

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
CENTRO DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E
ENGENHARIA DE MATERIAIS**

Sandra Maria Sobral de Carvalho

**CARBOXIMETILQUITOSANA/COLÁGENO PARA UTILIZAÇÃO COMO
PREENCHEDOR CUTÂNEO**

Campina Grande – PB

Dezembro - 2018

Sandra Maria Sobral de Carvalho

**CARBOXIMETILQUITOSANA/COLÁGENO PARA UTILIZAÇÃO COMO
PREENCHEDOR CUTÂNEO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais como requisito parcial à obtenção do título de **Doutor em Ciência e Engenharia de Materiais**.

Orientador: Prof. Dr. Marcus Vinicius Lia Fook

Agência financiadora: TECNÁLIA

Campina Grande – PB

Dezembro – 2018

C331c Carvalho, Sandra Maria Sobral de.
Carboximetilquitosana/colágeno para utilização como
preenchedor cutâneo / Sandra Maria Sobral de Carvalho. –
Campina Grande, 2018.
105 f.: il. color.

Tese (Doutorado em Ciência e Engenharia de Materiais) –
Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Ciências e
Tecnologia, 2018.
"Orientação: Prof. Dr. Marcus Vinicius Lia Fook".
Referências.

1. Biomateriais. 2. Biodegradável. 3. Biopolímero. I. Fook,
Marcus Vinicius Lia. II. Título.

CDU 62:61(043)

VITAE DO CANDIDATO

Sandra Maria Sobral de Carvalho

- Graduação em Medicina pela Universidade Federal da Paraíba em Maio de 1993.
- Residência Médica em Clínica Médica pela Fundação Hospitalar do Distrito Federal, no Hospital Regional de Taguatinga – DF, no período de Janeiro de 1994 a Dezembro de 1995.
- Especialização em Dermatologia pela Universidade Federal de Pernambuco – UFPE, de Janeiro de 1996 a Dezembro de 1997.
- Professora e Coordenadora do módulo de Propedêutica Médica da Faculdade de Medicina Nova Esperança – FAMENE/PB desde Janeiro de 2009.
- Médica Clínica concursada do EBSEH – Hospital Universitário Júlio Bandeira – HUJB/UFCG.
- Aprovada e classificada no concurso para professora de Infectologia da Universidade Federal de Campina Grande – UFCG, realizado em Agosto de 2018.

SANDRA MARIA SOBRAL DE CARVALHO

CARBOXIMETILQUITOSANA/ COLÁGENO PARA UTILIZAÇÃO COMO PREENCHEDOR CUTÂNEO

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciência e Engenharia de Materiais.

Aprovado em: 27/12/2018



Dr. Marcus Vinicius Lia Fook
Orientador
PPG-CEMat/UFCG



Dr.ª Suédina Maria de Lima Silva
Examinadora Interna
PPG-CEMat/UAEMa/UFCG



Dr.ª Renate Maria Ramos Wellen
Examinadora Interna
DEMAT/UFPB



Dr.ª Mônica Lorena Dias Meirelles da Cunha
Examinadora Externa
UFPB/HU



Dr.ª Alessandra Ferreira Tomaz
Examinadora Externa
UEPB/DF

À minha mãe, Conceição,
referência de amor, fortaleza,
determinação, resiliência, coragem,
gratidão, paciência, admiração...
Luz inspiradora de vida para mim,
DEDICO.

AGRADECIMENTOS

À Deus e Nossa Senhora, fontes de inspiração Divina, força para perseverar em busca do objetivo desejado, não me permitindo desistir, principalmente nos momentos mais difíceis de minha vida ao longo da trajetória desses quatro anos.

Às minhas filhas Gabrielle e Isabelle, bênçãos de Deus e também inspiração para que eu continue sempre lutando e possa um dia representar para elas o que minha mãe representa para mim.

Ao meu “Querido” orientador Prof. Dr. Marcus Vinícius, obrigada por persistir em continuar me orientando... Obrigada por representar tudo que me motivou a esse desafio... obrigada pelo exemplo contínuo de Retidão, Sabedoria, Competência, Compromisso, Integridade, Disciplina, Companhia, Amizade, Amor... Absolutamente Admirável, Amável.... Único.

Ao meu amigo Kleilton, exemplo de doçura, competência e dinamismo incomparáveis demonstrados ao longo dessa jornada, muito obrigada. Não teria chegado até aqui sem você nunca!

Ao amigo Rosseberg (o filho do “Rei”... rsrs), que foi fundamental na realização desse trabalho, exemplo de competência, alegria, “dureza”....você é maravilhosoprecisa acreditar nisso, Amigo.

Ao amigo Wladymyr, representação absoluta de companheirismo, solidariedade, amizade. Obrigada por estar sempre disposto a me ajudar em todos os momentos... Você é “10”.

Ao dedicado e competente André, agradeço pelas contribuições e desenvoltura no preparo das minhas apresentações, meu carinho e reconhecimento eterno.

À Professora Dra. Roberta, que ao longo destes anos me ajudou muito com suas observações, se submetendo inclusive à condição de paciente para preenchimento cutâneo.

Às encantadoras amigas Professoras e Dras. Alecsandra e Mônica por aceitarem participar da banca examinadora e contribuírem com esse trabalho. Obrigada imensamente, pois sei do esforço enorme de vocês para tais contribuições.

Às Professoras Dras. Suédina Lima e Renate Wellen pelas valiosas observações e contribuições.

Agradeço a todos os amigos do Laboratório de Avaliação e Desenvolvimento de Biomateriais do Nordeste – CERTBIO, que sem dúvida foram também muito importantes na concretização deste trabalho, demonstrando sempre companheirismo e disponibilidade: Lívia, Eunice Paloma, Rodolfo, Felipe Bacalhau, Rita, Márcio, João, Klaydson, Tânia, Paulinha, William, Sr. Sérgio, Hermano, Daniel, Sílvia, Bianca, Williams... Meu sincero agradecimento.

"Se você conta com alguém que tem menos qualidades que você, isso levará à sua degeneração. Se você conta com alguém com qualidades iguais às suas, você permanece onde está. Somente quando conta com alguém cujas qualidades são superiores às suas é que você atinge uma condição sublime".

Dalai Lama

RESUMO

O preenchimento cutâneo é uma técnica utilizada, especialmente, por médicos dermatologistas, para a correção de rugas superficiais ou profundas, cicatrizes deprimidas, além da reposição de volume facial. Existem vários biomateriais que são utilizados como preenchedores cutâneos, os mais usados são o ácido hialurônico, a hidroxiapatita e o ácido poli-L-lático, com propriedades isoladas e específicas para serem considerados preenchedores cutâneos adequados e que os diferenciam um do outro, principalmente quanto à indicação clínica. Alguns parâmetros são importantes para a conceituação de um preenchedor cutâneo ideal, a exemplo da área a ser corrigida, o tempo de duração do mesmo no tecido implantado e custo do produto/procedimento. Nesse contexto, esse trabalho baseia-se no desenvolvimento de hidrogel de carboximetilquitosana com colágeno produzido a partir da membrana do ovo de galinha, com potencial para ser utilizado como preenchedor cutâneo. Inicialmente foi obtida a carboximetilquitosana a partir da quitosana produzida no Laboratório CERTBIO, seguindo-se à extração do colágeno a partir da membrana celular do ovo de galinha. O hidrogel preenchedor foi confeccionado através da homogeneização da carboximetilquitosana com diferentes concentrações (m/m) de colágeno (5%, 10% e 15%). Após sua obtenção, o mesmo foi submetido às seguintes técnicas de caracterização: Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR), Microscopia Ótica (MO), pH, Condutividade, Microscopia Confocal por Fluorescência, Reologia, Injetabilidade/Força de Ejeção, Termogravimetria (TG), Intumescimento e Citotoxicidade. De acordo com os resultados de FTIR pode-se afirmar que a matéria prima se tratava da carboximetilquitosana e colágeno. Não se observou diferença significativa entre os espectros de FTIR dos hidrogéis. No pH das amostras verificou-se que a carboximetilquitosana apresenta-se mais alcalina quando comparada com o colágeno. A condutividade da carboximetilquitosana foi superior à da água e inferior à do colágeno. Na microscopia por fluorescência as partículas de colágeno apresentaram-se homogêneas em relação ao tamanho e bem distribuídas na mistura. O estudo reológico sugere tratar-se de material com comportamento pseudoplástico. Quanto à injetabilidade, pode-se afirmar que o hidrogel de carboximetilquitosana apresentou maior força de ejeção dentro do que preconiza a literatura para utilização como preenchedor cutâneo. A respeito da termogravimetria, identificaram-se três etapas de perda de massa nas composições dos hidrogéis de carboximetilquitosana e carboximetilquitosana/colágeno 5% e duas etapas de perda de massa nas composições com 10 e 15% de colágeno. Os hidrogéis de carboximetilquitosana e de carboximetilquitosana/colágeno apresentaram melhor intumescimento em solução de PBS. Em relação ao ensaio de citotoxicidade, todas as amostras demonstraram-se viáveis. Desta forma, pode-se concluir que os hidrogéis apresentaram propriedades físicas, químicas, térmicas, de viscosidade e biológicas potenciais para aplicação em preenchimento cutâneo.

Palavras-chave: Biomateriais. Biodegradável. Biopolímero.

ABSTRACT

Skin filling is a technique used, especially by dermatologists, for the correction of superficial or deep wrinkles, depressed scars, as well as facial volume replacement. There are several biomaterials that are used as skin fillers, the most used are hyaluronic acid, hydroxyapatite and poly-L-lactic acid, with isolated and specific properties to be considered suitable skin fillers and that differentiate them from one another, mainly clinical indication. Some parameters are important for the conceptualization of an ideal cutaneous filler, for example the area to be corrected, the duration of the same in implanted tissue and cost of the product / procedure. In this context, this work is based on the development of carboxymethylchitosan hydrogel with collagen produced from the chicken egg membrane. Initially the carboxymethylchitosan of the chitosan produced in the CERTBIO laboratory was obtained and after, was do extraction of the collagen from the cell membrane of the chicken egg. The filler hydrogel was made by homogenizing the carboxymethylchitosan with different concentrations (m / m) of collagen (5%, 10% and 15%). After its acquisition, it was submitted to the following characterization techniques: Infrared Spectroscopy with Fourier Transform (FTIR), Optical Microscopy (OM), pH, Conductivity, Confocal Microscopy by Fluorescence, Rheology, Injection / Ejection Force, Thermogravimetry (TG), Swelling and Cytotoxicity. According to the results of FTIR it can be stated that the raw material was carboxymethylchitosan and collagen. No significant difference was observed between the FTIR spectra of the hydrogels. In the pH of the samples it was verified that the carboxymethylchitosan presents more alkaline when compared with the collagen. The conductivity of carboxymethylchitosan was higher than that of water and lower than that of collagen. In fluorescence microscopy the collagen particles were homogeneous in relation to the size and well distributed in the mixture. The rheological study suggests that it is a material with pseudoplastic behavior. Regarding the injectability, it can be stated that the carboxymethylchitosan hydrogel presented greater ejection force within the recommended literature for use as a cutaneous filler. Regarding thermogravimetry, three stages of mass loss were identified in the compositions of the hydrogels of carboxymethylchitosan and carboxymethylchitosane /collagen 5% and two stages of mass loss in compositions with 10 and 15% of collagen. Carboxymethylchitosan and carboxymethylchitosan / collagen hydrogels showed better swelling in PBS solution. In relation to the cytotoxicity assay, all samples were found to be viable. In this way, it can be concluded that the hydrogels presented physical, chemical, thermal, viscosity and biological potential properties for application in cutaneous filling, with exception for the test of injectability.

Keywords: Biomaterials. Biodegradable. Biopolymer.

PUBLICAÇÕES

SANTOS, K. O.; BARBOSA, R. C.; BURITI, J. S.; BEZERRA JUNIOR, A. G.; SOUSA, W. J. B.; BARROS, S. M. C.; OLIVEIRA, R. J.; FOOK, M. V. L. Thermal, chemical, biological and mechanical properties of chitosan films with powder of eggshell membrane for biomedical applications. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, 2018.

TOMAZ, A. F.; CARVALHO, S. M. S.; BARBOSA, R. C.; SILVA, S. M. L.; GUTIERREZ, M. A. S.; LIMA, A. G. B.; FOOK, M. V. L. Ionically Crosslinked Chitosan Membranes Used as Drug Carriers for Cancer Therapy Application. **Materials**, 2017.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura da Pele (Fonte: Adaptado de James e Berger, 2007).	21
Figura 2 – Composição histológica da Epiderme (Junqueira, 2013).....	21
Figura 3 – Composição histológica da Derme (Junqueira, 2013).	22
Figura 4 – Sinais Clínicos do Envelhecimento cutâneo (Fonte: http://drpeterdobie.com/anti-ageing-medicine/ , 2017).....	25
Figura 5 – Cortes histológicos e ilustrações que mostram a organização das fibras colágenas e elásticas na pele jovem, na pele decorrente do envelhecimento intrínseco e na pele decorrente do envelhecimento extrínseco. (Fonte: Adaptado de Naylor, 2011).	26
Figura 6 – Fatores extrínsecos relacionados ao envelhecimento cutâneo.....	28
Figura 7 – Potenciais sítios para utilização do Preenchedor Cutâneo na face.	31
Figura 8 – Paciente tratado com preenchimento do sulco nasogeniano e mentoniano (a); volumização da região malar (b) e aumento do volume e contorno dos lábios (c) (Fonte: Arquivo pessoal).	32
Figura 9 – Lipodistrofia facial em paciente HIV (a) e outro com cicatrizes de acne (b) Fonte: (http://redenacionaldejovens.blogspot.com/2011/08/lipodistrofia-saiba-como-prevenir-e.html e https://cienciasesaber.wordpress.com/2016/12/14/cicatrizes-de-acne, 2018)	33
Figura 10 – Pontos anatômicos para realização de bloqueios dos nervos infraorbital e mentoniano (Fonte: Moreira, 2013).	33
Figura 11 – Níveis de aplicação de preenchedor cutâneo (Fonte: Adaptado de Pavicic, 2015).	38
Figura 12 – Técnicas de Injeção de Preenchedores Cutâneos: Linear retrógrada ou anterógrada (A), Puntuada seriada (B), Em leque (C) e Cruzada (D) (Fonte: Própria)	39
Figura 13 – Casos de complicações com o uso de preenchedores cutâneos: (A) Paciente com nódulos endurecidos e eritematosos na região periorbitária bilateralmente, após preenchimento com PMMA; (B) Necrose de asa nasal após uso de preenchedor no sulco nasolabial; (C) Paciente submetida ao preenchimento com poliacrilamida, nos sulcos nasogenianos, demonstrando endurecimento e hiperemia nas áreas preenchidas, principalmente à direita e (D) Visão frontal dos lábios, sendo que as setas demonstram os nódulos endurecidos provocados pelo preenchimento	

do lábio superior com polimetilmetacrilato e visão lateral dos lábios, da mesma paciente, após um ano do preenchimento (Fonte: http://www.rbc.org.br/details/282/reacoes-adversas-a-substancias-de-preenchimento-subcutaneo , 2018).....	40
Figura 14 – Classificação dos Hidrogéis (Fonte: Adaptado de Ullah, 2015).	46
Figura 15 – Esquema dos métodos de preparação de hidrogéis de origem química e física. (Fonte: Hoffman, 2012).	47
Figura 16 – Efeitos da tensão de cisalhamento nos materiais elástico, viscoso e viscoelástico (Fonte: Pierre, 2015).	50
Figura 17 – Tipos de deformação associados aos preenchedores cutâneos (Fonte: Pierre, 2015).	51
Figura 18 – Teste de compressão a um peso constante realizado para preenchedores cutâneos. F é a força aplicada a um peso constante (Fonte: Pierre, 2015).....	51
Figura 19 – Reação de desacetilação da quitina em quitosana (Fonte: Spin-Neto, 2008).....	53
Figura 20 – Estruturas químicas da Quitosana (Q), e Carboximetilquitosana (Fonte: Katugampola, Winstead, Adeleke, 2014).	56
Figura 21 – Estrutura do colágeno (Fonte: Adaptada de Paula, 2009).	57
Figura 22 – Esquema sobre as fibrilas e fibras colágenas (Fonte: Silva, 2012).....	58
Figura 23 – Fluxograma da síntese e caracterização das matérias primas.	63
Figura 24 – Fluxograma da obtenção e caracterização dos Hidrogéis de CMQ e CMQ/Col.	64
Figura 25 – Quitosana e carboximetilquitosana produzidas no CERTBIO.....	65
Figura 26 – Cascas de ovo e membranas extraídas.	66
Figura 27 – Gel de colágeno obtido da membrana de ovo antes (A) e após liofilização (B).....	66
Figura 28 – Colágeno liofilizado antes (A) e após macerado e peneirado em malha 325 mesh (B).	66
Figura 29 - Gel formado com uma das composições	67
Figura 30 – Adaptação de ensaio para realização da medida de injetabilidade/força de ejeção.	71
Figura 30 – Espectros de FTIR do pó de quitosana e da CMQ.	73
Figura 31 – Espectro de FTIR do colágeno.....	74

Figura 32 – Imagens de MO do colágeno liofilizado com magnificação de 50x.	75
Figura 33 – Imagens de MO da CMQ com magnificação de 50x.	75
Figura 34 – Imagens da Microscopia por Fluorescência do hidrogel de CMQ (A); do H-CMQCOL5I (B); H-CMQCOL10 (C); e H-CMQ COL15 (D) com magnificação de 10X.	79
Figura 35 – Imagem da Microscopia por Fluorescência de H-CMQCOL10 com magnificação de 20X.....	79
Figura 36 – Espectro de FTIR dos hidrogéis CMQ e de CMQ/Col.....	80
Figura 37 – Viscosidade versus taxa de cisalhamento das amostras dos hidrogéis de CMQ e de CMQ/Col.....	81
Figura 38 – Resultados dos módulos elástico (G') e módulo viscoso (G'') das amostras dos hidrogéis de CMQ e de CMQ/Col.....	82
Figura 39 – Resultados dos módulos elástico (G') das amostras dos hidrogéis de CMQ e de CMQ/Col.....	83
Figura 41 – Evolução da força de ejeção com o deslocamento do êmbolo da seringa com os hidrogéis de CMQ e de CMQ/Col.	84
Figura 42 – Curva termogravimétrica do colágeno.....	85
Figura 43 – Curva termogravimétrica do CMQ.....	85
Figura 44 – Análise termogravimétrica e derivada dos filmes: H-CMQ (A); H-CMQ/Col5 (B); H-CMQ/Col10 (C); H-CMQ/Col15 (D).	87
Figura 45 – Capacidade de intumescimento dos hidrogéis de carboximetilquitosana com diferentes concentrações de colágeno.	88
Figura 46 –Teste de viabilidade celular das amostras dos hidrogéis de CMQ e de CMQ/Col.....	89
Figura 47 – Ausência de descolorimento ao redor e sob as amostras: A: amostra 1: CMQ, B: amostra 2: CMQ 5% COL, C: amostra 3: CMQ 10% COL, D:amostra 4: CMQ 15% COL.....	91

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Alterações cutâneas, anexiais e histológicas que ocorrem nos envelhecimentos intrínseco e extrínseco individualmente	27
Tabela 2 – Características importantes para um preenchedor cutâneo ideal.	34
Tabela 3 – Classificação de preenchedores cutâneos	35
Tabela 4 – Preenchedores biodegradáveis e permanentes e suas principais características.....	36
Tabela 5 – Classificação de preenchedores cutâneos quanto a origem.....	37
Tabela 6 – Materiais, reagentes e equipamentos utilizados para a preparação dos hidrogéis.	62
Tabela 7 – Nomenclatura dos hidrogéis obtidos com CMQ e Col.....	68
Tabela 8 – Resultados de pH da carboximetilquitosana, do colágeno, da água ultra pura e dos hidrogéis CMQ/Col	76
Tabela 9 – Resultados da condutividade da água ultra pura, do colágeno, da carboximetilquitosana e dos Hidrogéis CMQ/Col	77
Tabela 10 – Graus de citotoxicidade.	90

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

PrCt	PREENCHIMENTO CUTÂNEO
Eint	ENVELHECIMENTO INTRÍNSECO
Eext	ENVELHECIMENTO EXTRÍNSECO
PC	PREENCHEDOR CUTÂNEO
AH	ÁCIDO HIALURÔNICO
Qs	QUITOSANA
CMQ	CARBOXIMETILQUITOSANA
Col	COLÁGENO
Hp	HIDROXIAPATITA
PMMA	POLI (METACRILATO DE METILA)
CMQ/Col	CARBOXIMETILQUITOSANA E COLÁGENO
H-CMQ/Col	HIDROGEL DE CARBOXIMETILQUITOSANA E COLÁGENO
H-CMQ/Col5	HIDROGEL DE CARBOXIMETILQUITOSANA E 5% DE COLÁGENO
H-CMQ/Col10	HIDROGEL DE CARBOXIMETILQUITOSANA E 10% DE COLÁGENO
H-CMQ/Col15	HIDROGEL DE CARBOXIMETILQUITOSANA E 15% DE COLÁGENO
FTIR	ESPECTROSCOPIA NA REGIÃO DE INFRAVERMELHO POR TRANSFORMADA DE FOURIER
GI	GRAU DE INTUMESCIMENTO
TGA	TERMOGRAVIMETRIA
MO	MICROSCOPIA ÓPTICA

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	20
2.1 Pele	20
2.1.1 Envelhecimento Cutâneo	24
2.1.2 Técnicas de Rejuvenescimento.....	29
2.2 Preenchimento Cutâneo	29
2.3 Biomateriais.....	41
2.3.1 Biopolímeros	43
2.3.2 Hidrogeis.....	45
2.3.3 Reologia de hidrogéis	48
2.4 Carboximetilquitosana	52
2.5 Colágeno	56
2.5.1 Uso do colágeno como preenchedor cutâneo	59
2.5.2 Colágeno da membrana da casca do ovo	61
3 MATERIAIS - MÉTODOS – caracterizações	62
3.1 Local da Pesquisa	62
3.2 Materiais e Reagentes.....	62
□ Papel filtro Quantitativo. Whatman GR 40 110mm BEM	62
3.3 Métodos.....	63
3.3.1 Síntese das Matérias Primas.....	64
3.3.2 Obtenção dos Hidrogéis.....	67
3.4 Caracterização das Matérias Primas e dos Hidrogéis.....	68
3.4.1 Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)....	68
3.4.2 Microscopia Ótica (MO).....	68
3.4.3 Potencial Hidrogeniônico (pH).....	69
3.4.4 Condutividade	69
3.4.5 Microscopia Confocal por Fluorescência	69
3.4.6 Reologia.....	69
3.4.7 Injetabilidade/Força de ejeção.....	70
3.4.8 Termogravimetria	71
3.4.9 Grau de Intumescimento	71
3.4.10 Citotoxicidade.....	72

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	73
4.1 Carboximetilquitosana e Colágeno	73
4.1.1 Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)....	73
4.1.2 Microscopia Óptica (MO).....	75
4.2 Caracterização dos Hidrogéis	76
4.2.1 Potencial Hidrogeniônico (pH).....	76
4.2.2 Condutividade	77
4.2.3 Microscopia por Fluorescência.....	78
4.2.4 Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)....	80
4.2.5 Reologia.....	81
4.2.6 Injetabilidade/Força de ejeção.....	83
4.2.7 Termogravimetria (TGA)	84
4.2.8 Grau de Intumescimento	88
4.2.9 Citotoxicidade	89
5 CONCLUSÕES	92
6 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	93
REFERÊNCIAS	94
ANEXOS	105

1 INTRODUÇÃO

O corpo humano está em permanente mudança, seja pela evolução natural, seja por ação de fatores externos. Diante dessas constantes alterações, o homem procura, através do desenvolvimento de tecnologias, intervir buscando ideias inovadoras. Nesse contexto, um dos órgãos que está relacionado de forma mais íntima com o envelhecer e a proteção contra os fenômenos físicos e/ou biológicos do corpo humano é a pele (Rock, 2011).

Na pele é onde são evidenciadas as principais manifestações físicas do envelhecimento humano, principalmente como consequência da perda da elasticidade e expressas clinicamente pelo aparecimento de manchas, rugas, flacidez e perda dos contornos faciais. A exposição solar, os hábitos alimentares e padrões genéticos são os fatores causais mais relevantes quanto ao envelhecimento cutâneo (Azulay, 2017).

A busca contínua por manter-se jovem e por padrões de beleza que representam para muitos a expressão de saúde, tem estimulado os avanços de pesquisa na indústria de cosméticos e na área de estética médica. Nos últimos anos, a partir da compreensão mais profunda dos mecanismos do envelhecimento facial, procedimentos não cirúrgicos, minimamente invasivos, como o tratamento com toxina botulínica, uso de *lasers*, bem como *peelings* e preenchimento de tecidos moles, tem sido preferidos em detrimento de procedimentos mais invasivos como a cirurgia plástica convencional (Kadunck *et al.*, 2015; Banyard, 2015).

O preenchimento cutâneo (PC) ou de tecidos moles é uma técnica utilizada principalmente por médicos dermatologistas para correção dos sinais clínicos do envelhecimento cutâneo, principalmente as observadas na região facial. Existem várias substâncias utilizadas nesse processo, que são implantes injetáveis constituídos de materiais biológicos como o colágeno (Col), a gordura autóloga e o ácido hialurônico (AH) animal ou sintéticos como o poli (metacrilato de metila) (PMMA), as micropartículas de hidroxiapatita (Hp) e o ácido hialurônico (AH) não-animal. Cada um desses, entretanto, tem características, propriedades e aplicações específicas, variando desde a duração do efeito dos mesmos, de seis meses até mais de três anos, a relação de eventos adversos que os mesmos podem provocar. No entanto, os tratamentos citados têm custos elevados (Parada, 2016).

De acordo com a *American Society for Aesthetic Plastic Surgery* (Sociedade Americana de Cirurgia Plástica Estética), foram gastos mais de 13,5 milhões de dólares em 2015 em procedimentos cirúrgicos e não cirúrgicos e, destes, 42% foram não-cirúrgicos. O Brasil, segundo pesquisa realizada pela *International Society of Aesthetic Plastic Surgery*, ocupa o terceiro lugar em realização de procedimentos estéticos no mundo e cerca de 51% destes procedimentos foram não-cirúrgicos, com destaque para o preenchimento cutâneo (Fallacara *et al.*, 2017; Parada *et al.*, 2016).

Nesse sentido, os avanços da Ciência e Engenharia de Biomateriais intensificaram a motivação no desenvolvimento de produtos que atuem intervindo no processo do envelhecer. Pesquisas vem sendo realizadas utilizando biopolímeros com o objetivo de substituir os materiais já comercializados, na busca por produtos de baixo custo e menor índice de rejeição. Dentre esses biopolímeros encontra-se a quitosana e seus derivados, como a carboximetilquitosana, além do colágeno (Ma, 2014; Levandowska, 2016).

Mimetizando o sistema biológico e sendo uma alternativa de fontes renováveis, a quitosana (Q) tem sido uma fonte de inspiração técnico científica por conjugar biocompatibilidade e biofuncionalidade para todos os tecidos orgânicos. Ademais, recentemente, o uso de derivados da quitosana, como a carboximetilquitosana (CMQ), desenvolvida com preparação por diversas fontes e rotas químicas, tem ampliado a sua faixa de processabilidade/solubilidade. Além disso, os derivados da quitosana têm demonstrado eficácia em várias áreas da medicina, como na dermatologia, na qual tem indicação para preenchimento dérmico com fins estéticos ou de reparação clínica, a partir do comprovado estímulo do crescimento de fibroblastos (Hong, 2011; Mogosanu, 2014).

Um outro material com importante papel na sustentação e elasticidade da pele, impedindo, por sua vez, o aparecimento de alguns dos sinais de envelhecimento, é o colágeno. Principal proteína estrutural presente no corpo humano, tem sido também muito estudado desde os anos 80 como biomaterial utilizado para correção de várias alterações na pele, principalmente as relacionadas ao envelhecimento cutâneo (Parada *et al.*, 2016; Sionkowska, 2016; Kaczmarek *et al.*, 2018). Desta forma, o objetivo desta pesquisa foi à obtenção de um biomaterial composto por carboximetilquitosana e colágeno para utilização como preenchedor cutâneo, visto que ambos possuem propriedades importantes para essa utilização, mas que até o presente não foi estudado em associação para este fim.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Pele

A pele, maior órgão do corpo humano, compreende uma complexa estrutura de tecidos de várias naturezas, os quais se dispõem e se interrelacionam para o desempenho de importantes funções (Sampaio e Rivitti, 2018):

- Proteção: tanto contra a ação da luz ultravioleta, quanto contra injúrias de agentes físicos, químicos e biológicos do ambiente;
- Percepção: por conter uma grande variedade de receptores para tato, pressão, dor e temperatura; sendo a pele considerada o maior órgão sensorial do corpo;
- Termorregulação: o isolamento contra perda de calor através da superfície pilosa e do tecido celular subcutâneo; a evaporação do suor pela superfície da pele e a regulação do fluxo sanguíneo através da rede vascular;
- Função metabólica: como o armazenamento de energia pelo tecido celular subcutâneo na forma de triglicerídeos, além da síntese de vitamina D.

Essa estrutura corresponde a mais de 15% do peso corpóreo e apresenta adaptações específicas para cada região do corpo, nas quais se identificam áreas de pele delgada e outras de pele espessa. A pele delgada, dotada de folículos pilosos e glândulas, é a mais encontrada; enquanto a espessa, basicamente limita-se às áreas palmo-plantares (James e Berger, 2007; Azulay, 2017).

Histologicamente, a pele é composta, essencialmente, por três grandes camadas de tecidos: uma camada superior – a epiderme; uma camada intermediária – a derme; e uma camada profunda, a hipoderme ou tecido celular subcutâneo, conforme a Figura 1 (Azulay, 2017).

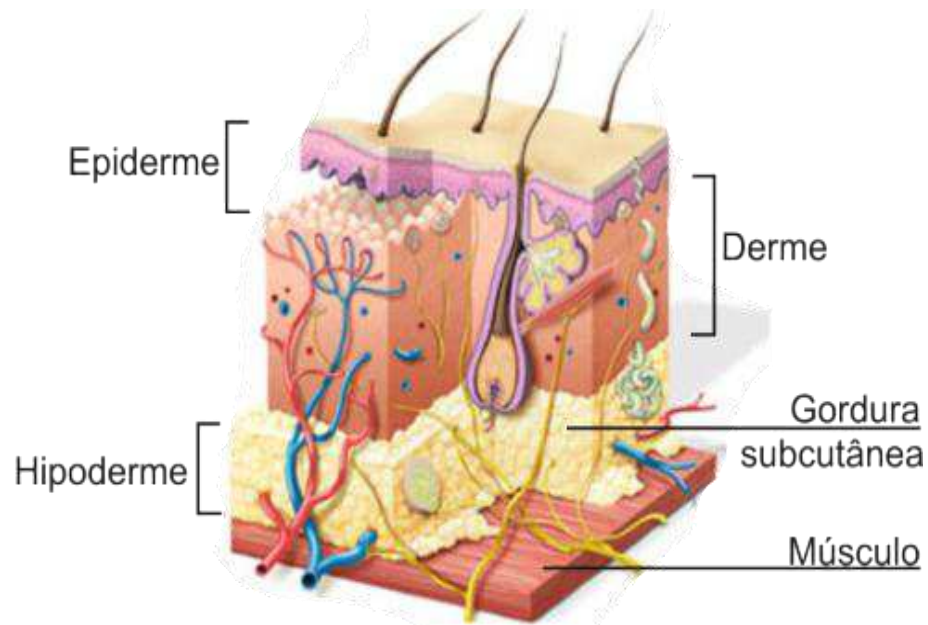


Figura 1 – Estrutura da Pele (Fonte: Adaptado de James e Berger, 2007).

A epiderme é a camada mais externa da pele, formada por epitélio pavimentoso estratificado queratinizado. É, ainda, dividida em cinco camadas (extratos): extrato córneo, extrato lúcido, extrato granuloso, extrato espinhoso e extrato basal; do mais externo, ao mais interno (Figura 2).

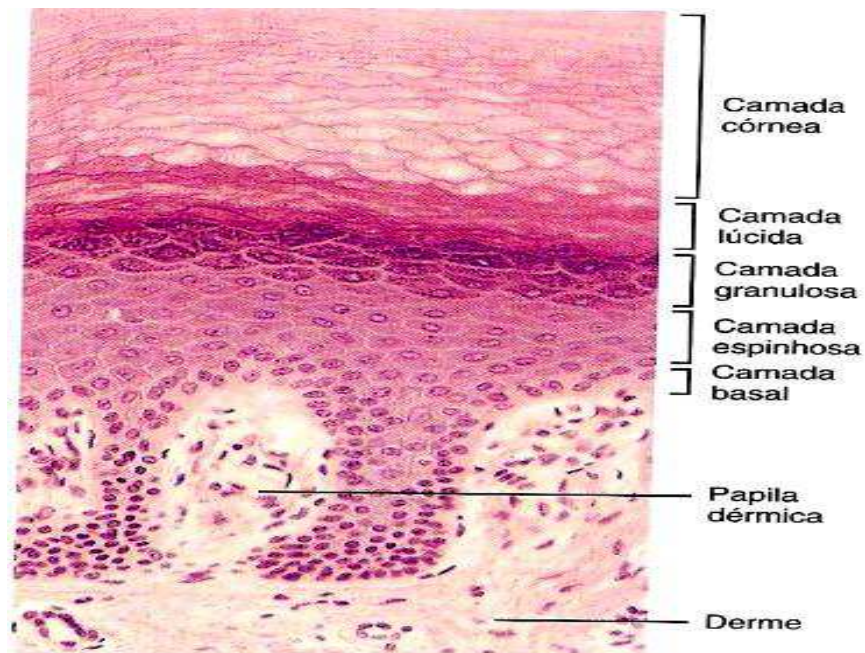


Figura 2 – Composição histológica da Epiderme (Junqueira, 2013).

A espessura da epiderme varia de 0,5 mm nas pálpebras a 1,5 mm nas regiões palmo-plantares. Há, na epiderme do adulto, três tipos básicos de células: o queratinócito ou célula escamosa, com papel ativo na função imune da pele e principal tipo celular responsável pela produção de queratina, proteína que forma a cobertura da pele e também das unhas e pelos; o melanócito, que sintetiza a melanina, responsável pela pigmentação da pele; e a célula de Langerhans, que participa das respostas imunes da pele. O extrato córneo, a parte mais externa da epiderme, possui entre 10 μ m e 20 μ m de espessura, é composto bioquimicamente por 80% de queratina, 5% a 10% de água, 5% a 10% de lipídeos, na maioria ceramidas, e pelo fator de hidratação natural (James e Berger, 2007; Sampaio, 2018).

A segunda camada da pele, disposta imediatamente abaixo da epiderme, é a derme, que é composta principalmente por três constituintes conjuntivos, responsáveis pela elasticidade, sustentação e estrutura da pele: colágeno, fibras elásticas e fibras reticulares. Sua espessura varia de 0,3 mm na pálpebra a 3,0 mm no dorso, chegando a uma espessura de quarenta vezes a da epiderme. É dividida em duas camadas, conforme a Figura 3:

- Derme papilar, que consiste numa fina camada superior e que é aderida firmemente à epiderme, composta por fibras de colágeno finas e dispostas aleatoriamente;
- Derme reticular, que é a camada inferior, mais espessa, e composta por grossas fibras de colágeno, dispostas paralelamente à superfície da pele (Habif, 2013).



Figura 3 – Composição histológica da Derme (Junqueira, 2013).

As principais células da derme, os fibroblastos, sintetizam o colágeno, as fibras elásticas e a matriz extracelular (MEC). O colágeno é o principal componente da derme, e compreende a principal proteína estrutural de todo o corpo, disposta em uma rede ortogonal na derme reticular, sendo predominantemente composta de colágeno tipo I (80 a 90%) e colágeno tipo III (de 8 a 12%); contribuindo com aproximadamente 70% do peso seco da pele (James e Berger, 2007; Junqueira, 2013). A termorregulação, a defesa imunológica e o suporte da rede vascular são outras funções da derme (Teixeira, 2013).

A junção entre a epiderme e derme é formada pela zona da membrana basal (ZMB), considerada um filtro poroso semipermeável, que permite a troca de células e líquidos entre a epiderme e derme, e que também serve de suporte estrutural à epiderme, mantendo unidas as duas camadas da pele (Azulay, 2017; Sampaio, 2018). É na derme que também se situam as estruturas vasculares, nervosas e os órgãos anexos da pele: glândulas sebáceas, sudoríparas e folículos pilosos (Habif, 2013; Sampaio, 2018).

A hipoderme, terceira e mais profunda camada da pele, é composta por tecido adiposo e por tecido conjuntivo frouxo, sendo o adiposo predominante. Por isso, sua espessura varia, assim como da epiderme e derme, de acordo com o local da pele, sexo e o peso corporal. É composta também por algumas fibras de colágeno que se conectam a ossos e músculos e em menor quantidade por células adiposas que servem como reserva de energia, isolante mecânico e térmico, funcionando como modeladora corpórea (James e Berger, 2007).

Embriologicamente, a pele deriva dos folhetos ectodérmico e mesodérmico. As estruturas epiteliais - epiderme, folículos pilossebáceos, glândulas apócrinas, glândulas écrinas e unhas – provêm do ectoderma. Os nervos e os melanócitos originam-se no neuroectoderma, e as fibras colágenas e elásticas, vasos sanguíneos, músculos e tecido adiposo originam-se do mesoderma (Junqueira, 2013; Azulay, 2017).

O pH da pele é levemente ácido, variando aproximadamente entre 5 e 6, o que contribui para que ocorra proteção contra microrganismos em sua superfície; já matriz extracelular apresenta um pH neutro (Leonardi, 2002).

A pele é também o órgão que mais reflete os efeitos da passagem do tempo. A pele jovem, em torno dos 20 anos de idade, geralmente, apresenta-se uniforme quanto à cor, textura, firmeza, ausência de manchas e rugas, sendo estas as

principais diferenças entre uma pele jovem e uma envelhecida (Batistela *et al.*, 2007).

Com o envelhecimento, diversas alterações ocorrem na pele e anexos; dentre elas, destacam-se maior fragilidade cutânea e menor capacidade da pele de atuar como barreira contra fatores externos; resistência ao calor diminuída, decorrente do menor número de glândulas sudoríparas; pele mais seca e rugosa devido à deficiência das glândulas sebáceas, resultando em pequena produção de sebo; menor estímulo sensitivo; diminuição da elasticidade, flacidez, alteração da resposta imunológica celular e diminuição da espessura da derme e da epiderme. Dessa forma, o surgimento de rugas, pele mais áspera, redução da elasticidade e firmeza da pele do rosto são os sinais mais expressivos do reflexo da idade biológica (Rezende, 2006; Son, 2018).

2.1.1 Envelhecimento Cutâneo

O envelhecimento pode ser definido como um conjunto de alterações morfológicas, fisiológicas e bioquímicas inevitáveis que ocorrem progressivamente no organismo ao longo da vida (Ribeiro, 2010).

A pele é um dos órgãos que expressa de forma mais precoce e visível a ação do tempo, quando em comparação aos demais, sendo o envelhecimento deste órgão decorrente de alterações celulares e moleculares. À medida que o processo de envelhecimento ocorre, a pele perde uma de suas principais propriedades que é a elasticidade, a qual está associada à perda do colágeno, de fibras elásticas, além da diminuição da funcionalidade das glândulas sudoríparas e sebáceas, diminuindo a hidratação e a quantidade de nutrientes da pele (Montagner, 2007; Strutzel, 2007; Son, 2018).

O processo de envelhecimento da pele é um fenômeno biológico complexo, classificado em:

- Envelhecimento intrínseco ou cronológico (Eint), o qual está relacionado à fatores fisiológicos e a predisposição genética do indivíduo sendo, portanto, esperado e inevitável. Ocorre de maneira mais suave, lenta e gradual, expressado clinicamente como uma pele mais fina, frágil, seca, e com rugas mais superficiais e inelásticas. Tais alterações clínicas são resultado da associação de diversas mudanças metabólicas, dentre elas: diminuição dos níveis hormonais e da

proliferação celular, degradação da matriz dérmica, mutação de genes nucleares e mitocondriais, aberrações no metabolismo de lipídeos e aminoácidos, acúmulo de espécies reativas de oxigênio, além de alterações na distribuição de água (Mesa-Arango, 2017)

- Envelhecimento extrínseco ou fotoenvelhecimento (Eext), é mais intenso e evidente na pele, sendo secundário à ação dos fatores ambientais e hábitos, como o abuso de tabagismo, consumo exagerado de bebidas alcóolicas e poluição ambiental, mas principalmente, pela ação maléfica da radiação ultravioleta, luz visível e radiação infravermelha e ação dos radicais livres (Mine, 2006; Suehara, 2008; Sandoval, 2015). Os fatores relacionados ao envelhecimento extrínseco decorrem, principalmente, da degeneração das fibras elásticas e colágenas de forma mais expressiva, culminando com o aparecimento de rugas mais profundas, manchas escuras na pele, ressecamento e perda da luminosidade da pele, além da flacidez cutânea mais expressiva (Buchil, 2002; Courderot-Masuyer, 2016).

As Figuras 4 e 5 e a Tabela 1 ilustram os sinais clínicos, cortes histológicos das peles jovem e da envelhecida; e as diferenças cutâneas decorrentes dos envelhecimentos intrínseco e extrínseco, respectivamente.

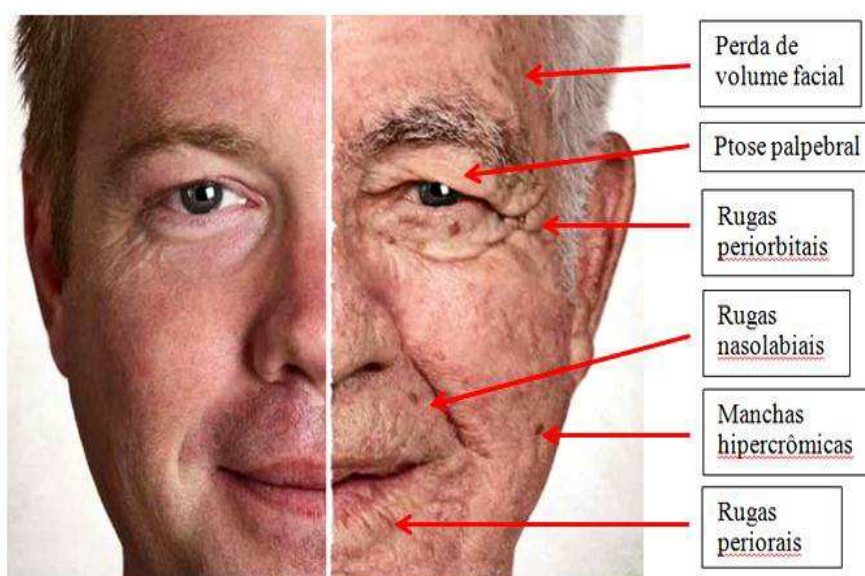


Figura 4 – Sinais Clínicos do Envelhecimento cutâneo (Fonte: <http://drpeterdobie.com/anti-ageing-medicine/>, 2017).

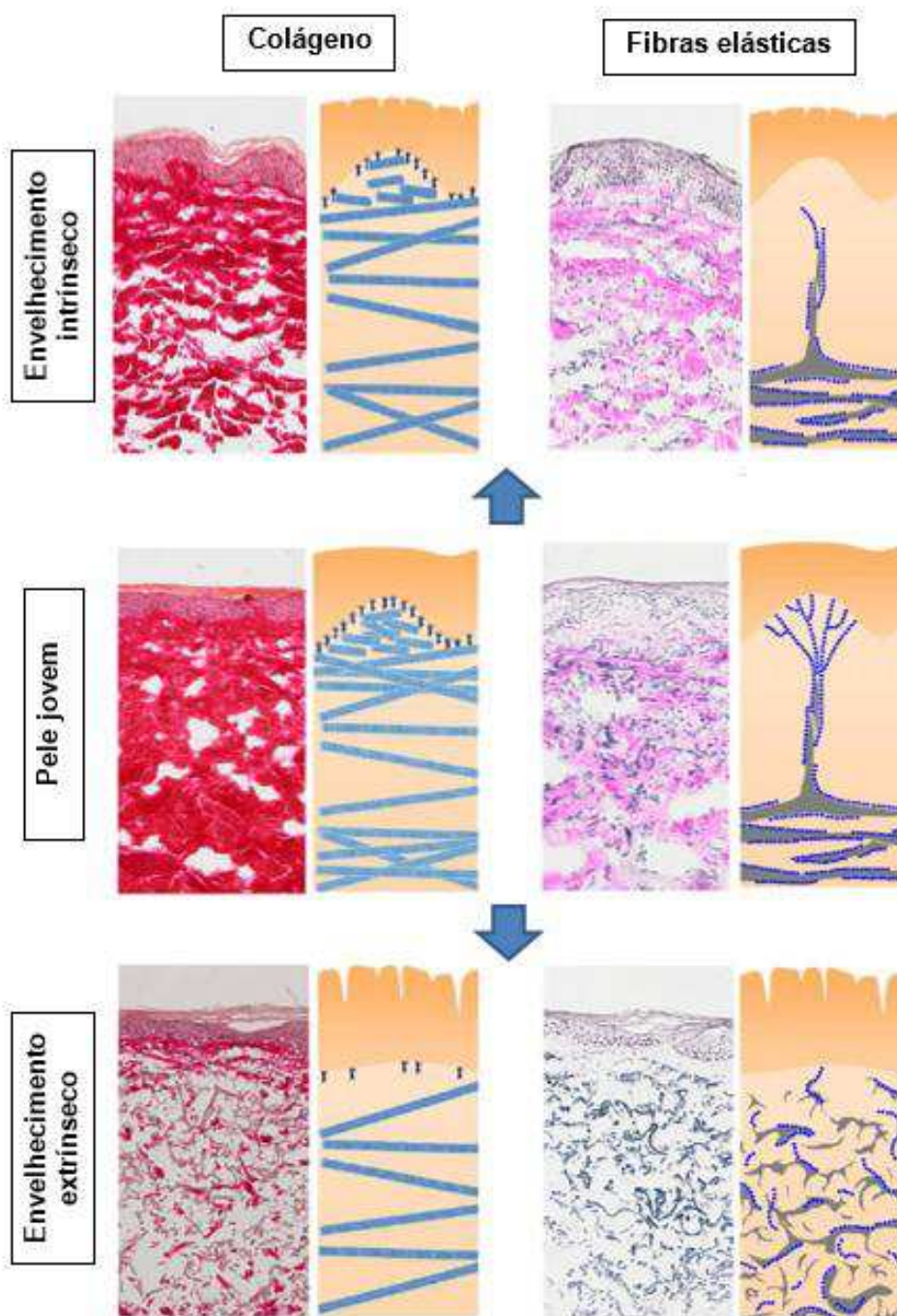


Figura 5 – Cortes histológicos e ilustrações que mostram a organização das fibras colágenas e elásticas na pele jovem, na pele decorrente do envelhecimento intrínseco e na pele decorrente do envelhecimento extrínseco. (Fonte: Adaptado de Naylor, 2011).

Tabela 1 – Alterações cutâneas, anexiais e histológicas que ocorrem nos envelhecimentos intrínseco e extrínseco individualmente.

	Envelhecimento Intrínseco	Envelhecimento Extrínseco
Rugas	Finas	Profundas
Fibras de colágeno	Discreta alteração no tamanho e organização	Grande alteração no tamanho e organização
Fibras elásticas	Reorganizadas	↓ Produção e ↑ degeneração
Folículo capilar	↓ Número e afinamento	↓ Número e estrutura:
Melanócitos	Normal	↓ Número e melanina
Glândulas sebáceas e sudoríporas	↓ Número	↓ Número: pele seca
Junção dermoepidérmica	Leve achatamento	Importante achatamento
Alterações pré-malignas	-	Ceratose Actínica
Alterações malignas	-	Carcinoma Basocelular e Carcinoma Espinocelular
Alterações benignas	Ceratose seborréica	Ceratose seborreica

Fonte: Adaptado de Montagner, 2009.

As alterações induzidas pelo fotoenvelhecimento podem ocorrer bem antes dos sinais do envelhecimento cronológico e, sem dúvida, dependem de inúmeros fatores, tais como o tipo de pele, natureza da exposição solar e capacidade individual de reparação do dano solar (Azulay, 2017; Son, 2018).

Os sinais de envelhecimento ocorrem, sobretudo como consequência do declínio das funções do tecido conjuntivo devido a ação dos vários fatores, como os radicais livres e exposição solar, que exacerbam a degradação enzimática do colágeno, das fibras elásticas, bem como de glicosaminoglicanos (GAGs), ácido hialurônico, queratina, condroitina e heparina que são também componentes da matriz extracelular. As metaloproteinases são as principais enzimas que degradam a matriz extracelular e seus componentes (Sadick, 2002; Lourith, 2016).

Sabe-se que o aumento do peso corporal e dos níveis de açúcar no sangue também pode ajudar a pele a envelhecer prematuramente (Landau, 2007; Bagatin,

2008). A Figura 6 ilustra os fatores extrínsecos relacionados ao envelhecimento cutâneo.



Figura 6 – Fatores extrínsecos relacionados ao envelhecimento cutâneo.

Vários estudos comprovam que o envelhecimento da pele provoca alterações qualitativas e degenerativas na derme, com diminuição do colágeno total e de suas frações I e III; fragmentação e desorganização das fibras colágenas, sendo comprovado que acontece uma perda média de 1% por ano do percentual total do colágeno a partir dos 30 anos (Ganceviciene, 2012), ocorrendo, porém mais rapidamente a partir dos 60 anos de idade; aumento da densidade do material elástico, com modificação da qualidade e da organização também da superfície de contato epiderme-derme e das fibras elásticas (Oriá, 2006; Ortolan, 2013).

É cada dia mais frequente a procura por tratamentos visando a manutenção de um rosto com aspecto jovial e saudável, tanto por mulheres como pelos homens. E são várias as técnicas de rejuvenescimento com a finalidade de corrigir ou retardar as alterações relacionadas ao envelhecimento cutâneo (Kadunck *et al.*, 2012).

2.1.2 Técnicas de Rejuvenescimento

As terapias antienvhecimento variam desde os cuidados de prevenção (evitando os fatores desencadeantes do envelhecimento extrínseco, principalmente), uso de medicamentos ou cosmeceuticos tópicos e/ou sistêmicos para tratar manchas e rugas superficiais, e a realização de vários procedimentos estéticos, que são tratamentos realizados principalmente pela área da dermatologia estética (Wollina, 2018).

E entre os procedimentos que são opções no tratamento das rugas e perda de volume facial, podem ser indicados os *peelings* químicos; a microdermoabrasão; tratamentos a laser, a radiofrequência, luz intensa pulsada, fotodermólise fracionada, fotomodulação – LED; aplicação de toxina botulínica; o microagulhamento; e o preenchimento cutâneo com preenchedores à base de colágeno, ácido hialurônico, hidroxiapatita, ácido poli-L(lático), ácido caprolactona (PCL); estes três últimos sendo também utilizados como bioestimuladores cutâneos; entre outros materiais (Kadunc *et al.*, 2012; Mogosanu, 2014).

O preenchimento cutâneo compreende a técnica que mudou completamente a perspectiva para o tratamento e rejuvenescimento das alterações relacionadas ao envelhecimento da pele, principalmente facial, especificamente para correção imediata de rugas e sulcos, e também reposição de volume facial; a partir da melhor compreensão do processo de envelhecimento e da maior procura por procedimentos minimamente invasivos (Attenello, 2015; Courderot-Masuyer, 2016).

2.2 Preenchimento Cutâneo

O preenchimento cutâneo (PrCt) refere-se a uma técnica da medicina estética, realizado principalmente por dermatologistas e cirurgiões plásticos em que são introduzidos preenchedores, em geral, ao nível da pele ou abaixo desta, quando se objetiva aumento do volume facial, por exemplo e oferece muitos dos benefícios de um *lifting* cirúrgico; porém, sem precisar de período de inatividade para recuperação (James e Berger, 2007; Fallacara, 2017).

Há mais de cem anos, têm sido descritas várias tentativas para restaurar o volume da face com o uso de injetáveis. Nesse processo, muitos foram os cientistas que contribuíram. Francis Rynd, médico irlandês, em 1844, inventou a seringa. Em

1893, Neuber publicou o primeiro enxerto de gordura autóloga em cicatrizes depressíveis. Frederick, em 1911, relatou o primeiro preenchimento com parafina e anestesia local para reconstrução facial. Charles Conrad Miller (1926) introduziu, por meio de cânulas, a gordura. Do final do século XIX ao começo do século XX, datam os primeiros trabalhos com o uso de preenchedores não biológicos, como parafina e vaselina, que eram usados em temperaturas que os tornassem líquidos, para que então se solidificassem à temperatura corporal. No século XX, por volta dos anos 1920, essas substâncias já estavam sendo abandonadas devido aos frequentes e diversos efeitos colaterais (Kadunck *et al.*, 2013; Basta, 2015).

Em 1977, Knaap realizou a primeira aplicação de colágeno bovino e, em 1981, ocorreu um grande avanço na pesquisa com esse produto. Este foi o primeiro preenchedor injetável com aprovação da *Food and Drug Administration* (FDA) para uso cosmético (Attenello, 2015).

De acordo com a Sociedade Americana de Cirurgiões Plásticos, dados estatísticos da Cirurgia Plástica de 2016 confirmam que 2,5 milhões de procedimentos estéticos utilizando-se preenchedores cutâneos foram realizados, ficando, assim, em segundo lugar dentre os procedimentos minimamente invasivos mais realizados, o que representa um aumento de mais de 16% em relação ao ano anterior. E desde o início do século, os números desses preenchimentos obtiveram um aumento de aproximadamente 275 % (Parada, 2016; Molliard, 2018).

Os preenchedores cutâneos (PC) compreendem biomateriais que, em geral, são injetados ao nível da derme, mas também podem ser implantados em regiões mais profundas como subdérmica ou supraperiosteal, e têm a função de corrigir imperfeições faciais, como rugas superficiais, moderadas ou profundas ou ainda a perda de volume ou do contorno facial. Esses biomateriais também podem atuar estimulando a derme, aprimorando o *turn-over* celular ou a produção de colágeno (neocolagênese) pelos fibroblastos do próprio paciente, durante e/ou após o processo de biodegradação destes nos tecidos implantados, aumentando a satisfação do paciente quanto ao resultado devido persistência da correção do defeito (Paula, 2014; Fallacara, 2017).

O desenvolvimento de preenchedores cutâneos com baixa citotoxicidade, alta funcionalidade, biocompatibilidade e baixa biodegradabilidade são de fundamental importância para alcance do efeito satisfatório. E recentemente, os polissacarídeos microbianos têm provocado grande interesse, graças as suas ótimas propriedades

físico-químicas e sua fácil biodegradabilidade quando incorporadas aos polímeros (Xian, 2015; Wu, 2017).

A maioria dos preenchedores utilizados atualmente são compostos por ácido hialurônico, polissacarídeo natural do corpo humano, encontrado em particular na derme, que compreende unidades de ácido D-glicurônico e N-acetil-D-glucosamida com ubíquas bandas glicosídicas de β -1,4 e β -1,3 (Wu, 2017) e o colágeno, outro biopolímero (Kim, 2015).

Nas Figuras 7 e 8 observam-se, respectivamente, áreas da face com potencial indicação de preenchimento cutâneo e imagens de pacientes antes e depois de tratamento realizado com preenchedor cutâneo.

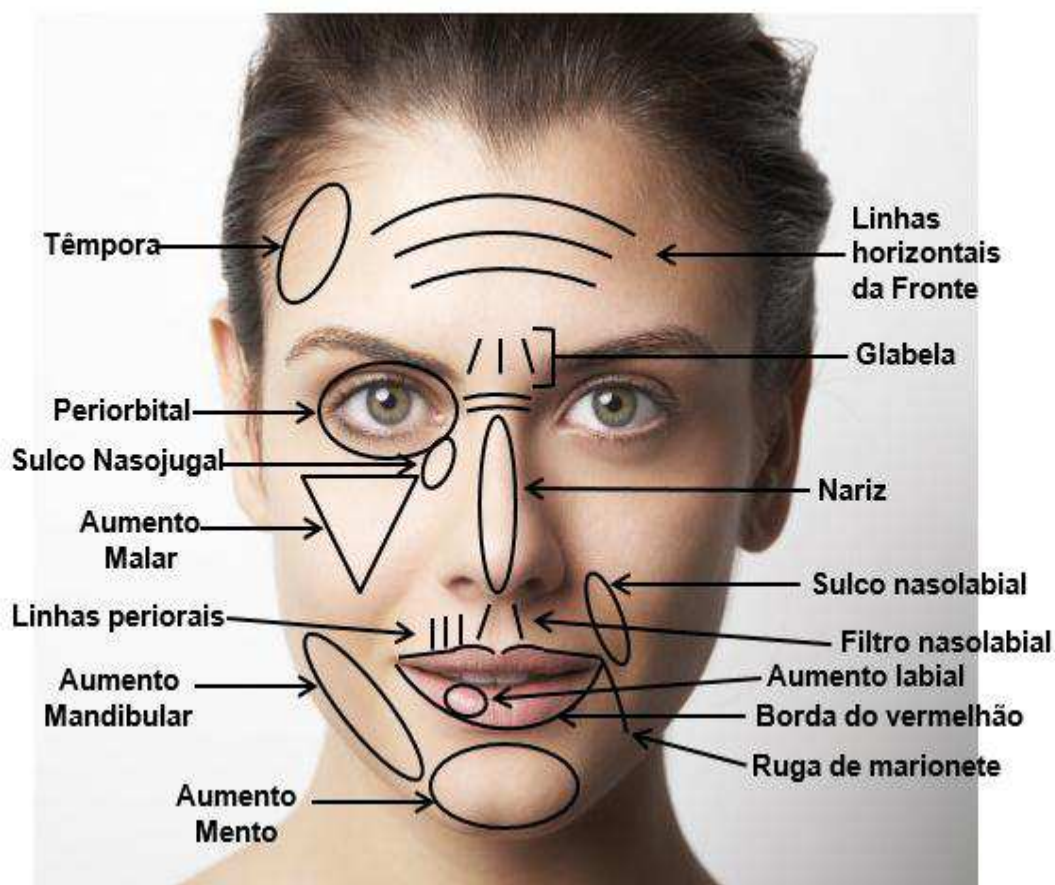


Figura 7 – Potenciais sítios para utilização do Preenchedor Cutâneo na face.



Figura 8 – Paciente tratado com preenchimento do sulco nasogeniano e mentoniano (a); volumização da região malar (b) e aumento do volume e contorno dos lábios (c) (Fonte: Arquivo pessoal).

Além das indicações estéticas do uso de PC, este também apresenta um papel importante na correção de defeitos secundários a desordens por trauma, cirúrgicas ou clínicas, como ocorre na lipodistrofia associada ao HIV, cicatrizes de acne ou assimetria facial ou defeitos de tecido mole (devido causa congênita, erro cirúrgico ou por trauma); exemplos ilustrados na Figura 9 (Xiang, 2017; Carruthers, 2018)



Figura 9 – Lipodistrofia facial em paciente HIV (a) e outro com cicatrizes de acne (b) Fonte: (<http://redenacionaldejovens.blogspot.com/2011/08/lipodistrofia-saiba-como-prevenir-e.html> e <https://cienciasesaber.wordpress.com/2016/12/14/cicatrizes-de-acne,2018>).

O Preenchimento Cutâneo é um procedimento realizado normalmente em consultório, sob anestesia tópica ou através de bloqueio de nervos (Figura 10), com o objetivo de reduzir a dor durante a realização do procedimento. Porém, no mercado farmacêutico, existem vários preenchedores comercializados que já apresentam incorporação de lidocaína na sua apresentação para uso (Monteiro, 2013).

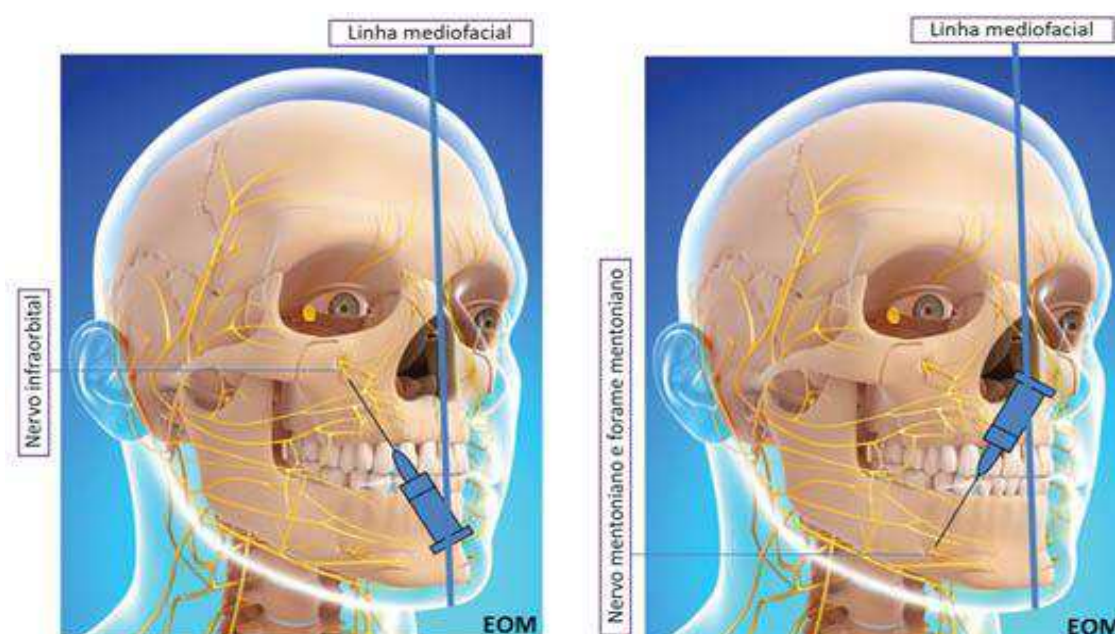


Figura 10 – Pontos anatômicos para realização de bloqueios dos nervos infraorbital e mentoniano (Fonte: Moreira, 2013).

O mercado para os preenchedores está em contínuo e acelerado crescimento e é caracterizado pelo desenvolvimento de produtos cada vez mais efetivos e seguros. Existem muitas categorias de preenchedores e cada uma é mais adequada e efetiva para uma determinada indicação (Cheng *et al.*, 2016). Algumas características dos PC são importantes para a efetividade do procedimento em questão, como observado na Tabela 2.

Tabela 2 – Características importantes para um preenchedor cutâneo ideal.

PREENCHEDOR CUTÂNEO IDEAL	
Características do material	<ul style="list-style-type: none"> • Biocompatível • Não antigênico • Não tóxico • Não carcinogênico • Não teratogênico • Estéril • Quimicamente inerte • Não modificado por líquidos orgânicos
Performance	<ul style="list-style-type: none"> • Reprodutível • Durável • Seguro • Sem migração • Capacidade de resistir às tensões mecânicas
Técnica de aplicação	<ul style="list-style-type: none"> • Técnica simples • Fácil aplicação
Outras	<ul style="list-style-type: none"> • Aprovado pelas autoridades sanitárias • Formulação estável, facilitando o transporte e o armazenamento • Boa relação custo/benefício • Reversível

Fonte: Adaptado de Kadunck *et al.*, 2013.

Uma classificação dos preenchedores atualmente utilizada é a que os divide em duas categorias:

I) Biodegradáveis temporários ou reabsorvíveis em meses ou anos, respectivamente e;

II) Permanentes ou não reabsorvíveis, os quais podem promover um resultado estético prolongadamente satisfatório, estimular a fibrogênese e produção do colágeno, mas com um potencial risco aumentado de complicações.

Os preenchedores biodegradáveis podem, por sua vez, ser divididos em dois outros grupos:

I) Não-permanentes ou preenchedores de substituição; os quais tem uma duração mais curta e que pode variar de alguns meses a um ano, sendo em geral absorvidos por ação macrofágica;

II) Semipermanentes ou preenchedores bioestimuladores, que são os que apresentam uma duração mais longa do efeito estético com mínimos efeitos adversos; resultando provavelmente em reação do tipo corpo estranho que estimula a ação dos fibroblastos e colagênese no local da injeção.

A Tabela 3 ilustra a classificação de preenchedores cutâneos.

Tabela 3 – Classificação de preenchedores cutâneos

Permanentes (Não-reabsorvíveis)	- Polimetilmetacrilato - Silicone - Poliacrilamida	
Biodegradáveis ou Reabsorvíveis	Semipermanentes ou preenchedores Bioestimuladores	- Ácido L-polilático - Hidroxiapatita de cálcio - Dextranômeros - Ácido caprolactona
	Não-permanentes ou Preenchedores de Substituição	- Ácido hialurônico - Colágeno - Gordura

Fonte: Adaptado de Cheng, 2016 e Fallacara, 2017.

A Tabela 4 ilustra exemplos de preenchedores Biodegradáveis e permanentes descrevendo características individuais de cada.

Tabela 4 – Preenchedores biodegradáveis e permanentes e suas principais características.

	PREENCHEDORES	CARACTERÍSTICAS
Biodegradáveis	Colágeno Bovino	Dura 3-6 meses; requer teste alérgico prévio; raras complicações.
	Colágeno humano	Dura de 4-7 meses; Dispensa teste alérgico prévio; raras complicações.
	Ácido Hialurônico (AH)	Duração de 6 meses até 2-3 anos; raras complicações; uso de hialuronidase(complicações);
	Plasma Rico em Plaquetas (PRP)	Usado como bioestimulador, ativando neocolagênese.
	Ácido poli-L- lático (PLLA)	Bioestimulador (neocolagênese 8-30 meses após injeção); biodegradado após 9-24 meses.
	Hidroxiapatita (CaHa)	Preenchedor e bioestimulador atualmente; facial e extrafacial (mãos); 9-12 meses duração.
	Ácido Policaprolactona (PCL)	Bioestimulador; 70%CMC/30%PCL sintética; induz neocolagênese por período > 12 meses.
	Carboximetilcelulose reticulada	Duração 9-12 meses; poucas reações
	Gordura autóloga	Duração pouco precisa; alguns efeitos adversos comuns; usado pela cirurgia plástica
	Permanentes	Parafina
Silicone		Não aprovado pelo FDA; sérias complicações; uso abandonado.
Polimetilmetacrilato (PMMA)		Complicações podem surgir muitos anos depois da aplicação; migração do sítio de aplicação.
Hidrogel de Poliacrilamida (PAAG)		97,5%água+2,5% PAAG; diminuição uso devido complicações.
Gel de Polialquilamida		Usado em lipodistrofias pacientes HIV +; complicações locais.
Suspensão de Polivinilpirrolidona-silicone		Composto de elastômero de silicone polimerizado; Não disponível no Brasil; complicações locais.
Microesferas de polivinilhidróxido suspensas em poliacrilamida gel		Aumento de lábios; raramente usado e sem relatos sobre efeitos colaterais; poucos trabalhos sobre este produto.

Fonte: Adaptado de Cheng, 2016

Apesar dos preenchedores não biodegradáveis, como o polimetilmetacrilato (PMMA), silicone ou hidroxietilmetacrilato, promoverem um efeito estético bastante duradouro, têm, entretanto, potencial risco de surgimento de complicações, efeitos

adversos mais sérios que os biodegradáveis, os quais podem surgir ao longo de toda a vida (Cheng *et al.*, 2016). Outra classificação que é utilizada refere-se à origem dos materiais que compõem os preenchedores (Tabela 5).

Tabela 5 – Classificação de preenchedores cutâneos quanto a origem.

PREENCHEDORES ORIGEM			
Não biodegradáveis	Autogênicos	Sem cultura	Gordura (derme)
		Com cultura	Cultura fibroblastos autólogos
	Alogênicos	Enxerto cadáver	Enxerto acelular dérmico
		Enxerto não cadáver	Colágeno extraído de cultura fibroblastos do tecido dérmico
	Heterogênicos		- Colágeno bovino - Ácido hialurônico animal (crista de galo)
	Sintéticos		- Ácido hialurônico não animal (fermentação bacteriana)

Fonte: Kadunc *et al.*, 2012.

Outro fator importante relacionado a indicação do uso dos preenchedores cutâneos e maior satisfação quanto ao resultado, diz respeito aos níveis de aplicação dos mesmos na pele do paciente. A depender do tipo de defeito a corrigir, o nível de aplicação na derme do preenchedor é diferente; no caso de rugas superficiais e/ou moderadas, é aplicado entre a camada papilar e a reticular da derme; nas rugas profundas ou para aumento do volume de partes moles, na derme reticular ou entre essa e o tecido celular subcutâneo, respectivamente, ou ainda na região supraparietal, conforme observado na Figura 11 (Fallacara, 2017).

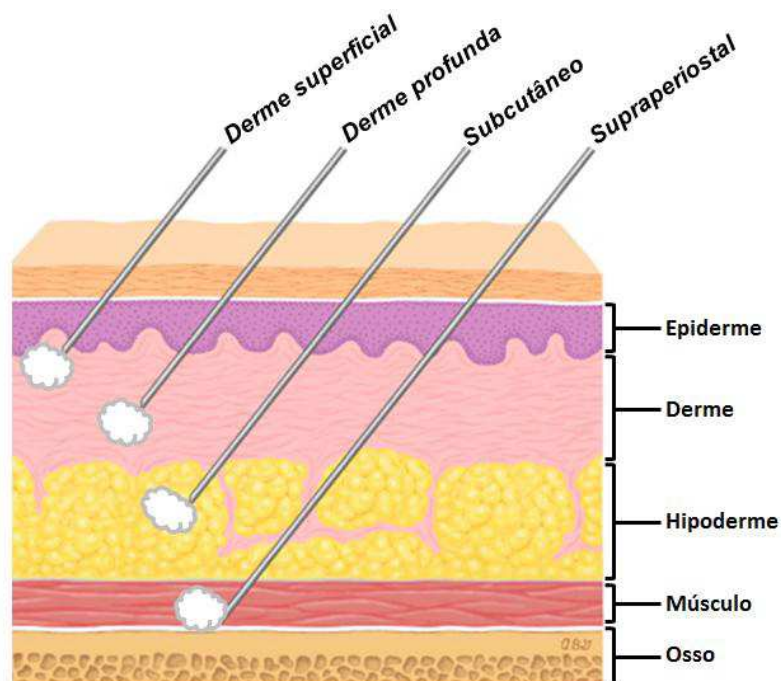


Figura 11 – Níveis de aplicação de preenchedor cutâneo (Fonte: Adaptado de Pavicic, 2015).

É fundamental a preparação adequada antes do tratamento com preenchedores cutâneos com o objetivo de minimizar riscos e diminuir ocorrência de efeitos adversos. Essa preparação deve incluir desde uma história clínica detalhada abordando as reações alérgicas ou de hipersensibilidade a alguma substância, inclusive anestésicos, além de orientação para suspensão do uso de medicamentos que aumentem risco de sangramento durante ou após procedimento, sendo necessário teste cutâneo alérgico prévio apenas para o uso de PC com colágeno bovino, termo de consentimento assinado pelo paciente (Anexo 1), registro fotográfico prévio. O preenchimento cutâneo é contraindicado durante a gravidez e período de lactação (Kadunck *et al.*, 2012).

Experiência e prática médica é requerida para injeção de PC, da mesma forma que a escolha do preenchedor que mais se adeque a cada paciente e sítio anatômico e quantidade exata a ser implantada são importantes.

São quatro as técnicas comumente usadas para a injeção dos preenchedores cutâneos (Figura 12):

- Linear retrógrada ou anterógrada - quando introduz todo o comprimento da agulha e segue injetando-se no movimento de retirar a agulha ou no movimento de introduzir a agulha, respectivamente;

- Puntuada seriada - quando preenche-se ponto-a-ponto a área a ser tratada;
- Em leque - a agulha é inserida como na técnica linear retrógrada, mas antes de remover a sua extremidade, ela é reintroduzida e posicionada de tal forma que outra linha de preenchimento é feita pelo mesmo orifício de entrada da anterior;
- Cruzada - Feitas injeções paralelas entre si, posteriormente injeções cruzadas perpendicularmente com as linhas paralelas iniciais, o que propiciam o preenchimento de grandes áreas ou para restauração de volume.

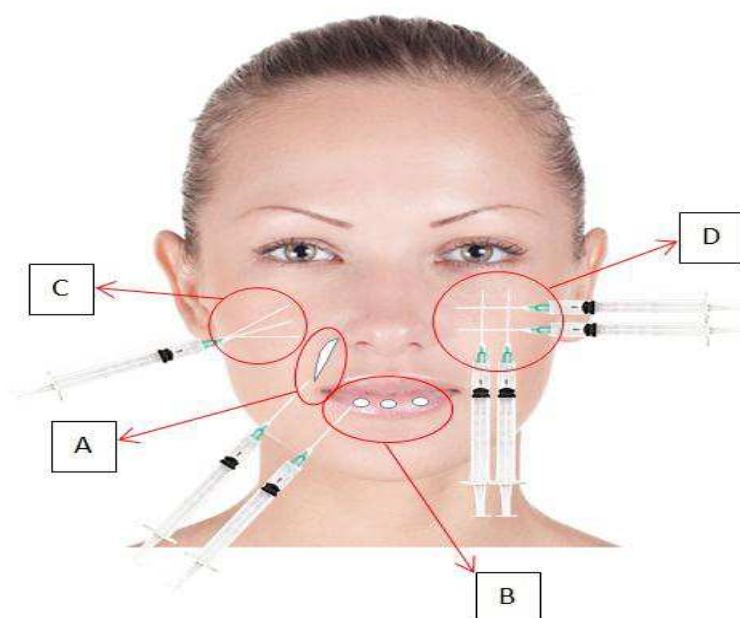


Figura 12 – Técnicas de Injeção de Preenchedores Cutâneos: Linear retrógrada ou anterógrada (A), Puntuada seriada (B), Em leque (C) e Cruzada (D) (Fonte: Própria)

Os preenchedores cutâneos, embora considerados muito seguros, podem causar complicações ou efeitos adversos, decorrentes da má técnica cirúrgica, intrínseca ao paciente ou do produto utilizado. Cuidadosa orientação e acompanhamento do paciente, planejamento terapêutico adequado, indicando-se o material mais correto a depender do defeito a ser corrigido e uma técnica/habilidade médica experiente são fundamentais para que seja alcançado o objetivo almejado (Parada, 2016; Skrzypek, 2018). Os efeitos adversos possíveis podem ser classificados como:

- Precoces - surgindo de poucos a vários dias; destacando-se reações locais (relacionadas apenas com a injeção) como inflamação local, hiperemia,

sensibilidade e hematomas; eritema; edema (uma das complicações mais comuns); injeção superficial do produto; infecção; complicações vasculares (necrose é a mais temida e complicada); reativação do vírus do Herpes; assimetria (sub ou sobrecorreção).

- Tardios - Entre semanas a anos; como surgimento de nódulos e/ou infecções; e migração do material de preenchimento (ocorrendo mais comumente entre os preenchedores não-biodegradáveis).

Uma outra queixa do paciente após realização de preenchimento refere-se ao aparecimento de coloração azulada no local da aplicação, condição chamada de efeito Tyndall, que ocorre geralmente quando o preenchedor é colocado muito superficialmente na pele; e esse efeito pode ser precoce ou tardio (Cho, 2018).

A Figura 13 ilustra imagens de pacientes com complicações após preenchimento facial.

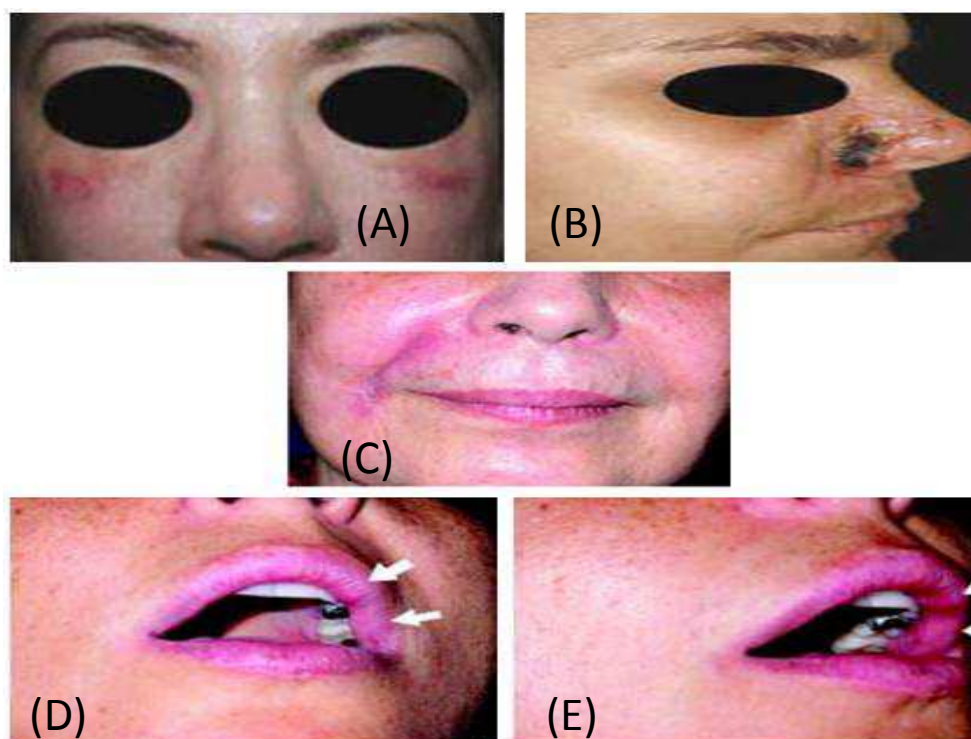


Figura 13 – Casos de complicações com o uso de preenchedores cutâneos: (A) Paciente com nódulos endurecidos e eritematosos na região periorbitária bilateralmente, após preenchimento com PMMA; (B) Necrose de asa nasal após uso de preenchedor no sulco nasolabial; (C) Paciente submetida ao preenchimento com poliacrilamida, nos sulcos nasogenianos, demonstrando endurecimento e hiperemia nas áreas preenchidas, principalmente à direita e (D) Visão frontal dos lábios, sendo que as setas demonstram os nódulos endurecidos provocados pelo preenchimento do lábio superior com polimetilmetacrilato e visão lateral dos lábios, da mesma paciente, após um ano do preenchimento (Fonte: <http://www.rbc.org.br/details/282/reacoes-adversas-a-substancias-de-preenchimento-subcutaneo>, 2018).

Desta maneira, a Engenharia de Materiais, mais especificamente, a área de biomateriais, têm buscado produtos médicos que possam ser utilizados com maior segurança e atenuem ou eliminem essas complicações, visando o bem estar do paciente (Kadunck *et al.*, 2012).

Sundaram e colaboradores (2010) em um estudo com diversos Preenchedores cutâneos mostraram que a avaliação reológica destes é importante para prever os padrões de integração no tecido e indicação clínica correta para cada preenchedor.

Preenchedores cutâneos com estruturas físico-químicas distintas apresentam comportamentos diferentes devido as suas propriedades reológicas (viscosidade, elasticidade e plasticidade). A viscosidade e o módulo de elasticidade devem ser avaliados. A estrutura físico-química e suas propriedades reológicas são importantes, pois determinam como o preenchedor se comporta durante e após a injeção deste no tecido. Sob condições fisiológicas, a viscosidade do material refere-se a 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 as forças de tensão da pele devido aos movimentos faciais (Sundaram *et al.*, 2013).

Segundo Lorenc (2017), o módulo elástico é o melhor parâmetro para diferenciar os preenchedores cutâneos.

Outras variáveis devem também ser consideradas, como as forças de cisalhamento que podem alterar a forma como o material flui durante a aplicação ou variáveis que podem afetar o material durante a aplicação, como o calibre da agulha, tamanho da seringa, a força e técnica de injeção (Sundaram *et al.*, 2013).

2.3 Biomateriais

Várias definições de biomateriais têm sido utilizadas por inúmeros autores ao longo dos últimos anos. Podem ser definidos como materiais que entram em contato com sistemas ou fluidos biológicos, com variadas aplicações: diagnósticas, vacinais, cirúrgicas ou terapêuticas, podendo ser constituídos de compostos de origem sintética ou natural, assim como de materiais naturais quimicamente modificados, tanto na forma de sólidos quanto de géis, pastas ou mesmo líquidos, não sendo

necessariamente fabricados, como válvulas cardíacas de porcos e partes de pele humana tratados para uso como implantes (FooK, 2017).

A propriedade fundamental para que uma substância seja classificada como biomaterial é a biocompatibilidade. E a partir da percepção de que materiais naturais ou artificiais poderiam ser utilizados para substituir partes danificadas do corpo humano, surgiu o que se denomina atualmente de primeira geração de materiais, que se baseava em três principais critérios:

- 1) capacidade de mimetizar propriedades mecânicas do tecido a ser substituído;
- 2) não toxicidade e;
- 3) inércia em resposta ao hospedeiro.

Enfatizava-se nesse período, portanto, o termo bioinerte, que refere-se ao material que tem baixa atividade química sendo reconhecido pelo meio biológico, porém, não interage com este.

A partir dos avanços obtidos, seja no campo dos biomateriais, na resposta do meio biológico e na compreensão dos fenômenos biológicos associados à interação com os biomateriais, foi possível o desenvolvimento de materiais específicos para uso como biomateriais, marcando a segunda geração destes, assim como os termos: biomiméticos, bioresponsivos e bioativos. Sendo biomiméticos, aqueles capazes de mimetizar a estrutura, bioquímica e biofuncionalidade de componentes teciduais, como por exemplo, alguns hidrogéis de colágeno e ácido hialurônico, que compreendem componentes naturais da matriz extracelular e são utilizados como preenchedores cutâneos (Santin, 2012).

A compreensão mais precisa das propriedades físico-químicas de alguns materiais como a Hidroxiapatita (HA), que é um material utilizado para preenchimento cutâneo assim como bioestimulador na área de dermatologia estética, favoreceu o melhor entendimento quanto a adesão e estimulação celular desta geração de biomateriais; da mesma forma que a quitosana e os ácidos poli láctico e glicólico, muito utilizados na área de dermatologia, também marcaram essa geração de biomateriais (Santin, 2012).

Os biomateriais de terceira geração estão relacionados aos biomateriais que permitem a modulação de processos, fundamental para a regeneração tecidual, e envolve a melhor compreensão sobre a adesão celular, proliferação e diferenciação através da ativação de determinados genes (Hench, 2012). Os avanços

relacionados ao surgimento de inovadores preenchedores cutâneos também exemplificam essa terceira geração de biomateriais (Santin, 2012; Lourith, 2016).

Os materiais biodegradáveis apresentam características químicas que são reconhecidas pelo meio biológico e que, simultaneamente, estimulam o crescimento celular e são biodegradados (Park e Lakes, 2007).

Particularmente, materiais biodegradáveis são materiais que são susceptíveis ao meio biológico por sofrerem redução da sua massa molar e que, sinergeticamente, os subprodutos – íons, meros e /ou oligômeros – estimulam a regeneração celular. Deve-se diferenciar o processo de degradação de materiais bioinertes e bioativos que podem conduzir a formação inflamatória (Santin, 2012).

Vários biomateriais poliméricos tem tido destaque na última década, principalmente em estudos para aplicações como preenchedores cutâneos no combate as alterações relacionadas ao envelhecimento cutâneo, considerando que são miméticos de fibras elásticas da pele e também da própria matriz extracelular (Lourith, 2016; Park *et al.*, 2017; Stander, 2018).

2.3.1 Biopolímeros

Biomateriais poliméricos de origem natural são denominados de biopolímeros. E estes têm despertado, cada vez mais, o interesse na área de dermatologia estética por possibilitarem o desenvolvimento de preenchedores cutâneos com propriedades mais próximas do meio biológico, em especial com as fibras elásticas e matriz extracelular de uma maneira geral – biomiméticos (Halimi, 2015; Lourith, 2016), enfatizando-se características como a biocompatibilidade, biodegradabilidade e não-citotoxicidade. Além disso, a correção de rugas ou do volume e contornos faciais com estes materiais permite uma satisfação imediata e muitas vezes mais duradoura do resultado, porque ao longo e após a biodegradação deste produto pelo organismo, a produção de componentes da própria matriz extracelular, como o colágeno, é aumentada (Lourith, 2016).

Os biopolímeros são produzidos a partir de organismos vivos e podem ser derivados de sistemas microbianos, extraídos de plantas, ou quimicamente sintetizados de sistemas biológicos básicos; e são maiores as vantagens destes em relação aos polímeros de origem sintética. Há três principais grupos de

biopolímeros: polissacarídeos, proteínas e polinucleotídeos (Aggarwal, 2012; Rebelo, 2017).

Quanto à ação da biodegradação, considera-se que estes devem ser suscetíveis a ação de hidrólise enzimática ou não-enzimática, que corresponde a degradação hidrolítica ou por hidrólise, ou seja, pela água (Ikada, 2000; Schoichet, 2010; Park *et al.*, 2017). As enzimas da MEC que desempenham um importante papel na elasticidade cutânea são derivados protéicos com 200 – 300 aminoácidos; sendo aquelas com peso molecular inferior a 500 Da consideradas de acordo com sua maior permeabilidade (Lourith, 2016).

Em geral, para muitos autores, todo polímero que perde sua massa desaparece ao longo do tempo após ter sido implantado no corpo humano, independentemente de como ocorreu sua degradação, se por hidrólise enzimática ou não, é denominado de absorvível, reabsorvível ou polímero bioabsorvível, como também biodegradável; mas para outros, o termo biodegradável deve ser usado apenas para os polímeros que sofrem degradação ao nível de meio ambiente, chamados polímeros ecológicos; enquanto que os polímeros implantados no corpo humano não deveriam ser chamados de biodegradáveis e sim absorvíveis ou reabsorvíveis (Ikada, 2000; Maia, 2010).

Nos últimos anos, estes materiais têm dominado o comércio clínico de preenchedores, não só dérmicos como de tecidos moles, principalmente por associar duas vantagens primordiais: a bioatividade e/ou adesão celular superior e também devido seu baixo custo, como resultado da disponibilidade da matéria-prima na natureza. Os biopolímeros tais como colágeno, elastina, ácido hialurônico, dextrana, celulose, quitina, quitosana e seus derivados como exemplo da carboximetilquitosana são todos biodegradáveis, outra importante característica para esta utilização clínica (Tharanathan, 2007; Van Nieuwenhove, 2017).

Os polissacarídeos naturais têm sua origem em plantas, animais invertebrados, fungos e microrganismos, embora também estejam presentes em mamíferos, porém, em menor proporção. Estes são constituídos por carboidratos, em geral, de alto peso molecular. São complexos coloidais que se hidrolisam em monossacarídeos contendo cinco ou seis átomos de carbono. Suas cadeias podem conter cargas ou serem neutras, sendo denominado de polieletrólitos, no primeiro caso, termo que se refere a polímeros que em solvente polar adequado apresentam cargas positivas e negativas, como positivas na quitosana e negativas em

carboximetilcelulose, ou cargas positivas e negativas na carboximetilquitosana, podendo ser utilizado como biomateriais na forma de hidrogéis (Halimi, 2015; Park *et al.*, 2017).

2.3.2 Hidrogeis

Hidrogeis são estruturas tridimensionais poliméricas, compostas de materiais naturais ou sintéticos ou ambos, com elevado grau de flexibilidade quanto à capacidade de absorção de água ou fluidos biológicos, caracterizados ainda por serem similar aos tecidos vivos, tornando-os capazes de se adequar a diversas aplicações (Ullah, 2015; Akhtar, 2016; Gyles, 2017). Segundo Hoffman (2012), a capacidade de absorção de água ocorre devido a presença de grupos hidrofílicos como $-NH_2$, $-OH$, $-COOH$, $-CONH_2$, $-CONH-$ e $-SO_3H$.

A classificação dos hidrogéis depende de suas propriedades físicas, meio de origem, carga iônica, método de preparação, degradabilidade, resposta e reticulação. A Figura 14 ilustra a classificação dos hidrogéis baseada em várias propriedades.

Quanto ao meio de origem, o hidrogel pode ser natural, sintético ou híbrido. No que se refere à degradabilidade, biodegradável ou não-biodegradável.

Eles podem ser agrupados em classes distintas, de acordo com o método de preparação:

- A) Hidrogel homopolimérico, que é decorrente de uma única classe de monômero;
- B) Hidrogel copolimérico, que é composto a partir de duas ou mais classes de monômeros, em que pelo menos um seja hidrofílico;
- C) Rede interpenetrante, decorrente de dois componentes poliméricos naturais e/ou sintéticos para formar a rede polimérica tridimensional.

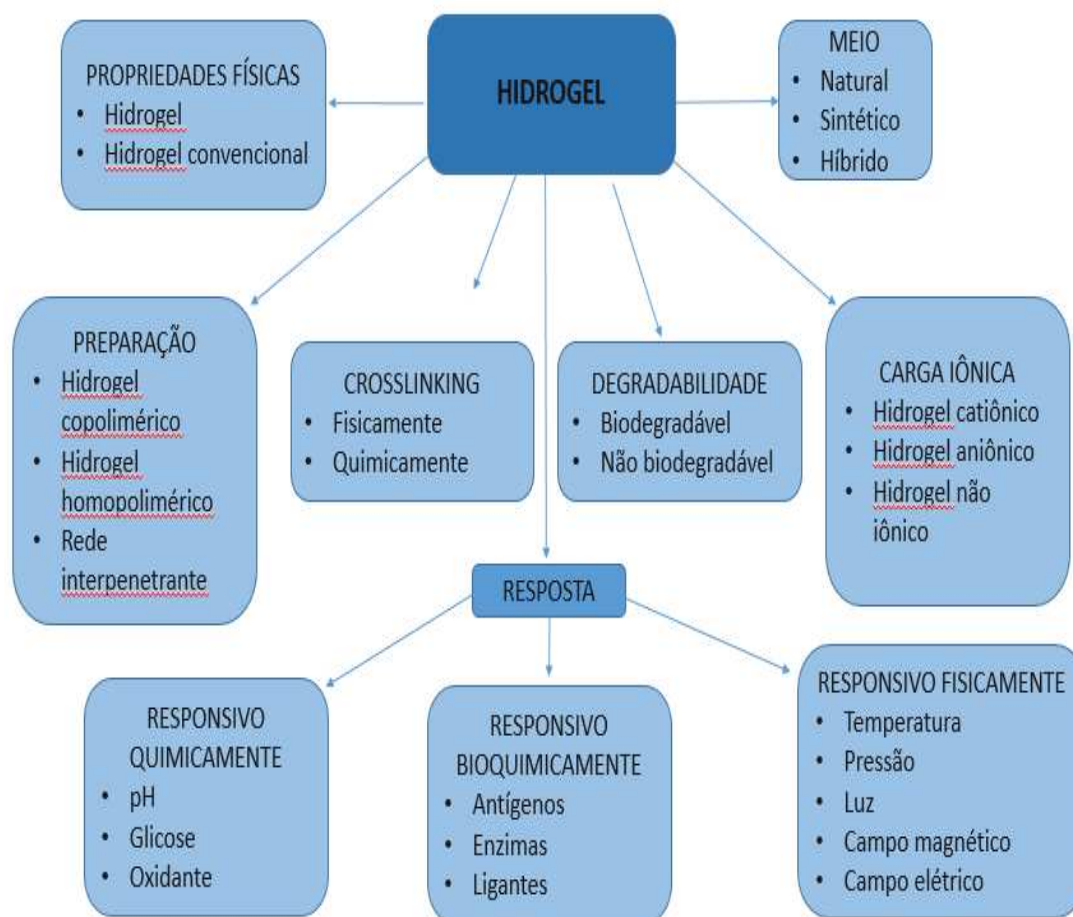


Figura 14 – Classificação dos Hidrogéis (Fonte: Adaptado de Ullah, 2015).

A classificação de acordo com sua estrutura física ou composição química é feita em:

- a) Amorfo (não-cristalino);
- b) Semicristalino, com fases amorfa e cristalina;
- c) Cristalino.

Quanto ao método de formação do hidrogel e reticulação são classificados em:

a) Reversíveis ou físicos: formados por estruturas que se mantêm como resultado de interações a nível intra ou intermolecular, como ligações iônicas, ligações de hidrogênio entre outras ou;

b) Permanentes ou químicos: formados por estruturas químicas resultantes de ligações covalentes. Estes últimos podem ser formados através de reticulação de polímeros solúveis em água com outros materiais ou da conversão de

polímeros hidrofóbicos em hidrofílicos através de reações de reticulação de forma a originar uma rede polimérica (Ratner *et al.*, 2012; Nguyen, 2010). A Figura 15 ilustra o esquema e as diferentes formas de preparação dos hidrogéis.

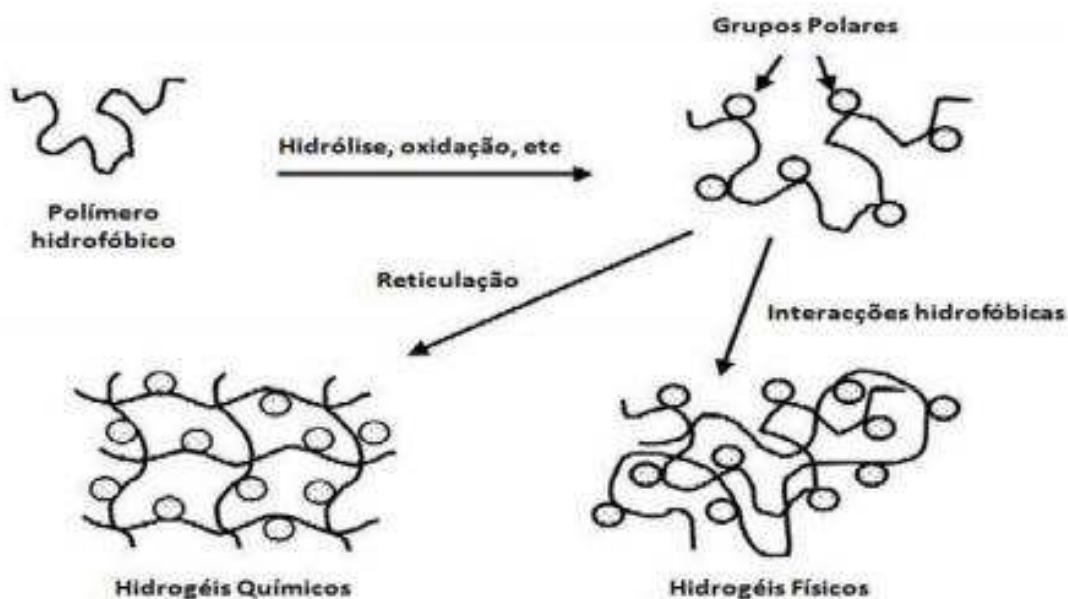


Figura 15 – Esquema dos métodos de preparação de hidrogéis de origem química e física. (Fonte: Hoffman, 2012).

Em resposta aos estímulos químicos, físicos ou bioquímicos, os hidrogéis podem ser considerados pH responsivo, glicose responsivo ou oxido responsivo; ser considerado fisicamente responsivo quando o estímulo for luz, temperatura, pressão, campo elétrico ou magnético; e finalmente responsivo a enzimas, antígenos ou ligantes (Ullah, 2015).

Compreendem uma classe de grande interesse na área de biomateriais utilizados na engenharia de tecidos e medicina regenerativa, sendo largamente usados em aplicações biomédicas por causa das suas específicas propriedades como a elevada composição de água, capacidade de imobilizar e liberar células, genes, proteínas, drogas e fatores de crescimento, além de sua biocompatibilidade e propriedades físicas e biológicas facilmente adaptáveis (Munarin, 2012; Uterman, 2017; Vedadghavami, 2017).

Eles são considerados sistemas apropriados para cirurgias minimamente invasivas agregando a arcabouços tradicionais a possibilidade de distribuí-los sem defeitos de tamanho ou forma, em alguns casos antes da gelificação e para obter uma liberação controlada de agentes terapêuticos (Munarin, 2012).

Entre os vários sistemas de arcabouços, o hidrogel, especialmente os compostos de polímeros naturais, tem sido a categoria mais estudada devido a sua semelhança estrutural e na composição com a matriz extracelular (MEC), seu comportamento reológico, associado a sua estrutura desejável para proliferação e sobrevivência celular. Devido a sua capacidade de mimetizar o comportamento de órgãos humanos, em especial a composição dérmica, em resposta a mudanças nas condições do meio como pH, temperatura, ação enzimática e campo elétrico, é considerado adequado para uso como implante dérmico (Ullah, 2015).

A estrutura tridimensional original degrada em substâncias não tóxicas para consolidar uma excelente biocompatibilidade do gel. A reticulação química, entretanto, é o método de escolha para que o hidrogel tenha sua resistência mecânica aumentada (Yamanlar, 2011; Wei, 2015; Akhtar, 2016; Wang, 2016).

A proporção de ligações cruzadas interfere na capacidade de inchamento dos hidrogéis, logo, quanto mais agente reticulante é incorporado na estrutura do gel, maior a proporção de reticulação, o que torna a estrutura mais rígida. A reticulação dificulta a mobilidade da cadeia polimérica e, conseqüentemente, a capacidade de inchamento ficará reduzida quando comparada aos mesmos hidrogéis com menor índice de ligações cruzadas (Peppas, 2000).

Uma grande variedade de materiais de origem natural ou sintética pode ser utilizada para formação de hidrogéis. Biopolímeros como quitosana e seus derivados, assim como: colágeno, fibrina, ácido hialurônico têm se destacado com prevalente utilização na área de engenharia de tecidos e também na utilização como preenchedores cutâneos (Drury, 2003; Park, 2013; Varaprasad, 2017).

Uma das principais vantagens do hidrogel de quitosana e de seus derivados é a longa estabilidade em temperatura ambiente sem redução do peso molecular, o que permite seu uso como biomateriais na temperatura corporal sem alterar o meio biológico (Furuike, 2017).

2.3.3 Reologia de hidrogéis

Segundo Pileggi (2001), a reologia é a ciência que estuda o fluxo e a deformação dos materiais quando submetidos a uma determinada tensão ou sollicitação mecânica externa.

A análise reológica de hidrogéis é de grande importância para compreensão do fenômeno de gelificação. A formação de um gel a partir de um biopolímero resulta da transformação de um líquido (solução) num sólido tipo gel, sendo possível a monitorização do processo de gelificação durante a realização deste, através de técnicas de reologia (Stocks, 2011).

Atualmente existe um grande interesse científico baseado nas características reológicas de preenchedores cutâneos, que é fundamental para que o médico consiga prever o comportamento do material implantado e então possa selecionar adequadamente o preenchedor a ser utilizado, considerando o defeito a corrigir, as técnicas de injeção que serão usadas e o nível de aplicação do mesmo (Molliard, 2018).

A reologia de um preenchedor cutâneo, especialmente a viscoelasticidade, compreende a propriedade que exhibe tanto o comportamento elástico como viscoso quando submetido a deformação por cisalhamento. Um material puramente elástico deforma até um certo ponto sob tensão de cisalhamento e recupera após cessada a tensão, enquanto que materiais puramente viscosos permanecem deformando ao longo da persistência da tensão de cisalhamento mas não se recupera após fim da tensão. Um preenchedor cutâneo para ser efetivo é preciso que apresente estas duas propriedades, visto que é submetido a diferentes tipos de força durante a injeção deste e após ter sido injetado (Pierre, 2015; Billon, 2016).

Há quatro parâmetros reológicos utilizados para descrever as propriedades viscoelásticas:

G^* (módulo complexo), que mede todas as propriedades viscoelásticas ou “dureza” do material; é determinado pela equação:

$G^* = \sqrt{(G')^2 + (G'')^2}$, onde G' e G'' são derivadas obtidas a partir de testes em reômetro;

G' (módulo elástico), representa a fração de energia de G^* armazenada pelo hidrogel durante a deformação e usada para recompor a forma originária;

G'' (módulo viscoso), representa a fração de energia de G^* perdida pelo hidrogel durante a deformação através da fricção interna; refletindo a incapacidade do hidrogel de recuperar sua forma completamente após remoção completa da tensão de cisalhamento;

$\tan \delta$ (refere-se à elasticidade do material), e compreende a razão entre as propriedades viscosas e elásticas, definida pela equação:

$$\tan \delta = G''/G';.$$

E determina se o material é predominantemente elástico ($\tan \delta < 1$) ou se predominantemente viscoso ($\tan \delta > 1$); para que qualquer preenchedor seja efetivo, este precisa ser viscoelástico (Figura 16):

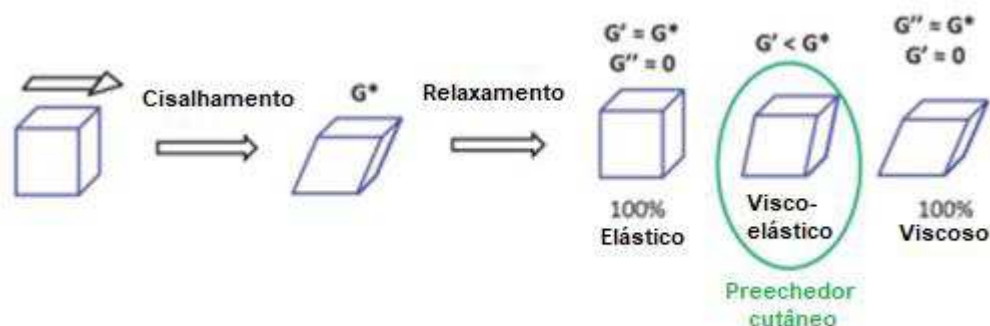


Figura 16 – Efeitos da tensão de cisalhamento nos materiais elástico, viscoso e viscoelástico (Fonte: Pierre, 2015).

As propriedades viscoelásticas dos preenchedores são determinadas durante o processo de produção dos mesmos, onde para um determinado preparo, a dureza do gel e o módulo elástico são proporcionais ao nível de reticulação, enquanto que todos os outros fatores são iguais, sendo considerado por vários autores como a propriedade mais importante (Zuidema, 2014; Lorenc, 2017; Billon, 2017).

É importante considerar também outras variáveis, como o tamanho e calibre da agulha, tamanho da seringa, força de ejeção, e técnica de injeção, visto que estes fatores afetam as forças de cisalhamento exercidas sobre o PC enquanto este está sendo injetado.

As forças de cisalhamento podem alterar o comportamento do preenchedor, afetando a sua viscosidade, elasticidade ou ambas. Se estas forças são muito grandes, a estrutura físico-química do PC pode ser alterada e quanto menor a viscosidade do preenchedor, maior será a modificação estrutural deste. Isto é, quando um preenchedor é injetado na face, este é submetido a ação em soma de tensão de cisalhamento, que leva a uma deformação devido ação de força aplicada ao longo da superfície do material do tipo tensão lateral ou torção num plano e forças de compressão x estiramento, ou seja, quando a força é aplicada perpendicularmente ou em compressão ao longo de um eixo; na primeira ocorrendo mudança da forma e dimensão mantida e na segunda, a forma é mantida e as

dimensões mudam (Pierre, 2015). A Figura 17 mostra os dois tipos de deformação associados aos preenchedores cutâneos.

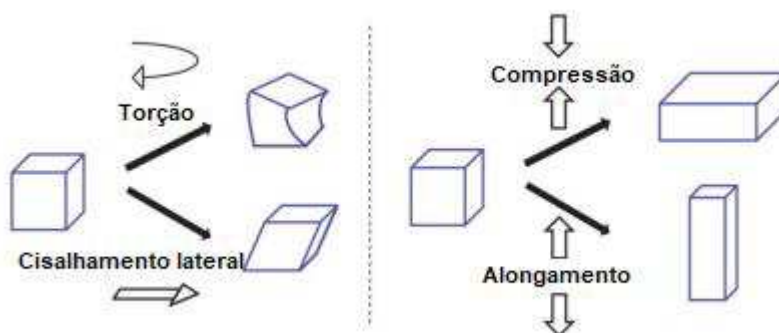


Figura 17 – Tipos de deformação associados aos preenchedores cutâneos (Fonte: Pierre, 2015).

Polímeros ultramacios, ou seja, com módulo elástico menor que 100 kPa, como acontece com os hidrogéis usados como preenchedores cutâneos, apresentam propriedades que, a partir do momento que são injetados, impedem o processo de colonização bacteriana como ocorre com vários biomateriais implantados (Wang, 2016).

A coesividade de um hidrogel expressa como o preenchedor se comporta uma vez implantado na face. Refere-se principalmente ao grau de atração entre as unidades do hidrogel reticulado. Pode ser medida como a resistência a compressão/alongamento vertical. A Figura 18 apresenta os possíveis resultados em resposta ao teste de compressão.



Figura 18 – Teste de compressão a um peso constante realizado para preenchedores cutâneos. F é a força aplicada a um peso constante (Fonte: Pierre, 2015).

A falta de coesividade entre as partículas do hidrogel também aumenta a chance de separação de partículas ao ser depositado o material, potencialmente desencadeando uma possível migração do preenchedor. E essa migração poderá

ocorrer independentemente da “dureza” do produto. E, além disso, poderá haver uma projeção vertical como decorrente do tamanho médio da partícula (Billon, 2016).

E quanto à viscosidade, que compreende a medida da resistência ao fluxo do preenchedor quando aplicada uma tensão de cisalhamento; tanto quanto maior a tensão, a viscosidade do material diminuirá. Sob baixas taxas de cisalhamento, o preenchedor tende a exibir suas propriedades elásticas sendo, portanto, a viscosidade importante sob taxas extremamente elevadas de cisalhamento ou durante a injeção quando o comportamento é de um material viscoso (SUNDARAM *et al.*, 2010).

A exposição a essas taxas elevadas fará com que a força de extrusão seja alterada; sendo então a força de extrusão, uma medida da força necessária para injetar um preenchedor a uma taxa fixa através da agulha ou cânula utilizada (Zuidema, 2014; Pierre, 2015). Logo, quanto maior a viscosidade do material, maior será a força de extrusão e isso poderá dificultar a injeção do produto pelo médico e, por sua vez, comprometer negativamente o resultado final.

2.4 Carboximetilquitosana

A quitosana (QS), polímero natural de grande importância para uso na medicina, com excelentes propriedades, incluindo biocompatibilidade, biodegradabilidade, não toxicidade, atividade antimicrobiana, baixa imunogenicidade, custo e acessibilidade é derivada da desacetilação parcial da quitina, um polissacarídeo natural e o segundo mais abundante da natureza, encontrado predominantemente no exoesqueleto de crustáceos (Silva *et al.*, 2012; Inzana, 2016; Malerba, 2016). A QS é considerada um polissacarídeo amino com unidades lineares binárias de β -(1-4) -2-amino-2-desoxi-D-glicose. A Figura 19 ilustra a reação de desacetilação da quitina em quitosana.

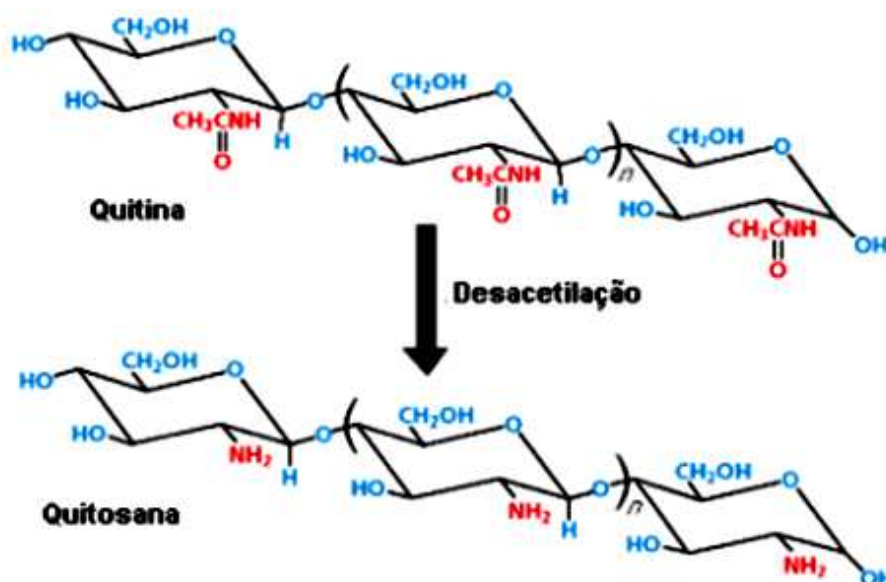


Figura 19 – Reação de desacetilação da quitina em quitosana (Fonte: Spin-Neto, 2008).

A quitosana tem notáveis propriedades biomédicas como atividades analgésicas, antibacterianas, antifúngicas e propriedades hemostáticas, além de relatos da sua utilização como implante para aumento de tecidos moles (Struszczuk, 2002; Khor e Lim, 2003; Yu-Ji et al, 2012; Shukla, 2013; Logithkumar *et al.*, 2016).

A quitosana tem uma estrutura cristalina rígida, a qual limita sua efetiva aplicação em vários processos; além disso, algumas aplicações da QS na área médica também são limitadas por problemas decorrentes da hidrosolubilidade, uma vez que esta é insolúvel em água com pH igual ou maior que o fisiológico (Shariatina, 2018).

A existência de grupos funcionais amino e hidroxil em sua estrutura permite sua modificação química com o objetivo de melhorar algumas limitações (Mourya, 2010; Shariatinia, 2018). Um dos processos que permite tais modificações na molécula da quitosana é o processo de carboximetilação, dando origem a derivados carboximetilados, com ampliação de seus potenciais nas aplicações médicas e farmacêuticas a partir da sua solubilidade em meios neutros ou básicos (Sashiwa, 2004; Campana-Filho, 2009; Fonseca-Santos, 2017). A carboximetilquitosana, em comparação com outros derivados da quitosana solúveis em água, tem sido mais amplamente estudada por ser de fácil síntese, caráter anfótero e ter amplas possibilidades de aplicação (Mourya, 2010).

Os derivados da Quitosana obtidos por carboximetilação são de 3 tipos: O-carboximetilquitosana (OCMQ), N-carboximetilquitosana (NCMQ) e N,O-carboximetilquitosana (NOCMQ). A reação de Carboximetilação ocorre especialmente ou nos grupos C-6- hidroxil ou na metade dos grupos NH_2 que produz compostos de N,O-carboximetilquitosana, com um grupo amino primário ($-\text{NH}_2$) ou uma amina secundária ($-\text{NH}-\text{CH}_2\text{COOH}$) (Shariatinia, 2018).

As aplicações médicas da carboximetilquitosana (CMQ) se devem, sobretudo, a sua solubilidade em meio fisiológico e às características associadas à segurança de seu uso, tais como baixa toxicidade, biodegradabilidade, ausência de alergenicidade, fácil degradação, boa capacidade de formação de películas, fibras e hidrogéis (Farag, Mohamed, 2013; Zhao *et al.*, 2013). Os hidrogéis de carboximetilquitosana apresentam maiores vantagens em comparação aos de quitosana, em destaque, habilidade de retenção em mistura, solubilidade em água, biodegradabilidade, biocompatibilidade, atividade antioxidante, antibacteriana e maior capacidade adsorptiva, decorrente de maior número de grupos quelantes e aumento da flexibilidade da cadeia aumentada (Shariatinia, 2018).

Os grupamentos amino (NH_2) protonados (NH_3^+) da quitosana e de seus derivados carboximetilados atuam como sítios antibacterianos. A natureza policatiónica da cadeia do polímero permite sua ação na superfície de carga negativa das células bacterianas alterando sua permeabilidade resultando em vazamento de componentes intracelular, conforme citado anteriormente, ou seja, a atividade antimicrobiana do polímero se dá por interação dos grupos amino livres da cadeia polimérica. Desta forma, a ação antimicrobiana está relacionada à quantidade de grupamentos aminos protonados ao longo da cadeia polimérica da quitosana e de seus derivados (Mourya, Inamdar e Tiwari, 2010).

Segundo Tan e colaboradores (2011), a CMQ tem atividade inibitória comprovada em relação a inibição da formação de biofilmes bacterianos principalmente por bactérias Gram-negativas quando comparada com as Gram positivas. Este fato deve-se, provavelmente, pelas propriedades físico-químicas de parede bacteriana e o impedimento da adesão celular entre as bactérias.

Estudos recentes demonstram que a CMQ promove, além de atividade antibacteriana e não-toxicidade, o estímulo ao crescimento tanto *in vivo*, como *in vitro*, dos fibroblastos humanos (Mogosanu, 2014). E tem sido relatado que a CMQ pode desempenhar uma ação antioxidante devido, sobretudo, a existência de grupos

amino e hidroxil nas cadeias poliméricas (Upadhyaya, 2013); além disso, foi também observado que diminuindo o peso molecular da CMQ, sua ação antioxidante era aumentada e isso é atribuído ao número diminuído de ligações de hidrogênio intra e intermolecular (Shariatnia, 2018). Ademais, seu baixo peso molecular pode promover aumento na produção de fibroblastos da pele normal (Chen *et al.*, 2002).

Na N-carboximetilquitosana o número efetivo de grupamentos aminos é baixo, por causa da substituição de grupamentos carboximetil na estrutura do polímero, causando queda da ação antibacteriana. Já na O-carboximetilquitosana, a inserção de grupamentos carboximetil ocorre somente nos grupamentos hidroxilas. Logo, o número de grupamentos aminos não é alterado e maior é a sua atividade antibacteriana. Além disso, a ação antimicrobiana da quitosana e de seus derivados muitas vezes é influenciada pela sua massa molecular, pois a maior massa molecular do polímero faz com que o conteúdo de $-NH_2$ também aumente (Mourya, Inamdar e Tiwari, 2010).

Os sítios reativos da quitosana para carboximetilação são os grupos amino e hidroxil presentes em sua cadeia. A reticulação das cadeias poliméricas da quitosana tem sido utilizada também para alterar a solubilidade em meio ácido. Dentre os diversos reagentes usados para a reticulação deste biopolímero, destacam-se o etilenoglicoldiglicidil éter, a epiclorigrina e, mais recentemente, a genipina e o tripolifosfato de sódio, em virtude da sua menor toxicidade em relação aos outros reticulantes (Gonsalvez, 2011). Observa-se na Figura 20 as estruturas químicas dos diferentes tipos de carboximetilquitosana.

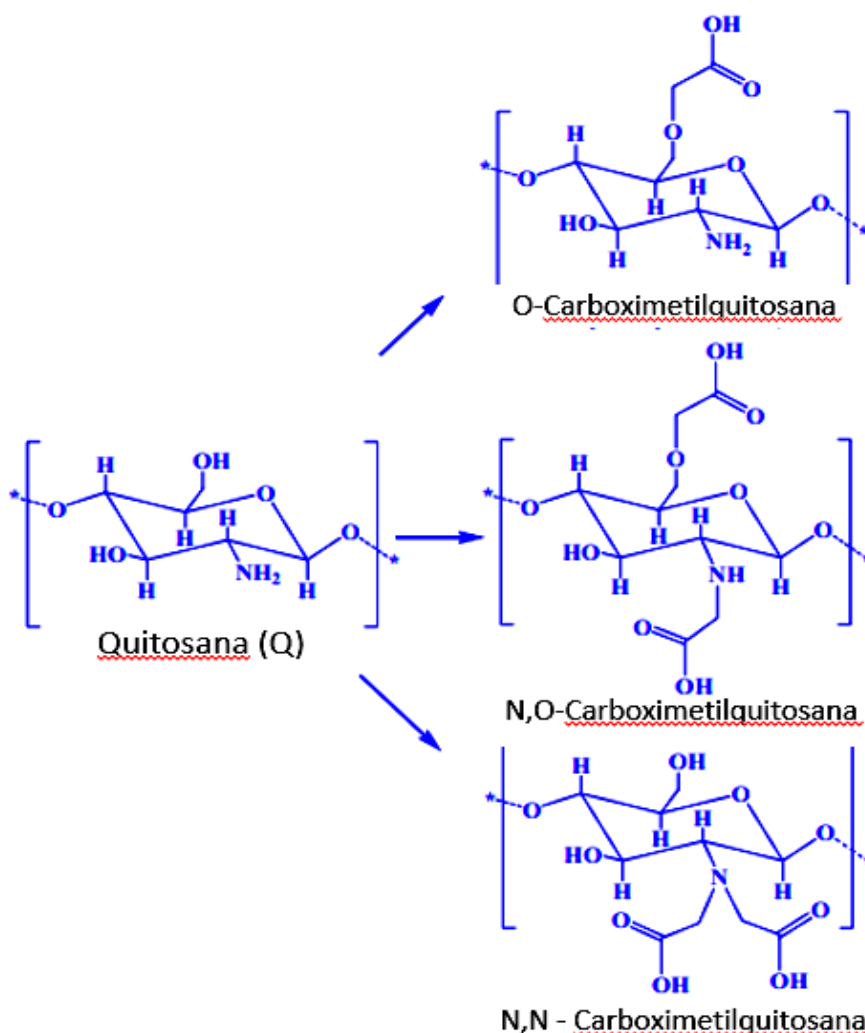


Figura 20 – Estruturas químicas da Quitosana (Q), e Carboximetilchitosana (Fonte: Katugampola, Winstead, Adeleke, 2014).

A CMQ além de permitir seu uso em amplo espectro, em especial na forma de hidrogel, e também estimular a atividade da lisozima extracelular presente em fibroblastos cutâneos influenciando o aumento da produção de colágeno da pele, determina importante estímulo para indicação como preenchedor cutâneo seja de forma isolada ou na combinação com outros biopolímeros, a exemplo do próprio colágeno (Fonseca-Santos, 2017; Shariatinia, 2018).

2.5 Colágeno

O colágeno é uma proteína amplamente distribuída pelos tecidos conjuntivos do corpo, com fibras variando em diâmetro entre 2 e 15 μm , dispostas ao longo da derme papilar como rede ondulada fina e na derme reticular, como uma rede

espessa. É composta por cadeias peptídicas α organizadas de forma paralela a um eixo e formando as fibras de colágeno. E tem como principal função contribuir com a integridade estrutural, resistência e elasticidade da matriz extracelular da derme (Silva, 2012; Qiu, 2015; Inzana, 2016).

São conhecidos, atualmente, pelo menos 29 tipos diferentes de colágeno. A estrutura básica de todos, entretanto, é a mesma e compreende três cadeias polipeptídicas α de mesmo tamanho, que se arranjam em uma estrutura de tripla hélice, sendo as fibras ligadas entre si através de pontes de hidrogênio e ligações covalentes. A estrutura básica, denominada de tropocolágeno, tem massa molecular de aproximadamente 280 kDa, 300 nm de comprimento e 1,5 nm de diâmetro. Apesar da variação, é característica dessas cadeias a repetição do aminoácido glicina a cada terceira posição da sequência. Dessa forma, cada cadeia apresenta a sequência Gly-X-Y, em que X e Y variam conforme o tipo de colágeno analisado, mas são frequentemente preenchidas pelos aminoácidos 4-hidroxiprolina e prolina (Azulay, 2017).

O colágeno, especificamente o tipo I, corresponde a maior parte da matriz dérmica da pele adulta – cerca de 85%, e cerca de 10% de colágeno tipo III (Sampaio, 2013). A tripla hélice do colágeno tipo I é constituída por 2 cadeias α 1 e uma α 2; enquanto que a do colágeno tipo III é composta por três cadeias α 1 idênticas. Anualmente, a partir dos 30 anos de idade ocorre uma redução de 1% (Baumann, 2006; Lourith, 2016).

As Figuras 21 e 22 ilustram a estrutura do colágeno e a organização das fibras de colágeno, respectivamente.



Figura 21 – Estrutura do colágeno (Fonte: Adaptada de Paula, 2009).

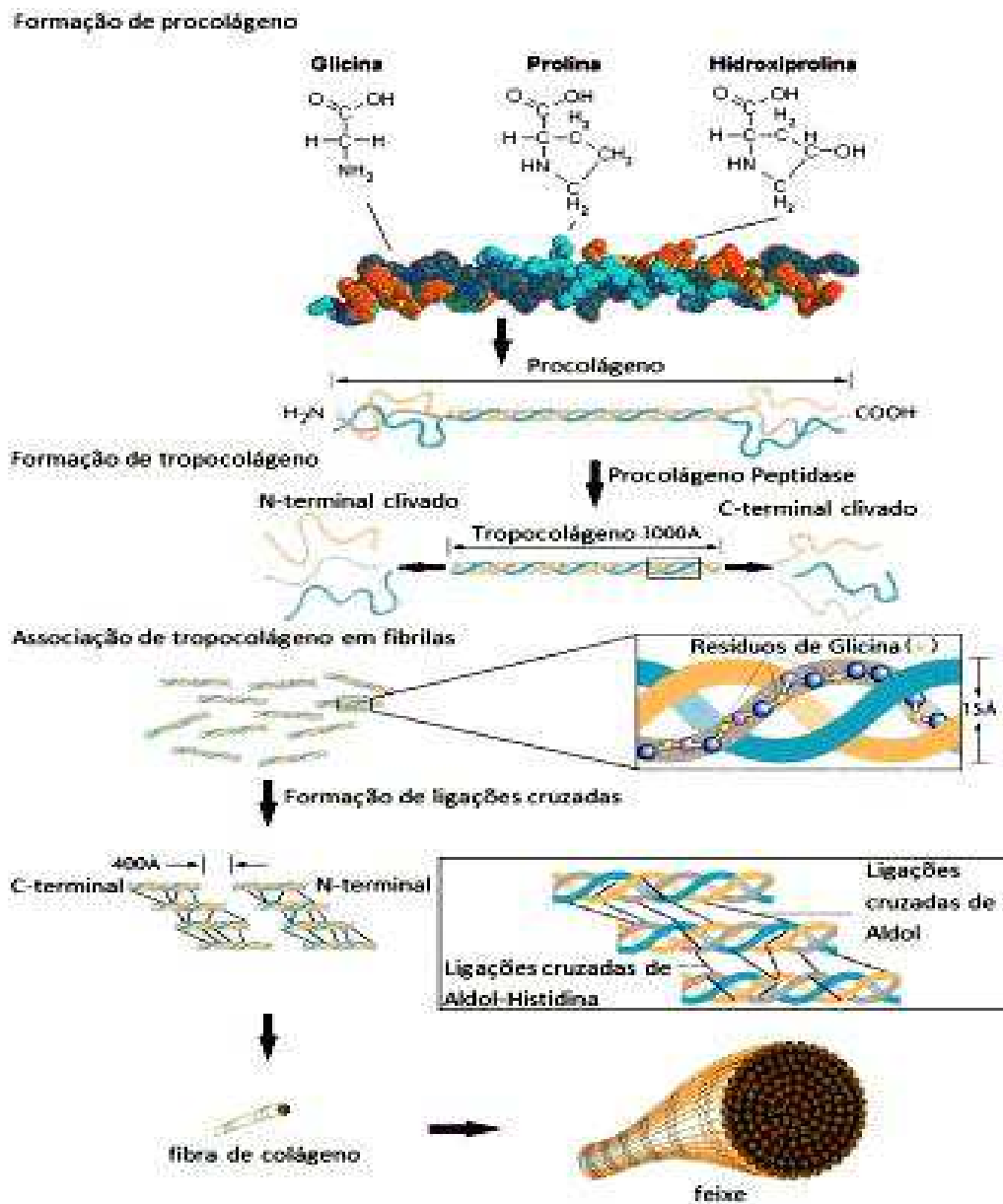


Figura 22 – Esquema sobre as fibrilas e fibras colágenas (Fonte: Silva, 2012).

Nas extremidades não helicoidais do tropocolágeno, pode-se observar a existência de telopeptídeos N e C-terminais, pequenas cadeias peptídicas contendo 15 e 26 resíduos de aminoácidos, respectivamente. Tais peptídeos atuam como sítios para o estabelecimento de ligações cruzadas entre as fibrilas para que, assim, se formem as fibras colágenas.

Como biomaterial, o colágeno tem ampla utilização, pois apresenta baixo índice de alergenicidade (cerca de 2% para colágeno heterólogo), o qual pode diminuir ainda mais através da remoção dos telopeptídeos N e C-terminais,

tornando-o, assim, altamente biocompatível; e também devido as preparações solúveis ou fibrilares de colágeno serem capazes de reconstituir-se, isto é, organizar-se estruturalmente da mesma forma que o tecido nativo, com propriedades similares e tendo sido desenvolvido para utilização para vários dispositivos biomédicos, com grande foco para formulações injetáveis, principalmente para uso no preenchimento cutâneo (Rostan, 2007; Halimi, 2015).

Quando ligadas a outros polímeros, como a quitosana ou seus derivados, as fibras de colágeno podem ter suas propriedades mecânicas otimizadas (Drury, 2003; Silva, 2012). Na pele envelhecida, há uma menor produção de colágeno pelos fibroblastos e uma maior ação das enzimas que o degradam, as metaloproteinases, especialmente as collagenases; e este desequilíbrio acelera o processo de envelhecimento (Baumann, 2006; Silva, 2012).

2.5.1 Uso do colágeno como preenchedor cutâneo

Quanto à origem dos preenchedores à base de colágeno, estes podem ser de origem bovina, humana ou suína, o que não impossibilita o uso desta proteína de origem da membrana celular. Uma das principais vantagens em relação ao ácido hialurônico, o principal componente da maioria dos preenchedores cutâneos temporários utilizados atualmente, é que os preenchedores à base de colágeno apresentam menor viscosidade, podendo ser utilizado na correção de rugas mais finas, dando maior segurança quanto ao surgimento de efeitos indesejados quando introduzidos muito superficialmente, apesar de terem menor duração de efeito devido a uma reabsorção mais rápida, cerca de 3 meses (Glogaw, 2012).

O colágeno bovino foi o primeiro a ser comercializado; sendo ainda necessário a realização de teste previamente a sua utilização devido risco de reações de hipersensibilidade, que ocorre em cerca de 3 a 5 % dos casos (Carpintero, 2009; Kadunck, 2012).

Como preenchedor, o colágeno também apresenta vantagens, como minimização de riscos para os pacientes, possibilidade de repetição da aplicação em casos de falhas e a não redução de opções futuras de tratamentos, o que acontece com alguns preenchedores sintéticos (Pradhan, 2017).

Existe disponível no mercado preenchedores com colágeno bovino, como o Zyderm I, Zyderm II e o Zyplast; todos com 95% de colágeno tipo I e 5% de

colágeno tipo III. O Zyderm I e o Zyplast são compostos por 3,5% de colágeno dérmico bovino, porém o Zyderm I é associado a 0,3% de lidocaína e o Zyplast a 0,0075% de glutaraldeído, que fortalece as fibras colágenas, estendendo, assim, a durabilidade do seu efeito preenchedor. Já o Zyderm II é composto por 6,5% de colágeno dérmico bovino, associado também a 0,3% de lidocaína. Porém, antes da aplicação desses preenchedores, é necessária a realização de teste alérgico, já que cerca de 3% da população é sensível ao colágeno bovino e estes tem uma duração de efeito no tecido cutâneo de 2 a 6 meses (Rostan, 2007).

Além desses, preenchedores com colágeno humano, obtido por bioengenharia (CosmoDerm I, CosmoDerm II e CosmoPlast) também estão presentes no mercado. Analogamente aos preenchedores de colágeno bovino, o CosmoDerm I e II são constituídos, respectivamente, por 3,5% e 6,5% de colágeno humano, associados a 0,3% de lidocaína; enquanto o CosmoPlast é constituído por 3,5% de colágeno, associado a glutaraldeído. Também são considerados preenchedores de curta duração, permanecendo por cerca de 3 a 7 meses no tecido implantado (Carpintero, 2009).

Ademais, também utilizam-se preenchedores com colágeno humano de origem cadavérica (Dermolgen e Cymetra), obtidos após rastreamento extensivo quanto possível contaminação viral ou bacteriana e colágeno autólogo (Isologen), que compreende a injeção de fibroblastos autólogos cultivados por 4 a 6 semanas a partir de fragmento de pele do próprio paciente obtido por biópsia prévia. Os preenchedores de origem suína que são comercializados, são utilizados para correção de rugas de moderadas a profundas, além da correção de contornos faciais; e são extraídos dos tendões de porcos, e quando implantados, tendem a desencadear baixa incidência de edema e hematomas, devido propriedade hemostática deste (Carpintero, 2009; Silva, 2012).

A partir do conhecimento que muitas das alterações clínicas relacionadas ao envelhecimento cutâneo, especialmente o facial, foram entendidos como consequência da perda e diminuição do colágeno, este é continuamente utilizado como preenchedor para correção desses defeitos até os dias atuais, e associações com outros materiais com potencial para uso com esse fim tem sido estudadas; tanto buscando a longevidade do tratamento, como potencializar outras propriedades do próprio colágeno (Kozłowska, 2017).

2.5.2 Colágeno da membrana da casca do ovo

A efetividade de resíduos da casca do ovo de galinha tem sido intensamente encorajada por razões econômicas e ambientais; sendo estes resíduos compostos pela casca calcificada e a membrana que envolve uma parte interna e outra externa (Pradhan, 2017). Já a membrana da casca do ovo é uma malha de proteínas fibrosas; um biomaterial natural que é utilizado na área biomédica, em especial como uma alternativa em curativos naturais em queimaduras e outras injúrias cutâneas há centenas de anos e que promove um meio ambiente favorável a proliferação dos fibroblastos humanos (Mogosanu, 2014; Vuong, 2017).

É um material bioativo que consiste de uma rede estrutural de colágeno e carboidratos complexos, como glicosaminoglicanos e glicoproteínas. As proteínas derivadas dessa membrana apresentam muitas propriedades médicas e bioquímicas (Nagamalli, 2017).

Com espessura variando de 50 – 70 μm e uma membrana interna com espessura 15 – 26 μm . Ela possui uma estrutura altamente resiliente e insolúvel e também é constituída por proteínas fibrosas como o colágeno e a elastina, que contribuem para resistência e flexibilidade dos tecidos conjuntivos e articulações.

A insolubilidade desta membrana deve-se, principalmente, a estabilização irreversível com reticulação de desmosina e isodesmosina derivadas da lisina semelhantes às encontradas no colágeno e elastina, que reforçam as ligações dissulfeto múltiplas (Ahmed, Suso e Hincke, 2017).

3 MATERIAIS - MÉTODOS – CARACTERIZAÇÕES

3.1 Local da Pesquisa

A pesquisa foi desenvolvida no Laboratório de Avaliação e Desenvolvimento de Biomateriais do Nordeste – CERTBIO da Universidade Federal de Campina Grande – UFCG.

3.2 Materiais e Reagentes

Os materiais, reagentes e equipamentos utilizados para o processo de obtenção dos hidrogéis estão ilustrados na Tabela 6.

Tabela 6 – Materiais, reagentes e equipamentos utilizados para a preparação dos hidrogéis.

MATERIAIS
• Vidrarias de laboratório: Béquer, balão, vidro de relógio, bastão
• Papel filtro Quantitativo. Whatman GR 40 110mm BEM
• Agitador Magnético. Marca Fisatom
• Placas do tipo petri
• Estufa Bacteriológica. Marca CETEC modelo TIC 17rgt
REAGENTES
• Quitosana - Produzida no CERTBIO, Grau Médico. Massa molar 260 KDa (Médio Peso). Acima 90% Grau de desacetilação
• Casca de ovo de galinha – Fornecida pela São Paulo Alpargatas/Fábrica Campina Grande-PB
• Água destilada (H ₂ O)
• Ácido acético glacial (CH ₃ COOH) (99,8% P.A) - Vetec
• Poli L (ácido Lático) (C ₃ H ₆ O ₃) (85% P.A) - Neon
• Hidróxido de Sódio (NaOH) P.A - Vetec
• Ácido Monocloroacético (C ₂ H ₃ O ₂ Cl) (99% P.A) - Sigma Aldrich
• Isopropanol (CH ₃ H ₈ O) P.A - Dinâmica
• Etanol (CH ₃ CH ₂ OH) P.A - Neon

3.3 Métodos

O método utilizado nesta pesquisa foi dividido em duas etapas e está ilustrado nas Figuras 23 e 24.

- 1) Síntese e caracterização das matérias primas – Carboximetilquitosana e Colágeno;
- 2) Obtenção e caracterização dos hidrogéis – Carboximetilquitosana e Carboximetilquitosana/Colágeno.

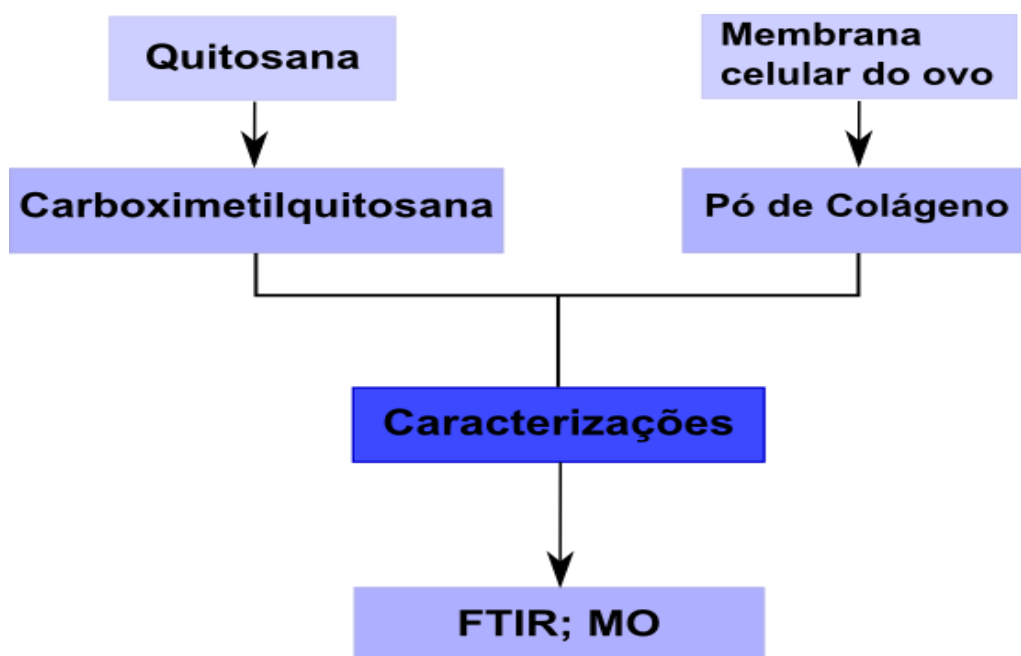


Figura 23 – Fluxograma da síntese e caracterização das matérias primas.

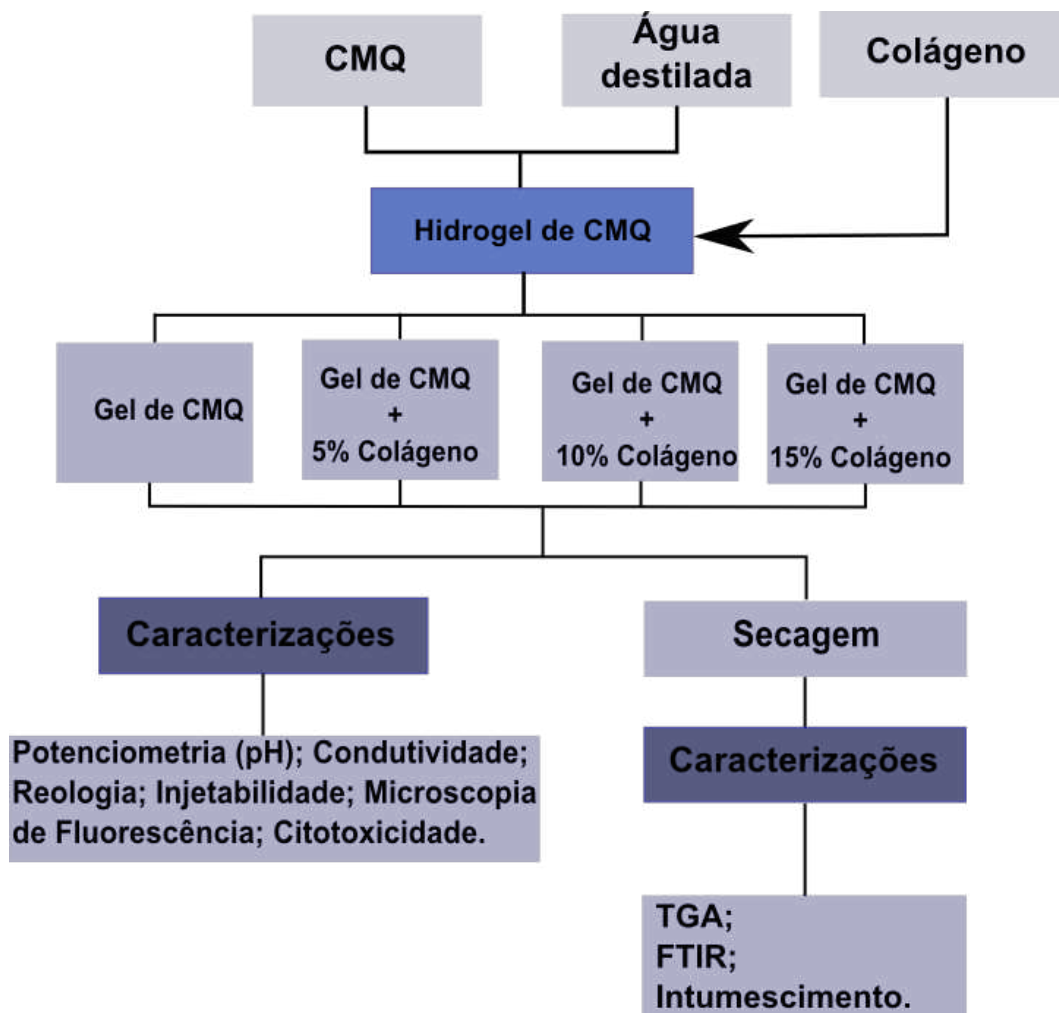


Figura 24 – Fluxograma da obtenção e caracterização dos Hidrogéis de CMQ e CMQ/Col.

3.3.1 Síntese das Matérias Primas

3.3.1.1 Síntese da Carboximetilquitosana

Para a síntese da Carboximetilquitosana foi utilizada a metodologia adaptada de Chen e Park (2003), considerando as variáveis da quitosana na perspectiva de utilizar reagentes em quantidade mais próxima possível da relação estequiométrica.

Inicialmente foi preparada uma solução alcóolica (isopropanol) de quitosana com concentração de 42,37 g/L sob agitação magnética por 30 minutos. Em seguida foi adicionado 10 mL de uma solução de Hidróxido de Sódio (10,2 mol/L). O mesmo foi solubilizado numa solução de isopropanol/água na proporção de 1:1(v/v), mantendo-se a agitação por 24 horas. Na etapa seguinte, foi adicionado, lentamente, uma solução de ácido Monocloroacético em Isopropanol (8,28 mol/L),

mantendo a agitação por 24 horas. Após este período foi adicionado 100 mL de Etanol absoluto, sob agitação magnética, filtrada dez vezes com Etanol 80% para remoção total do sal de carboximetilquitosana e uma lavagem com Etanol absoluto, para ajustar o pH final da carboximetilquitosana e retirar os resíduos, até a obtenção de valor próximo a 7. Após a filtração, o produto foi mantido à temperatura ambiente por 12 horas para secagem. A Figura 25 ilustra os pós da quitosana e da carboximetilquitosana.

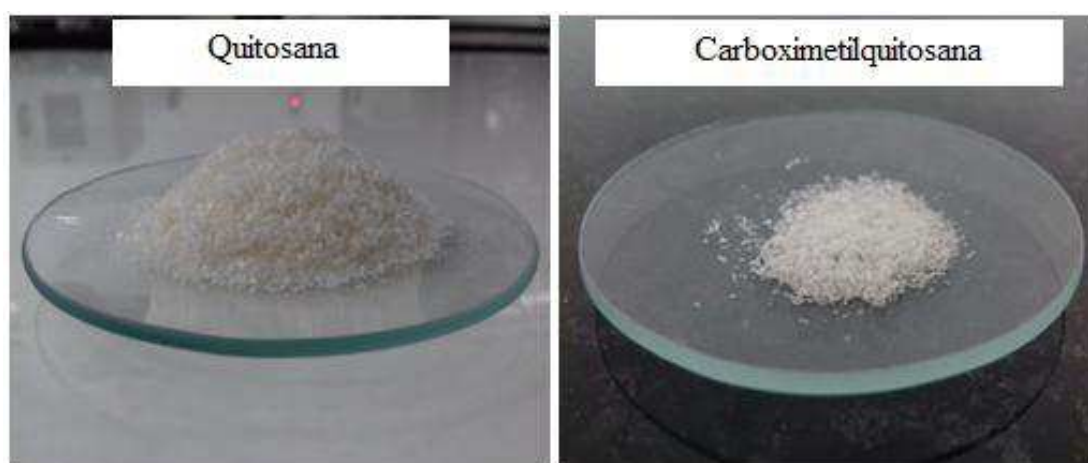


Figura 25 – Quitosana e carboximetilquitosana produzidas no CERTBIO.

3.3.1.2 Síntese do Colágeno

O colágeno foi extraído da membrana da casca de ovo de galinha. Para isso, as cascas de ovo foram colocadas em água destilada e as membranas separadas manualmente (Figura 26). Em seguida, colocadas em solução de ácido acético a 1% (v/v) para remoção de resíduos do carbonato de cálcio, lavadas em água destilada e secas. Posteriormente, 5 g destas membranas foram imersas em 250 mL de uma solução 1,0 mol/L de Hidróxido de Sódio (m/v) por 72 horas, obtendo-se então um material gelatinoso com partículas dispersas (Figura 27 a). Este foi filtrado e lavado em água destilada para retirada do hidróxido de sódio até pH neutro. O material neutralizado foi triturado em processador industrial e transferido para placas de petri, congelados em ultra freezer a -86°C por 24 horas e liofilizado por 72 horas (Figura 27 b). O material liofilizado ainda foi submetido à nitrogênio líquido, macerado em pistilo e almofariz para diminuição das partículas e obtenção do pó (Figura 28).



Figura 26 – Cascas de ovo e membranas extraídas.

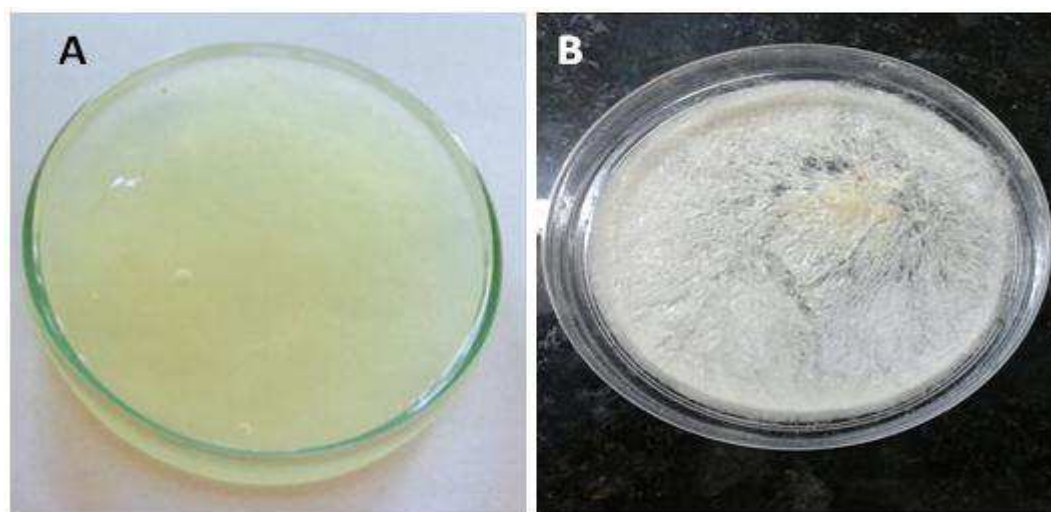


Figura 27 – Gel de colágeno obtido da membrana de ovo antes (A) e após liofilização (B).



Figura 28 – Colágeno liofilizado antes (A) e após macerado e peneirado em malha 325 mesh (B).

3.3.2 Caracterização da carboximetilquitosana e do colágeno em pó.

Foram realizados os ensaios de Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR) e Microscopia Óptica (MO) para identificação das matérias primas.

3.3.2 Obtenção dos Hidrogéis

3.3.2.1 Obtenção do Hidrogel de Carboximetilquitosana

O hidrogel de Carboximetilquitosana foi obtido colocando 1g de Carboximetilquitosana em 10 mL de água ultra pura e mantida sob agitação manual por 30 min. Esta concentração foi estabelecida a partir de observações experimentais.

3.3.2.2 Obtenção dos Hidrogéis de Carboximetilquitosana/Colágeno

Para o preparo das composições dos hidrogéis, pesou-se 1g de Carboximetilquitosana/colágeno, sendo as proporções de colágeno 5%, 10% e 15% em peso total de soluto e, em seguida, dispersos em 10 mL de água ultra pura, mantido sob agitação manual por 30 min. até a solubilização da carboximetilquitosana. A Figura 29 ilustra uma das composições dos hidrogéis obtidos.

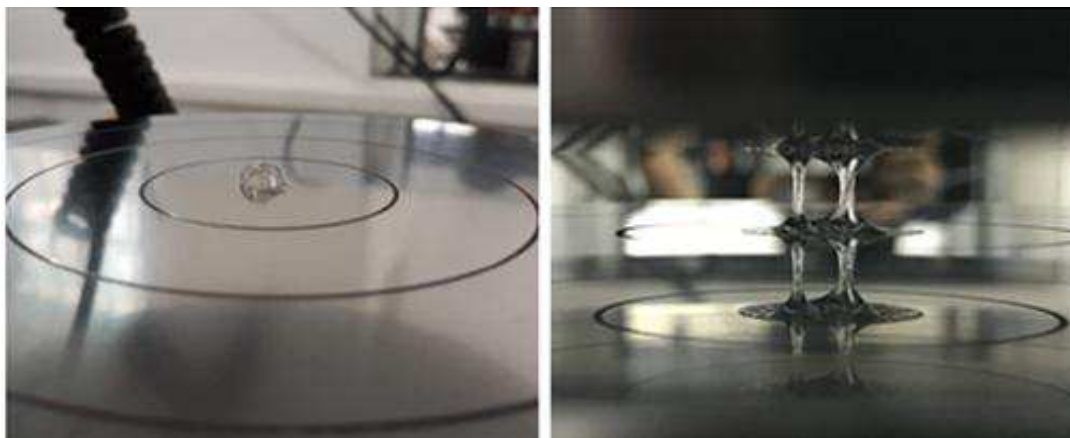


Figura 29 - Gel formado com uma das composições

Na Tabela 7 observam-se as nomenclaturas adotadas neste trabalho para as diferentes composições dos hidrogéis obtidos.

Tabela 7 – Nomenclatura dos hidrogéis obtidos com CMQ e Col.

Hidrogéis	Nomenclatura
Hidrogel com 100% carboximetilquitosana	H-CMQ
Hidrogel com carboximetilquitosana + 5% de colágeno	H-CMQ/Col5
Hidrogel com carboximetilquitosana + 10% de colágeno	H-CMQ/Col10
Hidrogel com carboximetilquitosana + 15% de colágeno	H-CMQ/Col15

3.4 Caracterização das Matérias Primas e dos Hidrogéis

Os materiais foram submetidos às técnicas de caracterização em duas condições: a primeira, caracterização das matérias primas por Espectroscopia na Região de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) e Microscopia Óptica (MO); a segunda, dos hidrogéis e filmes (desidratados), que foram: pH, Condutividade, Microscopia de Fluorescência, FTIR, Reologia, Injetabilidade/Força de ejeção, Termogravimetria (TGA), Grau de Intumescimento e Citotoxicidade.

3.4.1 Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)

A Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier das amostras foi realizada em temperatura ambiente (25°C) utilizando-se o equipamento Spectrum 400 da Perkin Elmer. Esta técnica foi utilizada para identificar as bandas características dos grupos funcionais das amostras, através de faixa de varredura de 4000 a 400 cm^{-1} .

3.4.2 Microscopia Óptica (MO)

A técnica de microscopia óptica foi utilizada para analisar a morfologia de superfície das matérias primas, onde as amostras foram submetidas à análise pelo método de iluminação por reflexão de luz visível. O canhão acoplado a estação de

captura de imagem foi o da série Mx, no caso o Mx (G) – 2016Z. Foram utilizados dois tipos de lentes adaptadoras para essa análise, a lente AD – 2016S que permite, no modo de observação normal, com ampliações de 20-160X e a lente AD-2016LOW, que na observação em modo de baixa ampliação, possibilita ampliações de 6-48X. O Software usado para a obtenção das imagens foi o 2D measure e o equipamento foi o Microscópio Hirox modelo KH-1300, com ampliação de 50 x.

3.4.3 Potencial Hidrogeniônico (pH)

Para determinação de pH foi utilizado um pHmetro marca Micronal, modelo B 474, com eletrodo de vidro combinado com solução interna de cloreto de potássio (KCl) saturada com cloreto de prata (AgCl). O equipamento foi previamente calibrado com soluções tampão de pH 4,0 e 7,0. Foi realizada uma análise de pH direta, sem diluição das amostras e em triplicata.

3.4.4 Condutividade

Para análise da condutividade dos hidrogéis utilizou-se um condutímetro de marca MS Tecnopon Instrumentação em temperatura ambiente (25°C).

3.4.5 Microscopia Confocal por Fluorescência

A topografia da amostra foi observada através da Microscopia Confocal por fluorescência utilizando-se o equipamento marca Nikon, modelo Eclipse Ts100/Ts 100F onde os hidrogéis obtidos foram submetidos ao processo de secagem em estufa a 40° C. As amostras foram coradas com o Alexa Fluor 488 – Faloídina. Esse tipo de corante tem afinidade química para ligar-se a filamentos de fibroactinas.

3.4.6 Reologia

As propriedades reológicas dos hidrogéis de CMQ e CMQ/Col foram avaliadas utilizando-se um Reômetro de placas planas HAAKE MARS III, com sistema modular PP 35 Ti, da marca Thermo Scientific; tendo sido medidas numa

frequência oscilatória variando de 0,1 a 10 Hz, a 0,1% de tensão, com um gap de 1 mm e temperatura 25°C. A frequência oscilatória considerada foi de até 10 Hz visto que se refere ao estresse fisiológico ao qual os preenchedores são submetidos durante e após serem injetados na pele, levando-se em consideração os movimentos faciais e o aumento volumétrico na face (Kablik, 2009).

3.4.7 Injetabilidade/Força de ejeção

A injetabilidade é de grande importância para avaliar a habilidade de injeção manual, mas também faz parte da avaliação do comportamento reológico durante a injeção sob elevadas taxas de cisalhamento. E a força de ejeção compreende a força que o injetor necessita para empurrar o biomaterial injetável para fora da seringa. São utilizadas agulhas de 27G e 30G para a injeção de preenchedores cutâneos (Halimi, 2015; Cho, 2018).

Foram utilizadas na realização deste ensaio, seringa de polipropileno de 1 mL BD produzida pela Becton Dickinson Ind. Cirúr. Ltda.; conectada a uma agulha com o diâmetro de 27 Gauge para quantificação da injetabilidade dos materiais obtidos. A seringa foi adaptada a uma máquina de ensaio mecânico universal Instron 3366, ajustada no modo de compressão, com célula de carga utilizada de 500 N (Figura 30). A garra de compressão pressiona o êmbolo da seringa. O tempo e a carga necessária para esvaziar a seringa foram registrados e analisados de acordo com a composição do material; ou seja, a força de ejeção necessária para extrusão do produto foi então registrada com um sensor de força a uma velocidade constante de 12 mm/min em temperatura ambiente (25°C). As medidas foram realizadas em triplicata e a cada extrusão, realizada a troca da seringa e agulha que era acoplada ao compartimento de compressão/tensão, o qual deslocava o êmbolo da seringa.



Figura 30 – Adaptação de ensaio para realização da medida de injetabilidade/força de ejeção.

3.4.8 Termogravimetria

A análise termogravimétrica foi utilizada para estudo da variação de massa das amostras, resultante de uma transformação química (decomposição, degradação, oxidação) ou física (evaporação, condensação, sublimação) em função da temperatura e/ou tempo. O percentual de perda de massa das amostras foi avaliado através do equipamento (TGA) PYRIS 1 TGA da Perkin Elmer. Aproximadamente 10 mg da amostra foi colocada em cadinho de alumina e submetido a uma faixa de aquecimento entre 25 – 700°C, sob fluxo de gás sintético de 20 mL/min, e razão de aquecimento de 10°C/min.

3.4.9 Grau de Intumescimento

O grau de intumescimento ou capacidade de absorção de água é uma importante propriedade de biomateriais utilizados para preenchimento dérmico ou aplicados para aumento de tecidos moles e está relacionado a estrutura interna destes materiais, o que tem uma correlação direta com a capacidade de preenchimento e volumização (Jeong, 2016).

Para a realização do ensaio de intumescimento foram utilizadas amostras dos hidrogéis, após serem desidratados em estufa a 40° C e em seguida pesadas e

colocadas em eppendorfs contendo 1 mL de água destilada pH 5,5 e em solução de PBS pH 7,4. Depois de imersas, foram pesadas em intervalo de 5, 10, 15, 30, 60, 1440 e 2880 minutos para avaliação da massa intumescida. Antes da pesagem, as amostras foram centrifugadas a uma velocidade de 3500 rpm por 5 minutos e o sobrenadante descartado.

3.4.10 Citotoxicidade

O ensaio de citotoxicidade foi realizado com base na norma ABNT NBR ISO 10993-5:2009. Este ensaio foi realizado por dois métodos de diluição: MTT e ágar, para avaliação da viabilidade celular tanto quantitativa como qualitativamente.

De acordo com o Órgão Internacional os ensaios necessários em animais de laboratório (Rogerio *et al.*, 2003 de Padronização (International Standard Organization), ISO 10993, o ensaio de citotoxicidade *in vitro* é o primeiro teste para avaliar a biocompatibilidade de qualquer material para uso em dispositivos biomédicos, depois de comprovada a sua não toxicidade é que o estudo da biocompatibilidade do produto pode ter continuidade para a realização.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados e discussão foram divididos em duas etapas, onde a primeira refere-se à caracterização das matérias primas e a segunda, à dos hidrogéis.

4.1 Carboximetilquitosana e Colágeno

4.1.1 Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)

A Figura 30 ilustra o espectro de FTIR da quitosana utilizada para obtenção da carboximetilquitosana, bem como desta. As absorções observadas em 1640 cm^{-1} e em 1395 cm^{-1} são características da reação de carboximetilação, que podem ser atribuídas às deformações simétricas e assimétricas do grupo COO^- , conforme descrito por Lamas (2008), utilizando diferentes metodologias, indicando que foi obtida a O-carboximetilquitosana. Infere-se ainda que a substituição química ocorreu predominantemente no grupo hidroxila.

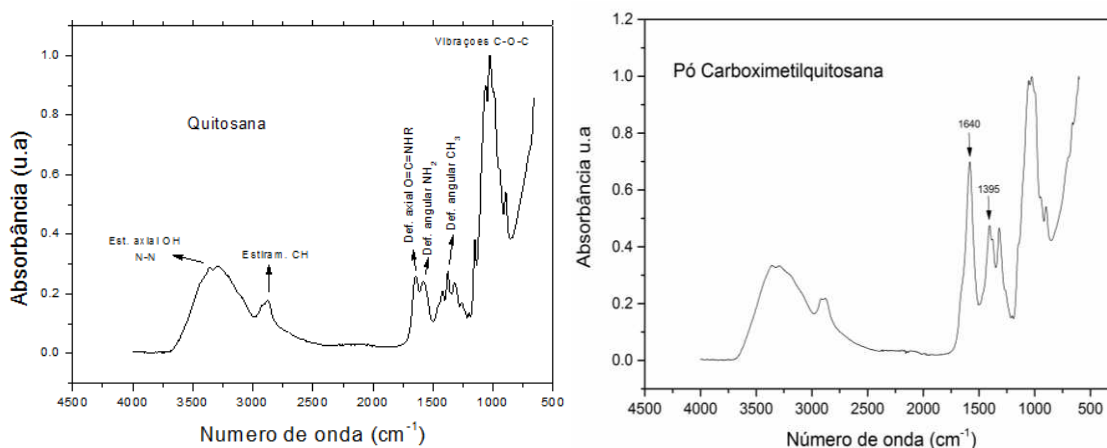


Figura 31 – Espectros de FTIR do pó de quitosana e da CMQ.

As demais bandas observadas também são encontradas no espectro de FTIR do precursor da carboximetilquitosana, a quitosana, pois em torno de 3300 cm^{-1} a banda refere-se ao estiramento axial de OH, sobrepondo a banda de estiramento N-H. A banda em 2883 e 2895 cm^{-1} é atribuída ao estiramento assimétrico do grupo C-H. Também foram observadas diferenças nas bandas de 1150 cm^{-1} e 1027 cm^{-1} relativas ao grupamento C-O-C, podendo estar associado ao fato de que a

substituição realizada diminuiu a banda de absorção do grupamento C-O-C, corroborando Farag e Mohamed, 2013; Liang *et al*, 2004 e Chen, 2003.

Os materiais utilizados como preenchedores cutâneos compostos por colágeno, seja de origem animal ou sintético, podem ser facilmente analisados e caracterizados utilizando-se a técnica de FTIR, a qual permite informação a nível molecular, tipos de grupos funcionais, bandas e vibrações além de conformações moleculares (Riaz, 2018).

A Figura 31 ilustra o espectro do colágeno obtido da casca do ovo no qual se observaram as bandas características em 3281 cm^{-1} , atribuídas ao estiramento O-H; 1632 cm^{-1} banda típica da amida I, referente ao estiramento da carbonila; 1540 cm^{-1} , relacionado à amida II, devido às vibrações no plano da ligação N-H; 1446 cm^{-1} , correspondente à vibração dos anéis pirrolidínicos dos aminoácidos prolina e hidroxiprolina e, ao estiramento C-N; 1234 cm^{-1} , característico das vibrações no plano da amida III, devido à deformação N-H, corroborando com os estudos de Sionkowska *et al.* (2004), Whang *et al.* (2008) , Silva (2013), Prestes, 2013 e Ma *et al* (2014).

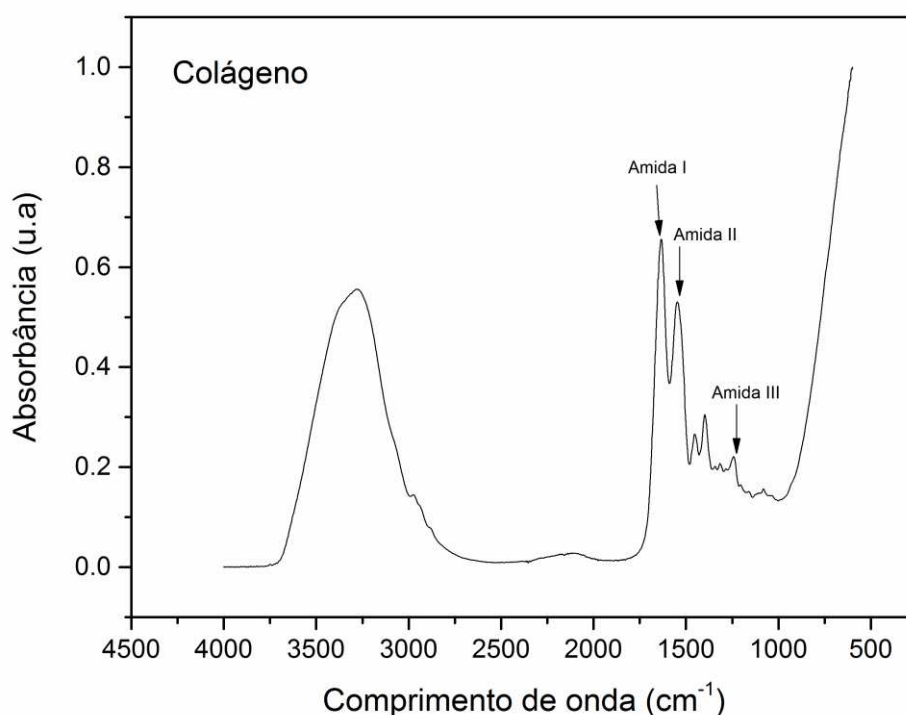


Figura 32 – Espectro de FTIR do colágeno.

4.1.2 Microscopia Óptica (MO)

A Microscopia Óptica do colágeno e da carboximetilquitosana foram realizadas para analisar a forma e o tamanho das partículas dos materiais obtidos. Na Figura 32 observa-se a imagem de microscopia óptica do colágeno liofilizado, onde foram evidenciadas a morfologia fibrilar podendo-se inferir a preservação da estrutura de tríplice hélice, resultados que corroboram com o trabalho de Chaudry *et al* (1997).

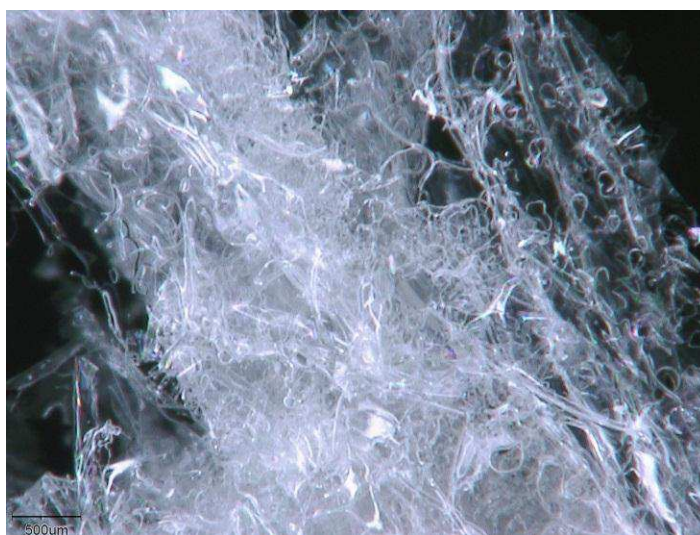


Figura 33 – Imagens de MO do colágeno liofilizado com magnificação de 50x.

Na Figura 33, identificam-se partículas de carboximetilquitosana com formas irregulares (retangular/esférica) e tamanhos variados (~500µm).



Figura 34 – Imagens de MO da CMQ com magnificação de 50x.

Largura (2009) quando sintetizou e caracterizou a O-carboximetilquitosana-nlauril para utilização como matriz polimérica para liberação de triancinolona, observou na microscopia partículas de o-carboximetilquitosana-nlauril com formas irregulares e superfície rugosas, resultados estes semelhantes aos observados nessa pesquisa.

4.2 Caracterização dos Hidrogéis

4.2.1 Potencial Hidrogeniônico (pH)

Na Tabela 8 observa-se os resultados de pH das amostras e verifica-se que a carboximetilquitosana apresenta-se mais alcalina quando comparada com o colágeno e a água ultra pura utilizada. Quanto aos hidrogéis CMQ/Col, verifica-se uma discreta diminuição do pH com o aumento da concentração do colágeno.

Tabela 8 – Resultados de pH da carboximetilquitosana, do colágeno, da água ultra pura e dos hidrogéis CMQ/Col

Amostras	pH
Água Ultra Pura	6,29
Colágeno	7,29
Carboximetilquitosana	8,89
H-CMQ	8,76
H-CMQ/Col5	8,88
H-CMQ/Col10	8,85
H-CMQ/Col15	8,79

O pH da carboximetilquitosana e dos hidrogéis apresenta-se superior quando comparado ao pH do colágeno estudado. Os preenchedores disponíveis no mercado e o meio extracelular apresenta pH aproximadamente 7,4. Isto não impede a utilização do material obtido para finalidade a que se propõe, já que o organismo, usualmente, se utiliza de uma solução tampão para manter o pH do meio em um intervalo de 7.0 a 7.4, dependendo do tipo de células.

Sugere-se que o fato do material apresentar o pH um pouco acima do aceitável pelo organismo, poderá aumentar a resposta inflamatória local e,

conseqüentemente, favorecer a produção de colágeno na região de aplicação do produto. Outro fator a ser considerado é que o material apresenta características hidrofílicas e isso favorecerá a diluição do líquido presente no hidrogel com o meio extracelular promovendo, possivelmente, a regulação do pH em pouco tempo após a sua aplicação, pois o pH dos líquidos extracelular e intracelular atuam na manutenção estrutural e funcional de proteínas, enzimas e organelas celulares (Cunningham, 2004).

4.2.2 Condutividade

Os resultados observados na Tabela 9 demonstram que a condutividade da carboximetilquitosana é superior à da água e inferior à do colágeno. Quanto à condutividade dos hidrogéis de CMQ/Col, verificaram-se valores superiores ao da carboximetilquitosana, indicando que a presença do colágeno influenciou no aumento da condutividade elétrica da mistura.

Tabela 9 – Resultados da condutividade da água ultra pura, do colágeno, da carboximetilquitosana e dos Hidrogéis CMQ/Col

Amostras	Condutividade
Água Ultra Pura	1,12 $\mu\text{S/cm}$
Colágeno	3230 $\mu\text{S/cm}$
H-CMQ	1463 $\mu\text{S/cm}$
H-CMQ/Col5	1922 $\mu\text{S/cm}$
H-CMQ/Col10	3230 $\mu\text{S/cm}$
H-CMQ/Col15	3740 $\mu\text{S/cm}$

Essa propriedade varia com a concentração total de substâncias ionizadas dissolvidas na água, temperatura, mobilidade dos íons, valência dos íons e as concentrações real e relativa de cada íon. Medidas de condutividade em tecidos biológicos vivos podem ser utilizadas para modelar sistemas (Paulson, Pidcock e Mcleod, 2004).

Os biomateriais obtidos apresentaram condutividade que variou de 1463 $\mu\text{S/cm}$ a 3740 $\mu\text{S/cm}$ e um material polimérico que vai servir como tecido artificial precisa ser sensível a variações de potenciais eletrônicos e responder a estes. Por

isso ele deve ter uma condutividade compatível com a função que desempenhará (Pattavarakorn *et al.*, 2013).

A condutividade de tecidos biológicos aumenta com a temperatura, isto ocorre, porque a temperatura faz a mobilidade de cada íon aumentar e a viscosidade dos fluidos biológicos diminuir. Erros significativos podem ser cometidos na medição da condutividade se este efeito não for compensado. O efeito da temperatura na condutividade varia para cada tecido.

4.2.3 Microscopia por Fluorescência

A microscopia de fluorescência permitiu observar a distribuição e a forma das partículas de colágeno na amostra. Foi possível captar imagens que possibilitou confirmar a interação física entre os componentes presentes no hidrogel, de acordo com a Figura 34.

Verificou-se que o corante utilizado tem afinidade com o colágeno e não apresentou afinidade com o polissacarídeo carboximetilquitosana, o que favoreceu o contraste entre os constituintes do hidrogel.

Pode-se afirmar que as partículas de colágeno apresentaram-se homogêneas em relação ao tamanho e bem distribuídas na mistura, demonstrando efetividade no processo de obtenção do hidrogel.

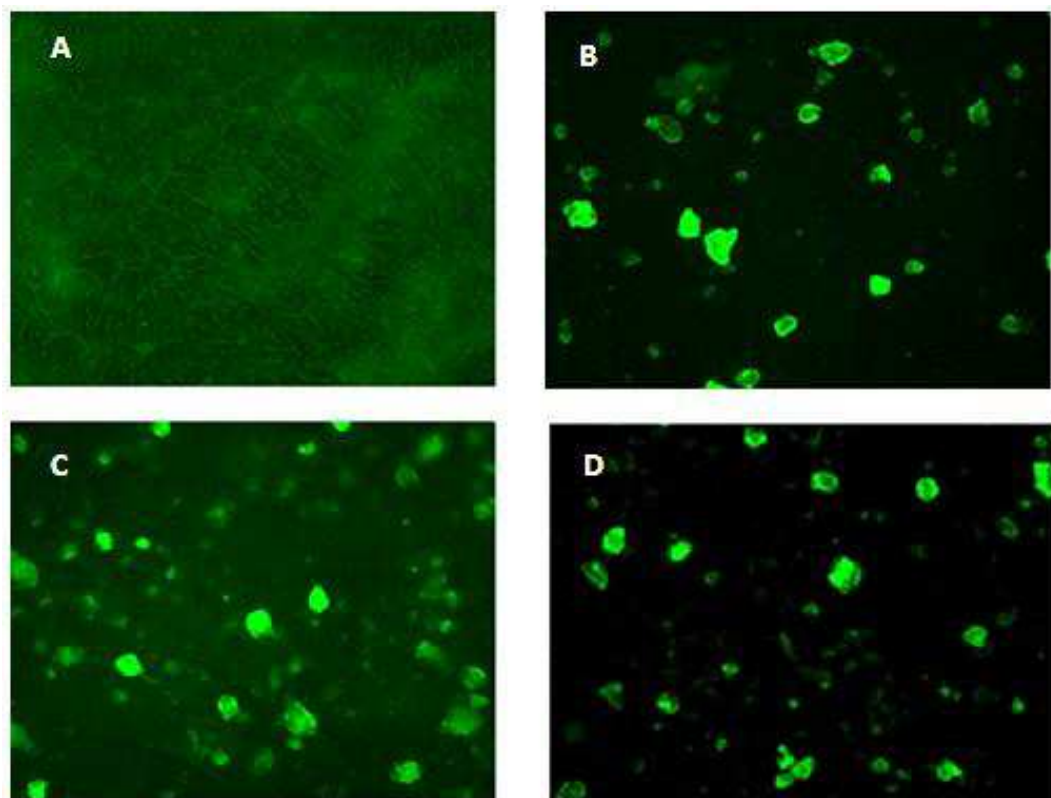


Figura 35 – Imagens da Microscopia por Fluorescência do hidrogel de CMQ (A); do H-CMQCOL5I (B); H-CMQCOL10 (C); e H-CMQ COL15 (D) com magnificação de 10X.

Através da análise de fluorescência das composições foi possível observar um delineamento mais fluorescente das partículas do colágeno no hidrogel, com um aumento de partículas evidenciadas à medida que o percentual do colágeno aumentou. Esse detalhe fica ainda mais nítido na imagem com magnificação de 20X, conforme a Figura 36.

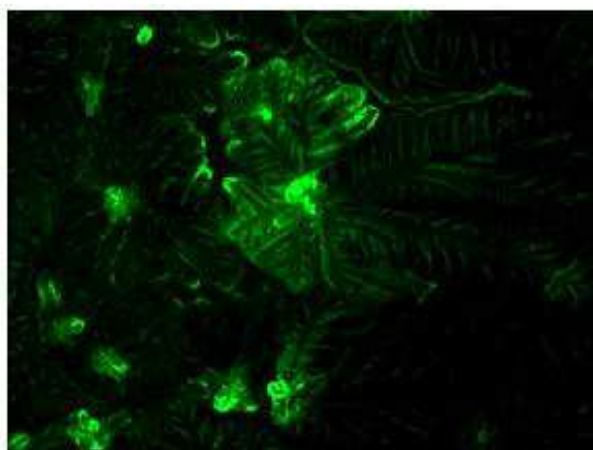


Figura 36 – Imagem da Microscopia por Fluorescência de H-CMQCOL10 com magnificação de 20X.

Foi possível identificar que as estruturas formadas do tipo “folhas” demonstraram ser essencialmente da carboximetilquitosana (CMQ), visto que não foi corada e não apresenta fluorescência. Observa-se também que as partículas de colágeno foram revestidas pela matriz de carboximetilquitosana. Este fato é corroborado pelo ensaio de FTIR, onde não foi possível verificar os grupos característicos do colágeno nas amostras de H-CMQ/Col, já que o ensaio foi realizado por ATR.

4.2.4 Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)

Não foi observada diferença entre os espectros dos hidrogéis de CMQ e CMQ/Col, conforme Figura 36, onde todos os espectros, independentemente das concentrações de colágeno, são os específicos da carboximetilquitosana, sendo explicado pelo fato da absorção de ambos os compostos serem em regiões semelhantes. Isso foi confirmado na microscopia por fluorescência onde as partículas encontravam-se revestidas pela matriz de carboximetilquitosana.

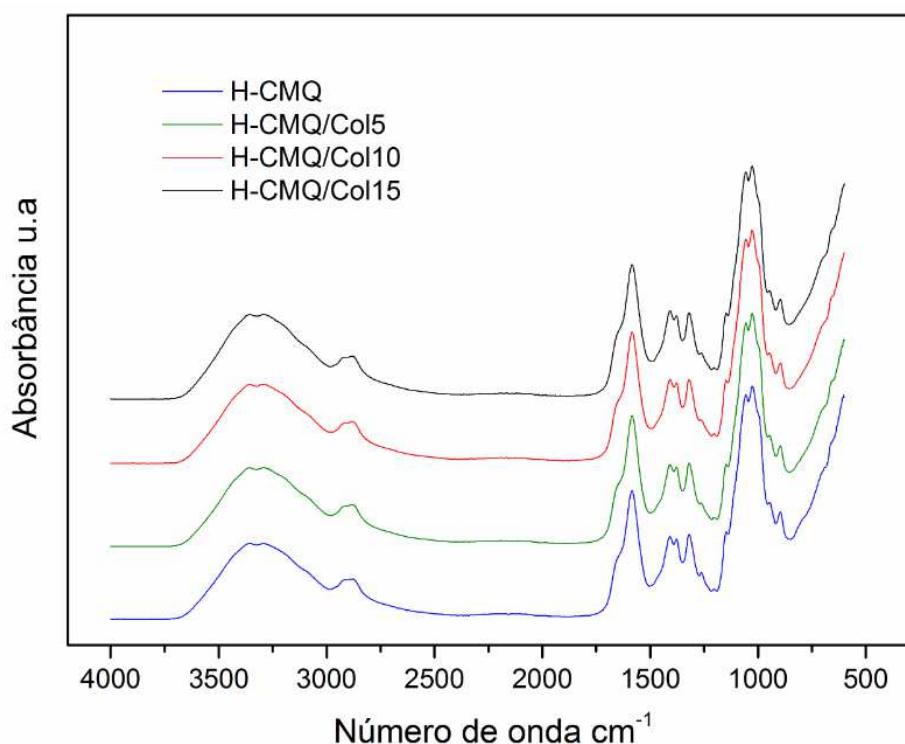


Figura 37 – Espectro de FTIR dos hidrogéis CMQ e de CMQ/Col.

A associação da CMQ/Col pode resultar em variadas respostas clínicas conforme descrito por outros autores, a depender de suas diferentes concentrações individuais. Chen (2002) exalta os picos, no espectro FTIR da CMQ, em 1738 cm^{-1} (-COOH) e em 1508 cm^{-1} ($-\text{NH}_3^+$) e descreve que a CMQ inibe a proliferação dos fibroblastos do queoide e, por sua vez, aumenta a proliferação dos fibroblastos da pele normal, fato importante para aplicação desejada nesta pesquisa.

Wahid *et al* (2016) demonstram picos ligeiramente mais intensos em torno de 1421 e 3443 cm^{-1} entre hidrogéis de CMQ e atribuíram ao possível decréscimo no número de bandas de ligação de hidrogênio formadas decorrentes de íons carboxilados na reticulação, processo esse não realizado nessa tese.

4.2.5 Reologia

Os dados da avaliação do comportamento reológico dos materiais obtidos provaram tratar-se de comportamento pseudoplástico, uma vez que a viscosidade diminuiu com o aumento da taxa de cisalhamento (Figura 37) semelhante ao comportamento dos preenchedores comerciais, ou seja, principalmente aqueles à base de ácido hialurônico (Sundaram, 2010; La Gatta, 2015). Essa característica, segundo Sundaram e colaboradores (2010), é adequada para um biomaterial que será utilizado como preenchedor dérmico.

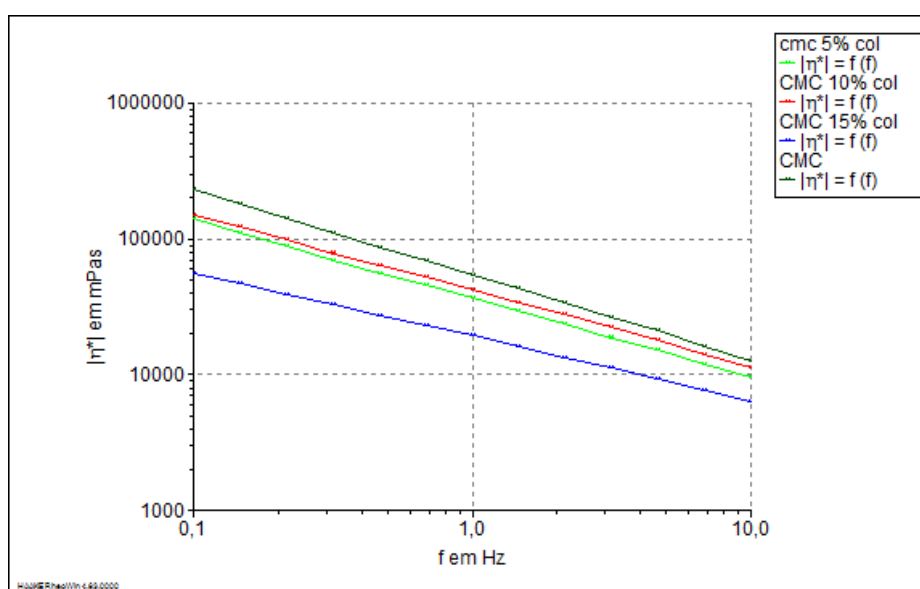


Figura 38 – Viscosidade versus taxa de cisalhamento das amostras dos hidrogéis de CMQ e de CMQ/Col.

Pode-se observar na Figura 38 que o módulo elástico (G') é maior que o módulo viscoso (G''), corroborando com o que também ocorre com a maioria dos preenchedores cutâneos utilizados.

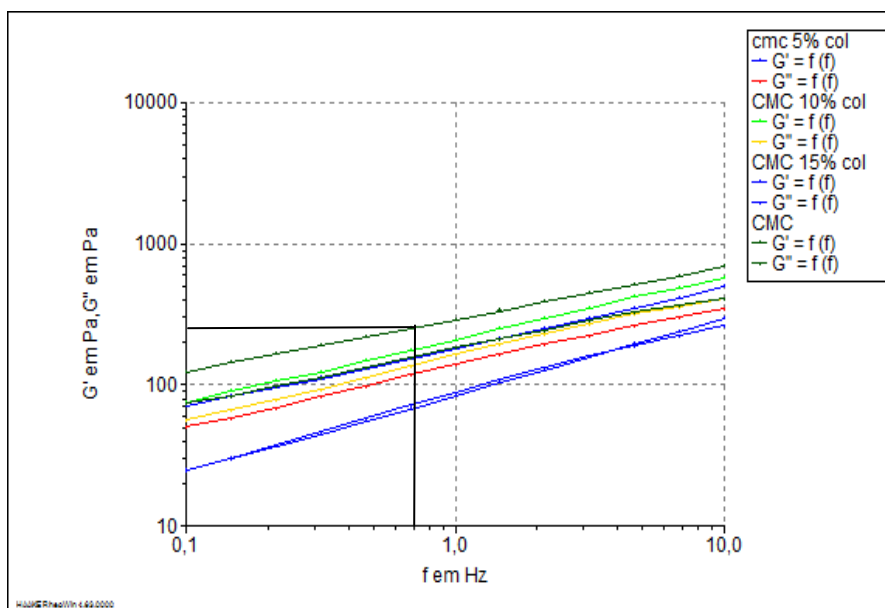


Figura 39 – Resultados dos módulos elástico (G') e módulo viscoso (G'') das amostras dos hidrogéis de CMQ e de CMQ/Col.

Ainda em relação a Figura 38, constata-se que na faixa de frequência oscilatória até 0,7 Hz, o $G' \leq 250$ Pa, que recomenda, sob esta grandeza, aplicação para preenchimento facial (Sundaram, 2010).

Edsman (2017) afirma em estudo sobre comportamento de preenchedores cutâneos, que as propriedades reológicas são descritas basicamente pelo módulo elástico (G') e o módulo viscoso (G''), onde os produtos avaliados apresentaram $G' > G''$ e tiveram variação de G' de 10 Pa a 500 Pa, em uma frequência oscilatória de 0,1 Hz.

O H-CMQ apresentou-se como o material mais rígido dentre as amostras de CMQ/Col, pois seu comportamento elástico (G'), conforme ilustrado na Figura 39, foi maior que todas as outras composições com CMQ e Col.

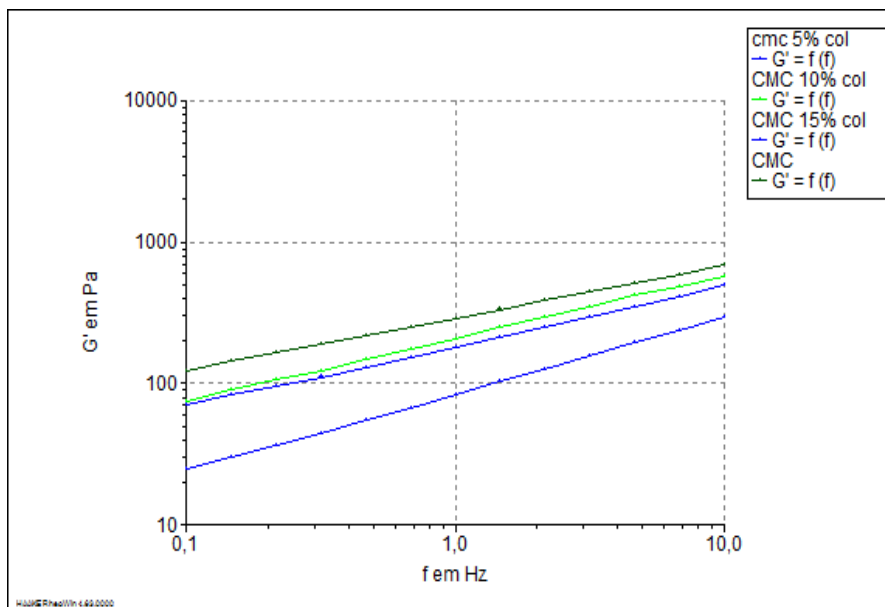


Figura 40 – Resultados dos módulos elástico (G') das amostras dos hidrogéis de CMQ e de CMQ/Col.

Medidas de viscosidade de soluções poliméricas, além do interesse prático, fornecem informações valiosas para a caracterização molecular de polímeros. A viscosidade de soluções macromoleculares é influenciada por uma série de fatores, tais como tamanho e conformação da molécula, volume ocupado em solução, peso molecular e sua distribuição, concentração em polímero, flexibilidade da cadeia e temperatura e velocidade de cisalhamento empregada para obtenção da medida viscosidade.

A viscosidade da carboximetilquitosana em dispersão é influenciada por muitos fatores, tais como: grau de desacetilação da quitosana utilizada, peso molecular, concentração, força iônica, pH e temperatura. Geralmente, com o aumento da temperatura a viscosidade da dispersão polimérica diminui. Contudo, a mudança de pH na dispersão polimérica pode levar a diferentes resultados, dependendo do tipo de solvente empregado (Li *et al.*, 1997).

4.2.6 Injetabilidade/Força de ejeção

A força de ejeção ou extrusão é definida como a força que o injetor precisa para empurrar o gel para fora da seringa. Foi medida a força para a extrusão dos hidrogéis de CMQ e CMQ/Col através de agulhas 27G, Figura 40.

A força de ejeção foi verificada em função do deslocamento do êmbolo da seringa a uma velocidade de 12 mm/min e os resultados estão ilustrados na Figura 41.

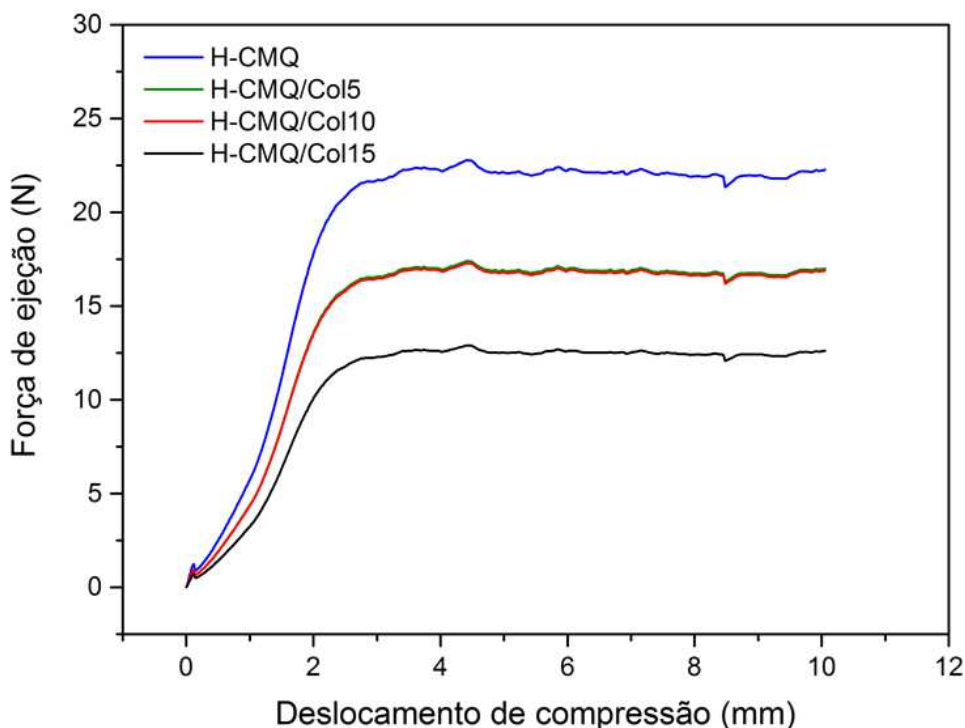


Figura 41 – Evolução da força de ejeção com o deslocamento do êmbolo da seringa com os hidrogéis de CMQ e de CMQ/Col.

A partir dos resultados obtidos, as composições dos hidrogéis CMQ/Col apresentaram força de ejeção inferior quando comparado com hidrogel CMQ, sendo os valores obtidos em todas as composições, o que é requerido de um material a ser utilizado como preenchedor cutâneo de acordo com a literatura.

Halimi (2015) afirma que um valor de força de ejeção abaixo de 15 N é usualmente necessário para um fácil procedimento de ejeção. Esses resultados demonstram que os hidrogéis obtidos apresentam valores acima do preconizado.

4.2.7 Termogravimetria (TGA)

As Figuras 42 e 43 ilustram as curvas termogravimétricas e derivadas referentes ao colágeno e ao pó de Carboximetilquitosana, respectivamente.

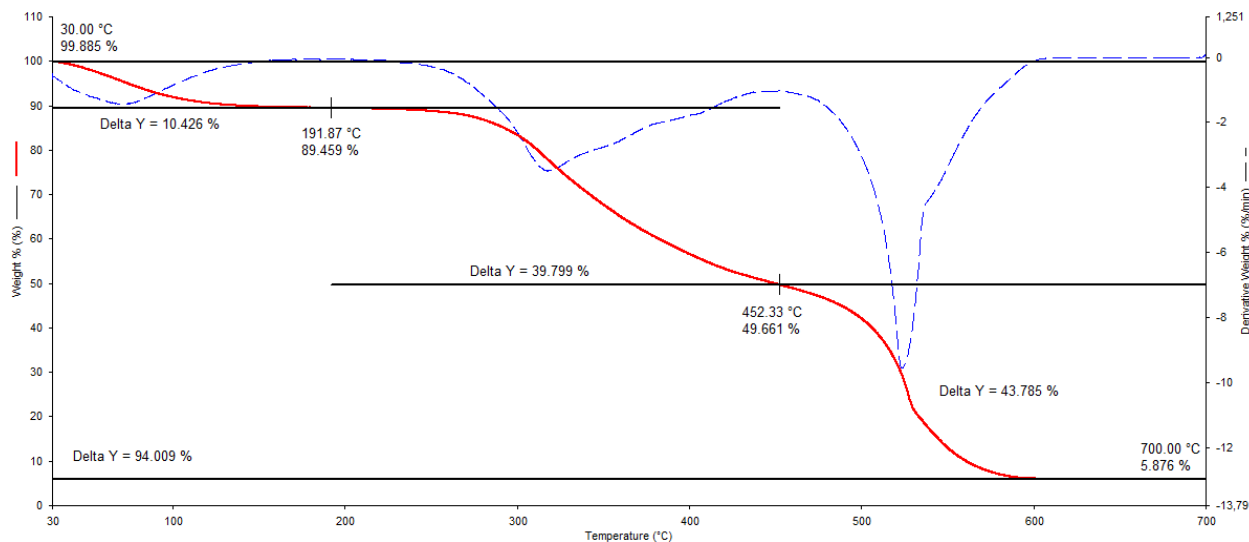


Figura 42 – Curva termogravimétrica do colágeno.

Observa-se que o colágeno apresentou 3 etapas de perda de massa, sendo a primeira em torno de 30 e 191° C relacionada a evaporação de água e início da desnaturação do colágeno; a segunda perda compreendida entre 191 e 452°C relacionada a degradação total do colágeno e a terceira etapa entre 452 e 700°C relacionada a cinzas resultante da degradação do colágeno. Resultados semelhantes foram obtidos por Yi *et al.* (2004) e Yu *et al.* (2012).

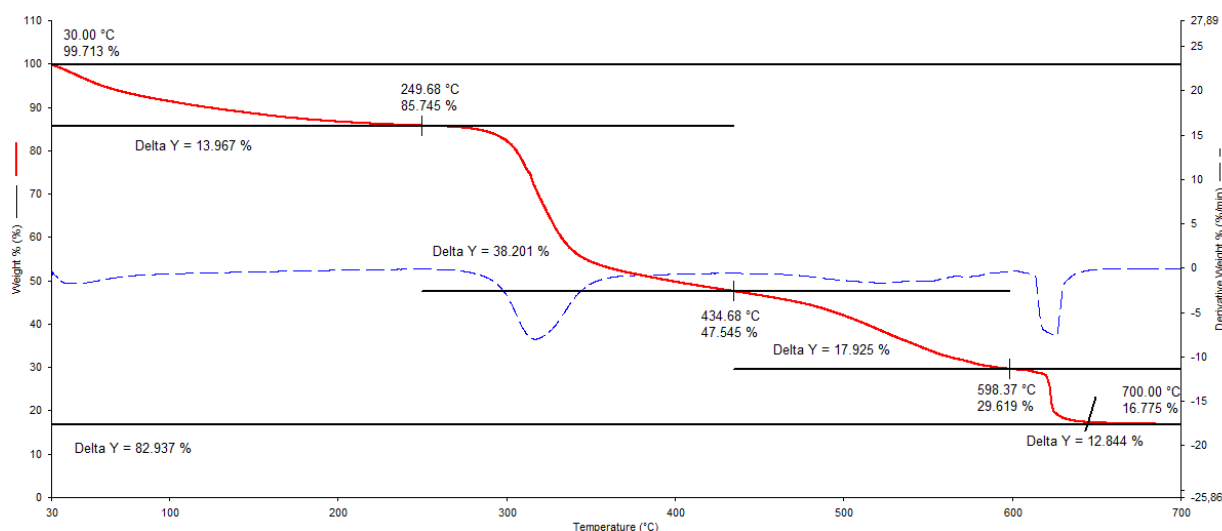
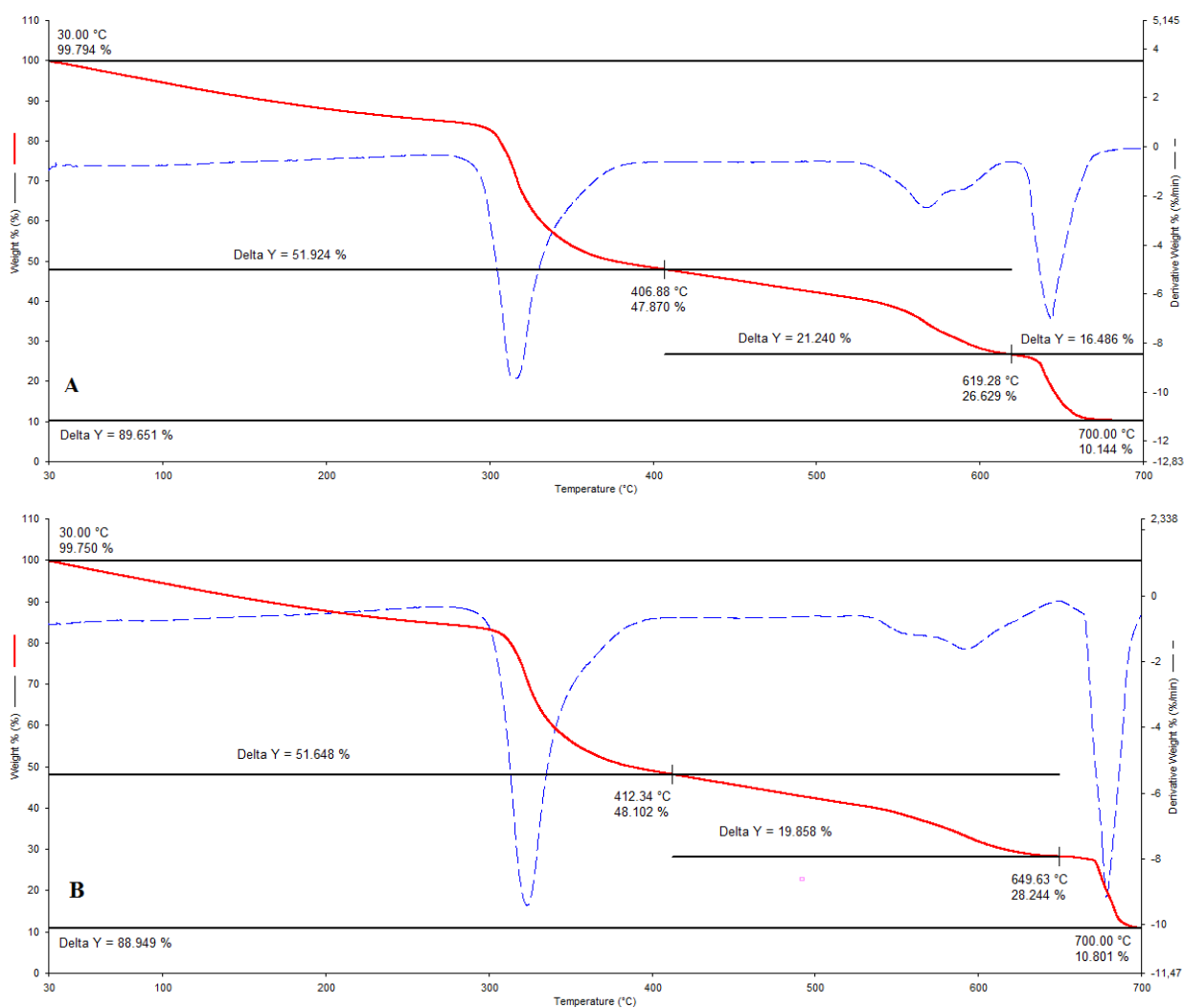


Figura 43 – Curva termogravimétrica do CMQ.

Na amostra de carboximetilquitosana (Figura 43) observam-se três etapas significativas de perda de massa. A primeira perda entre as temperaturas de 30 e 249 °C associada à perda de água fortemente ligada à estrutura; a segunda perda de massa compreendida entre 249 e 434°C atribuída, possivelmente, as

degradações térmicas da CMQ; a terceira perda ocorrendo entre 434 e 700 °C atribuída a carbonização do material.

A Figura 44 ilustra as curvas termogravimétricas dos hidrogéis formados, sendo hidrogel de carboximetilquitosana (H-CMQ), Figura 44A; composição carboximetilquitosana e colágeno 5% (H-CMQ/Col5), Figura 44B; composição carboximetilquitosana e colágeno 10% (H-CMQ/Col10), Figura 44C e composição carboximetilquitosana e colágeno 15% (H-CMQ/Col15), Figura 44D.



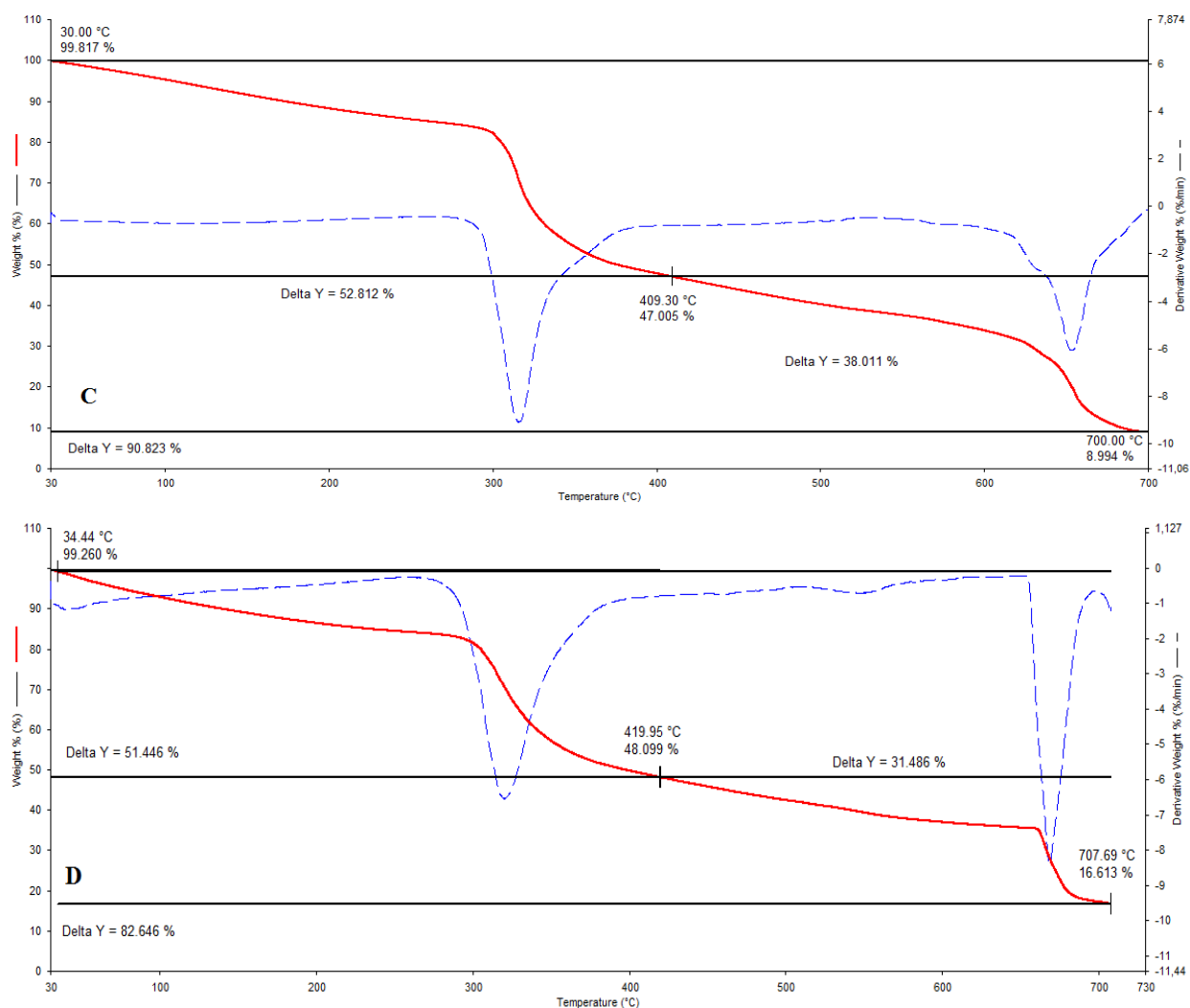


Figura 44 – Análise termogravimétrica e derivada dos filmes: H-CMQ (A); H-CMQ/Col5 (B); H-CMQ/Col10 (C); H-CMQ/Col15 (D).

Considerando as perdas de massa da Figura 44A e 44B, identifica-se três estágios significativos de decomposição térmica, a primeira decomposição ocorreu entre 30 e 412 °C, no segundo estágio entre 406 e 649 °C e o terceiro estágio entre 619 e 700 °C, com percentuais de perda total de massa de 89,65 e 88,94%, respectivamente.

Nas curvas das amostras H-CMQ/Col10 e H-CMQ/Col15, Figura 44C e 44D respectivamente, observam-se apenas dois estágios de decomposição, sendo o primeiro entre 30 e 419 °C e o segundo estágio entre 409 e 700 °C, com percentuais de perda total de massa de 90,82 e 82,64% respectivamente.

De forma sistemática houve uma diminuição da perda de massa total dos hidrogéis e uma etapa a menos de decomposição nas composições H-CMQ/Col10 e

H-CMQ/Col15. Esta diminuição pode estar relacionada à melhor estabilidade dos hidrogéis na medida em que um volume maior de carga (Colágeno) é adicionado na matriz carboximetilquitosana.

Em comparação com a quitosana e com o colágeno produzido, a carboximetilquitosana é considerada termicamente menos estável visto que o máximo de decomposição desta ocorreu em temperatura inferior a Qs e o colágeno. Esta menor estabilidade térmica da carboximetilquitosana pode estar relacionada à carboxilação (Tirkistani, 1998).

4.2.8 Grau de Intumescimento

Consoante a Figura 45, os hidrogéis de CMQ e de CMQ/Col em solução de PBS intumesceram menos do que os imersos em água destilada. Este fato se deve ao comportamento eletrostático da carboximetilquitosana que, em meio ácido apresenta característica policatiônica e em meio básico é polianiônica e seu ponto isoeletróstatco encontra-se em pH próximo do neutro. Outro fato que interferiu no grau de intumescimento das amostras foi o percentual de colágeno presente, pois quanto maior quantidade de colágeno, maior afinidade com água, o que justifica o aumento no intumescimento. Essa capacidade de absorção do hidrogel tem importância porque determina a permeação de nutrientes e produtos celulares (Hoffman, 2012).

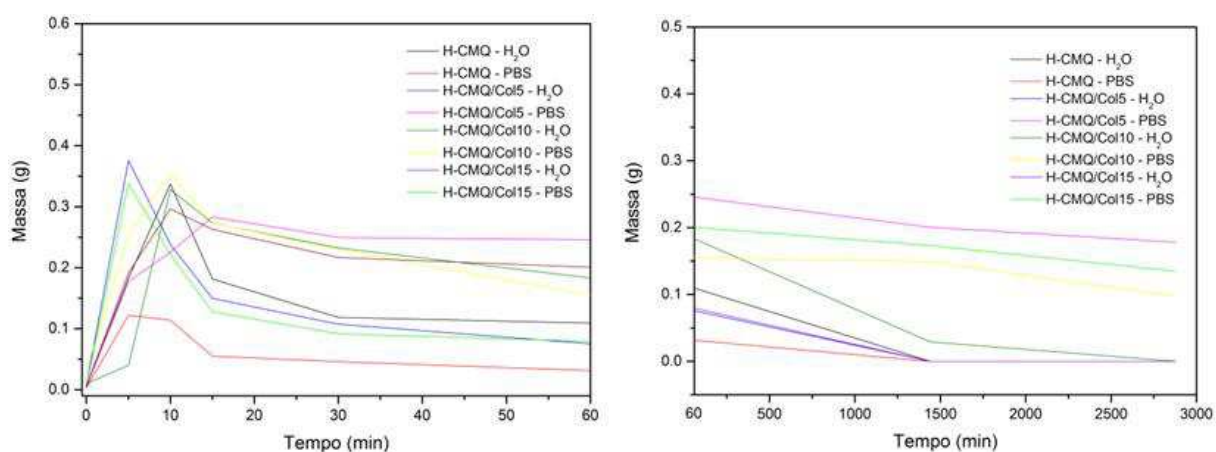


Figura 45 – Capacidade de intumescimento dos hidrogéis de carboximetilquitosana com diferentes concentrações de colágeno.

O grau de intumescimento ou capacidade de absorção de água é uma importante propriedade de biomateriais utilizados para preenchimento dérmico ou aplicados para aumento de tecidos moles e está relacionado à estrutura interna destes materiais, o que tem uma correlação direta com a capacidade de preenchimento e volumização (Jeong, 2016).

A elevada capacidade absorptiva da carboximetilquitosana se assemelha a do ácido hialurônico, preenchedor biodegradável mais utilizado atualmente (Kablik, 2009; Kaczmarek *et al.*, 2018).

4.2.9 Citotoxicidade

4.2.9.1 Método de MTT

Este ensaio foi realizado com os hidrogéis CMQ, e de CMQ/Col5, CMQ/Col10 e CMQ/Col15.

De acordo com os resultados da Figura 46, infere-se que os materiais apresentam viabilidade celular em cultura de fibroblastos L2929 adequada, conforme a norma ABNT NBR ISO 10993-5:2009, a qual ressalta que a partir de 70% de viabilidade celular o material é considerado não tóxico, ou seja, viável com possibilidade de utilização como biomaterial em organismos vivos.

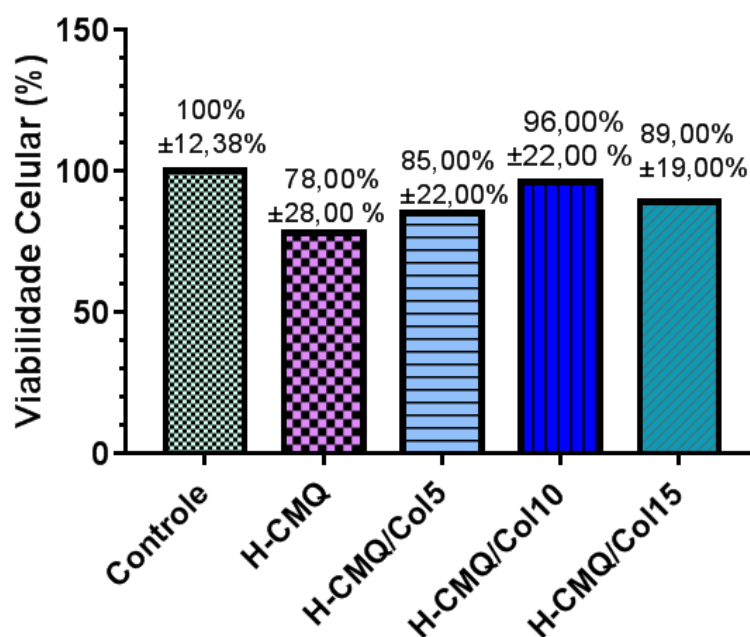


Figura 46 –Teste de viabilidade celular das amostras dos hidrogéis de CMQ e de CMQ/Col.

4.2.9.2 Método de difusão em ágar

Observou-se que após a incubação por 24 h das amostras, se formou um halo claro ao redor dos controles positivos, relativos à citotoxicidade do espécime; o mesmo não foi observado nos hidrogéis nem no controle negativo.

Os valores médios obtidos para cada amostra e controles com os limites especificados para os diferentes graus de citotoxicidade estão indicados na Tabela 10.

Tabela 10 – Graus de citotoxicidade.

GRAU	CITOTOXICIDADE	DESCRIÇÃO DA ZONA DE CITOTOXICIDADE
0	Ausência	Ausência de descoramento ao redor ou sob a amostra.
1	Leve	Zona de descoramento limitada à área sob a amostra.
2	Branda	Tamanho da zona de descoramento a partir da amostra menor que 0,45 cm.
3	Moderada	Tamanho da zona de descoramento a partir da amostra compreendido entre 0,45 cm a 1,0 cm.
4	Severa	Tamanho da zona de descoramento a partir da amostra maior que 1,0 cm, porém não envolvendo a placa inteira.

A validade do ensaio é feita a partir das respostas das células ao tratamento pelo controle negativo, pelo controle positivo e branco. O controle negativo mostrou ausência de reação citotóxica (grau 0), o controle positivo, uma nítida reação citotóxica (grau 4) e o controle branco, apresentou ausência de reação citotóxica.

A partir da constatação da ausência de halos nas amostras, buscou-se uma forma de ampliar a visualização macroscópica das amostras. Para tanto, os poços foram fotografados microscopicamente com o microscópio invertido digital NIKON TS100 11.05.85 e transferidas para o computador para a utilização do software *NIS-Elements*. Com os recursos de magnificação de imagem deste programa, foi possível identificar melhor os limites das áreas em questão.

Através do microscópio invertido, foram feitas fotos de uma região de cada poço das amostras analisadas, nos aumentos de 20X. A partir daí, foi constatada ausência de descoloramento ao redor e sob as amostras, evidenciando ausência de citotoxicidade (Grau 0) como mostrado no Figura 47.

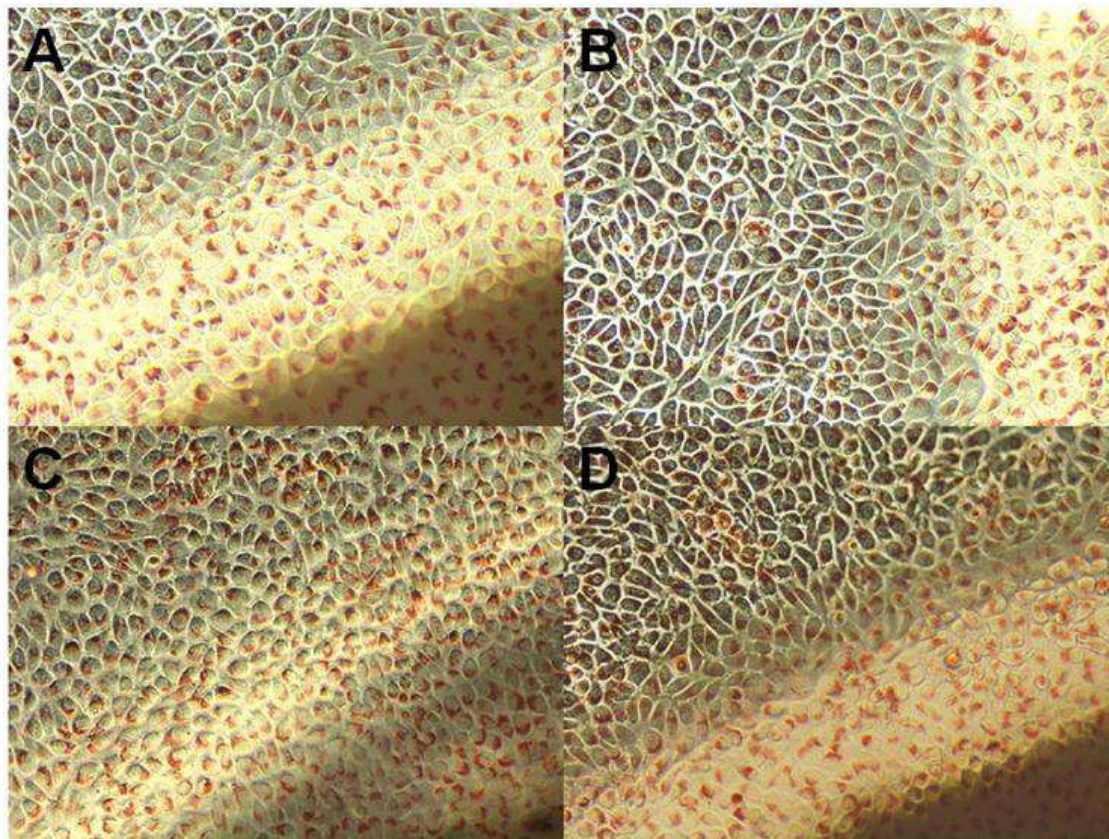


Figura 47 – Ausência de descoloramento ao redor e sob as amostras: A: amostra 1: CMQ, B: amostra 2: CMQ 5% COL, C: amostra 3: CMQ 10% COL, D: amostra 4: CMQ 15% COL.

Dessa maneira, a metodologia empregada neste estudo fez uma avaliação quantitativa, através da extensão em mm dos halos, e qualitativa, a partir da interpretação dos resultados, evidenciando a ausência de citotoxicidade das amostras avaliadas.

5 CONCLUSÕES

As conclusões desta tese estão apresentadas de acordo com os resultados obtidos nas duas etapas.

Primeira etapa:

- Os resultados de FTIR e MO, pode-se afirmar que a metodologia utilizada foi efetiva para obtenção da carboximetilquitosana e colágeno.

Segunda etapa:

- Comparando o hidrogel CMQ com os hidrogéis CMQ/Col, ocorreu redução do pH, aumento da condutividade e não houve variação significativa quanto ao espectro de FTIR e ao comportamento termogravimétrico;

- Quanto às propriedades de aplicação: as análises reológicas demonstraram a obtenção de material com comportamento pseudoplástico; redução da viscosidade e aumento do módulo elástico com o aumento da concentração do colágeno; e de acordo com os resultados de injetabilidade, pode-se afirmar que o hidrogel de carboximetilquitosana apresentou maior força de ejeção em comparação com as composições de H-CMQ/Col e que com o aumento do percentual de colágeno ocorreu uma diminuição da força exercida;

- O grau de intumescimento foi menor em meio do PBS, comparativamente em meio aquoso, tendendo a uma estabilização a partir de 1300 minutos.

- Quanto aos ensaios biológicos, o ensaio de viabilidade celular pelo método de ágar, demonstrou que todas as composições evidenciaram ausência de citotoxicidade;

Diante do exposto, os hidrogéis desenvolvidos nesta pesquisa apresentaram propriedades potenciais para aplicação em preenchimento cutâneo, entretanto, ainda são necessários estudos pré-clínicos e clínicos fase I e II para confirmar a potencialidade do biomaterial obtido.

6 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Estudar mecanismos e parâmetros de biodegradabilidade do material;
- Avaliar tipos e mecanismos para reticulação do hidrogel;
- Realizar ensaio *in vivo*.

REFERÊNCIAS

AGGARWAL, S.; GOEL, A.; SINGLA, S. Drug delivery: special emphasis given on biodegradable polymers. **Advances in Polymer Science and Technology: An International Journal**. V.2, n.1, pp. 1-15, 2012.

AHMED, E. M. (2015). Hydrogel: Preparation, characterization, and applications: A review. **Journal of Advanced Research**, v.6, n. 2, pp. 105–121, 2017.

AKHTAR, M.F.; HANIF, M.; RANJHA, N.M. Methods of synthesis of hydrogels - A review. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 24, pp. 554-559, 2016.

ATTENELLO, N., MAAS, C. Injectable Fillers: Review of Material and Properties. **Facial Plastic Surgery**, 31(01), 029–034, (2015).

AZULAY, R. D; AZULAY, D. R; AZULAY, A. L. **Dermatologia**. 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2017.

BAGATIN, E. Envelhecimento cutâneo e o papel dos cosmeceuticos. **Boletim de Dermatologia**, v. 5, n. 17, 2008.

BANYARD, D.A.; BOURGEOIS, J.M.; WIDGEROW, A.D.; EVANS, G.R.D. Regenerative Biomaterials: A Review. **Plastic and Reconstructive Surgery**, v.135, n. 6, 2015.

BATISTELA, M. et al. Abordagens no estudo do envelhecimento cutâneo em diferentes etnias. **Revista Brasileira Farmácia**, v. 88, n. 2, p. 59-62, 2007.

BAUMANN, L. Collagen-containing fillers: alone and in combination. **Clin Plast Surg**, v. 13, pp. 587-596, 2006.

BILLON, R.; HERSANT, B.; MENINGAUD, J. P. Rhéologie des acides hyaluroniques: principes fondamentaux et applications cliniques en rajeunissement facial. **Annales de Chirurgie Plastique Esthétique**, 62(3), 261–267, 2017.

BUCHIL, L. Radicais livres e antioxidantes. **Cosmetics e Toiletries**, v. 14, n.2; p. 54-57, 2002.

CAMPANA-FILHO, S.P.; SIGNINI, R.; CARDOSO, M.B. Propriedades e aplicações da quitosana **Revista Processos Químicos**, n.53, pp. 09-18, Jul /Dez 2009.

CARRUTHERS, J.; CARRUTHERS, A. A prospective, randomized, parallel group study analyzing the effect of BTX-A and nonanimal sourced hyaluronic acid in combination compared with NASHA alone in severe glabellar rhytides in adult female subjects. **Dermatol Surg**, v. 29, n. 8, p. 802-9, 2015.

CHAUDRY, Z. F.; ROCHA, J. L.; PLEPIS, A. N. G.; ROSSI, M.; GOISSIS, G. Preparação e Caracterização de Colágeno Aniônico por Hidrólise Seletiva de Grupos Carboxamida Internos. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, Abr/Jun, 1997.

CHEN, X.; PARK, H. Chemical characteristics of O-carboxymethyl chitosans related to the preparation conditions. **Carbohydrate Polymers**, n.53, pp. 355-359, 2003.

CHEN, X.; WANG, Z.; LIU, W.; PARK, H. The effect of carboxymethyl chitosan on proliferation and collagen secretion of normal and keloid skin fibroblasts. **Biomaterials**, n.23, pp. 4609-4614, 2002.

CHENG, L.Y.; SUN, X.; TANG, M.Y.; JIN, R.; CUI, W.G.; ZHANG, Y.G. An update review on recent skin fillers. **Aesthet Plastic Res** v.3, pp. 92-99, 2016.

CHO, S. Y.; PARK, J. W.; AN, H.; KO, H. J.; KIM, H.; CHOI, J. K.; CHOI, S.Y.; KIM, S.M.; KO, E.J.; KIM, B.J. Physical Properties of a novel small-particle Hyaluronic Acid filler: in vitro, in vivo and clinical studies. **J Cosmet Dermatol**, pp. 1-8, 2018.

COURDEROT-MASUYER, C.; ROBIN, S.; TAUZIN, H.; HUMBERT, P. Evaluation of lifting and antiwrinkle effects of calcium hydroxylapatite filler. In vitro quantification of contractile forces of human wrinkle and normal aged fibroblasts treated with calcium hydroxylapatite. **Journal of Cosmetic Dermatology**, v. 15(3), p. 260–268, 2016.

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

EDSMAN, K. L. M.; OHRLUND, A. Cohesion of Hyaluronic Acid Fillers: Correlation Between Cohesion and Other Physicochemical Properties, **Dermatol Surg**. pp. 1-6, 2017.

FALLACARA, A.; MANDEFRINI, S.; DURINI, E.; VENTUARNI, S.; FERRARA, E.R.; Hyaluronic Acid Fillers in Soft Tissue Regeneration, **Italy Facial Plast Surg**, n.33, pp. 87–96, 2017.

FARAG, R. K.; MOHAMED, R. R.; Synthesis and Characterization of Carboxymethyl Chitosan Nanogels for Swelling Studies and Antimicrobial Activity. **Molecules**; n.18, pp.190-203, 2013.

FAZLI, Y.; SHARIATINIA, Z. Controlled release of cefazolin sodium antibiotic drug from electrospun chitosan-polyethylene oxide nanofibrous Mats. **Materials Science and Engineering: C**, 71, 641–652, 2017.

FONSECA-SANTOS, B.; CHORILLI, M.; An overview of carboxymethyl derivatives of chitosan: Their use as biomaterials and drug delivery systems. **Materials Science and Engineering**, cp. 77, pp.1349-1362, 2017.

FOOK, M. V. L.; CRUZ, R. C. A. **Desenvolvimento de biomateriais. Evolução no desenvolvimento e aplicação dos biomateriais.** Avanços e Desafios no COMPLEXO INDUSTRIAL em produtos para a saúde. Ministério da Saúde; pp. 193-203, 2017.

FURUIKE, T.; KOMOTO, D.; HASHIMOTO, H.; TAMURA, H. Preparation of chitosan hydrogel and its solubility in organic acids **International Journal of Biological Macromolecules** v.104, Part B, pp.1620-1625, 2017.

GANCEVICIENE, R.; LIAKOU, A.I.; THEODORISIS, A.; MAKRANTONAKI, E.; ZOUBOULIS, C.C. Skin anti-aging strategies. **Dermato-Endocrinology**. v. 4, n. 3, pp.308-319, 2012.

GLOGAW, R.G.; Fillers: From the Past to the Future. **Semin Cutan Med Surg**, n. 31, pp. 78-87, Elsevier, 2012.

GONSALVES, A.A.; ARAUJO, C.R.M.; SOARES, N.A.; GOULART, M.O.F.; ABREU, F.C. Diferentes estratégias para a reticulação da quitosana. **Química Nova** v. 34, n. 7, pp. 1215-1223, 2011.

GUANG YU, D.; R. WILLIAMS, G.; YANG, J.; WANG, X. Chitosan Nanoparticles Self-Assembled from Electrospun Composite Nanofibers. **Journal of Textile Science & Engineering**, v.02; n.01, 2012.

GYLES, A. D.; CASTRO, D. L.; JUNIOR, S. C. O. J.; COSTA, R. M. R. A review of the designs and prominent biomedical advances of natural and synthetic hydrogel formulations. **European Polymer Journal**. Oxford, v. 88, p. 373-392, 2017.

HABIF, T. P. **Dermatologia Clínica**. Guia Colorido para Diagnóstico e Tratamento. Elsevier. 5ª edição. 2013.

HALIMI, C.; MONTEBAULT, A.; GUERRY, A.; DELAIR, T.; VIGUIER, E.; FULCHIRON, R.; DAVID, L. Chitosan Solutions As Injectable Systems For Dermal Filler Applications: Rheological Characterization And Biological Evidence. **Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc.**, pp. 2596-2599, 2015.

HENCH, L. L. **Biomateriais Fundamentos e Aplicações**. 1. Ed Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2012.

HOFFMAN, A. S.; Hydrogels for Biomedical Applications. **Advance Drug Delivery Reviews**, v. 43, pp.3-12, 2012.

INZANA, J.A.; SCHWARZ, E.M.; KATES, S.L.; AWAD, H.A. Biomaterials approaches to treating implant-associated osteomyelitis. **Biomaterials**; n.81, pp.58-71, 2016.

JAMES, W. D.; BERGER, T. E. D. **Andrews Doenças da Pele Dermatologia Clínica**. Elsevier. 10ª edição. 2007.

JEONG, S.; FAN, Y.; BAEK, J.; SONG, J.; CHOI, T.; KIM, S.; KIM, H. Long-lasting and bioactive hyaluronic acid-hydroxyapatite composite hydrogels for injectable dermal fillers: Physical properties and in vivo durability. **J Biomater Applic**. pp. 1-11, 2016.

JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. 11. Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013.

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

KACZMAREK, B.; SIONKOWSKA, A.; GOLYNSKA, M.; POLKOWSKA, I.; SZPONDER, T.; NEHRBASS, D.; OSYCZKA, A.M. In vivo study on scaffolds based on chitosan, collagen and hyaluronic acid with hydroxyapatite. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 118, pp. 938-944, Elsevier, 2018.

KADUNCK, B.; PALERMO, E.; METSAVAHT, L.; RABELLO, L.; MATTOS, R.; MARTINS, S. **Tratado de Cirurgia Dermatológica, Cosmiatria e Laser da Sociedade Brasileira de Dermatologia**, Rio de Janeiro: Elsevier, 2012.

KATUGAMPOLA, P.; WINSTEAD, C.; ADELEKE, A. Thermal stability of carboxymethyl chitosan varying the degree of substitution. **International Journal of Pharmaceutical Science Invention**, v.3, pp. 42-48, 2014.

KHOR, E.; LIM, L. Y. Implantable applications of chitin and chitosan. **Biomaterials**, v.24. n.13, p. 2339–2349, 2003.

KIM, S.W. Biomaterials to gene delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 25, n.155, pp. 116-118, 2011.

KIM, Z.; LEE, Y.; KIM, S.; KIM, H.; YUN, C.; CHOI, Y. A Composite Dermal Filler Cross-linked Hyaluronic Acid and Human Collagen for Tissue Reconstruction. **J Microbiol Biotechnol**, v.25, n.3, pp. 399-406, 2015.

KOZLOWSKA, J.; SIONKOWSKA, A. Effects of different crosslinking methods on the properties of collagen-calcium phosphate composite materials **Intern J Biol Macromol** v. 74, pp. 397-403, 2017.

LA GATTA, A.; DE ROSA, M.; FREZZA, M.A.; CATALAMO, C.; MELONI, M.; SCHIRALDI, C. Biophysical and biological characterization of a new line of hyaluronan-based dermal fillers: A scientific rationale to specific clinical indications. **Materials Science & Engineering C**, 2015.

LAMAS, J. C. Carboximetilquitosanas: Preparação, caracterização e aplicação como agentes de aplicação de estabilizações de superfícies aquosas em alumina. **Dissertação de Mestrado** – Universidade de São Paulo – Instituto de Química de São Carlos, 2008.

LANDAU, M. Exogenous factors in skin aging. **Curr Probl Dermatol**, v. 35; pp.1-13, 2007.

LARGURA, M. C. T. **Síntese e caracterização da o-carboximetilquitosana-n-lauril e utilização como polímero anfífilica em comprimidos de triacínolona**. 2009. 133 f. Dissertação (Mestrado) apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas na Universidade do Vale do Itajaí.

LEONARDI, G.R.; GASPAR, L.R.; CAMPOS, P.M.B.G.; Estudo da variação do pH da pele humana exposta à formulação cosmética acrescida ou não das vitaminas A, E ou ceramida, por metodologia não-invasiva. **An. Bras. Dermatol.** , v. 77, n. 5, Rio de Janeiro, 2002.

LEWANDOWSKA, K.; SIONKOWSKA, A.; GRABSKA, S.; KACZMAREK, B.; MICHALSKA, M. The miscibility of collagen/hyaluronic acid/chitosan blends investigated in diluted solutions and solids. **J Mol Liq**, v. 220, pp. 726-730, 2016.

LEWANDOWSKA, K.; SIONKOWSKA, A.; GRABSKA, S. Chitosan blends containing hyaluronic acid and collagen. Compatibility behaviour. **J Mol Liq**, v. 212, pp. 879-884, 2015.

LEWANDOWSKA, K.; SIONKOWSKA, A.; GRABSKA, S.; KACZMAREK, B. Surface and thermal properties of collagen/hyaluronic acid blends containing chitosan. **Int J Biol Macromol**, v. 92, pp. 371-376, 2016.

LIANG, P.; ZHAO, Y.; SHEN, Q.; WANG, D.; XU, D. The effect of carboxymethyl chitosan on the precipitation of calcium carbonate. **Journal of Crystal Growth** v. 261, pp. 571-576, 2004.

LOGITHKUMAR, R.; KESHAVNARAYAN, A.; DHIVYA, S.; CHAWLA, A.; SARAVANAN, S.; SELVAMURUGAN, N. A review of chitosan and its derivatives in bone tissue engineering. **Carbohydrate Polymers**, v.151, pp. 172-188, 2016.

LORENC, Z. P; ÖHRLUND, Å; EDSMAN, K. Factors Affecting the Rheological Measurement of Hyaluronic Acid Gel Fillers. **Journal of drugs in dermatology**. V.1; 16, n.9, pp. 876-882, 2017.

LOURITH, N.; KANLAYAVATTTANAKUL, M. Biopolymeric agents for skin wrinkle treatment. **Journal of cosmetic and laser therapy** v.18, n. 5, pp. 301-310, 2016.

MA, X.; DENG, J.; DU, Y.; LI, X.; FAN, D.; ZHU, C.; HUI, J.; MA, P.; XUE, W. A Novel chitosan-collagen-hydrogel for use as a dermal filler: initial in vitro and in vivo investigations. **J Mater Chem B**. n. 2, pp. 2749-2763, 2014.

MALERBA, M.; CERANA, R. Chitosan effects on Plants systems. **Int J Mol Sci** v.17, n. 7, pp. 996-1021, 2016.

MESA-ARANGO, A.C.; FLOREZ-MUNOZ, S.V.; SANCLEMENTE, G. Mecanismos de envejecimiento de la piel. **Iatreia Medellin**. v.30, n. 2, 2017.

MINE, S., FORTUNEL, N.O.; PAGEON, H.; ASSELINEAU, D.; Aging alters functionally human dermal papillary fibroblasts but not reticular fibroblasts: a new view of skin morphogenesis and aging. **Plo S One**, v.3, n.12, 2006.

MOGOSANU, G.D.; GRUMEZESCU, A.M. Natural and Synthetic Polymers for wound and burns dressing. **International Journal of Pharmaceutics** v. 463, pp. 127-136, 2014.

MONTAGNER, S.; COSTA, A. Bases biomoleculares do fotoenvelhecimento. **Anais brasileiros de dermatologia**, São Paulo, v.3, n. 84, p. 263-9, 2007.

MONTEIRO, E. O. Abordagens antigas e atuais: sulco nasolabial, linhas de marionete e rugas periorais. *RBM Out* 13 V 70 **Especial Dermatologia & Cosmiatria** 4, p. 3-15, 2013.

MOURYA, V. K.; INAMDAR, N. N.; TIWARI, A. Carboxymethyl chitosan and its applications. **Adv. Mat. Lett.** v.1, n., pp.11-33, 2010.

MUNARIN, F.; PETRINI, P.; BOZZINI, S.; TANZI, M. C. New perspectives in cell delivery systems for tissue regeneration: natural-derived injectable hydrogels. **J Appl Biomater Function Mater**, v. 10, n.2, pp.67-81, 2012.

NAGAMALLI, H.; SITARAMAN, M.; KANDALAI, K.K.; MUDHOLE, G.R. chicken eggshell as a potential substrate for production of alkaline protease by *Bacillus altitudinis* GVC11 and its application. **Biotech** n. 7, 2017.

NAYLOR, E.C.; WATSON, R.E.B.; SHERRAT, M.J. Molecular aspects of skin ageing. **Maturitas**. n. 69, pp. 249-256, 2011.

NGUYEN, M. K.; LEE, D. S.; Injectable Biodegradable Hydrogels. **Macromol Biosci**, n.10, pp. 563-579, 2010.

ORIÁ, R. B.; et al. Estudo das alterações relacionadas com a idade e a pele humana, utilizando métodos de histomorfometria e autofluorescência. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, Rio de Janeiro, v. 78, n. 4, p. 425-434, jul./ago. 2006.

ORTOLAN, M.C.; BERGAMO, A.; BIONDO-SIMÕES, M.L.P.; BARONI, E.R.V.; AUERSVALD, A.; AUERSVALD, L.A.; NETTO, M.R.M.; BIONDO-SIMÕES, R. Influência do envelhecimento na qualidade da pele de mulheres brancas: o papel do colágeno, da densidade de material elástico e da vascularização, 2013.

PARADA, M.B.; CAZERTA, C.; AFONSO, J.P.; IOSHIMOTO, D.; NASCIMENTO, S.; Overview and management of fillers complications, **Surg Cosmet Dermatol** ;v. 8, n.4, pp. 342-51, 2016.

PARK, H.; CHOI, B.; HU, J.; LEE, M. Injectable chitosan hyaluronic acid hydrogels for cartilage tissue engineering. **Acta Biomaterialia**, v.9, pp. 4779-4786, 2013.

PARK, J.; LAKES, R.S. **Biomaterials: an Introduction**. 3th Edition. New York: Springer, 2007. 561p.

PARK, S.B.; LIH, E.; PARK, K.S.; JOUNG, MY.K.; HAN, D.K. Biopolymer-based functional composites for medical applications **Progress in Polymer Science**, v.68, pp. 77-105, 2017.

PARK, J.B.; BRONZINO, J.D., **Biomaterials: Principles and applications**, CRC Press: Boca Raton, Florida, EUA, 2003.

PAVICIC, F.D., Dermal fillers in aesthetics: an overview of adverse events and treatment approaches. **Plastic Surgical Nursing**. V. 35, n. 1, pp. 13-32, 2015.

PEPPAS, N. A.; BURES, P.; LEOBANDUNG, W.; ICHIKAWA, H. Hydrogels in pharmaceutical formulations. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, London, v. 50, p. 27-46, 2000.

PIERRE, S.; LIEW, S.; BERNARDIN, A. Basics of Dermal Filler Rheology. **Dermatologic Surgery**, 41, S120–S126, 2015.

PIJUN, Y.; JIAN, G.; JUNGLIE, L. Z.; XIAO, S.; LUPING, W.; WEI, C.; XIUMEI, M. A new approach to heart valve tissue engineering based on modifying. **J Biomat Tissue Eng**, n.7, pp. 386-392, 2017.

PILEGGI, R. G. **Ferramentas para o estudo de desenvolvimento de concretos refratários**. Tese (Doutorado em Ciência e Engenharia de Materiais), Universidade Federal de São Carlos. São Carlos/SP, 2001.

PRADHAN, A.K.; SAHOO, P.K. Synthesis and study of thermal, mechanical and biodegradation properties of chitosan-g-PMMA with chicken egg shell (nano-CaO) as a novel bio-filler. **Materials Science and Engineering C**. n. 80, pp. 149-155, 2017.

PRESTES, R. C.; GOLUNSKI, S. M.; TONIAZZO, G.; KEMPKA, A. P.; DI LUCCIO, M. Caracterização da fibra de colágeno, Gelatina e colágeno hidrolisado. **Rev Bras Produtos Agroindustriais**. v. 15, n. 4, pp. 375-382, 2013.

QIU, Z.Y.; CUI, Y.; TAO, C.S.; ZHANG, Z.Q.; TANG, P.; MAO, K.; WANG, X.; CUI, F. Mineralized Collagen: Rationale, Current Status, and Clinical Applications **Materials** v.8, pp. 4733-4750, 2015.

RATNER, B.D., et al, Biomaterials Science: An introduction to Materials in Medicine, **Academic Press**, 3. Ed., 2012.

REBELO, R.; FERNANDES, M.; FANGUEIRO, R. Biopolymers in Medical Implants: A Brief Review. **Procedia Engineering**, n. 200, pp. 236-243, 2017.

REZENDE, D. M.; BACHION, M. M.; ARAÚJO, A. O. Integridade da pele prejudicada em idosos: estudo de ocorrência numa comunidade atendida pelo Programa Saúde da Família. **Acta Paul Enferm**, v.19, n. 2, pp.168-73, 2006.

RIAZ, T.; ZEESHAN, R.; ZARIF, F.; ILYAS, K.; MUHAMMAD, N, SAFI, S.Z. et al. FTIR analysis of natural and synthetic collagen. **Applied Spectroscopy Reviews**. V.53, n.9, pp. 703-746, 2018.

RIBEIRO, C.J.; **Cosmetologia Aplicada a Dermo estética**. 2. Ed. São Paulo: **Pharmabook**; 2010.

ROCK, K.; GRANDOCH, M.; MAJORA, M.; KRUTMANN, J.; FISCHER, J.W.; Collagen fragments inhibit hyaluronan synthesis in skin fibroblasts in response to ultraviolet B (UVB): new insights into mechanisms of matrix remodeling. **J Biol Chem**. V. 286, n. 20, pp.18268-76, 2011.

ROSTAN, E. Collagen Fillers **Facial Plast Surg Clin N Am** v. 15, pp. 55-61, 2007

RYU, S.-H.; MOON, S. Y.; YANG, Y.-J.; MOON, S. R.; HONG, J. P.; CHOI, J.; LEE, S. Recombinant Human Epidermal Growth Factor Accelerates the Proliferation of Irradiated Human Fibroblasts and Keratinocytes in vitro and in vivo. **Journal of Radiation Research**, v.50. n.6, p.545–552, 2009.

SADICK, N.S.; A Structural Approach to Nonablative Rejuvenation. **Cosmetic dermatology**, v.15, n.12: pp. 39-43, 2002.

SAMPAIO, S.A. P.; RIVITTI, E.A.; **Dermatologia**. 4. ed. São Paulo: Artes Médicas, 2018.

SÁNCHEZ-CARPINTERO, I., CANDELAS, D., RUIZ-RODRÍGUEZ, R. Dermal Fillers: Types, Indications, and Complications. **Actas Dermo-Sifiliográficas** (English Edition), v. 101; n.5, p.381–393, 2010.

SANDOVAL, M.H.L; CAIXETA, C.M., RIBEIRO, N. M.; Avaliação in vivo e in vitro da eficácia com associação de vitamina C, ácido hialurônico fragmentado e manose na prevenção do envelhecimento cutâneo. **Surg Cosmet Dermatol**; v.7, n.1, pp.37-44, 2015.

SANTER, V.; MOLLIARD, S. G.; MICHEELS, P.; RÍO-SANCHO, S. D.; QUINODOZ, P.; KALIA, Y. N.; SALOMON, D. Hyaluronic Acid After Subcutaneous Injection—An Objective Assessment. **Dermatologic Surgery**, 1, 2018.

SANTIN, M.; PHILLIPS, G. J. **Biomimetic, Bioresponsive, and Bioactive Materials: An Introduction to Integrating Materials with Tissues**. 1. Ed New Jersey: Wiley-Blackwell, 2012.

SASHIWA, H.; AIBA, S. Chemically modified chitin and chitosan as biomaterials. Progress in **Polymer Science**, v. 29(9), p. 887–908. 2004.

SHARIATINIA, Z. Pharmaceutical applications of chitosan. **Advances in colloid and interface science**, v. 263, p. 131-194, 2018.

SHOICHET, M.S.; Polymer Scaffolds for Biomaterials Applications. **Macromolecules**, v.43, pp. 581-591, 2010.

SHUKLA, S. K.; MISHRA, A. K.; AROTIBA, O. A.; MAMBA, B. B. Chitosan-based nanomaterials: A state-of-the-art review. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 59, p. 46–58, 2013.

SILVA, T.F.; PENNA, A.L.B. Colágeno: Características químicas e propriedades funcionais **Rev Inst Adolfo Lutz**, v.71, n.3, pp. 530-9, 2013.

SILVA, T.H.; ALVES, A.; FERREIRA, B.M.; OLIVEIRA, J.M.; REYS, L.L.; FERREIRA, R.J.F.; SOUSA, R.A.; SILVA, S.S.; MANO, J.F.; REIS, R.L. Materials of marine origin: a review on polymers and ceramics of biomedical interest **International Materials Reviews** v.0, n.0, pp. 1-32, 2012.

SIONKOWSKA, A. Modification of collagen films by ultraviolet irradiation. **Polymer Degradation and stability**, v. 68, p. 147-151, 2004

SIONKOWSKA, A.; KACZMAREK, B. Preparation and characterization of composites based on the blends of collagen, chitosan and hyaluronic acid. **J Biol Macromol**, v. 102, pp. 658-666, 2016

SKRZYPEK, E.; GÓRNICKA, B.; SKRZYPEK, D.M.; KRZYSZTOF, M.R. Granuloma as a complication of polycaprolactone-based dermal filler injection: ultrasound and histopathology studies. **Journal of Cosmetic and Laser Therapy**, 2018.

SON, D.; KIM, M.; WOO, H.; PARK, D.; & JUNG, E. Anti-Thermal Skin Aging Activity of Aqueous Extracts Derived from Apple Mint (*Mentha suaveolens* Ehrh.) in Human Dermal Fibroblasts. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, pp.1–7, 2018.

SPIN-NETO, R.; PAVONE, C.; FREITAS, R.M.; MARCANTONIO, R.A.C.; MARCANTONIO-JUNIOR, E. Biomateriais a base de quitosana com aplicação médica e odontológica: revisão de literatura. **Revista de Odontologia da UNESP**. v. 37, n.2, pp. 155-161, 2008.

STANDER, B.A.; VAN VOLLENSTEE, F.A.; KALLMEYER, K.; POTGIETER, M.; JOUBERT, A.; SWANEPOEL, A.; et al. An *in vitro* and *in vivo* study on the properties of hollow polycaprolactone cell-delivery particles. **PLoS ONE**, v.13, n.7, 2018.

STOCKS, D.; SUNDARAM, H.; MICHAELS, J.; DURRANI, M. J.; WORTZMAN, M. S.; NELSON, D. B. Rheological evaluation of the physical properties of hyaluronic acid dermal fillers. **Journal of drugs in dermatology**. V.10. n.9: p.974-80, 2011.

STRUTZEL, E. et al. Análise dos fatores de risco para o envelhecimento da pele: aspectos gerais e nutricionais. **Rev Bras Nutr Clin**, v.22, n.2, pp.139-45, 2007.

STRUTSZCZYK, M. H.; Chitin and chitosan. **Polymer**. v.47, n.9, pp.619-29, 2002.

SUEHARA, L.Y.; SIMONE, K.; MAIA, M. Avaliação do envelhecimento facial relacionado ao tabagismo. **An Bras Dermatol**. V.81, n.1, pp.34-9, 2006.

SUNDARAM, H.; VOIGTS, B.; BEER, K.; MELAND, M.; Comparasion of the rheological properties of viscosity and elasticity in two categories of soft tissue fillers: calcium hydroxyapatite and hyaluronic acid **Dermatol Surg** v.36 pp. 1859-1865, 2010.

TEIXEIRA, A. N. **Avaliação in vivo da pele humana facial por Espectroscopia Raman Confocal: Ação de cosméticos**. 2013. 77 f. Dissertação (Mestrado) apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica na Universidade Vale do Paraíba.

THARANATHAN, R.N.; PRASHANTH, K.V.H.; Chitin/chitosan: modifications and their unlimited application potential: an overview. **Trends in Food Science & Technology** v.18, pp.117- 131, 2007.

TIRKISTANI, F.A.A. Thermal analysis of some chitosan Schiff bases. **Polymer Degradation and Stability**, v. 60, n. 1, pp. 67-70, 1998.

TSUJI, H., IKADA, Y. Properties and morphology of poly(L-lactide) 4. Effects of structural parameters on long-term hydrolysis of poly(L-lactide) in phosphate-buffered solution. **Polymer Degradation and Stability**, v.67. n.1, 2000.

ULLAH, F.; OTHMAN, M. B. H.; JAVED, F.; AHMAD, Z.; AKIL, H. M. Classification, processing and application of hydrogels: A review. **Materials Science and Engineering** v. 57, pp.414-433, 2015.

UNTERMAN, S.; CHARLES, L. F.; STRECKER, S. E.; KRAMARENKO, D.; PIVOVARCHICK, D.; EDELMAN, E. R.; ARTIZI, N. hydrogels Nanocomposites with Independently Tunable Rheology and Mechanics. **ACS Nano**, v.11, pp. 2598-2610, 2017.

UPADHYAYA, L.; SINGH, J.; AGARVAL, V.; TEVARI, R. P. Biomedical applications of carboxymethyl chitosans. **Carbohydrate Polymers** v. 91, pp. 452-466, 2013.

VAN NIEUWENHOVE, I.; TYTGAT, L.; RYX, M.; BLONDEEL, P.; STILLAERT, F.; THIENPONT, H.; OTTOVAERE, H.; DUBRUEL, P.; VAN VLIERBERGHE, S. Soft tissue fillers for adipose tissue regeneration: From hydrogels development toward clinical applications **Acta Biomaterialia** pp. 1742-1761, 2017.

VARAPRASAD, K.; JAYARAMUDU, T.; SADIKU, E. R. Removal of dye by carboxymethyl cellulose, acrylamide and graphene oxide via a free radical polymerization process. **Carbohydrate Polymers**, v.164, p.186–194, 2017.

VEDADGHAVAMI, A.; MINOOEI, F.; MOHAMMADI, M.H.; KHETANI, S.; SANATI-NEZHAD, A.; Manufacturing of hydrogel biomaterials with controlled mechanical properties for tissue engineering applications **Acta Biomaterialia**, v. 62, n.15, pp. 42-63, 2017.

VUONG, T.T.; RONNING, S.B.; SUSO, H.P.; SCHMIDT, R.; PRYDZ, K.; LUNDSTROM, M.; MOEN, A.; PEDERSEN, M.E. The extracellular matrix of eggshell displays anti-inflammatory activities through NF- κ B in LPS-triggered human immune cells. **Journal of Inflammation Research**. V.10, pp. 83-96, 2017.

WAHID, F.; YIN, J.; XUE, D.; XUE, H.; LU, Y.; ZONG, C.; CHU, L. Synthesis and Characterization of Antibacterial Carboxymethyl Chitosan/ZnO Nanocomposite Hydrogels. **Int J Biol Macromol**, 2016.

WANG, Y.; GUAN, A.; ISAYEVA, I.; VORVOLAKOS, K.; DAS, S.; LI, Z.; PHILLIPS, K. S. Interactions of Staphylococcus aureus with ultrasoft hydrogel biomaterials. **Biomaterials** v.95, pp.74-85, 2016.

WEI, Z.; YANG, J. H.; LIU, Z. Q.; XU, F.; ZHOU, J. X., ZRÍNYI, M.; CHEN, Y. M. Novel Biocompatible Polysaccharide-Based Self-Healing Hydrogel. **Advanced Functional Materials**, v. 25; n.9, p.1352–1359, 2015.

WOLLINA, U.; BRZEZINSKI, P. Aesthetic dermatology: What's new, what's true? **Wiley Periodics, Inc. Dermatologic Therapy**, 2018.

WU, J.; FU, H.; JIANG, Y.; ZHANG, H.; ZHENG, Z.; ZHAN, X. Preparation and characterization of a novel polysialic acid-hyaluronan graft copolymer potential as dermal filler. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 99, pp. 692-698, 2017.

YAMANLAR, S.; SANT, S.; BOUDOU, T.; PICART, C; HOSSEIN, K. Surface functionalization of hyaluronic acid hydrogels by polyelectrolyte multilayer films. **Biomaterials**, v.32, pp. 5590-5599, 2011.

XIAN, LI.; WENJIAO, X.; CHENHUI, Z.; DAIDI, F.; YANNAN, L.; XIAOXUANMA. Novel Hydrogels based on carboxyl pullulan and collagen crosslinking with 1,4 butanediol diglycidylether for use as a dermal filler: initial in vitro and in vivo investigations. **Materials Science and Engineering C** v. 57, pp. 189-196, 2015.

XIANG, Q.; KOH, S.S.H.; SHIN, D.; DEYN, M.L.Z.; HO, C.Y.X. Use of polymethacrylate (PMMA) microspheres collagen to treat atrophic scars **Medical Hypothesis** v. 108, pp. 115-116, 2017.

ZHAO, D.; HUANG, J.; HU, S.; MAO, J. MEI, L. Biochemical activities of N,O-carboxymethyl chitosan from squid cartilage. **Carbohydrate Polymers**, v. 85, n. 4, p. 832 – 837, 2011.

ZUIDEMA, J.M.; RIVET, C.J.; GILBERT, R.J.; MORRISON, S.A. A protocol for rheological characterization of hydrogels for tissue engineering strategies. **J Biomed Mater Res Part B**. n. 102B, pp. 1063-1073, 2014.

ANEXOS

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para obtenção e utilização de imagens

Eu, _____, por meio deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, permito que a Dra. **SANDRA MARIA SOBRAL DE CARVALHO**, CRM-PB 4243, faça fotografias e/ou vídeos sobre o meu caso clínico.

Autorizo que estas imagens sejam utilizadas para finalidade científica, especificamente em sua Tese de Doutorado, sob título: **Carboximetilquitosana/colágeno para utilização como preenchedor cutâneo**, podendo inclusive ser mostrado o meu rosto, o que, dependendo do caso, pode fazer com que eu seja reconhecida, durante apresentação didática ou apenas em impressão escrita da tese.

Fui esclarecida de que não receberei nenhum ressarcimento ou pagamento pelo uso das minhas imagens e também compreendi que a profissional que me atende e atenderá durante todo o tratamento não terá qualquer tipo de ganhos financeiros com a exposição da minha imagem.

Portanto, estou de acordo com a utilização destas imagens para finalidades científicas.

João Pessoa – PB, _____ de _____ de 2018.