



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



MATHEUS SOUSA VITÓRIA

**Caracterização de géis de ácido hialurônico reticulados com polietileno glicol
diglicidil éter e butanodiol diglicidil éter com indicações na odontologia**

Araraquara

2020



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



MATHEUS SOUSA VITÓRIA

Caracterização de géis de ácido hialurônico reticulados com polietileno glicol diglicidil éter e butanodiol diglicidil éter com indicações na odontologia

Dissertação apresentada à Universidade Estadual Paulista (Unesp). Faculdade de Odontologia, Araraquara para obtenção do título de Mestre em Ciências Odontológicas, na área de Dentística Restauradora.

Orientador: Prof. Dr. Osmir Batista de Oliveira Junior

Araraquara

2020

V845c Vitória, Matheus Sousa
Caracterização de géis de ácido hialurônico reticulados com polietileno glicol diglicidil éter e butanodiol diglicidil éter com indicações na odontologia / Matheus Sousa Vitória. -- Araraquara, 2020
45 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Odontologia, Araraquara
Orientador: Osmir Batista de Oliveira Junior

1. Ácido hialurônico. 2. Preenchimentos dérmicos. 3. Cross link. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Odontologia, Araraquara. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

Matheus Sousa Vitória

Caracterização de géis de ácido hialurônico reticulados com polietileno glicol diglicidil éter e butanodiol diglicidil éter com indicações na odontologia

Comissão julgadora

Dissertação para obtenção do grau de mestre em ciências odontológicas

Presidente e Orientador Prof. Dr. Osmir Batista de Oliveira Junior

2º Examinador Prof. Dr. Hermes Pretel

3º Examinador Profa. Dra. Paula Mathias de Moraes

Araraquara, 06 de Agosto de 2020

DADOS CURRICULARES

MATHEUS SOUSA VITÓRIA

NASCIMENTO: 04 de fevereiro de 1991, Feira de Santana – Bahia

FILIAÇÃO: Josefa Martins de Sousa e Valmir Ribas Vitória

2010/2015 – Graduação em Odontologia - Universidade Federal da Bahia

2015/2016 - Atualização em Dentística Restauradora – Instituto Lumier/Ba

2017/2018 – Especialização em Prótese Dentária – Santé Pós-Graduação/Ba

2018/2020 – Mestrado em Ciências Odontológicas, área de concentração Dentística Restauradora – Universidade Estadual Paulista, Araraquara/SP

*Quero ser forte o bastante para enfrentar as dificuldades do meu caminho, sem me
tornar tão injusto a ponto de ignorar a dor das outras pessoas.*
Renée Venâncio

AGRADECIMENTOS

À minha mãe, Professora Josefa Martins de Sousa (in memoriam), a quem primeiro tive de exemplo e admiração do ser professor e a todos os professores que tive o privilégio de ser aluno e semearam conhecimento para que eu pudesse ser quem sou hoje.

Ao meu irmão Victor Sousa, que desde sempre esteve aberto a ouvir e pacientemente aconselhar, mestre nato e de doçura incomparável.

Aos meus amigos, que descobri que poderia ir muito mais longe com o apoio nos momentos difíceis que vivi. Aurélio Amorim, Ariana Barbosa, Deivisson Freitas, Igor Sacramento, Itana França, Marcos Oliveira, Rômulo Santiago, Welber Magalhães. Não seria possível sem o amparo de vocês.

À meu orientador Prof. Dr. Osmir Batista de Oliveira Junior, que se dispôs à minha formação nessa jornada de formação como pesquisador, ao Prof. Dr. José Paschoal Batistuti que gentilmente cedeu além do material o conhecimento necessário ao desenvolvimento dos experimentos realizados e ao Prof. Dr. Hermes Pretel, pela dedicação nas etapas de construção deste trabalho e ao meu aprendizado.

Aos colegas Básia Nogueira, doutoranda, e Mateus Garcia, iniciação científica, pelo auxílio e contribuição nas etapas de execução laboratorial, análises e discussão dos dados, além do apoio pessoal durante o período, muito obrigado e minha gratidão.

À Prof^a Dra. Patrícia P. Nordi Sasso Garcia, que me amparou com seu afago de tantos dias e que me encorajou a secar as lágrimas e seguir em frente pelo que eu acredito. E a todos os professores da FOAR que me mostraram um mundo pelos olhares experientes e dedicados.

À toda equipe da biblioteca da FOAR/Unesp em especial as servidoras Ana Cristina, Ceres, Denise e Marley, quem tive a companhia e me deram abrigo em todo o tempo.

Aos servidores desta faculdade, em especial à Seção técnica de pós graduação e ao servidor Cristiano por tanta dedicação a nós nesse período de vida que é a pós graduação, minha gratidão.

Ao Laboratório de Biopolímeros da Universidade de Araraquara (UNIARA), e aos colegas que nele trabalham, em nome do Professor Hernane Barud, pela contribuição em todos os momentos das análises.

Ao Instituto de Química de Araraquara – Unesp, em especial ao Laboratório Multiusuário de Análises Químicas e ao Laboratório de Microscopia Avançada.

À CAPES:

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de financiamento 001.

Vitória MS. Caracterização de géis de ácido hialurônico reticulados com polietileno glicol diglicidil éter e butanodiol diglicidil éter com indicações na odontologia [dissertação de mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2020.

RESUMO

Preenchimentos dérmicos com géis à base de ácido hialurônico (AH) são um dos principais produtos utilizados para diminuição das marcas de expressão e rejuvenescimento facial. Para que o produto seja viável para este fim, é necessária a modificação química de suas cadeias para reduzir sua degradação após implantação em tecidos humanos. A alteração das suas características físico-químicas, como a capacidade de intumescimento, coesividade e viscoelasticidade, vão estar ligadas as diferentes indicações clínicas, sendo de fundamental importância o conhecimento dessas propriedades, bem como estudo de novas formulações para a correta indicação e satisfação dos pacientes. O objetivo deste trabalho foi caracterizar formulações experimentais de géis de ácido hialurônico desenvolvidos com finalidade preenchedora. Para isso foram utilizadas formulações de géis à base de AH reticulados com Butanodiol Diglicidil Éter (BDDE) e Polietileno Glicol Diglicidil Éter (PEGDE), em diferentes concentrações de reticulação. Uma alíquota de cada gel, com alta e baixa concentração de reticulante, foi utilizada para a análise térmica, espectroscopia de absorção infra-vermelho, microscopia eletrônica de varredura, reologia e de grau de intumescimento. Os resultados obtidos evidenciaram diferenças na estrutura e viscoelasticidade dos géis, diretamente relacionadas ao reticulante utilizado e a taxa de reticulação. Foi possível concluir que o BDDE e o PEGDE foram eficazes na reticulação do AH e diferiram entre si quando comparados as taxas de reticulação, sendo possível ainda caracterizar os biomateriais através da metodologia utilizada.

Palavras – chave: Ácido hialurônico. Cross link. Preenchedores dérmicos.

Vitória MS. Characterization of hyaluronic acid gels cross-linked with poly (ethylene glycol) diglycidyl ether and butanediol diglycidyl ether with indications in dentistry [dissertação de mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2020.

ABSTRACT

Dermal fillers with hyaluronic acid (HA) gels are one of the main products used to reduce expression marks and facial rejuvenation. For the product to be viable for this purpose, chemical modification of its chains is necessary to reduce its degradation after implantation in human tissues. The alteration of its physical-chemical characteristics, such as the capacity for swelling, cohesiveness and viscoelasticity, will be linked to the different clinical indications, being of fundamental importance the knowledge of these properties, as well as the study of new formulations for the correct indication and patient satisfaction. The objective of this work was to characterize experimental formulations of hyaluronic acid gels developed for filling purposes. For this purpose, formulations of AH-based gels cross-linked with Butanediol diglycidyl ether (BDDE) and Poly ethylene glycol diglycidyl ether (PEGDE) were used, in different crosslinking concentrations. An aliquot of each gel, with high and low concentration of crosslinker, was used for thermal analysis, infrared absorption spectroscopy, scanning electron microscopy, rheology and degree of swelling. The results obtained showed differences in the structure and viscoelasticity of the gels, directly related to the crosslinker used and the crosslinking rate. It was possible to conclude that BDDE and PEGDE were effective in crosslinking HA and differed from each other when comparing crosslinking rates, making it possible to characterize biomaterials through the methodology used.

Keywords: Hyaluronic acid. Cross link. Dermal fillers.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	9
2 PROPOSIÇÃO	12
3 PUBLICAÇÕES	13
3.1 Publicação 1	14
3.2 Publicação 2	27
4 CONCLUSÃO	40
REFERÊNCIAS	41
ANEXOS	44

1 INTRODUÇÃO

Preenchimentos dérmicos têm sido um dos principais procedimentos estéticos realizados na face. Pela facilidade de administração, resistência à degradação e à deformação, biocompatibilidade e a possibilidade de reversibilidade, tornaram o ácido hialurônico (AH) o material escolha nesses tipos de procedimentos¹. O uso do AH, segundo dados da sociedade americana de cirurgia plástica, aumentou entre 2012 e 2017 85%, sendo o segundo procedimento não cirúrgico mais realizado nos EUA².

O ácido hialurônico (AH) é uma molécula natural de glicosaminoglicano formado por repetidos dissacarídeos de ácido D-glucorônico e N-acetilglicosamina. Essa molécula é componente fundamental da matriz extracelular, agindo na organização e forma tecidual e está presente em todos os vertebrados³⁻⁵. A maior quantidade de AH é encontrada na pele, sendo esse conteúdo perdido conforme o envelhecimento decorrente da ação dos raios ultravioleta (UV). Essa perda gradativa, diminui a elasticidade dos tecidos e por consequência leva a formação de marcas de expressão, comumente conhecido por rugas.

Quando o AH é utilizado de maneira cosmética, o composto de AH sofre modificações dando uma conformação de gel, isso porque o AH é um composto formado basicamente por água, sendo um material fluído se utilizado em sua fórmula não modificada quimicamente. Essa formulação fluída pode ser indicada para aumentar a hidratação superficial da pele, e é rapidamente degradado se utilizado intradérmico, cerca de 12 horas⁶⁻¹⁰.

Para ser utilizado em formulações de volumização, técnicas de modificação de suas cadeias foram então desenvolvidas na tentativa de assim manter o gel de AH presente por períodos maiores, dentre elas a reticulação ou *cross linked* das moléculas, uniformização das partículas e alterando sua concentração, obtendo-se assim um material viscoelástico e por consequência, com degradação mais lenta. Esse gel de AH agora modificado quimicamente, pode ser utilizado como preenchedor dérmico, dando sustentação aos tecidos e com degradação entre 6 a 18 meses, dependendo do grau de reticulação de suas cadeias^{4,11-13}.

No método de reticulação, é adicionado um agente reticulador à formulação de AH, que vai reagir e unir as cadeias de AH através das hidroxilas com os grupamentos livres do reticulante, criando um emaranhado denso e anovelado. O componente reticulador mais utilizado em formulações para preenchimentos é o 1,4 Butanodiol diglicidil éter (BDDE)^{14,15}. O BDDE é um epóxi com ligações éter que tem segurança

e reconhecimento de sua eficácia descritos na literatura. Ao ser incorporado na formulação, ele vai formar ligações com o grupo hidroxila do AH, a depender da quantidade de sítios reagidos e o emaranhado formado, o gel tende a ser mais ou menos resistente. Todavia, ao ser incorporado ao AH, nem todo BDDE vai ser reagido completamente, sendo capaz de formar 4 tipos de reações: O BDDE reagido em suas duas extremidades (reagido), reagido apenas em uma extremidade (ligação pendente), reagido com água (desativado) e não reagido (residual)^{1,14}.

O gel de AH quando utilizado como preenchedor dérmico, tem seu volume inicial dado pelo próprio volume do material e uma parte dado pela hidrofília da molécula do AH, que vai absorver certa quantidade de água circundante. Com o passar do tempo, também pode ocorrer a substituição de parte desse volume por colágeno, onde o AH ativa a deposição de fibroblastos, que por sua ação de sinalização molecular, ativa os receptores da superfície celular estimulando a migração de células⁸, que então vão substituir parte do volume do material por colágeno, elastina e fibras colágenas. Porém nem todo AH vai desencadear esse tipo de reação, pois a ativação e migração dessas células depende da viscosidade e elasticidade do produto¹⁶.

Outras características também influenciam o tipo de resposta biológica, como seu peso molecular, onde o produto com alto peso molecular pode suprimir a angiogênese à resposta imune e ainda diminuir a inflamação e diferenciação celular^{15,16}. Já o AH de baixo peso molecular ou fragmentado, pode induzir a regeneração, formação de cicatriz, imunoestimulação e angiogênese^{1,6}.

O ácido hialurônico é naturalmente degradado pela Hialuronidase por processo enzimático, por ataque de radicais livres ou termicamente. As enzimas hialuronidases são também utilizadas na reversibilidade de aplicações malsucedidas, pois elas clivam o ácido hialurônico reduzindo sua viscosidade e assim permitindo a sua degradação mais rápida^{4,17}. A eliminação do AH se dá pelo tecido linfático e é metabolizado pelo fígado.

Casos de incompatibilidade são descritos na literatura, e não são raros. Acredita-se que impurezas proteicas resultante da fermentação bacteriana e contaminantes no produto desencadeiam uma resposta imune^{18,19}. São encontrados casos de lesões eritematosas após uma segunda aplicação de AH, que após biópsia local são identificados como inflamação granulomatosa crônica de corpo estranho. Nesses casos, o tratamento é realizado com hialuronidase e administração oral e

infiltração de corticosteroides, podendo ainda serem necessários procedimentos de excisão local^{18,19}. Há também relatos referenciados à acidentes vasculares, obstrução de nervos e infecções, sendo causadas por fatores de técnica e tipo de produtos²⁰⁻²².

O campo de estudo das aplicações e resposta do AH pela engenharia tecidual na odontologia é extenso. Os cirurgiões-dentistas tem indicado o AH na correção de assimetrias faciais, suporte de tecidos após reabilitações protéticas, recuperação do padrão gengival em periodontia e implantodontia e na viscosuplementação da articulação temporomandibular. Estudos ainda apontam o uso do AH no tratamento de doença periodontal²³, auxiliar na regeneração óssea²⁴, como revestimento carregado de substâncias para diminuição de cepas bacterianas em ligações de titânio para implantes²⁵ e ainda como coadjuvante na cicatrização após extrações dentárias.

Outros agentes para reticulação foram testados com o objetivo aprimorar a reação e garantindo resistência à degradação e viscoelasticidade, como divinilsulfona e glutaraldeído, porém não obtiveram resultados satisfatórios quanto o método convencional de reticulação à base de BDDE¹⁵. O surgimento de um novo produto pode abrir outras possibilidades de formulações garantindo à segurança do tratamento. Há relatos na literatura do uso do polietileno glicol diglicidil éter (PEGDE), podendo ser uma alternativa ao BDDE. O PEGDE é também um epóxi, porém de cadeia maior que o BDDE, sugerindo assim alcançar sítios não reagidos do AH e por resultado tornando o produto final mais elástico, com maior tempo de duração pós implantação e com menos reticulante residual ao final da preparação⁴.

Conhecer as características de cada material se torna indispensável para alcançar produtos que possuam melhores vantagens. As propriedades físicas e químicas de cada material são diferentes e não são encontrados na literatura estudos que comparem produtos com esses dois tipos de reticulantes, tão pouco os efeitos de longevidade e resposta tecidual pós aplicação de formulações de AH com reticulantes BDDE e PEGDE, sendo necessário preencher essa lacuna sobre quais vantagens cada produto apresenta e sua melhor indicação.

2 PROPOSIÇÃO

Avaliar as propriedades físico-químicas e reológicas de géis experimentais de ácido hialurônico desenvolvidos com finalidade de preenchimentos dérmicos produzidos com dois reticulantes, polietilenoglicol diglicidil éter (PEGDE) e butanodiol diglicidil éter (BDDE) com baixa e alta reticulação. A hipótese nula testada será que os géis reticulados com PEGDE e BDDE não apresentam diferenças físico-químicas e reológicas.

3 PUBLICAÇÕES

Para a apresentação deste trabalho, o mesmo foi dividido em duas publicações de artigos científicos, a saber:

PUBLICAÇÃO 1 Razão de intumescimento de géis experimentais de ácido hialurônico para preenchimentos dérmicos reticulados com polietileno glicol diglicidil éter e butanodiol diglicidil éter.

PUBLICAÇÃO 2 Comportamento de géis experimentais de ácido hialurônico reticulados com BDDE e PEGDE para preenchimentos dérmicos

3.1 Publicação 1

Razão de intumescimento de géis experimentais de ácido hialurônico para preenchimentos dérmicos reticulados com polietileno glicol diglicidil éter e butanodiol diglicidil éter.*

Matheus Sousa Vitória¹

José Paschoal Batistuti²

Hermes Pretel¹

Basia Rabelo Nogueira¹

Mateus Garcia Gabriel¹

Osmir Batista de Oliveira Junior¹

¹ *Department of Restorative Dentistry, Araraquara School of Dentistry, São Paulo State University – UNESP*

² *Department of Food and Nutrition, School of Pharmaceutical Sciences, Araraquara, São Paulo State University – UNESP*

Corresponding author:

Osmir Batista de Oliveira Junior
Humaitá Street, 1680, Araraquara - SP, Brazil.
Zip code: 14801-385. Phone: +55(16) 3301 6300
E-mail: drosmirde@hotmail.com

* Artigo formatado seguindo as normas de publicação do periódico *Biomed Research International* (ANEXO A)

RESUMO

Formulações à base de ácido hialurônico (AH) são comumente utilizadas como preenchimentos dérmicos atualmente. Para que o produto seja viável para este fim, é necessária uma reação de reticulação para dificultar a degradação do mesmo pela hialuronidase e alterar suas características físico-químicas e mecânicas, como a capacidade de intumescimento que, se exagerado pode causar danos ao tecido. A mensuração do intumescimento da formulação também é uma importante medida sobre a eficiência da reticulação. O objetivo deste trabalho foi comparar a razão de intumescimento de formulações de géis à base de AH reticulados com Butanodiol Diglicidil Éter (BDDE) BDDE e Polietileno Glicol Diglicidil Éter (PEGDE), com alta e baixa taxa de reticulação, e correlacionar os achados com imagens da topografia superficial dos géis através de microscopia eletrônica de varredura (MEV). Uma alíquota de cada gel, com alta e baixa concentração de reticulante, foi preparada e adicionada solução de tampão fosfato salino (PBS 0,9% NaCl, pH= 7,2) para avaliar a sua capacidade de incorporação por um período de 24 horas, e então centrifugados e pesados. Foi realizada análise estatística multivariada com base no delta de intumescimento considerando o intervalo de confiança de 95% ($p < 0,05$). Os géis menos reticulados obtiveram maiores níveis de intumescimento, e as formulações com maior concentração de reticulante apresentaram-se mais homogêneas e com menor porosidade. Os resultados mostraram que a concentração do agente reticulador interferiu no grau de intumescimento dos géis e suas características morfológicas, podendo ser uma medida indireta de eficiência da reticulação.

Palavras chave: Ácido Hialurônico. Razão de intumescimento. Reticulação.

Introdução

O envelhecimento natural é fator determinante na perda de elasticidade da pele. Em um organismo jovem, o ácido hialurônico (AH) e o colágeno, responsáveis pela firmeza e sustentação dos tecidos, são degradados na mesma velocidade que são sintetizados.[1] Conforme envelhecimento, o organismo passa então a degradar mais rápido que a capacidade de síntese desses componentes, levando a perda de elasticidade e consequentemente a formação de marcas de expressão.[2] Uma solução encontrada de forma menos invasiva, alternativa aos procedimentos convencionais cirúrgicos é a utilização de biomateriais para preenchimentos dérmicos que recuperem a jovialidade e a percepção de beleza. [3, 4]

Preenchimentos dérmicos à base de AH tornaram-se um dos principais procedimentos estéticos não cirúrgicos nos últimos anos.[1, 5] O ácido hialurônico é um polissacarídeo formado por repetidos monômeros de ácido D- glucorônico e N-acetil glicosamina, sendo esta uma molécula natural dos vertebrados e quando utilizada de forma injetável, possui características que diminuem as chances de uma reação indesejada após aplicação quando comparado aos polímeros não absorvíveis. Por ser um polímero reabsorvível, a sua utilização fornece segurança, confiabilidade e com potencial de reversibilidade das aplicações. [6–8]

O ácido hialurônico quando não modificado quimicamente tem degradação rápida se injetado na derme, por conta da enzima hialuronidase.[9–11] Para que o uso do AH seja viável como preenchimento dérmico de média duração, o mesmo necessita de uma modificação na sua estrutura, denominada de reticulação ou *cross-link*, esse processo vai ligar as cadeias da molécula de ácido hialurônico, formando uma rede tridimensional. Dessa forma, o AH passa a adquirir características ideais para um preenchedor dérmico como viscosidade, coesividade, grau de inflamação controlado, intumescimento e maior tempo de degradação. Essas propriedades são diretamente relacionadas ao grau de reticulação das moléculas de AH.[11–15]

Um gel de AH mais reticulado tem menor distância entre suas cadeias, exigindo mais força para deformá-las, tornando-o então mais firme. Um gel menos reticulado, tem maior distância entre suas cadeias, tornando-o menos firme ou menos resistente à deformação. Por conta disso, a indicação do produto final não é universal, sendo necessário tornar claro as propriedades de cada produto e então combinar com as necessidades do paciente.[13, 16]

Para que AH permaneça estável após aplicação, as suas extremidades reativas devem estar ligadas ao agente reticulante, isso porque unidades livres após aplicação, vão se ligar a água circundante através de pontes de hidrogênio e intumescer. Na prática clínica, esse efeito pode levar a um resultado insatisfatório, como um falso volume gerado pela absorção de água circundante da região aplicada. Outro fator de insucesso são as repetições das aplicações em curtos períodos.[1, 17]

O processo de reticulação se diferencia tanto pelo método aplicado como pelo agente reticulador utilizado. Os agentes reticuladores mais utilizados são: divinilsulfona, éteres diglicidílicos e bis-epóxis. Dentre eles, o Butanodiol éter diglicidílico (BDDE) é o usualmente utilizado nas formulações,[14, 17, 18] sua ligação a molécula do AH ocorre através da reatividade do grupo epóxi presente nas duas extremidades da sua cadeia que reage com o grupo carboxílico mais acessível da cadeia do AH, porém nem todo BDDE disponível será integrado ao AH, podendo gerar subprodutos que em determinadas quantidades são tóxicos ao organismo humano. A busca por formulações menos tóxicas e mais reativas é motivo constante de estudo e tentativas de melhoramento dos atuais produtos disponíveis, um exemplo é a substituição do BDDE pelo Polietilenoglicol diglicidil éter (PEGDE), porém esse processo de reticulação ainda carece de informações e testes comparando as propriedades dos materiais para que assim forneça bases seguras que garantam a substituição dos atuais modelos de reticulação. [12, 14]

O objetivo deste estudo foi investigar o efeito da substituição do BDDE pelo PEGDE sobre o grau de intumescimento e a morfologia superficial e interna de formulações de AH para preenchimento dérmico.

Material e Método

Material

Foram utilizados no estudo 4 formulações de géis de ácido hialurônico, diferenciando-se do agente reticulador e concentrações utilizadas. Esses géis experimentais, foram recebidos codificados através da alíquota de reticulante adicionado e foram convertidos para mol afim de padronização como mostra a **tabela 1**.

Tabela 1: Codificação dos materiais e suas respectivas alíquotas dos reticuladores.

Tipo de reticulador	Alíquota utilizada	Código recebido
Butanodiol diglicidil	0,0775 mol	BDDE-
éter BDDE	0,1550 mol	BDDE+
Poli(etileno glicol)	0,1140 mol	PEGDE-
diglicidil éter PEGDE	0,1824 mol	PEGDE+

Razão de intumescimento

Alíquotas de aproximadamente 300 mg dos géis foram inseridas em tubos eppendorffs, previamente tarados. Para cada gel foram feitas 7 replicatas. Foram adicionados 1 ml de solução tampão fosfato salino (PBS 0,9% NaCl, pH= 7,2) nos tubos. Os géis permaneceram por 24 horas a temperatura de 37°C. Em seguida, foram centrifugados a 13.000 rpm por 5 minutos. O

excesso de solução foi retirado manualmente com auxílio de tiras de papel filtro. Assim, os tubos foram pesados e transferidos para estufa a 50°C por 24 horas. Após, os tubos foram pesados para determinação da massa seca. O cálculo da razão de intumescimento foi realizado a partir da seguinte fórmula

$$SW_R = \frac{Massa\ intumescida_g}{Massa\ seca_g}$$

Microscopia Eletrônica de Varredura

A MEV foi realizada para análise da morfologia das amostras intumescidas. Para que os géis pudessem ser corretamente descritos e comparados após o intumescimento, foi realizado a liofilização das amostras, onde aproximadamente 0,2 ml de cada AH foi congelada inicialmente a uma temperatura de -45°C por 48 horas, após foram levadas ao liofilizador Liotop L101, sob vácuo a uma temperatura de -55°C por 48 horas. Para secção das amostras sem influência na estrutura, as amostras foram cuidadosamente depositadas em base de cadinho e adicionado nitrogênio líquido para congelamento e após seccionados transversalmente. As amostras foram então acomodadas em stubs de latão e recobertas com carbono, gerando uma cobertura de 5nm, no equipamento *Bal-Tec* SCD 050. As análises em MEV foram realizadas no microscópio JOEL JSM 7500F, que é um microscópio eletrônico de varredura por emissão de campo.

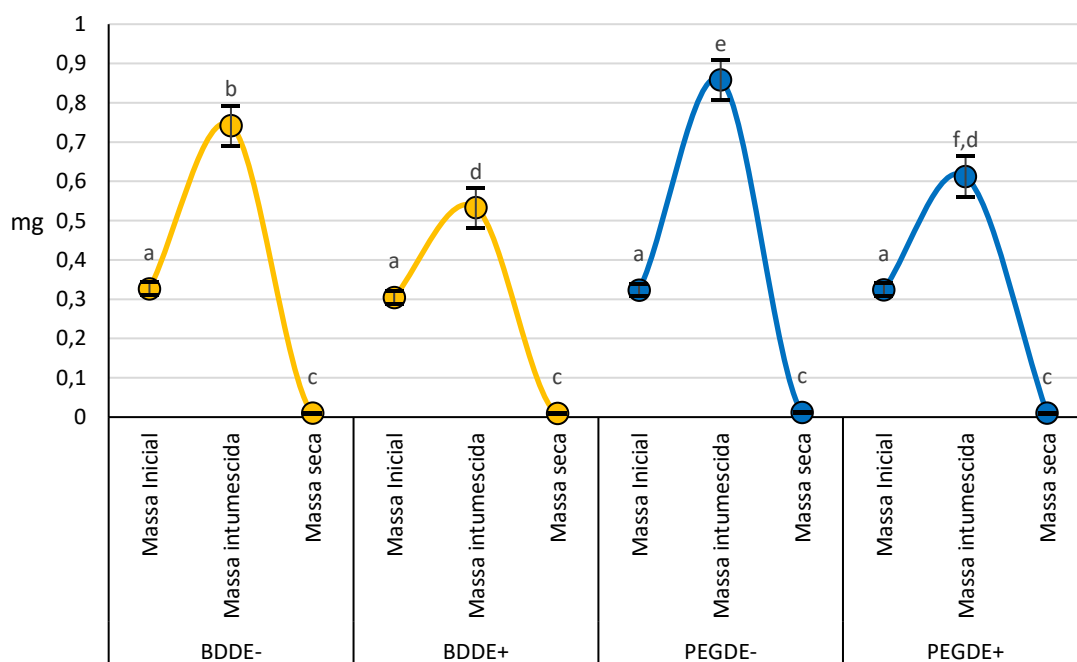
Análise Estatística

Foi realizada análise estatística multivariada considerando as massas registradas antes e após o intumescimento e depois da secagem do gel. Foi feito ainda o delta de intumescimento (diferença entre a massa final intumescida pela massa inicial do gel), onde o intervalo de confiança teve nível de significância de 95% ($p < 0,05$).

Resultados e discussão

Neste estudo foram utilizadas formulações de géis reticulados com dois tipos de époxydos, o Butanodiol diglicidil éter e o polietileno glicol diglicidil éter. O **gráfico 1** mostra a diferença entre os géis (BDDE em amarelo e PEGDE em azul) com diferentes tipos e alíquotas de reticuladores nos tempos inicial, gel intumescido e gel seco. Os géis com maior concentração de agente reticulante apresentaram taxa de intumescimento estatisticamente iguais. O gel que apresentou maior capacidade de reter água foi o PEGDE- seguido do BDDE-. Destaca-se ainda que ao avaliar o intumescimento com relação ao agente reticulador, os géis com maior concentração de PEGDE e BDDE obtiveram taxa de intumescimento estatisticamente iguais. A reticulação do AH com epóxydos teve seu primeiro relato feito por LAURENT 1964, onde a reação consiste em abertura do anel epóxydo para formação de ligações éter com a hidroxila, por meio de ligações éter, e grupos carboxilas, por meio de ligações éster. [19, 20]

Gráfico 1: Média da taxa de intumescimento (mg) e intervalos de confiança (IC95%), do gel de ácido hialurônico nos diferentes momentos de análise, em função de tipo e concentração do agente reticulante.



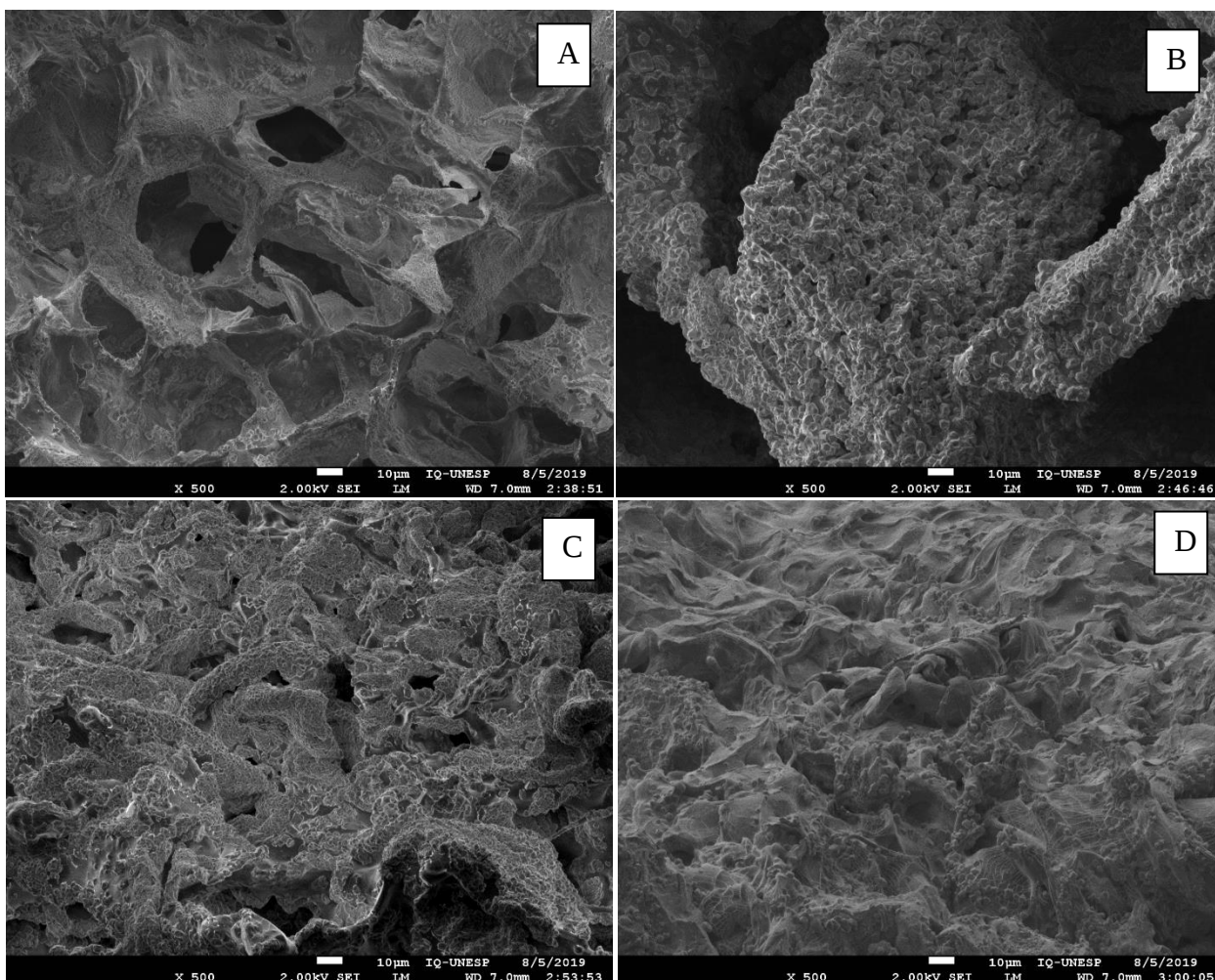
* Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas de acordo com o teste post hoc de comparações múltiplas com correção de Bonferroni ($p < 0,05$)

Outros fatores são requisitos para o bom resultado do gel na interação com o meio, como pH, força iônica, composição do solvente e pressão osmótica.[21, 22] Todos esses fatores levam a diferentes comportamentos do gel a depender do tipo de reticulante e método de reticulação. O resultado encontrado nesse estudo onde o gel com alíquota menor de reticulação teve maior taxa de intumescimento, também foi demonstrado por SHAH AND BARNETT 1992, que concluíram que o intumescimento do gel foi dependente do seu grau de reticulação. Também é possível sugerir que a integridade mecânica foi reduzida com esse aumento volumétrico, como é visto nas imagens de MEV (**figura 1**).

As fotomicrografias realizadas em MEV, sugerem uma estrutura densa, com poros em todas as formulações, pode-se inferir, portanto, que a estrutura de arcabouço do AH é mantida independente da reticulação, sendo mais evidente nas imagens das formulações com maior alíquota de reticulante (**imagem B e D**), podemos observar ainda nesses géis uma camada mais organizada e menos porosa, fator que pode ser atribuído à nova conformação adquirida após o arranjo das hélices de AH decorrente da reticulação. Um estudo realizado por YANG et al. 2013

apresentou resultados diferentes deste estudo, eles utilizaram um polietileno glicol na reticulação do AH e apresentou estrutura porosa homogênea nos géis com menor taxa de reticulação e não homogênea nos géis de maiores taxas, aumentando o número de poros conforme aumentou a reticulação das cadeias.

Figura 1. Microscopia eletrônica de varredura dos géis de ácido hialurônico. A e B representam o AH + BDDE, com baixa e alta reticulação respectivamente; C e D representam AH + PEGDE, com baixa e alta reticulação, respectivamente.



Apesar de poucos relatos sobre a utilização de formulações de géis de AH para preenchimentos dérmicos que contenham o PEGDE na sua composição, a diferença estrutural observada entre os géis nas imagens é explicada de modo que quando a utilizado o PEGDE como reticulador, há um relaxamento das tensões decorrentes da longa cadeia desse epóxido, o

que não é observado nos géis reticulados com BDDE, promovendo assim um gel mais elástico e denso.[23, 24] LIN-CHU et al 1999, citaram que a maior quantidade de poros favorecem a propagação de nutrientes facilitando o desenvolvimento celular e consequentemente aumentando a resposta tecidual.[25] Esse resultado pode sugerir que quanto menor for o nível de reticulação maior será a quantidade de poros que o gel pode possuir e assim aumentar a biodegradação.

EDSMAN et al. 2012 demonstraram que ao criar uma malha tridimensional densa de AH a reticulação reduz o espaço viável para absorção de água pela molécula de ácido hialurônico.[16] Na realidade clínica, a absorção de água pelo produto é importante para aumentar a hidratação da região em que foi aplicado e a sua sustentação dos tecidos. Entretanto, o intumescimento deve ocorrer de tal forma que não altere a resposta tecidual imunológica. Se o intumescimento for exagerado os tecidos podem sofrer distensão, dilaceração com consequente resposta inflamatória aguda, hematoma e edema.[13]

Conclusão

A concentração do agente reticulador interfere no grau de intumescimento dos géis de ácido hialurônico. Géis com maiores taxas de reticulação obtiveram menores níveis de intumescimento quando comparados aos géis com menores taxas de reticulação.

Data Availability

The processed data used to support the finding of this study are included within the article. The raw data used to support the finding of this study are available from the corresponding author upon request.

Acknowledgements

The authors declare that there are no conflicts of interest. In addition, there was no funding for the development of this study.

Referências

1. D. Funt and T. Pavicic: “Dermal Fillers in Aesthetics: An Overview of Adverse Events and Treatment Approaches.” *Plast. Surg. Nurs.* vol. 35, no. 1, pp. 13–32, 2015.
2. T. Michaud: “Rheology of hyaluronic acid and dynamic facial rejuvenation: Topographical specificities.” *J. Cosmet. Dermatol.* vol. 17, no. 5, pp. 736–743, 2018.
3. K. Hiramoto, H. Kobayashi, Y. Yamate, M. Ishii, and E.F. Sato: “Intercellular pathway through hyaluronic acid in UVB-induced inflammation.” *Exp. Dermatol.* vol. 21, no. 12, pp. 911–914, 2012.
4. R.S. Narins, F.S. Brandt, S.H. Dayan, and C.S. Hornfeldt: “Persistence of nasolabial fold correction with a hyaluronic acid dermal filler with retreatment: Results of an 18-month extension study.” *Dermatologic Surg.* vol. 37, no. 5, pp. 644–650, 2011.
5. R.V. Sepúlveda, A.P.B. Borges, L.G. Conceição, F.L. Valente, E.C. Carlo Reis, and I.B. Bohnenberger: “Composite synthetic hydroxyapatite 30%, in two physical states, as dermal filler.” *Rev. Ceres.* vol. 60, no. 4, pp. 458–464, 2013.
6. A. La Gatta, C. Schiraldi, A. Papa, and M. De Rosa: “Comparative analysis of commercial dermal fillers based on crosslinked hyaluronan: Physical characterization and in vitro enzymatic degradation.” *Polym. Degrad. Stab.* vol. 96, no. 4, pp. 630–636, 2011.
7. M.V.B. Pinheiro, E. Bagatin, K.M. Hassun, and S. Talarico: “Adverse effect of soft tissue augmentation with hyaluronic acid.” *J. Cosmet. Dermatol.* vol. 4, no. 3, pp. 184–186, 2005.
8. E. Csapó, H. Szokolai, Á. Juhász, N. Varga, L. Janovák, and I. Dékány: “Cross-linked and hydrophobized hyaluronic acid-based controlled drug release systems.” *Carbohydr. Polym.* vol. 195, no. February, pp. 99–106, 2018.
9. R.J. Hirsch, H.J. Brody, and J.D.A. Carruthers: “Hyaluronidase in the office: A necessity for every dermasurgeon that injects hyaluronic acid.” *J. Cosmet. Laser Ther.*

- vol. 9, no. 3, pp. 182–185, 2007.
10. M. Alam, R. Hughart, A. Geisler, K. Paghdal, A. Maisel, A. Weil, D.P. West, E. Veledar, and E. Poon: “Effectiveness of low doses of hyaluronidase to remove hyaluronic acid filler nodules a randomized clinical trial.” *JAMA Dermatology*. vol. 154, no. 7, pp. 765–772, 2018.
 11. T. Segura, B.C. Anderson, P.H. Chung, R.E. Webber, K.R. Shull, and L.D. Shea: “Crosslinked hyaluronic acid hydrogels: A strategy to functionalize and pattern.” *Biomaterials*. vol. 26, no. 4, pp. 359–371, 2005.
 12. N. Zerbinati, T. Lotti, D. Monticelli, V. Martina, G. Cipolla, E. D’Este, A. Calligaro, R. Mocchi, C. Maccario, S. Sommatitis, J. Lotti, U. Wollina, G. Tchernev, and K. França: “In vitro evaluation of the sensitivity of a hyaluronic acid PEG cross-linked to bovine testes hyaluronidase.” *Open Access Maced. J. Med. Sci.* vol. 6, no. 1, pp. 20–24, 2018.
 13. J. Kablik, G.D. Monheit, L.P. Yu, G. Chang, and J. Gershkovich: “Comparative physical properties of hyaluronic acid dermal fillers.” *Dermatologic Surg.* vol. 35, no. SUPPL. 1, pp. 302–312, 2009.
 14. K. De Boule, R. Glogau, T. Kono, M. Nathan, A. Tezel, J.X. Roca-Martinez, S. Paliwal, and D. Stroumpoulis: “A review of the metabolism of 1,4-butanediol diglycidyl ether-crosslinked hyaluronic acid dermal fillers.” *Dermatologic Surg.* vol. 39, no. 12, pp. 1758–1766, 2013.
 15. M. Cavallini, B. Antonioli, R. Gazzola, M. Tosca, M. Galuzzi, V. Rapisarda, F. Ciancio, and M. Marazzi: “Hyaluronidases for treating complications by hyaluronic acid dermal fillers: Evaluation of the effects on cell cultures and human skin.” *Eur. J. Plast. Surg.* vol. 36, no. 8, pp. 477–484, 2013.
 16. K. Edsman, L.I. Nord, Å. Öhrlund, H. Lärkner, and A.H. Kenne: “Gel properties of hyaluronic acid dermal fillers.” *Dermatologic Surg.* vol. 38, no. 7 PART 2, pp. 1170–1179, 2012.
 17. P.H.J. Keizers, C. Vanhee, E.M.W. van den Elzen, W.H. de Jong, B.J. Venhuis, H.M. Hodemaekers, P. Schwillens, and D.G.W. Lensen: “A high crosslinking grade of hyaluronic acid found in a dermal filler causing adverse effects.” *J. Pharm. Biomed. Anal.* vol. 159, pp. 173–178, 2018.
 18. F.J. Wende, S. Gohil, L.I. Nord, A. Helander Kenne, and C. Sandström: “1D NMR methods for determination of degree of cross-linking and BDDE substitution positions in HA hydrogels.” *Carbohydr. Polym.* vol. 157, pp. 1525–1530, 2017.
 19. M.N. Collins and C. Birkinshaw: “Physical properties of crosslinked hyaluronic acid

- hydrogels.” *J. Mater. Sci. Mater. Med.* vol. 19, no. 11, pp. 3335–3343, 2008.
20. T.C. Laurent, K. Hellsing, B. Gelotte, J.S. Burton, and R. Stevens: “Cross-linked Gels of Hyaluronic Acid.,” (1964).
 21. C.B. Shah and S.M. Barnett: “Swelling behavior of hyaluronic acid gels.” *J. Appl. Polym. Sci.* vol. 45, no. 2, pp. 293–298, 1992.
 22. B. Tavsanlı and O. Okay: “Preparation and fracture process of high strength hyaluronic acid hydrogels cross-linked by ethylene glycol diglycidyl ether.” *React. Funct. Polym.* vol. 109, pp. 42–51, 2016.
 23. N. Zerbinati, R. Mocchi, H. Galadari, C. MacCario, M. Maggi, R. Rauso, A. Passi, C. Esposito, and S. Sommati: “In vitro evaluation of the biological availability of hyaluronic acid polyethylene glycols-cross-linked hydrogels to bovine testes hyaluronidase.” *Biomed Res. Int.* vol. 2019, pp. 1–6, 2019.
 24. J.A. Calles, L.I. Tártara, A. Lopez-García, Y. Diebold, S.D. Palma, and E.M. Vallés: “Novel bioadhesive hyaluronan-itaconic acid crosslinked films for ocular therapy.” *Int. J. Pharm.* vol. 455, no. 1–2, pp. 48–56, 2013.
 25. L. Lin-Shu, A.Y. Thompson, M.A. Heidaran, J.W. Poser, and R.C. Spiro: “An osteoconductive collagen/hyaluronate matrix for bone regeneration.” *Biomaterials.* vol. 20, no. 12, pp. 1097–1108, 1999.

3.2 Publicação 2

Comportamento de géis experimentais de ácido hialurônico reticulados com BDDE e PEGDE para preenchimentos dérmicos

Matheus Sousa Vitória¹

José Paschoal Batistuti²

Hermes Pretel¹

Basia Rabelo Nogueira¹

Mateus Garcia Gabriel¹

Osmir Batista de Oliveira Junior¹

¹ *Department of Restorative Dentistry, Araraquara School of Dentistry, São Paulo State University – UNESP*

² *Department of Food and Nutrition, School of Pharmaceutical Sciences, Araraquara, São Paulo State University – UNESP*

Corresponding author:

Osmir Batista de Oliveira Junior
Humaitá Street, 1680, Araraquara - SP, Brazil.
Zip code: 14801-385. Phone: +55(16) 3301 6300
E-mail: drosmirde@hotmail.com

* Artigo formatado seguindo as normas de publicação do periódico *Brazilian Journal Pharmaceutical Sciences* (ANEXO B)

Introdução

Ácido hialurônico (AH) é um polímero natural não sulfatado de alto peso molecular formado por unidades repetidas dissacarídeas de Ácido D-glucurônico ligados por N-acetil-D-glucosamina, através de ligações glicosídicas dos tipos β -1,4 e β -1,3. (Huynh and Priefer, 2020; Wu et al., 2017; Zhuo et al., 2018) No corpo humano o AH tem função de volumização tecidual e lubrificação das articulações sendo naturalmente encontrado nos fluidos e tecidos. (Romagnoli and Belmontesi, 2008) Suas propriedades físico-químicas e mecânicas como viscoelasticidade, biodegradabilidade e biocompatibilidade o tornam um material de importante domínio para a indústria cosmética e farmacêutica. (Fallacara et al., 2018)

Entretanto, a rápida degradação do AH pela hialuronidase e a ausência de propriedades mecânicas para oferecer suporte aos tecidos trouxe a necessidade de alterar a estrutura química do composto para que ele obtivesse características que o tornasse ideal para este fim. (Fallacara et al., 2018; Robert et al., 2010; Sudha and Rose, 2014) O processo de reticulação consiste em formar uma massa molecular tridimensional aumentando o número de ligações duplas entre as cadeias de AH através de um composto químico, que se apresenta como agente reticulador. O resultado desse processo, é um gel de propriedades físico-químicas com finalidade volumizadora e maior resistência à degradação. Esse tipo de reação pode ocorrer em três sítios funcionais da molécula de AH: grupo carboxílico (- COOH), grupo hidroxila (- OH) ou grupo amino (- NHCOCH₃). (Collins and Birkinshaw, 2008; Nobuhiko et al., 1992; Schanté et al., 2011; Tomihata and Ikada, 1997a) Para a indústria cosmética a reticulação realizada através do grupo hidroxila é a mais utilizada, já que dessa forma é possível manter a natureza polianiônica do AH tornando-o apropriado para seu uso como preenchedor dérmico. (Al-Sibani et al., 2017; La Gatta et al., 2013)

Dentre os reticuladores mais utilizados, destaca-se o Butanodiol éter diglicidílico (BDDE) pela sua reatividade e baixa toxicidade.(De Boule et al., 2013; Huynh and Priefer, 2020; Wende et al., 2017) Contudo, é importante o conhecimento das propriedades físico-químicas e mecânicas dos géis, a fim de propor alterações em sua formulação e assim abrir novas possibilidades de produtos com segurança e eficácia clínica. Sabe-se que quanto maior a toxicidade do reticulador, maiores são as chances de hipersensibilidade, formação de edema, nódulos e reações adversas.(Cavallini et al., 2013; Huynh and Priefer, 2020; Zhuo et al., 2018) Para conseguir um produto final seguro é preciso proporcionar a alíquota de reticulador pela quantidade de AH, pois uma quantidade mínima de reticulador também não é desejável, produzindo um gel pouco eficiente.

Uma alternativa ao BDDE pode ser o polietileno glicol diglicidil éter (PEGDE). Esse epóxi tem menor potencial citotóxico quando comparado a outros agentes reticuladores,(Nishi et al., 1995) sendo capaz de formar um gel com baixa solubilidade e menor taxa de degradação.(Tomihata and Ikada, 1997b) Formulações de biopolímeros reticulados com o PEGDE já é realidade como a produção de scaffolds, carregador de drogas e géis para implantação.(Calles et al., 2013; Kang et al., 2009; Tavsanli and Okay, 2016) Entretanto, a literatura carece de evidências que comparem as características físico-químicas e mecânicas desses géis de AH.

Uma das características desejadas são de um reticulador ainda mais eficaz, com menor capacidade de formação de subprodutos e que proporcione estabilidade do gel por mais tempo após a aplicação, diminuindo o intervalo entre aplicações e reações adversas. As propriedades dos géis e de agentes reticuladores alternativos devem estudados, buscando o conhecimento dos produtos utilizados e melhoramento das formulações.

Material e Método

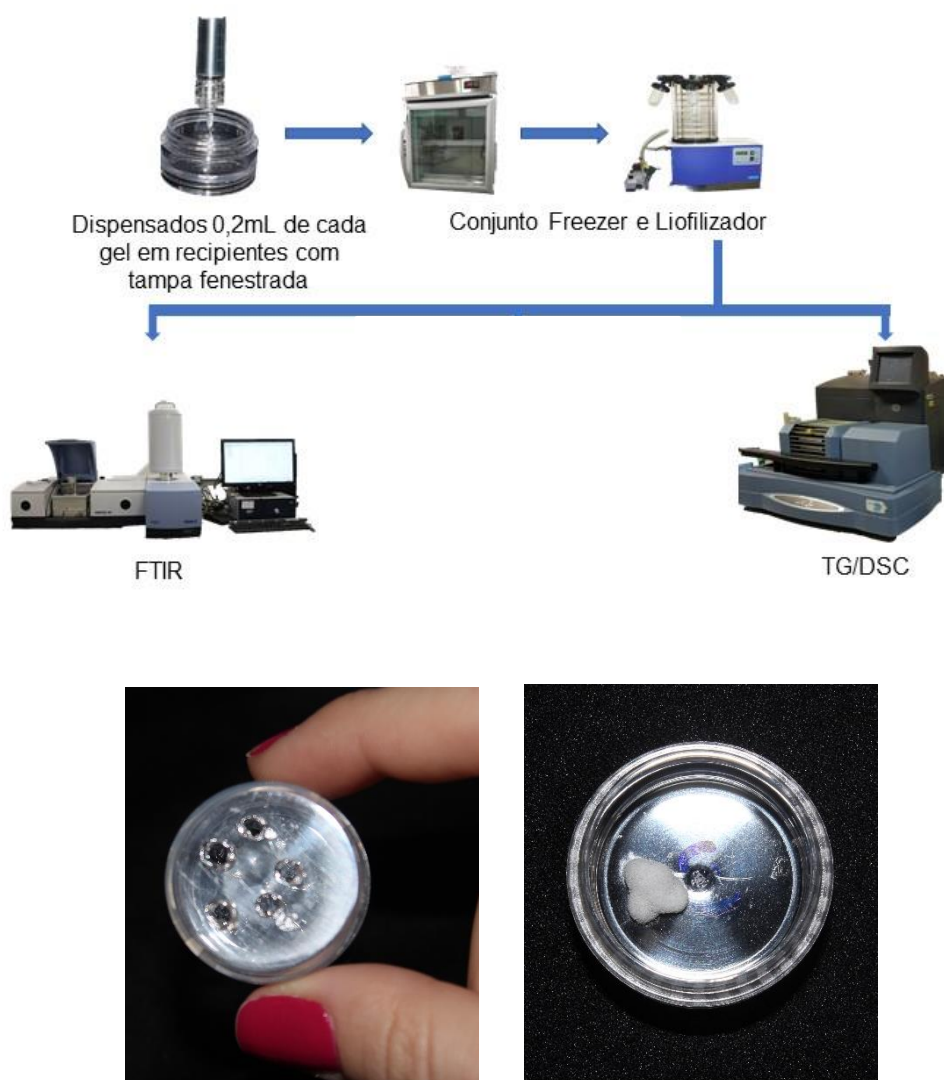
Material

Foram utilizadas cinco formulações de AH, duas reticuladas BDDE (alta e baixa concentração), duas do reticulador PEGDE (alta e baixa concentração) e uma não reticulada, utilizada como grupo controle. A concentração de AH foi determinada pelo fabricante, sendo a mesma em todas as formulações, 24 mg/mL. A descrição dos grupos experimentais e controle e suas respectivas siglas estão descritas no **quadro 1**. Para as análises em espectroscopia de absorção infravermelho por transformada de Fourier (FTIR), Termogravimetria (TG) e calorimetria diferencial exploratória (DSC) os géis foram liofilizados para manter as suas características morfológicas intactas sem interferência da água. O processo de liofilização se iniciou através do congelamento das amostras em freezer laboratorial (liotop, São Carlos – SP/Brasil) com temperatura controlada a -45° C por 48 horas. Após, o material foi levado ao liofilizador L101 (Liotop, São Carlos – SP/Brasil), por 48 horas sob vácuo e a uma temperatura de -55°C, obtendo-se então o material pronto para as análises como demonstrado no esquema de preparo na **figura 1**.

Quadro 1 - Formulações experimentais e controle testadas e suas respectivas siglas

Grupos	Reticulante	Nível de Reticulação	Sigla
Teste	1,4 Butanodiol diglicidil éter	Alto	BDDE+
	1,4 Butanodiol diglicidil éter	Baixo	BDDE–
	Polietileno glicol diglicidil éter	Alto	PEGDE+
	Polietileno glicol diglicidil éter	Baixo	PEGDE–
Controle	Não reticulado	--	C-

Figura 1 - Esquema de preparo das amostras prévio as análises e amostra final liofilizada. Vista Frontal do recipiente com tampa fenestrada/ Vista frontal sem tampa e com amostra liofilizada no interior



Espectroscopia de Absorção Infravermelho por transformada de Fourier

As análises por FT-IR foram realizadas através do microscópio Raman com transformada de Fourier – RAMANSKOPE da BRUKER (Bruker Optics Ltd, Milton/Ontário, Canadá) e acessório objetiva ATR 40x, com faixa de leitura de 400 a 4000 cm^{-1} , com laser de 1064 nm com potência máxima de 1000 mWA. A amostra foi posicionada sobre o cristal de germânio e a cabeça de leitura do acessório ATR foi regulada e travada para a realização das análises.

Análise térmica - Termogravimetria e Calorimetria diferencial exploratória (TG/DSC)

As análises de TG/DSC foram realizadas em uma câmara de análise térmica SDT Q600 TA instruments, utilizando 5mg de cada amostra, acondicionadas e pesadas em cadinho de alumina com variação de temperatura de 30° a 600° C, com rampa de aquecimento de 10° C/min, em atmosfera de nitrogênio sob fluxo de ar sintético de 100mL/min.

Reologia

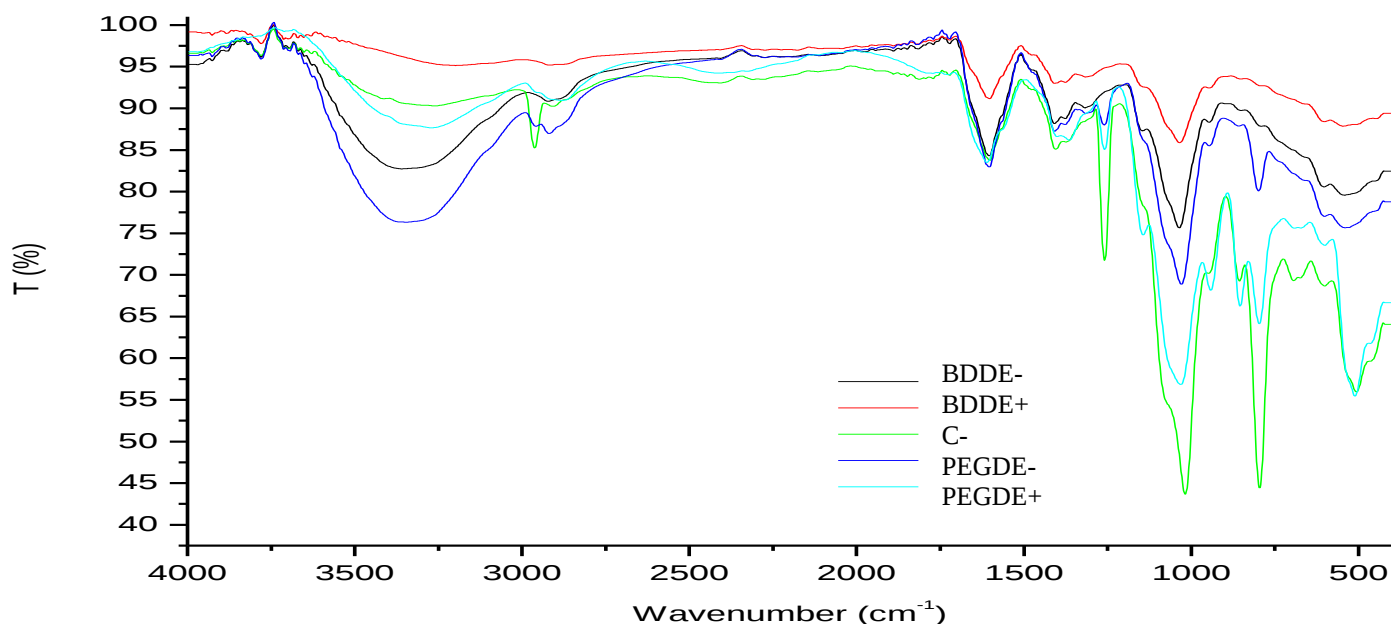
Foram realizados testes de reômetria dinâmica oscilatória no reômetro Discovery Hybrid Reometer TA instruments, utilizando a geometria cone/placa de 50mm de diâmetro e ângulo 1°, com 1 mm de gap.

Resultados e discussão

1 - Espectroscopia de absorção infravermelha por transformada de Fourier

Foi possível através da análise de espectroscopia determinar os grupos funcionais através das frequências vibracionais da molécula e assim confirmar a identidade da molécula de ácido hialurônico nas formulações experimentais, quando comparado ao espectro padrão da molécula de AH. Como fica demonstrado na **figura 2** A presença da banda forte no espectro aproximado 3300 cm⁻¹ OH e NH ligados por hidrogênio, caracterizando vibrações do grupo hidroxila, porém na formulação de AH reticulado com BDDE+ esse sinal não foi visivelmente sensível quando comparado às outras formulações. São encontradas bandas moderadas no espectro de 2.900 cm⁻¹, que indicam vibrações de estiramento do CH. As bandas entre 1600 cm⁻¹ são superposição de bandas amida I e II e as bandas de carbonila e carboxila V_{C=O}.

Figura 2 - FTIR dos géis de AH reticulados com BDDE e PEGDE



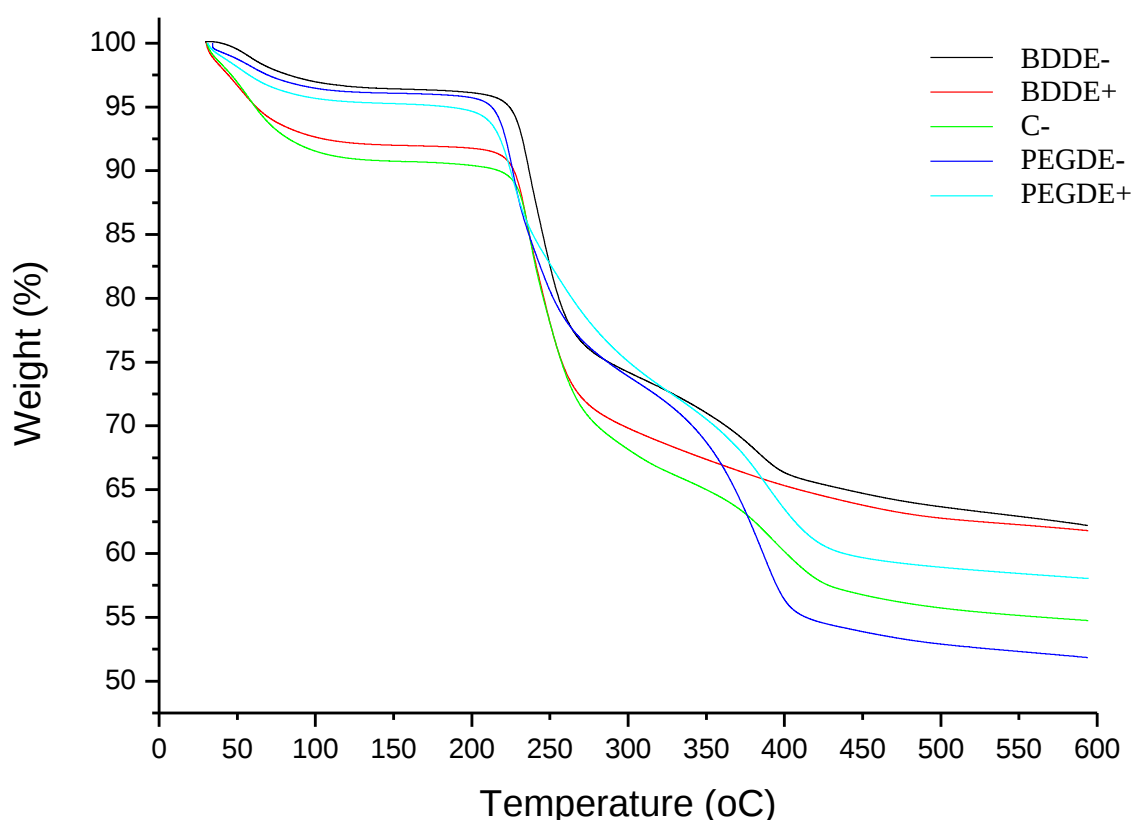
Tanto nas formulações de AH reticulados com BDDE como nas reticuladas com PEGDGE, a faixa entre 1300 a 1400 cm^{-1} pode ser atribuída ao alongamento de COO^- que se refere ao grupo ácido da molécula de AH. O padrão espectral de cada molécula não se altera, podendo então confirmar a sua composição química. Bandas entre 1030 cm^{-1} correspondem as vibrações de estiramento de $\text{C}=\text{O}$ nos álcoois, o ombro entre 1160 cm^{-1} é atribuído ao $\text{C}=\text{O}=\text{V}_c$ antissimétrico em grupos glicosídicos. Bandas em torno de 500 cm^{-1} podem ser atribuídas as moléculas de H_2O , são encontradas em todas as formulações, porém com mais intensidade na formulação de AH reticulado com PEGDGE+.

2 – Termogravimetria (TG) e Calorimetria Diferencial Exploratória (DSC)

As curvas de TG e DSC avaliam o comportamento da massa em função da temperatura. Na curva termogravimétrica (**figura 3**), é possível observar três eventos relacionados a temperatura que se refere a decomposição da amostra, o primeiro ocorre entre 50° e 120°C e está diretamente relacionado a perda de água, até 100° C comum em todos os géis e com maior

perda no gel do grupo controle. A segunda decomposição está relacionada a degradação das estruturas sacarídeas. Houve ainda uma estabilização da massa entre 120° e 200° C, onde a amostra do PEGDE+ apresentou a menor perda de massa entre as demais amostras nessa faixa de temperatura. Entre 250° a 410°C ocorre o terceiro evento de decomposição, dessa vez relacionada a estrutura orgânica de todas as amostras, concordando com os dados encontrados por YANG et al. 2019.(Kim et al., 2007)

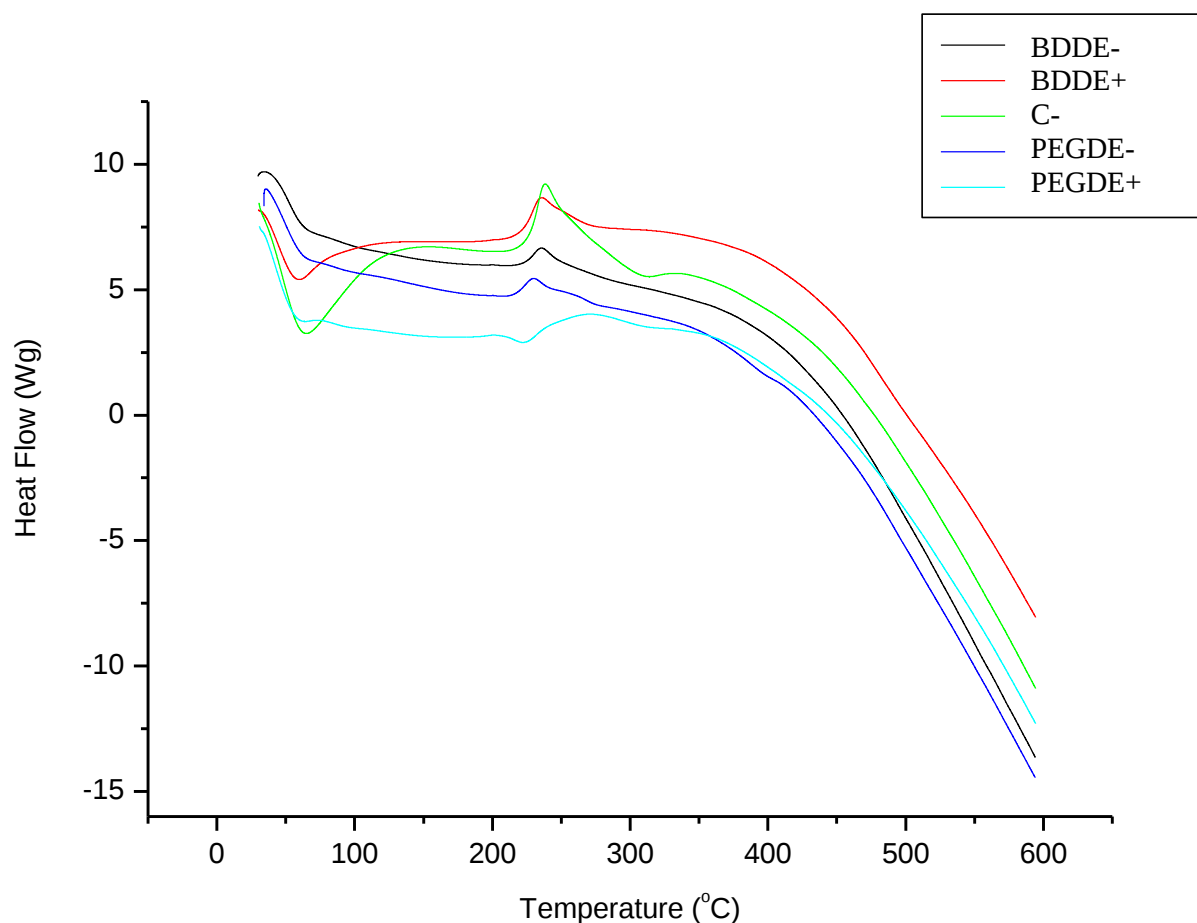
Figura 3 - Gráfico de termogravimetria dos géis de AH



Os dados apresentados do gráfico de DSC (**figura 4**), são relacionados ao fluxo de calor, tornando mais visíveis picos ascendentes, que nas amostras testadas variam entre 50° e 100°C, referentes aos eventos endotérmicos de perda de massa, redução, vaporização da água e a partir

de 250°C picos descendentes referentes aos eventos exotérmicos onde ocorre perda de componentes voláteis, cristalização, oxidação, degradação oxidativa e adsorção.

Figura 4 - Gráfico de calorimetria diferencial exploratória dos géis de AH

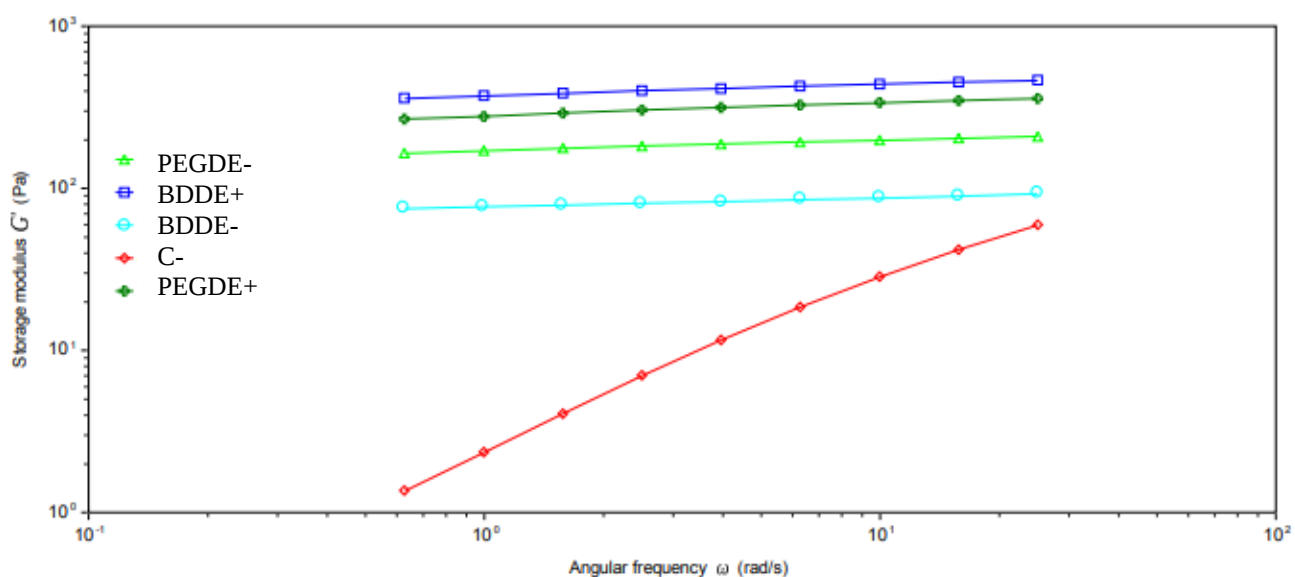


Muto et al 2014, define que existem três tipos de água ligadas à estrutura do polímero: a água livre que não participa das ligações, água intermediária que tem interações fracas e água ligada, que possui interações mais fortes e necessita de mais energia para o seu desligamento.(Muto et al., 2014) O AH possui grupos hidrofílicos de hidroxila e carboxila, o agente reticulador ocupa esses sítios e onde possuir ainda sítios livres a água vai competir pra formar ligações, justificando a necessidade de maior energia para decomposição das amostras reticuladas.

3- Reologia

O estudo do comportamento reológico das amostras permite a caracterização mecânica apresentada pelas formulações poliméricas. Nesta análise, os géis reticulados com BDDE + e PEGDE +, apresentaram módulo de força (G') maiores que os demais géis, sugerindo que a reticulação dessas amostras foram mais efetivas que as demais. O gel de PEGDE- apresentou diferença significativa no G' quando comparado ao gel de BDDE-, inferindo que os géis com menor alíquota do reticulador PEGDE, possui efetividade de reticulação superior ao BDDE.

Figura 4 – Gráfico da análise reológica das amostras.



Os resultados do nível de força necessária para desestruturação das amostras visto na análise reológica, podem ser comparados aos resultados apresentados neste trabalho através das análises de FTIR E TG/DSC, onde o gel reticulado com BDDE+ apresentou o maior nível de eficiência na reticulação. Fica evidente portanto que análises propostas, podem ser utilizadas como parâmetro indireto para determinação da efetividade da reticulação dos géis de AH.

CONCLUSÃO

A partir das análises realizadas podemos concluir que o gel de maior taxa de reticulação com BDDE, possuiu uma efetividade maior de reticulação com uma menor alíquota de reticulante quando comparado aos demais géis. O agente reticulador foi um fator de modificação nas propriedades físico-químicas e mecânicas dos géis. Os testes descritos neste estudo, podem ser utilizados para identificar e caracterizar as propriedades de géis de ácido hialurônico.

REFERENCIAS

- Al-Sibani M, Al-Harrasi A, Neubert RHH. Effect of hyaluronic acid initial concentration on cross-linking efficiency of hyaluronic acid - Based hydrogels used in biomedical and cosmetic applications. *Pharmazie* 2017;72:81–6. <https://doi.org/10.1691/ph.2017.6133>.
- De Boulle K, Glogau R, Kono T, Nathan M, Tezel A, Roca-Martinez JX, et al. A review of the metabolism of 1,4-butanediol diglycidyl ether-crosslinked hyaluronic acid dermal fillers. *Dermatologic Surg* 2013;39:1758–66. <https://doi.org/10.1111/dsu.12301>.
- Calles JA, Tártara LI, Lopez-García A, Diebold Y, Palma SD, Vallés EM. Novel bioadhesive hyaluronan-itaconic acid crosslinked films for ocular therapy. *Int J Pharm* 2013;455:48–56. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2013.07.063>.
- Cavallini M, Antonioli B, Gazzola R, Tosca M, Galuzzi M, Rapisarda V, et al. Hyaluronidases for treating complications by hyaluronic acid dermal fillers: Evaluation of the effects on cell cultures and human skin. *Eur J Plast Surg* 2013;36:477–84. <https://doi.org/10.1007/s00238-013-0855-y>.
- Collins MN, Birkinshaw C. Physical properties of crosslinked hyaluronic acid hydrogels. *J Mater Sci Mater Med* 2008;19:3335–43. <https://doi.org/10.1007/s10856-008-3476-4>.
- Fallacara A, Baldini E, Manfredini S, Vertuani S. Hyaluronic acid in the third millennium. *Polymers (Basel)* 2018;10. <https://doi.org/10.3390/polym10070701>.
- 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;96:536–44. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.04.022>.
- Huynh A, Priefer R. Hyaluronic acid applications in ophthalmology, rheumatology, and dermatology. *Carbohydr Res* 2020;489:107950. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2020.107950>.
- Kang JY, Chung CW, Sung JH, Park BS, Choi JY, Lee SJ, et al. Novel porous matrix of hyaluronic acid for the three-dimensional culture of chondrocytes. *Int J Pharm* 2009;369:114–20. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2008.11.008>.
- Kim JK, Lee JS, Jung HJ, Cho JH, Heo JI, Chang YH. Preparation and properties of collagen/modified hyaluronic acid hydrogel for biomedical application. *J Nanosci Nanotechnol* 2007;7:3852–6. <https://doi.org/10.1166/jnn.2007.047>.
- Muto J, Morioka Y, Yamasaki K, Kim M, Garcia A, Carlin AF, et al. Hyaluronan digestion controls DC migration from the skin. *J Clin Invest* 2014;124:1309–19. <https://doi.org/10.1172/JCI67947>.
- Nishi C, Nakajima N, Ikada Y. In vitro evaluation of cytotoxicity of diepoxy compounds used for biomaterial modification. *J Biomed Mater Res* 1995;29:829–34. <https://doi.org/10.1002/jbm.820290707>.
- Nobuhiko Y, Teruo O, Yasuhisa S. Inflammation responsive degradation of crosslinked hyaluronic acid gels. *J Control Release* 1992;22:105–16. [https://doi.org/10.1016/0168-3659\(92\)90195-W](https://doi.org/10.1016/0168-3659(92)90195-W).

Robert L, Robert AM, Renard G. Effets biologiques de l'hyaluronane dans les tissus conjonctifs, l'œil, la peau, la paroi veineuse. Rôle dans le vieillissement. *Pathol Biol* 2010;58:187–98. <https://doi.org/10.1016/j.patbio.2009.09.010>.

Romagnoli M, Belmontesi M. Hyaluronic acid-based fillers: theory and practice. *Clin Dermatol* 2008;26:123–59. <https://doi.org/10.1016/j.clindermatol.2007.09.001>.

Schanté CE, Zuber G, Herlin C, Vandamme TF. Chemical modifications of hyaluronic acid for the synthesis of derivatives for a broad range of biomedical applications. *Carbohydr Polym* 2011;85:469–89. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.03.019>.

Sudha PN, Rose MH. Beneficial effects of hyaluronic acid. vol. 72. Elsevier Inc.; 2014. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800269-8.00009-9>.

Tavsanli B, Okay O. Preparation and fracture process of high strength hyaluronic acid hydrogels cross-linked by ethylene glycol diglycidyl ether. *React Funct Polym* 2016;109:42–51. <https://doi.org/10.1016/j.reactfunctpolym.2016.10.001>.

Tomihata K, Ikada Y. Crosslinking of hyaluronic acid with water-soluble carbodiimide. *J Biomed Mater Res* 1997a;37:243–51. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4636\(199711\)37:2<243::AID-JBM14>3.0.CO;2-F](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4636(199711)37:2<243::AID-JBM14>3.0.CO;2-F).

Tomihata K, Ikada Y. Preparation of cross-linked hyaluronic acid films of low water content. *Biomaterials* 1997b;18:189–95. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(96\)00116-0](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(96)00116-0).

Wende FJ, Gohil S, Nord LI, Helander Kenne A, Sandström C. 1D NMR methods for determination of degree of cross-linking and BDDE substitution positions in HA hydrogels. *Carbohydr Polym* 2017;157:1525–30. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.11.029>.

Wu S, Deng L, Hsia H, Xu K, He Y, Huang Q, et al. Evaluation of gelatin-hyaluronic acid composite hydrogels for accelerating wound healing. *J Biomater Appl* 2017;31:1380–90. <https://doi.org/10.1177/0885328217702526>.

Zhuo F, Abourehab MAS, Hussain Z. Hyaluronic acid decorated tacrolimus-loaded nanoparticles: Efficient approach to maximize dermal targeting and anti-dermatitis efficacy. *Carbohydr Polym* 2018;197:478–89. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.06.023>.

4 CONCLUSÃO

A concentração e o tipo do agente reticulador interfere no grau de intumescimento e nas características morfológicas do gel de ácido hialurônico. Os Géis com maiores níveis de reticulação obtiveram menores taxas de intumescimento quando comparados aos géis com menores níveis de reticulação. O gel de maior nível do reticulante BDDE, obteve maior efetividade de reticulação com uma menor alíquota de reticulante quando comparado aos demais géis. O agente reticulador foi um fator de modificação nas propriedades físico-químicas e mecânicas dos géis. Os testes descritos neste estudo, podem ser utilizados para identificar e caracterizar as propriedades de géis de ácido hialurônico, sendo possíveis formulações para indicações na odontologia.

*REFERÊNCIAS

1. Narins RS, Brandt FS, Dayan SH, Hornfeldt CS. Persistence of nasolabial fold correction with a hyaluronic acid dermal filler with retreatment: results of an 18-month extension study. *Dermatologic Surg.* 2011;37(5):644–50.
2. Surgery C, Data N. Cosmetic surgery national data bank 2017.[Compilado estatístico da internet] Nova Iorque: American society for aesthetic plastic surgery; [acesso 2018 set 10]. Disponível em <https://www.surgery.org/sites/default/files/ASAPS-Stats2017.pdf>.
3. Li Z, Zhou F, Li Z, Lin S, Chen L, Liu L, et al. Hydrogel cross-linked with dynamic covalent bonding and micellization for promoting burn wound healing. *ACS Appl Mater Interfaces.* 2018;10(30):25194–202.
4. Zerbinati N, Lotti T, Monticelli D, Martina V, Cipolla G, D'Este E, et al. In vitro evaluation of the sensitivity of a hyaluronic acid PEG cross-linked to bovine testes hyaluronidase. *Open Access Maced J Med Sci.* 2018;6(1):20–4.
5. Choi HR, Kang YA, Na JI, Huh SY, Huh CH, Kim KH, et al. Oligosaccharides of hyaluronic acid increased epidermal cell stemness by modulation of integrin expression. *J Cosmet Dermatol.* 2012;11(4):290–6.
6. Hiramoto K, Kobayashi H, Yamate Y, Ishii M, Sato EF. Intercellular pathway through hyaluronic acid in UVB-induced inflammation. *Exp Dermatol.* 2012;21(12):911–4.
7. Brandt FS, Cazzaniga A. Hyaluronic acid gel fillers in the management of facial aging. *Clin Interv Aging.* 2008;3(1):153–9.
8. Tokudome Y, Komi T, Omata A, Sekita M. A new strategy for the passive skin delivery of nanoparticulate, high molecular weight hyaluronic acid prepared by a polyion complex method. *Sci Rep.* 2018;8(1):1–9.
9. Kavasi RM, Berdiaki A, Spyridaki I, Corsini E, Tsatsakis A, Tzanakakis G, et al. HA metabolism in skin homeostasis and inflammatory disease. *Food Chem Toxicol.* 2017;101:128–38.
10. Muto J, Morioka Y, Yamasaki K, Kim M, Garcia A, Carlin AF, et al. Hyaluronan digestion controls DC migration from the skin. *J Clin Invest.* 2014;124(3):1309–19.
11. Fujioka-Kobayashi M, Müller HD, Mueller A, Lussi A, Sculean A, Schmidlin PR, et al. In vitro effects of hyaluronic acid on human periodontal ligament cells. *BMC Oral Health.* 2017;17(1):1–12.

* 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-normalizacao-atualizado.pdf>

12. Leppilahti M, Hellström P, Tammela TLJ. Effect of diagnostic hydrodistension and four intravesical hyaluronic acid instillations on bladder ICAM-1 intensity and association of ICAM-1 intensity with clinical response in patients with interstitial cystitis. *Urology*. 2002;60(1):46–51.
13. Cavallini M, Antonioli B, Gazzola R, Tosca M, Galuzzi M, Rapisarda V, et al. Hyaluronidases for treating complications by hyaluronic acid dermal fillers: Evaluation of the effects on cell cultures and human skin. *Eur J Plast Surg*. 2013;36(8):477–84.
14. De Boulle K, Glogau R, Kono T, Nathan M, Tezel A, Roca-Martinez JX, et al. A review of the metabolism of 1,4-butanediol diglycidyl ether-crosslinked hyaluronic acid dermal fillers. *Dermatologic Surg*. 2013;39(12):1758–66.
15. Beniamino P, Vadalà M, Laurino C. Cross-linked hyaluronic acid in pressure ulcer prevention. *J Wound Care*. 2016;25(7):400–5.
16. Frenkel JS. The role of hyaluronan in wound healing. *Int Wound J*. 2014;11(2):159–63.
17. Bardazzi F, Ruffato A, Antonucci A, Balestri R, Tabanelli M. Cutaneous granulomatous reaction to injectable hyaluronic acid gel: Another case. *J Dermatolog Treat*. 2007;18(1):59–62.
18. Pinheiro MVB, Bagatin E, Hassun KM, Talarico S. Adverse effect of soft tissue augmentation with hyaluronic acid. *J Cosmet Dermatol*. 2005;4(3):184–6.
19. Bui P, Pons Guiraud A, Lepage C. Benefits of volumetric to facial rejuvenation. Part 2: Dermal fillers. *Ann Chir Plast Esthet*. 2017;62(5):550–9.
20. Chiang YZ, Pierone G, Al-Niaimi F. Dermal fillers: pathophysiology, prevention and treatment of complications. *J Eur Acad Dermatology Venereol*. 2017;31(3):405–13.
21. Ibrahim O, Overman J, Arndt KA, Dover JS. Filler nodules: inflammatory or infectious? A review of biofilms and their implications on clinical practice. *Dermatol Surg*. 2018;44(1):53–60.
22. Heydenrych I, Kapoor KM, Boulle K De, Goodman G, Swift A, Kumar N, et al. A 10-point plan for avoiding hyaluronic acid dermal filler-related complications during facial aesthetic procedures and algorithms for management. *Clin Cosmet Investig Dermatol*. 2018;11:603–11.
23. Mesa FL, Aneiros J, Cabrera A, Bravo M, Caballero T, Revelles F, et al. Antiproliferative effect of topic hyaluronic acid gel. Study in gingival biopsies of patients with periodontal disease. *Histol Histopathol*. 2002;17(3):747–53.

24. Yazan M, Kocyigit ID, Atil F, Tekin U, Gonen ZB, Onder ME. Effect of hyaluronic acid on the osseointegration of dental implants. *Br J Oral Maxillofac Surg*. 2019;57(1):53–7.
25. Valverde A, Pérez-Álvarez L, Ruiz-Rubio L, Pacha Olivenza MA, García Blanco MB, Díaz-Fuentes M, et al. Antibacterial hyaluronic acid/chitosan multilayers onto smooth and micropatterned titanium surfaces. *Carbohydr Polym*. 2019;207:824–33.

ANEXOS

Captura de tela do site <http://sherpa.ac.uk/romeo/index.php?la=pt> dia 02/07/2020, sobre a política de copyright do manuscritos enviados para publicação nos periódicos BioMed Research International e Brazilian Journal Pharmaceutical Sciences.

ANEXO A

02/07/2020 SHERPA/RoMEO Português - Pesquisa - Políticas de copyright e de auto-arquivo de editores



SHERPA/RoMEO . . . opening access to research

Pesquisa - Políticas de copyright e de auto-arquivo de editores

This version of Sherpa Romeo will be decommissioned on Friday 31 July 2020. Our new version is available at <https://v2.sherpa.ac.uk/romeo>.

Aviso(s):

- Não é possível pesquisar títulos de revistas e respectivos editores em Zefoc Moved Permanently

Uma revista encontrada ao pesquisar: biomed research

Revista: [BioMed Research International \[1\]](#) (ISSN: 2314-6133, ESSN: 2314-6141)

RoMEO: This is a RoMEO green journal

Listado em: [DOAJ](#) como revista de acesso aberto

Versão preprint do autor: ✓ O autor pode arquivar a versão preprint (i.e. antes do peer-review)

Versão postprint do autor: ✓ O autor pode arquivar a versão postprint (i.e. o rascunho final após o peer-review)

versão/PDF do editor: ✓ O autor pode arquivar a versão/PDF do editor

Condições gerais:

- On any website
- A versão/PDF do editor pode ser utilizada
- Creative Commons Attribution License

Mandato de Acesso Aberto: (A aguardar informação)

Notas:

- All titles are open access journals

Copyright: [Example Policy](#)

Atualizado: 08-Jan-2018 - [Supira uma actualização para este registo](#)

Ligação para esta página: <http://sherpa.ac.uk/romeo/issn/2314-6133/pt/>

Publicado por: [Hindawi - Green Policies in RoMEO](#)

Captura de tela do site <http://sherpa.ac.uk/romeo/index.php?la=pt> dia 02/07/2020, sobre a política de copyright do manuscritos enviados para publicação nos periódicos BioMed Research International e Brazilian Journal Pharmaceutical Sciences.

ANEXO B

02/07/2020

SHERPA/RoMEO Português - Pesquisa - Políticas de copyright e de auto-arquivo de editores



SHERPA/RoMEO

... opening access to
research

Pesquisa - Políticas de copyright e de auto-arquivo de editores

This version of Sherpa Romeo will be decommissioned on Friday 31 July 2020. Our new version is available at <https://v2.sherpa.ac.uk/romeo>.

Uma revista encontrada ao pesquisar: 2175-9790

Revista: [Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences](#) (ISSN: 1984-8250, ESSN: 2175-9790)

RoMEO: This is a RoMEO ungraded journal

Listado em: [DOAJ](#) como revista de acesso aberto



- As políticas desta revista não foram verificadas por RoMEO
- DOAJ diz esta é uma revista de acesso aberto, mas isso apenas significa que se encontra livremente disponível para leitura
- A maior parte das revistas de acesso aberto também permitem o auto-arquivo e a reutilização, mas algumas não
- Não assuma que o auto-arquivo é permitido, a não ser que tenha sido publicado sob uma licença [Creative Commons](#)
- Se necessário, por favor, entre em contacto com o editor para informações adicionais
- Please [contact us](#) if you wish to suggest adding this publisher properly to RoMEO

Publicado por: Universidade de São Paulo

Cores
RoMEO

Política de arquivo

[Verde](#)

Pode arquivar a versão preprint e postprint ou Versão/PDF do editor

[Azul](#)

Pode arquivar a versão postprint (i.e. o rascunho final após o peer-review) ou Versão/PDF do editor

[Amarelo](#)

Pode arquivar a versão preprint (i.e. antes do peer-review)

[Branco](#)

O arquivo não é suportado formalmente

[Mais sobre cores e restrições](#)

ou

[Ver todos os editores](#)

Utilize este sítio Web para encontrar um resumo das autorizações que são dadas, normalmente, como parte do acordo de transferência do copyright de cada editor.

Não autorizo a publicação deste trabalho pelo prazo de 2 anos após a defesa.

Direitos de publicação reservados ao autor

Araraquara, 06 de Agosto de 2020

Matheus Sousa Vitória