

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 20/09/2019.



UNESP - Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”
Faculdade de Odontologia de Araraquara



MORGANA REGINA MENDONÇA DE OLIVEIRA

**AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES MORFO-FISICOQUIMICA E
BIOLÓGICA DE DIFERENTES ACIDOS HIALURÔNICOS (AHS). ESTUDO IN
VIVO E IN VITRO**

Araraquara

2017



UNESP - Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”
Faculdade de Odontologia de Araraquara



MORGANA REGINA MENDONÇA DE OLIVEIRA

**AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES MORFO-FISICOQUIMICA E
BIOLÓGICA DE DIFERENTES ACIDOS HIALURÔNICOS (AHS). ESTUDO IN
VIVO E IN VITRO**

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Ciências
Odontológicas – Área de Dentística
Restauradora, da Faculdade de
Odontologia de Araraquara, da para
obtenção de título de Mestre em Ciências
Odontológicas

Orientador: Dr. Hermes Pretel

Araraquara

2017

Oliveira, Morgana Regina Mendonça de

Avaliação das propriedades morfo-fisicoquímica e biológica de diferentes ácidos hialurônicos (AHS). Estudo in vivo e in vitro / Morgana Regina Mendonça de Oliveira. -- Araraquara: [s.n.], 2017
98 f.; 30 cm.

Dissertação (Mestrado em Dentística Restauradora) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia

Orientador: Prof. Dr. Hermes Pretel

1. Ácido hialurônico 2. Preenchedores dérmicos 3. Reologia
I. Título

MORGANA REGINA MENDONÇA DE OLIVEIRA

**AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES MORFO-FISICOQUIMICA E
BIOLÓGICA DE DIFERENTES ACIDOS HIALURÔNICOS (AHS). ESTUDO IN
VIVO E IN VITRO**

Comissão julgadora

Para obtenção de grau de Mestre

Presidente e orientador Dr. Hermes Pretel

2º Examinador: Profa. Dra. Juliane Maria Guerreiro Tanomaru

3º Examinador: Profa. Dra. Thallita Pereira Queiroz

Araraquara, 20 de setembro de 2017.

MORGANA REGINA MENDONÇA DE OLIVEIRA

NASCIMENTO: 01 de março de 1992, Araraquara, SP

FILIAÇÃO: Osmir Batista de Oliveira Junior e Denise Cristina Mendonça de Oliveria

2011 a 2014	Graduação em Odontologia pela Universidade de Araraquara - Uniara
2015 até a presente data	Aluna do curso de Mestrado no Programa de PósGraduação em Ciências Odontológicas da Faculdade de Odontologia de Araraquara da Universidade Estadual Paulista – UNESP.
Maio de 2016	Estagio científico internacional realizado no Departamento de Materiais Dentários da Oklahoma University - Oklahoma, USA.
Setembro/2016 a Março de 2017	Mestrado Sandwich na Trent University - Canadá, no programa Emerging Leaders in the Americans Program

DEDICATÓRIA

A minha família, meus pais, Osmir e Denise, e meu irmão Caike, por serem a minha base, inspiração, admiração e meus grandes motivadores na busca para alcançar meus objetivos da melhor maneira possível. Por me conceder suporte, incentivo, e amor em todas as etapas da vida, sonhando comigo todos os meus sonhos. Dedico a vocês, todas as minhas pequenas e grandes conquistas.

Aos professores que foram responsáveis por ensinar, e inspirar meus caminhos na odontologia, e a todos que direta ou indiretamente foram responsáveis por alguma parte de meu crescimento, pessoal ou profissional, durante essa fase que esta sendo concluída.

Dedico ainda, aos meus amigos Mayara, Mauricio e Aldrey, meus parceiros de vida, por compartilharem mais uma etapa comigo e fazerem cada fase que compartilhamos juntos mais leve.

AGRADECIMENTO

Agradeço primeiramente a **DEUS** por estar sempre a frente de meus caminhos e escolhas, cuidando para que meus passos me levem na direção certa e que em todas as minhas atividades suas bençãos se manifestem.

Ao meu orientador Dr. Hermes Pretel, por esses anos que dispôs de sua paciência e dedicação, proporcionando crescimento e ensinamentos compartilhando sua amizade durante toda esta jornada.

Um agradecimento especial ao meu pai Osmir, sem o qual o caminho não teria sido trilhado desta maneira. Sua dedicação e amor ao trabalho me inspiram e me fizeram conquistar este título e, a cada dia, abrem novos horizontes e possibilidades. Tenho muito orgulho em ter você como inspiração.

A minha mãe Denise e meu irmão Caike por completarem a base de nossa família e por proporcionarem todo o apoio necessário, dando estímulo, equilíbrio e serenidade para que minha carreira pudesse avançar em direção ao sucesso profissional. Sou muito grata por ter vocês ao meu lado.

Agradeço a doutoranda, amiga e sócia Helida Barud pela amizade, aprendizado em conjunto e momentos compartilhados, além de, toda ajuda e suporte nas etapas experimentais e cuidados com os ratos, que foram de fundamental importância na execução deste trabalho.

Não poderia de fazer um agradecimento muito especial aos alunos de iniciação científica Priscila Carvalho e Renan Barroso, sem aos quais esta pesquisa teria sido mais difícil de ser executada.

Um agradecimento especial aos Profs(as). Dr(as) Hernane Barud, Andreia Meneguim e Sandra Andrea Cruz pelos ensinamentos, apoio incondicional e colaboração na interpretação de dados que compõe este trabalho.

Agradeço as empresas colaboradoras DMC Equipamentos e InnovaPharma por fornecerem os materiais utilizados nessa dissertação.

Ao amigo Cristian Sánchez, pelo apoio e ensino de fotografia, que facilitaram muito o registro das etapas metodológicas e a confecção da apresentação dos resultados.

Agradeço ainda aos funcionários da Faculdade de Odontologia de Araraquara - FOAr, aos funcionários do biotério e os funcionários do Departamento de Odontologia Restauradora pela didicação e apoio recebidos.

Agradeço especialmente ao Sr. Pedro Sergio Simões, funcionário de Departamento de Morfologia, pelo apoio na execução da etapa de processamento histológico desse trabalho.

Agradeço ao LMA-IQ pela disponibilidade de utilização do microscópio eletrônico de varredura e ao M.Sc. Diego Luis Tita.

Agradecemos ao Laboratório I Multiusuário de Análises Químicas pela disponibilidade de utilização do Espectrômetro de absorção na região do infravermelho médio e aos técnicos Alberto Camilo Alécio e Naira Canevarolo Pesquero

Aos funcionários da Secretaria da Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia de araraquara - UNESP, Cristiano e Alexandre pelo apoio e dedicação.

Aos funcionários da biblioteca da FOAr - UNESP, meu agradecimento pelo auxílio e disposição.

Ao Prof. Dr. Andrew Vreugdenhil, Jayme Stabler e a todo grupo de pesquisa da universidade de TRENT University, no Canadá, pelo aprendizado que me proporcionaram nos âmbitos pessoal, profissional e científico. Ao

governo Canadense e ao programa ELAP pela bolsa de estudo fornecida da qual fez-se possível esta experiência incrível.

Ao CNPQ pelo fornecimento da bolsa de estudo que apoiou minha formação e realização deste estudo.

Oliveira MRM. Avaliação das propriedades morfo-físicoquímica e biológica de diferentes ácidos hialurônicos (AHs). Estudo in vivo e in vitro [Dissertação Mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2017.

RESUMO

O objetivo desse estudo foi realizar a caracterização morfo-físicoquímica e avaliar a resposta histopatológica e a biodegradação de AH indicados para preenchimento dérmico: DMC-Facial 12,5% (D12) e RennovaFill (RF) e aumento volumétrico de tecido: DMC-Facial 15% (D15) e RennovaLift (RL). A caracterização foi realizada por microscopia eletrônica de varredura (MEV), espectroscopia dispersiva de raios X (EDX) e infra vermelha com transformada de Fourier (FT-IR) e reometria dinâmica oscilatória. Para avaliação da resposta histopatológica e da biodegradação foi implantado 0,1 mL de cada AH no plano sub-dérmico do dorso de 25 ratos Hostman, aleatoriamente distribuídos em 5 grupos (n=5), de acordo com o tempo de implantação dos AH (7, 14, 30, 60 e 120 dias). Um examinador experiente (HP), calibrado e cego para os AHs utilizados analisou os cortes. Modelo loglinear e teste de qui-quadrado (χ^2) foram utilizados para avaliar a associação entre os AH e a intensidade da resposta histopatológica e biodegradação para $p < 0,05$. A hipótese nula (H_0) foi rejeitada pois tanto na caracterização morfo-físicoquímica quanto na avaliação da resposta histopatológica e da biodegradação mostraram diferenças significativas entre os AHs testados. Pode-se concluir que: 1) AH com a mesma indicação clínica diferem tanto nas características morfo-físicoquímicas como na resposta inflamatória provocada e no padrão de biodegradação. 2) O nível de resposta histopatológica depende do AH utilizado. 3) Uma morfologia estrutural característica de D12 e D15, formada por câmaras separadas por septos finos, com bordas afiladas e irregulares, provoca maior resposta inflamatória. 4) Todos os AH testados estimularam a neo-formação de fibroblasto e colágeno. 5) A biodegradação dos AH é inversamente proporcional à taxa de reticulação.

Palavras-chave: Ácido hialurônico. Preenchedores dérmicos. Reologia.

Oliveira MRM. Evaluation of the morpho-physico-chemical and biological properties of different hyaluronic acids (HAs). In vivo and in vitro study. [Dissertação Mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2017.

Abstract

The aim of this study was to perform the morpho-physicochemical characterization and to evaluate the histopathological response and biodegradation of AH indicated for dermal filling: DMC-Facial 12.5% (D12) and RennovaFill (RF) and tissue lifting: DMC-Facial 15% (D15) and RennovaLift (RL). The characterization was performed by scanning electron microscopy (SEM), X-ray dispersive (EDX) and Fourier transform infra red spectroscopy (FT-IR) and oscillatory dynamic rheometry. To evaluate the histopathological response and biodegradation, 0.1 mL of each HA was implanted in the dorsal subdermal plane of 25 male Hostsman rats, randomly distributed in 5 groups (n = 5), according to the time of implantation of AH: 7, 14, 30, 60 and 120 days). Slides were analyzed by a experienced examiner (HP), calibrated and blinded for the AH used. Loglinear model and chi-square statistical test (χ^2) were used to evaluate the association between AH and the intensity of histopathological response and biodegradation for $p < 0.05$. Results: The null hypothesis (H_0) was rejected because both the morpho-physicochemically characterization and the histopathological analysis showed significant differences between the tested AHs. It can be concluded that: 1) AH with the same clinical indication differ in the morpho-physicochemical characteristics, in the inflammatory response and in the biodegradation pattern. 2) The level of histopathological response depends on the AH used. 3) A structural morphology characteristic of D12 and D15, formed by chambers separated by thin septa, with sharp and irregular borders, causes a greater inflammatory response, 4) All HA tested stimulated the fibroblast and collagen neoformation. 5) The biodegradation of HA is inversely proportional to the crosslinking rate.

Keywords Hyaluronic acid. Dermal fillers. Rheology.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	REVISÃO DA LITERATURA.....	19
2.1	Considerações Gerais sobre o AH.....	19
2.2	Reticulação e Degradação	21
2.3	Resposta Tecidual.....	26
2.4	Propriedades Reológicas	29
2.5	Aplicações Odontológicas	31
3	PROPOSIÇÃO	33
4	MATERIAL E MÉTODO	34
4.1	Avaliação Visual/Táctil	36
4.2	Preparo das Amostras para MEV, EDX e FT-IR	36
4.3	Avaliação da Morfologia Estrutural por MEV.....	39
4.4	Composição Química Elementar (EDX).....	39
4.5	Composição dos AH por FT-IR.....	39
4.6	Propriedades Viscoelásticas por Reometria Dinâmica Oscilatória	42
4.7	Resposta Tecidual aos Implantes de AH e Reabsorção do Biopolímero.....	43
4.7.1	Anestesia dos animais	44
4.7.2	Preparo dos animais	45
4.7.3	Obtenção das peças para análise e eutanásia dos animais	46
4.7.4	Processamento laboratorial e histológico	46
4.7.5	Resposta tecidual aos implantes de AH.....	47
4.8	Análise Estatística.....	48
5	RESULTADOS	50
5.1	Avaliação Visual/Táctil das Características Macroscópicas	50
5.2	Avaliação da Microestrutura e Micromorfologia Externa e Interna por MEV	51
5.3	Investigação da Composição Química Elementar por EDX.....	53
5.4	Investigação da Composição dos AH por FT-IR	55
5.5	Propriedades Viscoelásticas Analisadas por Reômetria Dinâmica Oscilatória...	57
5.6	Resposta Tecidual aos Implantes de AH e Reabsorção do Biopolímero.....	63

5.7	Análise Estatística dos Eventos Histológicos.....	69
5.7.1	Intensidade da resposta inflamatória	69
5.7.2	Presença de fibroblasto/angiogênese	69
5.7.3	Presença e organização de fibra colágena	71
5.7.4	Degradação do gel	72
5.8	Diferença entre Produtos	75
6	DISCUSSÃO	77
7	CONCLUSÃO	82
	REFERÊNCIAS	83
	APÊNDICE A - ANÁLISE MORFOLOGICA POR MEV	88
	APÊNDICE B - TABELA DE FREQUÊNCIAS DA RESPOSTA TECIDUAL	96
	ANEXO A - CERTIFICADO DE APROVAÇÃO CEUA.....	98

1 INTRODUÇÃO

O ácido hialurônico (AH) está presente naturalmente nos tecidos e fluidos do corpo humano em quantidades que decrescem ao longo do anos e é sintetizado principalmente pelos fibroblastos (Necaset al.³⁹, 2008). O mesmo é classificado bioquimicamente como um biopolímero de alto peso molecular de carga negativa, composto por várias unidades dissacarídeas de ácido D-glicurônico (GlcUA) e N-acetilglicosamida (GlcNAc) unidas alternadamente por ligações glicosídicas β - 1,3 e β - 1,4. (Necas et al.³⁹, 2008)

Devido as suas excelentes características de biocompatibilidade, permeação ao oxigênio, biodegradabilidade, não mutagenicidade, modulação do processo de diferenciação celular e de reparação tecidual, (Bertl et al.⁶, 2015) e (Faga et al.¹⁶, 2013), o AH tem sido indicado como biomaterial substituto na reposição do fluido sinovial de articulações (Legré-Boyer³² 2015), lubrificante ocular (Lee et al.²⁹, 2017), prevenção de aderência tecidual em pós-cirúrgicos (Chen et al.¹⁰, 2017), regenerar feridas (Voigt et al.⁴⁷, 2012), hidratar a derme (Iannitti et al.²⁴, 2016), reduzir as marcas de expressões estáticas advindo do envelhecimento (Necas et al.³⁹, 2008) (Kablik et al.²⁷, 2009), tratar a harmonia facial, complementar o tratamento periodontal (Dahiya et al.¹³, 2013) e (Bertl et al.⁶, 2015), tratar o espaço negro gengival (Becker et al.⁴, 2010), (Lee et al.³¹, 2016) e no capeamento pulpar (Bogović et al.⁷, 2011). Recentemente, também tem sido indicado como barreira antiaderente/antimicrobiana para aplicações em medicina e odontologia (Romanò et al.⁴³, 2017).

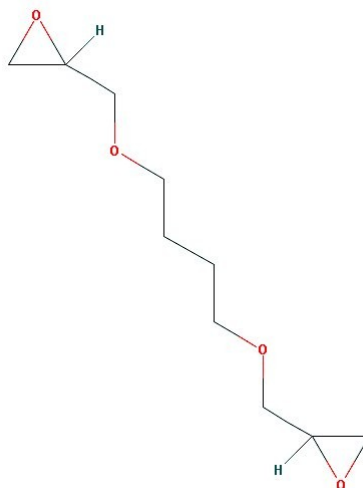
A versatilidade de tratamentos com o AH se faz possível devido à possibilidade de alterações na sua estrutura química pelo processo denominado de reticulação, também conhecido como *cross-linked* (Tezel et al.⁴⁶, 2008). O AH natural, sem as alterações da reticulação, não apresenta as propriedades mecânicas necessárias para promover a expansão e sustentação dos tecidos, muito menos durabilidade no quesito de biodegradação, o que inviabiliza sua aplicação clínica, pois é rapidamente degradado pela enzima hialuronidase (Tezel et al.⁴⁶, 2008).

A reação de reticulação pode ser realizada por via carboxílica ou hidroxílica, complementada ou não, pela agregação de outros compostos à cadeia polimérica (De Boulle et al.¹⁴, 2013). O objetivo da reticulação é aumentar o número de duplas ligações entre os diferentes segmentos das moléculas de AH, favorecendo a

formação de uma malha molecular densa, menos susceptível a biodegradação e com propriedades físico-mecânicas otimizadas. (Friedman et al.²¹, 2002) e (De Boulle et al.¹⁴, 2013).

Os agentes reticulantes mais utilizados nos AHs indicados para o uso clínico em preenchimentos dérmicos, e aumento volumétrico dos tecidos é o 1,4-butanodiol éter glicídico (BDDE) - Figura 1, ou a divinilsulfona (Segura et al.⁴⁴, 2005) e (De Boulle et al.¹⁴, 2013), que são adicionados na reação de reticulação para melhorar a estabilidade e, principalmente, para reduzir a biodegradação dos AHs (Noh et al.⁴⁰, 2006), (De Boulle et al.¹⁴, 2013), (Cena et al.⁸, 2014) e (Al-Sibani et al.¹, 2015).

Figura 1 - Molécula do reticulante 1,4-butanodiol eter glicídico (BDDE)



Fonte: PubChem URL: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>

O processo de reticulação possibilita a obtenção de diferentes características do gel de AH. São descritos na literatura por exemplo sete diferentes tecnologias de reticulações que atualmente apresentam patentes de diferentes fabricantes como por exemplo: AH não animal estabilizado (NASHA®), Matriz 3D®, Vicross®, Tecnologia de equilíbrio ideal (OBT®), Matriz coesiva polidensa (CPM®), AH resiliente (RHA®) e rede interpenetrante (IPN-Like®). Cada uma destas tecnologias resulta em um gel de AH com características estruturais, de coesividade e viscoelasticidade distintas, o que, por sua vez, determinará diferenças em outras propriedades físico-mecânicas como comportamento térmico, padrão de intumescimento (swelling), e taxa de biodegradação (Micheels et al.³⁷, 2016).

Além disso, ainda pode se destacar que o processo de reticulação influi diretamente na biocompatibilidade do gel de AH formado. O tipo e o grau de reticulação, bem como presença de BDDE residual interferem no nível da resposta

inflamatória ao implante de AH nos tecidos (De Boulle et al.¹⁴, 2013). Tecnicamente, produtos mais reticulados apresentam maior capacidade de preenchimento e sustentação tecidual, menor taxa de biodegradação e inicialmente maior processo inflamatório, (Kablik et al.²⁷, 2009) (De Boulle et al.¹⁴, 2013).

Essa resposta inflamatória transitória, parece ser uma vantagem do AH, pois pode resultar no encapsulamento desse biopolímero por fibras colágenas o que, consequentemente, aumenta a eficácia e a longevidade dos tratamentos realizados (Matarasso et al.³⁵, 2006), (Baumann et al.³, 2007) e (Narins et al.³⁸, 2010).

Além disso, não está claro se somente o nível e tipo de reticulação é o fatores responsável por esse encapsulamento, ou se outros fatores como composição, arranjo estrutural, pH do gel, e comportamento reológico também contribuem para esta eficácia diferenciada.

De acordo com seu comportamento reológico o AH pode ser classificado como um biopolímero viscoelástico. Essa viscoelasticidade é diretamente influenciada pelo nível de reticulação do material. Assim, AHs mais reticulados são mais viscosos e apresentam maior módulo de elasticidade, proporcionam maior sustentação tecidual e tratamentos mais duráveis, porém tem baixa capacidade de se recuperar de deformações.

No mercado, estão disponíveis para os profissionais, AHs de alta, média e baixa reticulação. Porém não se sabe se estes produtos tem comportamentos reológicos semelhantes e, nem se induzem resposta inflamatória diferenciada, que poderia resultar desempenho clínico distinto.

A taxa de biodegradação é outra propriedade que pode influenciar no desempenho dos tratamentos realizados com AH. Em princípio uma maior reticulação diminui a taxa de biodegradação do material e possibilita que este biopolímero seja utilizado para diferentes aplicações de média e longa duração. Segundo (Falcone et al.¹⁷, 2008), a taxa de biodegradação do AH pode ser estimada ao se multiplicar a concentração de AH no gel pela elasticidade do produto. Estes dados podem ser obtidos a partir da informação dos fabricantes e por estudos de reologia. No entanto, a relação entre o grau de reticulação e a taxa de biodegradação ainda não esta totalmente definida. Da mesma forma, pouco se sabe sobre a influência da taxa de biodegradação e a resposta tecidual ao AH.

Pelo exposto fica clara a importância de estudos que avaliem se AHs com maior reticulação são encapsulados por fibras colágenas e, se a composição

química, o arranjo estrutural, o comportamento reológico e a biodegradação do biopolímero contribuem de alguma forma para a resposta tecidual ao material.

7 CONCLUSÃO

Frente aos resultados obtidos se pode concluir que:

- 1) AH com a mesma indicação clínica diferem tanto nas características morfo-físicoquímica com na resposta inflamatória provocada e no padrão de biodegradação.
- 2) O nível de resposta histopatológica depende do AH utilizado.
- 3) A morfologia estrutural de D12 e D15, formada por câmaras separadas por septos finos, com bordas afiladas e irregulares, provoca maior resposta inflamatória,
- 4) Todos os AH testados estimularam a neo-formação de fibroblasto e colágeno.
- 5) A biodegradação dos AH é inversamente proporcional a taxa de reticulação.

REFERÊNCIAS*

- 1 Al-Sibani M, Al-Harrasi A, Neubert R. Evaluation of in-vitro degradation rate of hyaluronic acid-based hydrogel cross-linked with 1, 4-butanediol diglycidyl ether (BDDE) using RP-HPLC and UV-Vis spectroscopy. *J Drug Deliv Sci Technol.* 2015; 29: 24-30.
- 2 ASTM International. Standard Guide for Characterization and Testing of Hyaluronan as Starting Materials Intended for Use in Biomedical and Tissue Engineered Medical Product Applications¹. ASTM Committee F04 on Medical and Surgical Materials and Devices and is the direct responsibility of Subcommittee F04.42 on Biomaterials and Biomolecules for TEMP. West Conshohocken. 2003. Designation: F 2347 – 03.
- 3 Baumann LS, Shamban AT, Lupo MP, Monheit GD, Thomas JA, Murphy DK, et al. Comparison of smooth-gel hyaluronic acid dermal fillers with cross-linked bovine collagen: a multicenter, double-masked, randomized, within-subject study. *Dermatol Surg.* 2007; 33 Suppl 2: S128-35.
- 4 Becker W, Gabitov I, Stepanov M, Kois J, Smidt A, Becker BE. Minimally invasive treatment for papillae deficiencies in the esthetic zone: a pilot study. *Clin Implant Dent Relat Res.* 2010; 12(1): 1-8.
- 5 Berkó S, Mónika M, Magdolna B, Gábor E, Petra H, Kinga S, et al. Advantages of cross-linked versus linear hyaluronic acid for semisolid skin delivery systems. *Eur Polym J.* 2013; 49: 2511-7.
- 6 Bertl K, Bruckmann C, Isberg PE, Klinge B, Gottfredsen K, Stavropoulos A. Hyaluronan in non-surgical and surgical periodontal therapy: a systematic review. *J Clin Periodontol.* 2015; 42(3): 236-46.
- 7 Bogović A, Nižetić J, Galić N, Zelježić D, Micek V, Mladinić M. The effects of hyaluronic acid, calcium hydroxide, and dentin adhesive on rat odontoblasts and fibroblasts. *Arh Hig Rada Toksikol.* 2011; 62(2): 155-61.
- 8 Cena RB, Park JG, Kim HJ, Son KY, Kim DS, Kang MI, et al. Effects of crosslinked dextran in hydroxylpropyl methylcellulose on soft tissue augmentation in rats. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2014; 102(1): 131-40.
- 9 Chemistry, Libretexts. Infrared spectroscopy absorption table. [acesso em 2017 Jul 04]. Disponível em: [https://chem.libretexts.org/Reference/Reference_Tables/Spectroscopic_Parameters/Infrared_Spectroscopy_Absorption_Table].

* De acordo com o Guia de Trabalhos Acadêmicos da FOAr, adaptado das Normas Vancouver. Disponível no site da Biblioteca: <http://www.foar.unesp.br/Home/Biblioteca/guia-de-normalizacaoatualizado.pdf>

- 10 Chen CH, Chen SH, Mao SH, Tsai MJ, Chou PY, Liao CH, et al. Injectable thermosensitive hydrogel containing hyaluronic acid and chitosan as a barrier for prevention of postoperative peritoneal adhesion. *Carbohydr Polym.* 2017; 173: 721-31.
- 11 Chun C, Lee DY, Kim JT, Kwon MK, Kim YZ, Kim SS. Effect of molecular weight of hyaluronic acid (HA) on viscoelasticity and particle texturing feel of HA dermal biphasic fillers. *Biomater Res.* 2016; 20 (24): 1-7.
- 12 Daar E, King L, Nisbet A, Thorpe RB, Bradley DA. Viscosity changes in hyaluronic acid: Irradiation and rheological studies. *Appl Radiat Isot.* 2010; 68(4-5): 746–50.
- 13 Dahiya P, Kamal R. Hyaluronic acid: a boon in periodontal therapy. *N Am J Med Sci.* 2013; 5(5): 309–15.
- 14 De Boulle K, Richard G, Taro K, Myooran N, Ahmet T, Jean-Xavier R, et al. A review of the metabolism of 1,4-butanediol diglycidyl ether-crosslinked hyaluronic acid dermal fillers. *Dermatol Surg.* 2013; 39(12): 1758-66.
- 15 Edwards PC, Fantasia JE. Review of long-term adverse effects associated with the use of chemically-modified animal and nonanimal source hyaluronic acid dermal fillers. *Clin Interv Aging.* 2007; 2(4): 509-19.
- 16 Faga A, Nicoletti G, Brenta F, Scevola S, Abatangelo G, Brun P. Hyaluronic acid three-dimensional scaffold for surgical revision of retracting scars: a human experimental study. *Int Wound J.* 2013; 10(3): 329-35.
- 17 Falcone SJ, Berg RA. Crosslinked hyaluronic acid dermal fillers: a comparison of rheological properties. *J Biomed Mater Res A.* 2008; 87(1): 264-71.
- 18 Fan D, Wu B, Xu Z, Gu Q. Determination of hyaluronan by spectroscopic methods. *J Wuhan Univ Tech.* 2006; 21(3): 32-4.
- 19 Fernández-Cossío S, Castaño-Oreja MT. Biocompatibility of two novel dermal fillers: histological evaluation of implants of a hyaluronic acid filler and a polyacrylamide filler. *Plast Reconstr Surg.* 2006; 117(6): 1789-96.
- 20 Flynn TC, Sarazin D, Bezzola A, Terrani C, Micheels P. Comparative histology of intradermal implantation of mono and biphasic hyaluronic acid fillers. *Dermatol Surg.* 2011; 37(5): 637–43.
- 21 Friedman PM, Mafong EA, Kauvar AN, Geronemus RG. Safety data of injectable nonanimal stabilized hyaluronic acid gel for soft tissue augmentation. *Dermatol Surg.* 2002; 28(6): 491-4.

- 22 Hillel AT, Nahas Z, Unterman S, Reid B, Axelman J, Sutton D, et al. Validation of a small animal model for soft tissue filler characterization. *Dermatol Surg.* 2012; 38 (3): 471-8.
- 23 Iannitt T, Bingöl AÖ, Rottigni V, Palmieri B. A new highly viscoelastic hyaluronic acid gel: rheological properties, biocompatibility and clinical investigation in esthetic and restorative surgery. *Int J Pharm.* 2013; 456(2): 583-92.
- 24 Iannitti T, Julio CM, Alessandro C, Beniamino P. Experimental and clinical efficacy of two hyaluronic acid-based compounds of different cross-linkage and composition in the rejuvenation of the skin. *Pharm Res.* 2016; 33(12): 2879-90.
- 25 International Organization for Standardization, ISO 10993-10: biological evaluation of medical device part 10: Tests for irritation and skin sensitization. Zurich: ISO; 2010.
- 26 Jones D. Volumizing the face with soft tissue fillers. *Clin Plast Surg.* 2011; 38(3): 379-90.
- 27 Kablik J, Monheit GD, Yu L, Chang G, Gershtovich J. Comparative physical properties of hyaluronic acid dermal fillers. *Dermatol Surg.* 2009; 35 (S1): 302-12.
- 28 La Gatta A, Schiraldi C, Papa A, D'Agostino A, Cammarota M, De Rosa A, et al. Hyaluronan scaffolds via diglycidyl ether crosslinking: toward improvements in composition and performance. *Carbohydr Polym.* 2013; 96(2): 536-44.
- 29 Lee D, Lu Q, Sommerfeld SD, Chan A, Menon NG, Schmidt TA, et al. Targeted delivery of hyaluronic acid to the ocular surface by a polymer-peptide conjugate system for dry eye disease. *Acta Biomater.* 2017; 55: 163-71.
- 30 Lee DY, Kim JT, Kwon MK, Kim YZ, Kim SS. Influence of molecular weight on swelling and elastic modulus of hyaluronic acid dermal fillers. *Polymer(Korea).* 2015; 39(6): 976-80.
- 31 Lee WP, Kim HJ, Yu SJ, Kim BO. Six month clinical evaluation of interdental papilla reconstruction with injectable hyaluronic acid gel using an image analysis system. *J Esthet Restor Dent.* 2016; 28(4): 221-30.
- 32 Legré-Boyer V. Viscosupplementation: techniques, indications, results. *Orthop Traumatol Surg Res.* 2015; 101(1 Suppl 1): S101-8.
- 33 Lemperle G, Morhenn V, Charrier U. Human histology and persistence of various injectable filler substances for soft tissue augmentation. *Aesthetic Plast Surg.* 2003; 27(5): 354-66.

- 34 Maioli NA, Zarpelon AC, Mizokami SS, Calixto-Campos C, Guazelli CFS, Hohmann SN, et al. Superoxide anion donor, potassium superoxide, induces pain and inflammation in mice through production of reactive oxygen species and cyclooxygenase-2. *Braz J Med Biol Res.* 2015; 48(4): 321-31.
- 35 Matarasso SL, Carruthers JD, Jewell ML. Consensus recommendations for soft-tissue augmentation with nonanimal stabilized hyaluronic acid (Restylane). *Plast Reconstr Surg.* 2006; 117(3): 3-34.
- 36 Micheels P. Human anti-hyaluronic acid antibodies: is it possible? *Dermatol Surg.* 2001; 27(2): 185-91.
- 37 Micheels P, Sarazin D, Tran C, Salomon D. Effect of different crosslinking technologies on hyaluronic acid behavior: a visual and microscopic study of seven hyaluronic acid gels. *J Drugs Dermatol.* 2016; 15 (5): 600-6.
- 38 Narins RS, Welf P, Mark GR, Ernest AM, Andreas N. Nonanimal sourced hyaluronic acid–based dermal filler using a cohesive polydensified matrix technology is superior to bovine collagen in the correction of moderate to severe nasolabial folds: results from a 6-month, randomized, blinded, controlled, Multicent. *Dermat Surg.* 2010; 3 (6): 730-40.
- 39 Necas J, Bartosikova L, Brauner P, Kolar J. Hyaluronic acid (hyaluran) a review. *J Vet Med.* 2008; 54 (8): 397-411.
- 40 Nobuhiko Y, Terou O, Sakurai Y. Inflammation responsive degradation of crosslinked hyaluronic acid gels. *J Control Release.* 1992; 22 (2): 105-16.
- 41 Noh I, Kim GW, Choi YJ, Kim MS, Park Y, Lee KB, et al. Effects of cross-linking molecular weights in a hyaluronic acid-poly(ethylene oxide) hydrogel network on its properties. *Biomed Mater.* 2006; 1 (3): 116-23.
- 42 Park S, Park KY, Yeo IK, Cho SY, Chang Y, Koh HJ, et al. Investigation of the degradation-retarding effect caused by the low swelling capacity of a novel hyaluronic acid filler developed by solid-phase crosslinking technology. *Ann Dermatol.* 2014; 26(3): 357–62.
- 43 Romanò CL, De Vecchi E, Bortolin M, Morelli I, Drago L. Hyaluronic acid and its composites as a local antimicrobial/antiadhesive barrier. *J Bone Jt Infect.* 2017; 2(1): 63-72.
- 44 Segura T, Anderson BC, Chung PH, Webber RE, Shull KR, Shea LD. Crosslinked hyaluronic acid hydrogels: a strategy to functionalize and pattern. *Biomaterials.* 2005; 26(4): 359-71.

- 45 Sundaram H, Voigts B, Beer K, Meland M. Comparison of the rheological properties of viscosity and elasticity in two categories of soft tissue fillers: calcium hydroxylapatite and hyaluronic acid. *Dermatol Surg.* 2003; 36(3): 859-65.
- 46 Tezel A, Fredrickson GH. The science of hyaluronic acid dermal fillers. *J Cosmet Laser Ther.* 2008; 10(1): 35-42.
- 47 Voigt J, Driver VR. Hyaluronic acid derivatives and their healing effect on burns, epithelial surgical wounds, and chronic wounds: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Wound Repair Regen.* 2012; 20(3): 317-31.
- 48 Volpi N, Schiller J, Stern R, Soltés L. Role, metabolism, chemical modifications and applications of hyaluronan. *Curr Med Chem.* 2009; 16(14): 1718-45.
- 49 Yamada Y, Nakamura S, Ueda M, Ito K. Papilla regeneration by injectable stem cell therapy with regenerative medicine: long-term clinical prognosis. *J Tissue Eng Regen Med.* 2015; 9(3): 305-9.
- 50 Yang B, Guo X, Zang H, Liu J. Determination of modification degree in BDDE-modified hyaluronic acid hydrogel by SEC/MS. *Carbohydr Polym.* 2015; 131: 233-9.
- 51 Yeom J, Bhang SH, Kim BS, Seo MS, Hwang EJ, Cho IH, et al. Effect of cross-linking reagents for hyaluronic acid hydrogel dermal fillers on tissue augmentation and regeneration. *Bioconjug Chem.* 2010; 21: 240–7.