intradérmico e ambiental) foram efetuadas nos momentos 0 (antes do contato com o tratamento) e $+n$ (em que n corresponde ao tempo em minutos após contato, variando em uma escala de +1 a +15), como ilustrado na Figura 8.

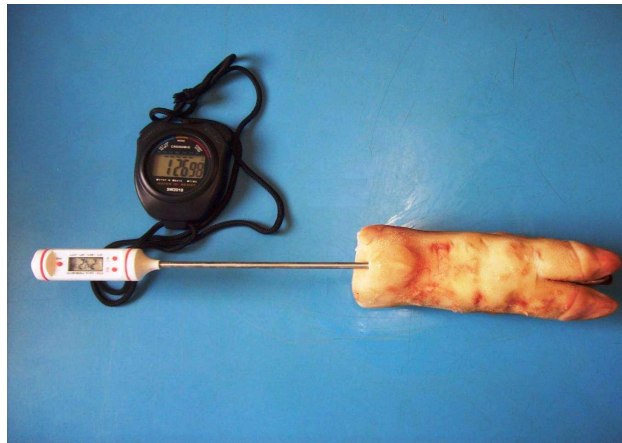


Figura 8 Momento de realização de leitura termométrica intradérmica com auxílio de cronômetro digital

3.3 Verificação de propriedades antibacterianas dos tratamentos

3.3.1 Base física da investigação

Esta fase da experimentação foi desenvolvida no Laboratório de Microbiologia do Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Lavras.

3.3.2 Material

Foram testadas duas espécies bacterianas de relevância clínica, especialmente em dermatologia veterinária de pequenos animais:

Staphylococcus intermedius (cepa 08/96PE-FUNED) e *Pseudomonas aeruginosa* (cepa ATCC 27853).

Como meio de cultura desses micro-organismos foi utilizado ágar Müeller-Hinton (OXOID), disposto em placas de Petri.

3.3.3 Método

Em uma etapa piloto, observou-se que não foi possível se obter uma completa homogeneização na incorporação direta dos géis ao meio, o que poderia comprometer os resultados. Dessa forma, como o veículo (gel) utilizado era inerte e não influenciaria no resultado microbiológico, o mesmo foi descartado. Cada composto presente nas diferentes composições dos tratamentos foi pesado e incorporado diretamente no meio, com a quantidade e metodologia idênticas às dos compostos preparados na farmácia de manipulação, promovendo homogeneização satisfatória.

O meio de cultivo foi preparado de modo a preservar a composição básica em termos de nutrientes e conteúdo de água para cada um dos tratamentos. A clinoptilolita e os sais de prata e zinco foram adicionados ao meio previamente à autoclavação. O enrofloxacino foi adicionado quando o meio estava em temperatura de 45-50°C, para evitar a sua inativação.

Após a autoclavação do meio e da adição do enrofloxacino nos tratamentos específicos, os meios contendo os diferentes tratamentos foram distribuídos em placas de Petri (25 mL/placa), como mostra a Figura 9.

Para o preparo dos inóculos, os tubetes contendo os micro-organismos testados foram retirados do ultrafrio (-70°C), descongelados e uma alíquota de cada um dos tubetes semeada em tubos contendo ágar Müeller-Hinton. Estes foram incubados a 37°C por 18-24 horas para a reativação dos micro-organismos. Após a reativação das amostras, foi feito repique dos agentes em

ágar Müeller-Hinton e incubação a 37°C por 24 horas. A partir das culturas em meio sólido, foi produzida uma suspensão-padrão de cada uma das bactérias correspondente à escala 10 de Mc Farland (3×10^9 UFC/mL). Uma alíquota de 20µL de cada suspensão padronizada foi depositada em cada uma das placas contendo os respectivos tratamentos, utilizando-se uma micropipeta automática. A distribuição dos inóculos em cada tratamento foi realizada por meio de alças de Drigalski.

As placas de Petri inoculadas foram incubadas a 37°C por 24 horas, momento em que foram feitas as leituras macroscópicas, avaliando-se se houve ou não crescimento dos micro-organismos testados.



Figura 9 Placa de Petri com ágar Müeller-Hinton referente ao Tratamento 7

3.4 Verificação de propriedades coagulantes dos tratamentos

3.4.1 Base física da investigação

Esta fase da experimentação foi realizada no Laboratório de Otologia do Hospital Veterinário da Universidade Federal de Lavras, no Departamento de Medicina Veterinária.

3.4.2 Material

Foram utilizados 32 tubos de ensaio 12 x 100mm de borosilicato, com tampa de rosca, balança de precisão, 32 *swabs* estéreis, estufa a 37,5°C, cronômetro digital.

Foi realizada a coleta de 100mL de sangue de um canino saudável, imediatamente antes do início dos testes.

3.4.3 Método

Os compostos de cada tratamento foram expostos aos tubos de ensaio, contendo 3mL de sangue canino *in natura* (colhido imediatamente antes do teste).

Uma alíquota de 250µg de cada composto foi adicionada ao sangue, e incubada a 37,5°C. As leituras de coagulação foram realizadas a cada minuto, no patamar de 15 minutos.

Os testes foram realizados em duplicata para cada tratamento, totalizando 32 testes.

3.5 Análise estatística

Os dados qualitativos referentes à etapa microbiológica foram abordados por meio da estatística descritiva.

Para os dados quantitativos referentes à etapa da termometria foi realizada uma análise de variância para dados não-paramétricos, com o teste de Kruskal-Wallis, com nível de significância de 5%.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Propriedade exotérmica

Na utilização da zeólita em pó como um anti-hemorrágico, Alam et al. (2004) relataram temperaturas que chegaram a 57°C após a aplicação do QuikClot® em sua versão original. Arnaud et al. (2007) relataram temperaturas de $58,1 \pm 4,5^\circ\text{C}$ após a aplicação da primeira geração do QuikClot® e temperaturas de $58,2 \pm 5,3^\circ\text{C}$ após a aplicação do QuikClot ACS®. Arnaud et al. (2008) encontraram temperaturas de até 72°C após a utilização do QuikClot ACS®. Cox et al. (2009) relataram temperaturas de 58°C, enquanto o menor aumento de temperatura, de 1,5°C a 6,5°C, foi registrado por Arnaud et al. (2008) em uma formulação mais recente do produto, o QuikClot ACS+®. Neste estudo, a elevação média máxima da temperatura das peças foi de 1,15°C, menor que a encontrada em todos os outros estudos, como está representado no Gráfico 1.

Não se observou diferença estatística significativa entre os diferentes tratamentos, apontando que a variação da inclusão da concentração da clinoptilolita, bem como dos sais de prata e zinco e de enrofloxacino, não influenciou a elevação de temperatura (Tabela 1).

Ao contrário das formulações anti-hemorrágicas comerciais - como citado por, Alam et al. (2004), Arnaud et al. (2007), Plurad et al. (2009) e Wright et al. (2004) - os géis testados elevaram, de maneira pouco significativa, a temperatura tissular local. É provável que essa hipertermia branda ocorra em função da menor granulação da zeólita e de sua incorporação em gel. As observações feitas por Cox et al. (2009) confirmam que é justamente o resíduo em pó que causa a elevação térmica acentuada, com conseqüente lesão tissular.

Também se pode inferir que o veículo usado nos géis, de reconhecida característica hidrofílica e dispersante, possa ter contribuído para abrandar o efeito térmico, seja pelo aumento da umidade local, decorrente da interface isolante - efeito barreira - ou mesmo por evitar um contato maior do mineral diretamente com a pele.

Além disso, a discrepância entre os resultados de elevação de temperatura encontrados no presente estudo e nos dados da literatura pode ser explicada pelas diferentes condições de experimentação, uma vez que, no presente estudo, foram utilizadas peças anatômicas de suínos, sem circulação sanguínea, com a fisiologia dermatológica e temperatura inicial alteradas. Além disso, no presente estudo, o produto foi testado em uma pele íntegra, livre de feridas e/ou escoriações. No entanto, o modelo experimental seguiu o proposto por Alam et al. (2004), utilizando a espécie suína. Como o produto é destinado a cães e gatos, futuros trabalhos devem realizar os testes na pele de cadáveres dessas espécies e, futuramente, em animais vivos, considerando variações de espécie para espécie. Novamente, ressalta-se que no presente trabalho, trata-se da primeira etapa de desenvolvimento do novo produto.

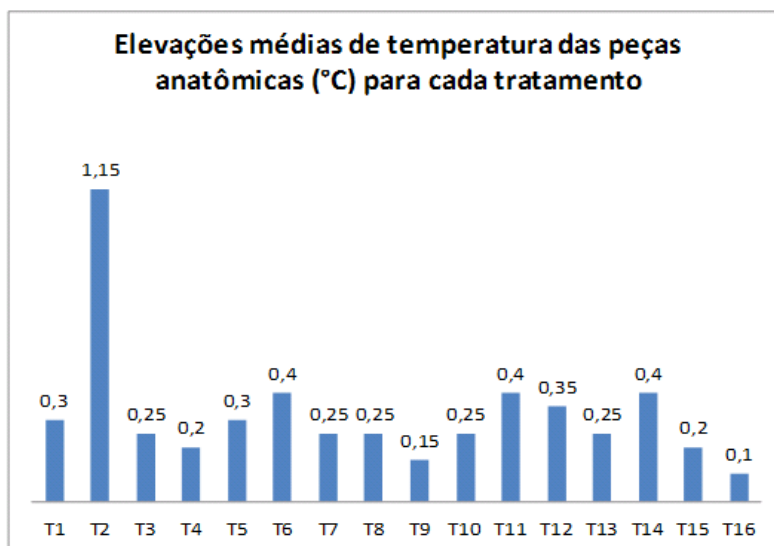


Gráfico 1 Amplitudes médias das temperaturas subcutâneas de peças anatômicas de membros de suínos tratadas com diferentes concentrações de géis

Como o experimento não foi realizado sob condições ambientais controladas, a temperatura ambiental foi mensurada durante toda a realização do experimento e, após análise estatística, foi possível constatar que a mesma também não sofreu alteração significativa ao longo do tempo, podendo-se descartar uma possível influência da temperatura ambiental sobre a temperatura mensurada na peça (Tabela 2).

Tabela 1 Medidas descritivas (média e desvio-padrão) e resultado do teste de Kruskal-Wallis para variável “temperatura da peça”, com nível de significância de 5%

TRATAMENTOS	N	MÉDIA	DESVIO-PADRÃO	P
C1	2	0,30	0,00	0,851326 (NS)
T1	2	1,15	1,48	
T2	2	0,25	0,07	
T3	2	0,20	0,00	
C2	2	0,30	0,28	
T4	2	0,40	0,00	
T5	2	0,25	0,07	
T6	2	0,25	0,21	
C3	2	0,15	0,21	
T7	2	0,25	0,21	
T8	2	0,40	0,28	
T9	2	0,35	0,21	
C4	2	0,25	0,21	
T10	2	0,40	0,14	
T11	2	0,20	0,00	
T12	2	0,10	0,00	

(NS): Teste não significativo com nível de 5% de probabilidade;
C: Grupo-controle; T: Grupo-teste

Tabela 2 Medidas descritivas (média e desvio-padrão) e resultado do teste de Kruskal-Wallis para variável “temperatura do ambiente”, com nível de significância de 5%

TRATAMENTOS	N	MÉDIA	DESVIO-PADRÃO	P
C1	2	0,10	0,00	0,084657 (NS)
T1	2	0,25	0,07	
T2	2	0,40	0,14	
T3	2	0,25	0,07	
C2	2	0,20	0,14	
T4	2	0,25	0,07	
T5	2	0,15	0,07	
T6	2	0,15	0,07	
C3	2	0,55	0,07	
T7	2	0,25	0,07	
T8	2	0,25	0,07	
T9	2	0,35	0,07	
C4	2	0,10	0,00	
T10	2	0,20	0,14	
T11	2	0,05	0,07	
T12	2	0,15	0,07	

(NS): Teste não significativo com nível de 5% de probabilidade;
C: Grupo-controle; T: Grupo-teste

4.2 Propriedade antimicrobiana

Na etapa microbiológica, foi constatado que os tratamentos que tinham em sua composição a clinoptilolita sem associações não foram capazes de inibir o crescimento dos micro-organismos, enquanto todos os tratamentos que continham os sais de prata e zinco e o enrofloxacino, sozinhos ou associados entre si e/ou com a zeólita, inibiram o crescimento das bactérias testadas (Quadro 2).

Quadro 2 Crescimento macroscópico de cepas bacterianas testadas frente aos géis após 24 horas de incubação em ágar Müller-Hinton

Tratamentos	<i>Staphylococcus intermedius</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
T1	+	+
T2	+	+
T3	+	+
T4	+	+
T5	-	-
T6	-	-
T7	-	-
T8	-	-
T9	-	-
T10	-	-
T11	-	-
T12	-	-
T13	-	-
T14	-	-
T15	-	-
T16	-	-

(+): presença de crescimento macroscópico; (-): ausência de crescimento macroscópico;
C: Grupo-controle; T: Grupo-teste

Foi demonstrado que a associação da clinoptilolita com os outros compostos não interferiu na inibição bacteriana, e que sua aplicação como composto isolado não foi capaz de inibir o crescimento bacteriano, como já havia sido mostrado por Kwakye-Awuah et al. (2007). Esse resultado reforça a sugestão de que o real valor das zeólitas nessas associações se dá pela sua

capacidade de se comportar como uma “bomba”, que realiza a liberação gradual e contínua dos compostos aos quais está associada, com importância em longo prazo, prolongando os efeitos dos mesmos, como proposto por Casemiro et al. (2008). Essa propriedade não foi avaliada no presente trabalho e merece estudos posteriores, pois se trata de uma das principais vantagens da formulação em estudo, sendo, particularmente, interessante na área dermatológica.

Como Casemiro et al. (2008), Cowan et al. (2003), Galeano, Korff e Nicholson (2003) e Kwakye-Awuah et al. (2007) já haviam demonstrado, os sais de prata e zinco se mostraram altamente eficazes, sendo capazes de inibir completamente o crescimento das bactérias na concentração de 1% utilizada em todos os tratamentos, associados ou não à zeólita e/ou ao antimicrobiano utilizado.

O efeito antimicrobiano do enrofloxacino, inibindo as bactérias testadas quando associadas aos outros compostos ou não, também era completamente esperado, tendo sido escolhido justamente por se tratar de uma fluorquinolona de amplo espectro, bactericida, tendo eficácia clínica estabelecida.

4.3 Propriedade coagulante

Sendo o primeiro trabalho da área com a tentativa de testar as propriedades coagulantes *in vitro*, a metodologia criada não foi capaz de prover resultados fidedignos, mostrando-se ineficaz. A coagulação em frasco se deu, em todos os tratamentos testados, em ambas repetições, antes da aplicação do produto, assim que o sangue era colocado no frasco, talvez pelo próprio “efeito vidro”, citado por Z-Medica (2008).

Como o produto se encontra na primeira fase de desenvolvimento e testes, pelas restrições éticas, não se pode testá-lo em animais vivos, condição a

qual já possui metodologia bem estabelecida, como foi adotado por Alam et al. (2004), Arnaud et al. (2007) e Arnaud et al. (2008), com o modelo em suínos.

Em razão dos registros de alta eficiência anti-hemorrágica das zeólitas, outros testes devem ser realizados e, caso se confirme esse efeito, o que é altamente esperado em decorrência dos registros já existentes, o mesmo poderá agregar mais uma função ao produto.

5 CONCLUSÃO

Nas condições deste experimento, pode-se concluir que as formulações de géis, nas concentrações propostas e contendo clinoptilolita, enrofloxacino e sais de prata/zinco, possuem baixo efeito térmico tissular e alto poder antibacteriano contra *Staphylococcus intermedius* e *Pseudomonas aeruginosa*.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este trabalho se refere à primeira etapa do desenvolvimento de um novo produto dermatológico. É o primeiro a considerar a aplicação das zeólitas em dermatologia veterinária, possibilidade considerada em razão dos diversos registros da utilização desse mineral em outras áreas como um excelente adsorvente, o que levou a se pensar no possível efeito adsorvente de toxinas, presentes com frequência em piodermites e feridas ulceradas; também foi considerada a sua capacidade liberadora de substâncias ao longo do tempo (efeito “bomba”), que seria extremamente útil na associação com antimicrobianos e íons, visando a um prolongamento de seu efeito.

Os resultados obtidos na primeira etapa de testes *in vitro* foram altamente favoráveis, pois não foi verificada alta reação exotérmica, o maior problema encontrado na literatura a respeito da utilização da composição em pó.

Adicionalmente, o potencial efeito antibacteriano da composição testada foi confirmado contra as cepas bacterianas testadas.

Dessa forma, sendo o pioneiro na área, a padronização de metodologias se tornou uma etapa desafiadora no desenvolvimento do projeto. Nesta pesquisa, visava-se à verificação *in vitro* das propriedades dos géis formulados e se elas realmente poderiam ser transferidas a partir das demais áreas, mantendo sua eficácia como um produto em gel. Além disso, buscou-se verificar a possível ocorrência de efeitos nocivos, frequentemente relatados na formulação em pó já existente. Associando várias metodologias de diferentes trabalhos, tentou-se estabelecer um padrão adequado para essa pesquisa, o que foi realizado com muito estudo e cuidado por meio de diversos ensaios-pilotos que permitissem confirmar que a melhor técnica a ser empregada.

Na etapa antimicrobiana, foi indicado que a presença da clinoptilolita não interferiu na inibição dos micro-organismos selecionados. Esse resultado deve-se, à ausência de uma metodologia *in vitro* adequada que confirmasse a ação em longo prazo desse mineral. Posteriormente, quando o produto for comprovadamente seguro, em uma etapa *in vivo* de desenvolvimento poder-se-á ressaltar com maior propriedade esse importante aspecto.

Quanto à verificação das propriedades exotérmicas, os resultados encontrados foram altamente positivos. Diante dos dados da literatura, de significativas elevações de temperatura, no início da pesquisa, não se sabia exatamente o que esperar nestes testes; o que foi encontrado nesta etapa *in vitro* foi uma elevação muito pequena, levando à consideração de que o produto não apresentará risco térmico à pele dos animais, fato a ser comprovado em etapa posterior de estudo.

A instituição e o sucesso do tratamento de dermatopatias é um desafio na rotina de médicos veterinários, já que as afecções dermatológicas são as que mais levam cães ao consultório. Produtos inovadores, frutos do desenvolvimento

da pesquisa dentro das universidades, servem diretamente à sociedade e aos profissionais que atuam na área, valorizando o trabalho da comunidade acadêmica. Atualmente, a pesquisa e a inovação devem andar paralelas, transformando trabalhos de pesquisadores em resultados tangíveis que levem ao desenvolvimento e à modernização das áreas do conhecimento e, conseqüentemente, da ciência do país.

REFERÊNCIAS

ABE, Y. et al. Effect of saliva on an antimicrobial tissue conditioner containing silver-zeolite. **Journal of Oral Rehabilitation**, Oxford, v. 31, n. 6, p. 568-573, Sept. 2004. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2842.2004.01267.x/pdf>>. Acesso em: 16 nov. 2011.

ACHESON, E. M. et al. Comparison of hemorrhage control agents applied to lethal extremity arterial hemorrhages in swine. **The Journal of Trauma: Injury, Infection and Critical Care**, Baltimore, v. 59, n. 4, p. 865-875, Oct. 2005. Disponível em: <http://ovidsp.tx.ovid.com/sp3.4.2a/ovidweb.cgi?WebLinkFrameset=1&S=PEJPFPIAIGDDLDILNCBLDEIBIEDGAA00&returnUrl=ovidweb.cgi%3f%26Full%2bText%3dL%257cS.sh.15.16%257c0%257c0000537320051000000010%26S%3dPEJPFPIAIGDDLDILNCBLDEIBIEDGAA00&directlink=http%3a%2f%2fgraphics.tx.ovid.com%2fovftpdfs%2fFPDDNCIBDEILIG00%2ffs047%2fovft%2flive%2fgv024%2f00005373%2f0000537320051000000010.pdf&filename=Comparison+of+Hemorrhage+Control+Agents+Applied+to+Lethal+Extremity+Arterial+Hemorrhages+in+Swine.&pdf_key=FPDDNCIBDEILIG00&pdf_index=/fs047/ovft/live/gv024/00005373/00005373-200510000-00010>. Acesso em: 16 nov. 2011.

ALAM, H. B. et al. Application of a zeolite hemostatic agent achieves 100% survival in a lethal model of complex groin injury in swine. **The Journal of Trauma: Injury, Infection and Critical Care**, Baltimore, v. 56, n. 5, p. 974-983, May 2004. Disponível em: <http://ovidsp.tx.ovid.com.ez26.periodicos.capes.gov.br/sp-3.5.1a/ovidweb.cgi?WebLinkFrameset=1&S=FAELFPLMJEDDGMIDNCALACIBOBKDAA00&returnUrl=ovidweb.cgi%3f%26TOC%3djb.search.25%257c3%257c50%26FORMAT%3dtoc%26FIELDS%3dTOC%26S%3dFAELFPLMJEDDGMIDNCALACIBOBKDAA00&directlink=http%3a%2f%2fgraphics.tx.ovid.com%2fovftpdfs%2fFPDDNCIBACIDJE00%2ffs024%2fovft%2flive%2fgv013%2f00005373%2f0000537320040500000007.pdf&filename=Application+of+a+Zeolite+Hemostatic+Agent+Achieves+100%25+Survival+in+a+Lethal+Model+of+Complex+Groin+Injury+in+Swine.&link_from=jb.search.25%7c3&pdf_key=B&pdf_index=jb.search.25>. Acesso em: 13 fev. 2012.

ARNAUD, F. et al. Comparative efficacy of granular and bagged formulations of hemostatic agent QuikClot. **The Journal of Trauma: Injury, Infection and Critical Care**, Baltimore, v. 63, n. 4, p. 775-782, Oct. 2007. Disponível em: <http://ovidsp.tx.ovid.com/sp3.4.2a/ovidweb.cgi?WebLinkFrameset=1&S=EKNGFPIAJFDDMDAMNCBLJAIBCNAFAA00&returnUrl=ovidweb.cgi%3f%26Full%2bText%3dL%257cS.sh.15.16%257c0%257c000053732007100000009%26S%3dEKNGFPIAJFDDMDAMNCBLJAIBCNAFAA00&directlink=http%3a%2f%2fgraphics.tx.ovid.com%2fovftpdfs%2fFPDDNCIBJAAMJF00%2ffs046%2fovft%2flive%2fgv023%2f00005373%2f000053732007100000009.pdf&filename=Comparative+Efficacy+of+Granular+and+Bagged+Formulations+of+the+Hemostatic+Agent+QuikClot.&pdf_key=FPDDNCIBJAAMJF00&pdf_index=/fs046/ovft/live/gv023/00005373/00005373200710000-00009>. Acesso em: 16 nov. 2011.

ARNAUD, F. et al. Exothermic reaction in zeolite hemostatic dressings: QuikClot ACS and ACS+. **Annals of Biomedical Engineering**, Nova York, v. 36, n. 10, p. 1708-1713, Oct. 2008. Disponível em: <<http://www.springerlink.com/content/c1783877k3043107/fulltext.pdf>>. Acesso em: 16 nov. 2011.

BRAGA, A. A. C.; MORGON, N. H. Descrições estruturais cristalinas de zeólitos. **Química Nova**, São Paulo, v. 30, n. 1, p. 178-188, jan./fev. 2007. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S010040422007000100030>. Acesso em: 16 nov. 2011.

CAI, L. et al. Evaluation of zeolite for control of odorants emissions from simulated poultry manure storage. **Journal of Environmental Quality**, Madison, v. 36, n. 1, p. 184-193, Jan. 2007. Disponível em: <<http://www.ncsu.edu/airworkshop/Posters-c.pdf>>. Acesso em: 16 nov. 2011.

CASEMIRO, L. A. et al. Antimicrobial and mechanical properties of acrylic resins with incorporated silver-zinc zeolite – part I. **Gerodontology**, Mount Desert, v. 25, n. 3, p. 187-194, Sept. 2008. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1741-2358.2007.00198.x/pdf>>. Acesso em: 16 nov. 2011.

CHRÉTIEN, M. N.; HEAFEY, E.; SCAIANO, J. C. Reducing adverse effects from UV sunscreens by zeolite encapsulation: comparison of oxybenzone insolation and in zeolites. **Photochemistry and Photobiology**, Oxford, v. 86, n. 1, p. 153-161, Jan./Feb. 2010. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1751-1097.2009.00644.x/pdf>>. Acesso em: 16 nov. 2011.

CHRÉTIEN, M. N.; MIGAHED, L.; SCAIANO, J. C. Protecting the protectors: reducing the biological toxicity of UV sunscreens by zeolite encapsulation. **Photochemistry and Photobiology**, Oxford, v. 82, n. 6, p. 1606-1611, Nov./Dec. 2006. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1751-1097.2006.tb09819.x/pdf>>. Acesso em: 16 nov. 2011.

CLARK, K. J. et al. In vitro studies on the use of clay, clay minerals and charcoal to adsorb bovine rotavirus and bovine coronavirus. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 63, n. 2/4, p. 137-146, Oct. 1998. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science?_ob=MiamiImageURL&_cid=271229&_user=686380&_pii=S0378113598002417&_check=y&_origin=&_coverDate=01Oct1998&view=c&wchp=dGLbVltzSkzS&md5=76cfa038d677fe925bd22cc3fa1207a8/1s2.0S0378113598002417-main.pdf>. Acesso em: 16 nov. 2011.

COWAN, M. M. et al. Antimicrobial efficacy of a silver-zeolite matrix coating on stainless steel. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, Houndmills, v. 30, n. 2, p. 102-106, Feb. 2003. Disponível em: <<http://www.springerlink.com/content/pkf60vkvtx06hw3c/fulltext.pdf>>. Acesso em: 16 nov. 2011.

COX, E. D. et al. New hemostatic agents in the combat setting. **Transfusion**, Philadelphia, v. 49, n. 5, p. 248-255, Dec. 2009. Supplement 5. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1537-2995.2008.01988.x/pdf>>. Acesso em: 16 nov. 2011.

DEDOUSSI, A. et al. The effect of natural zeolite (clinoptilolite) on total bacteria contamination of ostrich eggshells. **Archiv für Geflügelkunde**, Stuttgart, v. 72, n. 4, p. 157-163, 2008. Disponível em: <<http://www.cabi.org/animalscience/uploads/file/animalscience/additionalfiles/wpsaverona/10135.pdf>>. Acesso em: 16 nov. 2011.

EGGER, S. et al. Antimicrobial properties of a novel silver-silica nanocomposite material. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 75, n. 9, p. 2973-2976, May 2009. Disponível em:
<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2681698/pdf/1658-08.pdf>>.
Acesso em: 16 nov. 2011.

GALEANO, B.; KORFF, E.; NICHOLSON, W. L. Inactivation of vegetative cells, but not spores, of *Bacillus anthracis*, *B. cereus* and *B. subtilis* on stainless steel surfaces coated with an antimicrobial silver and zinc containing zeolite formulation. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 69, n. 7, p. 4329-4331, July 2003. Disponível em:
<<http://aem.asm.org/content/69/7/4329.full.pdf+html>>. Acesso em: 16 nov. 2011.

HUWIG, A. et al. Mycotoxin detoxication of animal feed by different adsorbents. **Toxicology Letters**, Amsterdam, v. 122, n. 2, p. 179-188, June 2001. Disponível em:
<http://www.sciencedirect.com/science?_ob=MiamiImageURL&_cid=271168&_user=686380&_pii=S0378427401003605&_check=y&_origin=&_coverDate=20Jun2001&view=c&wchp=dGLbVIVzSkzk&md5=4ee29243aea725ccb028f36804b2a9d/1-s2.0-S0378427401003605-main.pdf>. Acesso em: 16 nov. 2011.

IHRKE, P. J.; PAPICH, M. G.; DEMANUELLE, T. C. The use of fluorquinolones in veterinary dermatology. **Veterinary Dermatology**, Malden, v. 10, n. 3, p. 193-204, Sept. 1999. Disponível em:
<<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1046/j.1365-3164.1999.00179.x/pdf>>.
Acesso em: 13 fev. 2012.

KWAKYE-AWUAH, B. et al. Antimicrobial action and efficiency of silver-loaded zeolite X. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 104, n. 5, p.1516-1524, May 2007. Disponível em:
<<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2672.2007.03673.x/pdf>>.
Acesso em: 16 nov. 2011.

LI, J. et al. Addition of an alginate to a modified zeolite improves hemostatic performance in a swine model of lethal groin injury. **Journal of Trauma: Injury, Infection and Critical Care**, Baltimore, v. 66, n. 3, p. 612-620, Mar. 2009. Disponível em: <http://ovidsp.tx.ovid.com/sp3.4.2a/ovidweb.cgi?WebLinkFrameset=1&S=LOMEFPPPHKDDLDCMNCBLLEOBNFEPAA00&returnUrl=ovidweb.cgi%3f%26Full%2bText%3dL%257cS.sh.15.16%257c0%257c0000537320090300000003%26S%3dLOMEFPPPHKDDLDCMNCBLLEOBNFEPAA00&directlink=http%3a%2f%2fgraphics.tx.ovid.com%2fovftpdfs%2fFPDNCOBLECMHK00%2ffs047%2fovft%2flive%2fgv031%2f00005373%2f0000537320090300000003.pdf&filename=Addition+of+an+Alginate+to+a+Modified+Zeolite+Improves+Hemostatic+Performance+in+a+Swine+Model+of+Lethal+Groin+Injury.&pdf_key=FPDDNCOBLECMHK00&pdf_index=/fs047/ovft/live/gv031/00005373/00005373-200903000-00003>. Acesso em: 16 nov. 2011.

LUZ, A. B. da. **Zeólitas: propriedades e usos industriais**. Rio de Janeiro: CETEM/CNPq, 1995. 35 p.

MAIA, G. V. Z. **Zeólitas (Clinoptilolita) e *Yucca schidigera* em rações para cães: palatabilidade, digestibilidade e redução de odores fecais**. 2008. 85 p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2008.

MARGULIS, V. et al. Application of novel hemostatic agent during laparoscopic partial nephrectomy. **The Journal of Urology**, Baltimore, v. 147, n. 2, p. 761-764, Aug. 2005. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science?_ob=ImageURL&_cid=273470&_user=686380&_pii=S0022534701683873&_check=y&_origin=&_coverDate=31Aug2005&view=c&wchp=dGLbVBAzSkWz&md5=11ffbea774ebe34ee140d2ef6933f95/1s2.0S0022534701683873-main.pdf>. Acesso em: 16 nov. 2011.

METRY, C. A. et al. Determination of enrofloxacin stability and in vitro efficacy against *Staphylococcus pseudintermedius* and *Pseudomonas aeruginosa* in four ear cleaner solutions over a 28 day period. **Veterinary Dermatology**, Malden, v. 23, n. 1, p. 23-29, Feb. 2011. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-3164.2011.00999.x/pdf>>. Acesso em: 13 fev. 2012.

MUMPTON, F. A.; FISHMAN, P. H. The application of natural zeolites in animal science and aquaculture. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 45, n. 5, p. 1188-1203, Nov. 1977. Disponível em: <<http://jas.fass.org/content/45/5/1188.full.pdf>>. Acesso em: 16 nov. 2011.

MUMPTON, F. A. La roca magica: uses of natural zeolites in agriculture and industry. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 96, n. 7, p. 3463-3470, Mar. 1999. Disponível em: <<http://www.pnas.org/content/96/7/3463.full.pdf+html>>. Acesso em: 16 nov. 2011.

ÖTKER, H. M.; BALCIOGLU, I. A. Adsorption and degradation of enrofloxacin, a veterinary antibiotic on natural zeolite. **Journal of Hazardous Materials**, Amsterdam, v. 122, n. 3, p. 251-258, July 2005. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science?_ob=MiamiImageURL&_cid=271390&_user=686380&_pii=S030438940500097X&_check=y&_origin=&_coverDate=15Jul2005&view=c&wchp=dGLbVltzSkzk&md5=23e2c7fe601e4dbcc1b3b02695249bf6/1-s2.0-S030438940500097X-main.pdf>. Acesso em: 16 nov. 2011.

PLURAD, D. et al. A complication of intracorporeal use of QuikClot for pelvic hemorrhage. **The Journal of Trauma: Injury, Infection and Critical Care**, Baltimore, v. 66, n. 5, p. 1482-1484, May 2009. Disponível em: <http://ovidsp.tx.ovid.com/sp-4.2a/ovidweb.cgi?WebLinkFrameset=1&S=OFLJFPNOEDDLDFONCBLBBJCEJIOAA00&returnUrl=ovidweb.cgi%3f%26Full%2bText%3dL%257cS.sh.15.16%257c0%257c0000537320090500000035%26S%3dOFLJFPNOEDDLDFONCBLBBJCEJIOAA00&directlink=http%3a%2f%2fgraphics.tx.ovid.com%2fovftpdfs%2fFPDDNCJCB BFOOE00%2ffs047%2fovft%2flive%2fgv024%2f00005373%2f0000537320090500000035.pdf&filename=A+Complication+of+Intracorporeal+Use+of+Quikc lot+for+Pelvic+Hemorrhage.&pdf_key=FPDDNCJCB BFOOE00&pdf_index=/fs047/ovft/live/gv024/00005373/00005373-200905000-00035>. Acesso em: 16 nov. 2011.

PRVULOVIAE, D. et al. Efecto de los aluminosilicatos hidratados dietéticos em el crecimiento y los indicadores sanguíneos de cerdos. **Cuban Journal of Agricultural Science**, Havana, v. 43, n. 1, p. 59-64, 2009. Disponível em: <<http://redalyc.uaemex.mx/redalyc/pdf/1930/193015398011.pdf>>. Acesso em: 16 nov. 2011.

RAMU, J. et al. Adsorption of cholera and heat-labile *Escherichia coli* enterotoxins by various adsorbents: an in vitro study. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 60, n. 4, p. 358-362, Apr. 1997.

RESENDE, N. das G. de A. da M.; MONTE, M. B. de M.; PAIVA, P. R. P. Zeólitas naturais. In: LUZ, A. B; OLIVEIRA, C. H. **Rochas e minerais industriais**: usos e especificações. Rio de Janeiro: CETEM, 2008. cap. 9, p. 889-915.

RHEE, P. et al. QuikClot use in trauma for hemorrhage control: case series of 103 documented uses. **The Journal of Trauma: Injury, Infection and Critical Care**, Baltimore, v. 64, n. 4, p. 1093-1099, Apr. 2008. Disponível em: <http://www.medicalscsca.com/files/rhee._jot_april_2008._quikclot_use_in_trauma_for_hemorrhage_control.pdf>. Acesso em: 16 nov. 2011.

RIBEIRO, C.; LOPES, S. C.; GAMEIRO, P. New insights into the translocation route of enrofloxacin and its metalloantibiotics. **Journal of Membrane Biology**, Nova York, v. 241, n. 3, p. 117-125, June 2011. Disponível em: <<http://www.springerlink.com/content/uvv82h601257q610/fulltext.pdf>>. Acesso em: 13 fev. 2012.

SHANMUGAM, V.; ROBINSON, M. H. Case report of uncontrollable pelvic bleeding: managed by a previously unreported method (QuikClot®). **Colorectal Disease**, Oxford, v. 11, n. 2, p. 221-222, Feb. 2009. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1463-1318.2008.01550.x/pdf>>. Acesso em: 16 nov. 2011.

SHINZATO, M. C. Remoção de metais pesados em solução por zeólitas naturais: revisão crítica. **Revista do Instituto Geológico**, São Paulo, v. 27/28, n. 1/2, p. 65-78, jan./dez. 2007. Disponível em: <http://www.igeologico.sp.gov.br/downloads/revista_ig/27-28_1-2_5.pdf>. Acesso em: 16 nov. 2011.

TOP, A. **Cation exchange (Ag⁺, Zn²⁺, Cu²⁺) behavior of natural zeolites**. 2001. 118 p. Dissertation (Master's Degree in Chemical Engineering) - Izmir Institute of Technology, Izmir, 2001.

TRCKOVA, M. et al. Kaolin, bentonite and zeolites as feed supplements for animals: health advantages and risks. **Veterinární Medicína**, Praga, v. 49, n. 10, p. 389-399, 2004. Disponível em: <<http://www.vri.cz/docs/vetmed/49-10-389.pdf>>. Acesso em: 16 nov. 2011.

VANCUTSEM, P. M.; BABISH, J. G.; SHWARK, W. S. The fluorquinolone antimicrobials: structure, antimicrobial activity, pharmacokinetics, clinical use in domestic animals and toxicity. **The Cornell Veterinarian**, Cornell, v. 80, n. 2, p. 173-186, Apr. 1990. Disponível em:

<<http://ukpmc.ac.uk/abstract/MED/2180631>>. Acesso em: 13 fev. 2012.

WRIGHT, J. K. et al. Thermal injury resulting from application of a granular mineral hemostatic agent. **The Journal of Trauma: Injury, Infection and Critical Care**, Baltimore, v. 57, n. 2, p. 224-230, Aug. 2004. Disponível em: <http://ovidsp.tx.ovid.com/sp-3.4.2a/ovidweb.cgi?WebLinkFrameset=1&S=ONGFFPGANPDDLDBNCBLMADCHFMMMAA00&returnUrl=ovidweb.cgi%3f%26Full%2bText%3dL%257cS.sh.15.16%257c0%257c0000537320040800000004%26S%3dONGFFPGANPDDLDBNCBLMADCHFMMMAA00&directlink=http%3a%2f%2fgraphics.tx.ovid.com%2fovftpdfs%2fFPDDNCDCMALBNP00%2ffs046%2fovft%2flive%2fgv023%2f00005373%2f0000537320040800000004.pdf&filename=Thermal+Injury+Resulting+from+Application+of+a+Granular+Mineral+Hemostatic+Agent.&pdf_key=FPDDNCDCMALBNP00&pdf_index=/fs046/ovft/live/gv023/00005373/00005373-20040800-00004>. Acesso em: 16 nov. 2011.

Z-MEDICA CORPORATION. **How QuikClot® Brand works to stop bleeding**. Wallingford, 2008. Disponível em: <<http://www.z-medica.com/healthcare/HowQuikClot-Works/QuikClot-1st-and-2nd-Generation.aspx>>. Acesso em: 15 maio 2010.

Z-MEDICA CORPORATION. **QuikClot® Product history**. Disponível em: <<http://www.z-medica.com/healthcare/AboutUs/QuikClotProductHistory.aspx>>. Acesso em: 18 jan. 2012.