

Centro Federal de Educação Tecnológica de Minas Gerais



Dissertação de Mestrado

Edirlaine Soares da Silva

**DESENVOLVIMENTO DE UM COMPÓSITO DE ÁCIDO HIALURÔNICO COM  
MICROESFERAS DE FOSFATO DE CÁLCIO BIFÁSICO PARA REPARAÇÃO DE  
ESTRUTURAS ANATÔMICAS SUBDÉRMICAS**

Belo Horizonte  
Dezembro de 2012

Edirlaine Soares da Silva

**Desenvolvimento de um Compósito de Ácido Hialurônico com Microesferas de Fosfato de Cálcio Bifásico para Reparação de Estruturas Anatômicas Subdérmicas**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Materiais do CEFET-MG, na área de concentração de Ciência e Desenvolvimento de Materiais, na Linha de Pesquisa em Biomateriais, como parte integrante dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Engenharia de Materiais.

Orientador: Professor Dr. Sidney Nicodemos da Silva – CEFET-MG

Co-orientadora: Dra. Sílvia Ligório Fialho – FUNED - MG

Belo Horizonte – MG  
Dezembro / 2012

**Desenvolvimento de um Compósito de Ácido Hialurônico com Microesferas de Fosfato de Cálcio Bifásico para Reparação de Estruturas Anatômicas Subdérmicas**

Dissertação apresentada em 06 de dezembro 2012 por Edirlaine Soares da Silva, ao Curso de Mestrado em Engenharia de Materiais do Centro Federal de Educação Tecnológica de Minas Gerais – CEFET-MG, na área de concentração de Ciência e Desenvolvimento de Materiais, na Linha de Pesquisa em Biomateriais, aprovada pela banca examinadora constituída dos professores:

---

Prof. Dr. Sidney Nicodemos da Silva  
Centro Federal de Educação Tecnológica de Minas Gerais - CEFET-MG

---

Dr<sup>a</sup>. Sílvia Ligório Fialho  
Fundação Ezequiel Dias – FUNED – MG

---

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. Ivete Peixoto Pinheiro  
Centro Federal de Educação Tecnológica de Minas Gerais - CEFET-MG

Belo Horizonte, 06 de dezembro de 2012

Aos meus pais, irmãos e sobrinhos.

## **AGRADECIMENTOS**

Ao meu marido Elmo Alves, pelo incentivo, paciência, compreensão e apoio incondicional e incessante. Nada disso teria se realizado sem você.

Ao professor Dr. Sidney Nicodemos da Silva, meu orientador, pela confiança, apoio e contribuições para a realização deste trabalho e, à Dra. Sílvia Ligório Fialho, minha co-orientadora.

Aos funcionários do DEMAT, Bruno Cordeiro da Silva pelas imagens de MEV e análises DRX e Ivete Maria Aires pela prestatividade e atenção.

Ao professor Dr. Antônio Carlos Valadão e ao técnico Arnaldo Nakamura Filho da Fundação do Centro Tecnológico de Minas Gerais (CETEC) pelo auxílio para a realização das análises de reologia.

À professora Dra. Patrícia Patrício do departamento de Química do CEFET pela realização das análises de FTIR.

À professora Dra. Ivete Peixoto Pinheiro pelas contribuições.

À Rachel M. Osthues pela doação das microesferas de BCP e pela atenção.

Aos colegas Deny Gomes de Freitas, Rosemary Rezende pela prestatividade e auxílio no esclarecimento de dúvidas.

À INSIDE por doar o ácido hialurônico e disponibilizar o laboratório para realização de alguns experimentos.

Aos órgãos de fomento CAPES e FAPEMIG do Brasil.

A todos que contribuíram de forma direta e/ou indireta para a concretização deste trabalho e agregaram em meu conhecimento intelectual e pessoal.

## RESUMO

Preenchedores dérmicos são biomateriais injetáveis constituídos de uma combinação de polímeros naturais ou sintéticos, às vezes com uma segunda fase na forma de partículas para dar reforço mecânico (nestes casos microesferas ou *whiskers*). São utilizados como agentes de enchimento e/ou como estruturas tridimensionais organizando o crescimento celular e estimulando a formação de um tecido epitelial quando em contato com o tecido conjuntivo. Sua principal indicação é para tratar defeitos de contornos causados por envelhecimento, danos provocados pela exposição à luz solar, doenças e traumas. Atualmente, uma das estratégias de maior eficácia para reparação ou restabelecimento das funções de tecidos moles tem sido o desenvolvimento de preenchedores formados pela combinação de dois ou mais biomateriais neste caso, um biopolímero hidrossolúvel associado com uma biocerâmica. Assim, as partículas de fosfatos de cálcio bifásico - BCP (hidroxiapatita/betaTCP) estimulam a formação de colágeno em seu entorno, enquanto, o hidrogel carreador produz imediata correção, sendo absorvido gradualmente. O BCP se fixa no local impedindo a migração e devido sua lenta degradação proporciona uma longevidade maior do preenchedor. Neste trabalho foram processados e caracterizados compósitos de ácido hialurônico - AH e de microesferas de fosfato de cálcio bifásico - BCP com diâmetro inferior a 38  $\mu\text{m}$ . O AH e BCP na forma de pós foram caracterizados através da espectroscopia de infravermelho (FTIR), difração de raios X (DRX) e microscopia eletrônica de varredura (MEV) e o AH quanto à capacidade de absorção de água. Para avaliação do desempenho na seringa (viscosidade em condição de uso) do compósito foi analisado seu comportamento reológico, bem como sua injetabilidade. Os resultados mostraram que os géis são constituídos por mais de 80% de água. Ocorreu diminuição da viscosidade do compósito com a diminuição da massa de AH. O material apresentou comportamento não-newtoniano pseudoplástico à 25°C e 37°C e viscosidade típica de gel, com módulo elástico maior que o viscoso ( $G' > G''$ ). A extrusão foi influenciada pela concentração total de AH. O compósito apresentou melhor fluidez com a agulha de maior calibre (22G). A DRX e FTIR mostraram espectros com picos característicos de BCP e AH. Estes resultados demonstraram

que os compostos propostos neste estudo apresentam características compatíveis para serem utilizados como preenchedores dérmicos, possuindo potencial para ser um candidato para restabelecimento de tecidos moles.

Palavras chaves: Compósito, ácido hialurônico, fosfato de cálcio bifásico, preenchedor dérmico, hidrogéis.

## ABSTRACT

Dermal fillers are injectable biomaterials constituted from a combination of natural or synthetic polymers, sometimes with a second phase in particulate form to provide mechanical reinforcement (in these cases microspheres or whiskers). Used as fillers and/or three-dimensional structures organizing cell growth and stimulating the formation of an epithelial tissue when in contact with the conjunctive tissue. Its main indication is to treat contour defects caused by aging, injury from exposure to sunlight, illnesses and traumas. Currently, one of the most effective strategies for repair or restoration of soft tissue functions has been the development of fillers formed by combining two or more biomaterials this case, a water soluble biopolymer associated with a bioceramic. Thus, particles of biphasic calcium phosphates - BCP (hydroxyapatite/beta TCP) stimulate the formation of collagen in your surroundings, while the hydrogel carrier produces immediate correction gradually being absorbed. The BCP is fixed in place impeding migration due to their slow degradation and provides a greater longevity filler. In this work were processed and characterized composites of hyaluronic acid - HA and microspheres biphasic calcium phosphate - BCP diameter less than 38  $\mu\text{m}$ . The HA and BCP as powders were characterized by infrared spectroscopy fourier transform (FTIR), x-ray diffraction (XRD) and scanning electron microscopy (SEM) and HA for the ability to absorb water. To evaluate the composite was analyzed rheological behavior, as well as its injectability. The results showed that gels are comprised of more than 80% water. There was a decrease in viscosity of the composite mass reduction of HA. The material presented pseudoplastic non-Newtonian behavior at 25°C and 37°C and typical viscosity gel, with elastic modulus greater than the viscous ( $G' > G''$ ). The extrusion was influenced by the total concentration of HA. The composites showed better fluidity with large bore needle (22G). The XRD and FTIR spectra showed characteristic peaks of HA and BCP. These results demonstrate that the compounds proposed in this study have characteristics compatible for use as dermal fillers having the potential to be a candidate for restoration of soft tissue.

Keywords: Composite, hyaluronic acid, biphasic calcium phosphate, dermal filler, hydrogels.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Representação esquemática da formação de hidrogéis químicos e físicos a partir da modificação química de um polímero hidrofóbico	25
Figura 2	Exemplos de sinais de envelhecimento facial	29
Figura 3	Representação esquemática mostrando tipos de falhas dérmicas e resultados após aplicação do preenchimento	32
Figura 4	Esquema ilustrativo da profundidade de aplicação e das técnicas de injeção dos materiais de preenchimento dérmico	34
Figura 5	Paciente tratada com AH nos sulcos nasogenianos, antes (a) e depois (b)	35
Figura 6	Estrutura cristalina da hidroxiapatita no modelo de estruturas rígidas	40
Figura 7	Estrutura primária do ácido hialurônico (AH) composta por repetições de unidades dissacarídicas de ácido glucurônico e N-acetil glucosamina	43
Figura 8	Estrutura terciária do AH: estrutura de fita torcida da molécula de AH em solução, com faces hidrofílicas (azuis) e hidrofóbicas (vermelhas)	44
Figura 9	Cadeias de polímero AH sendo ligadas pelo agente de reticulação BDDE	48
Figura 10	Exemplo do grau de reticulação de um preenchedor de ácido hialurônico	49
Figura 11	Tipos de comportamentos reológicos (a) Fluido Newtoniano, (b) Fluido com comportamento Plástico, (c) Fluido com comportamento Pseudo-plástico, (d) Fluido com comportamento dilatante e (e) Curva de escoamento tixotrópico	53
Figura 12	Fluxograma das etapas de trabalho	59

Figura 13	Dispositivo de injetabilidade (a) - visão anterior do dispositivo de injetabilidade mostrando o suporte, o êmbolo oco e a seringa. (b) dispositivo de injetabilidade montado com todos os seus componentes	63
Figura 14	Micrografia dos pós de partida: (a) Imagem da partícula de BCP; (b) Superfície da partícula de BCP; (c) Imagem do AH pó.	68
Figura 15	Difratograma das microesferas de BCP	69
Figura 16a	Espectro FTIR do AH	70
Figura 16b	FTIR das microesferas de BCP	71
Figura 17	Ilustrações do compósito preparado com diferentes quantidades de massa AH - 17a – CPI; 17b- CPII; 17c – CPIII; 17d - CPIV	76
Figura 18	Compósito (AH gel/BCP partículas) pronto para uso	76
Figura 19	Separação das fases do compósito (AH gel/BCP partículas)	77
Figura 20a	Viscosidade versus taxa de cisalhamento das amostras de compósito a 25°C.	79
Figura 20b	Viscosidade versus taxa de cisalhamento das amostras de compósito a 37°C	79
Figura 21a	Espectro de oscilação da mistura compósito/fluido 80:20	82
Figura 21b	Espectro de oscilação da mistura compósito/fluido 70:30	82
Figura 22	Fórmula molecular do AH	89
Figura 23	Espectros de Infravermelho: (a) Gel de AH reticulado misturado com microesferas de BCP (b) Gel de ácido hialurônico reticulado sem BCP, (c) Teosyal Ultimate® (ácido hialurônico comercial) <i>versus</i> número de onda ( $\text{cm}^{-1}$ )	91

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Tipos de materiais de preenchimento e seus nomes comerciais	31
Tabela 2	Escalas de classificação de rugas	33
Tabela 3	Relação Ca/P das fases de apatita	41
Tabela 4	Características que influenciam o desempenho de um preenchedor dérmico de AH	50
Tabela 5	Grau de intumescimento (%) dos géis de AH reticulados até o equilíbrio	72
Tabela 6	Comportamento de intumescimento dos géis reticulados com diferentes massas de AH	73
Tabela 7	Efeito da reticulação na razão de intumescimento dos géis com diferentes massas de AH	74
Tabela 8	Parâmetros determinados nas curvas de fluxo das misturas compósito/fluido	80
Tabela 9	Injetabilidade (%) das amostras de hidrogel	84
Tabela 10	Injetabilidade (%) das amostras de compósito	84
Tabela 11	Injetabilidade (%) das misturas de compósito diluídas 70:30	85
Tabela 12	Injetabilidade (%) das misturas de compósito diluídas 80:20	85

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AH: Ácido Hialurônico – Hialuronan

ANOVA: Análise de variância

BCP: Fosfato de Cálcio Bifásico

$\beta$  – TCP: Beta fosfato tricálcico

DMSO: Dimetil Sulfóxido

DRX: Difractometria

EDS: Espectroscopia de Energia Dispersiva de Raios X

FTIR: Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier

HA: Hidroxiapatita

IV: Infravermelho

MEC: Matriz Extracelular

MEV: Microscopia Eletrônica de Varredura

NASHA: Ácido Hialurônico em gel de origem não animal

NMR: Ressonância Magnética Nuclear

PBS: Tampão de Salina Fosfatada

PCL: Policaprolactona

PGA: Ácido Poliglicólico

PLA: Ácido Polilático

PLGA: poli (L-ácido láctico-co-ácido glicólico)

PM: Peso Molecular

PMMA: Polimetilmetacrilato

SFB: Soro Fetal Bovino

TCP: Fosfato Tricálcico

## **ORGANISMOS INTERNACIONAIS**

*ASTM: American Society for Testing and Materials*

*ATCC: American Type Culture Collection*

*BSI: British Standards Institute*

*FDA: Food and Drug Administration*

*ICDD: International Center for Diffraction Data*

*ISO: International Organization for Standardization*

*NCCLS: National Committee for Clinical Laboratory Standards*

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	OBJETIVOS	18
3	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	19
3.1	BIOMATERIAIS	19
3.2	COMPÓSITOS	21
3.3	HIDROGÉIS	23
3.4	PREENCHEDORES	28
3.4.1	PREENCHEDOR DE HIDROXIAPATITA	37
3.5	FOSFATO DE CÁLCIO	38
3.6	ÁCIDO HIALURÔNICO	43
3.7	REOLOGIA	51
4	PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	59
4.1	MATERIAIS	59
4.2	METODOLOGIA	60
4.2.1	CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DAS MATÉRIAS-PRIMAS	60
4.2.1.1	MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA - MEV	60
4.2.1.2	DIFRATOMETRIA - DRX	61
4.2.1.3	ESPECTROSCOPIA DE I.V. COM TRANSF. DE FOURIER - FTIR	61
4.2.1.4	GRAU DE INTUMESCIMENTO	61
4.2.2	PREPARO DO COMPÓSITO	62
4.2.3	CARACTERIZAÇÃO DO COMPÓSITO	63
4.2.3.1	DETERMINAÇÃO DA VISCOSIDADE	63
4.2.3.2	INJETABILIDADE - EXTRUSÃO	64
4.2.3.3	MEDIDA DO PH DO COMPÓSITO	66
4.2.3.4	FTIR	66
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	68

5.1	CARACTERIZAÇÃO DAS MATÉRIAS-PRIMAS	68
5.1.1	MEV	68
5.1.2	DRX	69
5.1.3	FTIR	69
5.1.4	GRAU DE INTUMESCIMENTO	71
5.2	CARACTERIZAÇÃO DO COMPÓSITO	75
5.2.1	CARACTERÍSTICAS FÍSICAS DO COMPÓSITO	75
5.2.2	DETERMINAÇÃO DA VISCOSIDADE – REOLOGIA	78
5.2.3	INJETABILIDADE - EXTRUSÃO	83
5.2.4	MEDIDA DO PH DO COMPÓSITO	87
5.2.5	FTIR	88
6	CONCLUSÃO	92
7	RECOMENDAÇÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	94
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	95
	ANEXO	102

## 1 INTRODUÇÃO

Desde os primórdios, a humanidade tem se preocupado com sua aparência, relacionando aspectos físicos com o emocional e motivacional. No decorrer dos tempos, inúmeros foram os padrões de beleza almejados, por vezes ligados a fatores étnicos ou geográficos, pressões sociais (modismos ou apelos socioeconômicos), estilos de vida, entre outros. Entretanto, com o tempo, com a exposição solar, hábitos alimentares, padrões genéticos e outros fatores, a pele começa a perder sua aparência jovem, especialmente na face (JACOVELLA, 2008).

Os sinais estéticos de envelhecimentos faciais mais comuns incluem visibilidade de marcos ósseos, rugas na pele, sulcos profundos, proeminência de dobras nasolabial, rugas periorais, ptose de comissuras orais e desbaste dos lábios. Estas alterações surgem a partir da perda de tecido subcutâneo associado com afinamento da derme (JACOVELLA, 2008).

Em função disso muitas técnicas foram concebidas para rejuvenescer o rosto. A cirurgia de rejuvenescimento convencional provavelmente continua sendo o tratamento de escolha para pacientes que necessitam de extensas alterações estéticas faciais. No entanto, preenchedores dérmicos, cada vez mais tem se tornado uma opção extremamente atrativa para melhorar alguns sinais de envelhecimento em pacientes que não estão procurando mudanças notáveis na especificidade física, mas querem parecer mais descansados. Nestes casos, os preenchedores parecem oferecer resultados em *real-time* (JACOVELLA, 2008).

Existem numerosos materiais para preenchimento, utilizados na prática clínica com finalidade cosmética e médica, aprovados pelos órgãos normativos americanos e europeus. O uso destes produtos tem sua principal aplicação em dermatologia como tratamento temporário não cirúrgico para o rejuvenescimento facial e correção de defeitos de tecidos moles associados ao envelhecimento. Seu emprego em indicações médicas, como a lipoatrofia facial, tratamento de cicatrizes, perfilamento do queixo em pacientes com implantes, tratamento do lóbulo auricular e rejuvenescimento das mãos é menos freqüente (CARPINTERO; CANDELAS; RODRIGUEZ, 2010; JACOVELLA, 2008; JONES, 2008).

Preenchedores dérmicos são implantes injetáveis constituídos de materiais biológicos (colágeno, gordura autóloga, ácido hialurônico animal) ou sintéticos (polimetilmetacrilato (PMMA), micropartículas de hidroxiapatita, ácido hialurônico não animal), biodegradáveis ou não, que incluem como características ideais biocompatibilidade, longevidade, perfil não migratório e capacidade de promover uma correção harmoniosa com aspecto natural. Em termos de durabilidade de resultados, podem ser classificados da seguinte forma: curta duração (até 6 meses); longa duração ou semi-permanentes (até 3 anos); e permanente (mais que 3 anos) (CARPINTERO; CANDELAS; RODRIGUEZ, 2010; JACOVELLA, 2008; JONES, 2008).

Cada produto tem perfil próprio em termos de eventos adversos, técnica de injeção e aplicações que devem ser considerados pelo paciente e médico no planejamento do tratamento (JACOVELLA, 2008).

Nos últimos anos, uma nova estratégia de maior eficácia tem sido o desenvolvimento de *scaffolds* injetáveis formados pela combinação de dois ou mais biomateriais na forma de um compósito com comportamento reológico controlado, integrados com fatores de crescimento e células-tronco buscando o restabelecimento das funções teciduais. As biocerâmicas associadas a polímeros hidrossolúveis têm sido desenvolvidas como substitutos para reparação de tecidos moles com ótima resposta biológica. Compósitos formados pela associação de partículas de hidroxiapatita (HA) com polímeros para preenchimento dérmico apresentam vantagens únicas sobre seus componentes individualizados, pois combinam a osteocondutividade da HA com a facilidade de processamento dos polímeros para produzir materiais completamente degradáveis otimizando a resposta biológica reparadora (REDBORD; BUSSO; HANKE, 2011; JACOVELLA, 2008).

As partículas de hidroxiapatita funcionam como suporte destes *scaffolds* injetáveis para a formação de um novo tecido e estimulam a formação de colágeno em seu entorno, enquanto, o hidrogel carreador produz imediata correção, sendo posteriormente absorvido. As partículas de hidroxiapatita são biofixadas no local inibindo a migração e sua lenta degradação proporciona uma longevidade maior da biofuncionalidade do implante (REDBORD; BUSSO; HANKE, 2011; JACOVELLA, 2008).

Os polímeros à base de ácido hialurônico têm despertado grande interesse no desenvolvimento de materiais para preenchimento dérmico por suas propriedades estruturais e mecânicas similares à matriz extracelular da maioria dos tecidos, por sua biocompatibilidade, biodegradabilidade e interação celular intrínseca (DRURY; MOONEY, 2003; NADERI; MATIN; BAHRAMI, 2011).

Dessa forma, as biocerâmicas associadas a polímeros hidrossolúveis estão sendo estudadas como substitutos para várias aplicações na engenharia de tecidos, regeneração e reparação de órgãos e em sistemas de liberação controlada de fármacos, uma vez que, são capazes de, ao longo do tempo, realizar uma interação auxiliar nas funções anatômicas, e estimular concomitantemente a regeneração tecidual, e finalmente serem reabsorvidas (biodegradadas) num dado tempo pós-implantação (DACULSI, 2003).

## 2 OBJETIVOS

### GERAL:

Este trabalho teve como objetivo o desenvolvimento e a caracterização de compósito biodegradável injetável de ácido hialurônico (AH) contendo microesferas de fosfato de cálcio bifásico (BCP = hidroxiapatita e  $\beta$ -TCP (beta fosfato tricálcico)) menores que 38 $\mu$ m para reparação de tecidos moles.

### ESPECÍFICOS:

Para alcance do objetivo principal, o trabalho experimental exigiu os seguintes objetivos específicos:

- Produzir um hidrogel modificado com o ácido hialurônico em diferentes concentrações utilizando reticulação física através de tratamento térmico para modificações na biodegradação e alteração do comportamento viscoelástico.
- Produzir o compósito (AH e BCP) incorporando as microesferas de BCP ao hidrogel.
- Caracterizar física e quimicamente as matérias-primas e o material produzido.
- Determinar o comportamento reológico (viscosidade e injetabilidade) do hidrogel puro e do compósito.

### 3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

#### 3.1 BIOMATERIAIS

Muitas definições para biomateriais têm sido propostas ao longo das últimas décadas. Por consenso de especialistas (Conferência de Chester/UK, 1996), ao longo deste tempo, uma das definições mais aceitas seria “materiais naturais ou sintéticos não viáveis usados para substituir partes de um sistema vivo ou funcionar em contato íntimo com os tecidos” sem gerar reações adversas (DOROZHKIN, 2010). Para Willians (1996), biomaterial é um material não vivo usado em dispositivos médicos com o objetivo de interagir com os sistemas biológicos. Contudo, em 2010, foi introduzida uma definição mais avançada:

biomaterial é uma substância projetada para assumir uma forma que, sozinho ou como parte de um sistema complexo, é utilizado para direcionar, pelo controle das interações com os sistemas vivos, o curso dos procedimentos diagnósticos e terapêuticos em humanos e animais (DOROZHKIN, 2010).

Segundo Naderi e colaboradores (2011), uma definição ampliada de biomateriais inclui substâncias que são concebidas para controlar o ambiente biológico de células e tecidos. Mais do que ser simplesmente compatível com o hospedeiro e desempenhar papel estrutural, biomateriais podem direcionar células através de sinais microambientais. De qualquer forma, biomateriais são destinados à interface com os sistemas biológicos para avaliar, tratar, aumentar ou substituir algum tecido, órgão ou função do corpo (DOROZHKIN, 2010; NADERI; MATIN; BAHRAMI, 2011).

Concatenado ao termo biomateriais a engenharia de tecidos oferece alternativas para contornar as limitações dos transplantes tradicionais que incluem falta de tecidos de doadores adequados, risco de transmissão de doenças e rejeição imunológica, através da substituição e restauração de vários tecidos e órgãos, pela entrega de células-tronco e moléculas bioativas (exemplo, proteínas como o fator de crescimento vascular endotelial -VEGF- que estimula o crescimento de novos vasos sanguíneos) em biomateriais específicos (NADERI; MATIN; BAHRAMI, 2011).

Nos últimos anos, uma das estratégias utilizadas pela engenharia de tecidos é o uso de materiais como *scaffolds*, ou “arcabouços e constructos” que servem como matriz extracelular sintética para organizar células em uma estrutura tridimensional (3D) que, na presença de estímulo, direciona o crescimento de um novo tecido. Em outras palavras, os *scaffolds* inicialmente, preenchem um espaço ocupado por tecido natural, e depois, oferecem uma condição para o tecido se regenerar. Desta forma, o sucesso do *scaffold* dependerá das propriedades físicas do material selecionado (DRURY; MOONEY, 2003). Provou-se que *scaffolds* 3D podem melhorar a diferenciação condrogênica (formação da cartilagem), neural, hematopoiética e osteogênica. Assim, além de atuarem como veículos de entrega de biomacromoléculas durante o desenvolvimento do tecido, os biomateriais devem promover a adesão, proliferação, organização e diferenciação celular durante o tempo necessário para o restabelecimento da matriz extracelular natural (NADERI; MATIN; BAHRAMI, 2011).

O sucesso da organização e desenvolvimento dos tecidos está sujeito às propriedades dos *scaffolds*, sintéticos ou naturais consideradas sobre diferentes aspectos, compreendendo a taxa de degradação do material, resíduos, estrutura química da superfície capaz de reconhecer células, entrega de moléculas bioativas, a unidade mecânica e capacidade para promover vias de transdução de sinal (NADERI; MATIN; BAHRAMI, 2011).

Dependendo do tecido de interesse e da aplicação, o material e suas propriedades serão completamente diferentes. A seleção do material para cada aplicação específica deve considerar diversas variáveis, abrangendo propriedades físicas (mecânica, formação do gel, degradação), de transporte de massa (difusão) e biológicas (adesão celular e sinalização) (KRETLOW *et al*, 2009).

Qualquer biomaterial injetável deve ter propriedades mecânicas compatíveis com o tecido e a localização do implante. Um sistema ideal deverá degradar de maneira tal que a taxa de degradação seja proporcional ao crescimento e diferenciação do tecido com ou sem o *scaffold* (DRURY; MOONEY, 2003; KRETLOW *et al*, 2009). Portanto, uma variedade de hidrogéis, sistemas poliméricos de origem sintética (interessantes por suas propriedades químicas reproduzíveis e controláveis) ou natural (vantagem por serem bioativos e biocompatíveis), altamente hidratados

(concentração de água  $\geq 30\%$  do peso) e degradáveis têm sido empregados como *scaffolds* injetáveis por terem propriedades estruturais e mecânicas similares à matriz extracelular da maioria dos tecidos. Os naturais incluem colágeno, ácido hialurônico, fibrinogênio e glicosaminoglicanas. Entre os sintéticos estão o ácido poliglicólico (PGA), ácido polilático (PLA), copolímero poli (ácido láctico-co-ácido glicólico) (PLGA) e outros (DRURY; MOONEY, 2003; NADERI; MATIN; BAHRAMI, 2011).

Uma matriz formadora de gel injetável oferece muitas vantagens sobre os *scaffolds* pré-formados, tais como: habilidade para preencher o defeito assumindo a forma desejada (agentes de preenchimento), permite fácil incorporação de vários agentes terapêuticos, não contém solventes residuais que podem estar presentes nos *scaffolds* pré-formados e não requer procedimento cirúrgico para colocação. A combinação destas vantagens contribui para diminuir a morbidade dos pacientes e os efeitos estéticos negativos (GUTOWSKA; JEONG; JASIONOWSKI, 2001; KRETLOW *et al*, 2009; NADERI; MATIN; BAHRAMI, 2011).

### 3.2 COMPÓSITOS

“A importância relativa dos quatro materiais básicos (metais, polímeros, cerâmicos e compósitos) em um contexto histórico foi discutida por Ashby (Ashby, 1987), quando se notou um crescimento da importância clínica dos materiais poliméricos, cerâmicos e compósitos e uma diminuição no uso de metais” (CUPERTINO, 2009). No entanto, historicamente estima-se que há 5000 a.C, os materiais mais utilizados para procedimentos ou intervenções médicas eram polímeros e cerâmicas obtidos diretamente da natureza, como madeira, marfim, peles e fibras naturais, sendo que durante muitos séculos estes foram os materiais disponíveis para estas aplicações. Por volta do século XIX, houve uma grande expansão do uso de metais nobres, sobretudo com o desenvolvimento das ligas metálicas e novos materiais mais resistentes. A partir da década de 1950, surgiram as indústrias de compósitos devido à maior importância destes materiais no mercado mundial com o desenvolvimento dos polímeros reforçados com fibras (CUPERTINO, 2009).

O emprego de fibras contínuas ou descontínuas (whiskers), ou mesmo de uma segunda fase de maior resistência para enrijecer e/ou elevar as propriedades mecânicas de uma matriz de um material de menor custo é uma prática antiga. Há pelo menos 5000 anos, o homem vem utilizando palha, crina de cavalo e também diversos outros materiais para reforçar tijolos de barro e utensílios domésticos de cerâmicas, melhorando suas propriedades mecânicas (tenacidade à fratura, módulo de elasticidade, resistência máxima, etc.). Materiais compósitos largamente demandados atualmente como o papel e o concreto, eram utilizados pelos romanos e povos antigos. Quase todos os materiais naturais estruturais são compósitos, como a madeira, os ossos e músculos (CUPERTINO, 2009).

Em contraste com um material que ocorre ou se forma naturalmente, o termo “material compósito” surgiu para designar uma nova classe muito promissora de materiais de engenharia em meados do século XX (CUPERTINO, 2009; CALISTER JUNIOR, 2002). Sendo assim, compósito significa: “formado por duas ou mais partes distintas”. No presente contexto, compósito é o termo empregado para designar a *associação artificial* de dois ou mais materiais (metais, cerâmicas e polímeros) com propriedades físico-químicas diferentes e não miscíveis, em várias combinações adequadamente arranjadas ou distribuídas e com uma interface separando-as, com o objetivo de atingir um conjunto de propriedades que não é exibido por qualquer material isolado, como também incorporar as melhores características de cada um dos componentes (rigidez, tenacidade, densidade, resistência às condições do ambiente e à temperatura elevada). Exemplos de compósitos: ligas metálicas, cerâmicas, polímeros multifásicos (SHISHATSKAYA; KHLUSOV; VOLOVA, 2006; CALISTER JUNIOR, 2002; CUPERTINO, 2009).

Os materiais compósitos podem ser produzidos a partir de dois elementos, um material base, chamado matriz, e um reforço ou carga, disperso no primeiro.

- **Fase Matricial:** contínua e envolve a outra. Confere estrutura ao material compósito, estando presente como material principal, porém com espaços vazios em sua estrutura que são preenchidos com materiais de reforço.

- **Fase dispersa:** reforços dispersos na fase matricial. Responsáveis em realçar as propriedades mecânicas, eletromagnéticas ou químicas do material compósito como um todo (CALISTER JUNIOR, 2002).

Geralmente, o propósito da matriz é proteger o reforço do ambiente externo e o reforço, proporciona rigidez e resistência ao material (CUPERTINO, 2009).

Os compósitos mais utilizados possuem matrizes poliméricas e reforços fibrosos. O uso de polímeros como matriz se deve, principalmente, à sua facilidade de manipulação (CUPERTINO, 2009).

“As propriedades dos compósitos são função das propriedades das fases constituintes, de suas quantidades relativas e da geometria da fase dispersa” (CALISTER JUNIOR, 2002). Assim sendo, há vários tipos de classificação para estes materiais. A taxonomia os define em termos do tipo de matriz e da morfologia de seus agentes de reforço. Quanto ao tipo de matriz podem ser poliméricos, metálicos ou cerâmicos. Quanto ao reforço, particulados (partículas grandes ou dispersas), fibrosos (fibras longas ou curtas) ou estruturais (laminados). E ainda, denominados como nanocompósitos quando são utilizadas nanopartículas como reforço (CUPERTINO, 2009; CALISTER JUNIOR, 2002).

A grande versatilidade de fabricação e manipulação e a capacidade mecânica em aplicações estruturais, leva os compósitos às mais diferentes aplicações de engenharia, incluindo equipamentos esportivos (como tacos de golfe, raquetes, esquis), armamentos (armas mais leves, mísseis, foguetes), proteção balística e blindagens e no setor petroquímico (estruturas tubulares para transporte de fluidos a altas pressões e temperatura) (CUPERTINO, 2009).

### **3.3 HIDROGÉIS**

Os hidrogéis representam uma classe de materiais poliméricos que podem inchar retendo grande quantidade de água em seu interior sem se dissolverem. Uma vez inchados, suas propriedades são influenciadas pelo teor de água em seu interior que pode exceder em até 100% o seu volume, devido à compatibilidade termodinâmica com a água, que permite seu aumento de volume em meio aquoso (HOFFMAN, 2002; PEPPAS, 2000).

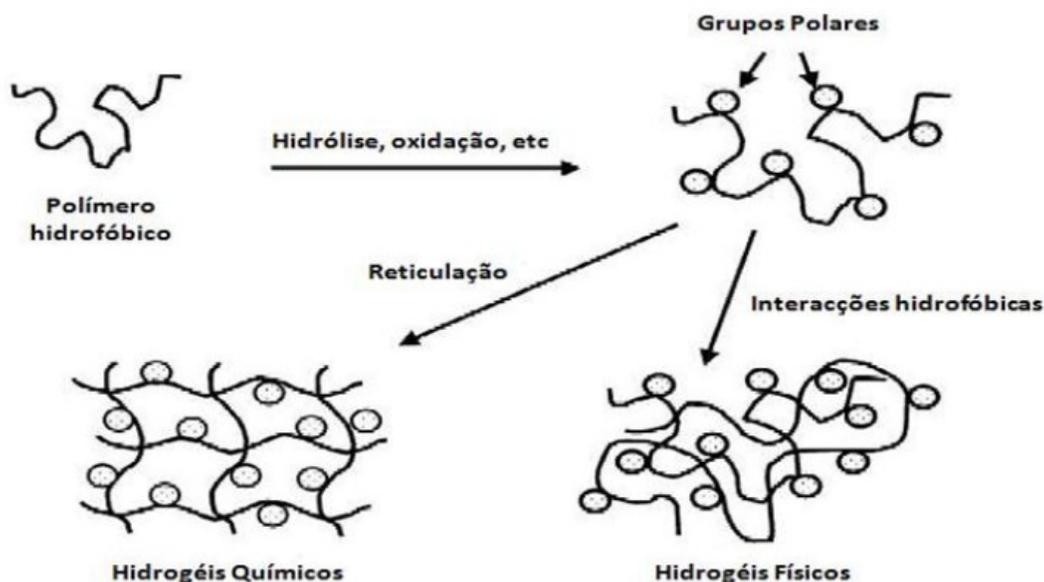
Segundo Peppas (2000), hidrogéis podem ser definidos como sistemas de redes tridimensionais de polímeros hidrofílicos capazes de absorver grandes quantidades de água ou fluidos biológicos. A capacidade absorviva de um hidrogel é atribuída à presença de grupos  $-OH$ ,  $-CONH$ ,  $-CONH_2$  e  $-SO_3H$  na estrutura dos polímeros que o formam e do nível de reticulação (HOFFMAN, 2002).

As redes são compostas de homopolímeros ou copolímeros e são insolúveis devido à presença das ligações químicas cruzadas ou reticulações físicas, sendo que estas últimas promovem a integridade física da estrutura de rede (HOFFMAN, 2002; PEPPAS, 2000). A reticulação entre as cadeias poliméricas que formam os hidrogéis podem ser de duas categorias: ligações físicas ou forças de interação secundárias (forças eletrostáticas, ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas) e ligações químicas (covalentes). Os hidrogéis podem ser quimicamente estáveis ou podem se degradar e eventualmente desintegrar e dissolver (HOFFMAN, 2002). Estes são chamados “reversíveis” ou “físicos” quando a rede é mantida unida por entrelaçamento molecular e/ou forças de interação secundárias ou podem ser considerados géis “permanentes” ou “químicos” quando formam redes reticuladas covalentemente. A figura 1 ilustra a formação de um hidrogel físico e químico a partir da modificação química de um polímero hidrofóbico (HOFFMAN, 2002).

Embora apresentem forma definida, os hidrogéis não têm uma complexidade estrutural e diversidade funcional natural. Podem exibir partículas de dimensões micro ou nanométricas (microgel, nanogel) (HOFFMAN, 2002).

A capacidade de inchamento dos hidrogéis é afetada principalmente pela proporção de ligações cruzadas. Esta é definida pela razão entre a quantidade de agente reticulante e a quantidade de unidades de repetição polimérica. Quanto mais agente reticulante é incorporado na estrutura do hidrogel, maior a proporção de reticulação, tornando a estrutura mais rígida (PEPPAS, 2000). A reticulação dificulta a mobilidade da cadeia polimérica e, conseqüentemente, a capacidade de inchamento ficará reduzida quando comparada com os mesmos hidrogéis com menor índice de ligações cruzadas (PEPPAS, 2000).

Figura 1 – Representação esquemática da formação de hidrogéis químicos e físicos a partir da modificação química de um polímero hidrofóbico.



(HOFFMAN, 2002)

É possível alcançar a propriedade mecânica desejada para um hidrogel modificando seu grau de reticulação. Para obter um hidrogel mais firme, aumenta-se o grau de reticulação, entretanto, cria-se uma estrutura mais frágil. Deste modo, existe um grau ótimo de reticulação para alcançar um hidrogel relativamente forte e elástico (PEPPAS, 2000).

A estrutura química do polímero também pode afetar o grau de intumescimento dos hidrogéis. Sendo assim, hidrogéis com grupos hidrofílicos incham mais que aqueles contendo grupos hidrofóbicos devido ao colapso que estes grupos sofrem na presença da água, diminuindo sua exposição (PEPPAS, 2000).

O comportamento de inchamento dos hidrogéis também pode ser dependente do ambiente externo. Hidrogéis com este comportamento são sensíveis ao meio fisiológico, onde polímeros complexos podem ser quebrados ou a rede pode inchar em resposta à mudança do ambiente externo. Os fatores que afetam o inchaço de

hidrogéis fisiologicamente responsivos incluem presença de íons, pH, radiação, temperatura e força eletromagnética (PEPPAS, 2000).

O intumescimento dos hidrogéis pode seguir a cinética de difusão controlada (Fickiana) e relaxação controlada (não-Fickiana). A situação ideal é o transporte Fickiano que ocorre normalmente em polímeros nos quais a cadeia polimérica possui mobilidade suficiente para a penetração da água. Quando a passagem da água para o hidrogel ocorre muito mais rapidamente que o relaxamento das cadeias do polímero, a cinética do inchaço é controlada por difusão (PEPPAS, 2000).

No estado reticulado, hidrogéis alcançam em meio aquoso o equilíbrio de intumescimento que depende principalmente da densidade de reticulação. Este equilíbrio é atingido quando a força de intumescimento é igualada à força de retração induzida pelas ligações cruzadas da rede (PEPPAS, 2000). Este processo ocorre da seguinte forma: quando um hidrogel seco inicia o seu processo de absorção de água, as primeiras moléculas absorvidas irão hidratar as moléculas mais polares da estrutura polimérica, resultando em um primeiro tipo de ligação da água com as moléculas do polímero, chamadas de “águas ligadas”. À medida que estes grupos vão sendo hidratados, ocorre o aumento físico da estrutura polimérica, expondo as moléculas mais hidrofóbicas. Estas interagem com a água, provocando o aparecimento de um segundo tipo de ligação das moléculas de água com os componentes mais hidrofóbicos do polímero. Além destes dois métodos de retenção de água, ocorre também absorção de água por difusão osmótica. As forças físicas e covalentes que mantêm a estrutura do hidrogel se opõem a todo este processo lhe conferindo capacidade elástica. Quando as duas forças se igualam, o processo de intumescimento pára e o conteúdo de água no equilíbrio (“água total”) é alcançado (HOFFMAN, 2002).

Os hidrogéis físicos e químicos não são homogêneos. Eles, usualmente, contêm regiões de pouca absorção de água e alta densidade de reticulação, chamadas “clusters” que estão dispersas dentro de regiões de alto intumescimento e baixa densidade de reticulação. Isto pode ser devido à agregação hidrofóbica pelos agentes reticulantes (HOFFMAN, 2002).

Os parâmetros mais importantes utilizados para caracterizar a estrutura de rede de hidrogéis são: a fração em volume do polímero no estado inchado, o peso molecular

da cadeia polimérica entre dois pontos de reticulação vizinhos e os tamanhos de malha correspondentes. A fração em volume do polímero no estado inchado é uma medida da quantidade de fluido absorvido e retido pelo hidrogel. O peso molecular entre duas ligações cruzadas consecutivas é uma medida do grau de reticulação do polímero. Estes parâmetros estão relacionados entre si e podem ser determinados teoricamente ou através de técnicas experimentais (PEPPAS, 2000).

Hidrogéis, de acordo com a natureza dos grupos laterais, podem ser classificados como neutros ou iônicos e pelas características estruturais e mecânicas, como redes “imaginárias”. Podem ser homopolímeros ou redes de copolímeros com base no método de preparação. Conforme a estrutura física das redes, como amorfos, semicristalinos, estruturas ligadas por pontes de hidrogênio, estruturas supramoleculares e agregados hidrocoloidais (PEPPAS, 2000).

Os hidrogéis podem apresentar várias estruturas macromoleculares diferentes, abrangendo: redes entrelaçadas ou reticuladas de homopolímeros lineares, copolímeros lineares e copolímeros em bloco, redes hidrofílicas estabilizadas por domínios hidrofóbicos e outras. Como também diferentes formas físicas, incluindo: formas sólidas modeladas (lentes de contato), micropartículas (carreadores microadesivos ou curativos), revestimentos (cateteres, implantes), membranas (reservatório de drogas num adesivo transdermal) e líquidos (géis) (HOFFMAN, 2002).

Hidrogéis baseados em polímeros naturais ou sintéticos têm sido utilizados como biomateriais em diversas aplicações nas áreas médica e farmacêutica para engenharia de tecidos, regeneração e reparação de órgãos e em sistemas de liberação controlada de drogas, devido a sua elevada hidrofiliabilidade, biocompatibilidade e facilidade de produção (JHA *et al*, 2010; HOFFMAN, 2002; LI; RODRIGUES; TOMÁS, 2011). Estes hidrogéis são utilizados como agentes de enchimento, veículos de entrega de moléculas bioativas, estruturas tridimensionais que organizam o crescimento celular e estímulos para dirigir a formação de um tecido desejado. Os agentes de enchimento de espaço são o grupo de *scaffolds* mais simples e são usados para dar volume, como também na prevenção de aderência e como “cola” biológica. Os *scaffolds* de hidrogéis quando associados às células de transplantes são aplicados para engendrar todos os tecidos do corpo,

incluindo cartilagem, osso e músculo liso (DRURY; MOONEY, 2003). Materiais sintéticos incluem óxido de polietileno (PEO), álcool polivinílico (PVA), ácido poliacrílico (PAA), poliésteres, polipeptídeos e outros. Enquanto, polissacarídeos, como o hialuronato, condroitina, quitosana, alginato e agarose e proteínas como fibropina, fibrina e colágeno, são exemplos de polímeros naturais (BALAKRISHNAN; BANERJEE, 2011; LI; RODRIGUES; TOMÁS, 2011).

Apesar de hidrogéis derivados de biopolímeros apresentarem notáveis vantagens sobre os sintéticos como biocompatibilidade, biodegradabilidade, sinalização biológica e adesão celular, falta para estes géis algumas propriedades específicas como porosidade e resistência mecânica para a concepção exógena da matriz extracelular. Por outro lado, os polímeros sintéticos podem ser processados de forma a controlar e manipular a macroestrutura, porosidade, resistência mecânica e tempo de degradação e são reprodutíveis em larga escala. A desvantagem é a falta de reconhecimento de sinais celulares. Portanto, a produção de hidrogéis híbridos tem sido amplamente explorada com propriedades melhores para aplicações biomédicas (BALAKRISHNAN; BANERJEE, 2011; LI; RODRIGUES; TOMÁS, 2011).

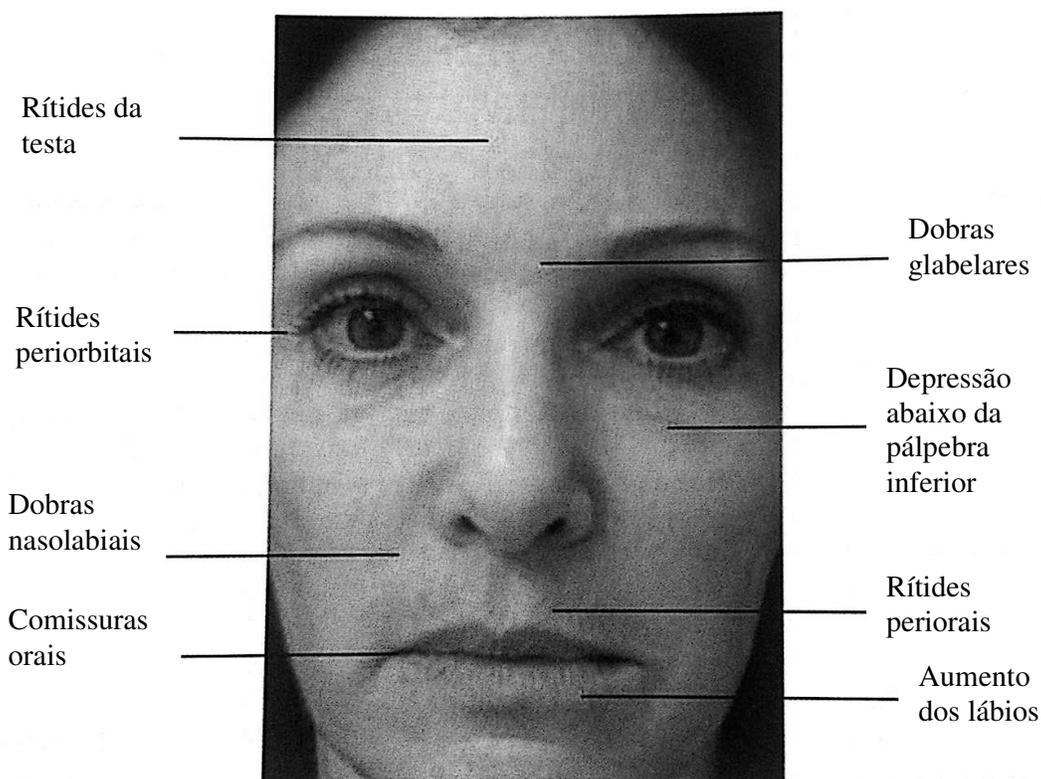
### **3.4 PREENCHEDORES**

Alguns tipos de materiais foram utilizados para fins de preenchimento, há mais de 100 anos (JACOVELLA, 2008). O primeiro implante heterólogo injetável foi realizado em 1889 com a introdução de parafina em humanos na tentativa de criar próteses escrotais. Por causa das importantes reações de corpo estranho produzidas, tais como: embolia pulmonar e granulomas, a parafina foi abandonada (JACOVELLA, 2008; JONES, 2008). Em 1893 enxertaram gordura autóloga para preencher falhas do volume facial (JACOVELLA, 2008). O uso de silicone líquido na medicina foi avaliado em 1961 e estendido para a área da estética posteriormente. No início do século XX, implantes autólogos e preenchimentos com gorduras começaram a ser utilizados (JONES, 2008). Desde 1970, novas tecnologias têm permitido a redução do potencial imunogênico do colágeno bovino utilizado na correção de rugas e cicatrizes, que até hoje é o padrão-ouro com o qual todos os preenchedores dérmicos recém desenvolvidos são comparados. Em 1985, diferentes tipos de

colágeno foram introduzidos no mercado, seguido por outras substâncias, como o ácido hialurônico (JACOVELLA, 2008; JONES, 2008; LEONARDIS *et al*, 2010).

Preenchedores dérmicos têm se tornado uma excelente opção para tratar defeitos de contornos causados por envelhecimento, danos provocados pela exposição à luz solar, doenças, traumas ou escarificação. Os sinais mais comuns de envelhecimento facial são exemplificados na figura 2.

Figura 2 – Exemplos de sinais de envelhecimento facial



(WALDEN; LAMPETER, 2009)

O fato dos enchimentos biodegradáveis serem absorvidos dentro de um ano após a aplicação, resultou no surgimento de produtos permanentes e semi-permanentes para oferecer aos pacientes efeitos mais duradouros (STURM *et al*, 2011;

JACOVELLA, 2008; REDBORD; BUSSO; HANKE, 2011). Atualmente, existe um grande número de preenchedores dérmicos injetáveis para ampliação dos tecidos moles e vários tipos novos foram aprovados recentemente pelo Food Drug Administration (FDA), como os preenchedores à base de ácido polilático (PLA), hidroxiapatita (HA), ácido hialurônico (AH), carboximetilcelulose (CMC), colágeno humano recombinante e óleo de silicone altamente purificado para uso oftalmológico (JONES, 2008). As características ideais de um preenchedor incluem biocompatibilidade, longevidade, perfil não migratório e baixo custo-benefício. Além disso, deve ser de fabricação e armazenamento simples, permitir fácil injeção, não deve ser carcinogênico (não provocar o surgimento de câncer), aterogênico (não provocar a formação de ateromas, isto é, acumular-se impedindo a passagem do sangue comprometendo a circulação), tóxico e alergênico (não induzir alergia), sendo capaz de promover uma correção estética harmoniosa, com aspecto natural (CARPINTERO; CANDELAS; RODRIGUEZ, 2010; CARRUTHERS; COHEN, 2009; JACOVELLA, 2008; JONES, 2008).

Quimicamente, os produtos podem ser classificados em duas categorias: biológicos e sintéticos. Os materiais biológicos incluem colágeno bovino, ácido hialurônico animal e gordura autóloga. Os preenchedores sintéticos compreendem ácido hialurônico não animal, microesferas de polimetilmetacrilato (PMMA), micropartículas de hidroxiapatita de cálcio, dentre outros (CARPINTERO; CANDELAS; RODRIGUEZ, 2010; JACOVELLA, 2008; JONES, 2008). De acordo com o tempo de duração no tecido, os preenchedores dérmicos podem ser classificados em: curta duração (até 6 meses); longa duração ou semi-permanentes (até 3 anos); e permanente (mais que 3 anos). Quanto ao processo de degradação, podem ser classificados como produtos biodegradáveis e não biodegradáveis (CARPINTERO; CANDELAS; RODRIGUEZ, 2010; JACOVELLA, 2008; JONES, 2008). A tabela 1 abaixo, exemplifica os tipos de matérias de preenchimento e os nomes comerciais. Outra maneira de classificar os preenchedores é com base no tipo de falhas que cada material consegue corrigir, ilustradas na figura 3. Por definição, as ríttides (rugos) podem ser divididas em três tipos: superficiais, intermediárias e profundas. Do mesmo modo, o nível em que há perda de volume da pele pode ser a derme superficial, as camadas intermediária e profunda da derme (os sulcos

nasolabiais ou as comissuras orais) ou os tecidos subcutâneos (falhas de contorno mais profundas como a lipoatrofia facial) (JONES, 2008).

Tabela 1- Tipos de materiais de preenchimento e seus nomes comerciais.

<b>Material</b>	<b>Nome Comercial</b>	<b>Duração e Biodegradação</b>
Gordura Autóloga	Obtida do próprio paciente	Curta duração e biodegradável
Ácido hialurônico	Restylane <sup>®</sup> (Sub-Q, Uppsala, Suécia) RestylanePerlane <sup>®</sup> (Sub-Q) Restylane Lipp <sup>®</sup> (Sub-Q) RestylaneTouch <sup>®</sup> (Sub-Q) RestylaneVital <sup>®</sup> (Sub-Q) Macrolane <sup>®</sup> 20, 30 (Q-Med AB, Suécia) Ultra1,2,3 <sup>®</sup> JuvedermVoluma <sup>®</sup> HylaformPlus <sup>®</sup> (Allergan Inc.) HylaformFineline <sup>®</sup> (Allergan Inc.) RofilanForte <sup>®</sup> (Rofil Medical International, Breda, Holanda) Puragen <sup>®</sup> (Mentor Corp, Santa Barbara, CA)	Curta duração e biodegradável
Colágeno	Zyplast <sup>®</sup> /Zyderm <sup>®</sup> (bovino) (Allergan Inc., Santa Barbara, CA) Cosmoderm <sup>®</sup> /Cosmoplast <sup>®</sup> (humano) (Allergan Inc., Santa Barbara, CA) Evolence <sup>®</sup> (Colbar LifeScience, Herzliya, Israel) Permacol <sup>®</sup> (Tissue Science Labs, Reino Unido) Fibroquel <sup>®</sup> (Suíno) (Aspid, Mexico)	Curta duração e biodegradável
Hidroxiapatita de cálcio	Radiesse <sup>®</sup> (Bioform Medical, San Mateo, CA, EU)	Semipermanente e biodegradável
Ácido poliláctico	Sculptra <sup>®</sup> /New Fill <sup>®</sup> (Dermic Laboratories, Berwyn, PA, EU)	Semipermanente e biodegradável
β-fosfato tricálcico com ácido hialurônico	Atlean <sup>®</sup> (Stiefel, França)	Permanente e biodegradável
Gel de poliácridamida	Aquamid <sup>®</sup> (Polymekon, Milão) Bio-Alcamid <sup>®</sup> (Polymekon, Milão)	Permanente e biodegradável
Polimetilmetacrilatos	Arteplast <sup>®</sup> (Suneva Medical Inc., San Diego, CA) Artecoll <sup>®</sup> , Artefill <sup>®</sup>	Semipermanente e biodegradável
Polímeros de dimetilsiloxane	Silicona	Permanente e biodegradável

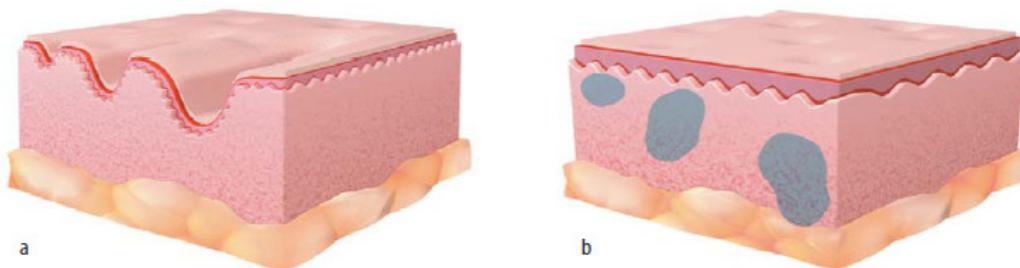
(CARPINTERO; CANDELAS; RODRIGUEZ, 2010)

A figura 3 também relaciona os preenchedores mais apropriados para cada tipo de falha, a saber:

(a) Ilustração esquemática mostrando três diferentes tipos de falhas: à esquerda, linhas finas; ao centro, rugas moderadas; à direita, falha mais proeminente e pronunciada.

(b) Resultado das injeções dos preenchedores apropriados na epiderme superficial para tratar linhas finas (Cosmoderm® ou Zyderm®), na região intermediária da derme para tratar rugas moderadas (Zyplast,® Cosmoplast,® Hylaform,® Captique,® Restylane® ou Juvederm®) e na derme profunda para corrigir falhas mais proeminentes e pronunciadas (HylaformPlus,® Perlane,® Radiesse,® Sculptra® ou Silikon®-1000).

Figura 3 - Representação esquemática mostrando tipos de falhas dérmicas e resultados após aplicação do preenchimento



(JONES, 2008).

Para a avaliação da eficácia clínica dos preenchimentos dermais têm sido utilizadas diferentes escalas de classificação da severidade das rugas, compreendendo a escala de classificação de Lemperle (LRS), a escala de classificação da severidade das rugas (WSRS) e ainda a escala de rugas modificada por Fitzpatrick (MFWS).

A tabela 2 mostra os métodos de classificação das rugas (CARRUTHERS; COHEN, 2009).

Tabela 2 – Escalas de classificação das rugas

LRS	WSRS	MFWS
0 = nenhuma ruga	0 = nenhuma ruga	0 = nenhuma ou não visível
1 = apenas perceptível (~0,1 mm)	1 = suave	0,5 = muito suave
2 = rasa (~0,2 mm)	2 = moderada	1 = fina
3 = profundidade moderada (~0,5 mm)	3 = severa	1,5 = visível (< 1mm)
4 = profunda (~1,0 mm)	4 = extrema	2 = moderada (1-2 mm)
5 = muito profunda com dobra reduntante (~2,0 mm)		2,5 = visível proeminente (>2<3 mm)
		3 = profunda (>3mm)

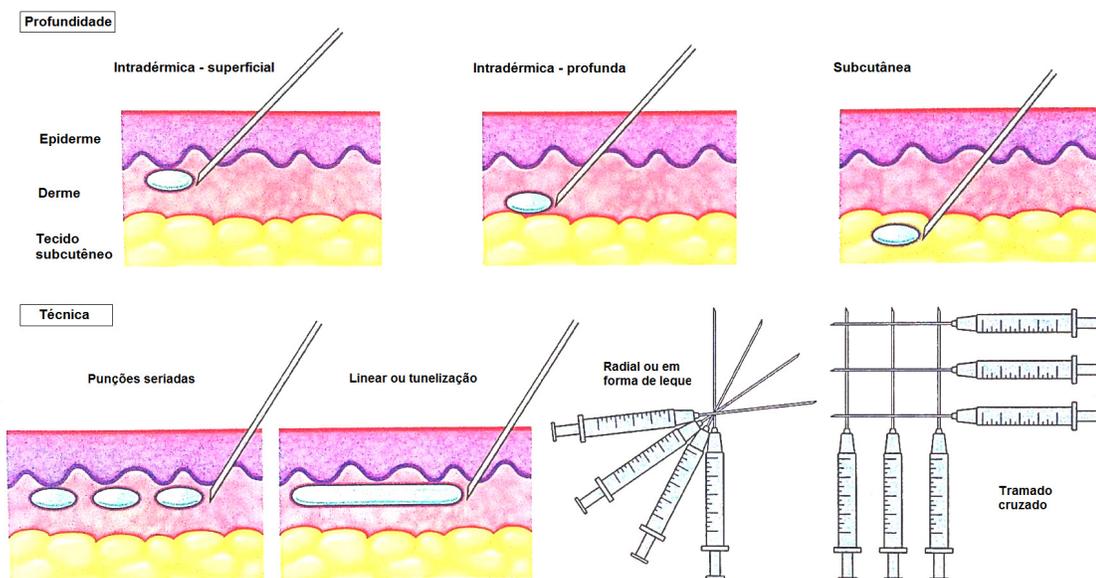
(adaptada de CARRUTHERS; COHEN, 2009)

A aplicação intradérmica dos materiais de preenchimento requer certa experiência e prática. É fundamental eleger o produto mais adequado para cada pessoa ou região anatômica a ser tratada, assim como a quantidade de material a ser injetado. A profundidade que o material será depositado também é importante para garantir um bom resultado (REDBORD; BUSSO; HANKE, 2011; CARPINTERO; CANDELAS; RODRIGUEZ, 2010; JACOVELLA, 2008; JONES, 2008). Assim, geralmente, a maior parte dos preenchimentos é colocada na derme profunda e na gordura. As principais técnicas de aplicação de materiais de preenchimento são descritas a seguir:

- **Linear ou tunelização**, técnica na qual se introduz a agulha de forma linear e à medida que se retira a mesma, deposita-se o produto através de uma única aplicação. É empregada principalmente para rugas isoladas como as pregas nasolabiais.

- **Punções seriadas**, técnica que aplica múltiplas injeções sequenciais ao longo da ruga suficientemente próximas entre si para evitar irregularidades.
- **Radial ou em forma de leque**, a agulha é introduzida e o material depositado como na técnica de tunelização. A agulha, antes de ser retirada do local, é redirigida de forma radial e novo preenchimento é depositado, repetindo o número de vezes necessárias para conseguir o efeito desejado. Esta técnica é utilizada para a região malar por dar mais volume.
- **Tramado cruzado**, é uma variação da técnica linear. Várias linhas paralelas são criadas na região que deseja tratar e depois o mesmo procedimento é repetido de forma perpendicular. Utilizada para corrigir linhas de marionete e o sulco peri- mandibular (CARPINTERO; CANDELAS; RODRIGUEZ, 2010; WALDEN; LAMPETER, 2009). Estas técnicas de aplicação dos preenchedores estão ilustradas na figura 4.

Figura 4 - Esquema ilustrativo da profundidade de aplicação e das técnicas de injeção dos materiais de preenchimento dérmico



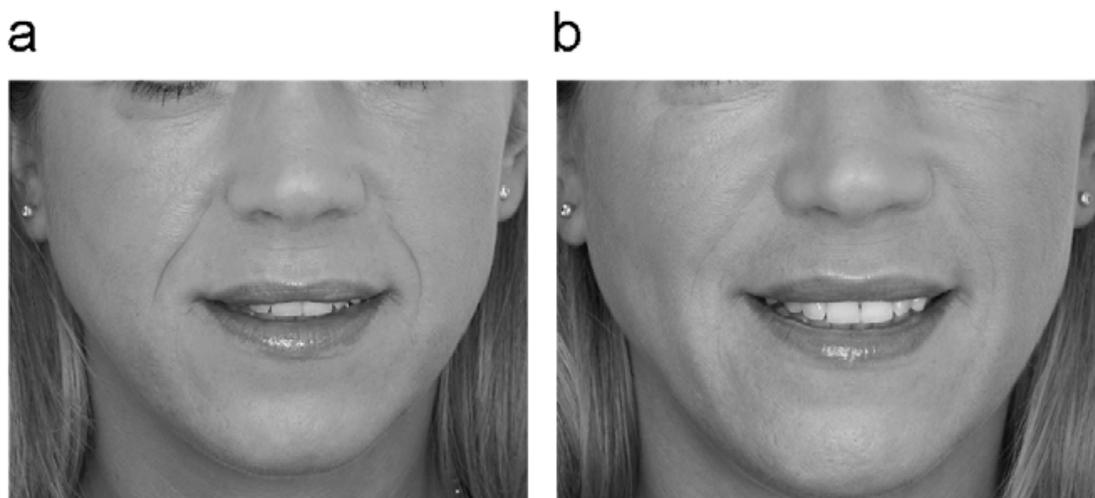
(WALDEN; LAMPETER, 2009).

Embora os enchimentos tenham excelentes perfis de segurança e os eventos adversos possam ser evitados com experiência e uma boa técnica, reações adversas significativas podem ocorrer. Os eventos adversos de curto prazo são

eritema, edema, prurido e hematomas. Outras complicações, como descoloração, hipersensibilidade, coloração azulada (conhecida como efeito Tyndall) e nódulos podem ocorrer devido à colocação superficial ou hipercorreção. Geralmente, estes eventos podem ser tratados com a utilização de hialuronidase e/ou massagem, aspiração e uso de esteróides orais. Reações inflamatórias, formação de nódulos ou granulomas vasculares, oclusão ou necrose, cegueira, infecção e cicatrizes são complicações raras (REDBORD; BUSSO; HANKE, 2011; CARRUTHERS; COHEN, 2009).

A principal indicação dos materiais de preenchimento é na prática de rejuvenescimento facial, restauração de volumes e melhora do contorno facial. Contudo, estes materiais podem ser indicados com menos freqüência no tratamento de cicatrizes, perfilamento do queixo em pacientes com implantes, tratamento do lóbulo auricular e rejuvenescimento das mãos (REDBORD; BUSSO; HANKE, 2011; CARPINTERO; CANDELAS; RODRIGUEZ, 2010; LEMPERLE *et al*, 2010; JACOVELLA, 2008; JONES, 2008;). A figura 5 ilustra o resultado após tratamento com preenchimento de ácido hialurônico nos sulcos nasogenianos.

Figura 5 - Paciente tratada com AH nos sulcos nasogenianos, antes (a) e depois (b).



(LEMPERLE *et al*, 2010)

Segundo os dados da Sociedade Americana de Cirurgia Plástica e Estética em 2006, mais de 85% dos materiais de preenchimento são derivados do ácido hialurônico devido à segurança, facilidade de aplicação e bons resultados encontrados (REDBORD; BUSSO; HANKE, 2011; CARPINTERO; CANDELAS; RODRIGUEZ, 2010; WALDEN; LAMPETER, 2009; JACOVELLA, 2008; JONES, 2008;).

A estrutura físico-química de um gel para preenchimento de tecidos moles é estabelecida durante o processo de preparo pelo ajuste de variáveis como: concentração das moléculas da fase sólida, o método, a porcentagem de ligações cruzadas na fase sólida e a proporção de gel que constitui esta fase (proporção gel-fluido). Preenchedores de tecidos moles com estruturas físico-químicas distintas se comportam de maneira diferente devido a suas propriedades reológicas (viscosidade, elasticidade e plasticidade) que são dependentes destas variáveis citadas anteriormente, entre outras. A viscosidade e o módulo de elasticidade devem ser quantificados. A estrutura físico-química dos preenchedores e suas propriedades reológicas únicas são clinicamente importantes por determinarem como o material se comporta durante e após a injeção. Sob condições fisiológicas, a viscosidade do material refere-se à forma como ele flui a partir da agulha e a elasticidade está relacionada à rigidez ou capacidade de resistir à deformação enquanto ele está sendo injetado. Após a injeção, a viscosidade e o módulo de elasticidade vão influenciar na maneira como o preenchedor resiste às forças de tensão da pele devido aos movimentos faciais (SUNDARAM; VOIGTS; BEER, 2010; FREDRICKON; TEZEL, 2008).

É importante também considerar outras variáveis que afetam o material durante a aplicação: calibre da agulha, tamanho de seringa, a força e a técnica de injeção, devido às forças de cisalhamento podem alterar a forma como material flui durante a aplicação, influenciando a sua viscosidade e elasticidade (SUNDARAM; VOIGTS; BEER, 2010).

### 3.4.1 PREENCHEDOR DE HIDROXIAPATITA

Com referência às características mencionadas anteriormente para um preenchedor dérmico, a hidroxiapatita (HA) pode ser considerada um enchimento sintético semi-permanente ou duradouro (JACOVELLA, 2008).

O preenchedor de hidroxiapatita ou Radiesse® (produzido por BioForm Medical, USA) é um implante subdérmico injetável, composto de 30% de microesferas de hidroxiapatita de cálcio sintética com 25-45 µm de diâmetro, suspensas em 70% de gel carreador aquoso de carboximetilcelulose, semi-permanente, estéril, não pirogênico, livre de látex e com viscosidade e elasticidade elevadas (REDBORD; BUSSO; HANKE, 2011; JACOVELLA, 2008). O produto é fornecido em seringas de 1,3 ml descartáveis com fechamento em rosca (Luer-lock). Radiesse® oferece muitas das propriedades desejáveis mencionadas para um preenchedor facial, particularmente para defeitos dérmicos profundos e para aumento não cirúrgico do contorno (JACOVELLA, 2008).

A HA é biodegradável, seguindo a mesma via metabólica dos restos ósseos de fraturas comuns. Após 2 a 3 meses, a carboximetilcelulose é reabsorvida e substituída por colágeno. Finalmente, um colapso gradual das partículas ocorre até a completa fagocitose. As microesferas de HA presentes no Radiesse® têm a mesma composição química que o constituinte inorgânico de ossos e dentes, e por isso, apresentam um perfil bastante seguro para serem utilizadas como preenchedor dérmico. Como biocerâmica, foi amplamente testada em estudos pré-clínicos e mostrou-se biocompatível, não tóxica, não imunogênica. Após injeções *in vivo*, em estudos clínicos e histológicos, demonstrou excelente tolerância com mínima reação inflamatória. Dentro dos tecidos moles, tais como a derme, as partículas de HA estimulam a formação de colágeno novo, ou seja, a HA imita o ambiente no qual é colocada. Não foram observados infiltração óssea nem lixiviação a partir dos pontos de injeção do biomaterial (JACOVELLA, 2008).

Radiesse® é considerado um “dispositivo médico” porque além de seu uso estético em cirurgias plásticas e reconstrutivas, incluindo aumento de tecidos moles, é também utilizado em incontinência urinária de esforço, refluxo vesicouretral,

aumento das cordas vocais e como marcador radiográfico. O produto foi testado por Evans *et al* (2005) para projeção do mamilo após falha na reconstrução mamilo areolar e a técnica parece promissora (JACOVELLA, 2008). Carruthers *et al* (2009) relatou um estudo no qual avaliaram o uso de Radiesse® em lipoatrofia facial associada ao HIV, cujos resultados demonstraram melhora estatisticamente significativa na espessura da bochecha em um período de 3-6 meses (CARRUTHERS, COHEN *et al*, 2009).

Compósitos formados pela associação de partículas de hidroxiapatita com polímeros para preenchimento dérmico apresentam vantagens únicas sobre seus componentes individualizados, pois combinam a osteocondutividade da HA com a facilidade de processamento dos polímeros para produzir materiais completamente degradáveis otimizando a resposta biológica reparadora (REDBORD; BUSSO; HANKE, 2011).

As partículas de hidroxiapatita funcionam como *scaffold* injetável para a formação de um novo tecido e estimulam a formação de colágeno em seu entorno, enquanto, o hidrogel carreador produz imediata correção sendo absorvido gradualmente. As partículas de HA fixas no local desencorajam a migração e sua lenta degradação proporciona uma longevidade de 8 a 12 meses. Sua viscosidade e elasticidade únicas permitem fácil manipulação (REDBORD; BUSSO; HANKE, 2011; JACOVELLA, 2008).

### 3.5 FOSFATOS DE CÁLCIO

A primeira biocerâmica artificial testada amplamente em humanos era de gesso ( $\text{CaSO}_4 \cdot \frac{1}{2} \text{H}_2\text{O}$ ), porém, seu uso tornou-se inviável como implante ósseo devido à sua baixa resistência mecânica e fácil absorção pelo organismo (DOROZHKIN, 2010). Os implantes artificiais do passado também falhavam devido às infecções. Assim, o uso de biomateriais só foi possível após o desenvolvimento das técnicas cirúrgicas assépticas em 1860. Ainda havia a falta de conhecimento sobre a toxicidade dos materiais selecionados (DOROZHKIN, 2010).

Portanto, de acordo com a literatura disponível, a primeira tentativa de utilizar os fosfatos de cálcio (fosfato tricálcico-TCP) como um material artificial foi realizada em 1920 devido à sua similaridade química com o componente mineral dos ossos e dentes e ao seu alto grau de biocompatibilidade. O primeiro trabalho contendo o termo biocerâmicas foi publicado em 1972. A comercialização das biocerâmicas para aplicações odontológicas e cirúrgicas (principalmente, HA) ocorreu na década de 1980 (DOROZHKIN, 2010).

Geralmente, as biocerâmicas de fosfato de cálcio devem ser caracterizadas a partir de diversos pontos de vista: como a composição química (estequiometria e pureza), homogeneidade, distribuição de fases, morfologia, tamanho de grão e forma, tamanho do cristal, cristalinidade, poros, fissuras e superfície (DOROZHKIN, 2010).

Fosfatos de cálcio são materiais cerâmicos com relação Ca/P variada, conhecidos como apatitas. Geralmente são obtidos a partir de fontes minerais (rochas ígneas e depósitos de oceanos e lagos), biológicas (ossos e dentes de animais, casca de ovos e corais marinhos) e pela síntese química (precipitação a partir de soluções contendo íons  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{PO}_4^{3-}$  em condições alcalinas ou ácidas) (APARECIDA *et al*, 2007; NAGEM FILHO *et al*, 2006).

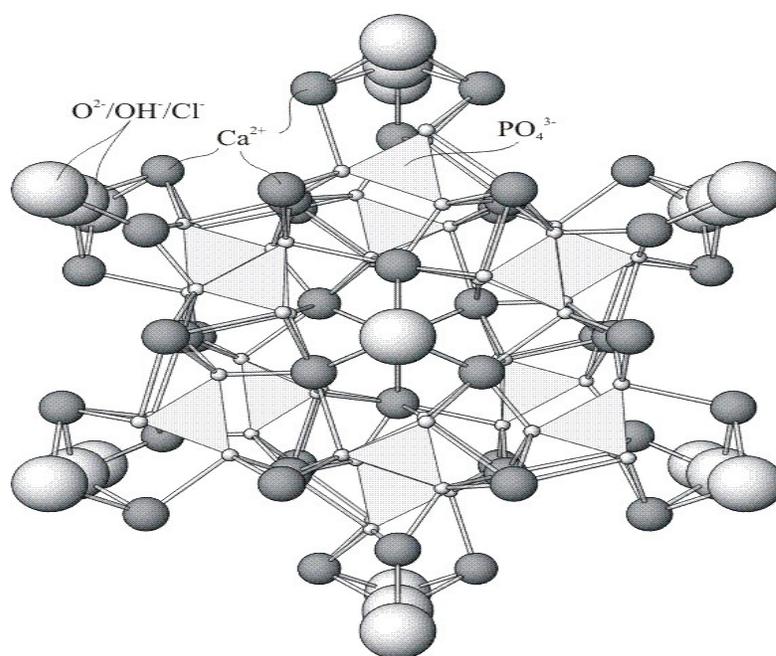
A hidroxiapatita é um importante mineral da família das apatitas, sendo as apatitas de cálcio  $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{X}_2$ , onde ( $\text{X} = \text{F}^-, \text{Cl}^-, \text{OH}^-, \text{Br}^-, \text{O}^{2-}$ ) a classe predominante desta família. As apatitas são a maior fonte natural de fosfatos e fósforo do planeta. Sua estrutura química é bem conhecida e permite inúmeras substituições, incluindo íons metálicos (K, Na, Mn, Ni, Cu, Co, Zn, Sr, Ba, Pb, Cd, Sb, Y, U) no sítio do Ca e complexos aniônicos ( $\text{AsO}_4^{3-}$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ ,  $\text{CO}_3^{2-}$ ,  $\text{SiO}_4^{4-}$ , etc) no sítio do  $\text{PO}_4^{3-}$ . Essas substituições são encontradas na ordem de traços (ELLIOT, 1994).

A figura 6 apresenta a estrutura cristalina da hidroxiapatita no modelo de esferas rígidas. O arranjo atômico consiste de uma célula hexagonal, na qual os íons hidroxilas estão localizados nos cantos da célula, rodeados por 2 grupos de átomos de cálcio e por 2 grupos de fosfato, ambos arranjados em posições triangulares.

Biomateriais sintéticos incluem essencialmente, vitrocerâmicas especiais descritas como biovidros compostas de: fosfato de cálcio (hidroxiapatita – HA), fosfato tricálcico – TCP e fosfato de cálcio bifásico – BCP (DACULCI, 2003). Estes materiais

diferem entre si em composição e propriedades físicas. A hidroxiapatita (HA) -  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$  apresenta razão cálcio/fósforo (Ca/P) = 1,67 molar, os  $\beta$  - TCP e  $\alpha$  - TCP -  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ , razão Ca/P = 1.5 molar (DOROZHKIN, 2010). Os fosfatos de cálcio podem ser classificados através da razão molar entre os átomos de cálcio e fósforo - Ca/P, a qual varia de 0,5 a 2,0 conforme apresentado na tabela 3.

Figura 6 - Estrutura cristalina da hidroxiapatita no modelo de esferas rígidas



(<http://www.umanitoba.ca/geoscience/faculty/arc/PICTURES/apatitestr1.jpg>)

Do ponto de vista químico, a maioria das biocerâmicas de fosfato de cálcio é baseada na hidroxiapatita (HA),  $\beta$  - TCP e  $\alpha$  - TCP e/ou fosfato de cálcio bifásico (BCP, o qual é uma mistura de ( $\beta$  - TCP + HA) ou de ( $\alpha$  - TCP + HA). Recentemente, o conceito de BCP foi estendido para preparação e caracterização de TCP bifásico, consistindo de fases de  $\alpha$  - TCP e  $\beta$  - TCP. O TCP bifásico é usualmente preparado por aquecimento dos precursores ACP (fosfatos de cálcio

amorfo –  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot n\text{H}_2\text{O}$ ) nos quais a proporção de  $\alpha$  – TCP/  $\beta$  – TCP pode ser controlada pelo tempo de reação e pH durante a síntese do precursor amorfo. A formulação trifásica consistindo de HA,  $\beta$  – TCP e  $\alpha$  – TCP também tem sido preparada (DOROZHKIN, 2010).

Quando comparados, HA com os  $\beta$  – TCP e  $\alpha$  – TCP, a HA é uma fase mais estável sob condições fisiológicas, uma vez que tem solubilidade mais baixa, e assim uma cinética de reabsorção mais lenta. Portanto, o conceito de BCP esta baseado no balanço ótimo entre a fase mais estável (HA) e a fase mais solúvel ( $\beta$  – TCP) (DOROZHKIN, 2010).

Tabela 3 – Relação Ca/P das fases de apatita

Fosfato de Cálcio	Fórmula Química	Razão Molar Ca/P
Fosfato Tetracálcico (TeCP)	$\text{Ca}_4\text{O}(\text{PO}_4)_2$	2,000
Hidroxiapatita (HA)	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$	1,667
Fosfato de Cálcio Amorfo (ACP)	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot n\text{H}_2\text{O}$	1.500
Fosfato Tricálcico ( $\alpha$ , $\alpha'$ , $\beta$ , $\gamma$ ) (TCP)	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	1,500
Fosfato Octacálcico (OCP)	$\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	1,333
Mono-hidrogênio Fosfato de Cálcio Diidratado (DCPD)	$\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1,000
Mono-hidrogênio Fosfato de Cálcio (DCP)	$\text{CaHPO}_4$	1,000
Pirofosfato de Cálcio (CPP)	$\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$	1,000
Pirofosfato de Cálcio Diidratado (CPPD)	$\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1,000
Fosfato Heptacálcico (HCP)	$\text{Ca}_7(\text{P}_5\text{O}_{16})_2$	0,700
Di-hidrogênio Fosfato Tetracálcico (TDHP)	$\text{Ca}_4\text{H}_2\text{P}_6\text{O}_{20}$	0,670
Fosfato Monocálcico Mono-hidratado (MCPM)	$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0,500
Metafosfato de Cálcio ( $\alpha$ , $\beta$ , $\gamma$ ) (CMP)	$\text{Ca}_3(\text{PO}_3)_2$	0,500

(Adaptada de APARECIDA *et al*, 2007)

O fato das biocerâmicas serem solúveis, se degradarem gradualmente *in vivo* e apresentarem boa biocompatibilidade, torna estes biomateriais muito promissores em aplicações biomédicas (VICTORIA, 2002; DACULSI *et al*, 2003).

Devido a uma maior biodegradabilidade do componente  $\alpha$  ou  $\beta$ -TCP, a cinética de biodegradação do BCP depende da relação HA / TCP: quanto maior a relação, mais baixa a taxa de degradação. Assim, *in vivo* a bioreabsorção do BCP pode ser controlada por meio da composição da fase (DOROZHKIN, 2010).

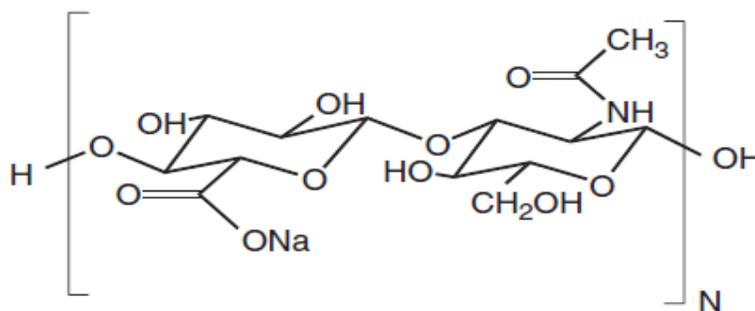
Deve-se salientar que, recentemente, os conceitos de materiais bioativos e reabsorvível convergiram e materiais bioativos são feitos reabsorvíveis, enquanto os materiais bioabsorvíveis são feitos bioativos (DOROZHKIN, 2010). A distinção entre biocerâmicas bioativas e bioreabsorvíveis está associada ao elemento estrutural. As biocerâmicas de HA não porosa e altamente cristalina se comporta como um material bioinerte e ficam retidas no organismo por pelo menos 5 a 7 anos, sem alterações visíveis; enquanto uma biocerâmica altamente porosa da mesma composição, pode ser reabsorvida dentro de um ano aproximadamente. As biocerâmicas de fosfato de cálcio, em especial os arcabouços feitos de BCP, têm se destacado entre as cerâmicas com propriedades biológicas devido à ausência de toxicidade local e sistêmica e capacidade de se ligar ao tecido hospedeiro. Tais características são explicadas pela natureza química do material (DOROZHKIN, 2010).

O BCP, desenvolvido desde 1985 está disponível comercialmente, como material para enxerto ou substituto ósseo para aplicações médicas ou odontológicas, na forma de blocos densos ou porosos, partículas, injetável ou em formas customizadas. Materiais macroporosos são mais favoráveis para aplicações em engenharia de tecido que os não porosos (DACULSI *et al*, 2003). O BCP é obtido quando uma apatita deficiente de cálcio, biológica ou sintética é sinterizada (sofre tratamento térmico ou queima realizado sempre abaixo do ponto de fusão dos materiais e que modifica sua estrutura microscópica) a intervalos de 0,5-3°C/minuto, a 1000-1250°C por 2-5horas. A extensão da deficiência de cálcio ( $Ca/P < 1,67$  molar) depende do método de preparação (precipitação, hidrólise ou mistura mecânica), do pH da reação e da temperatura da preparação da apatita antes da sinterização (DOROZHKIN, 2010, DACULSI *et al*, 2003).

### 3.6 ÁCIDO HIALURÔNICO

O ácido hialurônico (hialuronan, AH) é uma glicosaminoglicana ou ácido mucopolissacarídeo, importante constituinte da matriz extracelular (MEC) composto de unidades de  $\beta$  (1,4) ácido D-glucurônico e  $\beta$  (1,3) N-acetil-D-glicosamina em uma estrutura química simples conforme ilustrado na figura 7 abaixo:

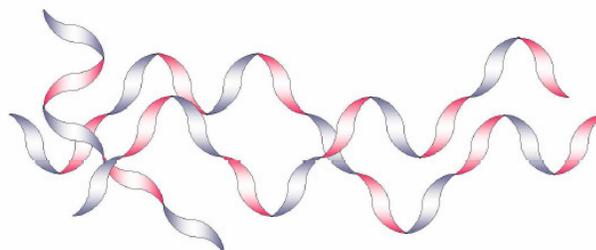
Figura 7 – Estrutura primária do ácido hialurônico (AH) composta por repetições de unidades dissacarídicas de ácido glucurônico e N-acetil glucosamina.



(KABLIC *et al*, 2009).

Além da estrutura primária, o AH apresenta estruturas secundárias e terciárias. A estrutura secundária do AH envolve as ligações de H intra e intermoleculares formadas em solução aquosa. Estas ligações de H são formadas pelos grupos acetamida, carboxilato e hidroxílico da molécula e por moléculas de água do solvente (NUSGENS, 2010; KABLIC *et al*, 2009; LAPCIK JR. *et al*, 1998; ANTONIO; ANTONIO, 2011; JHA *et al*, 2010; REDBORD; BUSSO; HANKE, 2011). A estrutura tridimensional do AH, que representa sua estrutura terciária, é formada por duas cadeias antiparalelas que se enovelam formando uma estrutura de fita torcida estabilizada através de interações eletrostáticas, pontes de hidrogênio e interações hidrofóbicas e está ilustrada na figura 8.

Figura 8 - Estrutura terciária do AH: estrutura de fita torcida da molécula de AH em solução, com faces hidrofílicas (azuis) e hidrofóbicas (vermelhas).



(adaptada de KABLIC *et al*, 2009).

É encontrado na camada dérmica preenchendo os espaços extracelulares entre as fibras colágenas. O nome “ácido hialurônico” foi dado devido sua aparência “lustrosa” (do grego, *hyalos* = vidro) (ANTONIO; ANTONIO, 2011).

A síntese de ácido hialurônico é realizada através de um processo único que depende da atividade enzimática da hialuronan sintetase. Seu peso molecular varia entre 100 a 10.000kDa e depende da fonte e do método de obtenção e purificação do ácido. O ácido hialurônico pode ser classificado de acordo com seu peso molecular, em três tipos: de alto peso molecular (de até 10.000.000Da), de baixo peso molecular (de 15.000 a 50.000Da), de baixíssimo peso molecular ( $\leq 10.000$ Da).

Este ácido é amplamente distribuído nos tecidos conectivos, epitelial e neural, tais como pele, cartilagem e humor vítreo de todos os mamíferos, sendo que aproximadamente 50% do total de AH do corpo é encontrado na pele (NUSGENS, 2010; KABLIC *et al*, 2009; LAPCIK JR. *et al*, 1998; ANTONIO; ANTONIO, 2011; JHA *et al*, 2010).

O AH é um polímero altamente hidrofílico com um grupo carboxílico por unidade de ácido glicurônico, o que lhe confere caráter polianiónico em pH fisiológico (pH 7). Todos os grupos carboxílicos do ácido D-glicurônico e da N-acetilglicosamina estão completamente ionizados, *in vivo*, tornando a molécula de AH altamente polar e, conseqüentemente, altamente solúvel em água. Na presença de água, as cadeias de AH podem expandir em volume até 1000 vezes e formar matrizes imensamente hidratadas (NUSGENS, 2010; KABLIC *et al*, 2009; LAPCIK JR. *et al*, 1998; ANTONIO; ANTONIO, 2011; JHA *et al*, 2010; REDBORD; BUSSO; HANKE, 2011).

Soluções de AH tem pronunciadas propriedades viscoelásticas. Em solução aquosa, o comportamento do AH passa de Newtoniano para não-Newtoniano com o aumento da massa molar, da concentração ou da taxa de cisalhamento (KABLIC *et al*, 2009). Além disso, os aumentos de massa molar e de concentração aumentam a viscoelasticidade da solução, que é dependente do pH e é afetada pela força iônica do meio. Variações no pH afetam a extensão da ionização da cadeia de AH e essas variações, conseqüentemente, alteram as interações inter e intramoleculares e conseqüentemente suas propriedades reológicas (XU *et al*, 2012).

De acordo com Xu e colaboradores (2012), o comportamento das soluções de AH em diferentes valores de pH apresenta discreta degradação na massa molar média em condições ácidas ( $\text{pH} < 1,6$ ) e em meio básico ( $\text{pH} 12,6$ ), contudo, não influenciando o comportamento reológico de forma significativa. Um comportamento de gel é observado em  $\text{pH} \geq 2,5$  e pode ser atribuído às interações cooperativas intercadeias devido à redução das cargas do polímero e protonação dos grupos acetamida. Em pH alcalino ( $\text{pH} > 12$ ), ocorre a diminuição da viscosidade, atribuída principalmente a uma redução da rigidez da cadeia do polímero devido à quebra parcial da rede de ligações de H (XU *et al*, 2012).

Devido a suas propriedades físicas, o AH tem funções no preenchimento de espaços, na lubrificação, na absorção de choque, tampão osmótico na MEC, e ainda, como peneira, controlando o transporte de água e restringindo o movimento de agentes patogênicos, proteínas do plasma e proteases (XU *et al*, 2012; NUSGENS, 2010; TANG *et al*, 2007; ANTONIO; ANTONIO, 2011). Além disso, suas propriedades bioquímicas permitem que desempenhe papel importante na cicatrização de feridas, motilidade celular, angiogênese, na construção da matriz extracelular, estabilizador de moléculas sendo particularmente importante no desenvolvimento e remodelamento de tecidos (ANTONIO; ANTONIO, 2011).

Na pele, além de servir como matriz para as células, o AH pode imobilizar água no tecido e assim, alterar o volume dérmico e sua compressibilidade, mostrando que há uma correlação direta entre a quantidade de ácido hialurônico no tecido dérmico, o conteúdo dérmico de água, e as propriedades viscoelásticas da matriz extracelular (ANTONIO; ANTONIO, 2011). A concentração de ácido hialurônico presente na pele diminui com a idade. Isto resulta em uma capacidade diminuída de retenção de água

(hidratação), provocando uma perda de volume na derme e aumento da sua propensão ao enrugamento (ANTONIO; ANTONIO, 2011; WALDEN; LAMPETER, 2009).

O AH é degradado pela enzima hialuronidase e por radicais livres. Sua capacidade de reagir com o oxigênio derivado dos radicais livres confere ao AH efeito antioxidante (XU *et al*, 2012). A resposta celular é amplamente influenciada pelo tamanho do polímero e pela estrutura de fragmentos formados pela degradação do AH pela ação de radicais livres ou da hialuronidase (NUSGENS, 2010). Em seu estado natural, o ácido hialurônico exógeno é degradado rapidamente, tendo meia vida de 2 a 3 dias dependendo do tecido, sendo na pele de apenas um dia (12 a 24 horas) (XU *et al*, 2012; WALDEN; LAMPETER, 2009). AH pode ser extraído de tecidos animais (sendo a crista de galo a maior fonte) ou ser biossintetizado por bactérias através de fermentação (ANTONIO; ANTONIO, 2011).

Devido à sua origem natural, o AH é biocompatível, não imunogênico e não produz reações inflamatórias. Estes seus atributos favorecem sua aplicação como biomaterial viscoelástico para finalidades médicas, como agente apropriado para preenchimento de tecidos moles, como cosmético por causa da sua alta capacidade de reter água e em sistemas de liberação de drogas devido a sua biodegradabilidade (ANTONIO; ANTONIO, 2011).

Vários aspectos físico-químicos do AH são vantajosos para sua fabricação e aplicação como biomaterial. Por exemplo, AH pode ser produzido em grandes quantidades facilmente e de forma controlada através da fermentação microbiana, permitindo o aumento de produtos derivados e evitando o risco de veicular patógenos quando originados de animais. O AH é altamente hidrófilo e, portanto, não aderente às proteínas e células, propriedade valiosa para a prevenção de formação de tecido cicatricial e de cápsula (LEACH *et al*, 2003).

A matéria-prima, ácido hialurônico, utilizada para produzir preenchedores dérmicos geralmente é fornecida aos fabricantes na forma de pó. Misturando este pó com água produz-se um líquido viscoso com aparência de clara de ovo. Quanto maior a quantidade de AH adicionada a um dado volume de água, mais grossa e mais viscosa a solução se torna (FREDRICKON; TEZEL, 2008). Uma solução deste tipo é conhecida como AH livre, AH sem ligações cruzadas, ou AH não modificado. Se esta

solução for utilizada como material de enchimento por via dérmica, o produto será eliminado rapidamente. Por isso, as soluções de AH não reticuladas não podem proporcionar a persistência necessária de um enchimento dérmico (FREDRICKON; TEZEL, 2008).

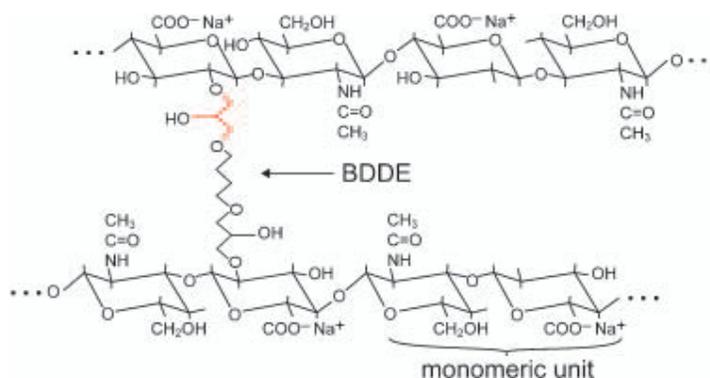
Para superar esta falta de persistência do AH, uma grande variedade de modificações químicas (esterificação, nitração e acetilação) e agentes reticulantes (moléculas de peso molecular muito menor que o da cadeia polimérica e com no mínimo dois grupos funcionais reativos que permitam a formação de ponte entre cadeias) envolvendo os grupos funcionais do AH, principalmente os grupos carboxílicos e hidroxílicos, são empregados para produzir hidrogel, aumentando sua viabilidade e permanência no local aplicado (XU *et al*, 2012; FREDRICKON; TEZEL, 2008; TANG *et al*, 2007; LEACH *et al*, 2003). A reticulação do AH fornece moléculas maiores e mais estáveis, com biocompatibilidade similar a do AH não modificado. O polímero pode ser reticulado através de ligações covalentes irreversíveis (reticulação química), ou através da formação de várias ligações iônicas reversíveis sem qualquer modificação por produto químico (reticulação física) (XU *et al*, 2012). A molécula de AH apresenta quatro grupos funcionais que podem ser modificados quimicamente: carboxílico, hidroxílico, acetamida e o terminal reduzido do polímero (XU *et al*, 2012; FREDRICKON; TEZEL, 2008; TANG *et al*, 2007; LEACH *et al*, 2003).

Duas estratégias têm sido empregadas para a modificação das propriedades físico-químicas do AH: reticulação e/ou adição de compostos na cadeia polimérica (adição de grupos pendentes). A reticulação é a estratégia mais usada e modifica as propriedades físicas pelo aumento do tamanho das moléculas ou pela formação de uma rede reticulada das cadeias de AH que se intumescce em água sem solubilizar. Já a adição de grupos pendentes ao AH modifica suas propriedades pela conjugação de cadeias hidrofílicas, por redução do caráter polianiónico ou pela modificação da agregação das cadeias (XU *et al*, 2012 TANG *et al*, 2007; LEACH *et al*, 2003).

Este hidrogel reticulado resultante, também chamado de ácido hialurônico “estabilizado”, impõe uma barreira física e química para a quebra enzimática e por radicais livres, contribuindo para uma degradação mais lenta (ANTONIO; ANTONIO,

2011; WALDEN; LAMPETER, 2009; FREDRICKON; TEZEL, 2008; TANG *et al*, 2007; LEACH *et al*, 2003). Grupos funcionais epóxi e vinil sulfona reagem com os grupos hidroxílicos do AH em condições básicas para produzir ligações éter. Os processos convencionais usados para reticular o AH e preparar hidrogéis deste biopolímero normalmente utilizam 1,4-butanodiol diglicidil éter (BDDE) e divinilsulfona (DVS) como agentes reticulantes (FREDRICKON; TEZEL, 2008). A figura 9 ilustra o BDDE unindo duas cadeias poliméricas de AH. Os grupos (-CH<sub>2</sub>OH) e (-CHOH) são os possíveis alvos para a reação dentro da unidade monomérica.

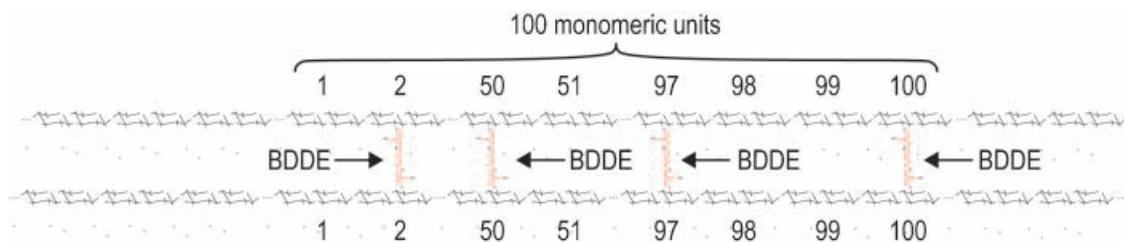
Figura 9 - Cadeias de polímero AH sendo ligadas pelo agente de reticulação BDDE



(FREDRICKON; TEZEL, 2008)

O grau de reticulação de um preenchedor dérmico de AH compreende a porcentagem de monômeros de ácido hialurônico que estão efetivamente ligados à molécula de reticulante. Assim, se um preenchedor tem 4% de reticulação, significa que existe em média, quatro moléculas de reticulante para cada 100 unidades de monômeros de AH, conforme mostrado na figura 10. As unidades monoméricas ligadas ao agente reticulante são determinadas estatisticamente pelo processo de reação. A maioria dos preenchedores de ácido hialurônico é composta de frações reticuladas e não reticuladas de gel para facilitar o fluxo do material através da agulha (FREDRICKON; TEZEL, 2008).

Figura 10 – Exemplo do grau de reticulação de um preenchedor de ácido hialurônico.



(FREDRICKON; TEZEL, 2008)

Embora os métodos utilizados para reticular o ácido hialurônico produzam hidrogéis com uma variedade de propriedades e taxas de degradação, os mesmos apresentam desvantagens: o processo de modificação envolve síntese e muitos passos de purificação; a reação de reticulação ocorre imediatamente após a mistura das soluções de AH e o agente reticulante; devido à formação de géis altamente viscosos pelo AH é difícil controlar os produtos de reticulação após a mistura (LEACH *et al*, 2003).

Considerando que os agentes de reticulação são muitas vezes tóxicos e não biodegradáveis, impondo uma remoção rigorosa de seus resíduos antes que um hidrogel possa ser utilizado em aplicações biomédicas e farmacêuticas, a produção de hidrogéis reticulados fisicamente é uma opção interessante (JAGUR-GRODZINSKI, 2010).

Hidrogéis reticulados fisicamente são formados espontaneamente em condições adequadas, sem a necessidade de introdução de agentes reticulantes externos que podem dificultar sua degradação. Por outro lado, os hidrogéis reticulados fisicamente são biodegradáveis porque sua fase amorfa é mantida pelas cadeias unidas por forças moleculares secundárias, tais como forças de Van der Waals ou interações hidrofóbicas (JAGUR-GRODZINSKI, 2010).

As principais características físico-químicas que influenciam o desempenho final de um preenchimento dérmico de ácido hialurônico estão sintetizadas na tabela 4 abaixo.

Tabela 4 – Características que influenciam o desempenho de um preenchedor dérmico de AH

Grau de reticulação	O grau de reticulação contribui para a persistência cutânea do AH
Firmeza do gel	O módulo de elasticidade descreve a dureza de um gel. Enchimentos dérmicos AH com valores elevados desta variável são difíceis de injectar através de uma agulha de pequeno calibre, a menos sejam incorporadas grandes quantidades de AH não reticulado.
Consistência do gel	Processos de fabricação determinam a consistência final dos preenchedores dérmicos de AH.
Força de extrusão e viscosidade	A viscosidade e força de extrusão caracterizam a facilidade com que um material de enchimento pode ser injetado através de uma agulha.
Concentração de AH e extensão da hidratação	Estas características são importantes para determinar a capacidade de restauração de volume e a longevidade do preenchedor.

(FREDRICKON; TEZEL, 2008)

Preenchedores de ácido hialurônico são utilizados na Europa desde 1995 e vários produtos têm passado por modificações ao longo do tempo, porque atualmente o foco está na obtenção de produtos mais duradouros. Há duas grandes categorias de ácido hialurônico reticulado injetável. Uma categoria, o ácido hialurônico estabilizado (o grupo Hylaform<sup>®</sup>) é derivada de animais (cristas de galinha), e a segunda, é o ácido

hialurônico sintético não derivado de animal (NASHA). O grupo NASHA (Restylane®, Captique® e Juvederm®) é produzido da fermentação bacteriana (*Streptococcus*). O ácido hialurônico bacteriano é o mais utilizado entre os dermatologistas (ANTONIO; ANTONIO, 2011; WALDEN; LAMPETER, 2009; REDBORD; BUSSO; HANKE, 2011). As duas categorias são constituídas de gel límpido, não particulado, incolor e espesso, sem lidocaína. Todos são embalados de modo semelhante em seringas pré-carregadas de uso único acompanhadas de agulhas de 30G (gauge) (ANTONIO; ANTONIO, 2011).

Reações adversas são encontradas em menos de 2% dos casos. Contudo, é importante monitorar o surgimento de eventos adversos. Uma das maiores vantagens dos géis de ácido hialurônico é a reduzida incidência de reações de hipersensibilidade tardia. Como é praticamente impossível ocorrer algum tipo de reação ao AH puro, pelo fato do mesmo ser idêntico em todas as espécies e tipos de tecidos, qualquer tipo de reação que ocorra, provavelmente, é devido às impurezas no processo de produção (ANTONIO; ANTONIO, 2011).

Os preenchedores dérmicos de AH são comercializados por múltiplas fontes através do mundo, disponibilizando produtos diversificados no que se refere ao tamanho das partículas, concentração de AH e o grau de reticulação. Para a escolha do preenchedor adequado é importante o conhecimento das características físico-químicas das formulações de ácido hialurônico, porque embora os produtos comercializados atualmente, estejam muito próximos do “ideal”, ainda apresentam limitações relacionadas à facilidade de injeção e persistência (FREDRICKON; TEZEL, 2008; WALDEN; LAMPETER, 2009).

### **3.7 REOLOGIA**

Análises reológicas são fundamentais para os estudos de tecnologia farmacêutica, sendo imprescindíveis no desenvolvimento de formulações e na caracterização físico-química de produtos farmacêuticos, tais como pastas, emulsões, cremes, géis e vários outros. O conhecimento do comportamento reológico é importante, uma vez que um adequado fluxo dos sistemas é exigido para que a atividade terapêutica ou

as funções cosméticas do produto sejam asseguradas (CORRÊA *et al*, 2005; ALVES, 2006).

A reologia é a área da física que analisa a viscosidade, plasticidade, elasticidade, o escoamento e as deformações de um material sobre ação de forças, estando o sistema no estado sólido, líquido ou gasoso. Desta forma, a viscosidade é uma expressão da resistência ao fluxo de um fluido, sendo que quanto maior a viscosidade maior a resistência do líquido para escoar (ALVES, 2006).

Portanto, a *reologia* é o estudo da deformação e do escoamento da matéria, enquanto que a resistência de um fluido ao escoamento é chamada *viscosidade* (ALVES, 2006).

O comportamento reológico de um sistema e a determinação da viscosidade são utilizados com a finalidade de quantificar em produtos semi-sólidos, os efeitos provocados pelo tempo, temperatura e pela incorporação de substâncias ativas. Os estudos reológicos podem contribuir para avaliar a influencia que os processos de fabricação exercem nos produtos, bem como fornecer informações sobre as propriedades estruturais, estabilidade, absorção, características sensoriais e desempenho dos mesmos.

Assim, as características reológicas de um produto definem várias situações práticas, como a facilidade com a qual o material pode ser retirado de uma embalagem, pressionado em um tubo ou espalhado sobre a pele (ALVES, 2006).

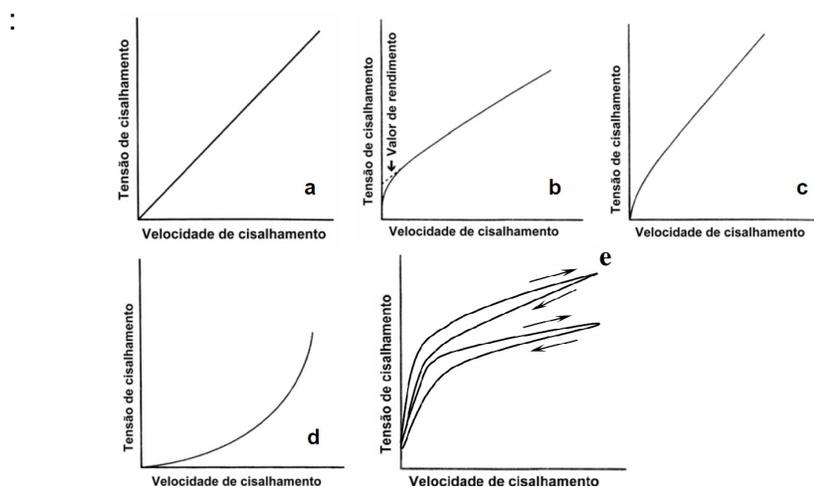
Em resposta a uma força externa, os materiais podem apresentar comportamento ideal de um sólido elástico ou de um líquido viscoso. O primeiro é descrito pela *lei de Hooke*, enquanto que um líquido viscoso ideal obedece à *lei de Newton*. No entanto, todos os sistemas de biopolímeros têm comportamento intermediário, com elementos de sólido elástico e de líquido viscoso em resposta a deformação. Esses sistemas são chamados de *viscoelásticos* (CORRÊA *et al*, 2005; ALVES, 2006).

De acordo com o comportamento assumido pelos sistemas, os fluidos podem ser classificados em fluidos newtonianos e não newtonianos.

## FLUIDOS NEWTONIANOS

O fluxo newtoniano é caracterizado por apresentar viscosidade constante, independente da taxa de cisalhamento figura 11a.

Figura 11 – Tipos de comportamentos reológicos (a) Fluido Newtoniano, (b) Fluido com comportamento Plástico, (c) Fluido com comportamento Pseudo-plástico, (d) Fluido com comportamento dilatante e (e) Curva de escoamento tixotrópico.



ALVES (2006)

Segundo a lei de Newton, para os líquidos ideais, a tensão de cisalhamento é diretamente proporcional à taxa de cisalhamento. Desta forma, para todos os valores considerados, o coeficiente angular da equação da reta corresponderá ao coeficiente de viscosidade, que é uma medida da resistência do material ao escoamento.

Para este tipo de fluido, a viscosidade é independente da velocidade de deformação, o que só é verdadeiro para líquidos ideais, ou fluidos newtonianos (CORRÊA *et al*, 2005; ALVES, 2006).

Normalmente, os materiais que apresentam comportamento newtoniano são materiais puros ou soluções de soluto de massa molar reduzida. Alguns exemplos são a água, a glicerina, tinturas e óleos vegetais utilizados em formulações farmacêuticas (ALVES, 2006).

## **FLUIDOS NÃO NEWTONIANOS**

Nos fluidos não newtonianos não se verifica uma relação linear entre a tensão de cisalhamento e a taxa de cisalhamento aplicada. Este comportamento é observado em muitos sistemas de interesse farmacêutico, tais como suspensões, emulsões, pomadas e géis. Geralmente, não é possível caracterizar um sistema não newtoniano de uma única medida. A extensão das interações entre as partículas é a principal responsável pela complexidade do comportamento reológico das preparações. Assim, os fluidos podem assumir vários comportamentos, determinando diferentes tipos de reogramas: plástico, pseudoplástico ou dilatante (CORRÊA *et al*, 2005; ALVES, 2006).

## **COMPORTAMENTO PLÁSTICO**

Nos sistemas que apresentam comportamento plástico existe a necessidade de uma força para iniciar o fluxo das camadas moleculares, demonstrado na figura 11b. O fluxo plástico está relacionado à presença de partículas floculadas em suspensões concentradas. O valor da tensão de cisalhamento limite está presente devido às interações entre as partículas adjacentes pelas forças de Van der Waals, que devem ser rompidas antes do fluxo começar a escoar. Consequentemente, o valor de cedência é uma indicação do grau de floculação, uma vez que um aumento na estrutura requer uma força maior para que o fluxo do sistema seja iniciado.

Algumas suspensões poliméricas espessas apresentam comportamento viscoelástico mais complexo, ou seja, pseudoplastia acima da tensão de cisalhamento limite (ALVES, 2006).

## **COMPORTAMENTO PSEUDOPLÁSTICO**

Nos sistemas com comportamento pseudoplástico o fluxo é iniciado e a viscosidade varia com o aumento da tensão, ou seja, o material começa a fluir quando uma tensão de cisalhamento é aplicada conforme ilustrado na figura 11c (ALMEIDA; BAHIA, 2003).

Vários sistemas coloidais, especialmente soluções poliméricas, dispersões floculadas, formas semissólidas contendo concentrações significativas de metilcelulose, CMC, carbômero, alginatos e várias gomas, tornam-se fluidas quando agitadas. Neste tipo de sistema ocorre uma diminuição da resistência do material ao escoamento com o aumento da velocidade de deformação.

Formulações farmacêuticas e cosméticas, como géis, emulsões e suspensões constituídos com partículas de diâmetros inferiores a 1 $\mu$ m apresentam este tipo de comportamento.

A pseudoplastia é reversível em certo grau, ou seja, em repouso por um tempo suficiente, o fluido recupera a maior parte da sua forma original (ALVES, 2006).

## **COMPORTAMENTO DILATANTE**

O comportamento dilatante apresentado por alguns sistemas caracteriza-se pelo aumento da viscosidade quando a tensão de cisalhamento é aumentada conforme mostrado na figura 11d. Em repouso, as partículas estão muito próximas e encontram-se envolvidas com um volume mínimo de líquido. Os espaços interpartículas são reduzidos e a quantidade de veículo presente é apenas o

necessário para os preencher. Quando a suspensão é agitada, o espaço entre as partículas aumenta e a quantidade de veículo torna-se insuficiente para assegurar a lubrificação de todas as partículas. Isto resulta em um aumento da resistência ao escoamento e, conseqüentemente, da viscosidade, com o aumento da taxa de cisalhamento. Este sistema é caracterizado pelo aumento de volume (ALVES, 2006).

## **TIXOTROPIA**

A tixotropia pode ser representada quantitativamente pelo *loop* de histerese que se caracteriza pela área entre as curvas ascendente e descendente calculada pelo reograma (gráfico da tensão versus taxa de cisalhamento) e ilustrado na figura 11e.

É um fenômeno que ocorre frequentemente nos sistemas dispersos. Caracteriza-se pela diminuição da viscosidade em função do tempo de deformação, sendo uma propriedade desejável em sistemas farmacêuticos e cosméticos. Os géis produzidos por polissacarídeos de elevada massa molecular, estabilizados por um grande número de ligações secundárias, são um exemplo.

Estes sistemas sofrem reorganização sob cisalhamento, reduzindo a estrutura tridimensional a uma estrutura dimensional. Os produtos tixotrópicos geralmente apresentam uma consistência maior na embalagem, podendo ser facilmente removidos do frasco e espalhados no local da aplicação, após sofrer ação de uma força mínima (*yield stress*). As partículas são mantidas em suspensão, sendo este comportamento adequado para emulsões, cremes, loções e pomadas.

Por sua vez, a antitixotropia é o aumento da viscosidade com o tempo de deformação. Geralmente, a tixotropia e antitixotropia são reversíveis. O fluido retorna à sua viscosidade inicial e estrutura original, após algum tempo, quando a deformação é cessada, sendo esta recuperação rápida ou lenta. A medida desta recuperação é dada pela área sob a curva de histerese (ALVES, 2006).

Os equipamentos que medem as propriedades viscoelásticas de sólidos, semi-sólidos e fluidos são chamados reômetros, que são normalmente rotacionais. Os equipamentos limitados apenas à medida do comportamento de fluxo viscoso são

denominados viscosímetros. Eles podem ser rotacionais, capilares e do tipo “queda de bola” (ALMEIDA; BAHIA, 2003).

A determinação das propriedades viscoelásticas de materiais pode ser realizada através de testes estáticos ou dinâmicos. Grande parte das caracterizações reológicas é realizada em escoamento em estado estacionário, já que convencionalmente, a viscosidade é vista como a propriedade mais importante do material. Nos testes estáticos, uma tensão é imposta e mantida constante durante o teste, e a variação da deformação é medida em função do tempo (ALMEIDA; BAHIA, 2003).

Quando um fluido Newtoniano é submetido a um escoamento, a viscosidade,  $\eta$ , é a constante de proporcionalidade entre a tensão de cisalhamento,  $\tau$ , e a taxa de deformação,  $\dot{\gamma}$ , como apresentado na equação 1:

$$\tau = \eta \cdot \dot{\gamma} \quad (1)$$

Desde que a unidades de  $\tau$  (força/área) é (Pa), a unidade de  $\dot{\gamma}$  é ( $s^{-1}$ ) e a unidade da viscosidade é (Pa.s) no S.I. (Sistema Internacional) (ALMEIDA; BAHIA, 2003).

Dentre as propriedades viscoelásticas determinadas nos testes dinâmicos estão o módulo de armazenamento ou de elasticidade ( $G'$ ), o módulo de perda ou de viscosidade ( $G''$ ) e o ângulo de fase, normalmente calculado como  $\tan \delta = G''/G'$  (MENDIETA-TABOATA *et al*, 2008).

O módulo de elasticidade ( $G'$ ) e o módulo de perda ( $G''$ ) representam, respectivamente, os graus relativos em que um material consegue se recuperar com uma resposta elástica ou com uma resposta viscosa, à medida que a taxa de deformação (frequência) muda.  $G'$  e também  $G''$  aumentam linearmente com o aumento da frequência, mas  $G''$  aumenta mais rapidamente que o outro (MENDIETA-TABOATA *et al*, 2008).

Nos géis, a resposta elástica ( $G'$ ) predomina sobre o fluxo viscoso ( $G''$ ) e nenhum módulo apresenta dependência significativa da frequência (MENDIETA-TABOATA *et al*, 2008).

O grau de reticulação e a concentração do gel desempenham um importante papel na definição de  $G'$ ,  $G''$ , e muitas empresas utilizam estes parâmetros para avaliar a dureza de seus produtos (KABLIK *et al*, 2009).

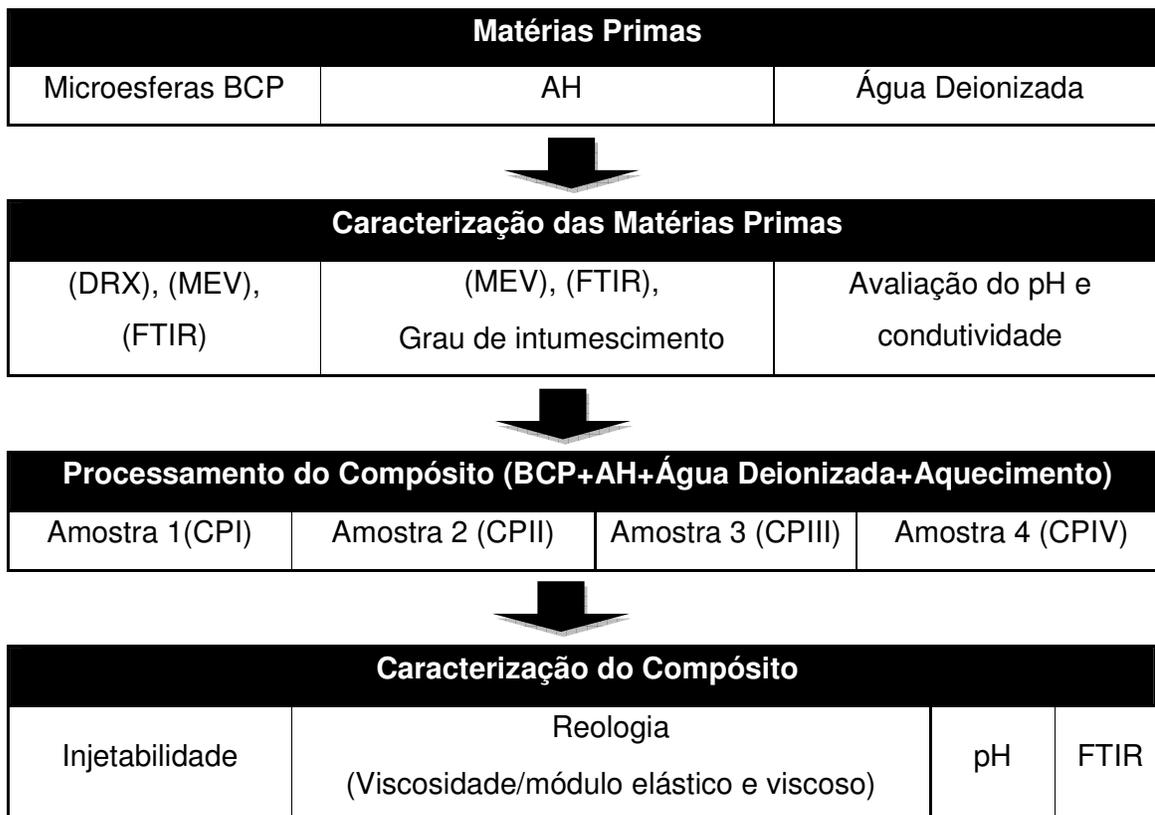
A maioria dos géis utilizados nas áreas médica e cosmética são viscoelásticos, e podem ser avaliados usando testes dinâmicos também através do módulo complexo ou viscosidade complexa ( $G^*$ ), que define a resistência total do material. A deformação  $G^*$  pode ser definida como a soma dos módulos  $G'$  e  $G''$ . Géis mais concentrados produzem maior emaranhamento molecular e, portanto, aumentam o módulo  $G^*$  (MENDIETA-TABOATA *et al*, 2008).

Um gel com um baixo grau de reticulação, mas com alta concentração de polímero pode apresentar um módulo similar ao de um gel de baixa concentração e alto grau de reticulação. O aumento do grau de reticulação torna a rede mais emaranhada, as ligações mais próximas e, portanto o gel mais rígido ( $> G'$ ). Géis de AH com grupos pendentes não formam uma rede reticulada e assim, apresentam um pequeno efeito no módulo  $G^*$ . Os valores de  $G'$  e  $G''$  quando plotados como função da frequência podem fornecer importantes informações sobre a estruturas do gel (KABLIK *et al*, 2009).

## 4 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

As etapas do desenvolvimento do trabalho estão organizadas no fluxograma abaixo:

Figura 12 – Fluxograma das etapas de trabalho



(Da autora)

### 4.1 MATERIAIS

As matérias-primas para processamento dos compósitos utilizadas neste estudo foram:

- Microesferas de fosfato de cálcio bifásico (BCP) na proporção 90:10 em peso de hidroxiapatita ( $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ) +  $\beta$ -TCP ( $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ) apresentando faixa de distribuição de diâmetro menor que  $38\mu\text{m}$ , classificadas por coluna de peneiramento pela escala Tyler com malhas entre 37 a 53 microns, produzidas pela doutoranda *Rachel M. Osthues* (OSTHUES, 2012) através da técnica de imiscibilidade de

líquidos, a qual encontra-se em fase final de pedido de patente. Estas microesferas foram produzidas na empresa Inside Materiais Avançados Ltda, com a biocerâmica produzida e doada pela mesma.

- Ácido hialurônico (AH) sintético, em pó, obtido a partir da fermentação de bactérias produzido por Chengzhi Life Science, PM 1500kDa, pH 6,52 adquirido da empresa Via Farma Importadora Ltda. do Brasil. As especificações de qualidade são garantidas pelo certificado de análises emitido pela empresa fabricante e pela empresa distribuidora (anexo).

- Água deionizada com pH de  $(6,2 \pm 0,5)$  e condutividade de  $(1,2 \pm 0,1) \mu\text{S/cm}$  a  $25^\circ\text{C}$ .

## **4.2 METODOLOGIA**

### **4.2.1 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DAS MATÉRIAS-PRIMAS**

Objetivando determinar algumas propriedades físico-químicas das matérias-primas utilizadas, foram realizadas as seguintes técnicas de caracterização:

#### **4.2.1.1 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA - MEV**

A análise morfológica (forma e tamanho dos grânulos) das microesferas de BCP e do polímero puro de AH (pó) foi realizada através de microscópio eletrônico de varredura (MEV) acoplado com uma espectrometria de energia dispersiva de raios X (EDS) marca Shimadzu modelo Superscan SSX – 550. Ambos os pós foram recobertos com ouro no Laboratório de Caracterização do Centro Federal de Educação Tecnológica de Minas Gerais (CEFET-MG).

#### **4.2.1.2 DIFRATOMETRIA DE RAIOS X - DRX**

Para confirmação da composição das fases e do grau de cristalinidade, as microesferas de BCP foram analisadas por DRX utilizando difratômetro da marca Shimadzu modelo XRD 7000 do Laboratório de Caracterização do Centro Federal de Educação Tecnológica de Minas Gerais (CEFET-MG). O difratômetro foi operado com radiação de  $\text{CuK}\alpha$  ( $\lambda = 1,5418 \text{ \AA}$ ), tensão de 30kV e corrente de 15 a 40mA. Não foi necessário preparo prévio das amostras. Estas foram apenas ligeiramente pressionadas em uma bandeja de amostra de alumínio utilizando uma lâmina de vidro (75 × 25mm) para gerar uma heterogeneidade na orientação cristalográfica. Os dados da curva de DRX foram coletados em intervalos angulares contínuos de 1 a 100 graus em  $2\theta$  com tamanho de passo de 0,02 graus a cada 40s. O ensaio foi realizado à temperatura ambiente. As difrações obtidas foram comparadas com a base de dados ICDD (International Center for Diffraction Data) para identificação das fases.

#### **4.2.1.3 ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER - FTIR**

Para a confirmação de sua composição química, as microesferas de BCP e o polímero puro de AH (pó) foram analisados por espectroscopia de infravermelho utilizando espectrofotômetro Nicolet Thermo Scientific 380 com cristal de seleneto de zinco (ZnSe) do Departamento de Química do Centro Federal de Educação Tecnológica de Minas Gerais (CEFET-MG) com espectro entre  $400 - 4000\text{cm}^{-1}$ , e com resolução de  $4\text{cm}^{-1}$  e 32 escaneamentos.

#### **4.2.1.4 GRAU DE INTUMESCIMENTO**

Para avaliação da capacidade de absorção de água dos géis em função do tempo, as massas de hidrogéis reticulados de AH utilizadas para produção dos compósitos, massa de gel seco (ms), foram imersas em água e deixadas intumescer até o

equilíbrio (ficarem totalmente inchados), a 25°C por 72 horas. Em seguida, o gel intumescido foi colocado sobre um papel de filtro nos períodos de tempo de 5, 10, 15, 20, 25, 30, 60 minutos e depois de 12, 24, 48 e 72 horas, para retirada da água não ligada. Então, foram pesados para a obtenção da massa de gel intumescido ( $m_i$ ) de acordo com Shu e colaboradores (2004). A razão de intumescimento do polímero ( $RI_{AH}$ ) e a razão de intumescimento do gel ( $Q$ ) foram calculadas de acordo com as equações 2 e 3 respectivamente:

Razão de intumescimento do polímero:

$$(RI_{AH}) = (m_i - m_s) / m_s \quad (2)$$

Razão de intumescimento do gel:

$$(Q) = m_i / m_s \quad (3)$$

O conteúdo total de água no equilíbrio foi calculado de acordo com a equação 4.

Conteúdo de água total no equilíbrio (%):

$$(CAT) = [(m_i - m_s) / m_i] \times 100 \quad (4)$$

As amostras foram testadas em triplicata. Os valores de média foram calculados para análise estatística.

Os dados foram analisados empregando-se estatística descritiva e inferencial. Para análise estatística foi utilizado o software SPSS, versão 11.0 e Microsoft Excel. As variáveis quantitativas foram descritas através de média e desvio padrão. Os resultados foram apresentados em tabelas. Para comparação entre mais de dois grupos utilizou-se ANOVA e o teste Post Hoc de Tukey. Para comparação entre dois grupos utilizou-se o teste t de student. O nível de significância adotado foi de 5%.

#### **4.2.2 PREPARO DO COMPÓSITO**

Os compósitos foram preparados com uma proporção da ordem de 75:25 em peso de gel de ácido hialurônico (AH) e microesferas de fosfato de cálcio bifásico (BCP). Primeiramente géis com concentrações de 37, 30, 24 e 18 mg/ml de AH/água foram

preparados dissolvendo as quantidades correspondentes de AH em 40ml de água deionizada. A mistura foi feita a temperatura ambiente, sob agitação manual constante com bastão de vidro até a completa homogeneização e formação de um gel sem grumos. O pH de  $7,1 \pm 0,1$  para cada amostra foi ajustado com NaOH 0,25N. As amostras foram aquecidas a 125°C durante 45 e 90 segundos para promover a reticulação física por aquecimento logo após o preparo de cada formulação. Em seguida, as amostras foram rapidamente resfriadas em banho de gelo até a temperatura ambiente ( $\sim 25^\circ\text{C}$ ). Posteriormente para processamento do compósito foram incorporadas as microesferas de BCP com tamanho menor que 38 microns ao hidrogel reticulado misturando e homogeneizando manualmente com bastão de vidro.

Cada grupo de amostra de compósitos CPI (37mg/mL), CPII (30 mg/mL), CPIII (24 mg/mL) e CPIV (18 mg/mL) foi processado em triplicata de acordo com os procedimentos experimentais propostos, nas quantidades necessárias para as etapas de caracterização físico-química, mantendo a proporção da ordem de 75:25 em peso de gel de ácido hialurônico (AH) e microesferas de fosfato de cálcio bifásico (BCP).

### **4.2.3 CARACTERIZAÇÃO DO COMPÓSITO**

#### **4.2.3.1 DETERMINAÇÃO DA VISCOSIDADE**

O comportamento reológico de cada compósito em resposta a uma força de cisalhamento aplicada foi medido utilizando um reômetro de placas modelo (Brookfield R/S-CPS Rheometer®) da Fundação Centro Tecnológico de Minas Gerais (CETEC). Foram caracterizadas as propriedades dos materiais em regime permanente e em regime oscilatório. O sistema foi termostatizado a 25°C (temperatura ambiente) e 37°C (temperatura fisiológica) por um banho circulatório. Foram escolhidas estas temperaturas para comparação do comportamento reológico do material nas duas condições. Cada amostra foi comprimida entre duas placas circulares, de forma que a placa inferior foi forçada a girar, enquanto uma tensão rotacional variável foi aplicada ao material. As medidas oscilatórias foram

conduzidas com uma tensão de oscilação de 1,188Pa, em uma faixa de frequência de 0,1 a 200rad/s. O tempo de análise foi de 60 segundos para a curva ascendente e 60 segundos para curva descendente para um total de 30 leituras. As medidas em regime permanente foram efetuadas com taxas de cisalhamento entre 0,1 a 30s<sup>-1</sup>.

Misturas com proporções compósito/AH fluido de 80:20 e 70:30 em massa foram preparadas para facilitar a realização dos ensaios reológicos dos materiais propostos neste estudo. O fluido de AH (1%) foi preparado misturando 0,5g do AH em pó com 50mL de água destilada sob agitação manual constante até homogeneização completa.

Os resultados do ensaio estático estabeleceram a viscosidade em função da tensão aplicada para cada produto. Já os resultados do ensaio dinâmico de cada amostra permitiram obter a viscosidade ou módulo de perda (G'') e a elasticidade (firmeza) ou módulo de armazenamento (G') em função da frequência para os produtos estudados.

#### **4.2.3.2 INJETABILIDADE – EXTRUSÃO**

A injetabilidade do hidrogel puro e do compósito foi avaliada utilizando um dispositivo de injeção desenvolvido segundo o modelo proposto por ALVES (2008) que consiste de um êmbolo oco (peso morto) para contenção de água (controle da pressão da aplicação) e um mancal, ambos devidamente nivelados na vertical através de um suporte. O êmbolo apoia-se em uma seringa de polipropileno de 3mL BD Plastipak ® produzida por Becton Dickinson Ind. Cirúr. Ltda., Curitiba, Brasil, conectada a uma agulha hipodérmica BD Plastipak ®. As medidas foram realizadas utilizando três diâmetros diferentes de agulha, 22G (gauge), 26G e 30G. O dispositivo é mostrado nas figuras 13a e 13b.

Esta metodologia se baseia na quantificação das massas residuais de material retidas na seringa após a aplicação instantânea de uma força padrão de 50N num período de tempo de injeção pré-estabelecido (ALVES, 2008), neste caso, 5 segundos. A força de 50N utilizada para empurrar o êmbolo da seringa foi

estabelecida de acordo com a força máxima que a mão humana é capaz de aplicar com os dedos em uma seringa descartável de 3 ml e considerando que na prática médica, as forças empregadas são bastante inferiores devido à baixa viscosidade dos produtos injetados (ALVES, 2008).

As etapas do procedimento compreenderam a pesagem da seringa vazia, o preenchimento da seringa com o material, pesagem da massa total, o posicionamento correto da seringa no dispositivo, a liberação do peso morto sobre o êmbolo da seringa e a pesagem final da seringa. As diferentes formulações propostas foram injetadas através da aplicação de uma força instantânea constante de 50N sobre o êmbolo da seringa, permitindo a saída do material pelo orifício frontal da agulha.

Figura 13 - Dispositivo de injetabilidade (a) - visão anterior do dispositivo de injetabilidade mostrando o suporte, o êmbolo oco e a seringa. (b) dispositivo de injetabilidade montado com todos os seus componentes.



(Da autora)

A cada medida foi utilizado novo conjunto de seringa e agulha. Todas as medidas de massa foram realizadas sem a agulha, sendo considerada injetada a quantidade de material remanescente dentro da mesma.

Para cada injeção foi realizada a pesagem da massa da seringa vazia (M0), da massa da seringa cheia (M1), e da massa da seringa após injeção (M2). Assim, para todas as formulações avaliadas, a injetabilidade do compósito em porcentagem foi calculada a através da equação 5.

$$\text{Injetabilidade(\%)} = \frac{(M1 - M0) - (M2 - M0)}{(M1 - M0)} \times 100 \quad (5)$$

As amostras foram testadas em triplicata e os resultados foram expressos em porcentagem de massa expelida a partir da cânula sob uma força constante. Os dados foram analisados empregando-se estatística descritiva e inferencial. Para análise estatística foi utilizado o software SPSS, versão 11.0 e Microsoft Excel. As variáveis quantitativas foram descritas através de média e desvio padrão. Os resultados foram apresentados em tabelas. Para comparação entre mais de dois grupos utilizou-se ANOVA e o teste Post Hoc de Tukey. Para comparação entre dois grupos utilizou-se o teste t de student. O nível de significância adotado foi de 5%.

#### **4.2.3.3 MEDIDA DO pH DO COMPÓSITO**

O potencial hidrogeniônico (pH) dos compósitos foi medido utilizando o mesmo método e equipamento descritos anteriormente para a água deionizada.

#### **4.2.3.4 ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER – FTIR**

Para confirmar a composição química dos compósitos e determinar a modificação química do AH após a reação de reticulação, foi realizada espectroscopia de

infravermelho utilizando espectrofotômetro Nicolet Thermo Scientific 380 com cristal de seleneto de zinco (ZnSe) do Departamento de Química do Centro Federal de Educação Tecnológica de Minas Gerais (CEFET-MG) com espectro entre 400 – 4000 $\text{cm}^{-1}$ , com resolução de 4 $\text{cm}^{-1}$  e 32 escaneamentos da amostra CP111.

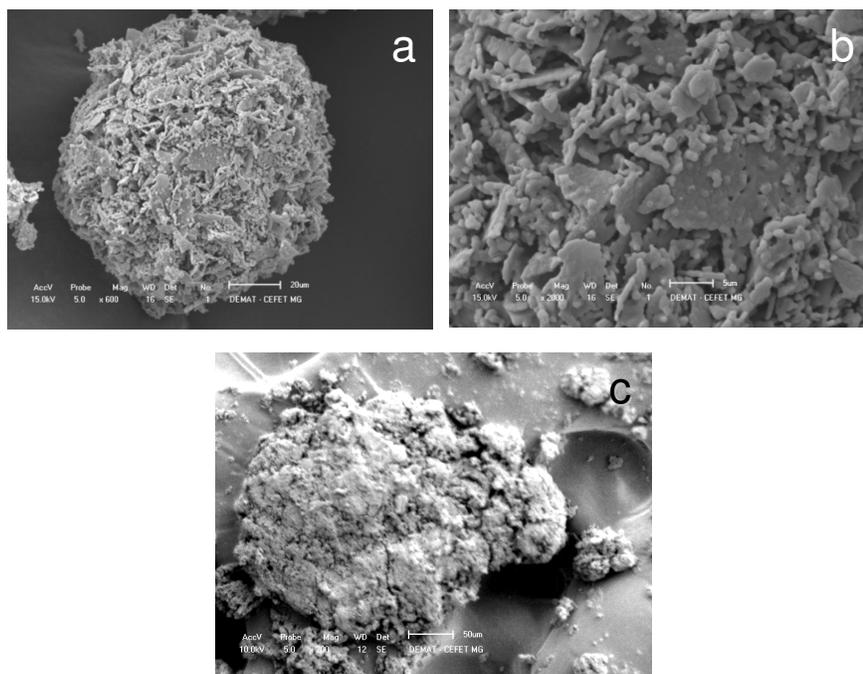
## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 CARACTERIZAÇÃO DAS MATÉRIAS-PRIMAS

#### 5.1.1 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA - MEV

As microesferas de BCP e o polímero puro foram analisados por MEV e a figura 14 apresenta as imagens características destes materiais. Os pós apresentaram morfologias diferentes, sendo a do BCP de forma esférica e superfície rugosa, enquanto a presença de aglomerados caracteriza o AH. A figura 14a mostra uma esfera com diâmetro de 38 $\mu$ m, com uma superfície rugosa, micro e macroporos interconectados na superfície da partícula que permite a penetração de fluidos, células, tecidos e vascularização e a figura 14b, a superfície da partícula de BCP. O AH está ilustrado na figura 14c.

Figura 14 – Micrografia dos pós de partida: (a) Imagem da partícula de BCP; (b) Superfície da partícula de BCP; (c) Imagem do AH pó.

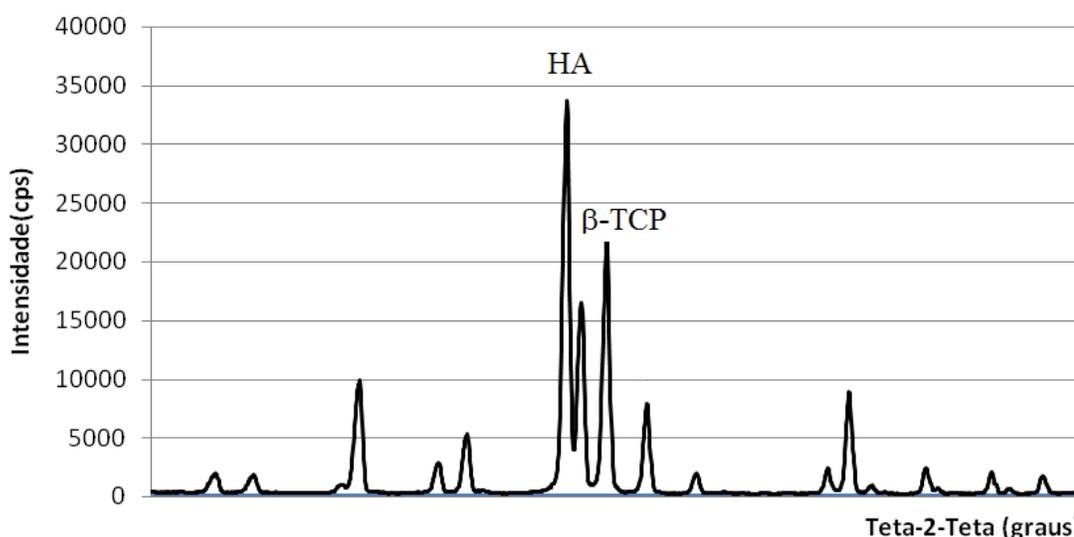


(Da autora)

### 5.1.2 DIFRATOMETRIA DE RAIOS X - DRX

A figura 15 mostra o difratograma obtido a partir do pó de BCP. Os resultados apresentaram um perfil de difratometria com picos indicativos de hidroxiapatita, fase majoritária e traços de beta fosfato tricálcico, confirmando tratar-se de microesferas do composto BCP, concordantes com Legeros e colaboradores (2003).

Figura 15 - Difratograma das microesferas de BCP



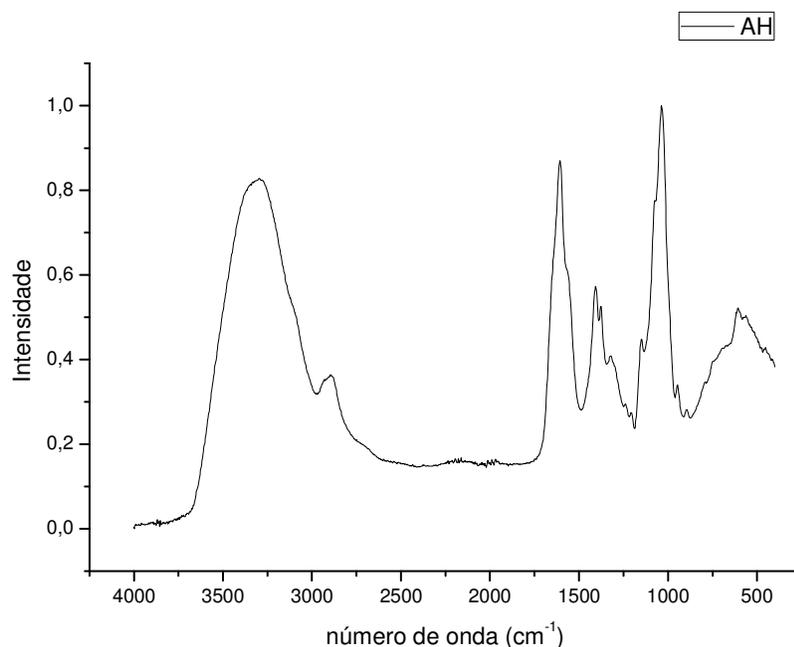
(Da autora)

### 5.1.3 ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER – FTIR

O espectro de infravermelho do pó de ácido hialurônico (AH) na faixa espectral de  $4000-400\text{cm}^{-1}$  está mostrado na figura 16a. Os resultados da análise revelaram a presença de picos característicos deste material. A banda a  $600\text{cm}^{-1}$  corresponde às vibrações das moléculas de água residual; a banda  $950-1200\text{cm}^{-1}$  corresponde às vibrações de estiramento (-COH) dos alcoóis; o alongamento  $1400\text{cm}^{-1}$  é atribuído ao grupo (-CO) ou (COO<sup>-</sup>); o pico em  $1500-1700\text{cm}^{-1}$  corresponde à superposição entre as bandas amida I e II e várias bandas dos grupos carbonila e carboxila (C=O);

a banda  $1617\text{ cm}^{-1}$  é atribuída ao grupo (-COONa); o alongamento  $2700\text{-}3600\text{ cm}^{-1}$  corresponde às bandas de estiramento (NH) e (OH) dos grupos envolvidos nas ligações de hidrogênio e a  $2900\text{ cm}^{-1}$  o pico atribuído ao estiramento (CH).

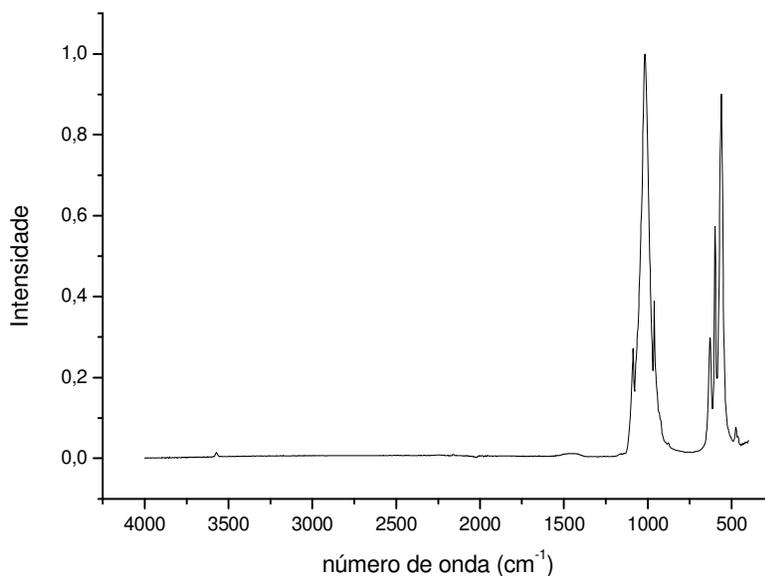
Figura 16a - Espectro FTIR do AH



(Da autora)

Os resultados da análise de Espectroscopia de Infravermelho (FTIR) das microesferas de BCP na faixa espectral de  $4000\text{-}400\text{ cm}^{-1}$  apresentados na figura 16b revelaram picos característicos de grupos ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) em bandas de 570, 630, 961, 1049 e  $1090\text{ cm}^{-1}$ . A banda discreta em aproximadamente  $3579\text{ cm}^{-1}$  é característica de vibrações do grupo hidroxila. Os difratogramas do ácido hialurônico (AH) e das microesferas de BCP confirmaram a constituição química destes materiais pela presença das bandas de absorção características da sua estrutura.

Figura 16b - FTIR das microesferas de BCP



(Da autora)

#### 5.1.4 GRAU DE INTUMESCIMENTO

O grau de intumescimento ou capacidade de absorção de água é uma das mais importantes propriedades dos biomateriais utilizados como enchimento dérmico ou aplicados para aumento de tecidos moles e está relacionada com a estrutura interna destes materiais.

Segundo Hoffman (2002), as medidas da capacidade de intumescimento são importantes porque a natureza da água em um gel pode determinar sua permeação de nutrientes e produtos celulares. Géis de AH podem absorver grandes quantidades de água, sendo que a capacidade de intumescimento destes géis varia conforme os produtos e é dependente da concentração, densidade de reticulação e do processo de preparação do gel (KABLIC, 2009).

As medidas do conteúdo de água dos hidrogéis até o equilíbrio, assim como as razões de intumescimento do polímero ( $RI_{AH}$ ) e dos géis (Q), calculadas pelas equações (2), (3) e (4) estão apresentadas nas tabelas 6, 7 e 8, respectivamente.

A análise de variância realizada para os dados obtidos para cada grupo de amostra indicou diferença significativa entre as médias do grau de intumescimento dos géis nos momentos diferentes. Portanto, procedeu-se ao teste de Tukey para a comparação das médias. Observou-se que as médias de todos os grupos de géis diferiram entre si ( $p \leq 0,05$ ), sendo que as médias variaram entre 77,5% e 96,9% e o gel com menor concentração de AH (18mg/ml) inchou mais comparado aos demais.

Tabela 5 - Grau de intumescimento (%) dos géis de AH reticulados até o equilíbrio

Tempo	Massa de AH (mg)				Valor P
	37 CPI**	30 CPII**	24 CPIII**	18 CPIV**	
	$\bar{x} \pm s$	$\bar{x} \pm s$	$\bar{x} \pm s$	$\bar{x} \pm s$	
05 min.	77,46 ± 0,02	90,57 ± 0,02	94,19 ± 0,01	95,37 ± 0,03	0.000*
10 min.	79,57 ± 0,01	92,82 ± 0,02	94,34 ± 0,01	95,43 ± 0,02	0.000*
15 min.	80,76 ± 0,01	92,87 ± 0,02	95,52 ± 0,01	96,23 ± 0,02	0.000*
20 min.	85,83 ± 0,02	93,89 ± 0,02	95,96 ± 0,01	96,32 ± 0,01	0.000*
25 min.	85,87 ± 0,01	93,92 ± 0,01	96,42 ± 0,02	96,77 ± 0,01	0.000*
30 min.	85,91 ± 0,01	93,94 ± 0,01	96,45 ± 0,01	96,91 ± 0,02	0.000*
60 min.	85,93 ± 0,01	93,93 ± 0,01	96,45 ± 0,02	96,92 ± 0,03	0.000*
12 h	85,92 ± 0,02	93,93 ± 0,02	96,44 ± 0,02	96,94 ± 0,01	0.000*
24 h	85,93 ± 0,01	93,94 ± 0,01	96,45 ± 0,01	96,92 ± 0,02	0.000*
48 h	85,91 ± 0,03	93,93 ± 0,02	96,44 ± 0,02	96,93 ± 0,01	0.000*
72 h	85,92 ± 0,01	93,95 ± 0,01	96,44 ± 0,01	96,93 ± 0,01	0.000*

Anova \*  $p \leq 0,05$  Tukey\*\*  $p \leq 0,05$

Os resultados mostraram que os géis com menores quantidades de massa de AH incharam mais (18mg/mL) indicando que havia mais espaço disponível para

absorção de água e grande disponibilidade de grupos funcionais para formação de ligações de hidrogênio com as moléculas de água. Quanto menor a quantidade de cadeias poliméricas por unidade de volume, maior a capacidade de absorver água, porque a alta densidade de cadeias poliméricas do hidrogel reduz o espaço entre cadeias que atua como reservatório para a água absorvida (KABLIC, 2009).

Contudo, os resultados do conteúdo de água total mostraram que após o equilíbrio, todos os géis são constituídos por mais de 80% de água, CPI (86%), CPII (94%), CPIII (96%) e CPIV (97%). A determinação da capacidade de absorção de água de um gel pode indicar o grau de ligações cruzadas presentes, porque normalmente o grau de intumescimento diminui com um elevado grau de ligações cruzadas (KABLIC, 2009; SUNDARAM, 2010; FREDERICKSON, 2008).

Os géis em equilíbrio ou completamente hidratados já atingiram sua capacidade de hidratação, assim, eles não vão inchar quando injetados na derme, enquanto géis não equilibrados tendem a inchar após a injeção. Portanto, deve-se considerar a possibilidade de um sub-preenchimento ou hipercorreção quando se realiza uma correção com estes géis (KABLIC, 2009). Formulações com alta concentração de AH (faixa de 20-24mg/ml) estão abaixo de seu equilíbrio de hidratação e vão intumescer um pouco mais após a injeção, por absorverem água dos tecidos adjacentes. Esta é uma característica benéfica para um preenchedor (FREDRICKON; TEZEL, 2008; SUNDARAM, 2010). Assim sendo, o comportamento de intumescimento dos géis utilizados neste estudo foi avaliado e os resultados estão mostrados a seguir, na tabela 7.

Tabela 6 - Comportamento de intumescimento dos géis reticulados com diferentes massas de AH

Massa de AH (mg)	Razão de intumescimento do ácido hialurônico reticulado ( $RI_{AH}$ )	Valor p
	$\bar{x} \pm s$	
37 CPI**	65,88 $\pm$ 0,04	0.000*
30 CPII**	122,57 $\pm$ 0,02	
24 CPIII**	186,39 $\pm$ 0,01	
18 CPIV**	325,08 $\pm$ 0,01	

Anova \* $p \leq 0,05$  Tukey\*\*  $p \leq 0,05$

Conforme os resultados do comportamento de intumescimento dos hidrogéis reticulados apresentados na tabela 7, o ácido hialurônico absorveu quantidade de água suficiente para aumentar seu volume em até 300 vezes, confirmando que este parâmetro depende do grau de reticulação, uma vez que, na presença de água, as cadeias de AH sem modificação podem expandir em volume em até 1000 vezes, segundo Kabolic (2009). O grupo de amostra CPI inchou menos, sugerindo que neste grupo ocorreu formação de maior número de ligações cruzadas.

Tabela 7 - Efeito da reticulação na razão de intumescimento dos géis com diferentes massas de AH

Massa de AH (mg)	Q					
	hidrogel sem reticulação	Valor p	hidrogel após aquecimento de 45s	Valor p	hidrogel após aquecimento de 90s	Valor p
	$\bar{x} \pm s$		$\bar{x} \pm s$		$\bar{x} \pm s$	
37 CPI**	24,32 ± 0,03	0.000*	23,14 ± 0,02	0.000*	22,05 ± 0,02	0.000*
30 CPII**	37,12 ± 0,01		34,06 ± 0,02		31,14 ± 0,01	
24 CPIII**	52,38 ± 0,02		47,86 ± 0,02		46,95 ± 0,01	
18 CPIV**	78,06 ± 0,01		71,62 ± 0,02		69,22 ± 0,02	

Anova \* p≤ 0,05      Tukey\*\* p≤ 0,05

De acordo com Kabolic (2009) e Peppas (2000), a razão de intumescimento de géis de AH alcança seu máximo de intumescimento em água, sendo que, um gel com menor número de ligações cruzadas apresenta moléculas de AH com maior comprimento entre as ligações, requerendo assim, menor força para ser deformado (gel *soft*). O aumento do grau de reticulação torna a rede mais emaranhada, as ligações mais “apertadas” e, portanto, o gel mais *firm*.

Os resultados apresentados na tabela 8 sugerem que ocorreu a formação de ligações cruzadas entre as cadeias poliméricas pelo aquecimento, porque a razão de intumescimento (Q) de AH diminuiu após o aquecimento dos géis, sendo confirmados pela análise de variância e teste de Tukey que indicaram diferença significativa entre todos os grupos de amostras. Os valores obtidos para razão de

intumescimento dos grupos de géis aquecidos por 45s são maiores que os obtidos para os grupos aquecidos por 90s. Os grupos de amostras aquecidas por 90s incharam menos e ficaram mais rígidas, enquanto as aquecidas por 45s permaneceram mais fluidas. Os resultados também indicaram que pode ter ocorrido menor quantidade de ligações cruzadas após o aquecimento por 45s, pois nestes grupos de amostras os géis apresentaram-se mais fluidos. Portanto, de acordo com os resultados, o grupo CPI é o que apresentou características de gel mais firme.

## **5.2 CARACTERIZAÇÃO DO COMPÓSITO**

### **5.2.1 CARACTERÍSTICAS FÍSICAS DO COMPÓSITO**

A quantidade de massa de AH no material influencia as propriedades reológicas e estruturais dos géis. Assim sendo, é um parâmetro que pode ser usado para controlar o grau de intumescimento e o grau de reticulação do gel de AH (FALCONE, 2006). A diminuição da massa de AH forneceu géis menos firmes, mais intumescidos, enquanto géis duros e menos intumescidos foram obtidos quando a massa de AH foi aumentada, conforme mostrado na figura 17. Estas características podem ser atribuídas ao maior emaranhamento das cadeias do polímero em géis com maior massa, porque a proximidade entre as cadeias facilita a formação de ligações cruzadas aumentando o grau de reticulação conforme explicado por Kabolic (2009).

O compósito pronto para uso também está ilustrado na figura 18.

É natural que partículas micrométricas com densidade maior que o meio da suspensão quando colocadas em um recipiente, sedimentem sob a ação da gravidade (FATIMI *et al*, 2010). No entanto, a estabilidade da suspensão é essencial para garantir as características do produto, facilitar a injetabilidade e evitar a separação de fases e a filtração por pressão da suspensão durante a injeção (FATIMI *et al*, 2010).

Figura 17- Ilustrações do compósito preparado com diferentes quantidades de massa AH - 17a – CPI; 17b- CPII; 17c – CPIII; 17d - CPIV

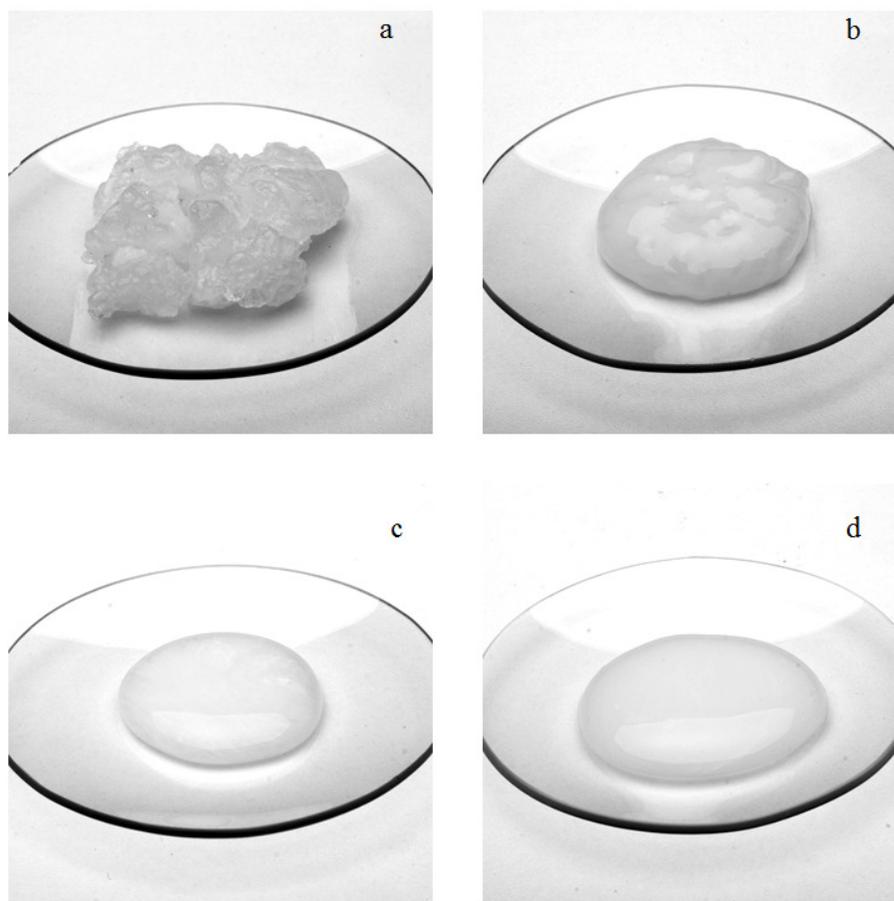
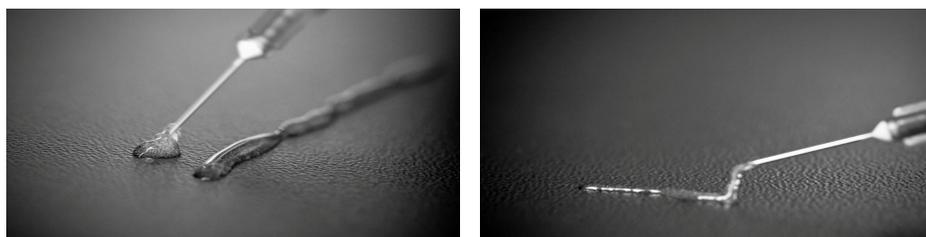


Figura 18 – Compósito CPIII (AH gel/BCP microesferas) pronto para uso



(Da autora)

Entretanto, as partículas de BCP suspensas no gel de AH sedimentaram durante o armazenamento. Detectou-se a separação das fases da suspensão, pela observação visual do limite entre as partículas de BCP sedimentadas e a fase clara do gel sobrenadante, após um período de armazenamento de 120 dias em seringas hipodérmicas plásticas de 3mL a temperatura ambiente (22-25°C). Não foi observada variação significativa das características viscoelásticas do produto durante este período de armazenamento. A figura 19 mostra esta separação de fases ocorrida.

Figura 19 – Separação das fases do compósito (AH gel/BCP microesferas)



(Da autora)

De acordo com Fatimi *et al* (2010), o processo de sedimentação envolve a concentração e geometria das partículas sólidas e a viscosidade (relacionada com a concentração) do meio de suspensão. E, para biomateriais compósitos a base de polímeros, a análise da sedimentação torna-se muito mais complicada, uma vez que o polímero pode interagir com as partículas sólidas e eventualmente, promover a agregação.

O tamanho das partículas sólidas de 30-50 $\mu$ m parece ser o tamanho ideal para materiais utilizados como enchimentos dérmicos injetáveis. Grandes o bastante para escapar da fagocitose (devem ser > 20 $\mu$ m) e ainda suficientemente pequenas para serem distribuídas de forma suave através de agulhas finas de 30G e 26G (FATIMI

*et al*, 2010). O tamanho médio das partículas de BCP de 38  $\mu\text{m}$  utilizadas neste estudo está em conformidade com a granulometria recomendada por Fatimi, bem como com o tamanho das partículas de hidroxiapatita presentes no preenchedor Radiesse<sup>®</sup> (25-45 $\mu\text{m}$ ).

Apesar da proporção de BCP ter sido a mesma em todos os grupos de amostras, observou-se que a quantidade de sedimento formado foi maior nos grupos CP III e CP IV. Estes resultados sugerem que à medida que a concentração do polímero é aumentada, a sedimentação diminui. Percebeu-se também que após a mistura das microesferas de BCP com o hidrogel de AH, ocorreu quebra das microesferas que se apresentaram irregulares na microscopia ótica. O processo de produção do compósito por homogeneização manual pode ter sido uma das causas do esfacelamento das microesferas. Diante destes resultados, é importante que outros experimentos sejam realizados para verificar a(s) causa(s) desta alteração e se isto contribuiu para ocorrer sedimentação das partículas de BCP.

### **5.2.2 DETERMINAÇÃO DA VISCOSIDADE – REOLOGIA**

A maior parte dos géis utilizados nas áreas médica e cosmética apresenta viscoelasticidade, sendo constituídos por um componente elástico (sólido) e um viscoso (líquido) podendo ser avaliados através de testes dinâmicos (FALCONE, 2006). Foram avaliadas as propriedades reológicas das misturas de compósitos com uma “solução” de AH (AH a 1% em água destilada) nas proporções 80:20 e 70:30 às temperaturas de 25°C e 37°C. As figuras 20a e 20b apresentam a viscosidade das misturas compósito/fluido plotada em função da taxa de cisalhamento às temperaturas de 25°C e 37°C respectivamente.

Figura 20a – Viscosidade versus taxa de cisalhamento das amostras de compósito a 25 °C.

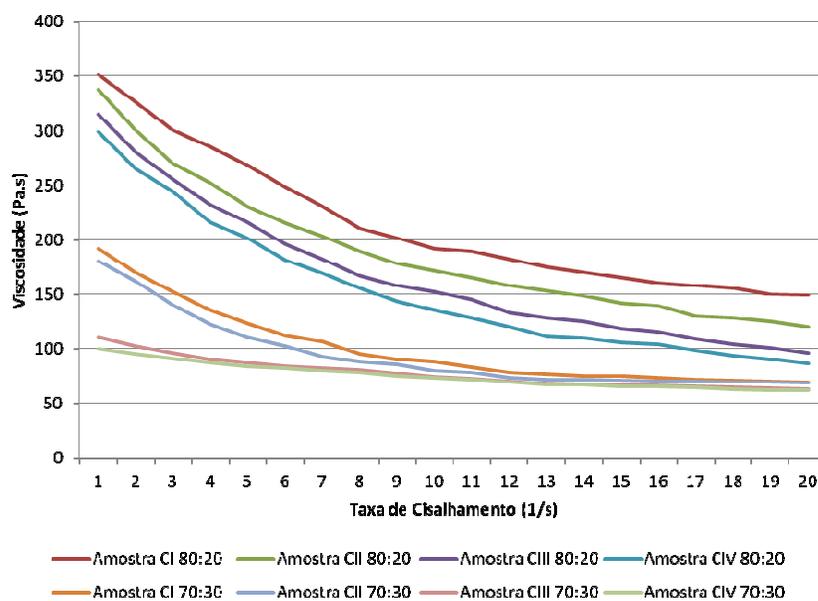
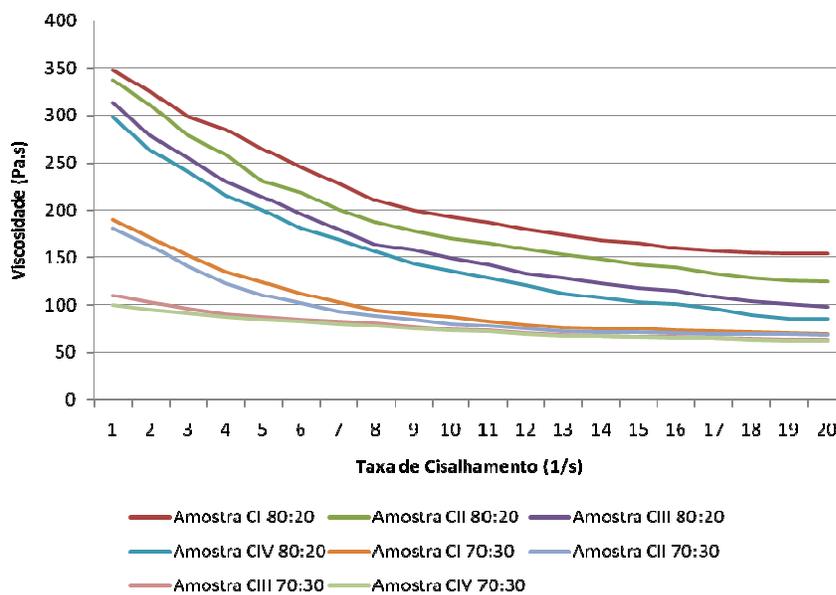


Figura 20b - Viscosidade versus taxa de cisalhamento das amostras de compósito a 37 °C



(Da autora)

As curvas de fluxo das misturas compósito/fluido mostraram uma diminuição progressiva da viscosidade com o aumento da quantidade de AH fluido adicionado resultante da diluição do material, ou seja, ocorreu diminuição da viscosidade dos materiais à medida que a concentração de AH nas formulações diminuiu.

Os materiais exibiram comportamento não-Newtoniano pseudoplástico tanto a 25°C quanto a 37°C, uma vez que a viscosidade diminuiu com o aumento da taxa de cisalhamento nas duas temperaturas. Esta característica corresponde às de um material pseudoplástico, ou seja, alta viscosidade para baixa taxa de cisalhamento, segundo Falcone (2006) e Sundaram (2010). Esta é uma característica importante para um biomaterial que será usado em sistemas injetáveis (SUNDARAM, 2010), porque apresenta similaridade com as condições fisiológicas encontradas depois de depositado na derme.

Considerando a “Lei de Potência” descrita por Ostwald ( $\eta = K \cdot \lambda^n$ ), os valores dos parâmetros  $K$  e  $n$  para as misturas compósito/fluido 80:20 e 70:30 e para o fluido AH 1% são apresentados na tabela 9. O valor de  $n$  igual a 0,85 para o fluido AH 1% indica comportamento próximo ao Newtoniano onde  $n$  é igual a 1. Os valores de  $n$  obtidos indicaram que o comportamento viscoelástico depende da razão de massa compósito/fluido.

Tabela 8 - Parâmetros determinados nas curvas de fluxo das misturas compósito/fluido

	K (mPa.s <sup>n</sup> )	n
Fluido 1%	301	0,85
Compósito/Fluido 70:30	17157	0,49
Compósito/Fluido 80:20	32221	0,42

Assim sendo, deve haver um balanço ótimo entre a mistura compósito/fluido que não influencie significativamente no tempo de residência do produto, porque, embora o aumento da porcentagem de fluido facilite a injeção do produto, este aumento pode

ocasionar uma diminuição no tempo de permanência do produto no sítio de aplicação já que o AH presente no fluido não é reticulado e é facilmente degradado.

As curvas de fluxo das misturas compósito/fluido avaliadas neste estudo não mostraram modificação significativa do comportamento reológico à temperatura de 37°C em relação ao apresentado à 25°C. Não foram encontrados na literatura estudos referentes ao efeito da temperatura de 37°C nas características reológicas do AH. Contudo, Guelcher e Hollinger (2005) descrevem uma despolimerização com consequente diminuição da massa molar média do polímero de AH em temperaturas acima de 80°C, provocando alteração de viscosidade do gel. Além disso, durante o aquecimento, o polímero também pode sofrer degradação ou decomposição que são alterações na estrutura química da molécula, sendo observada através de uma coloração amarelada do gel de AH. Nos processos de esterilização convencionais em autoclave a 121-128°C por 15-30 minutos normalmente observa-se a decomposição do gel em adição à despolimerização do AH (GUELCHER; HOLLINGER, 2005).

Os espectros de oscilação das misturas compósito/fluido, ou seja, o módulo elástico ou de armazenamento ( $G'$ ) e o módulo de perda ou fluxo viscoso ( $G''$ ) plotados em função da frequência para as misturas compósito/fluido 80:20 e 70:30 estão mostrados nas figuras 21a e 21b respectivamente.

Os resultados indicaram que os materiais propostos neste estudo apresentaram viscosidade típica de gel, dependente da concentração do polímero, de acordo com Mendieta-Taboata e colaboradores (2008), que descrevem um gel típico como aquele cuja resposta elástica ( $G'$ ) predomina sobre o fluxo viscoso ( $G''$ ), sem que nenhum módulo tenha apresentado dependência significativa da frequência, conforme pode ser observado nas figuras 21a e 21b.

Figura 21a - Espectro de oscilação da mistura compósito/fluido 80:20

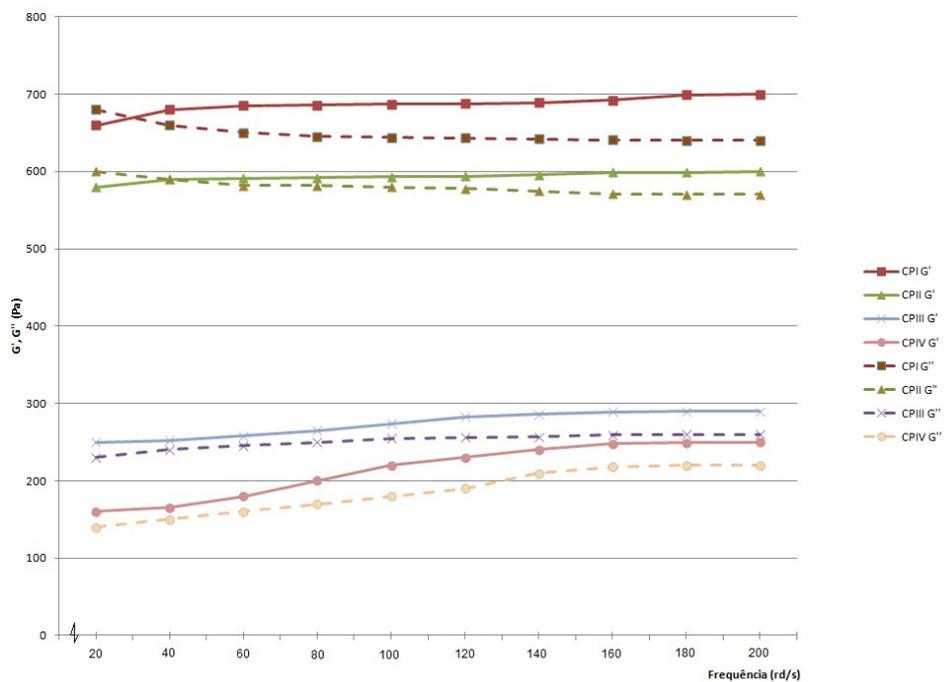
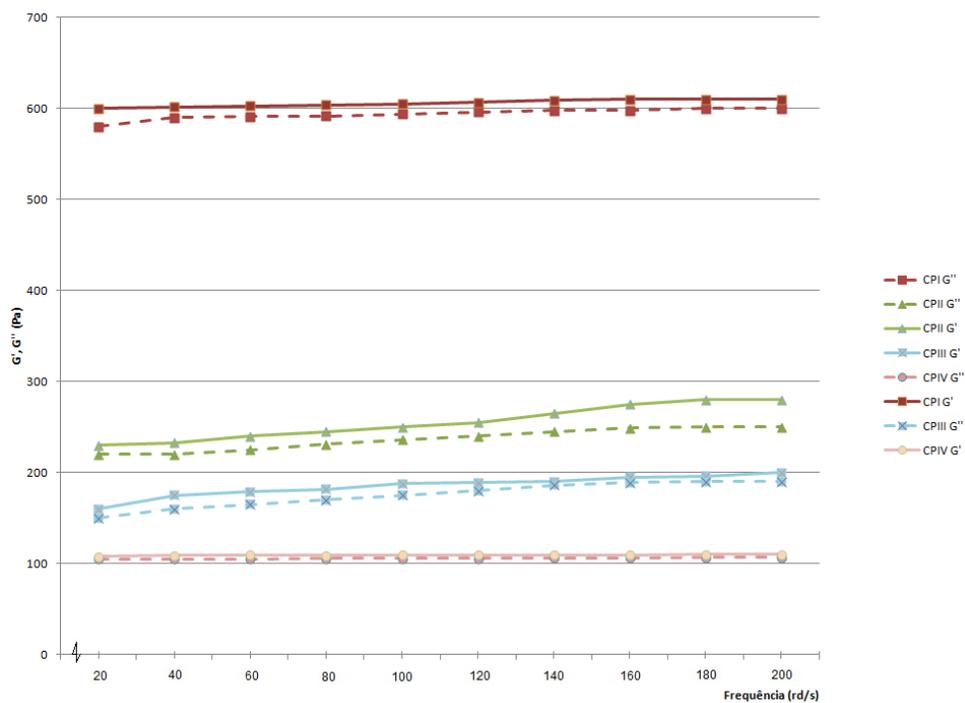


Figura 21a - Espectro de oscilação da mistura compósito/fluido 80:20



(Da autora)

Os espectros são típicos de polímero com ligações cruzadas, pois ambos os módulos, de armazenamento ( $G'$ ) e de perda ( $G''$ ), mostraram um ligeiro aumento à medida que a frequência foi aumentada conforme descrito por Barbucci (2000).

Segundo Kabolic (2009), os maiores valores do módulo de armazenamento ( $G'$ ) indicam maior grau de reticulação. Um gel com alto valor numérico para  $G'$  é mais capaz de resistir às alterações de forma e é descrito como mais firme, mais forte ou mais elástico que um gel com  $G'$  menor. Os espectros de oscilação dos compósitos de AH com diferentes concentrações mostraram um aumento do módulo  $G'$  para as amostras que apresentaram maior grau de reticulação conforme resultados apresentados anteriormente, corroborando a afirmativa de Kabolic. Assim sendo, a ordem do mais firme para o menos elástico dos compósitos propostos neste trabalho é a seguinte: CPI, CPII, CPIII e CPIV.

Clinicamente espera-se preenchedores dermais com valores maiores de  $G'$  para oferecer melhor suporte estrutural e volume. Outra propriedade importante é a viscosidade, representada por  $G''$ , que determina géis mais espessos ou mais viscosos quando apresenta valores numéricos mais elevados (KABLIC, 2009). Portanto, o material mais adequado, será o que apresentar os valores mais elevados de  $G'$  e  $G''$ . Diante dos resultados apresentados, o grupo de amostras CPI parece ser o que tem mais firmeza e mais elasticidade dentre os grupos avaliados. Entretanto, deve-se considerar também a facilidade com que este material é injetado através de agulhas de pequeno calibre, para definição de qual das amostras tem melhor potencial para ser utilizada como preenchedor dérmico.

### **5.2.3 INJETABILIDADE – EXTRUSÃO**

Como regra geral, o calibre da agulha recomendado para injetar um preenchedor de forma adequada deve ser o menor possível, visando reduzir os efeitos colaterais indesejáveis, como dor, edema, hematoma e hemorragia. O diâmetro mais utilizado pelos médicos é 30G, sendo que alguns autores recomendam também os calibres 27G e 25G (KABLIC, 2009). Desta forma, primeiramente foi avaliada a injetabilidade dos materiais (hidrogéis e compósitos) sem diluição através das agulhas de 22G, 26G e 30G. Entretanto, não foi possível a extrusão pela agulha de 30G apesar da

facilidade de manuseio do material, devido à sua elevada viscosidade. Numa segunda etapa, foi avaliada a extrusão utilizando as misturas de compósito/AH fluido (80:20 e 70:30) sendo que o material passou pelas agulhas com mais facilidade e foi possível obter uma significativa extrusão inclusive através da agulha de 30G. Os resultados foram apresentados nas tabelas 10, 11, 12 e 13 nesta ordem.

Tabela 9 - Injetabilidade (%) das amostras de hidrogel

Amostras	Hidrogéis		Valor p
	Agulha 22G	Agulha 26G	
	$\bar{x} \pm s$	$\bar{x} \pm s$	
HI	0,09 ± 0,05	0,05 ± 0,03	0.147
HII	0,10 ± 0,02	0,07 ± 0,04	0.224
HIII	0,12 ± 0,02	0,09 ± 0,02	0.132
HIV	0,17 ± 0,05	0,13 ± 0,04	0.086

Teste T\* p ≤ 0,05

Tabela 10 - Injetabilidade (%) das amostras de compósito

Amostras	Compósitos		Valor p
	Agulha 22G	Agulha 26G	
	$\bar{x} \pm s$	$\bar{x} \pm s$	
CPI	0,08 ± 0,03	0,04 ± 0,02	0.106
CPII	0,11 ± 0,02	0,06 ± 0,01	0.028*
CPIII	0,12 ± 0,03	0,08 ± 0,02	0.086
CPIV	0,16 ± 0,04	0,11 ± 0,02	0.463

Teste T\* p ≤ 0,05

Tabela 11 - Injetabilidade (%) das misturas de compósito diluídas 70:30

Amostras	Mistura 70:30 Compósito/AH fluido			Valor p
	Agulha 22G**	Agulha 26G**	Agulha 30G**	
	$\bar{x} \pm s$	$\bar{x} \pm s$	$\bar{x} \pm s$	
CPI	0,32 ± 0,03	0,20 ± 0,04	0,10 ± 0,02	0.000*
CPII	0,43 ± 0,02	0,25 ± 0,02	0,14 ± 0,02	0.000*
CPIII	0,51 ± 0,01	0,32 ± 0,02	0,20 ± 0,01	0.000*
CPIV	0,64 ± 0,02	0,43 ± 0,01	0,34 ± 0,01	0.000*

Anova\* p ≤ 0,05 Tukey\*\* p ≤ 0,05

Tabela 12 - Injetabilidade (%) das misturas de compósito diluídas 80:20

Amostras	Mistura 80:20 Compósito/AH fluido			Valor p
	Agulha 22G**	Agulha 26G**	Agulha 30G**	
	$\bar{x} \pm s$	$\bar{x} \pm s$	$\bar{x} \pm s$	
CPI	0,24 ± 0,02	0,18 ± 0,01	0,06 ± 0,01	0.000*
CPII	0,29 ± 0,02	0,21 ± 0,01	0,09 ± 0,01	0.000*
CPIII	0,37 ± 0,01	0,26 ± 0,02	0,15 ± 0,02	0.000*
CPIV	0,49 ± 0,03	0,33 ± 0,01	0,23 ± 0,02	0.000*

Anova\* p ≤ 0,05 Tukey\*\* p ≤ 0,05

Os resultados mostraram o aumento da injetabilidade e queda da resistência mecânica do hidrogel com o aumento da razão líquido/pó porque as amostras mais consistentes tiveram menor porcentagem de material injetado através dos três tamanhos de agulhas para todos os grupos de compósitos diluídos 80:20 e 70:30,

conforme foi verificado pelas diferenças significativas ( $p \leq 0,050$ ) apresentadas pela análise de variância e teste de Tukey. Neste contexto, pode-se dizer que há uma relação de proporcionalidade direta entre a razão líquido/pó e a injetabilidade, conforme Falcone (2008).

O aumento da fase fluida reduziu a força de extrusão, facilitando a aplicação do produto, tanto que tornou possível a injeção através da agulha 30G. Normalmente os fabricantes adicionam AH livre (não reticulado) como componente fluido solúvel no gel para facilitar a extrusão do preenchedor através da agulha (FALCONE, 2006; FREDERICKSON, 2008). Os resultados indicaram que a extrusão dos materiais foi influenciada pela concentração total de AH (que consiste de gel de AH insolúvel e AH livre solúvel) nas formulações, pois o grupo CPIV (18mg/ml AH) apresentou as maiores porcentagens de injetabilidade para os três diâmetros de agulhas testados, tanto no grupo de compósito diluído 80:20 quanto no diluído 70:30. Ainda comparando os dois grupos de compósito diluído, o grupo CPIV na diluição 70:30 mostrou os valores mais elevados de extrusão.

Os resultados dos ensaios de injetabilidade dos grupos de amostras de hidrogel não apresentaram diferenças significativas entre as agulhas 22G e 26G, ou seja, as porcentagens de material expelido foram similares independentemente do calibre da agulha. Enquanto as análises estatísticas dos grupos de compósitos sem diluição utilizando os mesmos diâmetros de agulhas, mostraram que apenas o grupo CPII apresentou diferença significativa comparada aos demais, (11%) e (6%) para agulhas 22G e 26G respectivamente. Este resultado também indica que não há diferença na quantidade de material injetado através das agulhas de 22G e 26G para os grupos de amostras CPI, CPIII e CPIV dos compósitos sem diluição.

Uma vez que, não houve diferença significativa para todos os grupos de amostras de compósitos entre todos os tamanhos de diâmetros das agulhas ( $p \leq 0,05$ ), pode-se considerar que a adição das microesferas de BCP no hidrogel não provocou alteração na injetabilidade deste material através das agulhas com estes calibres. Conforme o esperado, todos os grupos de amostras apresentaram melhor fluidez com a agulha de maior diâmetro (22G).

Os resultados de extrusão mostraram que os materiais com maiores concentrações de AH exigem mais força para passar através das agulhas, pois para uma mesma

força aplicada, a quantidade de produto expelido foi menor nestes grupos de amostras comparados com os demais (9% HI), (8% CPI /sem diluição), (32% CPI 70:30), (24% CPI 80:20).

Pode-se verificar também que nenhuma das formulações foi totalmente injetada, apresentando ao final do tempo de injeção uma quantidade remanescente de material no interior da seringa. Isto não significa que as formulações não sejam totalmente injetáveis, apenas que o tempo estabelecido de 5s de injeção foi insuficiente para a expulsão de todo o material.

Diante das vantagens de se utilizar agulhas de menor diâmetro para a aplicação dos preenchedores dermais e considerando os resultados de injetabilidade para os grupos de amostras de compósitos diluídos, o grupo de amostras CPIV 70:30 com 34% de extrusão através da agulha 30G, apresenta as características mais adequadas para funcionar como material de preenchimento.

As características mais positivas que um preenchedor dérmico deve possuir citadas anteriormente são: ter em sua formulação concentração de AH um pouco abaixo de seu equilíbrio de hidratação (20-24 mg/ml); apresentar firmeza e elasticidade que permita proporcionar suporte estrutural e volume e oferecer facilidade de aplicação quando injetado através de agulhas de pequeno calibre. Portanto, considerando todas estas características e observando os resultados obtidos, o grupo CPIII apresenta as características mais compatíveis para ser utilizado como preenchedor dérmico, possuindo potencial para ser um candidato para restabelecimento de tecidos moles.

Neste caso, se for desconsiderada a exigência da utilização de agulhas com diâmetros muito reduzidos (30G) para a aplicação do material, e houver possibilidade de usar outro calibre de agulha, o grupo CPI poderá ser o escolhido como candidato potencial para funcionar como preenchedor dérmico.

#### **5.2.4 MEDIDA DO pH DO COMPÓSITO**

Sabe-se que o pH do gel afeta consideravelmente sua viscosidade e, conseqüentemente as propriedades reológicas dos compósitos, sendo um parâmetro

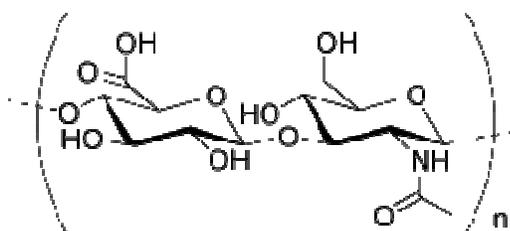
que deve ser controlado cuidadosamente (XU *et al*, 2012). O AH precisa estar em pH ~ 7,0 para que esteja completamente ionizado e conseqüentemente altamente solúvel em água, sendo desta forma capaz de formar matrizes imensamente hidratadas e conferir o volume desejado (KABLIC *et al*, 2009). Em pH muito alcalino, ocorre alteração da conformação da molécula de ácido hialurônico através da ruptura de algumas ligações de hidrogênio, fazendo com que a molécula de AH se contraia e conseqüentemente reduza a viscosidade. A contração da molécula de AH pode afetar também a reação de reticulação por dificultar a entrada do agente reticulante nos pontos de ligação química através de impedimento estérico (COWMAN; MATSUOKA, 2005; XU *et al*, 2012; ). Portanto, o pH de cada amostra do compósito foi ajustado em 7,0-7,2 com NaOH 0,25N.

### **5.2.5 ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER – FTIR**

A técnica da Espectroscopia de Infravermelho com Transformadas de Fourier (FTIR) é uma das fotoespectroscópicas mais utilizadas na identificação dos diferentes grupos constituintes de biopolímero ou também de quaisquer materiais de engenharia. Este tipo de análise baseia-se nas propriedades microestruturais dos materiais, principalmente nas características intrínsecas de suas ligações químicas de possuírem frequências de vibração e de alongação (translação nas direções x, y e z) específicas, às quais correspondem níveis energéticos específicos (princípio de equipartição de energia) da molécula. Deste modo, parte da radiação incidente pode ser absorvida pelas moléculas do material emitida em seguida, como uma assinatura de cada grupo funcional da molécula, apresentando valores característicos para vibração, alongação e rotação. A leitura deste espectro de emissões, com suas bandas peculiares, permite a verificação dos tipos de grupos que constituem cada composto (MORRISON & BOYD, 2009). Esta técnica foi utilizada para verificação da formação do gel de ácido hialurônico, ao mesmo tempo, observar a variação na sua estrutura para as diferentes amostras estudadas, sendo expectável o aparecimento das ligações N-H existentes no AH e, sobretudo, uma banda expressiva de O-H, e um aumento da mesma para os géis mais hidratados. Na figura 23 estão representados os espectros de FTIR dos géis de ácido hialurônico preparados neste

trabalho. O espectro do AH está de acordo com os dados descritos na literatura para estes géis, possuindo uma banda intensa, e bem definida que aparecem a 3500 e 3000  $\text{cm}^{-1}$  associadas, respectivamente, às vibrações de deformação axial dos grupos O-H e C-H das unidades de anidroglicose. Para números de onda inferiores, entre 1700 e 1500  $\text{cm}^{-1}$ , são visíveis as bandas correspondentes às deformações angulares da ligação C-H dos grupos  $\text{CH}_2$  e à elongação (vibrações translacionais) C-O dos grupos no anel (vide a fórmula molecular e estrutural do AH ( $\text{C}_{14}\text{H}_{21}\text{NO}_{11}$ )<sub>n</sub>).

Figura 22 – Fórmula molecular do AH



O ácido hialurônico é uma biomacromolécula de textura viscosa, formado pelo ácido glucurônico crosslinkado com a água estrutural e a N-acetilglicosamina com característica de um biopolímero cuja consistência (reologia) desta glicoproteína tem grande importância na homeostase articular e na manutenção da função estrutural da pele. A comparação dos espectros de FTIR do AH antes e após reação de *crosslink* permite confirmar a ocorrência de modificação estrutural pela diminuição da intensidade da banda que aparece a 3300  $\text{cm}^{-1}$  relativa às vibrações dos grupos O-H e o aparecimento de uma nova banda característica do grupo carbonila em torno de 1700  $\text{cm}^{-1}$ . Verifica-se ainda aparecimento de uma banda convolvida em torno de 1500  $\text{cm}^{-1}$ , típica de vibrações dos grupos C-N.

É possível verificar o aparecimento de uma banda localizada a cerca de 900  $\text{cm}^{-1}$  associada às vibrações dos grupos Ca-OH e P-O (fosfato de cálcio bifásico) resultantes das reações de hidrólise dos grupos Ca-P. Uma vez que o material e os reagentes foram posteriormente misturados, seria esperado ocorresse hidrólise desses grupos, devido à presença de água no meio reacional, muito embora a profundidade da análise dos espectros de FTIR do AH seja inferior a 1 micrón. Assim após hidrólise verifica-se uma ligeira diminuição relativa da intensidade da

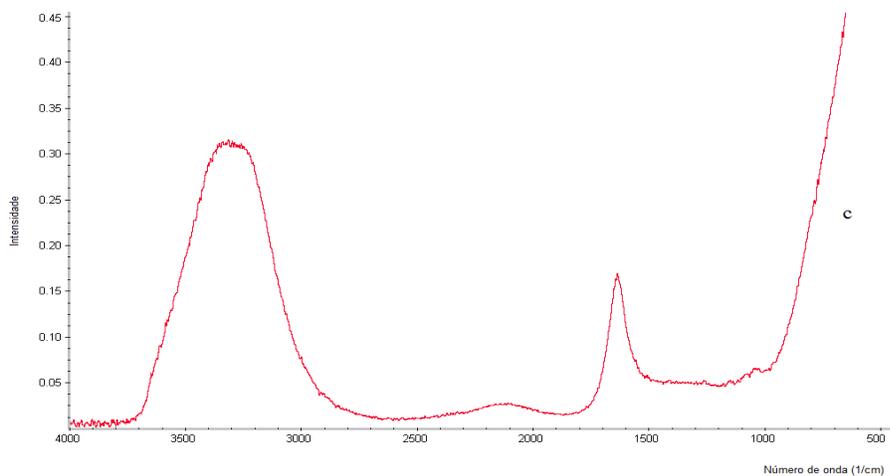
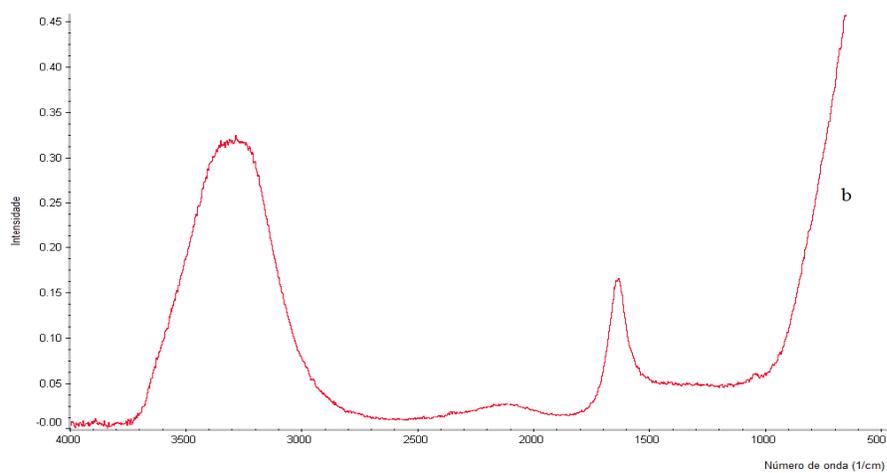
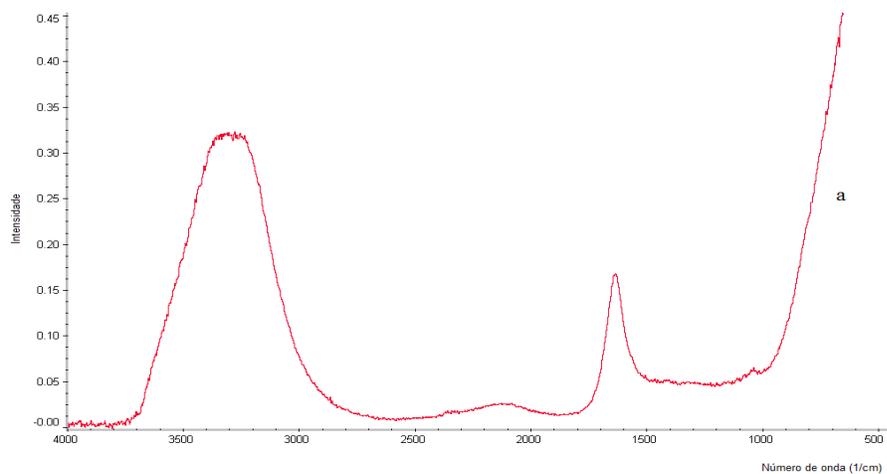
banda a cerca de  $3000\text{ cm}^{-1}$  associada às vibrações de deformação axial dos grupos CH. Esta diminuição é consequência da hidrólise dos grupos Ca-P que deram origem a ligações Ca-O-Ca. No entanto, esta banda vai ser mascarada pela banda associada à deformação angular da elongação dos grupos C-O.

A caracterização estrutural realizada por espectroscopia de infravermelho dos géis preparados neste trabalho mostra grande semelhança através da comparação entre os espectros do compósito (amostra CPIII) com o do gel de AH reticulado e do produto comercial de ácido hialurônico reticulado (Teosyal Ultimate®), vide figura 23.

Não foi possível verificar a presença das bandas referentes aos grupos ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) ( $570\text{-}630\text{ cm}^{-1}$  e  $960\text{-}1090\text{ cm}^{-1}$ ) características da estrutura do BCP no espectro do compósito, porque as mesmas foram possivelmente encobertas pelas bandas do AH entre ( $950\text{-}1200\text{ cm}^{-1}$ ), e pelas vibrações das moléculas de água ( $600\text{ cm}^{-1}$ ), ou seja, as mesmas provavelmente foram mascaradas pela profundidade espectral do FTIR. Ao comparar os géis reticulados de AH apresentados na figura 23 com o AH nativo (matéria-prima/pó) da figura 16a, não foi possível observar os picos característicos deste material na região de absorção de  $1400\text{-}600\text{ cm}^{-1}$  correspondentes aos grupos (-COH), (-CO) e ( $\text{COO}^-$ ) e às moléculas de água residual, pois ocorreu um alongamento das bandas nesta região de absorção.

A comparação dos espectros dos géis preparados neste trabalho com o do gel comercial não mostrou diferença significativa, indicando que os produtos parecem muito similares.

Figura 23 – Espectros de Infravermelho: (a) Gel de AH reticulado misturado com microesferas de BCP (amostra CPIII) (b) Gel de ácido hialurônico reticulado sem BCP, (c) Teosyal Ultimate® (ácido hialurônico comercial) *versus* número de onda ( $\text{cm}^{-1}$ ).



## 6 CONCLUSÃO

Os compósitos apresentaram comportamento viscoelástico com viscosidade típica de géis dependente da concentração do polímero.

O aumento da concentração de AH reticulado acima de 24mg/mL se torna um problema porque o material tem dificuldade de ser injetado através da agulha de pequeno calibre.

A quantidade de material injetado através da agulha está relacionada com o grau de reticulação e com a viscosidade do material.

A adição de uma fase fluida ao hidrogel de ácido hialurônico reduziu a força de extrusão e facilitou a aplicação do material através de agulhas de pequeno calibre, confirmando que a extrusão é influenciada pela concentração total de ácido hialurônico nas formulações.

Todos os géis são constituídos por mais de 80% de água, contudo aqueles com menores quantidades de massa de AH incharam mais.

O ácido hialurônico absorveu quantidade suficiente de água para aumentar seu volume em até 300 vezes, confirmando que este parâmetro depende do grau de reticulação.

O tratamento térmico realizado permitiu reticular os hidrogéis de ácido hialurônico propostos, uma vez que os valores dos módulos de armazenamento e de perda mostraram um ligeiro aumento à medida que a frequência foi aumentada nas análises reológicas. Este efeito também pode ser confirmado pelas características físicas dos hidrogéis, sendo que aqueles com ligações cruzadas apresentaram-se mais firmes e menos inchados.

A quantidade de massa de ácido hialurônico no material influencia as propriedades estruturais e reológicas dos géis.

A viscosidade dos compósitos diminuiu com a redução da concentração de ácido hialurônico nas formulações.

Os compósitos apresentaram comportamento pseudoplástico nas temperaturas ambiente e fisiológica, característica importante para um biomaterial que será utilizado em sistemas injetáveis porque apresenta similaridade com as condições fisiológicas encontradas depois de depositado na derme.

As amostras do grupo CPIII apresentam as características mais próximas às desejáveis para um material que seria utilizado para ser injetado na derme como preenchedor (concentração de polímero abaixo do equilíbrio de hidratação e maior elasticidade), pois poderá proporcionar melhor persistência clínica e suporte estrutural.

A composição qualitativa e quantitativa de cada formulação determina seu comportamento reológico e estas propriedades reológicas são determinantes das outras características importantes como estabilidade e desempenho do produto. Diante disso, conclui-se que ainda será necessário submeter o compósito desenvolvido aqui a estudos mais específicos e amplos que complementem os resultados encontrados.

## 6 RECOMENDAÇÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Investigar a estabilidade dos compósitos em condições diferentes de armazenamento.
- Avaliar os efeitos dos processos de esterilização nas propriedades reológicas dos compósitos.
- Avaliar a biocompatibilidade e citotoxicidade através de testes *in vitro*.
- Avaliar o processo de degradação do material através de testes *in vitro* e *in vivo*.
- Verificar o grau de reticulação dos compósitos.
- Avaliar o efeito do diâmetro médio das partículas nas propriedades reológicas dos compósitos.
- Realizar ensaios *in vivo* com os compósitos de AH avaliando o tempo de residência e a sua eficiência.
- Avaliar o desempenho dos compósitos de AH em diferentes locais de aplicações.
- Realizar ensaios associando medicamentos aos compósitos.

## Referências Bibliográficas

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Guia de controle de qualidade de produtos cosméticos: uma abordagem sobre os ensaios físicos e químicos.** Brasília. 2008.

ALMEIDA, I. F.; BAHIA, M. F.. Reologia: interesse e aplicações na área cosmético-farmacêutica. **Cosmet. Toiletries**, v. 15, n. 3 , p.96-100, May/Jun. 2003.

ALVES, H. L. R.; SANTOS, L. A.; BERGMANN, C. P. Injectability evaluation of tricalcium phosphate bone cement. **J. Mater. Sci.: Mater. Med.**, n.19, p.241-246, 2008.

ALVES, M. P. **Formas farmacêuticas plásticas contendo nanocápsulas e nanoesferas e nanoemulsões de nimesulida: desenvolvimento, caracterização e avaliação da permeação cutânea *in vitro*.** 2006. 183f. Tese (Doutorado) – Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

ANTONIO, J. R.; ANTONIO, C. R. **Preenchimentos avançados.** Caracas: Fundación PIEL Latinoamericana, 2011. cap. 107.

APARECIDA, A. H.; FOOK, M. V. L.; SANTOS, M. L.; GUASTALDI, A.C. Estudo da influência dos íons  $K^+$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $SO_4^{2-}$  e  $CO_3^{2-}$  na cristalização biomimética de fosfato de cálcio amorfo (ACP) e conversão a fosfato octacálcico (OCP). **Quím. Nova**, São Paulo, v. 30, n. 4, p. 892-896, July/Aug 2007.

BALAKRISHNAN, B.; BANERJEE, R. Biopolymer-Based Hydrogels for Cartilage Tissue Engineering. **Chemical Reviews**, Maharashtra, v. 111, p. 4453–4474, 2011.

BARBUCCI, R. et al. Synthesis chemical and rheological characterization of new hyaluronic acid-based hydrogels. **J. Biomater. Sci. Polymer. Edn.**, v. 11, n. 4, p. 383-399, 2000.

CALISTER JUNIOR, W. D. Compósitos. In: CALISTER JUNIOR, W. D. **Ciência e engenharia de materiais: uma introdução.** 7 ed. Rio de Janeiro: LTC, 2002. cap. 16, p. 422-454.

CARPINTERO, I. S.; CANDELAS, D.; RODRIGUEZ, R. R. Materiales derelleno: tipos, indicaciones y complicaciones. **Actas Dermosifiliogr.**, Madrid, v. 101, n.5, p. 381-393, 2010.

CARRUTHERS, J.; COHEN, S. R. et al. The science and art of dermal fillers for soft-tissue augmentation. **Journal of Drugs in Dermatology**, v. 8, n. 4, p. 335-351, 2009.

COLLISCHONN, W. Qualidade da água. In: COLLISCHONN, W; TASSI, R. Introduzindo hidrologia. cap. 19. Disponível em: <<http://pt.scribd.com/doc/43435101/Apostila-Hidrologia>> Acesso em: 29 out. 2012.

CORRÊA, N. M.; CAMARGO JUNIOR, F. B.; IGNÁCIO, R. F.; LEONARDI, G. R. Avaliação do comportamento reológico de diferentes géis hidrofílicos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 41, n.1, p. 73-78, Jan./Mar. 2005.

COWMAN, M. K.; MATSUOKA, S. Experimental approaches to hyaluronan structure. **Carbohydrate Research**, v. 340, p. 791-809, 2005.

CUPERTINO, L. F. **Modelagem do módulo de Young em nanocompósitos através de inteligência computacional**. 2009. 82f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Elétrica)-Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2009.

DACULSI, G.; LABOUX, O.; MALARD, O.; WEISS, P. Currente state of the art of biphasic calcium phosphate bioceramics. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 14, p. 195-200, 2003.

DEDAVID, B. A.; GOMES, C. I.; MACHADO, G. **Microscopia eletrônica de varredura: aplicações e preparação de amostras: materiais polímeros, metálicos, semi-condutores**. Porto Alegre: EDIPUCRS, 2007. 60p.

DOROZHKIN, S. V. Calcium orthophosphates as bioceramics: state of the art. **J. Funct. Biomater.**, Moscow, v. 1, p. 22-107, Nov. 2010.

DRURY, J. L.; MOONEY, D. J. Hydrogels for tissue engineering: scaffold design variables and applications. **Biomaterials**, v. 24, p. 4337-4351, 2003.

ELGA, Labwater. ANALÍTICA. O guia da água pura. Disponível em: <[http://www.analiticaweb.com.br/agua/arquivos/seminario/guia\\_da\\_agua\\_pura/guia\\_da\\_agua\\_pura.pdf](http://www.analiticaweb.com.br/agua/arquivos/seminario/guia_da_agua_pura/guia_da_agua_pura.pdf)> Acesso em: 29 out. 2012.

ELLIOT, J.C.; WILSON, R.M.; DOWKER, S.E.P. **JCPDS - International Centre for Diffraction Data** – Advances in x-ray analysis. Apatite structures, 2002, v. 45, p. 172-181.

FALCONE, S. J.; BERG, R.A. Crosslinked hyaluronic acid dermal fillers: a comparison of rheological properties. **Journal of Biomedical Materials Research**, p. 264-272, 2008. Disponível em: <[www.interscience.wiley.com](http://www.interscience.wiley.com)>. Acesso em: 09 fev. 2012.

FALCONE, S. J. Rheological and cohesive properties of hyaluronic acid. **J. Biomed. Mater. Res. A.**, v. 76, p. 721-728, 2006.

FALCONE, S. J. Biomedical applications of hyaluronic acid. **American Chemical S. Series**, 2006, p. 155-174.

FATIMI, A.; TASSINI, J-F.; AXELOS, M. A. V.; WEISS, P. The stability mechanisms of an injectable calcium phosphate ceramic suspension. **J. Mater Science: Mater Med**, p. 1799-1809, 2010.

FREDRICKON, G. H.; TEZEL, A. The science of hyaluronic acid dermal fillers. **Journal of Cosmetic and Laser Therapy**, v. 10, p. 35-42. 2008.

GUELCHER, S. A.; HOLLINGER, J. O. **An introduction to biomaterials: biomedical engineering series**. [S.l.] Taylor & Francis, 2005. 576p.

GUTOWSKA, A.; JEONG, B.; JASIONOWSKI, M. Injectable Gels for Tissue. **The Anatomical Record.**, v. 263, p. 342–349, 2001.

HOFFMAN, A. S. Hydrogels for biomedical applications. **Advanced Drug Delivery Reviews** , Seattle, v. 43, p. 3-12, 2002.

HSU, Sherman. Infrared spectroscopy. In: SETTLE, FRANK, A. **Handbook of Instrumental Techniques for Analytical Chemistry**. Prentice Hall, 2004. cap. 15, p. 247-285.

<<http://www.umanitoba.ca/geoscience/faculty/arc/PICTURES/apatitestr1.jpg>> Acesso em: fev. 2012.

JACOVELLA, P. F. Use of calcium hydroxylapatite (Radiesse®). **Clinical Interventions in Aging**, Argentina, v. 3, p. 161-174, 2008.

JAGUR-GRODZINSKI, J. Polymeric gels and hydrogels for biomedical and pharmaceutical applications. **Polymers Advanced Technologies**, v.21, p. 27- 47, 2010.

JENKINS, R. **JCPDS - International Centre for Diffraction Data** - Sample preparation methods in x-ray power diffraction. *Power diffraction*, 1986, v. 1, n. 2, p. 51-63.

JHA, A. K.; MALIK, M. S.; FARACH-CARSON, M. C.; DUNCAN, R.L L.; JIA, X. Hierarchically structured, hyaluronic acid-based hydrogel matrices via the covalent integration of microgels into macroscopic networks. **Soft Matter**, v. 6, p. 5045-5055, June 2010.

JONES, D. Preenchedores dérmicos. In: GOLDBERG, D. J. **Rejuvenescimento Facial**. [S.l.]: Ganabara Koogan, 2008. cap. 5, p. 228.

KABLIC, J.; MONHEIT, G. D.; YU, L.; CHANG, G. Comparative physical properties of hyaluronic acid dermal fillers. **Dermatol. Surg.**, v. 35, p. 302-312, 2009.

KRETLOW, J. D.; YOUNG, S.; KLOUDA, L.; WONG, M.; MIKOS, A. G. Injectable biomaterials for regenerating complex craniofacial. **Adv. Mater.**, v. 21, n. 32-33, p. 3368–3393, Apr. 2009.

LAPCIK JR., L.; LAPCIK, L.; DE SMEDT, S.; DEMEESTER, J.; CHABRECEK, P. Hyaluronan: preparation, structure, properties, and applications. **Chemical Reviews**, v. 98, n. 8, p. 2664-2686, Dec. 1998.

LEACH, J. B. et al. Photocrosslinked hyaluronic acid hidrogels: natural, biodegradable tissue engineering scaffolds. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 82, n. 5, June 2003.

LEGEROS, R. Z.; LIN, S.; ROHANIZADEH, R.; MIJARES, D.; LEGEROS, J. P. Biphasic calcium phosphate bioceramics: preparation, properties and applications. **J Mater Sci Mater Med.**, v. 14, n. 3, p. 201-209, Mar. 2003.

LEMPERLE, G. et al. Artefill® permanent injectable for soft tissue augmentation: I. mechanism of action and injection techniques. **Aesth. Plast. Surg.** v. 34, p. 264-272, 2010.

LEONARDIS, M.; PALANGE, A.; DORNELLES, R.F.V.; HUND, F. Use of cross-linked carboxymethyl cellulose. **Clinical Interventions in Aging for soft-tissue augmentation: preliminary clinical studies**, Roma, v. 5, p. 317-322, Nov. 2010.

LI, Y.; RODRIGUES, J.; TOMÁS, H. Injectable and biodegradable hydrogels: gelation, biodegradation and biomedical applications. **Chem. Soc. Rev.**, July 2011.

MENDIETA-TABOADA, O.; DE CARVALHO, R. A., SOBRAL, P. J. A. Análise dinâmico-mecânica: aplicações em filmes comestíveis. **Química Nova**, v. 31, n. 2, p. 384-393, 2008.

MORRISON, R. T.; BOYD, R. N. **Organic chemistry**. Sixth edition. New Jersey: Prentice Hall, 2009. 1360p.

NADERI, H.; MATIN, M. M.; BAHRAMI, A. R. Review paper: critical issues in tissue engineering: biomaterials, cell sources, angiogenesis, and drug delivery systems. **Journal of Biomaterials Applications**, v. 26, p. 383-419, Nov. 2011.

NAGEM FILHO, HALIM et al. Scaffolds in tissue engineering bone. **Innovations Implant Journal – Biomaterials and Esthetics**, v. 1, n.1, p. 54-62, May 2006.

NUSGENS, B. V. Hyaluronic acid and extracellular matrix: a primitive molecule? **Ann. Dermatol. Venereol.** Belgique, v. 137, p. Suppl 1: S3-8, April 2010.

OLIVEIRA, S. M; ALMEIDA, I. F.; COSTA, P. C. et al. Characterization of polymeric solutions as injectable vehicles for hydroxyapatite microspheres. **AAPS PharmSci. Tech.**, v. 11, n. 2, p. 852-859, June 2010.

PEPPAS, N. A. et al. Hydrogels in pharmaceutical formulations. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**. v. 50, p. 27-46, 2000.

PEPPAS, N. A. et al. Physicochemical foundations and structural design of hidrogels in medicine and biology. **Annu. Rev. Biomed. Eng.** v. 2, p. 9-29, 2000.

RATNER, D. Buddy et al. **Biomaterials Science**: an introduction to materials in medicine. [S.I.]: Academic Press, 1996, 484p.

REDBORD, K. P.; BUSSO, M.; HANKE, C. W. Soft-tissue augmentation with hyaluronic acid and calcium hydroxyl apatite fillers. **Dermatologic Therapy**, v. 24, p. 71-81, 2011.

SANTOS, Elisa Soares. Caderno Pedagógico. Química. Análises físico-químicas de água e solos. Pinhais. 2008. Disponível em: <<http://www.diaadiaeducacao.pr.gov.br/portals/pde/arquivos/1701-6.pdf>> Acesso em: 29 out. 2012.

SHISHATSKAYA, E. I.; KHLUSOV, I. A.; VOLOVA, T. A. A hybrid PHB-hydroxyapatite composite for biomedical application: production, in vitro and in vivo investigation. **J. Biomater. Sci. Polymer**, v. 17, p. 481-498, 2006.

SHU, X. Z.; PRESTWICH, G. D. Therapeutic biomaterials from chemically modified hyaluronan in chemistry and biology of hyaluronan. In: GARG, H.G.; HALES, C.A. **Chemistry and biology of hyaluronan**. Oxford: Elsevier, 2004, p. 1-19.

STURM, L. P.; COOTER, R. D.; MULTIMER, K. L.; GRAHAM, J. C.; MADDERN, G. J. A systematic review of dermal fillers for age-related lines and wrinkles. **ANZ Journal of Surgery**, Stepney, v. 81, p. 9-17, 2011.

SUNDARAM, H et al. Rheological evaluation of the physical properties of hyaluronic acid dermal fillers. **Journal of Drugs in Dermatology**, v. 10, p. 974-981, Sept., 2011.

SUNDARAM, H.; VOIGTS, B.; BEER, K. Comparison of the rheological properties of viscosity and elasticity in two categories of soft tissue fillers: calcium hydroxylapatite and hyaluronic acid. **Dermatol. Surg.** , v. 36, p. 1859–1865, 2010.

TANG, S.; VICKERS, S. M.; HSU, H. P.; SPECTOR, M. Fabrication and characterization of porous hyaluronic acid–collagen composite scaffolds. **Journal of Biomedical Materials Research**, p. 323-335, Feb. 2007.

VICTORIA, E. C.; GNANAM, F. D. Synthesis and characterization of biphasic calcium phosphate. **Trends Biomaterials Artif. Organs**, v. 16, n. 1, p. 12-14, 2002.

WALDEN, J.L.; LAMPETER, W. Hyaluronic acid injectable filler. In: ASTON, S.J.; STEINBRECH, D. S.; WALDEN, J. L. **Aesthetic Plastic Surgery**. Saunders Co. Ltda, 2009. cap. 74.

XU, X. et al. Hyaluronic acid-based hydrogels: from a natural polysaccharide to complex networks. **Soft Matter**. v. 8, n. 12, p. 3280-3294, 2012.

## Anexo



## CERTIFICADO DE ANÁLISES

Autorização de Funcionamento M.S.: 1.05486-1

PAG: 1

PRODUTO: 1432-ACIDO HIALURONICO PO  
 LOTE\_FABRICANTE: 20111027  
 FABRICANTE: CHENGZHI LIFE SCIENCE  
 PAIS DE ORIGEM: CHINA  
 PROCEDENCIA: CHINA  
 CLIENTE: INSIDE MATERIAIS AVANCADOS L  
 D.C.B.: N/A  
 D.C.I.: N/A  
 DATA DE ANALISE: 13/12/2011

LOTE\_INTERNO: 041234  
 GRUPO... : NUTRA/COSMET  
 FABRICACAO : 10/2011 N.FISC:61374  
 VALIDADE. : 10/2014 QTD: 0,060

## ENSAIOS REALIZADOS PELO FABRICANTE†

TESTES	ESPECIFICACOES	RESULTADOS
pH	5 5 a 7.5	6,52
Aparencia	Po branco	De acordo
C.T. Bacterias	Max 10 UFC/g	De acordo
Transparencia	Min. 99,0% (Solucao Aq 0,1%)	100,0
Metais pesados (Pb)	Max 20 ppm	De acordo
Arsenio	Max. 2 ppm	De acordo
Pseudomonas Aeruginosa	Negativo	De acordo
Proteina	Max 0,1%	0,030
Bolores e Leveduras	Max. 10 UFC/g	De acordo
Peso molecular	Informativo	1500000
Staphylococcus Aureus	Negativo	De acordo
Glicuronico	Min. 44,0%	46,43
Perda por secagem	Max 10%	6,82

## ENSAIOS REALIZADOS PELA VIA FARMA-ORDEM DE FRACIONAMENTO: 43820†

TESTES	ESPECIFICACOES	RESULTADOS
pH	5 5 a 7 5	5,8
Aparencia	Po branco	De acordo
C T Bacterias	Max. 10 UFC/g	<10
Transparencia	Min 99,0% (Solucao Aq 0,1%)	99.8
Pseudomonas Aeruginosa	Negativo	De acordo
Bolores e Leveduras	Max 10 UFC/g	<10
Staphylococcus Aureus	Negativo	De acordo
Perda por secagem	Max 10%	7.8

REF BIBLIOGRAFICA:O PRODUTO SEGUE METODOLOGIA DO FABRICANTE.

REF.BIBL.VIA FARMA:FABRICANTE

ARMAZENAMENTO:MANTER HERMET FECHADO/LOCAL SECO E AREJADO.  
 ADV.SEGURANCA:NAO SE APLICA  
 CONCLUSAO.: APROVADO

ESTE DOCUMENTO E UMA COPIA DO ORIGINAL !  
 SE HOUVER DUVIDA ENTRE EM CONTATO C/ NOSSO DEPTO.TECNICO.



**Karina Pontes Martinho**  
 Farmacêutica Responsável CRF-SP: 30.263



**Léia Fontes Rios**  
 Farmacêutica Responsável pela Unidade da  
 Qualidade CRF-SP: 49372