

Thais Cerqueira Silva

Síntese e avaliação térmica de géis de ácido hialurônico: uso em preenchimento facial e viscosuplementação

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Química, junto ao Programa de Pós-Graduação em Química, do Instituto de Química da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de Araraquara.

Orientador: Prof. Dr. Clovis Augusto Ribeiro

Co-orientador: Prof. Dr. Fernando Luis Fertoni

Araraquara

Julho de 2019

FICHA CATALOGRÁFICA

S586s Silva, Thais Cerqueira
Síntese e avaliação térmica de géis de ácido hialurônico: uso em preenchimento facial e viscosuplementação / Thais Cerqueira Silva. – Araraquara : [s.n.], 2019
83 f. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química
Orientador: Clovis Augusto Ribeiro
Coorientador: Fernando Luis Ferttonani

1. Ácido hialurônico. 2. Proteínas - Ligações cruzadas.
3. Polímeros na medicina. 4. Análise térmica. 5. Reologia.
I. Título.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

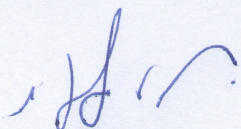
TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: "Síntese e avaliação térmica de géis de ácido hialurônico: uso em preenchimento facial e viscosuplementação"

AUTORA: THAÍS CERQUEIRA SILVA

ORIENTADOR: CLOVIS AUGUSTO RIBEIRO

COORIENTADOR: FERNANDO LUIS FERTONANI

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em QUÍMICA, pela Comissão Examinadora:

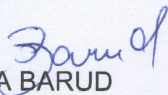
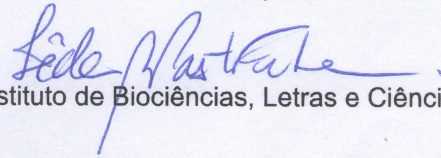


Prof. Dr. CLOVIS AUGUSTO RIBEIRO

Departamento de Química Analítica / Instituto de Química - UNESP - Araraquara

Prof^a. Dr^a. IEDA APARECIDA PASTRE FERTONANI

Departamento de Química e Ciências Ambientais / Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas - UNESP - São José do Rio Preto



Prof. Dr. HERNANE DA SILVA BARUD

Núcleo de Pesquisa em Biotecnologia / Universidade de Araraquara - UNIARA - Araraquara

Araraquara, 18 de julho de 2019

DADOS CURRICULARES

Identificação

Nome: Thais Cerqueira Silva

Nome em citações bibliográficas: Silva, T. C.

Dados pessoais

Nascimento: 22 de Janeiro de 1991 Nacionalidade: Brasileira Naturalidade: Penápolis –
SP

Filiação: Florindo Jacinto da Silva e Neuza do Santos Cerqueira Silva Civil: Solteira

Formação acadêmica

2012 – 2016: Bacharel em Química – Instituto de Biociências Letras e Ciência Exatas
Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” UNESP, Campus São José do
Rio Preto - SP.

Atividades acadêmicas

- **Trabalhos complementares à formação do Mestre:**

Estágio-docência na disciplina Laboratório de Química Analítica Qualitativa
sob supervisão do Prof. Dr Fernando Luis Fertoni.

Atuou e atua no Grupo PET-Química Ambiental sob a tutoria da Prof. Dra.
Iêda Ap. Pastre em atividades efetivas do Grupo. Atualmente é consultora para o grupo
PET.

Curso: Viscosidade e outras propriedades reológicas: Medições e aplicações.
TA instruments, 2017. Presencial, teórico-prático. AlfaVille, São Paulo, SP.

- **Trabalhos publicados e/ou submetidos a periódicos indexados:**

Oliveira, Ana Beatriz Bortolozo ; De Moraes, Fabio Rogério ; Candido, Natalia Maria ; Sampaio, Isabella ; Paula, Alex Silva ; De Vasconcellos, Adriano ; **Silva, Thais Cerqueira** ; Miller, Alex Henrique ; Rahal, Paula ; Nery, Jose Geraldo ; Calmon, Marília Freitas . Metabolic Effects of Cobalt Ferrite Nanoparticles on Cervical Carcinoma Cells and Nontumorigenic Keratinocytes. Journal of Proteome Research (Print), v. n/a, p. acs.jpoteome.6b00411, 2016.

Silva Cerqueira, Thais; Augusto Ribeiro, Clovis; Fertonani, Fernando L.; Batistuti, José P.; Pastre, Iêda Ap, Marques dos Santos, C. C.. "Preenchimento dérmico facial com produto à base de ácido hialurônico e 1,4 Butanediol diglycidyl ether" (57° CBQ/2017)

Silva Cerqueira, Thais; Batistuti, José P.; Pastre, Iêda Ap, Marques dos Santos, C. C. Fertonani, Fernando L.; Augusto Ribeiro, Clovis. "Preparo e avaliação cinética de gel a base de ácido hialurônico-BDDE" (57° CBQ/2017)

Silva Cerqueira, Thais; Augusto Ribeiro, Clovis; Fertonani, Fernando L.; Batistuti, José P.; Pastre, Iêda Ap, Guizzellini, Filipe C.. "Preenchimento dérmico facial com produto à base de ácido hialurônico e 1,4 Butanediol diglycidyl ether" (57° CBQ/2017).

Thais Cerqueira, Clovis Augusto Ribeiro, Fernando L. Fertonani, José P. Batistuti, Iêda Aparecida Pastre Fertonani, Filipe C. Guizzellini. "Dinâmica da água em géis de ácido hialurônico: avaliação térmica" (XI CBRATEC/2018)

Iêda Aparecida Pastre Fertonani, Matheus Antonio da Silva, Fernando L. Fertonani, **Thais Cerqueira**. "Avaliação da influência da matéria orgânica no tratamento térmico da caulinita" (XI CBRATEC/2018)

Iêda Aparecida Pastre Fertonani, Matheus Antonio da Silva, Fernando L. Fertonani, **Thais Cerqueira**. "Avaliação da influência da matéria orgânica no tratamento térmico da caulinita" (XI CBRATEC)/2018)

- **Participação em eventos científicos:**

Workshop de análise térmica e calorimetria, 2016. (Comissão Organizadora)

II Workshop de Metrologia em Química e Qualidade, 2017. (Comissão Organizadora)

Curso: Viscosidade e outras propriedades reológicas: Medições e aplicações. TA instruments, 2017. Presencial, teórico-prático. AlfaVille, São Paulo, SP.

57° Congresso Brasileiro de Química, CBQ, 23 a 27 de outubro de 2017, em Gramado/RS

XI Congresso Brasileiro de Análise Térmica e Calorimetria, CBRATEC, 22 a 24 de Abril de 2018, em Rio de Janeiro/RJ.

Atividades profissionais

2019

Professor de Química no Centro de Estudos Phillips, São José do Rio Preto - SP

2018

Professor de Química no Centro de Estudos Phillips, São José do Rio Preto – SP

Professor Química Geral, plataforma Super Prof, São José do Rio Preto - SP

Coordenador Local de aplicação Enem 2018 – Fundação Cesgranrio, Ilha Solteira - SP

2017

Professor de Química no Centro de Estudos Phillips, São José do Rio Preto - SP

Coordenador Local de aplicação Enem 2017 – Fundação Cesgranrio, Ilha Solteira - SP

Dedico esse trabalho à minha mãe Neuza dos S. Cerqueira Silva, ao meu pai Florindo J. Silva pela paciência e confiança. Agradeço por acreditar e apoiar todos meus sonhos e objetivos.

AGRADECIMENTOS

Dedico meu agradecimento em primeiro lugar a Deus e a todos meus familiares Neuza, Florindo, Maria, José, Maria José, Ellis, Julius César, Marina, Marcus Vinicius, Letícia, Heitor, Guilherme, Elsa, Vanessa, Odair, Inez, José, Alexander, Daniele José Cerqueira e Helena que contribuíram na minha formação, dando o apoio fundamental para permanecer em busca dos meus sonhos e objetivos, ensinando valores e princípios fundamentais em minha formação pessoal.

Meus sinceros agradecimentos ao meu orientador Dr. Prof. Clóvis Augustos Ribeiro, ao meu co-orientador Prof. Dr. Fernando Luis Fertoni e ao Prof. Dr. José Paschoal Batistuti pela total dedicação em minha formação científica, tornando em um profissional mais maduro e ético em busca do desenvolvimento científico e tecnológico. Muito obrigada pela confiança, colaboração e, sobretudo, pelo valioso conhecimento a mim passado.

A todos meus companheiros de pesquisa do Laboratório de Fotoquímica UNESP\IBILCE Laboratório de Análise Térmica IQ/UNESP, Bruno, Filipe, Diógenes, Cecília, Carla, Jovan, José Ricardo, Thomas, Nathalia, Paulo, Tony, Luciana, João, Gilmarcio Gabriel, Matheus em Especial a Prof. Dr Marisa Spirandeli Crespi.

Agradeço aos meus amigos do grupo PET – Programa de Educação Tutorial em especial a minha tutora Prof. Dr. Iêda Aparecida Pastre Fertoni por contribuir no meu desenvolvimento pessoal e profissional frente as ações de trabalho de ensino, pesquisa e extensão.

Agradeço também a todos os professores e funcionários e Alunos do Instituto de Química, Instituto de Biociências Letras e ciência exatas por compartilharem comigo conhecimento e experiência que levarei por toda minha vida.

“Imagination is everthing it is the preview of lifes
coming attractions.”

Albert Einstein (1879-1955)

RESUMO

O envelhecimento suscitou nas pessoas a procura por procedimentos para a diminuição das rugas, sulcos e sinais de envelhecimento. Diversas técnicas de rejuvenescimento são sugeridas para tratar os aspectos visuais do envelhecimento facial. Os enchimentos são uma ferramenta importante para combater tais fenômenos. Existem muitos tipos de preenchedores dérmicos usados nas práticas clínicas de rotina, porém com baixo tempo de permanência na região de preenchimento. Os principais tipos de agentes de enchimento são: 1- de proteína (colágeno dérmico); 2- polissacarídeos (ácido hialurônico); 3- gordura; e 4- agentes sintéticos. Dentre estes, o ácido hialurônico é um importante composto para o aumento do volume da pele, por ser biocompatível, não imunogênico, etc. Para fins de enchimento, o ácido hialurônico deve ser estabilizado por reticulação química, resultando num polímero viscoelástico insolúvel em água, menos susceptível à degradação enzimática e com melhor elasticidade, comparados ao produto in natura. O objetivo deste trabalho foi obter géis reticulados a partir de ácido hialurônico, empregando-se o agente reticulante 1,4- butanodiol diglicidil eter, frente a distintas relações massa/massa do agente, buscando a preparação de géis de alta hidrofiliabilidade. Em concordância com os objetivos deste trabalho foi possível, confirmar a produção/preparação de géis de alta hidrofiliabilidade e com cadeias efetivamente elásticas e baixo grau de reticulação. Os géis produzidos são mecânica e quimicamente estáveis e foram caracterizados do ponto de vista cinético e estrutural, por ensaios gravimétricos de intumescimento, e comparados aos ensaios obtidos por TG-DTA, DSC, FTIR, Reologia e de microscopia ótica das superfícies dos géis. Foram obtidos géis com elevado grau de intumescimento e com partículas apresentando esfericidade, o que agrega ganho efetivo às propriedades visco elásticas do produto, importante no que tange à aplicação subcutânea.

Palavras chaves: Ácido hialurônico; Ligações cruzadas; Polímeros na medicina; Análise térmica; Reologia

ABSTRACT

Aging has led people to look for procedures to reduce wrinkles, furrows and signs of aging. Several rejuvenation techniques are suggested to treat the visual aspects of facial aging. Fillers are an important tool to combat such phenomena. There are many types of dermal fillers used in routine clinical practice, but with a low dwell time in the filling region. The main types of fillers are: 1- protein (dermal collagen); 2- polysaccharides (hyaluronic acid); 3-fat; and 4-synthetic agents. Among these, hyaluronic acid is an important compound for increasing the volume of the skin, because it is biocompatible, non-immunogenic, etc. For filling purposes, hyaluronic acid should be stabilized by chemical crosslinking, resulting in a water insoluble viscoelastic polymer, less susceptible to enzymatic degradation and with better elasticity, compared to the in natura product. The objective of this work is to obtain crosslinked gels from hyaluronic acid, using the cross-linking agent 1,4-butanediol diglycidyl ether, against different mass / mass ratios of the agent, in order to prepare high hydrophilicity gels. In agreement with the objectives of this work, it was possible to confirm the production / preparation of gels of high hydrophilicity and with elastic chains and low degree of crosslinking. The gels produced are mechanically and chemically stable and were characterized from a kinetic and structural point of view by gravimetric swelling tests and compared to the tests obtained by TG, DSC, FTIR rheology and optical microscopy of the surfaces of the gels. Gels with a high swelling degree and with spherical particles were obtained, which adds an effective gain to the viscoelastic properties of the product, important for subcutaneous application.

Keywords: Hyaluronic acid; Crosslinking; Polymers in medicine; Thermal analysis; Rheology

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1.** I. Estrutura primária do AH: unidades repetidas dissacarídicas do ácido hialurônico II. Estrutura secundária do AH. III. **(A, B)** Estrutura terciária do AH: Estrutura de fita enovelada da molécula de AH. Imagens AFM ref. 165. Bar = 250 nm.....16
- Figura 2.** Sugestão de mecanismo para a formação das ligações entrecruzadas nos géis.....19
- Figura 3.** A formulação do gel a base de ácido hialurônico utilizando variações de volume do agente reticulante BDDE 13, 25, 37, 50%.....28
- Figura 4:** Efeito das razões mássicas gel reticulado com BDDE 13%, 25%, 37% 50% no estudo do intumescimento do gel como função do tempo (h).....36
- Figura 5a- (A)** Infravermelho (ATR-FTIR) reagentes e o gel de ácido hialurônico(AH) com 50%BDDE; **(B)** ampliação da região de 500 a ~2000 cm^{-1} 38
- Figura 51b.** (A) Infravermelho (ATR-FTIR) do gel: purificado (GBDDE) e não purificado (GBDDEST); (B) ampliação: 1000 a 2000 cm^{-1} 40
- Figura 6a-** Micrografias do gel preparado com 50%BDDE: **D, E, F)** GBDDE gel lavado com solução tamponante, PBS, e intumescido; **G, H, I)** GBDDE lavado e adicionado de 10% de HA (GBDDE10%); **A, B, C)**, sem lavar e intumescer com PBS, GBDDEST.....4
- 3
- Figura 6b.** 2b1) Ensaio de extrusão, para o gel, 50%BDDE; 2b2) transparência do gel 50%BDDE antes e após a adição de 10%HA intumescido.....43

Figura 7. Valores de n como função dos teores de BDDE. Valores de $0,45 \leq n \leq 0,50$, controle pelo processo de difusão de Fick.....	53
Figura 8. Valores de D , coeficiente de difusão, em solução tamponante, pH 6,5; 7; 7,5; sem e com ajuste $I = 0,145 \text{ mol L}^{-1}$. Traço: $D_{H_2O} = 5,0 \times 10^{-5} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$, valor referência; 25 °C.....	54
Figura 9. Valores de M_c como função dos pH 6,5; 7,0 e 7,5. Para géis reticulado com BDDE 13%, 25%, 37% e 50%.....	55
Figura 10. Valores de q (índice de densidade de reticulação) como função com %BDDE como agente reticulante 13%, 25%, 37% e 50%, para os pH 6,5; 7,0; 7,5.....	56
Figura 11. Valores de V_e como função com %BDDE como agente reticulante 13%, 25%, 37% e 50%, para os pH 6,5; 7,0; 7,5.....	57
Figura 12. Curvas DSC para géis de AH com $13 \leq \%BDDE \leq 50\%$; intumescidos a pH 7,0; a) sem ajuste de I ; b) $I = 0,156 \text{ mol L}^{-1}$, em NaCl. Detalhe: sinal em -18°C . $\beta = 5^\circ\text{C min}^{-1}$; cadinho: Al, 50 μL , aberto; atmosfera estática inerte: de N_2	59
Figura 13. a) Curvas DSC com diferentes %BDDE: 16 a 50%; intumescido a pH 7 $I = 0,145 \text{ mol L}^{-1}$, em NaCl; b) Ampliação sinal em -18°C ; condições experimentais iguais as da Fig.12.....	64
Figura 15. Curvas DSC gel HA-BDDE, intumescido a pH 7; $I = 0,156 \text{ mol L}^{-1}$, em NaCl. Amostras aquecidas previamente para remoção parcial do solvente até a $T = 80, 60, 25^\circ\text{C}$ resfriamento prévio a $T = -80^\circ\text{C}$ e obtenção das curvas DSC de aquecimento; condições experimentais iguais as da Fig.12.....	68
Figura 16. Módulo elástico (G') função da frequência de oscilação 0,1 a 2 Hz. Para géis de HA reticulado com BDDE 13%, 25%, 37% e 50%	70
Figura 17. Módulo viscoso (G'') função da frequência de oscilação 0,1 a 2 Hz.. Para géis de HA reticulado com BDDE 13%, 25%, 37% e 50%.....	71
Figura 18. Tangente de delta função da frequência de oscilação 0,7Hz. Para géis de HA reticulado com BDDE 13%, 25%, 37% e 50% e produtos comerciais Boloterio Basic, Juvederm Ultra, Juvederm Ultra Plus e Restylane.....	74
Figura 19. Viscosidade complexa (η^*) função da frequência de oscilação 0,1 a 100 Hz. Para géis de HA reticulado com BDDE 13%, 25%, 37% e 50%.....	75
Figura 20. Viscosidade complexa (η^*) função da frequência de oscilação 0,1 a 2 Hz em escala logarítmica. Para géis de HA reticulado com BDDE 13%, 25%, 37% e	

50%.....	75
Figura S3- Valores de %Q e do Q% _{máx.} obtidos a partir das curvas Q% vs. t para pH 6,5, 7,0, 7,5; sem a) e com ajuste I= 0,145 mol L ⁻¹ b); 13, 25, 37 e 50%BDDE.....	48
Figura S3a. Curva Log F vs. log t, para o gel de 36,6% BDDE; sem a) e com ajuste I= 0,156 mol L ⁻¹ b).....	49
Figura S4: A curva TG apresentada a seguir foi obtida para o gel preparado pela adição de 13%BDDE, e a perda de massa de água livre foi utilizada nos cálculos citados anteriormente. Esta curva é representativa das demais.....	66
Figura S5- Experimento de varredura contínua para a verificação a estabilidade dos picos das curvas de resfriamento e aquecimento, respectivamente. Número de ciclos: 5 ciclos; intervalo de temperaturas (-80°C ≤ T ≤ 25°C); último ciclo -80° até 120°C. Gel de 13 %BDDE	67

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1:** Número de procedimentos estéticos realizados no Brasil, Japão e França em 2016, pelo estudo internacional estatístico sobre procedimentos estéticos cosméticos realizado em 2016 pelo ISAPS.....22
- Tabela 2:** Determinação de pH dos reagente e amostra em etapa de síntese.....34
- Tabela 3.** Teores de AH encontrados nos géis reticulados com BDDE 13%, 25%, 37% 50%
- Tabela 4.** a) Grau de intumescimento $Q\%$, n (expoente difusional), D , coeficiente de difusão, em relação a %BDDE usada na síntese dos géis e dos parâmetros experimentais: pH (6,5; 7; 7,5) e I (sem e com ajuste $I = 0,156 \text{ mol L}^{-1}$); 25 °C51
- Tabela 5.** Dados de DSC para água livre e ligada para géis de HA reticulado com BDDE 13, 25, 37 e 50% e produto comercial Rennova Lift, concentração de AH, grau de reticulação relativo.....61
- Tabela 6.** Resumo dos valores dos parâmetros G' , η^* , G'' e $\tan \delta$ para a frequência de 0.7 Hz e os valores da massa molar média para os géis preparados.....69
- Tabela S1.** Principais bandas de absorção dos espectros IR obtidas a partir dos reagentes; gel AH-BDDE puro; géis purificados (GBDDE) e não purificado (GBDDEST)4
- 1
- Tabela S2:** Valores de ΔH de cristalização e de fusão da água e as respectivas temperaturas (T_{onset}) para a recristalização e T_{pico} para a fusão. Valor referência para o $\Delta H_{\text{normalizada}}$ da água.....65

Sumário

Síntese e avaliação térmica de géis de ácido hialurônico: uso em preenchimento facial e viscosuplementação	1
DADOS CURRICULARES	2
Dados pessoais	2
Formação acadêmica	2
Atividades acadêmicas	2
• Trabalhos publicados e/ou submetidos a periódicos indexados:	2
• Participação em eventos científicos:	3
Atividades profissionais	4
2018 4	
AGRADECIMENTOS.....	6
RESUMO.....	8
ABSTRACT.....	9
LISTA DE ILUSTRAÇÕES.....	10
LISTA DE TABELAS.....	17
1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	15
1.1. Ácido Hialurônico (AH).....	15
2.1.1. Estrutura química	15
2.1.2. Modificação do grupo hidroxílico	18
2.2. Reticulação	18
2.3 Intumescimento.....	20
2.4. Análise Térmica	21
2.5. Médicas e cosméticas	22
2.6. Preenchimentos faciais ou viscoamento	23
2.7. Viscosuplemento.....	24
2.8. Propriedades Reológicas	25
2. OBJETIVOS.....	26
2.1. Objetivos gerais	26
2.2. Objetivos específicos	26

3.	MATERIAIS E MÉTODOS	28
4.1.	Materiais	28
	Reagentes utilizados na síntese do gel (AH-GBDDE)	28
4.2.	Formulação do gel de ácido hialurônico-BDDE	28
4.5.	Obtenção dos parâmetros cinéticos e estruturais das membranas do géis	29
4.6.	Equipamentos	31
4.6.1.	Espectroscopia de infravermelho (ATR-FTIR).....	31
4.6.2.	Microscopia Óptica.....	31
4.6.3.	Obtenção das curvas DSC.....	32
4.6.4.	Avaliação reológica dos géis.....	32
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
4.3.	Avaliação da Evolução do pH no Processo de Síntese	33
4.4.	Estudo da Razão de Intumescimento dos Géis.....	33
4.4.1.	Calculo da Concentração de AH presente nos Géis	35
	Avaliação Morfoestrutural das superfícies dos géis	40
	Obtenção dos parâmetros cinéticos e estruturais dos géis.....	43
4.2.	Ensaio térmico.....	56
5.2.1.	Calorimetria exploratória diferencial (DSC)	56
5.3.	Avaliação das Propriedade Reológicas dos géis.....	67
5.	Considerações Finais.....	74
6.	CONCLUSÕES.....	76
7.	PERSPECTIVA DO ESTUDO	76
8.	REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA	77

1. INTRODUÇÃO

Preenchedores dérmicos são indicações cosméticas e médicas usadas em prática clínica de rotina. O período de permanência do material preenchedor pode ser classificada de acordo com a composição do produto, como temporário (ex. colágeno), semipermanente (ex. Hidroxiapatita de Cálcio) ou permanente (ex. Polímeros de dimetilsiloxano). Dentre os diferentes materiais para preenchimento temporário o ácido hialurônico é o mais utilizado, sendo possuidor um vasto campo de aplicação. (Sánchez-Carpintero, 2010)

O ácido hialurônico (AH) pode ser modificado no grupo carboxílico, hidroxílico, acetamida e no terminal reduzido do polímero por reações de esterificação, eterificação, dentre outras. A reticulação pode ser realizada a partir da exposição direta do AH ao agente reticulante, em meio alcalino. A maioria dos métodos apresentados na literatura Kogan et. al. em 2006 para reticular o AH emprega reagentes polifuncionais (ex.: bis-epóxidos, carbodiimidias e divinilsulfona) (Kogan et. al., 2006).

O processo de reticulação química altera principalmente a solubilidade e as propriedades físicas e reológicas da molécula de AH, gerando géis com alta capacidade de intumescimento (La Gatta, et. al., 2016). O processo de intumescimento é governado por fatores físico-químico como presença de forças de coesão, grupos hidrofílicos, densidade de reticulação, e flexibilidade da cadeia do polímero favorecendo, sinergicamente, o intumescimento (MASON, 2000).

A presença de grupos hidrofóbicos, além da densidade de reticulação, e a presença de íons desfavorecem a absorção de água, assim como o pH e a composição do solvente são fatores externos que interferem no processo de formação do gel. Neste contexto, o objetivo do projeto foi preparar o gel de AH utilizando como agente reticulante o 1,4 Butanodiol diglicidil éter (BDDE) e a avaliação térmica e estrutural dos géis e a cinética do processo de intumescimento.

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1. Ácido Hialurônico (AH)

O ácido hialurônico similarmente identificado por hialuronato de sódio, hialuronan ou *Natrii hyaluron*; de acordo; com o campo de aplicação na literatura científica. É encontrado naturalmente nos tecidos conjuntivos de mamíferos, e pode ser extraído da pele, tendões, fluido sinovial e do cordão umbilical, existindo nestes dois últimos tecidos em altas concentrações. A produção deste polímero é comumente realizada por processos fermentativos com microrganismos do gênero *Streptococcus*, sendo uma alternativa mais favorável em relação à extração de tecido animal já relatados. (BARBUCCI, R,2002).

Os avanços de diversos biomateriais para as áreas médica e cosmética nas ciências de polímeros e tecnologias correlatas, têm promovido o desenvolvimento das áreas com o ácido hialurônico (AH) possui um vasto campo de aplicação devido a suas características físico-químicas e biológicas.

O desenvolvimento de técnicas associadas basicamente às características estruturais do AH, permite às possíveis modificações químicas do polímero de acordo com o uso, as quais indicam suas propriedades reológicas, de solubilidade, de hidratação e de reconhecimento celular específico; além disso, o AH é não imunogênico, biocompatível e biodegradável, sendo ele um polissacarídeo natural linear composto de repetidas unidades dissacarídicas de ácido D-glicurônico (GlcUA) e N- acetilglicosamina (GlcNAc), unidas alternadamente por ligações glicosídicas β -1,3 e β - 1,4. (Kogan et. al.,2006; Mohammed Al-Sibani et. al 2015).

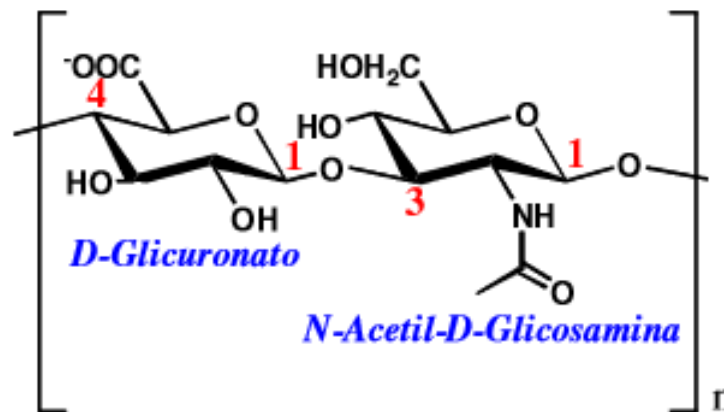
2.1.1. Estrutura química

As características estruturais do polímeros de AH é invariável independente da fonte de obtenção do material, no qual se diferem somente pela massa molecular de cada polímero que está relacionando ao comprimento e ao número de unidade presentes nas cadeias, obtidas de acordo com o processo de extração e purificação, registrando a variação de massa molar ente a faixa 10^4 a 10^7 Da. (Hascall & Laurent, 1997).

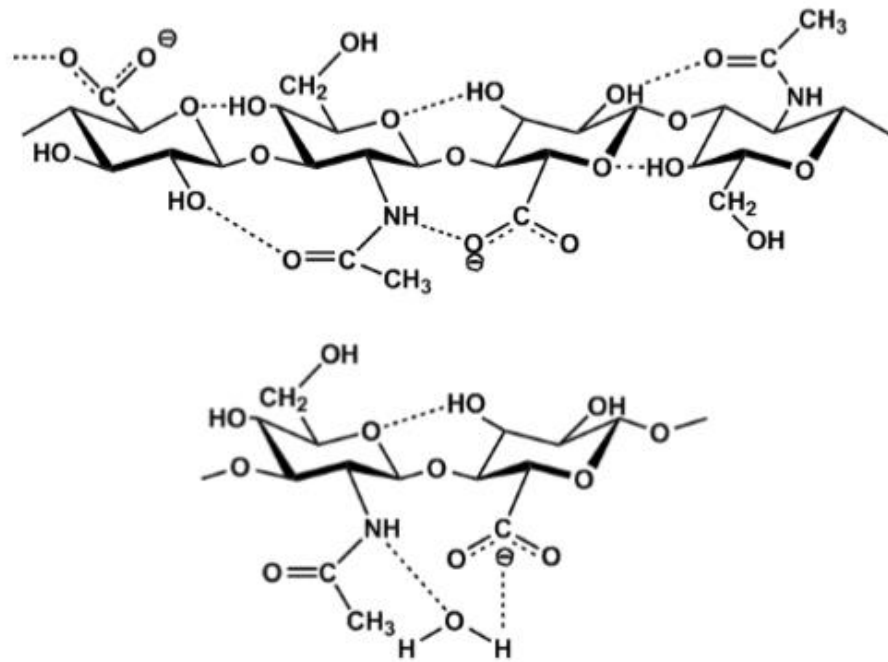
O AH possui uma estrutura primária, secundária e terciária. A estrutura primária é composto de repetidas unidades dissacarídicas de ácido D-glicurônico (GlcUA) e N-acetilglicosamina (GlcNAc), unidas alternadamente por ligações glicosídicas β -1,3 e β -1,4. A secundária é responsável pelas ligações intra e intermoleculares do polímeros que ocorrem majoritariamente por ligações de hidrogênio advindas pelos grupos acetamida (CH_3CONH_2), carboxilato (COOH) e hidroxílico(OH) da molécula e por moléculas de água do solvente. (Kogan et. al.,2006).

A estrutura terciária do polímero de AH é formada por cadeias posicionadas de forma antiparalela causando um enovelamento e formando uma fita torcida que se estabiliza através de pontes de hidrogênio, interações eletrostáticas que dá origem a estrutura tridimensional do polímero. (Brown & Jones, 2005, Cowman, M. K.; Matsuoka, K., 2005)

Figura 1. I. Estrutura primária do AH: unidades repetidas dissacarídicas do ácido hialurônico **II.** Estrutura secundária do AH. **III. (A, B)** Estrutura terciária do AH: Estrutura de fita enovelada da molécula de AH. Imagens AFM ref. 165. Bar = 250 nm

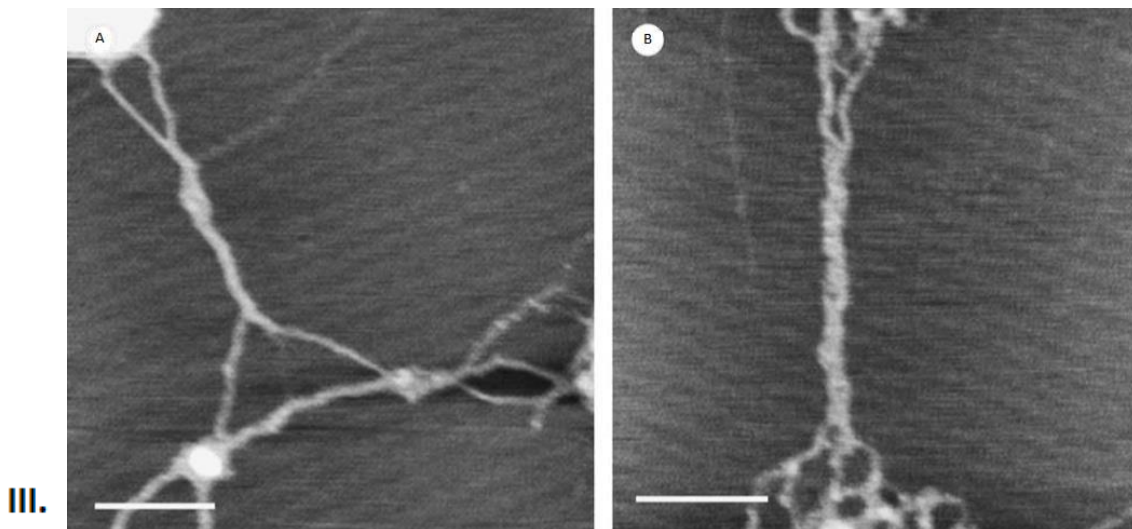


I. n = número de repetições de unidades dissacarídicas



II.

(Adaptado de Almond et al., 1998).



III.

Referência: Cowman, M. K.; Matsuoka, K. Carbohydrate Research. 2005 Pag. 791–809

A estrutura terciária do AH como identificada na Figura 1 por AFM apresenta sua estrutura de fita enovelada atribuídos as interações moleculares existentes no polímero. Neste caso, essa características também lhe confere através da presença de grupos carboxílicos por unidade de ácido glicurônico que identifica um polímero

altamente hidrofílico. Portanto, esta qualidade torna este polímero um material com propriedade que lhe confere um caráter polianiónico em pH 7; que em meio aquoso lhe torna altamente polar, conseqüentemente, altamente solúvel em água. A promoção de uma abertura das cadeias enoveladas que ao expandir em meio aquoso lhe permitem um aumento de até 1000 vezes de volume, formando uma matriz com alto grau de intumescimento. Estas propriedades podem ser modificadas de acordo com o pH, e com as modificações químicas realizadas no produto, como exemplo a reticulação. (Boulléa, K., 2013).

2.1.2. Modificação do grupo hidroxílico

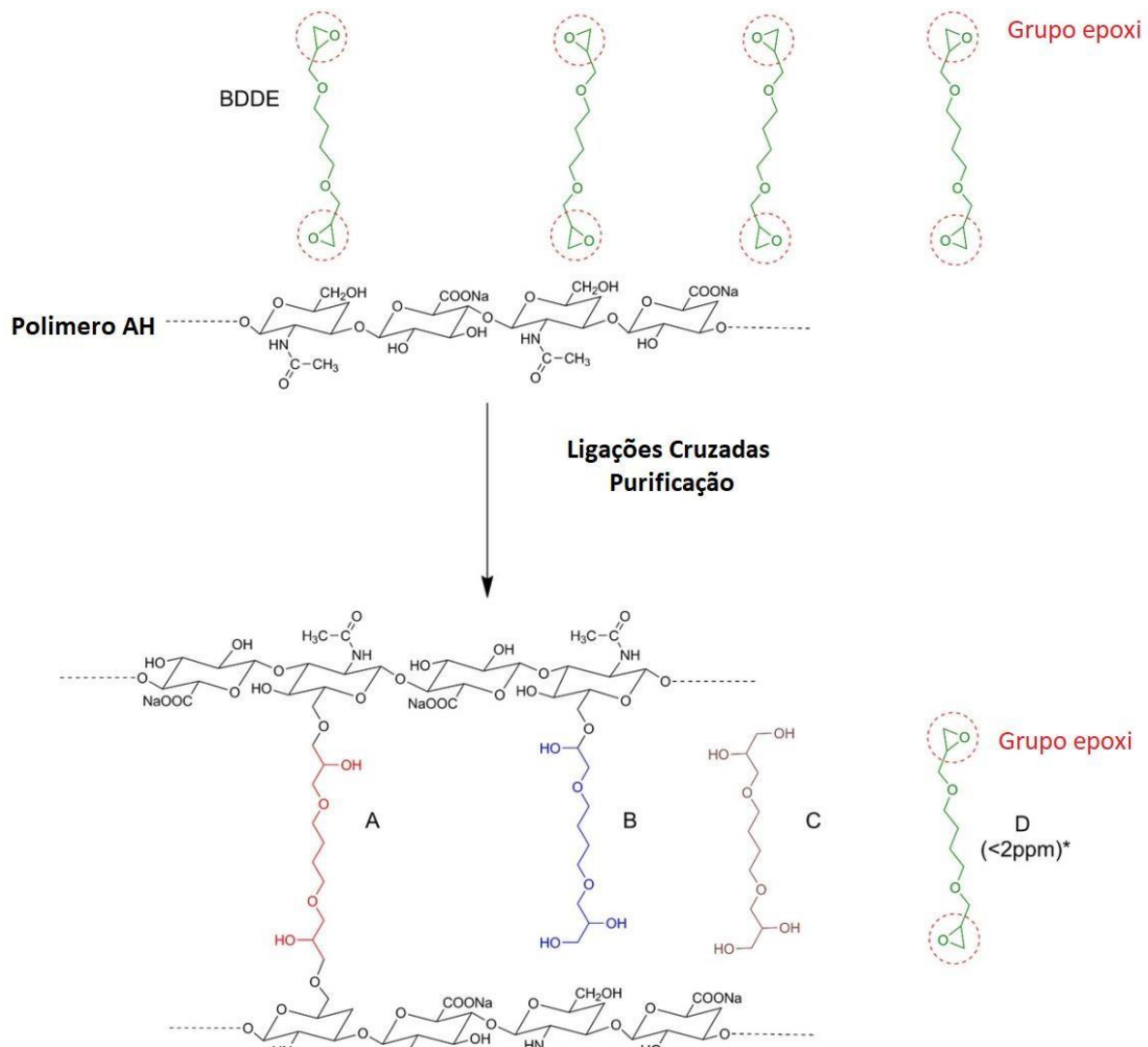
As modificações químicas realizadas no polímero de AH promovem a formulação de uma gama variada de produtos bioaplicáveis. A estrutura do AH, este material pode ser modificado no grupo carboxílico, hidroxílico, acetamida e no terminal reduzido do polímero através de reações de esterificação, eterificação, reações mediadas por carbodiimidas, acilação, acoplamento com isouréia, oxidação com periodato, sulfatação, aminação redutiva, dentre outras. (Garg & Hales, 2004). Entre elas as modificações realizadas no grupo hidroxílico permitem formular produtos com características estruturais bem específicas, que promovem uma modificação nas características físico-química, mecânicas e biocompatíveis; além do aumento no tempo de resistência ao efeito da biodegradabilidade quando comparamos com o polímero de AH natural. Este processo pode ser realizado por meio da reticulação do polímero, utilizando moléculas de cadeias carbônicas variadas ligadas por intercruzamento nos grupos hidroxilas. (Boulléa, K. de *et. al.*, 2013)

2.2. Reticulação

As modificações do ácido hialurônico (AH) através da adição de moléculas em sua cadeia, permite ser modificado através de reações de reticulação. A reticulação pode ser realizada através da exposição direta do AH ao agente reticulante, ou através da reação de um derivado de AH altamente reativo previamente sintetizado com o agente reticulante em uma reação secundária. (Von Lospichla, B., 2017) A maioria dos métodos reportados para reticular o AH emprega reagentes polifuncionais tais como bis-epóxidos, carbodiimidas e divinilsulfona. A modificação química do ácido hialurônico

(AH) com divinilsulfona (DVS) para preparação de géis reticulados envolvem os grupos hidroxílicos do AH, enquanto que a modificação mediada por carbodiimida envolve os grupos carboxílicos do AH e o grupo amina do fosfolípídeo. (KABLIK, J. de *et. al.* , 2009).

Figura 2. Sugestão de mecanismo para a formação das ligações intercruzadas nos géis formados a partir de AH e o agente reticulante 1,4 Butanodiol diglicidil eter (BDDE)



Referência: Boulela, Koenraad de *et. al.* *Dermatol Surg* 2013;39: 1758– 1766.

Como descrito por Boulela, Koenraad *et. al.* (2013) o processo de reticulação química altera principalmente a solubilidade e as propriedades físicas e reológicas da

molécula de AH gerando géis com alta capacidade de intumescimento. A relevância da obtenção de géis reticulados de AH está nas aplicações em estética facial, em cosméticos e nas aplicações médicas que exigem viscosuplementação. As modificações químicas realizadas com o AH como observado na Figura 2. Utiliza como agente reticulante moléculas de BDDE através dos grupamentos epóxido que após abertura do anel de ligação do ciclo se ligam a estrutura de AH gerando produtos de alto valor agregado ainda inexistente no mercado brasileiro, atribuindo relevância as pesquisas de desenvolvimentos relacionados a este tema.

2.3 Intumescimento

Alguns dos fatores que contribuem para popularidade do polímero reticulado de AH além de sua biossegurança na metabolização na utilização como preenchedores, é devido a rentabilidade de síntese deste produto, promovido pelo alto grau de intumescimento. Assim, os géis podem ser definido como sistemas hidrofílicos. (Boullea, K. *et. al.*, 2013). Este sistema intumescido formado pela união de componentes estruturado por ligações com características covalente ou/e eletrostáticas permitem uma matriz tridimensional que favorece a sua interação com moléculas de água. A quantidade de água adsorvida pelos hidrogéis geralmente está relacionada com a hidrofiliçidade das cadeias e a quantidade de agente reticulante utilizada na síntese, além do pH em que o meio está inserido. (Lin, Hai *et. al.*, 2015)

Os fatores de controle do sistema são, densidade de cadeias poliméricas; quantidade de agente de reticulação; balanço hidrofílico e hidrofóbico possibilita a obtenção de matrizes com propriedades mecânicas e estruturais ajustadas para um grau de intumescimento adequado para uma determinada aplicação. Como exemplo da metilcelulose sintetizada juntamente com acrilamida obtiveram hidrogéis com maior hidrofiliçidade atribuído a maior presença dos seus grupo hidroxilas. (Aouada, Fauze A. *et. al.*, 2009)

Outros parâmetros importantes para o processo de intumescimento além das condições do meio, tais como, força iônica e pH; os parâmetros cinéticos e estruturais têm forte influência no sistema, estes parâmetros são descritos na literatura científica de Aouada, Fauze A. *et. al.* (2009) como expoente difusional (n); constante de difusão (k); coeficiente de difusão (D) e parâmetros estruturais como massa molar média entre retículos (Me); densidade de reticulação (q) e número de cadeias efetivamente elásticas

por unidade de volume (Ve). O parâmetros relatados podem ser obtidos somente pelas curvas de grau de intumescimento em função do tempo.

Para a compreensão do comportamento do sistema e de seus parâmetros cinético o conceito da lei de difusão de Fick deve ser utilizado, por abordar matematicamente através de equações diferenciais desenvolvidas com base na conservação da massa da substância percolante. Segundo a lei de Fick a difusão dessa substâncias são dependentes do tempo, onde é possível analisar a variação da concentração da substância considerando o fluxo do soluto tornando uma relação simples entre o coeficiente de difusão e a concentração do fluido que assume uma dependência exponencial (Neogi, 1996).

2.4. Análise Térmica

É definida pela Confederação Internacional de Análise Térmica e Calorimetria (ICTAC), como sendo “um grupo de técnicas nas quais, uma propriedade física de uma substância e/ou seus produtos de reação é medida como função da temperatura, enquanto a substância é submetida a um programa controlado de temperatura”.

Consideradas como técnicas termoanalítica, ela apresenta como características analíticas: 1- Uma propriedade física tem que ser medida, 2- A medida deve ser representado em função da temperatura, 3- A medida tem que ser feita sob um programa controlado de temperatura. Dentre as técnicas difundidas e utilizadas são: Termogravimetria, Termogravimetria Derivada (TG, DTG), Análise Térmica Diferencial (DTA), Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC), Detecção de gás desprendido (EGA), Análise termomecânica (TMA), etc. Estas técnicas permitirão se obter informações com respeito: 1- as etapas de perda de massa e respectivas temperaturas para a eliminação de água em suas diferentes etapas, importante informação quanto a retenção da água e suas formas presentes, podendo-se, possivelmente, correlacioná- las com o grau de reticulação; 2- a estabilidade térmica do produto, informações quanto a pureza, do produto, e as etapas de liberação e, ou evolução de calor, no estudo da síntese do gel; 3- permitindo, ainda, a investigação da cinética da reação de polimerização; dentre outras. (Edsman katarina de *et. al.*, 2012)

As informações provenientes da análise térmica permitirão não só o desenvolvimento e melhoramento do produto, associada à técnica, como a

possibilidade de aplicação, a posterior, para ao controle da qualidade do produto permitindo atribuir a melhor aplicação medicas e cosmética para o gel.

2.5. Médicas e cosméticas

Sánchez-Carpintero, de *et. al.* 2010 descreve uma vasta área de aplicação do polímero de ácido hialurônico, tais como: 1-Viscocirurgia protege os tecidos delicados como em cirurgias oftalmológicas. 2-Viscoaumento ou preenchimento que aumenta os tecidos com danos e cicatrizes. 3- Viscosuplementação recompõem os fluidos como a exemplo do fluido sinovial responsável pela formação de artrites e osteoartrites. 4- Viscoproteção que promove a renovação de tecidos ao proteger os tecidos danificados evitando ressecamento da região. 5-Viscosseparação aplicada a regiões traumatizadas como separador para prevenir a formação de tecidos que dificultem processo cirúrgico e maior formação de cicatrizes.

Tabela 1: Número de procedimentos estéticos realizados no Brasil, Japão e França em 2016, pelo estudo internacional estatístico sobre procedimentos estéticos cosméticos realizado em 2016 pelo ISAPS

Procedimentos estéticos Não-cirúrgicos:		
BRASIL	JAPÃO	FRANÇA
Toxina Botulínica 472.615	Ácido Hialurônico 192,730	Ácido Hialurônico 120,156
Ácido Hialurônico 279,785	Toxina Botulínica 183,429	Toxina Botulínica 101.498
Depilação 73,370	Depilação 177.444	Redução de gordura não cirúrgica 9,196
Peeling Químico 54.285	Foto Rejuvenescimento 120,640	Depilação 8,018
Tratamento Celulite 28,930	Apertonãocirúrgicodapele100.904	Casca Química4.807

Fonte: ISAPS - Global Statistics 2016

A gama de aplicações médicas e cosméticas do ácido hialurônico causou uma forte influência no mercado de procedimentos estéticos não cirúrgicos. No estudo global realizado pelo ISAPS em 2016 (ISAPS - Global Statistics 2016) Mostrou que o Brasil é um forte mercado consumidor de ácido hialurônico estando somente abaixo dos Estados Unidos em nível mundial. Além disto entre todos procedimentos estéticos não cirúrgicos realizados compõem em todos os países posições de 1° ou 2° lugar na avaliação, acima de técnicas altamente difundidas como peeling, depilação e uso de toxina botulínica que vem a cada ano sendo substituído pelo uso de preenchedores faciais.

2.6. Preenchimentos faciais ou viscoamento

Os enchimentos são ferramentas importantes no arsenal médico para tratar os fenômenos ocorrido pelo envelhecimento. Uma grande variedade de substâncias preenchimento estão agora disponíveis para satisfazer as vontades dos pacientes, mas esta longe, de atender todas as necessidades em medicina estética. Existem muitos tipos de preenchedores dérmicos, os quais são usados para indicações cosméticas e médicas na prática clínica de rotina. (Sánchez-Carpintero, de *et. al.* 2010). Os enchimentos podem ser classificados como temporário, semi-permanente ou permanente, dependendo da duração da substância no tecido. Eles podem ser classificados também pela composição do produto. (Kogan, G., *et. al.*, 2006). Dentre os materiais o ácido hialurônico é entre os outros enchimentos temporários o mais utilizado para uso cosmético. Isto é devido à facilidade de aplicação dos materiais de enchimento com base nesta substância, os bons resultados obtidos, e seu perfil de segurança. (Boullea, K. de *et. al.*, 2013).

Substâncias de enchimento são injetadas para dentro ou abaixo do tecido dérmico para substituir o volume perdido ou aumentar o volume existente. A injeção de agentes de preenchimento é menos invasiva do que a colocação de implantes. A maioria das substâncias de preenchimento não são permanentes; existem muitos agentes, em geral, as soluções mais "fisiológicas" tendem a dar os resultados mais naturais e mais duradouros; por exemplo, a gordura é ideal para defeitos de contorno profundas, assim como o colágeno funciona bem para os defeitos superficiais, mas as qualidades ideais de substâncias de preenchimento incluem os seguintes atributos: boa correção, efeitos duradouros, uma aparência natural, propensão para não migrar, facilidade de implantação e de baixo custo, facilmente disponível, inerte, não carcinogênico, não imunogênico, estéril e facilmente removido . (L. J. Lapcík, de *et. al.*, 1998).

Nenhuma substância tem todas essas qualidades, assim o médico deve escolher os mais adequados para a tarefa em mãos, no mercado atual se encontra disponível para o mercado géis de preenchimento facil sintetizado com divinil sulfona (*Hylaform, Captique, e Prevelle Genzyme Co. , Cambridge, MA*) éter diglicídico (*Restylane, Q-Med, Uppsala, Suécia, Juvederm, Allergan, Irvine, CA e Belotero, Anteis*

SA, Genebra, Suíça) ou bi-epóxidos (PurDETTRANSP 575VAGASagen Mentor, Santa Bárbara, CA) (Jeffrey Kablik et al., 2009)

2.7. Viscosuplemento

A osteoartrose é caracterizada por dor e disfunção articular progressivas decorrentes de destruição da cartilagem e do osso subcondral com ocorrência de redução do espaço articular, inflamação/sinovite e formação de osteófitos periarticulares. (J. Necas, L. 2008). Dentre as grandes articulações, a do joelho é a mais afetada, e resulta em déficit funcional de 10% dos indivíduos acima de 55 anos e em 25% em casos de doença avançada. (E. Neovius, 2013)

Atualmente, não existem estudos epidemiológicos no Brasil que elucidem com precisão a prevalência da osteoartrose ou os gastos públicos relacionados com a doença. Tendo em vista o aumento importante da expectativa de vida da população brasileira e o aumento da proporção de idosos, este fato deve ser considerado de interesse em saúde pública. Existem várias opções de tratamento para a osteoartrose. Dentre elas estão redução do peso, fisioterapia, exercícios físicos e dispositivos extra-articulares para assistência à função. (P.A. Dieppe, L.S., 2005)

As opções de terapia farmacológica (analgésicos comuns, opioides, anti-inflamatórios não esteroides, corticoides) são voltadas para o alívio da dor. Glicosaminas, diacereína e ácido hialurônico são drogas conhecidas como modificadores da história natural da doença, que promovem melhoria da função e da dor em curto prazo. Contudo, mais estudos são necessários para elucidação da eficiência das drogas para evitar a progressão da doença. Ainda não existe medicamento eficaz para mudar o curso da doença, desta forma procura-se uma formulação com substâncias do líquido sinovial, que é composto, entre outros elementos, de polissacarídeos que contêm glicosamina e ácido glicurônico e de ácido hialurônico, que é considerado uma molécula-chave na biomecânica articular.

As preparações de ácido hialurônico para uso intra-articular podem ser divididas entre as de baixo e de alto peso molecular. De acordo com alguns estudos, (M.N. Collins, C., 2007), há vantagens em relação ao uso da apresentação de alto peso molecular.

Apesar dos possíveis benefícios da viscosuplementação, seu uso ainda permanece controverso. O padrão do tratamento da osteoartrose com o uso de ácido hialurônico é extremamente variável entre os estudos. Há diferenças nas preparações usadas, no número de aplicações, na dose injetada por aplicação e na quantidade de ciclos, além da diferença de tempo entre eles. (M.N. Collins, et. al., 2007; M.N. Collins, et. al., 2013) Os parâmetros para análise de melhoria clínica e funcional também mudam entre os estudos. Muitos não dispõem de grupo controle e ainda há carência de estudos que comparem a viscosuplementação com outros tratamentos. No entanto o Mercado dispõe de alguns géis para serem utilizados para essa tal finalidade; principais produtos disponíveis no mercado para o tratamento da osteoartrite são o *Healon*® (Pfizer, Nova York, NY) com massa molar 2 MDa, o *Synvisc*® conhecido como Hylan G- F 20 (Genzyme, Cambridge, MA) com massa molar 7 MDa, *Hyalgan*® (Fidia, Abano Terme, Itália) massa molar 1 MDa e *Artz*® (Seikagaku, Tóquio, Japão) com massa molar 1 MDa. (Kogan et al., 2007).

2.8. Propriedades Reológicas

A massa molar de polímeros assim como a concentração e a estrutura podem ser determinadas e exploradas a partir de suas propriedades reológicas. A reologia está relacionada ao comportamento e ao estudo do escoamento e deformação do Hidrogel em resposta de uma força externa. O comportamento reológico de resposta dos hidrogéis diferentemente de que um sólido elástico como descrito pela lei de Hooke ou líquido viscoso como descrito pela lei de Newton apresenta comportamento intermediário ou chamado de viscoelástico. (Chronakis & Kasapis, 1995) As análises de reologias podem ser feitas por reômetros rotacionais determinando parâmetros como os módulos elásticos (G'), relacionado ao grau de reticulação indicando um maior nível de emaranhamento do polímero, essa indicação do maior número de ligações entre as cadeias poliméricas são representadas por valores alto de G'' , módulos Viscoso (G'') e viscosidade (η) importante propriedade para preenchedores faciais e viscosuplementação.

Após obter os módulos de (G') e (G'') é calculado o ângulo da fase por $\tan \delta = G''/G'$ (Mendieta-Taboata et al, 2008). O ângulo de fase (δ) é descrito como a expressão da capacidade do material em converter a energia mecânica em calor, indicando o quanto este material é considerado viscoso ou elástico, que representa um importante

parâmetros nos hidrogéis do polímero de AH. Deste modo pode relacionar com dados obtidos pela reologia na análises de viscosidade complexa (η^*) que através do função log de η^* (viscosidade complexa) e log ω (frequência angular), possui uma dependências decrescente registada pela predominância da resposta elástica sobre o fluxo viscoso. (Steffe, 1996; Kablik et al, 2009).

Outra forma de obter informações estruturais de comportamento do gel é através dos valores de G' e G'' quando plotados como função da frequência, verificando o grau de dependência, determinado pelos parâmetros da Lei de Potência (Equação 1), que através da curvas log de G' versus ω , onde B é a inclinação e está relacionado a natureza da força do gel como fortes (géis convencionais) B igual a 0, ou géis fracos com B maior que 0. (Khondkar et al., 2007).

$$G' = A \omega^B$$

Equação (1)

Portanto, a reologia se torna fundamental para o estudo de materiais em aplicações médicos e cosméticas responsáveis para a caracterização e indicação do uso, tais como, géis, cremes, emulsões, pastar, sérum e entre outros. (CORRÊA et al, 2005; ALVES, 2006).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivos gerais

O presente trabalho de pesquisa teve como objetivo obter géis reticulado a partir de ácido hialurônico para uso em tecido subcutâneo preferencialmente para preenchimento facial e viscosuplementação.

2.2. Objetivos específicos

Desenvolver, produzir e caracterizar o gel de ácido hialurônico reticulado empregando-se o agente reticulante BDDE:

- I. Síntese do gel, utilizando variações de volume do agente reticulante BDDE de modo a se obter os produtos para preenchimento facial e viscosuplementação;
- II. Estudo da variação do pH do meio reacional e seu efeito na reticulação.
- III. Avaliação da ocorrência da reticulação PARA AS DIFERENTES ETAPAS DE SÍNTESE DO GEL (uso do FTIR).
- IV. Avaliação das superfícies dos géis intumescido, anterior e posterior a adição de HA, a partir de Imagens de micrografia ótica.
- V. Obtenção das curvas de intumescimento e respectivos parâmetros Cinéticos e estruturais.
- VI. Caracterização térmica dos géis intumescidos, com e sem controle de força iônica, por DSC cíclico, e o estudo da presença de água ligada e livre.
- VII. Caracterização reológica dos géis.
- VIII. Comparação dos géis preparados com os produtos comerciais de mesma natureza pelos parâmetros reológicos e térmicos.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Materiais

Reagentes utilizados na síntese do gel (AH-GBDDE)

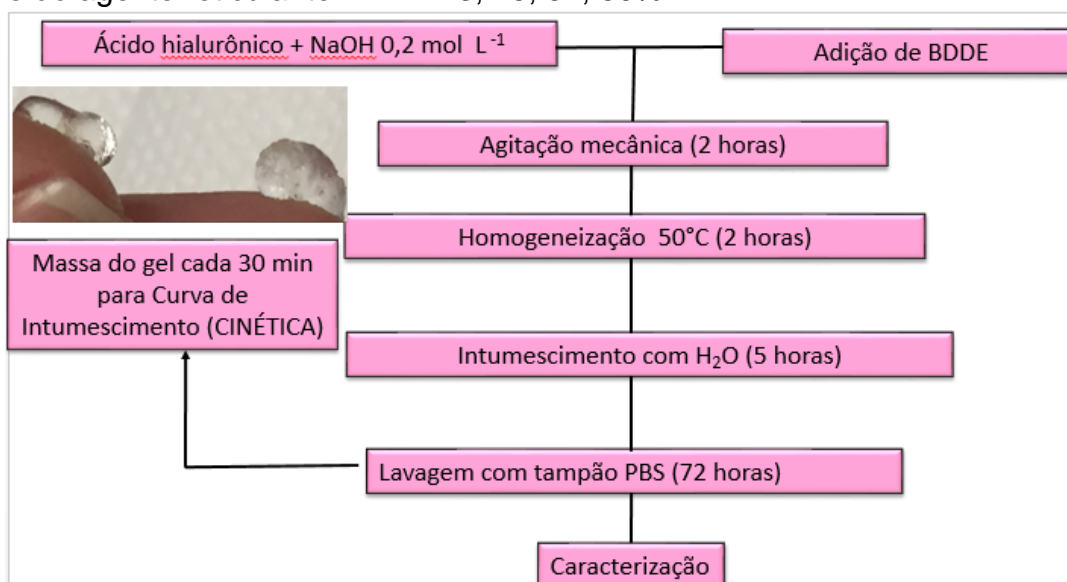
- 1,4-Butanediol Diglicidil Éter (BDDE) $\geq 95\%$ (Sigma-Aldrich).
- Hidróxido De Sódio Anidro 98 % (NaOH) (Vetec).
- Fosfato De Sódio Dibásico Anidro (Sigma-Aldrich).
- Fosfato De Sódio Monobásico Anidro (Sigma-Aldrich).
- Hialuronato de sódio (HA) (Making cosmetics).

4.2. Formulação do gel de ácido hialurônico-BDDE

A formulação do gel a base de ácido hialurônico **Figura 3** utilizou variações de volume do agente reticulante BDDE, de modo a se obter o produto para o preenchimento facial como descritos por:

- 13% do Agente reticulante BDDE com relação Massa“AH”/Massa“BDDE” (**GBDDE13%**)
- 25% do Agente reticulante BDDE com relação Massa“AH”/Massa“BDDE” (**GBDDE25%**)
- 37% do Agente reticulante BDDE com relação Massa“AH”/Massa“BDDE” (**GBDDE37%**)
- 50% do Agente reticulante BDDE com relação Massa“AH”/Massa“BDDE” (**GBDDE50%**)

Figura 3. A formulação do gel a base de ácido hialurônico utilizando variações de volume do agente reticulante BDDE 13, 25, 37, 50%



GBDDEST: Gel de Ácido hialurônico/BDDE sem purificação.

*GBDDE / GBDDE_C: Gel de Ácido hialurônico reticulado/BDDE purificado e intumescido tamponante pH 7 com NaCl ($I = 0,00156 \text{ mol L}^{-1}$).

*GBDDE_S: Gel de Ácido hialurônico reticulado/BDDE purificado e intumescido tamponante pH 7 sem NaCl.

4.5. Obtenção dos parâmetros cinéticos e estruturais das membranas do géis

Os géis preparados como descrito anteriormente, foram adicionados a sacos de diálise mantidos por 1 h sob agitação em água pura, repetindo-se o processo, porém, sem agitação, por mais 3 vezes, perfazendo um total de 4 h. Posteriormente foram secos e mantidos em béquer para estocagem e posterior utilização. Assim, géis secos, foram imersos em solução tamponante, em pH 6,5; 7; 7,5. Para todos os pH procedeu-se sua preparação com/sem o ajuste de foga iônica, $I = 0,145 \text{ mol L}^{-1}$, em NaCl, e a cada 30 min o gel era removido do sistema para a medição de massa e obtenção da curva de intumescimento. Ao final do processo de intumescimento o gel era pesado para a obtenção da massa de gel intumescido (M_t). As propriedades hidrofílicas dos géis foram estudadas por medidas de grau de intumescimento (Q%) como função do tempo, e os valores de Q% foram, então, calculados a partir da equação:

$$Q\% = [(M_t - M_o) / M_o] \times 100, \quad (3)$$

para o qual M_t massa do gel intumescido no tempo t ; e M_o a massa inicial do gel.

Os parâmetros da cinética de intumescimento, n , k e D , foram obtidos a partir das medições de grau de intumescimento como função do tempo, F vs. t . A partir das curvas de F vs. t , o expoente difusional, n , e a constante de difusão, k , foram obtidas a partir da equação:

$$F = [M_t / M_{eq.}] = k \cdot t^n, \quad (4)$$

Sendo $M_{eq.}$ a massa do gel na condição de equilíbrio de intumescimento, t o tempo e k a constante de difusão. A equação está limitada até 60% do primeiro estágio da curva de intumescimento. A determinação dos valores de n , e de k , é efetivada a partir da relação $\log F$ vs. $\log t$, para a qual a pendente da curva fornece o valor de n , e o coeficiente linear fornece o valor de k . A avaliação da incorporação do solvente ao interior da matriz do gel foi efetivada a partir da determinação do coeficiente de difusão do solvente, a partir da equação:

$$D = \pi \cdot r^2 \cdot (k/4)^{1/n}, \quad (5)$$

para a qual: D é o coeficiente de difusão (cm s^{-1}), r o raio da circunferência do disco de gel seco (cm).

Para o estudo dos parâmetros estruturais de redes dos hidrogéis utilizou-se, os parâmetros grau de intumescimento (Q%) e massa molar média entre retículos (M_c) são os mais utilizados para caracterizar uma rede polimérica tridimensional. Outros parâmetros tais como densidade de reticulação (q), que é proporcional à fração molar de agente de reticulação BDDE, e número de cadeias efetivamente elásticas por unidade

de volume (V_e) também são importantes para a caracterização estrutural da rede tridimensional de um hidrogel. Neste trabalho, os valores de M_c , q , V_e foram obtidos utilizando-se a Equação 6, 7 e 8 descritos na literatura. (AOUADA, FAUZE A. et. al., 2009).

$$M_c = -V_l d_p \frac{(V_s^{1/2} - V_{s/2})}{\ln(1) - V_s + V_s + x V_s^2} \quad (6)$$

V_l = vmolar da água, mL/Molvolume

d_p = densidade do polímero g/mL

$$q = \frac{M_0}{M_c} \quad (7)$$

$$V_e = \frac{d_p N_a}{M_c} \quad (8)$$

N_a é o Número de Avogadro.

4.6. Equipamentos

4.6.1. Espectroscopia de infravermelho (ATR-FTIR)

A análise de infravermelho foi usada para avaliar os reagentes e os produtos das sínteses dos géis, de modo a confirmar a sua formação. Para tal foram identificadas as vibrações das ligações químicas presentes nos reagentes e no géis de HA. As análises de infravermelho com transformada de Fourier foram coletadas com uso de um espectrômetro Perkin-Elmer (ATR-FTIR spectrum). Foram analisadas por 128 vezes na capacidade de resolução espectral de 2 cm^{-1} entre 4000 cm^{-1} e 400 cm^{-1} .

A Figura S1 e Tabela S1 mostram os resultados obtidos dos ensaios de infravermelho para o processo de constatação da formação dos géis. O gel 50%BDDE é representativo dos demais. Juntamente a figura e a tabela são apresentadas a interpretação dos mesmos. Tal interpretação não será abordada no item Resultados e Discussão.

4.6.2. Microscopia Óptica

Microscopia Óptica (MO) foi conduzida para a avaliação da forma física dos géis após o ajuste do tamanho de partículas ($200\text{ }\mu\text{m}$). Para este ensaio foi utilizado o Microscópio Digital Zoom 200x, 600x e 1000x profissional, com luz polarizada, que permitiu visualização da morfologia na superfície dos filmes de géis. Os géis foram dispostos sobre laminas de vidro com diferente cores de fundo (azul, branco ou vermelho) de modo a facilitar a visualização da superfície externa dos micros cubos de gel.

Na Figura 6 são mostradas as imagens obtidas para o gel de 50%BDDE, recém preparado ($200\text{ }\mu\text{m}$), sem purificação prévia, purificado por intumescimento em solução tamponante, PBS, e purificado e adicionado de 10% de HA intumescido; este gel é representativo para os demais. A Figura 6a mostra o gel de 50%BDDE, de $200\text{ }\mu\text{m}$, sendo extrusado e a Figura S2b mostra o gel após a extrusão. O gel extrusado com a adição de HA intumescido apresenta maior transparência a luz.

4.6.3. Obtenção das curvas DSC

As curvas DSC foram obtidas em análises, um módulo DSC 1 Stare, Mettler Toledo, capaz de operar entre -80 a 150 °C, acoplado a um módulo de resfriamento por N₂ (IntraCooler) com precisão e exatidão respectiva de $\pm 0,02$ °C e $\pm 0,2$ °C. A calibração foi realizada com índio e zinco, conforme as recomendações do fabricante. Curvas DSC foram realizadas em atmosfera de N₂ (50 mL min⁻¹), com massa igual 5,0 mg; as massas foram medidas em cadinhos de alumínio, de 50 µL, não selados, numa razão de aquecimento de 10 °C min⁻¹. (Hema Sundaram, M.D. et al, 2013). O método dinâmico consistiu em resfriamento entre 25 °C a -80 °C, seguido por aquecimento até 20 °C. Os dados relativos à entalpia, temperatura de pico e “onset”, foram obtidos com a integração dos picos, utilizando o software STARe versão 11.00a.

A remoção parcial do solvente para os ensaios para a determinação da T_g para o gel preparado com 50%BDDE foi realizada empregando-se o programa de aquecimento da amostra que segue: a amostra inserida no compartimento da célula do DSC e aquecida da temperatura do laboratório até a temperatura desejada T_{inversão}: (25 ≤ T_{inversão} ≤ 80) °C; atingida o valor de interesse a curva de aquecimento era revertida, para resfriamento até a T = -70 °C, retornando à 20°C.

Os ensaios para a determinação dos diferentes tipos de águas presentes nos géis, água livre e água ligada e água de “cold crystallisation”, foram realizados empregando-se curvas DSC cíclicas: T_{inicial} = 20 °C; T_{inversão} = 25 °C; T_{reversão} = -70 °C; demais condições semelhantes apresentadas anteriormente.

4.6.4. Avaliação reológica dos géis

O comportamento reológico dos géis de ácido hialurônico reticulado com BDDE foi realizado utilizando o reômetro rotacional AR-2000EX (TA Instruments, Delaware, USA), com geometria do tipo placas paralelas ranhuradas (40 mm) com um gap de 1000 µm, com aproximadamente 5 mL de amostra por ensaio, inseridas com auxílio de uma seringa. Inicialmente, foi realizada uma varredura em deformação (1x10⁻⁴ a 100 s⁻¹) para verificação da região de viscoelasticidade linear, com frequência de oscilação constante 0,1 Hz e temperatura constante de 25 °C.

Posteriormente, as medidas oscilatórias foram conduzidas na região viscoelástica linear obtendo os módulos de armazenamento (G') e de perda (G''), com deformação 5%, em uma faixa de frequência de 0,1 a 10 Hz.

As medições em regime estacionário para viscosidade complexa (η^*) foram efetuadas com tensão de cisalhamento em unção de taxa de deformação (0,1 a 100) s⁻¹). (Hema Sundaram, M.D. et al, 2013)

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.3. Avaliação da Evolução do pH no Processo de Síntese

De acordo com Balazs e Leschchiner (1986), 1,4 Butanediol diglycidyl éter (BDDE) reage rapidamente com AH em solução alcalina aquosa a 25°C fornecendo um gel de AH reticulado. A razão de intumescimento e as propriedades físico-químicas do gel dependem do grau de reticulação do gel. O grau de reticulação, por sua vez, pode ser controlado por vários fatores, principalmente, pela massa molar do AH, sua concentração na mistura reacional, pelo pH do meio reacional, da razão polímero/BDDE. (BALAZS & LESCHCHINER, et. al. 1986).

Desta forma, o acompanhamento da evolução do pH durante o processo é fundamental, uma vez que o pH empregado para a etapa de reticulação é alto, $\text{pH} \approx 13$, e que o valor do pH tem influência direta na estabilidade das moléculas de AH e na abertura de sua estrutura e dos grupos epóxi. Por outro lado, deve-se considerar que o pH dos tecidos dérmicos apresentam-se próximo da neutralidade, minimizando o efeito na estrutura do gel do AH após sua aplicação.

Na Tabela 2 são apresentados os valores de pH obtidos para os reagentes iniciais e para cada etapa do processo de preparação dos géis. Os valores de pH observados para cada reagente original variam entre 5 e 13. A partir dos dados apresentados na Tabela 2 observou-se que os valores de pH são mantidos próximos à neutralidade para GBDDE, próximos à pH 13 para AH+NaOH e GBDDEST* e próximo de pH 5 para reticulante BDDE, os produtos preparados, intumescidos e purificados e adicionados de AH; todos em valores próximos da neutralidade que ocorre como marco final para o processo de intumescimento já que o pH varia do valor 13 e é lavado até que atinja o pH 7, sendo o motivo do qual o gel mesmo já intumescimento continuam a ser lavados por 72 horas com propósito de manter pH neutro e a saída total do BDDE.

Tabela 2: Determinação de pH dos reagente e amostra em etapa de síntese

Amostra	AH+NaOH	BDDE	GBDDEST*	GBDDE*
pH	13	5	13	7

*GBDDEST: Gel de Ácido hialurônico reticulado com BDDE sem purificação.

*GBDDE: Gel de Ácido hialurônico reticulado com BDDE purificado e intumescido em sol. tamponante pH 7.

4.4. Estudo da Razão de Intumescimento dos Géis

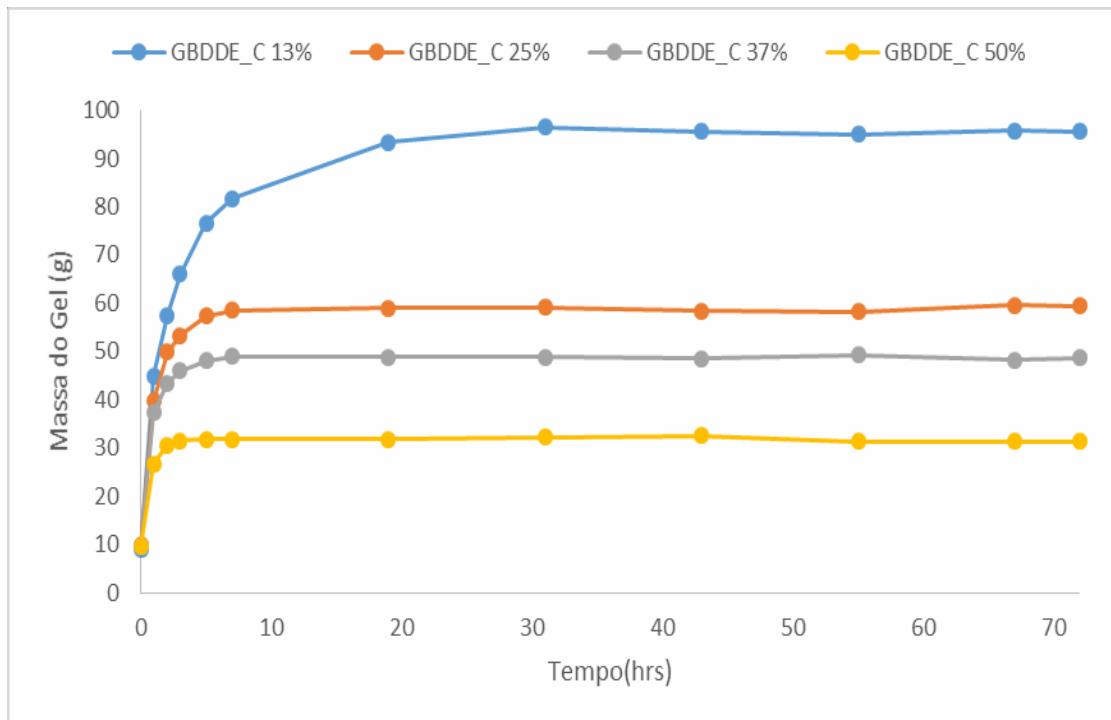
Géis de AH reticulados quimicamente são capazes de absorver enormes quantidades de água e de solução salina. A capacidade de intumescimento dos géis de AH varia de produto para produto e é dependente da concentração, densidade de reticulação, e processo usado para hidratação do gel (Kablik, 2009).

Medidas de intumescimento são muito importantes, pois a característica da água em um gel pode determinar a estabilidade e permeação de nutrientes e de produtos celulares (Hoffman, 2002). Os resultados obtidos para o ensaio de intumescimento dos géis preparados com BDDE 13, 25, 37 50% (Figura 4).

A razão de intumescimento de géis de AH é dado pelo alcance de seu máximo de intumescimento em água. No entanto, os géis preparados neste estudo foram intumescidos em solução tampão de fosfato (PBS), o motivo para tal escolha é devido a se estabelecer condições que se aproximem das condições fisiológicas. Tal condição é requerida para os géis aplicados no preenchimento facial, intradémico, (Zawko et al., 2009).

As curvas mostradas na Figura 4 revelam um comportamento de intumescimento característico dos demais géis de AH reticulados apresentados na literatura, empregando diferentes reticulantes (BARBUCCI, R,2002, I. Sánchez- Carpintero, 2010; G. Kogan, 2007).

Figura 4: Efeito das razões mássicas gel reticulado com BDDE 13, 25, 37 50% no estudo do intumescimento do gel como função do tempo (h)



Fonte: Autor

Este comportamento permitiu sugerir que com o aumento da quantidade de solvente o grau de reticulação é menor comparativamente. A presença dos diferentes grupos funcionais presentes nos diferentes reticulantes, grupos responsáveis pela interação com a água, a partir de ligações de hidrogênio, permitem variar a quantidade de água absorvida durante o intumescimento.

Os valores de intumescimento obtidos para o polímero AH, para as amostras de géis ensaiados, permitiram observar que a partir da massa de AH presente nos géis este consegue reter quantidades de água da ordem de 60 a 90 vezes superior à sua massa inicial. Há sempre uma dependência no valor final do intumescimento com a quantidade do reticulante incorporado ao sistema.

4.4.1. Cálculo da Concentração de AH presente nos Géis

Um dos principais parâmetros que influencia a eficiência e o tempo de resistência de um gel utilizado como preenchimento facial e visco suplementação é dada pela concentração de AH. A concentração total de AH destes produtos à base de reticulação por BDDE foram calculadas a partir da massa de AH colocada em cada reação de reticulação:

$$[\text{AH}]_{\text{teórica}} = \text{massa AH (mg)} / \text{massa gel intumescido (g)} \quad \text{Equação (2)}$$

Importante ressaltar que as concentrações calculadas consistem do AH presente na fase gel (insolúvel) e não na fase fluida (solúvel). Devido à comum utilização dos fabricantes em inserir uma fase fluida para melhorar as suas propriedades reológicas, que consiste na adição AH não reticulado. Deste modo a fase solúvel é degradada facilmente pelo organismo, não implicando contribuição na maior duração do gel. (Massa Molar AH 1,32 MDa)

Tabela 3. Teores de AH calculado para os géis reticulados com BDDE 13, 25, 37 50%

Amostra(GBDDE_C)	13%	25%	37%	50%
Concentração (mg/mL)	12,5	20,2	24,6	38,2

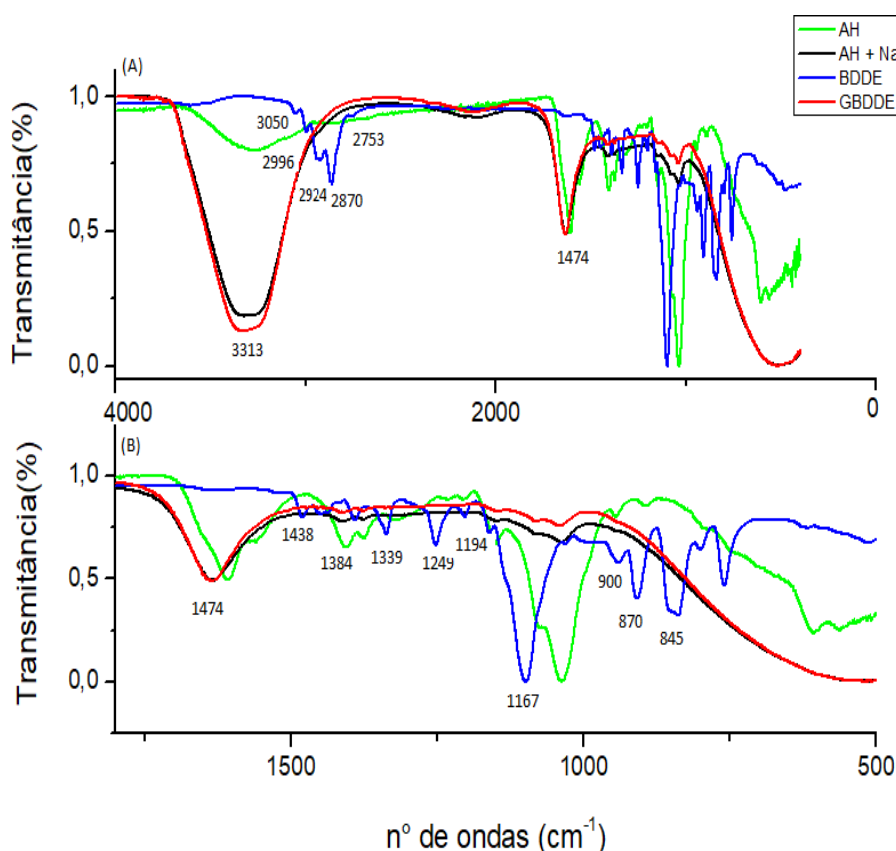
Fonte: Autor

Evidenciação da reticulação pelo emprego da espectroscopia vibracional na região do infravermelho

A evidenciação da reticulação dos géis preparados neste trabalho foi abordada a partir da técnica de espectroscopia vibracional na região do infravermelho (ATR-FTIR). Os apontamentos a seguir se deu a partir da realização da comparação entre os espectros dos géis com os espectros do AH não reticulado, BDDE, puro, e o gel pós reticulação.

Na Figura 5a são apresentados os espectros de IR para os reagentes individuais e em cada fase do processo do processo de preparação do produto. Os espectros encontram-se superpostos como uma forma de facilitar a análise dos mesmos, de modo a buscar indícios do que se passa, estruturalmente, durante o processo de reticulação para a obtenção do gel.

Figura 5a- (A) Infravermelho (ATR-FTIR) reagentes e o gel de ácido hialurônico(AH) com 50%BDDE; (B) ampliação da região de 500 a ~2000 cm^{-1}



Fonte: Autor

Foram superpostos os IR do agente reticulante, BDDE, e do ácido hialurônico, AH, puros, seguidos das misturas reacionais do AH em presença de NaOH, e do gel purificado e intumescido. A comparação dos espectros de IR obtidos para o AH, puro, em comparação ao AH (AH, BDDE, AH+NaOH, GBDDE), em presença do hidróxido de

sódio, permitiu se observar as variações na posição e na intensidade de algumas das bandas de absorção do AH posterior a adição da base; verifica-se uma perda de intensidade nos picos presentes em 2965 cm^{-1} , 2920 cm^{-1} , e o deslocamento de banda nas regiões de 2361 cm^{-1} descrito na Figura 5b.

Tal fato, esta em conformidade com a literatura (COLTHUP, N.B.1964) no que se refere à abertura da estrutura original do AH; inicialmente helicoidal(ŠESTÁK, J. et. al., 2000).

A comparação entre os espectros de IR referentes ao BDDE e ao gel permite que se evidencie a ausência, nos espectros dos géis purificados, das bandas características do BDDE (3050 cm^{-1} , 2996 cm^{-1} , $2924,6\text{ cm}^{-1}$, 2870 cm^{-1}) o que é aceitável uma vez que os grupos epóxi são abertos pela ação da base; devendo estes grupos se ligar a estrutura, agora aberta, do AH.

Considerando-se que a maior percentagem dos grupos epóxi é empregada para a formação das ligações entrecruzadas no polímero, o que resta de BDDE, com grupos epóxi, possivelmente não abertos, deve estar abaixo da sensibilidade do instrumento de medição.

Por outro lado, ao se comparar o espectro do gel purificado, intumescido, com os demais (AH e BDDE) observam-se a ausência de bandas (1474 cm^{-1} , 1438 cm^{-1} , $1384,5\text{ cm}^{-1}$, 1339 cm^{-1} , 1249 cm^{-1} , 1195 cm^{-1} , 1167 cm^{-1} , 1095 cm^{-1}) referentes aos resíduos dos reagentes. Esta constatação permite sugerir a efetividade obtida no processo de purificação empregado.

Com o objetivo de se confirmar a efetividade no processo de purificação do gel avaliou-se amostras do gel anterior a etapa de intumescimento (GBDDEST) a fim de comparar com gel pós-purificação (Figura 5b).

Avaliando os espectros da figura, ampliada, foi possível, a partir das bandas de absorção em 2960 cm^{-1} , 2920 cm^{-1} , 2620 cm^{-1} e 2590 cm^{-1} , evidenciar a efetividade na purificação do produto (menor intensidade na banda de absorção da amostra GBDDE e GBDDEST). Para região em 2850 cm^{-1} não podemos visualizar a formação do sinal nesta região referente à sobreposição da ligação $-\text{CH}_2\text{-OH}$ pela presença do reticulante

Figura 5b. (A) Infravermelho (ATR-FTIR) do gel: purificado (GBDDE) e não purificado (GBDDEST); (B) ampliação: 1000 a 2000 cm^{-1}

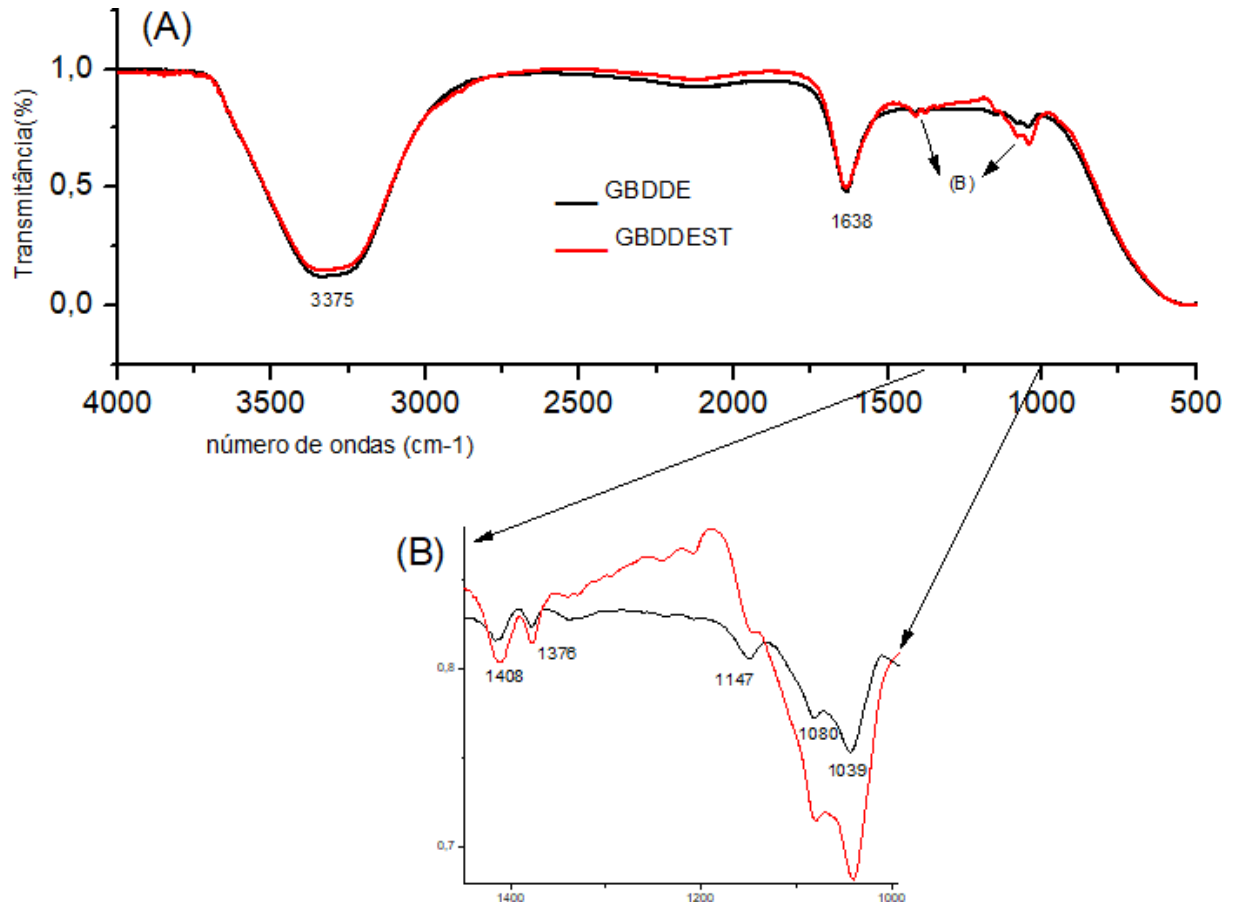


Tabela S1. Principais bandas de absorção dos espectros IR obtidas a partir dos reagentes; gel AH-BDDE puro; géis purificados (GBDDE) e não purificado (GBDDEST)

Bandas no Infravermelho		Número de Onda(cm^{-1})			
		HÁ	BDD E	GB DD E	GBDD EST
C-C	56	1046	94	946	
	61				
C-O-C estiramento, O-H deformação	1	1046	10	1039	
	89				
C-O-C, C-O e C-O-H e estiramento	6	1046	10	1080	
	94				
C-O	6	1046	11	1147	
	10				
C-O	39	1046	12	1206	
	10				
C-O	77	1046	12	1235	
	11				
C-O	50	1046	13	1376	
	12				
CH ₂ , CH ₃ , C-O-H deformação, combinação C-O com C=O; C-N	06	1046	14	1408	
	12				
Deformação NH	35	1046	16	1638	
	12				
Amid II	95	1046	16	1638	
	13				
NH estiramento, O-H	76	1046	33	3375	
	14				
NH estiramento, O-H	08	1046	38	2119	
	15				
NH estiramento, O-H	65	1046	75	3276	
	16				
NH estiramento, O-H	07	1046	75	3276	
	32				
NH estiramento, O-H	76	1046	75	3276	
	76				

Fonte: Autor

Avaliação Morfoestrutural das superfícies dos géis

As micrografias óticas apresentadas na Figura 6a foram obtidas para as amostras GBDDE, GBDDEST e GBDDE 10% (vide abreviações na Tabela 1). A partir das micrografias foi possível revelar as características superficiais dos géis após a reticulação (Figura 6a A-I). Tais micrografias são exemplo dos ensaios levados a termo pelas adições de AH aos diferentes géis de HA-BDDE no intervalo de $(2,5 \leq AH \leq 20)$ %(m/m).

A partir das micrografias foi possível a visualização, em detalhes, das superfícies das amostras dos géis: 1- obtidas ao final da síntese, sem intumescimento 6a A-C; 2- lavada e intumescida, 6a D-F; e 3- lavada, intumescida e com adição de solução de AH, 10% (m/m), 6a G-I. Para a melhor visualização das superfícies e suas características físicas, as micrografias apresentadas na Figura 6 foram ampliadas: 1- A,D,G- 200X; 2- B,E,H- 600X; e 3- C,F,I- 1000X.

O aspecto superficial dos géis, portanto, é de grande importância no que se refere à aplicação subcutânea dos mesmos. O aspecto superficial está diretamente relacionado às características reológicas, tais como, a: 1- extrusão; 2- injetabilidade; e 3- manipulação clínica dos géis: manipulação na região subcutânea, pós-inserção (LARSEN, 1993).

Assim, a partir das micrografias da Figura 6a A-C, obtidas para o gel reticulado, sem purificação prévia, em comparação com as imagens 6a D-F, purificada e intumescida, observa-se uma superfície opaca (ampliação: 600 X) e sem fluidez aparente. Por outro lado, ao compara-se as imagens 6a A-F com as imagens S2a G-I, gel purificado, intumescido e adicionado com AH (AH - previamente intumescido), verifica-se a ausência de opacidade, e uma considerável intensificação na fluidez aparente, acompanhada de avaliação da fluidez a partir do tato Figura 6b.

No entanto, ao se considerar as imagens 6a G-I fica evidente a minimização das arestas dos microcubos, quando comparado as imagens 6a D-F, permitindo sugerir-se um aumentando na esfericidade das partículas do gel com diâmetro médio de aresta de $200\mu\text{m}$ (vide as imagens 6a I e 6a F).

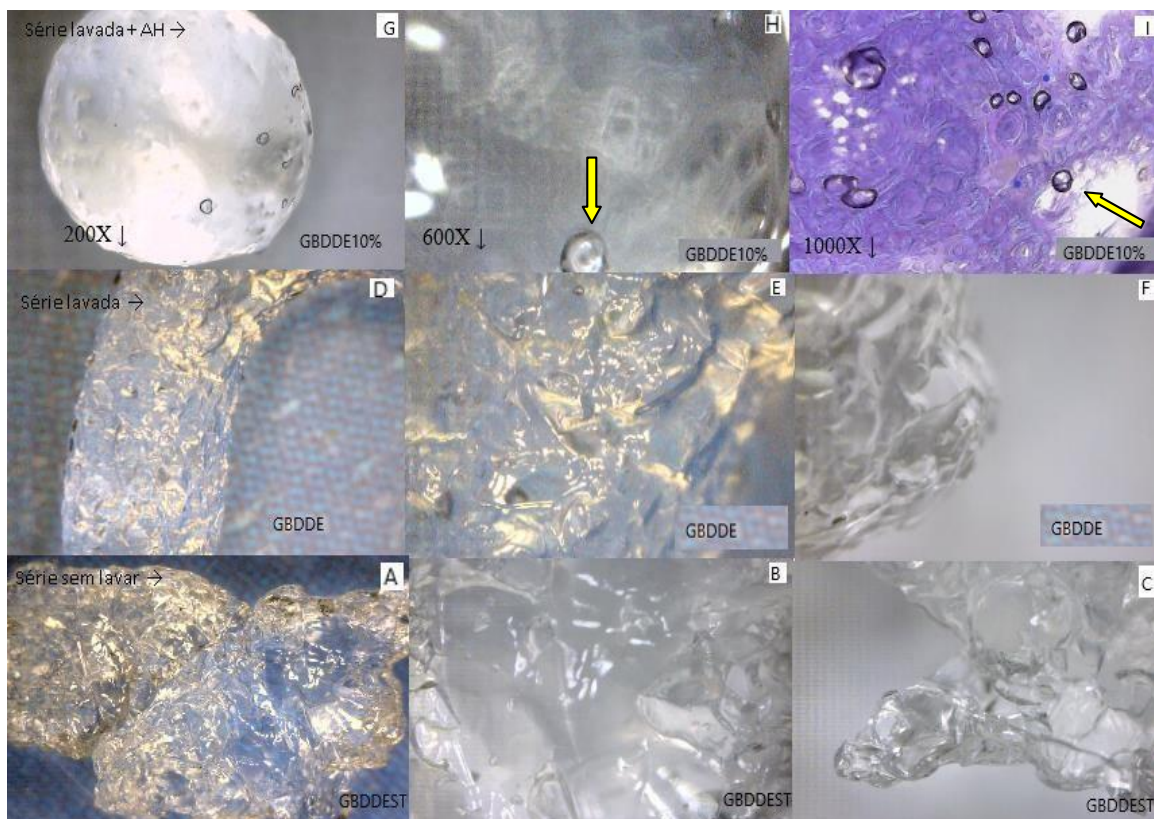
Desta forma, o produto, gel aditivado de AH, teve a sua viscosidade melhorada a partir de ensaios realizados com a adição de soluções de AH, preparadas a partir de diferentes proporções em massa de $(2,5 \leq AH \leq 10)$ %(m/m) permitindo a modulação da viscosidade final do gel. Tal constatação ficou evidenciada a partir dos

ensaios de extrusão, pela minimização aparente do fator de extrusão, e, portanto, refletindo-se no aumento no grau de injetabilidade do produto Figura 6b.

O gel, nesta condição apresenta, portanto, como diferencial o aumentando na esfericidade das partículas, o que conduz a uma melhora nas propriedades reológicas do produto. O estudo reológico está em fase de execução; não será apresentado neste texto, pois os dados aguardam a fase de interpretação.

Outro aspecto revelado a partir das micrografias é a presença de microbolhas de ar. Indesejáveis do ponto de vista comercial, Figura 6a H e 6a I (setas amarelas). A centrifugação prévia do produto, após a sua purificação dos géis deveria ter eliminado a presença das bolhas de ar. No entanto, a velocidade de rotação (rpm) não foi suficiente e este parâmetro reavaliado e modificado até a eliminação completa dos mesmos.

Figura 6a- Micrografias do gel preparado com 50%BDDE: **D, E, F)** GBDDE gel lavado com solução tamponante, PBS, e intumescido; **G, H, I)** GBDDE lavado e adicionado de 10% de HA (GBDDE10%); **A, B, C)**, sem lavar e intumescer com PBS, GBDDEST



Fonte: Autor

Figura 6b. 2b1) Ensaio de extrusão, para o gel, 50%BDDE; 2b2) transparência do gel 50%BDDE antes e após a adição de 10%HA intumescido



Obtenção dos parâmetros cinéticos e estruturais dos géis

As bases teóricas para o intumescimento foram desenvolvidas na década de 40, pelos cientistas Flory e Rehner 1943, (FLORY, P. J.; et. al., 1943). Os autores partiram da premissa de que o fenômeno de intumescimento é controlado por três forças naturais, a variação na: 1- entropia da mistura solvente-polímero; 2- entropia conformacional, causada pela redução no número de conformações das cadeias em consequência de seu estiramento; e 3- entalpia de mistura solvente e polímero. Desta forma, o intumescimento de um determinado polímero é dependente do grau de interação do polímero com as moléculas do solvente e da densidade de reticulação, do número de cadeias efetivamente elásticas, dentre outros (KABLIK, 2009).

O primeiro parâmetro a ser determinado é razão de intumescimento de géis (%Q), que é dada pelo alcance de seu máximo de intumescimento em água, em comparação a sua massa inicial.

Os géis preparados neste estudo, foram intumescidos tanto em água pura ou em solução tamponante PBS com NaCl ($I = 0,0156 \text{ mol L}^{-1}$), $6,5 \leq \text{pH} \leq 7,5$; com porcentagens do reticulante ($13 \leq \% \text{BDDE} \leq 50$). As curvas apresentadas nas Figuras S3 permitem uma visualização, representativa, do comportamento de intumescimento característico dos demais géis de AH reticulados empregando-se como agente reticulante o BDDE. O comportamento verificado é concordante com aqueles observados na literatura, empregando outros agentes reticulantes (BARBUCCI, R. 2002; I. SÁNCHEZ-CARPINTERO, 2010; G. KOGAN, 2007). Os valores de $\%Q_{\text{max}}$ na Figura S3 para as diferentes % de BDDE, pH e controle de força iônica estão apresentados na Tabela 4.

A partir da Figura S3 pode ser observado que para os valores de grau de intumescimento (Q%) para 13 e 25% de BDDE seguiram uma dinâmica semelhante para todos os valores de pH ensaiados, apresentando valores para %Q: 4979, 4985, 3982 para os pHs 6,5; 7,0 e 7,5, respectivamente, em ausência de ajuste da força iônica.

Porém, para o sistema empregando o ajuste de força iônica, os valores obtidos para as %Q foram: 3101, 2519, 2206%, consideravelmente menores em comparação aos obtidos em água pura. Este comportamento indica a influência da força iônica sobre a pressão osmótica do sistema na fase de intumescimento e seus efeitos sobre a rede

do polímero/BDDE. A partir das curvas fica evidenciado que os géis atingem a estabilidade em aproximadamente 2h para baixas % de BDDE com valores da ordem de $Q\% = 5010$, para as maiores % de BDDE e ao redor de 15 h, atingindo valores de $1080 \leq Q\% \leq 2500$ (37% e 50%).

Ao passo que, com o aumento do agente reticulante, e o conseqüente aumento no grau de reticulação, deve favorecer a diminuição do espaço livre, intra-retículo, para a inserção do solvente, tendo como conseqüência uma menor capacidade de intumescimento.

O efeito da presença de sais, devido ao ajuste da I no tampão PBS (NaCl a $0,0156 \text{ mol L}^{-1}$), também, se faz evidente, no processo de intumescimento, por exemplo, o observado para o gel preparado com 13%BDDE ($Q_{\text{máx.}} = 1920$) Significativamente, menor em comparação ao solvente puro ($Q_{\text{máx.}} = 4000$), Correspondendo a uma diminuição em 48 % no poder de absorção do gel. Os valores obtidos para o grau de intumescimento, $Q_{\text{máx.}}$, para os géis de AH-BDDE, estão apresentados na Tabela 4, juntamente com os valores obtidos para os parâmetros cinéticos, n e k, e para os valores obtidos do coeficiente de difusão, D.

Os valores de $Q\%$ e do $Q_{\text{máx.}}$ foram obtidos a partir das curvas $Q\% \text{ vs. } t$ (Figura S3), e os parâmetros cinéticos a partir dos coeficientes angulares e das pendentes das retas obtidas das relações $\log F \text{ vs. } \log t$ (Figura S3a) (para $F = M_t/M_{\text{eq}} = K.t^n$; M_{eq} é a massa do gel no equilíbrio de intumescimento, t, tempo em horas; o expoente difusional (n) e constante de difusão (k); eq. (4)). Os valores de D foram obtidos a partir da equação (5): $D = \pi r^2 (k/4)^{1/n}$ onde D é dado em $\text{cm}^{-1} \text{ s}^{-1}$, r é o raio do hidrogel sem intumescimento (dado em centímetros) em forma de disco; tais curvas foram obtidas individualmente cada um dos diferentes géis

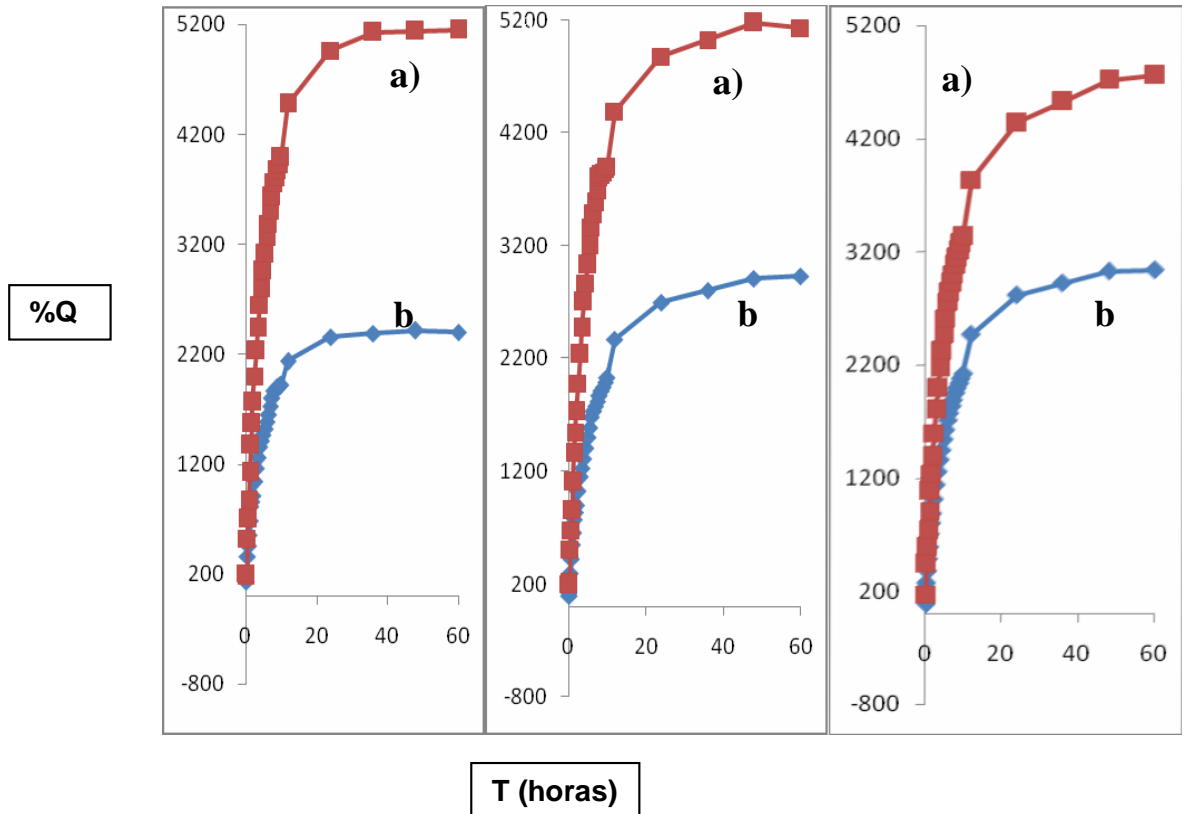
A partir dos resultados cinéticos apresentados na tabela e na figura é possível observar que os valores de n, para cada um dos processos de intumescimento, como função do pH, com ou sem ajuste da força iônica, podem ser avaliados em função do processo de difusão Fickiano, por relaxação das cadeias do polímero ou um processo misto.

Assim, para os valores de n contidos no intervalo de $0,45 \leq n \leq 0,50$, evidencia-se um processo de difusão do solvente característico de Fick. Por outro lado, valores muito próximos ou superiores a $n = 1$, têm-se um processo controlado preferencialmente por relaxação das cadeias poliméricas e para valores, intermediários

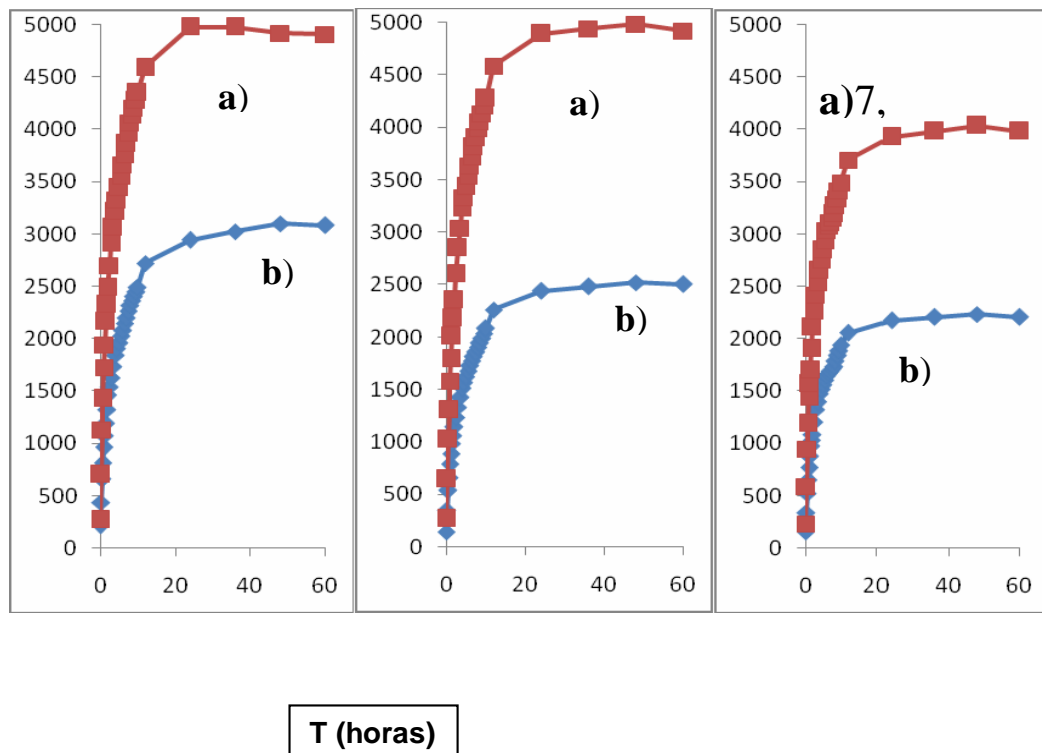
entre $0,5 < n < 1$, tem-se a contribuição mista, composta pelos dois processos de difusão do solvente

Figura S3 - Valores de %Q e do $Q\%_{\text{máx}}$. obtidos a partir das curvas $Q\% \text{ vs. } t$ para pH 6,5, 7,0, 7,5; sem a) e com ajuste $I = 0,145 \text{ mol L}^{-1}$ b); 13, 25, 37 e 50%BDDE 13% de BDDE; pH 6,5, 7,0, 7,5; sem ajuste de força iônica a) e com ajuste $I = 0,145 \text{ mol L}^{-1}$ b)

Fonte: Autor

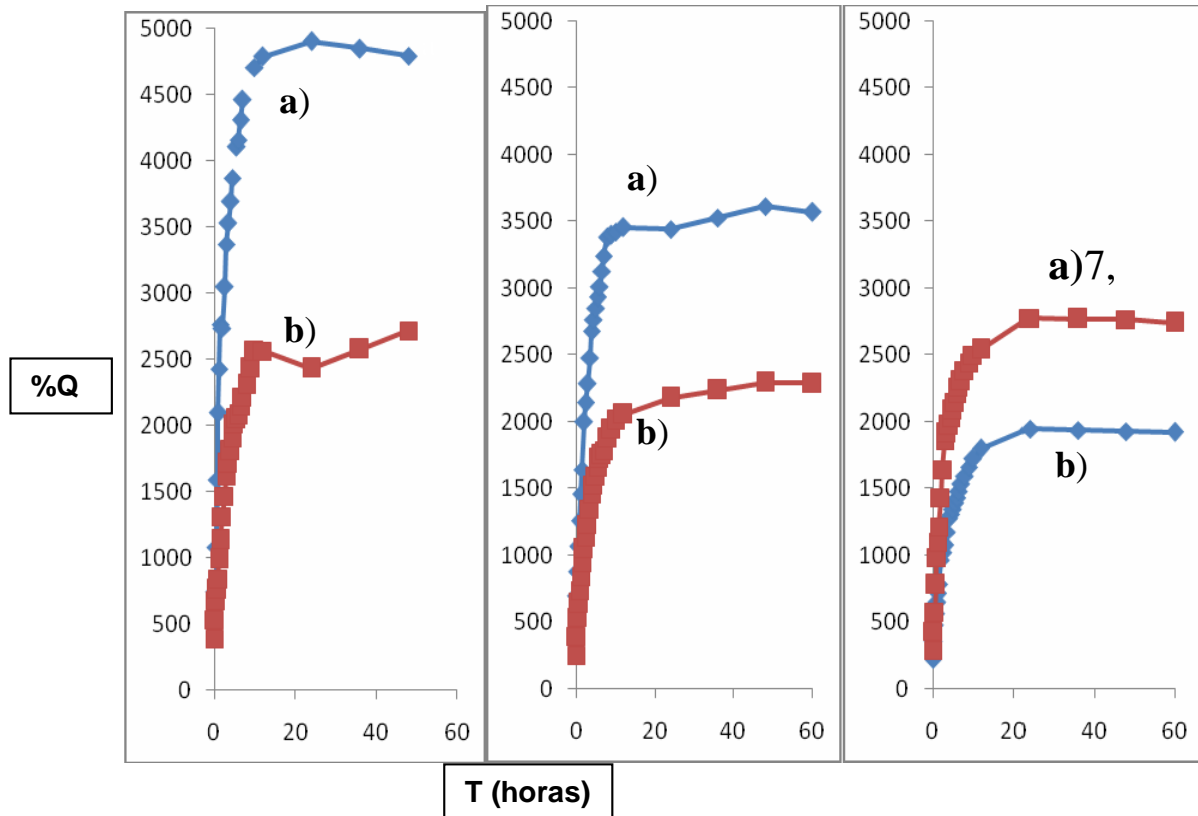


25% de BDDE; pH 6,5, 7,0, 7,5; sem a) e com ajuste $I = 0,145 \text{ mol L}^{-1}$ b)



Continuação: Figura S3.

36,6% de BDDE; pH 6,5, 7,0, 7,5; sem a) e com ajuste $I = 0,145 \text{ mol L}^{-1}$ b)



50% de BDDE; pH 6,5, 7,0, 7,5; ; sem a) e com ajuste $I = 0,145 \text{ mol L}^{-1}$ b)

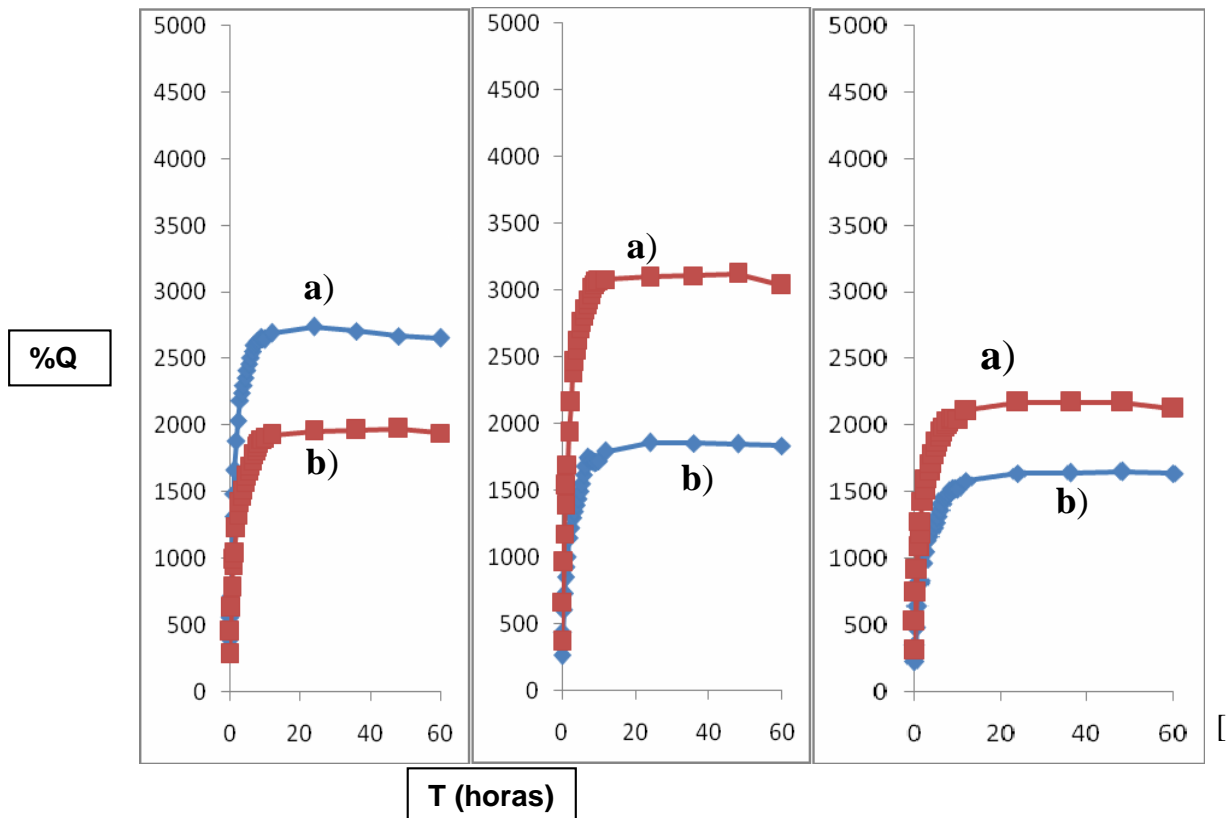


Figura S3a. Curva Log F vs. log t, para o gel de 36,6% BDDE; sem a) e com ajuste I= 0,145 mol L⁻¹ b)

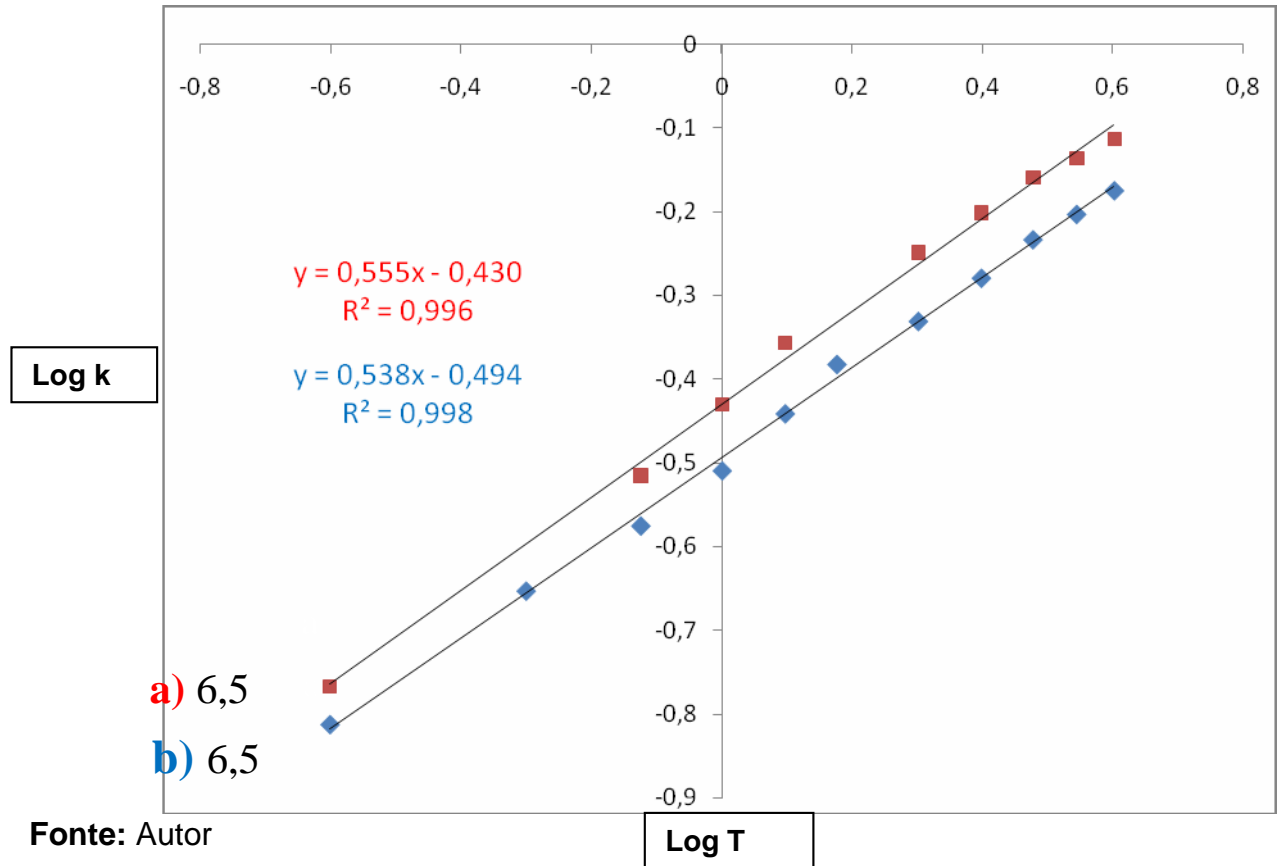


Tabela 4. a) Grau de intumescimento (Q%), expoente difusional (n), coeficiente de difusão (D), em relação a %BDDE usada na síntese dos géis e dos parâmetros experimentais: pH (6,5; 7; 7,5) e I (sem e com ajuste I= 0,156 mol L⁻¹); 25 °C

SISTE M	pH	%Q / g g ⁻¹	n	D/ cm ² /s	M c/ gm ol ⁻¹	q/ g m ol ⁻¹	V e/ mol mL ⁻¹
13%	6,5	5.1	0,	4,1	12	10	0,5
	-S	52	81		4	7	1
	6,5	2.4	0,	2,5	49	26	1,2
	-C	19	54		,1	9	9
	7,0	5.1	0,	4,2	10	13	0,6
	-S	51	82		1	1	3
	7,0	2.9	0,	0,81	10	12	0,6
	-C	28	75		3	9	2
	7,5	4.8	0,	3,1	12	10	0,5
	-S	06	84		3	7	1
7,5	3.0	0,	2,4	11	11	0,5	
-C	48	87		7	3	4	
25%	6,5	4.9	0,	1,9	56	23	1,1
	-S	80	54		,7	3	2
	6,5	3.1	0,	0,99	39	36	1,7
	-C	00	45		,9	8	6
	7,0	4.9	0,	2,3	57	22	1,1
	-S	80	58		,6	9	0
	7,0	2.5	0,	0,98	50	26	1,2
	-C	20	48		,6	1	5
	7,5	3.9	0,	2,5	51	25	1,2
	-S	80	57		,9	4	2
7,5	2.2	0,	1,1	34	38	1,8	
-C	00	47		,7	0	2	
36,6 %	6,5	4.4	0,	2,8	15	84	4,0
	-S	90	56		,6	6	5
	6,5	2.4	0,	1,8	23	57	2,7
	-C	70	54			4	5
	7,0	3.5	0,	1,8	15	87	4,1
	-S	40	51		,1	4	9
	7,0	2.2	0,	0,86	13	99	4,7
	-C	80	47		,3	2	5
	7,5	2.8	0,	2,1	14	93	4,4
	-S	20	55		,2	0	5
7,5	1.9	0,	1,1	9,	1.	6,4	
-C	30	47		78	35	7	
						0	
6,5	2.7	0,	4,2	7,	1.	9,0	
-S	00	56		02	88	1	
					0		
6,5	1.9	0,	1,6	7,	1.	8,5	
-C	60	46		41	78	3	
					1		

50%	7,0 -S	3.1 00	0, 51	2,5	11 ,5	1. 14 8	5,5 0
	7,0 -C	1.8 50	0, 37	0,48	7, 65	1. 72 5	8,2 7
	7,5 -S	2.1 70	0, 47	2,1	7, 46	1. 76 9	8,4 8
	7,5 -C	1.6 50	0, 45	1,2	7, 97	1. 65 6	7,9 3

Fonte: Autor

Assim, os valores de n , obtidos neste estudo, de modo geral, para todos os sistemas ensaiados (%BDDE, pH e I) há uma diminuição brusca dos valores de n , ao se passar da composição 13 para 25 %BDDE, seguida de uma tendência a estabilização dos valores de n em valores superiores (37 e 50 %BDDE; como observado na Figura 7). Nesta condição, atribui-se ao gel de 13 a 25 % de BDDE o comportamento misto, com grande contribuição da relaxação das cadeias poliméricas efetivamente elásticas para o processo difusional BDDE, ao passo que para os demais valores de % de BDDE os valores de n se aproximam dos valores de $0,45 \leq n \leq 0,50$.

No entanto, avaliando-se o aumento das %BDDE frente aos parâmetros experimentais, pH e I, tem-se que os valores de n permitem sugerir para:

1- pH 6,5, com e sem o controle de I, processo difusional efetivamente Fikiano; exceto para a I ajustado, apresentando um controle por relaxação das cadeias poliméricas, da ordem de 88%;

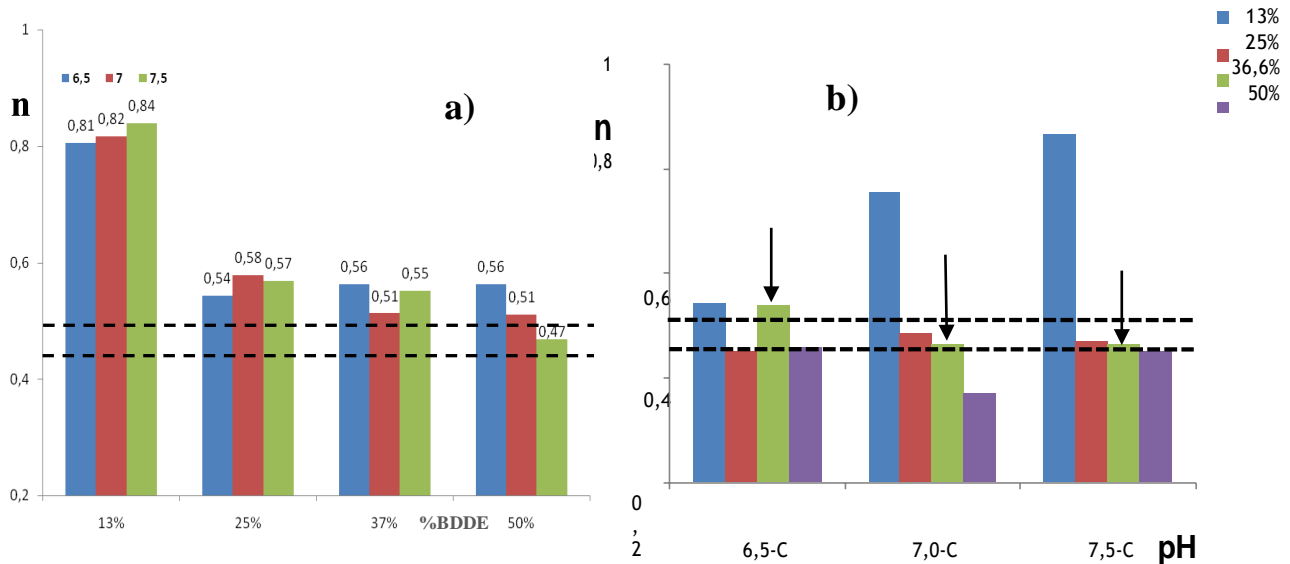
2- pH 7, sem o ajuste de I, de 13 a 25%BDDE, processo difusional com maior contribuição do processo por relaxação das cadeias poliméricas; e para I ajustada, processo de difusão efetivamente Fikiano;

3- pH 7,5, sem o ajuste de I, contribuição difusional mista, porém, acima de 37%BDDE o processo torna-se Fikiano; e para I ajustada, o controle é efetivamente Fikiano para $25 \leq \%BDDE \leq 50$; exceto para 13 %BDDE, que apresenta-se uma contribuição por relaxação das cadeias poliméricas de ~88 %.

O parâmetro n, Figura 7 com as linha tracejadas representando os valores de 0,4, é mais sensível do que o parâmetro k para a avaliação do processo difusional que ocorre para os diferentes géis e pode ser considerado avaliando-se a equação (4). Assim, evidenciou-se um aumento sistemático ao valores de k em junção com aumento das %BDDE ao passo que os valores de D mostram um comportamento contrário. Nesta situação, considerando-se o fato de que: D foi obtido a partir de n e k; e o valor de k foi obtido independente do mecanismo de difusão (n).

Portanto seria de se esperar que a difusão do solvente, no processo de intumescimento dos géis, seja melhor descrita quando avaliada a partir do parâmetro n. Considerando-se, ainda, a dependência de D do parâmetro exponencial (1/n) e a dependência direta com k, fica evidente a maior sensibilidade do parâmetro D à variação no mecanismo, n, em comparação ao parâmetro k. Outro aspecto a ser apresentado é a possibilidade, ainda, de existência de correlação entre os parâmetros n e k, o que juntamente com a sensibilidade ao parâmetro n insere uma maior dificuldade à interpretação dos resultados experimentais.

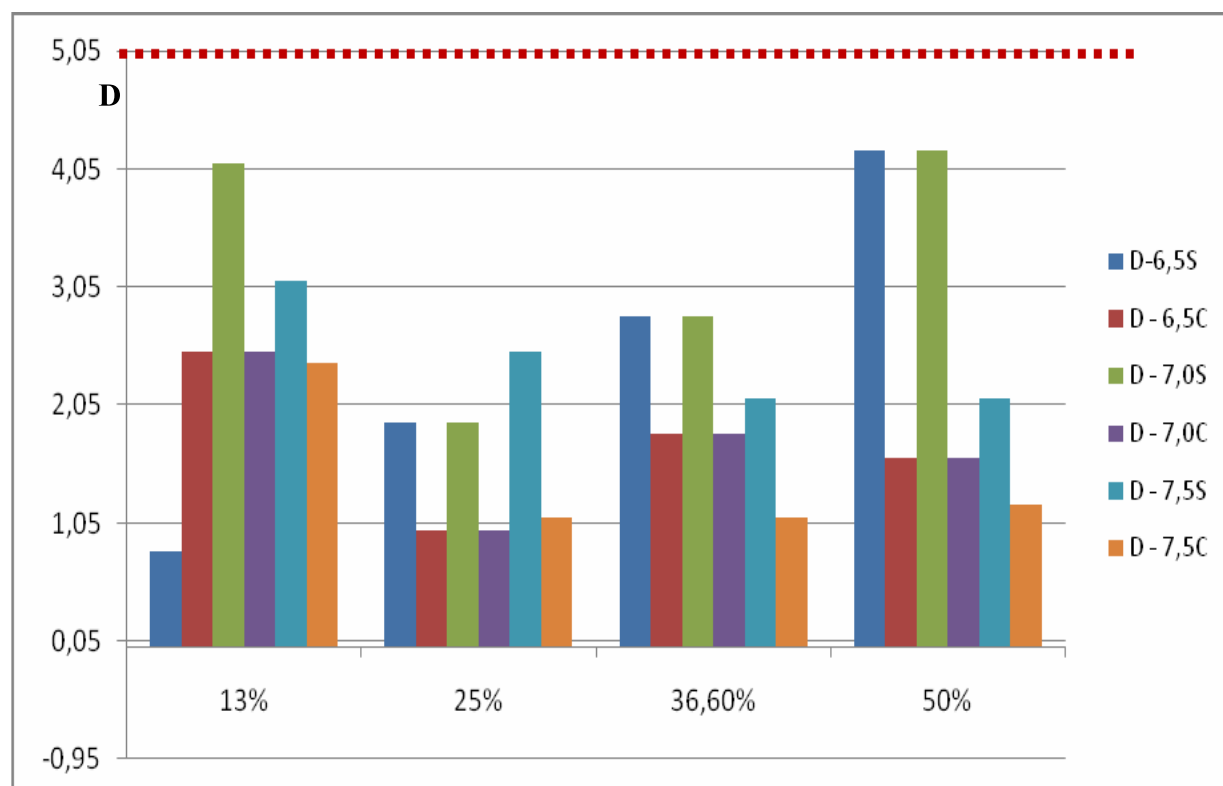
Figura 7. a) Valores do expoente difusão n como função dos teores de BDDE, para valores de $6,5 \leq \text{pH} \leq 7,5$; sem ajuste de I; b) Valores de n como função do pH, para os teores de $13 \leq \text{BDDE} \leq 50\%$; com ajuste de I. Valores de $0,50 < n < 1,0$, controle misto (Fick+relaxação)



Na Figura 8 estão representados os valores de D obtidos para os géis preparados com $13 \leq \% \text{BDDE} \leq 50$ como função dos valores de pH ensaiados com e sem o ajuste de força iônica. Fica evidente que os valores de D obtidos para os géis são diferentes, estatisticamente. O tratamento estatístico não será mostrado neste texto.

Assim, os valores de D obtidos em ausência de ajuste da força iônica são superiores aos obtidos com força iônica ajustada, a considerar todas as % de BDDE estudadas. No entanto, os valores de D observados para os extremos, 13 % de BDDE e 50% de BDDE adicionado ao polímero apresentam valores de $D > 4 \times 10^{-5}$, sem ajuste da força iônica; valores consideravelmente próximos ao valor referência: água, $D = 5,02 \times 10^{-5} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$. Para os géis ensaiados em força iônica ajustada o maior valor para D é observado para o gel com 13% de BDDE, $D = 2,5 \times 10^{-5} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$, e diminui para as demais % de agente reticulante.

Figura 8. Valores do coeficiente de difusão, D, em solução tamponante, pH 6,5; 7,0; 7,5; sem e com ajuste da $I = 0,156 \text{ mol L}^{-1}$. Traço: $D_{\text{H}_2\text{O}} = 5,0 \times 10^{-5} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$, valor referência; 25 °C



Fonte: Autor

Conforme descrito anteriormente, os valores obtidos para de D têm uma dependência com o valor do parâmetro cinético, n, constatando-se um aumento linear dos valores de D vs. n; observado para os géis intumescidos em força iônica ajustada. Para os géis ensaiados em solvente puro este comportamento é anômalo, diminuindo até 36,6% e aumentando bruscamente para 50% de BDDE presente no polímero.

Deste modo, a difusão do solvente para dentro dos retículos dos géis investigados está intimamente relacionada ao efeito da pressão osmótica da membrana do polímero, respondendo a presença e, ou ausência de sais na solução de intumescimento, conforme apontado anteriormente. Este fato será retomado nos ensaios utilizando-se das técnicas de análise térmica, mais adiante neste texto.

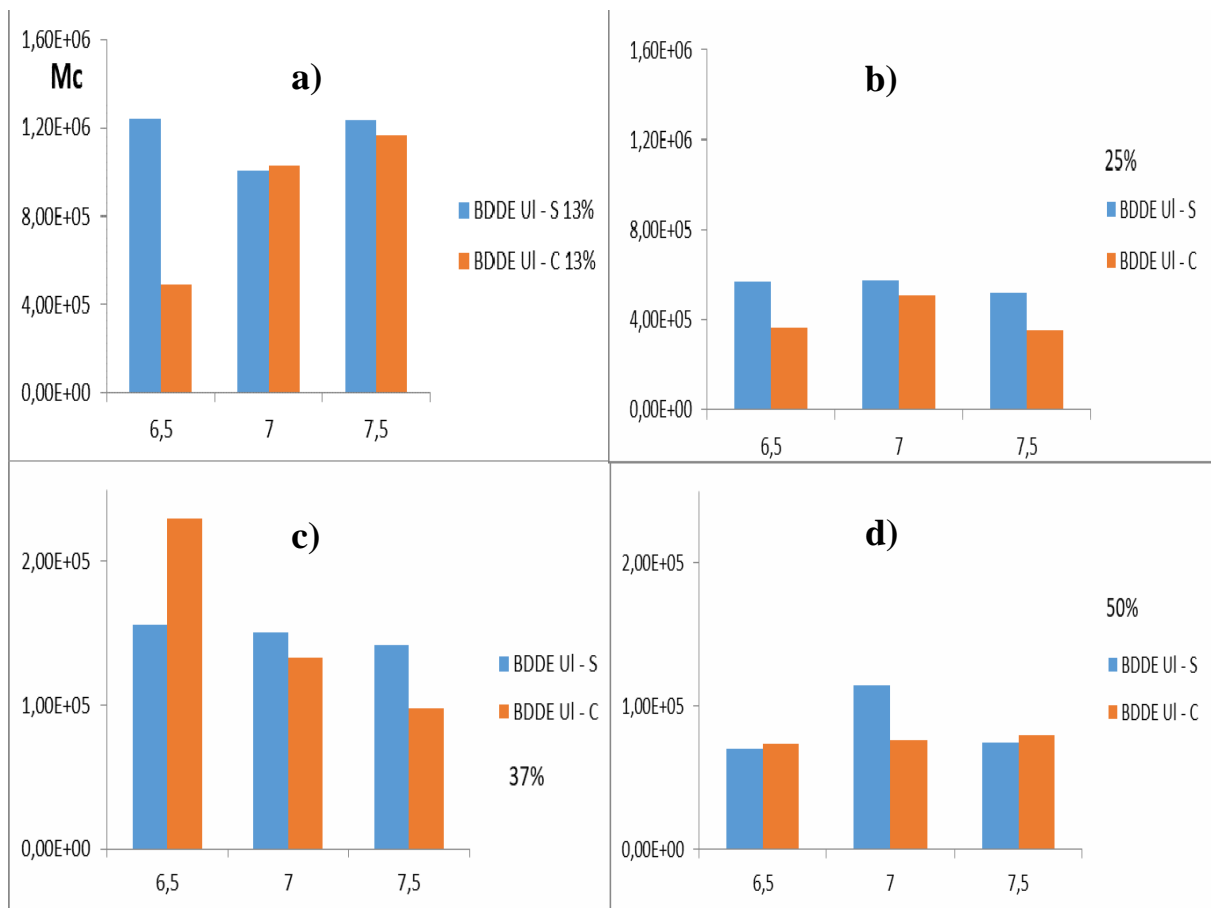
Somado aos efeitos da pressão osmótica sobre o comportamento dos géis deve-se tomar em conta a variação na hidrofiliicidade do polímero. Neste sentido, é importante apontar que a cadeia carbônica do BDDE não contém um significativo número de grupos OH originários da incorporação do mesmo.

Este fato fica evidente na medida em que se aumenta o grau de reticulação, passando-se de 13 para 50% de BDDE na etapa de síntese do polímero. Neste caso, a hidrofiliicidade do polímero aumenta para os géis na medida em que se diminui o grau de reticulação o que pode ser visualizado a partir da Figura S3 (curvas de intumescimento).

Os parâmetros cinéticos estão em concordância com os parâmetros estruturais, que % de BDDE na síntese do polímero, Figuras 6, 6a, 7, fica claro que há uma diminuição exponencial da massa molecular média dos retículos (M_c) Figura 9 variando da escala de 10^6 para 10^5 , principalmente pela variação no intervalo de 13 a 37% de BDDE inserido ao polímero a partir do qual a M_c passa a ficar constante.

Figura 9. Valores de M_c como função dos pH 6,5; 7,0 e 7,5, para os géis reticulado com BDDE: a) 13; b) 25; c) 37; e d) 50%. As figuras: a) e b) estão em escala de $1,60 \times 10^6$ e c) e d) em escala de $2,00 \times 10^5$

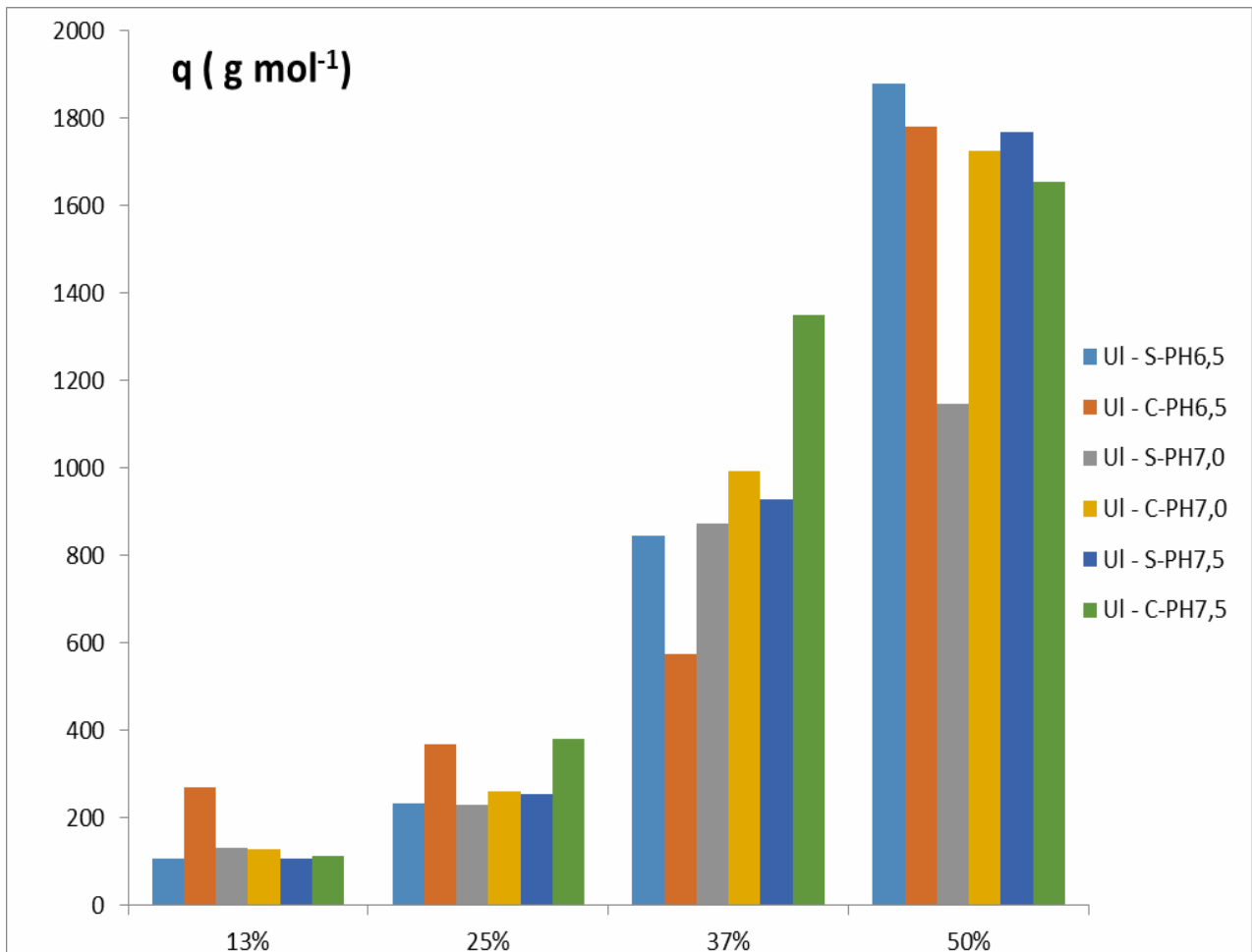
Fonte: Autor



Então, observou-se na Figura 10 que com o aumento da % do agente reticulante, há um consequente aumento no índice de densidade de reticulação (q), **Tabela 4**, o que favorece a diminuição do espaço livre, intra-retículo, para a inserção do solvente. Como consequência tem-se a diminuição na capacidade de intumescimento

%Q. Assim, fica evidente que o aumento no grau de reticulação e a diminuição da massa molar média entre os retículos (M_c) dos géis estão atrelados efetivamente ao aumento da % de BDDE a matriz do polímero (Tabela 4).

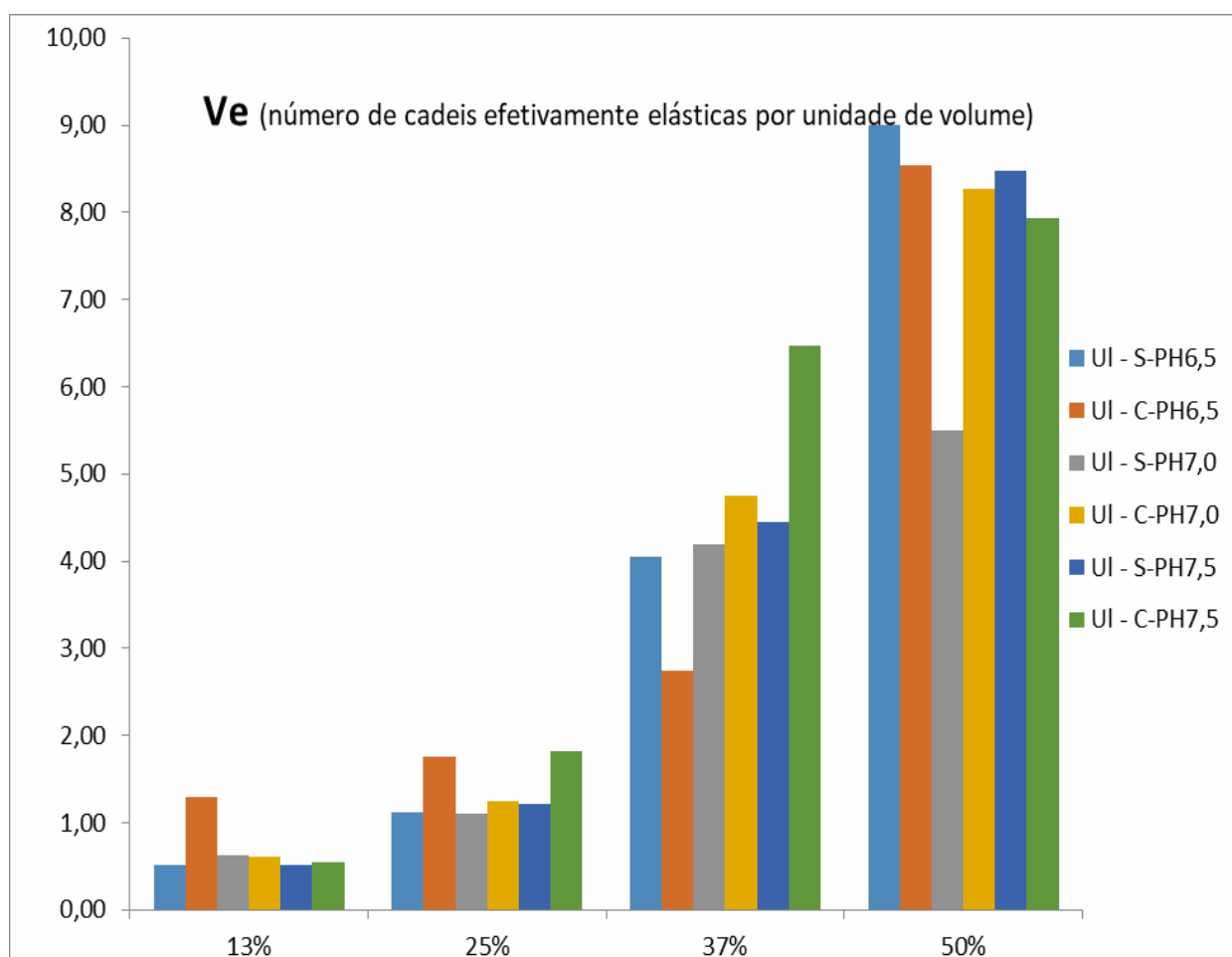
Figura 10. Valores de q (índice de densidade de reticulação) como função com %BDDE como agente reticulante 13, 25, 37 e 50%, para os pH 6,5; 7,0; 7,5



Fonte: Autor

Na Tabela 4 são apresentados os parâmetros cinéticos (n , D e $\%Q_{\text{máx}}$) e os parâmetros estruturais (Mc , q e V_e) obtidos para os géis em diferentes valores de pH e de força iônica (I). Neste estudo, o parâmetro n representa o mecanismo de transporte do solvente para o interior dos retículos, D o coeficiente de difusão do solvente e a $\%Q$, o grau de intumescimento. As variações nos parâmetros permitiram sugerir a existência de diferenças estruturais, no interior do gel. Tais regiões estão refletidas no tamanho médio dos retículos (Mc , Figura 9) o qual diminui exponencialmente com o aumento da %BDDE e aumento do V_e que representa o número de cadeias efetivamente elástica por unidade de volume.

Figura 11. Valores de V_e como função com %BDDE como agente reticulante 13, 25, 37 e 50%, para os pH 6,5; 7,0; 7,5



Fonte: Autor

4.2. Ensaio térmicos

5.2.1. Calorimetria exploratória diferencial (DSC)

Técnicas térmicas são utilizadas na investigação de sistemas poliméricos, fornecendo informações importantes no que tange as interações polímero solvente. As curvas de DSC apresentados na Figura 12a-b foram obtidas para os géis preparados a partir de diferentes percentagens do agente reticulante ($13 \leq \%BDDE \leq 50$) e intumescidos com (Figura 12b) e sem (Figura 12a) ajuste de força iônica. Na tabela S2 fica evidente a diferença no perfil térmico das curvas DSC, principalmente, na posição e intensidades dos picos: 1- exotérmicos, de cristalização do solvente; 2- endotérmicos, de fusão do solvente, presentes no interior do gel. Outro aspecto que os diferencia é o perfil, específico, dos picos de fusão do solvente, na ausência do ajuste de força iônica.

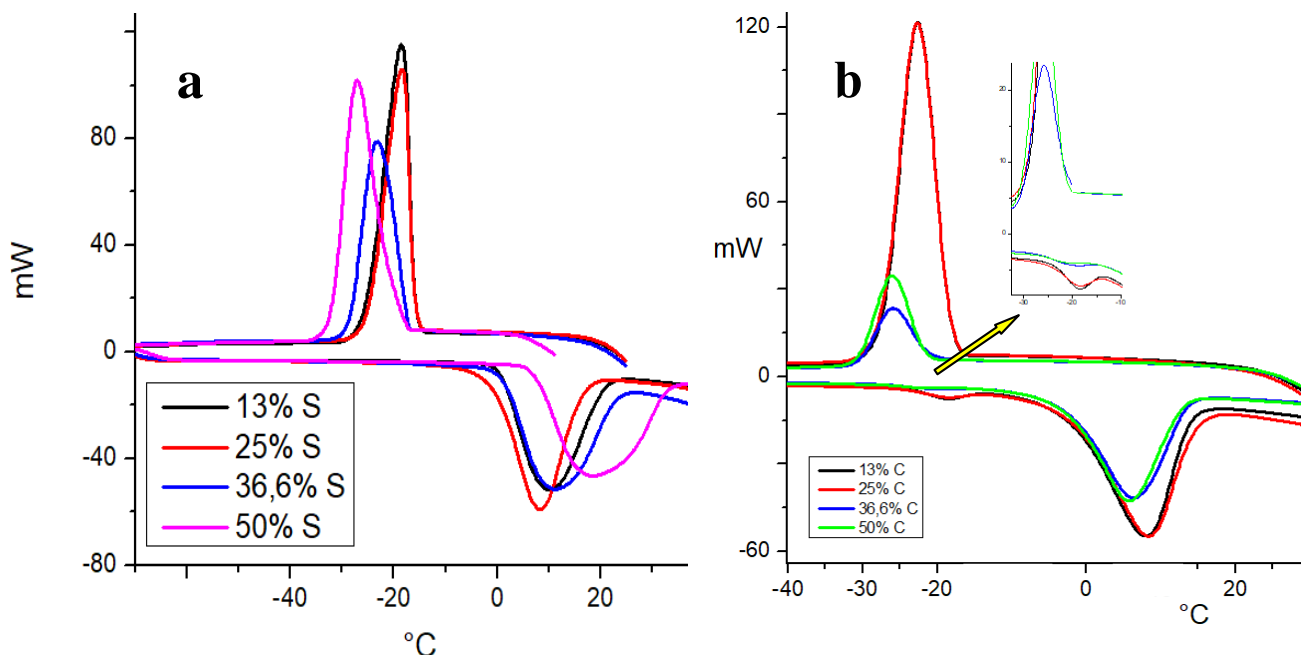
As curvas obtidas na ausência de ajuste de força iônica apresentam as temperaturas de pico de cristalização, T_c , segundo a ordem: $T_{c13\%} \sim T_{c25\%} (-22,5 \text{ } ^\circ\text{C}) > T_{c36,6\%} (-23,6 \text{ } ^\circ\text{C}) > T_{c50\%} (-27,1 \text{ } ^\circ\text{C})$. Este deslocamento da T_c , para valores mais baixos de temperatura de cristalização ocorre, efetivamente, como resultado: 1- do aumento do grau de reticulação do polímero, evidenciado pelo aumento do número de retículos (parâmetro estrutural, d); e 2- diminuição da massa molar média (M_c) dos retículos; resultantes do aumento na % de BDDE na matriz do polímero.

Portanto, o deslocamento na T_c é indicativo do grau de reticulação do polímero e pode ser correlacionado diretamente com teor de BDDE adicionado.

Por outro lado, uma avaliação da curva DSC no intervalo de temperatura de aquecimento da amostra, pós-congelamento, permite observar que as temperaturas de fusão (T_f) estão em correspondência direta com as temperaturas de congelamento (T_c). Assim, por exemplo, o gel preparado com 13% de BDDE apresenta a maior temperatura de congelamento e a menor temperatura de fusão.

No entanto, o perfil das curvas de fusão é distinto, sendo que as curvas obtidas para os géis preparados com 13% ($T_f = 8,2 \text{ } ^\circ\text{C}$) e 25% ($T_f = 10,4 \text{ } ^\circ\text{C}$) de BDDE são de aparência gaussiana, pura, ao passo que as curvas obtidas para 37% ($T_f = 12,3 \text{ } ^\circ\text{C}$) e 50% ($T_f = 18,1 \text{ } ^\circ\text{C}$) de BDDE apresentam-se alargadas, e, para 50%, ocorrendo a presença de um ombro com início de pico em $T_f = 26,1 \text{ } ^\circ\text{C}$.

Figura 12. Curvas DSC para géis de AH com $13 \leq \%BDDE \leq 50\%$; intumescidos a pH 7,0; a) sem ajuste de I; b) $I = 0,156 \text{ mol L}^{-1}$, em NaCl. Detalhe: sinal em -18°C . $\beta = 5^\circ\text{C min}^{-1}$; cadinho: Al, 50 μL , aberto; atmosfera estática inerte: de N_2



Fonte: Autor

A variação no perfil destas curvas está diretamente associada à presença de moléculas do solvente distribuídas por regiões internas do polímero apresentando energias de interação, solvente-solvente, solvente-polímero diferenciadas. Tal comportamento permite sugerir que nos diferentes géis existem regiões com diferenças estruturais, tamanho de retículo, o que se reflete na distribuição de sítios energeticamente diferenciados, possivelmente referente a variações no tamanho médio dos retículos para um mesmo gel.

Este fato é concordante com o observado para as T_c , que tem sua temperatura diminuída com o aumento do grau de reticulação (parâmetro estrutural, d). O deslocamento de T_c em -5°C , observado ao se passar de 13 para 50% de BDDE, permite sugerir que com o aumento do grau de reticulação é necessário a retirada de mais energia térmica do sistema promovendo a diminuição da T_c . Assim, a modificação do perfil térmico das curvas DSC são resultados efetivos das modificações ocorridas nos géis como função da quantidade de agente reticulante adicionado ao polímero.

Ao se avaliar a Figura 12b verifica-se, para o passo do resfriamento, 25 a -60 °C, que a intensidade e a posição dos picos de temperatura, T_c , não seguem exatamente os observados no perfil das curvas DSC obtidas para os géis em ausência de ajuste de força iônica, no que tange as intensidades dos picos de T_c .

Os picos observados para os géis preparados pela adição 13 e 25 % apresentam-se exatamente com os mesmos valores de $T_c = -22,5$ °C e igual intensidade. Estes picos apresentam suas T_c iguais às observadas em ausência de ajuste de força iônica. Por outro lado, os géis preparados para 37 e 50% de BDDE apresentam intensidade aproximadamente 80 % menor comparado as T_c para 13 e 25% de BDDE. No entanto, a diferença entre as temperaturas $\Delta T_c = -5$ °C obtidas para 13 e 50% de BDDE, em presença da I ajustada, não se alterou em comparação a obtidas em ausência de ajuste de I.

As curvas DSC obtidas para os géis com ajuste de I com NaCl no passo de aquecimento das amostras revelam a presença de um pico endotérmico em $T = -18$ °C. Este pico não tem alterada a sua posição com o aumento do número de ciclos de varredura contínua (cinco ciclos) de temperaturas; vide experimento específico, Figura S4. Fica evidente que este pico só se faz, efetivamente, presente para os géis preparados em baixas percentagens do agente reticulante, estando ausente para as demais.

Tal comportamento está em concordância com os parâmetros cinéticos e estruturais apresentados anteriormente. Ao se avaliar os resultados para a densidade de retículos (q) e para massa molecular média para os retículos (M_c) observa-se que para as baixas percentagens de BDDE o grau de reticulação diminui exponencialmente ao passo que o tamanho médio dos retículos (M_c) aumenta, permitindo a difusão do solvente e a consequente inserção da solução com seus íons ao interior dos retículos.

Paralelamente, os estudos de DSC apresentados para a determinação dos teores de água livre e água ligada as paredes dos retículos, por ligações de hidrogênio (Tabela 5), mostraram que o gel preparado com 25%BDDE, sem ajuste da I, apresenta o maior teor de água ligada 16,5% H_2O e, conseqüentemente, o menor teor de água livre, 83,5 % H_2O .

Para os demais géis, tanto para valores inferiores quanto superiores a 25%BDDE, ocorre a diminuição dos teores de água ligada e o aumento da água livre presente nos géis, respectivamente. Comportamento semelhante é esperado para os géis quando intumescidos em presença de sal a pH 7,0. No entanto, o que se obtém,

aplicando-se o mesmo procedimento de cálculo, $\Delta\% \text{H}_2\text{O}$ (S-C), Tabela 5, são valores variando entre 20 e 30 % de água, o que não pode ser atribuído a água ligada as cadeias do polímero, pois estaria em desacordo com o observado para as curvas de intumescimento (Figura S3). Tais curvas diminuem em intensidade da %Q quando se compara os géis intumescidos em água a pH 7,0 e em presença do sal. Assim, chegou-se a conclusão que o teor de água ligada, quando da presença de sal, é a mesma que a obtida para os géis intumescidos em água a pH 7,0. Porém, essa elevada percentagem de água calculada se refere à água que não foi incorporada aos retículos dos géis quando estes são intumescidos em presença de sal. (SESTAK, JAROSLAV. Et. al. 2000)

Tabela 5. Dados de DSC para água livre e ligada para géis de HA reticulado com BDDE 13, 25, 37 e 50% e produto comercial Rennova Lift, concentração de AH, grau de reticulação relativo.

% BDD E	C _{AH} mg L ⁻¹	%C H ₂ O livre	%S H ₂ O livre	$\Delta\%$ H ₂ O (S-C)	%S H ₂ O* ligada	Grau de reticulação relativo**
13	12,5	65,9	96,8	30,9	3,2	2,1
25	20,2	63,2	83,5	20,3	16,5	11,0
37	24,7	56,9	86,6	29,7	13,4	9,0
50	38,2	65,9	91,8	25,9	8,2	5,5
**Renno va Lift	-	-	85,06	-	14,94	10,0

*%C H₂O: presença de sal, pH 7,0. %S H₂O: ausência de sal, pH 7,0. $\Delta\%$ (S-C): água que não foi inserida no interior do retículo dos géis em presença do sal. *Este valor foi considerado o mesmo para a %C H₂O, pois $\Delta\%$ H₂O (S-C) não pode corresponder a água ligada, uma vez que a %Q diminui com a presença do sal. ** Comparação com o produto comercial.*

%S H₂O ligada=100-%S H₂O livre. 100= energia de fusão da água pura.

Este comportamento, observado para os teores de água, ligada (%S H₂O ligada) e livre (%C H₂O; %S H₂O, livres), variando como função da %BDDE crescente, está em conformidade com a variação no índice de reticulação, **q**, obtidos para o estudo cinético e estrutural dos géis. Assim, de modo geral, a diminuição no tamanho médio dos retículos (**Mc**), o enrijecimento do polímero, com o aumento no **q** e o aumento na massa molar média do polímero (MM_{mp}), Tabela 6, são concordantes com a diminuição observada para a quantidade de água livre no interior dos retículos e o aumento da quantidade de água ligada as suas paredes (Tabela 5) para os géis intumescidos em água, pH 7,0. Para os géis intumescidos em presença do sal os valores de perda de água livre do interior dos géis é significativamente superior a observada para os intumescidos em água a pH 7,0.

A partir da Tabela 5 verifica-se que a quantidade de moléculas de água ligadas por ligação de hidrogênio, às paredes do polímero, para os géis mais reticulados diminui, em comparação aos géis de 13 e 25%BDDE. No entanto, de modo geral, com o aumento da reticulação a tendência é a diminuição da água ligada e o aumento da quantidade de água livre no interior dos retículos, relativamente; compare-se os géis preparados com 25, 36,6 e 50%BDDE. Esta nova redistribuição de moléculas de solvente está relacionada à sistemática diminuição da T_c para os géis com teores de BDDE nos intervalos: 1- (25% < %BDDE < 36,6) $\Delta T = 4^\circ\text{C}$; e 2- (25 < %BDDE < 50) $\Delta T = 8^\circ\text{C}$.

Considerando-se as avaliações referentes à presença de água livre e ligada, as curvas DSC obtidas para as baixas % de BDDE (Figuras 12b e 13) mostram a presença de um par de picos, exo e endotérmicos, em -54 e -18°C , respectivamente. Por outro lado, a ausência deste pico para as demais percentagens do agente reticulante (37 e 50%BDDE) deve estar associada à minimização da quantidade de solvente e, portanto do sal hidratado, no interior dos retículos. A minimização do sal nos retículos deve estar sendo causada pela ação seletiva do mesmo, não permitindo a inserção dos íons hidratados, devido, possivelmente, ao considerável volume dos íons de sódio e cloreto hidratados.

Esta constatação corrobora com os resultados obtidos do estudo cinético para os valores de D obtidos para os sistemas ensaiados em soluções tamponantes com a força iônica ajustada. Tais valores se apresentam significativamente baixos ($0,9 \times 10^{-5}$) em comparação com a água pura ($5,01 \times 10^{-5}$) ao passo que os valores obtidos em ausência de ajuste de força iônica atingem valores ($4,2 \times 10^{-5}$) que se aproximam ao da água.

Apesar das considerações apresentadas nos parágrafos anteriores fica, ainda, evidente o deslocamento dos picos com $T_{c\ 36,6\%} = -23,6^\circ\text{C}$ para a de $T_{c\ 36,6\%} = -25,0^\circ\text{C}$, pela ação da presença do sal. Deve ser apontado, no entanto, que o valor da $T_{c\ 50\%}$ não é alterado pela presença do sal; exceto a $T_{c\ 37\%}$ a qual deslocou-se de um $\Delta T = 2,4^\circ\text{C}$, passando de $23,6$ para $26,0^\circ\text{C}$, por efeito da presença do sal.

Retomando a avaliação da etapa de aquecimento das curvas DSC das amostras intumescida em solução tamponante, com ajuste da I , Figura 12b, no que se referem às temperaturas de fusão, em comparação com o observado para a Figura 12a, sem

ajuste da I, as curvas se apresentam simétricas e, portanto, com comportamento gaussiano.

Comportamento desta natureza permite sugerir que as moléculas do solvente estão distribuídas com maior regularidade pelos retículos, tendo, portanto, ocorrido uma minimização na variação do tamanho médio dos retículos.

Outro aspecto a ser observado a partir da Figura 12a e b é o fato das temperaturas de fusão, T_f , terem diminuído: $T_{f\ 13\%} \sim T_{f\ 25\%} = 9,6 > T_{f\ 37\%} = 6,0 > T_{f\ 50\%} = 5,8$ °C; em comparação com aquelas observadas para os géis intumescidos em sem ajuste da I. O valores de ΔT observados para os géis intumescidos sem ajuste da I foi de $\Delta T = 9,9$ °C, ao passo que para os géis intumescidos em força iônica ajustada foi de $\Delta T = 3,8$ °C, o que denota a diferença significativa nos arranjos cristalinos do solvente no interior dos géis e a ação dos íons de NaCl. Estes valores de ΔT foram obtidos subtraindo o maior valor de T_f do menor valor constante das curvas presentes em cada caso.

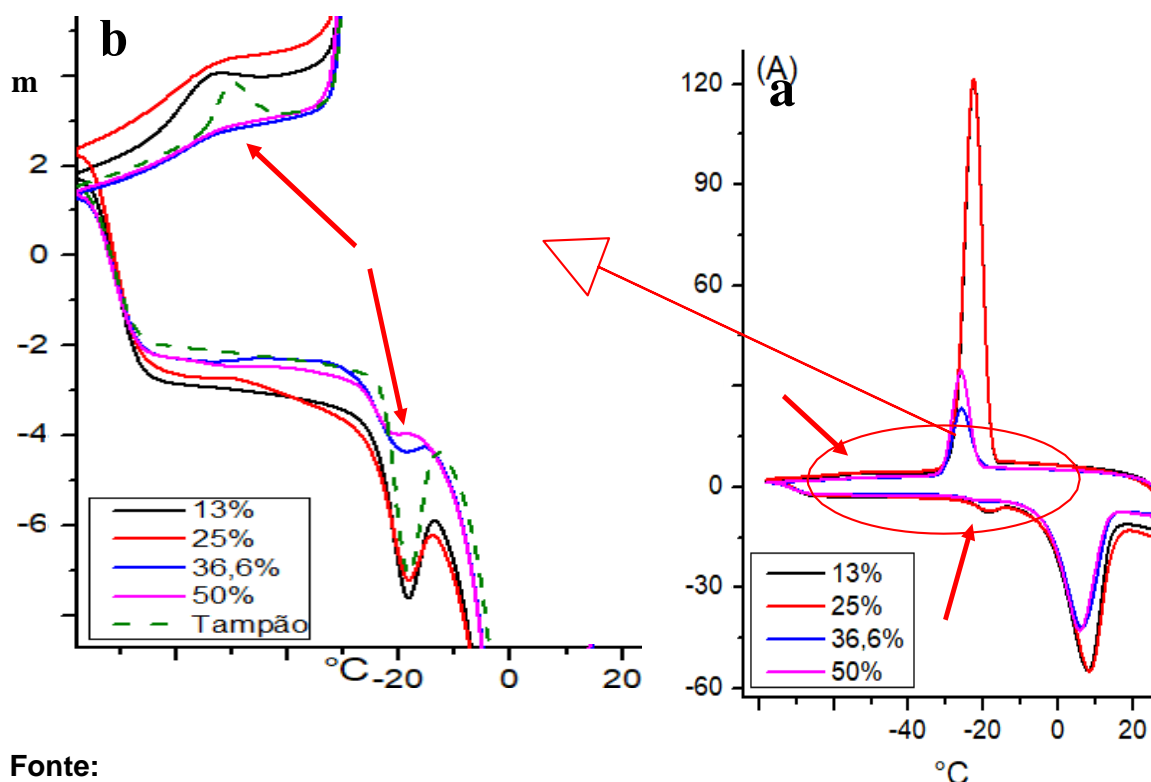
Paralelamente as variações nas temperaturas de fusão, T_f , para os géis intumescidos em ausência de ajuste da I, constatam-se uma inversão na correspondência entre as temperaturas de pico de cristalização, T_c , e as de fusão, T_f , por exemplo: $T_{c\ 13\ e\ 25\%} = 22,5$ °C apresentam $T_{f\ 13\ e\ 25\%} = 9,6$ °C a passo que $T_{c\ 37\ e\ 50\%} = 26,0$ °C apresentam $T_{f\ 37\ e\ 50\%} = 6,3$ °C.

Considerado o discutido anteriormente para a Figura 12a, as temperaturas de fusão deveriam ser maiores para os géis com temperaturas de cristalização menores. Este fato se pode justificar pela maior quantidade de solução sendo inserida nos retículos dos géis de composição 13 e 25% de BDDE (Tabela 5), o que desloca o evento para temperaturas maiores devido à considerável massa de solvente presente nestas amostras.

Na Figura 13 são apresentadas curvas DSC obtidas para a confirmação do fato de que o pico endotérmico ($T = -18$ °C), apresentado anteriormente, é gerado pela presença dos íons de NaCl, presentes na solução de intumescimento. A Figura 13b apresenta uma ampliação da região de interesse.

A partir desta figura é possível a observação da curva DSC obtida para a solução utilizada nos experimentos de intumescimento dos géis, tendo a I ajustada, e a curva obtida em iguais condições experimentais. Fica explicitada a posição do pico em $T = -18$ °C, e o correspondente, pico exotérmico, em -54 °C; em perfeita concordância com as curvas DSC obtidas para os demais géis ensaiados.

Figura 13. a) Curvas DSC com diferentes %BDDE: 16 a 50%; intumescido a pH 7 I= 0,145 mol L⁻¹, em NaCl; b) Ampliação sinal em -18°C; condições experimentais iguais as da Fig.12



Fonte:

Outro pico se faz evidente, para o ramo de resfriamento da curva DSC em $T = -54$ °C. Este pico exotérmico se faz presente, não só para a solução de intumescimento, como para os géis preparados com 13 e 25%BDDE; exatamente para os géis que permitem a inserção do solvente e de seus íons no interior dos retículos (valores de n elevados, baixos valores de d e altos valores de Mc e baixos valores para a MM_{mp}).

A observação do pico endotérmico em -18 °C está em perfeita concordância com a literatura (Zhao, Li-Shan. et. al. 2015). Desta forma, este pico, poderia ser atribuído num primeiro momento, a uma transição alotrópica $\alpha - \beta$ da água, de configuração cúbica, para valores de $T < -20$, para hexagonal para $T > -18$ °C. Esta transição poderia estar relacionada com as moléculas de água de hidratação dos íons quando presentes no interior das dos géis de baixo teor de agente reticulante; a considerar que estas águas estão fortemente ligadas ao íon e não as paredes do polímero que configuram os retículos ou mesmo a outras moléculas de água por ligação de hidrogênio.

Outra avaliação conduzida para estes géis foi o ensaio para a verificação da existência de T_g , transição vítrea para estes géis. Os experimentos foram conduzidos a

partir da remoção parcial do solvente dos géis previamente intumescidos, por programa de aquecimento da amostra, no compartimento da célula do DSC, até a temperatura desejada para a remoção parcial do solvente. Amostras independentes, três, do mesmo gel, foram ensaiadas até as temperaturas de: 25, 60 e 80 °C, para a remoção parcial do solvente.

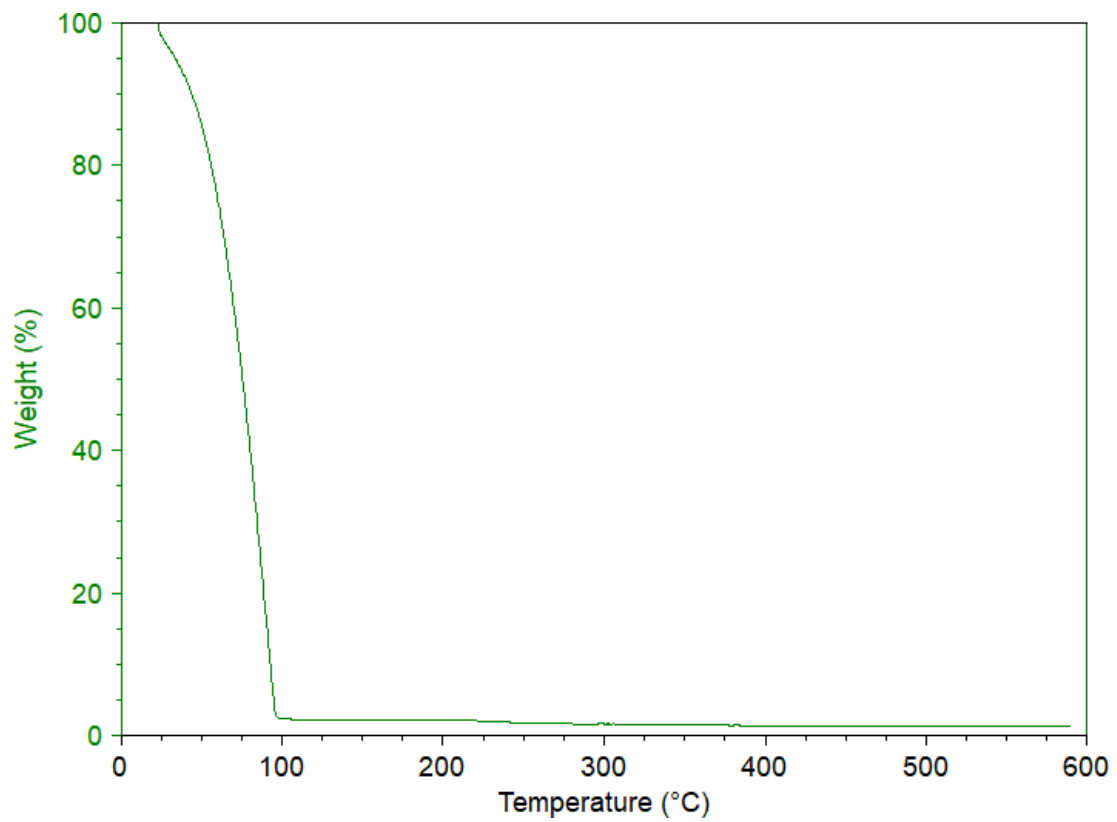
Tabela S2: Valores de ΔH de cristalização e de fusão da água e as respectivas temperaturas (T_{onset}) para a recristalização e T_{pico} para a fusão. Valor referência para o $\Delta H_{\text{normalizada}}$ da água

	Amostra	$\Delta H_{\text{Integral}}$ (mJ)	$\Delta H_{\text{Normalized}}$ (Jg ⁻¹)	T_{Onset} /°C	T_{Peak} °C
Cristalização da água	13% ComsalGBDDE	2838,8	230,8	- 20,98	-18,97
	25% ComsalGBDDE	2858,6	228,7	- 21,15	-19,19
	36% ComsalGBDDE	2176,9	215,5	- 22,23	-20,33
	50% ComsalGBDDE	2130,4	229,1	- 23,14	-20,49
	13% semsalGBDDE	3065,0	303,4	- 18,98	-17,07
	25% semsalGBDDE	3297,3	299,8	- 18,03	16,08
	36% semsalGBDDE	3249,4	285,0	-20,6	-18,49
	50% SemsalGBDDE	3302,5	289,7	- 23,93	-21,91
		Renova LiFt	2794,4	285,2	- 23,44
Fusão da água	13% ComsalGBDDE	-2751,3	-223,7	-1,16	7,17
	25% ComsalGBDDE	-2680,1	-214,4	0,64	7,4
	36% ComsalGBDDE	-1953,4	-193,4	-1,23	6,06
	50% ComsalGBDDE	-2080,8	-223,7	-1,53	5,37
	13% semsalGBDDE	-3318,3	-328,6	1,88	9,92
	25% semsalGBDDE	-3119,1	-283,6	0,52	8,18
	36% semsalGBDDE	-3352,4	-294,1	2,35	10,27
	50% SemsalGBDDE	-3551,4	-311,5	1,83	9,23
		Renova LiFt	-2830,3	-288,8	-1,66

Fonte: Autor

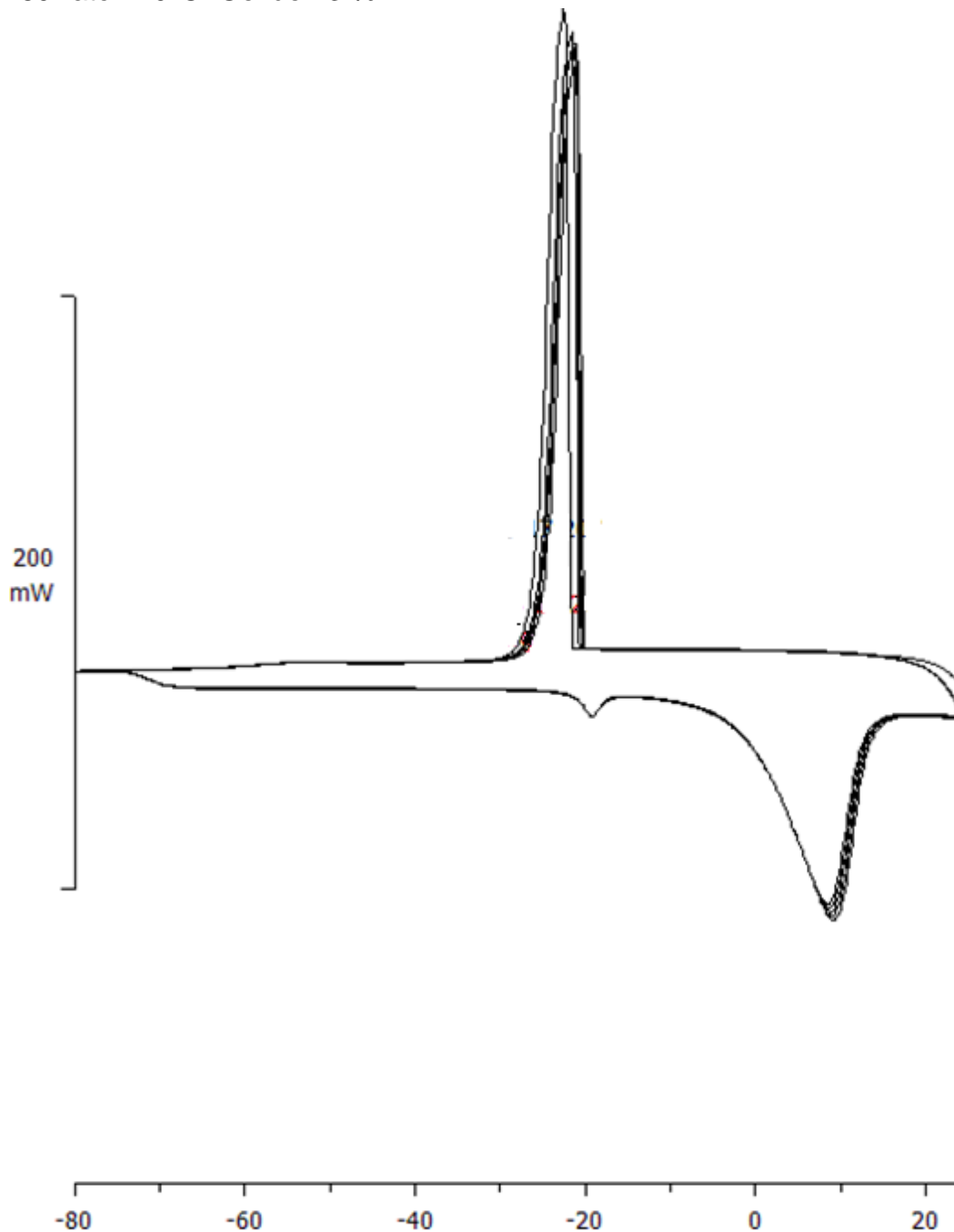
Estes dados (Tabela S2) foram utilizados, juntamente com as curvas de decomposição térmica do gel (curvas TG), obtidas para cada gel, para nortear os cálculos dos diferentes tipos de água presentes no gel: água ligada e água livre. Os cálculos foram conduzidos em acordo com a referência (SM Shaheen, K Yamaura -, 2002).

Figura S4: A curva TG apresentada a seguir foi obtida para o gel preparado pela adição de 13%BDDE, e a perda de massa de água livre foi utilizada nos cálculos citados anteriormente. Esta curva é representativa das demais.



Fonte: TA Universal Analysis

Figura S5- Experimento de varredura contínua para a verificação a estabilidade dos picos das curvas de resfriamento e aquecimento, respectivamente. Número de ciclos: 5 ciclos; intervalo de temperaturas ($-80^{\circ}\text{C} \leq T \leq 25^{\circ}\text{C}$); último ciclo -80° até 120°C . Gel de 13 %BDDE.

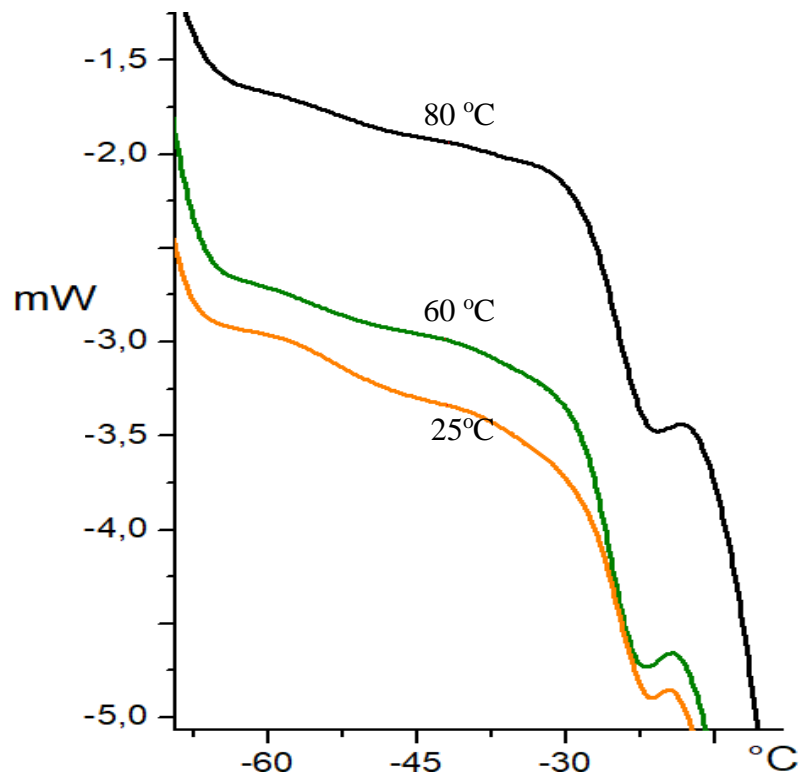


Fonte: DSC Stare, Mettler Toledo

Na Figura 15 estão representadas, sobrepostas às curvas obtidas para a etapa de aquecimento, após a remoção parcial do solvente conforme descrito no parágrafo anterior. Foi então, possível se observar a presença e, ou ausência de T_g para os diferentes géis preparados, sendo que para os géis: 1- menos reticulados, 13 e 25% de BDDE, a temperatura da T_g não foi observada, podendo estar presente em temperaturas

inferiores a 80 °C; e 2- mais reticulados, 36,6 e 50 % de BDDE, foram observadas T_g para o mesmo valor: $T_{Tg} = -53$ °C. A presença das T_g está em fase de investigação.

Figura 15. Curvas DSC gel HA-BDDE, intumescido a pH 7; $I = 0,156 \text{ mol L}^{-1}$, em NaCl. Amostras aquecidas previamente para remoção parcial do solvente até a $T = 80, 60, 25$ °C; resfriamento prévio a $T = -80$ °C e obtenção das curvas DSC de aquecimento; condições experimentais iguais as da Fig.12



Fonte: Autor

5.3. Avaliação das Propriedade Reológicas dos géis

A abordagem reológica dos géis foi levada a cabo por se ter a necessidade de se obter maiores detalhes dos géis intumescidos em pH 7,0 e com a força iônica ajustada. Assim, a aplicação desta técnica permite não só, a determinação da viscosidade dos géis preparados, como a determinação das suas massas molares médias, a classificação viscoelástica dos polímeros, permitindo a sua comparação com os produtos comerciais de diferentes aplicações.

Na Tabela 6 são apresentados os parâmetros reológicos: G'' , relacionado ao módulo viscoso; G' relacionado ao módulo elástico; η^* , relacionado à viscosidade complexa; $\tan \delta$, relacionado ao comportamento viscoelástico do polímero; e a MM_{mp} , massa molar média do polímero; parâmetros obtidos para os géis preparados com $13 \leq \%BDDE \leq 50$.

Tabela 6. Resumo dos valores dos parâmetros G' , η^* , G'' e $\tan \delta$ para a frequência de 0.7 Hz e os valores da massa molar média para os géis preparados

% BDDE	C_{HA} mg L ⁻¹	G' (Pa)	G'' (Pa)	η^* (Pa s)	\tan δ	Massa Molar Média (MDa)
13	12,5					5,0
		56,6	19,3	41,5	0,33	
25	20,2					6,3
		184	69,5	106	0,37	
37	24,7					10
		370	137	212	0,37	
50	38,2					11
		434	189	279	0,43	

Fonte: Autor

Assim, o módulo elástico, G' , é um medida da rigidez do gel e, portanto, sua capacidade de resistir à deformações quando submetido a uma pressão aplicada, para a extrusão do gel de preenchimento, seja através de uma agulha ou cânula de injeção para a inserção em partes sensíveis da pele da face ou, posterior ao implante, quando o preenchedor é submetido a movimentos da musculatura facial.

No que tange aos valores de G' , quanto mais alto for este valor para o gel em estudo menor é a sua capacidade de deformação, quando aplicada uma determinada pressão e, portanto, mais energia este pode armazenar, e, assim, vão apresentar uma menor espalhabilidade, quando presentes na região subcutânea. Géis com esta

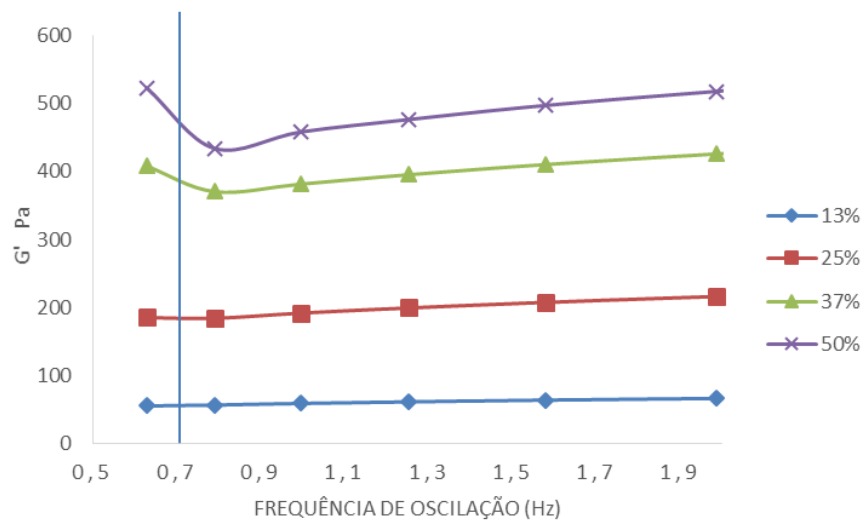
natureza foram obtidos para as preparações efetivadas com $37 \leq \%BDDE \leq 50$, Tabela 6, respectivamente.

A Figura 16 apresenta a variação do módulo G' vs. a frequência, no intervalo de $(0,1 \leq f \leq 2)$ Hz, observado para os géis preparados com $13 \leq \%BDDE \leq 50$. A seleção deste intervalo de baixa frequência, é tido como fisiologicamente relevante (região de estresse fisiológico) que consiste no movimento da musculatura facial e da ação da gravidade em que a pele está submetida. (Hema Sundaram, M.D. et al, 2013).

A partir dos dados apresentados na Tabela 6, para os valores de G' , verifica-se um aumento deste parâmetro com o acréscimo da $\%BDDE$. Tal comportamento comprova o aumento na propriedade elástica dos géis com o aumento da $\%BDDE$, p. ex., o valor de G' para gel com 25%BDDE, 184 Pa, encontra-se na faixa de uso comercial, para aplicação como preenchimento dérmico facial.

Por sua vez, o gel contendo 37 e 50%BDDE, G' , 370 e 434 Pa, apresentam-se na faixa de uso para a aplicação como viscosuplimentação, tornando mais resistente ao movimento das articulações. Géis com tal comportamento possuem alta capacidade de elevação de tecidos, tornando um predito de maior capacidade de suporte tecidual (do tipo comercial designado como: "lift"), estando em acordo com a literatura (Sébastien Pierre et. al., 2013).

Figura 16. Módulo elástico (G') função da frequência de oscilação 0,1 a 2 Hz. Para géis de HA reticulado com BDDE $13 \leq \%BDDE \leq 50$. Linha azul em 0,7 Hz região de frequência para uso em preenchimento facial

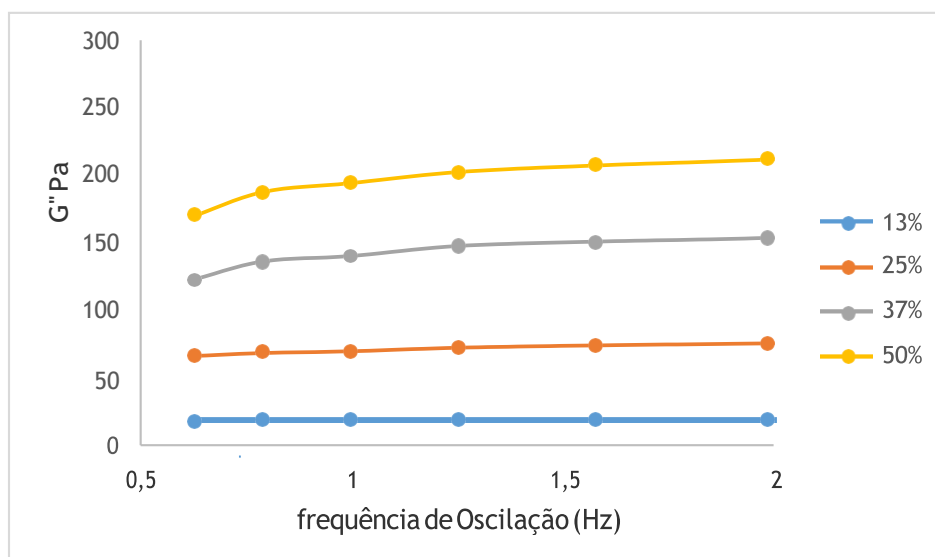


No que se refere ao módulo viscoso (G''), a Figura 17 e Tabela 6 apresentam o comportamento geral e os valores de G'' , dos géis estudados, como função da frequência de oscilação, para o mesmo intervalo de frequências aplicadas para o estudo de G' , ($0,1 \leq f \leq 2$) Hz. Para géis investigados observa-se o aumento da viscosidade com aumento na $13 \leq \% \text{BDDE} \leq 50$ na matriz do polímero de HA.

Sabe-se que o módulo G , propriedade viscosa, quando se apresenta com valores até o teto de 100 Pa, é tida como adequada para a finalidade de uso comercial, para fins de aplicação em preenchimento facial (Sébastien Pierre et. al., 2013). Assim, os géis preparados com $13 \leq \% \text{BDDE} \leq 25$, apresentam ($19,2 \leq G'' \leq 69,5$) Pa apresentando-se como apropriados para esta finalidade. Uma forma de amenizar esse efeito é com a adição de AH livre para que ocorra o decaimento do módulo G'' .

Para os géis preparados com $37 \leq \% \text{BDDE} \leq 50$ apresentam valores para ($137 \leq G'' \leq 189$) Pa; valores estes que se apresentam superiores a 100 Pa. No entanto, um artifício, comercial, pode ser aplicado. O artifício consiste na adição de percentagem adequada de solução de HA intumescido ao gel de interesse e, assim, baixar os valores de modo a estes caírem no intervalo de interesse; deve ser observado que tal ação, também, irá alterar os valores para G' .

Figura 17. Módulo viscoso (G'') como função da frequência de oscilação 0,1 a 2 Hz. Para géis os géis com $13 \leq \text{BDDE}\% \leq 50$. Linha azul em 0,7 Hz região de frequência para uso em preenchimento facial



Fonte: Autor

A Tabela 6, também, apresenta os valores calculados para o ângulo da fase, $\tan \delta = G''/G'$. O ângulo de fase (δ) é descrito como sendo a expressão da capacidade do material em converter a energia mecânica aplicada ao mesmo em calor, indicando o quanto este material é considerado viscoso ou elástico (Mendieta-Taboata et al, 2008).

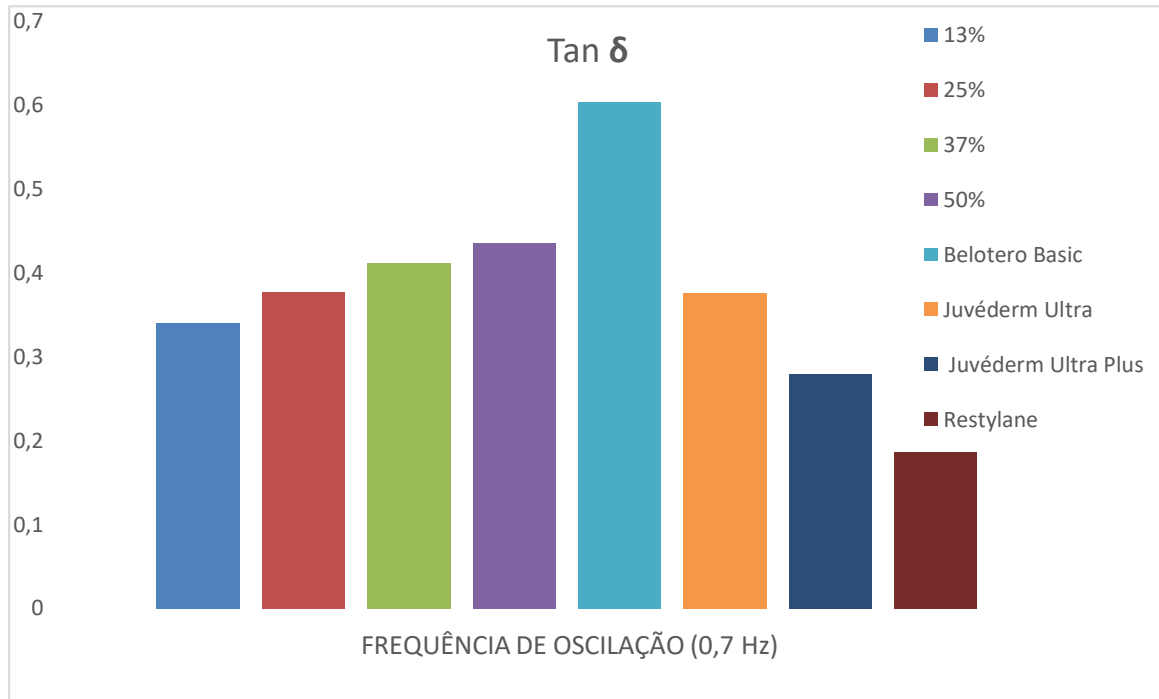
Uma avaliação dos valores de $\tan \delta$ para os valores de $13 \leq \%BDDE \leq 37$ apresentam-se no intervalo de (0,33 $\tan \delta$ e 0,37). Este parâmetro se refere à elasticidade do material. Assim, os valores de $\tan \delta$ determinam se o material é principalmente elástico ($\tan \delta < 1$), exibindo comportamento gelatinoso, ou se é principalmente viscoso ($\tan \delta > 1$), comportando-se mais como um líquido viscoso (por exemplo, mel).

Desta forma, para a aplicação do gel como preenchedores faciais, o $\tan \delta$ deve ser baixo, geralmente variando no intervalo de ($0,05 \leq \tan \delta \leq 0,80$). Se se observar os valores deste parâmetro para os géis em estudo tem-se valores, todos inferiores a $\tan \delta \leq 0,37$, exceto para o gel preparado com 50%BDDE cujo valor é de $\tan \delta 0,43$. Esta constatação mostra que o comportamento destes géis é elástico, sob baixa tensão de cisalhamento, sobrepondo-se, portanto, ao comportamento viscoso (isto é, líquido).

Assim, os valores obtidos para a $\tan \delta$, Tabela 6, para todos os géis produzidos estão associados a um baixo valor de $\tan \delta$ e próximos ao valor relacionado com fluido sinovial de $\tan \delta 0,33$. Este fato comprovando a capacidade satisfatória dos géis, quando presentes no meio fisiológico, de converter a energia mecânica em calor. Assim, pode-se verificar que, considerando esta faixa de valores para o $\tan \delta$, os géis preparados neste estudo podem ser classificados tanto para a aplicação como viscosuplementação, quanto para o preenchimento facial.

A Figura 18 apresenta os valores de $\tan \delta$ obtidos para os géis preparados neste trabalho em comparação com os valores de $\tan \delta$ para um conjunto de produtos comerciais: Juverderm; Belotero Basic; Juvedérm; Juvedérm Ultra Plus; Restylane; Rennova Lift. Os resultados comparados evidenciam as oportunidades de aplicação dos géis sintetizados com o agente reticulante no intervalo: $13 \leq \%BDDE \leq 50$.

Figura 18. Tangente de δ função da frequência de oscilação 0,7Hz. Para géis de HA reticulado com BDDE 13, 25, 37 e 50% e produtos comerciais Bolotero Basic, Juvederm Ultra, Juvederm Ultra Plus e Restylane. Retângulos pontilhados referem-se ao presente trabalho; os demais produtos comerciais, para comparação



Fonte: Autor

Os ensaios reológicos no que tange as determinações da viscosidade, quantificada como viscosidade complexa e simbolizada como η^* , para a região de ($0,1 \leq f \leq 2$) Hz são mostrados na Figura 19 e 20. Os valores de η^* são utilizados para se inferir a respeito da capacidade do gel em resistir a uma dada força de cisalhamento aplicada ao mesmo. Tais forças aparecem no processo de preenchimento durante e após a injeção do produto, seja subcutânea ou nas regiões que necessitam da viscosuplementação (HemaSundaram, M.D. et al, 2013).

Dentro de certa faixa de força de cisalhamento aplicada, em região viscoelástica linear, o gel irá se “diluir”, como consequência da diminuição no valor do η^* , de uma maneira proporcional à força aplicada. Esse fenômeno é o que ocorre no gel preparado de 13 a 50 % de BDDE é denominado de desgaste de cisalhamento, pode ser controlado e, portanto, é previsível, este comportamento se torna importante fator no processo de extrusão do gel durante a aplicação no tecido subcutâneo, os melhores

valores que tange a preenchimento facial está atribuído ao géis de % BDDE entre 13 e 25.

Por outro lado, se a força de cisalhamento é aumentada além da faixa viscoelástica, linear, o η^* do gel diminui de maneira descontrolada e imprevisível. Tal fenômeno é a tensão de escoamento que indica a perda total do comportamento elástico do gel, este comportamento não foi encontrado em nenhum dos géis reticulados com BDDE neste estudo, indicando a estabilidade na estrutura do polímero sintetizado. No entanto, se a força de cisalhamento for aumentada para um nível suficientemente alto além da faixa viscoelástica linear, ocorrerá a ruptura da estrutura do gel, deste modo a determinação da taxa de deformação a 5% para este gel é um importante resultado para iniciar a avaliação reológica.

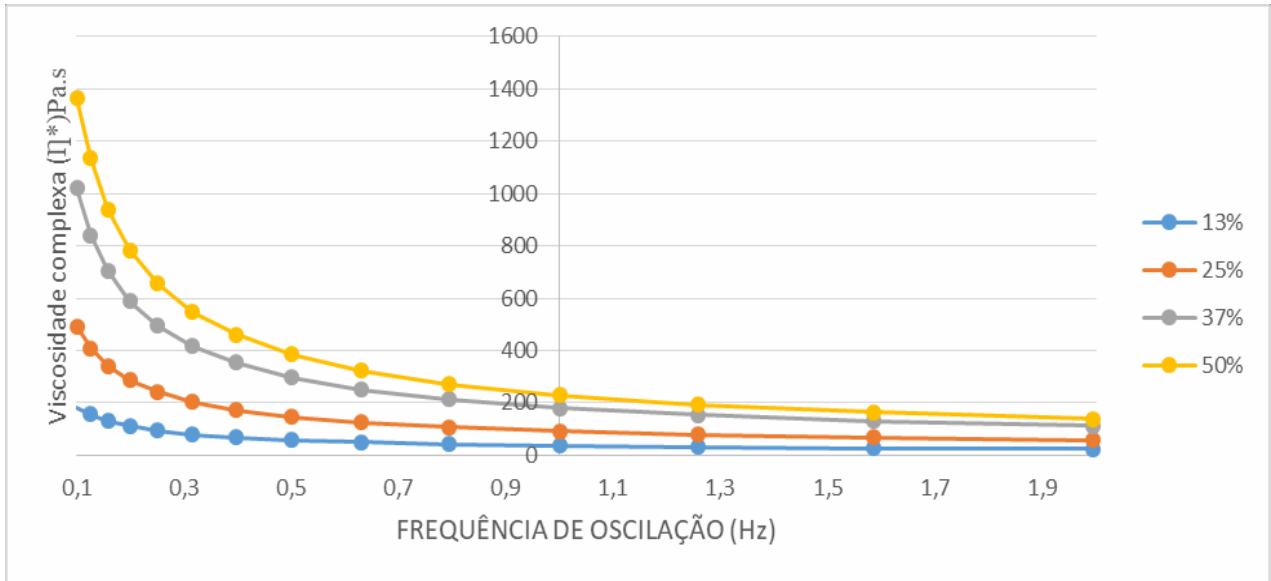
Os valores obtidos para os géis estudados no intervalo total de 0,1 a 100 Hz demonstraram que os géis, sem exceção ($13 \leq \%BDDE \leq 50$), a partir de 5 Hz passam pelo processo de tensão de escoamento. Por tal motivo e pelo fato de as oscilações no organismo humano não passarem de 2 Hz é que os estudos foram conduzidos no intervalo de frequência de 01 a 2 Hz.

Outro aspecto importante que se pode avaliar com respeito à viscosidade complexa é a possibilidade de se calcular a massa molecular média do polímero (MM_{mp}) (Tuminello, W. H., 1999), as quais encontram-se apresentadas na Tabela 6.

Os géis produzidos neste trabalho foram sintetizados a partir do ácido hialurônico de $MM_{MP} = 1,34$ MDa. Este valor de MM_{mp} do HA apresenta-se superior aos MM_{mp} utilizados na síntese dos géis comerciais (aproximadamente 200 a 800kDa).

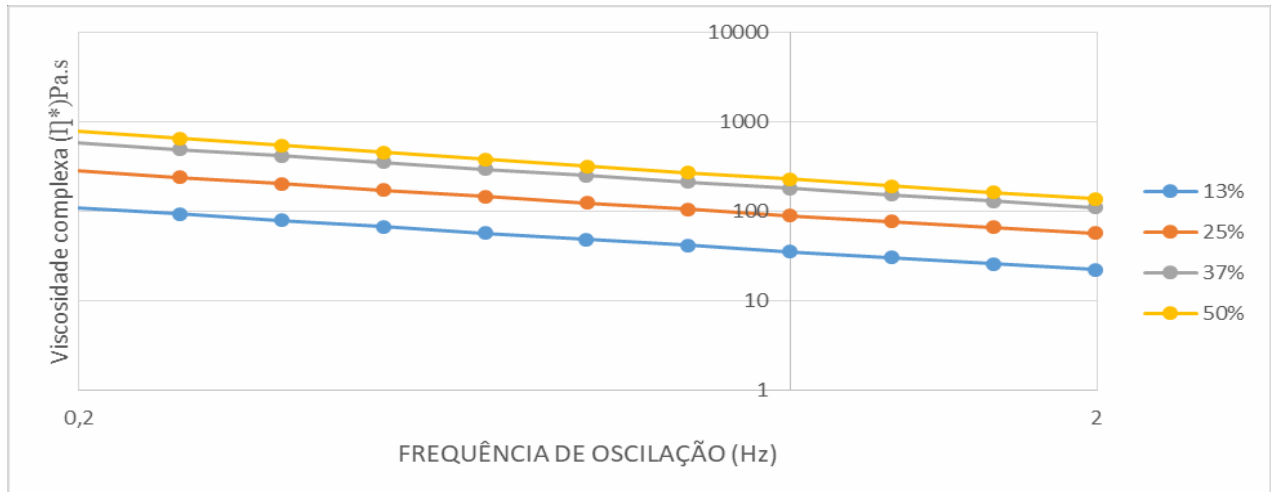
Assim, os géis produzidos com AH-BDDE utilizando-se HA de massa molar superior a 800 kDa tem sua aplicação, preferencial, destinada à zonas faciais com pressão desigual, como as regiões perioral e periocular. Considerando-se os géis preparados neste trabalho, com teor de $13 \leq \%BDDE \leq 50$, com MM_{mp} de 6,3 e 10 MDa, respectivamente, devido a sua resiliência característica, estes poderiam ser utilizados em implantação superficial, pelo fato de que estes géis estão aptos a suportarem forças de cisalhamento intradérmica que ocorrem em níveis mais profundos desses tecidos.

Figura 19. Viscosidade complexa (η^*) função da frequência de oscilação 0,1 a 2 Hz. Para géis de HA reticulado com BDDE 13, 25, 37 e 50%



Fonte: Autor

Figura 20. Viscosidade complexa (η^*) função da frequência de oscilação 0,1 a 2 Hz em escala logarítmica. Para géis de HA reticulado com 13, 25, 37 e 50 %BDDE



Fonte: Autor

5. Considerações Finais

Em concordância com os objetivos deste trabalho foi possível, até o presente momento, confirmar a produção/preparação de géis de alta hidrofiliçidade quando se comprada com massa inicial e massa final do polímero em meio aquoso observado na %Q e com cadeias efetivamente elásticas e apresentando grau de reticulação variável. Os géis produzidos são mecânica e quimicamente estáveis e foram caracterizados do ponto de vista cinético e estrutural, por ensaios gravimétricos de intumescimento, análise térmica DSC e por ensaios reológicos, comparados aos ensaios obtidos por DSC, FTIR e de microscopia ótica das superfícies dos géis. Foram obtidos géis com elevado grau de intumescimento e com partículas apresentando esfericidade, o que agrega ganho efetivo às propriedades visco elásticas do produto, importante no que tange à aplicação subcutânea.

Assim, como resultado das abordagens experimentais foi possível, a partir das:

1- Curvas de intumescimento: foi possível avaliar: **2.1-** o aumento de massa dos géis, de 5 a 9 vezes, em relação a sua massa inicial, causado pela absorção do solvente e, ou da solução tamponante; **2.2-** a cinética do processo de intumescimento, evidenciando a presença de um processo de difusão misto (Fikiano + relaxação das cadeias poliméricas) para os géis com baixo grau de reticulação e comportamento, predominantemente, Fikiano para os géis com alto grau de reticulação; **2.3-** os parâmetros estruturais, evidenciando a presença de um baixo índice de reticulação, d , e do número de cadeias efetivamente elásticas para os géis preparados com baixo grau de reticulação; e um elevado índice, d , e número de cadeias efetivamente elásticas para os géis preparados com alto grau de reticulação; evidenciando a maior %Q para os géis com menor grau de reticulação;

2- Curvas DSC: **3.1-** a confirmação da obtenção dos diferentes géis, em corroboração as conclusões apresentadas para as abordagens anteriores; **3.2-** a avaliação do grau de reticulação, em ausência de ajuste da força iônica, a partir das temperaturas de pico de cristalização (T_c) do solvente nos retículos do polímero em conformidade com a ordem: $T_{c13\%} \sim T_{c25\%} (-22,3 \sim -22,5 \text{ } ^\circ\text{C}) > T_{c36,6\%} (-23,6 \text{ } ^\circ\text{C}) > T_{c50\%} (-27,0 \text{ } ^\circ\text{C})$; corroborado

aos dados de índice de reticulação, d , da massa molar média dos

retículos, MMr, e do número de cadeias efetivamente elásticas, V_e ; **3.3-** o efeito da força iônica sobre o comportamento térmico (DSC) dos géis, conduzindo ao deslocamento efetivo das temperaturas de congelamento, formando dois grupos de géis com valores de T_c : $T_{c13 \text{ e } 25\%}(-22,5 \text{ }^\circ\text{C}) > T_{c36,6 \text{ e } 50\%}(-25 \text{ }^\circ\text{C})$; e b) a minimização das temperaturas de fusão, T_f , ΔT_f , referente aos géis de composição 50 e 13%, passando de $\Delta T_f = 9,9 \text{ }^\circ\text{C}$ (água pura) para $\Delta T_f = 3,8 \text{ }^\circ\text{C}$ (solução tamponante com força iônica ajustada), refletindo a minimização das energias de interações solvente-solvente e solvente polímero em comparação aos géis preparados em água pura; **3.4-** a identificação da transição alotrópica, mudança de estrutura cúbica para estrutura hexagonal (*estrutura característica da água congelada*), calcada nos picos endotérmico/exotérmico presentes em $T = -18 / -50 \text{ }^\circ\text{C}$ (ramo de aquecimento/resfriamento), presentes unicamente para os géis intumescidos em solução tamponante com força iônica ajustada com NaCl; **3.5-** a determinação da temperatura de transição vítrea, T_g , unicamente para os géis com alto grau de reticulação: $T_{g36,6\% \text{ e } 50\%} = -53 \text{ }^\circ\text{C}$ (ramo de aquecimento); encontrando-se a T_g , para os géis com baixo grau de reticulação, possivelmente, abaixo de $-80 \text{ }^\circ\text{C}$.

4. Propriedades Reológicas: Os géis preparados neste trabalho foram avaliados dentro da faixa da região de estresse fisiológico (0,1 a 2) Hz a partir da avaliação do parâmetro G' . Os géis produzidos com 13 e 25%BDDE tem medidas aceitas para o uso como preenchedor facial e o gel com 37%BDDE foi classificado como viscosuplementação. Os géis preparados com 37 e 50%BDDE apresentaram valores altos de G' sendo indicados para aplicações como géis fortes. A partir da avaliação do parâmetro G'' , os géis preparados com 13 e 25%BDDE apresentaram módulos com valores inferiores a 100 Pa; valores próximos aos géis presentes no mercado. Géis preparados com a adição de 37% e 50%BDDE poderão ser adicionados da adição do AH intumescido para facilitar a extrusão do gel. Valores obtidos para $\tan \delta$, variando no intervalo de valores $0,33 \leq \tan \delta \leq 0,43$ para os géis reticulados de 13 a 50 %BDDE aos quais apresentam-se como géis com maior comportamento elástico, e para os géis reticulados de 13 a 37% BDDE são indicados para uso em regiões que necessitam de parâmetros semelhantes ao do líquido sinovial.

A partir dos valores obtidos para η^* para todos os géis avaliados apresenta comportamento viscoso, decrescente e controlado com o aumento da oscilação até 5Hz, o perfil decrescente é semelhante ao comportamento de outros produtos existente no mercado. Também indicou-se o gel como de estrutura “Forte”, no entanto, para o 25% BDDE apresenta melhor relação da η^* entre comportamento viscoelástico e a força de extrusão. Obtidos os valores obtidos para η^* foi possível a determinação da MM_{mp} dos polímeros preparados com a adição de BDDE. Os valores de MM_{mp} de géis 13 a 50% são indicados também para regiões viscosuplementar, perioral e periocular.

6. CONCLUSÕES

O presente trabalho de pesquisa tem como resultados:

- A efetiva obtenção dos géis reticulados a partir de ácido hialurônico eo agente reticulante BDDE em 13, 25,37 e 50%.
- Consolidação dos estudos de Gravimetria, avaliação cinética, estrutural, térmica e reologia indicam para uso preferencialmente:
 - 1- Gel 25% de BDDE para preenchimento facial;
 - 2- Gel de 37% BDDE para viscosuplementação.

7. PERSPECTIVA DO ESTUDO

- 1- Investigação do processo de adição do segundo reticulante (Polietilenoglycol dyglycidyl ether) ao ácido hialurônico e avaliação do processo de intumescimento e grau de reticulação e a cinética para cada reticulante. (TG- DTA, DSC, IV-FT e RMN).
- 2- Investigação do período de permanência da mistura à temperatura: 1- ambiente, após adição do(s) reticulante(s); em presença e ausência do inibidor da enzima hialuronidase. 2- 50°C, durante o período de incubação 2h. (TG-DTA, DSC).
- 3- Avaliação dos parâmetros: 1- tamanho de partículas; e 2- tempo de lavagem do gel produzido para retirada do excesso de reticulante e solução tamponante adequada. TURRAX/extração em solução tamponante adequada.
- 4- Controle de qualidade do produto final Avaliação dos resíduos de agentes reticulantes nos géis e adequação metrológica, química, dos métodos: 1- térmicos, para controle do intumescimento e grau de reticulação; e 2- HPLC, acessando padrões metrológicos com estimativa do cálculo da incerteza para os níveis toxicológicos, mínimos (limite: ≤ 5 ppm), especificados para os reticulantes/uso da técnica de HPLC

8. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

Annalisa La Gatta , Chiara Schiraldi , Agata Papa , Mario De Rosa; Comparative analysis of commercial dermal fillers based on crosslinked hyaluronan: Physical characterization and in vitro enzymatic degradation, , *Polymer Degradation and Stability* 96(4):630-636).

ALMOND, A., BRASS, A., SHEEHAN, J. K. Dynamic exchange between stabilized conformations predicted for hyaluronan tetrasaccharides: comparison of molecular dynamics simulations with available NMR data. *Glycobiology*, v. 8, n. 10, p. 973-980, 1998.

BAND, P. A. Hyaluronan derivatives: chemistry and clinical applications. In: LAURENT TC, Editor. *The chemistry biology and medical applications of hyaluronan and its derivatives*. London: Portland Press, 1998, p. 33-42.

BARBUCCI, R., LAMPONI, S., BORZACCHIELLO, A., AMBROSIO, L. TORRICELLI, P., GIARDINO, R. Hyaluronic acid hydrogel in the treatment of osteoarthritis. *Biomaterials*, v. 23, p. 4503–4513, 2002.

Boullea, Koenraad de et. al. *Dermatol Surg* 2013;39:1758–1766.

COLTHUP, N.B. Dally, L. H. Stephen E. Wiberley. *Introduction to infrared and Raman Spectroscopy*. Cap. 4. Pag. 168, 1964.

D., PINCHUK, I., SHINAR, H., YEDGAR, S. Interaction of hyaluronic acid-linked phosphatidylethanolamine (HyPE) with LDL and its effect on the susceptibility of LDL lipids to oxidation. *Chemistry and Physics of Lipids*, v. 104, p. 149–160, 2000.

D.Y. Wen; Intra-articular hyaluronic acid injections for knee osteoarthritis. *Am Fam Physician.*, 62 (3) (2000), pp. 565–570

D.Y. Wen; Intra-articular hyaluronic acid injections for knee osteoarthritis. *Am Fam Physician.*, 62 (3) (2000), pp. 565–570

E. George; Intra-articular hyaluronan treatment for osteoarthritis. *Ann Rheum Dis.*, 57 (11) (1998), pp. 637–640

E. Neovius, M. Lemberger, A.C. Docherty Skogh, J. Hilborn, T. Engstrand; Alveolar bone healing accompanied by severe swelling in cleft children treated with bone morphogenetic protein-2 delivered by hydrogel. *J. Plast. Reconstr. Aesthet. Surg.*, 66 (2013), pp. 37–42

Fauze A. Aouada; Edvani C. Muniz; Carlos M. P. Vaze Luiz H. C. Mattoso. Correlação Entre Parâmetros Da Cinética De Intumescimento Com Características Estruturais E Hidrofílicas De Hidrogéis De Poliacrilamida E Metilcelulose. *Quim. Nova*, Vol. 32, No. 6, 1482-1490, 2009

FLORY, P. J.; REHNER, J. J.; *J. Chem. Phys.* 1943, 11, 521.

G. Kogan, L. Soltes, R. Stern, P. Gemeiner; Hyaluronic acid: a natural biopolymer with a broad range of biomedical and industrial applications. *Biotechnol. Lett.*, 29 (2007), pp. 17–25

- H. Fam, J.T. Bryant, M. Kontopoulou. Rheological properties of synovial fluids. *Biorheology.*, 44 (2) (2007), pp. 59–74
- Hema Sundaram, M.D. Daniel Cassuto, M.D. Rockville, Md.; *Biophysical Characteristics of Hyaluronic Acid Soft-Tissue Fillers and Their Relevance to Aesthetic Applications*, Fairfax, Va.; and Milan, Italy. From private practice. Received for publication March 20, 2012; accepted May 8, 2013.
- I. SÁNCHEZ-CARPINTERO, D. CANDELAS, R. RUIZ-RODRÍGUEZ. DERMAL Fillers: Types, Indications, and Complications *Actas Dermo-Sifiliográficas (English Edition)* Volume 101, Issue 5, 2010, pp 381-393.
- J. Necas, L. Bartosikova, R. Brauner, J. Kolar; Hyaluronic acid (hyaluronan): a review. *Vet. Med.*, 53 (2008), pp. 397– 411
- J.R. Fraser, T.C. Laurent, U.B. Laurent; Hyaluronan: its nature, distribution, functions and turnover. *J. Intern. Med.*, 242 (1997), pp. 27–33
- KABLIK J, MONHEIT GD, YU L, CHANG G, GERSHKOVICH J. Comparative physical properties of hyaluronic acid dermal fillers. *Dermatologic Surgery.*, v. 35, n. 1, p. 302–312, 2009.
- L Drake, SM Dinehart, ER Farmer, *etal.* Guidelines of care for soft tissue augmentation: collagen implants *J Am Acad Dermatol*, 34 (1996), pp. 695–697
- L.B. Dahl, I.M. Dahl, A. Engström-Laurent, K. Granath; Concentration and molecular weight of sodium hyaluronate in synovial fluid from patients with rheumatoid arthritis and other arthropathies. *Ann Rheum Dis.*, 44 (12) (1985), pp. 817–822
- L.J. Lapcík, L. Lapcík, S.D. Smedt, J. Demeester, P. Chabracek. Hyaluronan: preparation, structure, properties, and applications *Chem. Rev.*, 98 (1998), pp. 2663–2684
- L.S. Simon; Viscosupplementation therapy with intra-articular hyaluronic acid. Fact or fantasy? *Rheum Dis Clin North Am.*, 25 (2) (1999), pp. 345–357
- LARSEN, N. E., POLLACK, C. T., REINER, K., LESHCHINER, E., BALAZS, E. A. Hylan gel biomaterial: dermal and immunologic compatibility. *Journal of Biomedical Materials Research*, v. 27, p. 1129-1134, 1993.
- Lett.*, 29 (2007), pp. 17–25.
- M.N. Collins, C. Birkinshaw; Comparison of the effectiveness of four different crosslinking agents with hyaluronic acid hydrogel films for tissue-culture applications. *J. Appl. Polym. Sci.*, 104 (2007), pp. 3183–3191
- MASON, M., VERCRUYSSSE, K. P., KIRKER, K. R., FRISCH, R., MARECAK, D. M., PRESTWICH, G. D., PITT, W. G. Attachment of hyaluronic acid to polypropylene, polystyrene, and polytetrafluoroethylene. *Biomaterials*, v. 21, p.31-36, 2000.

MOHAMMED AL-SIBANI; AHMED AL-HARRASI; REINHARD H. H. NEUBERT. Evaluation of in-vitro degradation rate hyaluronic acid-based hydrogel cross-linked with 1,4 butanedion diglycidyl ether (BDDE) using RP-HPLC and UV-Vis spectroscopy. *Journal of Drug delivery and technology*. 29(2015) 24-30

P., GIARDINO, R. Hyaluronic acid hydrogel in the treatment of osteoarthritis. *Biomaterials*, v. 23, p. 4503–4513, 2002.

P.A. Dieppe, L.S. Lohmander ; Pathogenesis and management of pain in osteoarthritis. *Lancet.*, 365 (9463) (2005), pp. 965–973

PRESTWICH, G. D., PITT, W. G. Attachment of hyaluronic acid to polypropylene, polystyrene, and polytetrafluoroethylene. *Biomaterials*, v. 21, p.31-36, 2000.

S. Fagien - Facial soft-tissue augmentation with injectable autologous and allogeneic human tissue collagen matrix (Autologen and Dermalogen), *PlastReconstrSurg*, 105 (2000), pp. 362–373

SCHNITZER, E., DAGAN, A., KRIMSKY, M., LICHTENBERG, SESTAK, JAROSLAV. MIRACLE OF REINFORCED STATES OF MATTER Glasses: ancient and innovative materials for the third Millennium *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, Vol. 61 (2000) 305.323.

SHINAR, H., YEDGAR, S. Interaction of hyaluronic acid-linked phosphatidylethanolamine (HyPE) with LDL and its effect on the susceptibility of LDL lipids to oxidation. *Chemistry and Physics of Lipids*, v. 104, p. 149–160, 2000.

SM SHAHEEN, K YAMAURA - *Journal of controlled release*, 2002 - Elsevier

T. Luan, L. Wu, H. Zhang, Y. Wang ; A study on the nature of intermolecular links in the cryotropic weak gels of hyaluronan . *Carbohydr.Polym.*, 87 (2012), pp. 2076–2085

W.Y. Chen, G. Abatangelo; Functions of hyaluronan in wound repair. *Wound Repair Regen.*, 7 (1999), pp. 79–89

X. Ayral, Injections in the treatment of osteoarthritis, *Best Pract Res ClinRheumatol.*, 15 (4) (2001), pp. 609–626

X. Xu, A.K. Jha, D.A. Harrington, M.C. Farach-Carson, X. Jia; Hyaluronic acid-based hydrogels: from a natural polysaccharide to complex networks. *Soft Matter*, 8 (2012), pp. 3280–3294

ZHAO, LI-SHAN; CAO, ZE-XIEN; WANG, QIAND, WANG. Glass transition of aqueous solutions involving annealing induced ice recrystallization resolves liquid-liquid transition puzzle of water. *Scientific Reports*, 27.01.2015