



**PRÓ-REITORIA ACADÊMICA
DIRETORIA DE PESQUISA, EXTENSÃO E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE MESTRADO PROFISSIONAL EM ODONTOLOGIA**

ANDRÉA LISBOA SISNANDO

**ANÁLISE REOLÓGICA DE PREENCHEDORES DÉRMICOS A BASE DE ÁCIDO
HIALURÔNICO COM ALTO CROSSLINKED APÓS PASSAGEM POR
CÂNULAS DE DIÂMETROS DIFERENTES**

**RHEOLOGICAL ANALYSIS OF HYALURONIC ACID DERMAL FILLERS WITH
HIGH CROSSLINKED AFTER PASSING THROUGH CANNULAS OF
DIFFERENT DIAMETERS**

MARINGÁ
2022



**PRÓ-REITORIA ACADÊMICA
DIRETORIA DE PESQUISA, EXTENSÃO E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE MESTRADO PROFISSIONAL EM ODONTOLOGIA**

ANDRÉA LISBOA SISNANDO

**ANÁLISE REOLÓGICA DE PREENCHEDORES DÉRMICOS A BASE DE ÁCIDO
HIALURÔNICO COM ALTO CROSSLINKED APÓS PASSAGEM POR
CÂNULAS DE DIÂMETROS DIFERENTES**

**RHEOLOGICAL ANALYSIS OF HYALURONIC ACID DERMAL FILLERS WITH
HIGH CROSSLINKED AFTER PASSING THROUGH CANNULAS OF
DIFFERENT DIAMETERS**

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado Profissional em Odontologia, do Centro Universitário Ingá - UNINGÁ, para obtenção do título de Mestre em Odontologia, área de concentração Ortodontia (Harmonização Orofacial)

Orientador: Prof. Dr. Giancarlo De La Torre Canales.

MARINGÁ
2022

Sisnando, Andrea Lisboa

Análise de reologia de preenchedores dérmicos de ácido hialurônico com alto crosslinked após a passagem do ácido por cânulas de diâmetros diferentes/ Andrea Lisboa Sisnando. – Maringá, 2022.

39 p.: il.; cm

Dissertação (Mestrado) - Centro Universitário Ingá Uningá, 2022.

1. Ácido Hialurônico. 2. Reologia. 3. Cânula.

I. Orientador: Prof. Dr. Giancarlo De La Torre Canales
Diretoria de Pesquisa, Extensão e Pós-Graduação.
Programa de Mestrado Profissional em Odontologia.

Autorizo, exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação, por processos fotocopiadores e outros meios eletrônicos.

Assinatura:

Data:

ANDRÉA LISBOA SISNANDO

**ANÁLISE DE REOLOGIA DE PREENCHEDORES DÉRMICOS DE ÁCIDO
HIALURÔNICO COM ALTO CROSSLINKED APÓS A PASSAGEM DO ÁCIDO
POR CÂNULAS DE DIÂMETROS DIFERENTES**

**RHEOLOGY ANALYSIS OF HYALURONIC ACID DERMAL FILLERS WITH
HIGH CROSSLINKED AFTER THE PASSAGE OF ACID BY CANNULAS OF
DIFFERENT DIAMETERS**

Dissertação apresentada ao Programa de
Mestrado Profissional em Odontologia, do
Centro Universitário Ingá - UNINGÁ, para
obtenção do título de Mestre em
Odontologia, área de concentração
Ortodontia (Harmonização Orofacial)

Maringá, ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Giancarlo De La Torre Canales - Orientador
UNINGÁ - Centro Universitário Ingá

Profa. Dra. Mariana Barbosa Câmara Souza
UNINGÁ - Centro Universitário Ingá

Profa. Dra. Edmara Tatiele Pedroso Bergamo
Universidade Federal de São Paulo – Campus Bauru

MARINGÁ
2022

DEDICATÓRIA

A minha família: mãe Marriba, minha irmã Adriana, meu esposo Jesus Sisnando, meu maior incentivador e meus filhos, Carolina e Jesus Neto, o amor de vocês é o que me move. Obrigado pela compreensão e carinho durante este período no qual não pude dedicar-lhes a devida atenção.

AGRADECIMENTOS

Ao Centro Universitário Ingá - UNINGÁ, na pessoa do Magnífico Reitor Prof. Dr. Ricardo Benedito de Oliveira.

À Coordenadora dos Cursos de Pós-Graduação do Centro Universitário Ingá – UNINGÁ, Prof^a Dr^a Karina M. Salvatore Freitas.

Ao meu orientador Prof. Dr. Giancarlo De la Torre Canales que me forneceu todas as bases necessárias para a realização deste trabalho, agradeço com profunda admiração pelo seu profissionalismo.

Aos professores da Área de Harmonização Orofacial, Profa. Dra. Célia Rizzatti Barbosa Prof. Dr. Jose Ricardo de Albergaria Barbosa, Prof. Dr. Giancarlo De La Torre Canales, e Profa. Dra. Mariana Barbosa Câmara de Souza, pelas orientações e ensinamentos.

Aos membros da banca examinadora do exame de qualificação, Prof. Dr. Giancarlo De La Torre Canales, Profa. Dra. Célia Rizzatti Barbosa e Prof. Dr. José Peixoto Ferrão, pelas contribuições feitas ao nosso trabalho.

A todos os co-autores do presente trabalho, Giancarlo De La Torre Canales, Mariana Barbosa Câmara-Sousa, Gisele Rosada Dônola Furtado, Vasudev Vivekanand Nayak e Célia Marisa Rizzatti-Barbosa, pelas parcerias e contribuições a nosso trabalho.

Ao meu amigo/irmão Omar Morhy, pelo incentivo, pelas risadas e por não me deixar desistir, mesmo nos momentos de maior dificuldade. Obrigada por esta caminhada juntos.

RESUMO

Objetivo: O objetivo deste trabalho foi avaliar e comparar a alteração das propriedades reológicas de preenchedores de Ácido Hialurônico (AH) de alto crosslinking após a passagem por cânulas de diferentes diâmetros. **Materiais e Métodos:** As propriedades reológicas de cinco preenchedores de alto crosslinking de diferentes marcas, foram analisados por um Reômetro TA-INSTRUMENTS AR-1500EX (NEW CASTLE, NE, USA), antes e logo após passagem por cânulas de diferentes diâmetros, 22G e 25G. Os testes foram realizados com frequências no Valor de deformação de 0,1Hz a 2 Hz e temperatura controlada a 25°C para determinação dos parâmetros de reologia G' e G'' . Todas as análises foram feitas em triplicata e por um mesmo pesquisador cego as marcas comerciais dos AH. **Resultados:** As medições de amplitude oscilatória após passagem pela cânula 22G indicaram comportamento idêntico em deformações de oscilação mais baixas (< 10%), onde o módulo de armazenamento, G' foi observado por ser maior que o módulo de perda G'' . Em frequências mais altas (> 10%), diferenças de comportamento entre os grupos foram observadas com os preenchedores A, B, C e E, exibindo um cruzamento entre G' e G'' , enquanto o preenchedor D não apresentou esse cruzamento. Os preenchedores apresentaram esse mesmo comportamento após passagem pela cânula de 25G. As medições de frequência oscilatória dos preenchedores após passagem por ambos os diâmetros das cânulas apresentaram comportamento semelhante. Porém, o preenchedor A apresentou um cruzamento de G' e G'' a uma frequência angular de 10 rad/s, acima da qual o G'' é maior durante a duração do experimento. Todos os outros grupos, independentemente do tamanho da cânula, não mostraram tal cruzamento com G' e G'' em toda a faixa de frequência do experimento. Os módulos complexos de todos os grupos que passaram por ambos os tamanhos de cânula foram reduzidos correspondendo a um aumento na frequência angular. **Conclusão:** Em frequências fisiológicas correspondentes à região da face, o diâmetro das cânulas não altera as propriedades reológicas de preenchedores de AH com alto crosslinking.

Palavras-chave: Ácido hialurônico. Preenchimento. Crosslinking.

ABSTRACT

OBJECTIVE: The objective of this work was to evaluate and compare the change in the rheological properties of high crosslink Hyaluronic Acid (HA) fillers after passage through cannulas of different diameters. **Materials and Methods:** The rheological properties of five high crosslink fillers from different brands were analyzed by a TA-INSTRUMENTS AR-1500EX Rheometer (NEW CASTLE, NE, USA), before and after passing through cannulas of different diameters, 22G and 25G. The tests were performed with frequencies in the deformation value of 0.1Hz to 2 Hz and controlled temperature at 25°C to determine the rheology parameters G' and G'' . All analyzes were performed in triplicate and by the same researcher blinded to the HA trademarks. **Results:** Measurements of oscillatory amplitude after passing through the 22G cannula indicated identical behavior at lower oscillation strains (< 10%), where the storage modulus, G' , was observed to be greater than the loss modulus G'' . At higher frequencies (> 10%), behavioral differences between groups were observed with fillers A, B, C and E, exhibiting a cross between G' and G'' , while filler D did not show this cross. The fillers showed the same behavior after passing through the 25G cannula. Oscillatory frequency measurements of the fillers after passing through both cannula diameters showed similar behavior. However, filler A showed a crossover of G' and G'' at an angular frequency of 10 rad/s, above which G'' is highest during the duration of the experiment. All other groups, regardless of cannula size, showed no such crossover with G' and G'' across the entire frequency range of the experiment. The complex modules of all groups that passed through both cannula sizes were reduced corresponding to an increase in angular frequency. **Conclusion:** At physiological frequencies corresponding to the face region, the diameter of the cannulas does not change the rheological properties of HA fillers with high crosslink.

Keywords: hyaluronic acid. Filler. Crosslink.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Estrutura Química Polissacarídeo do Ácido Hialurônico	13
Figura 2.	Camadas e estrutura da pele	13
Figura 3.	Fibras de colágeno, Ácido Hialurônico e Elastina	14
Figura 4.	Processo de Crosslinking do AH	15

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

AH -	Ácido Hialurônico
BDDE -	Éter 1,4-butanodiol diglicídico
g	- Grama
°C	- Grau Celsius
G'	- Módulo elasticidade
G''	- Módulo viscoso
G*	- Módulo complexo
G	- Gaude
LVE	- Região Linear Viscoelástica
mg	- Miligramas
Pa.s	- Pascal segundo
Tan δ	- Tangente da perda
γ	- Taxa de cisalhamento

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 ARTIGO	20
3 CONSIDERAÇÕES FINAIS	33
4 RELEVÂNCIA E IMPACTO DO TRABALHO PARA À SOCIEDADE	35
REFERÊNCIAS	37

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

Os tratamentos cosméticos cirúrgicos e não cirúrgicos como os injetáveis temporários, semipermanentes, e permanentes, aumentaram em popularidade na última década em diferentes áreas da saúde, abrangendo desde a dermatologia e cirurgia plástica à odontologia (ROGERIO et al., 2021). Uma pesquisa recente da Sociedade Internacional de Cirurgia Plástica Estética reportou um aumento contínuo de procedimentos estéticos cirúrgicos e não cirúrgicos em todo o mundo, totalizando, um aumento de 7,4% desde 2015 até 2020. Mas, os procedimentos cosméticos minimamente invasivos tiveram um papel de destaque aumentando 144% desde o ano 2000 (ISAPS, 2020). Ademais, os procedimentos na face, cabeça e pescoço e o uso de injetáveis tiveram aumento de 13,5% e 8,6% respectivamente em 2019.

Embora a toxina botulínica continue sendo o tratamento injetável mais utilizado, com um aumento de 64,9% em 2019, o uso do ácido hialurônico (AH) mostrou um crescimento de 15,7% entre o 2018 e 2019 (ISAPS, 2019). Estes dados indicam que as injeções de preenchedores a base de AH nos tecidos moles são o segundo procedimento minimamente invasivo mais frequentemente utilizado nos EUA e no Brasil, os quais são os países que mais intervenções estéticas realizam no mundo (ISAPS, 2019). Desta forma, a literatura atual, considera o uso de preenchedores a base de AH essenciais na maioria de procedimentos de rejuvenescimento facial que precisem de reestruturação tecidual mantendo a dinâmica facial (MICHAUD, 2018). Porém, é importante mencionar a diminuição do uso dos preenchedores a base de AH em 6,1% entre os anos 2019 e 2020, principalmente devido à pandemia da COVID-19 (ISAPS, 2020).

Descoberto pela primeira vez no humor vítreo do olho em 1934 e posteriormente sintetizado in vitro em 1964, o AH consiste em uma unidade básica de dois açúcares, ácido glicurônico e N-acetil-glucosamina, polimerizados em grandes macromoléculas de mais de 30.000 unidades repetidas (Figure 1). É encontrado naturalmente no corpo humano particularmente em todos os tecidos conjuntivos (PRICE et al., 2007). Em sua forma nativa, a estrutura química do AH é idêntica em diferentes espécies e abundante na matriz extracelular da pele humana e na interface de fibras de colágeno e elastina (Figura 1) (PRICE et al., 2007). Em sua origem sintética, o AH pode ser extraído de certos tecidos de animais como da

crista do galo, e ou produzidos por fermentação bacteriana, onde este último apresenta um menor risco de hipersensibilidade (LIMA et al., 2016).

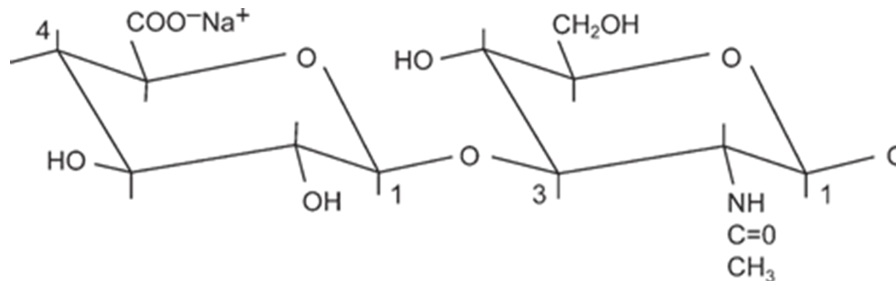


Figura 1. Estrutura Química Polissacarídeo do Ácido Hialurônico
Fonte: Tezel et al. (2008)

No pH fisiológico, o AH liga-se extensivamente à água produzindo um gel (Figura 2) e desta forma proporcionando “volume” nos tecidos. Na presença de água, as cadeias de AH podem expandir em volume até 1000 vezes e formar matrizes imensamente hidratadas (NUSGENS, 2010; REDBORD et al., 2011). Assim, o AH é considerado altamente solúvel em água, uma vez que adsorve água e se comporta como um lubrificante, o que lhe confere propriedades higroscópicas e homeostáticas. Isso, pode ser benéfico em algumas indicações, como por exemplo nas cirurgias ortopédicas, onde uma maior lubrificação é necessária; porém, é imprescindível uma maior estabilidade estrutural do AH para engenharia de tecidos e reestruturação tecidual. A viscosidade do gel produzido parece ser dependente de uma série de propriedades, incluindo o comprimento das cadeias (incluindo, o grau de emaranhamento), reticulação, pH e modificação química.

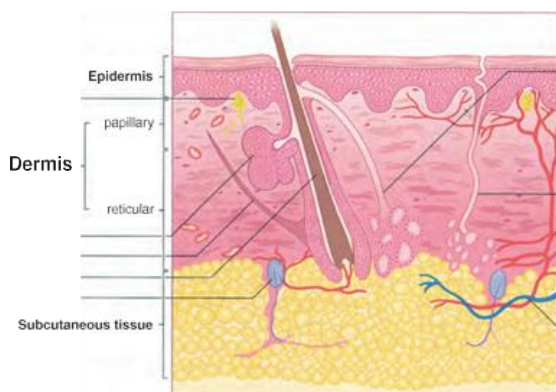


Figura 2. Camadas e estrutura da pele
Fonte: Kolarsick et al (2011)

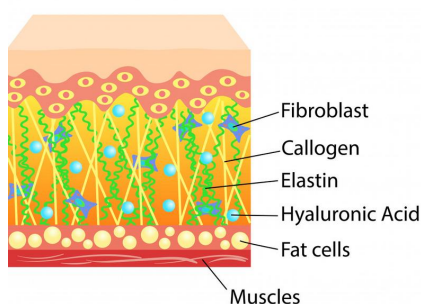


Figura 3. Fibras de colágeno, Ácido Hialurônico e Elastina
 Fonte: <https://epidermolysisbullosanews.com>

O AH pode ser modificado por reticulação química (crosslinked) entre os filamentos de AH, o que aumenta a firmeza do produto, tornando-o mais resistente ao estresse, e à degradação enzimática in vivo, resultando em maior duração do efeito preenchedor. A matéria-prima na produção de géis a base de AH para uso estético consiste em cadeias com diferenciações em seus pesos moleculares, que pode variar de 600 kDa a mais de 2.500 kDa. Desta forma, as propriedades físicas e farmacológicas dos géis a base de AH diferem por sua propriedade tecnológica de crosslinking (PATRICK et al., 2016).

O processo de ligação cruzada, intitulado crosslinked, correlaciona as cadeias lineares de AH, transformando-os em uma rede tridimensional (SUNDARAM et al., 2015). Assim, o grau de crosslink indica a porcentagem de unidades de monômero de AH que estão interligados por uma molécula de crosslinked. Quando todos os outros parâmetros de um AH são iguais, o maior grau de crosslinked, aumenta a dureza do produto (TEZEL et al., 2008). O objetivo do crosslinked é prolongar o tempo de retenção de AH in vivo. O AH com maior modificação é o que apresentará maior resistência, resultando em um tempo de retenção mais longo. Se esta dureza aumentar, também aumentará a dificuldade do AH de ser injetado (CHANG et al., 2019) o que pode afetar as propriedades físicas dos preenchedores a base de AH. Desta forma, o crosslinked é a base para a força mecânica do gel e melhora da longevidade do produto; mas, também constitui uma variável que pode afetar as propriedades físicas (reológicas) dos preenchedores a base de AH, assim como a concentração do polímero (AH).

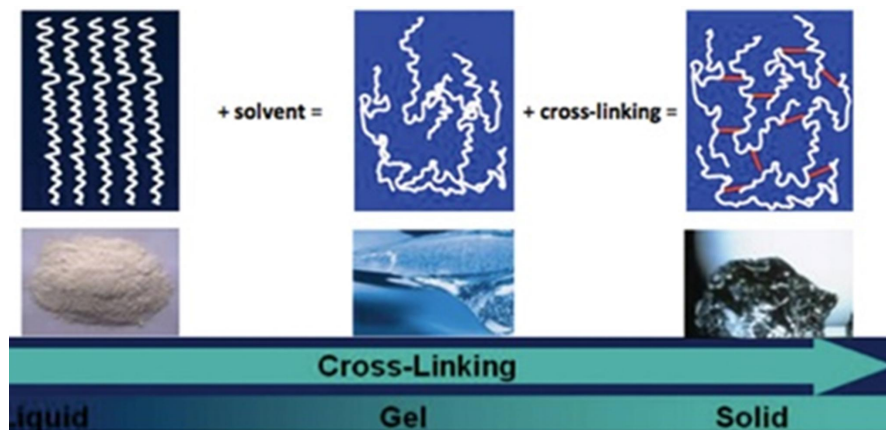


Figura 4. Processo de Crosslinking do AH
 Fonte: Ohrlund et al. (2015)

Dentro das propriedades físicas dos preenchedores a base de AH podemos mencionar: o tamanho e concentração das partículas de AH por mililitro, a resistência do AH a degradação (longevidade) e a dureza do gel ou propriedades reológicas (capacidade do gel de AH de se deformar após passagem por agulhas ou cânulas e como retorna imediatamente ao seu estado original) medido pela energia armazenada no gel, quando uma tensão é aplicada. Os preenchedores a base de AH apresentam 3 propriedades reológicas: viscosidade, elasticidade e coesividade; propriedade determinantes da sua resistência à deformação durante tensões mecânicas. A viscosidade e a elasticidade estão relacionadas à resistência à deformação no plano horizontal, enquanto a coesividade define a resistência no plano vertical (BILLON et al., 2017). Segundo Mendieta e col. (2008), os preenchedores a base de AH são classificados como viscoelásticos, devido a que apresentam um desempenho de um modo viscoso (deformação irreversível) e elástico (deformação reversível no qual ocorrerá a recuperação do material após a remoção da força aplicada), ou seja, eles dissipam e armazenam a energia requerida para a deformação o que permitiria que estes preenchedores recuperem seu estado original após implantação.

A avaliação das propriedades físicas de um material viscoelástico como os preenchedores a base de AH é de extrema importância, uma vez que estas propriedades divergem nos diversos tipos de preenchedores a base de AH disponíveis no mercado e devido a que direcionam as indicações clínicas para cada

tipo gel. Estas propriedades podem ser medidas e avaliadas mediante a reometria. Dentro destas propriedades podemos mencionar:

- Módulo de armazenamento ou de elasticidade (G') descreve o armazenamento e liberação de energia durante um ciclo de estresse, isto é, à sua capacidade de resistir à deformação. Caracteriza a capacidade de se recuperar à sua forma original quando agido por forças dinâmicas;
- Módulo de perda ou de viscosidade (G'') corresponde à energia dissipada por atrito durante um ciclo de estresse; caracteriza a resistência a forças dinâmicas:
 - G'' mais alto - o gel de AH é mais grosso, exigindo maior força para extrusão através de uma agulha,
 - G'' mais baixo - o gel de AH requer menos força para extrusão através de uma agulha;
- Elasticidade ($\tan \delta$) caracteriza as proporções relativas de módulo elástico ao viscoso (G''/G'), é o parâmetro que fornece informações valiosas adicionais sobre as propriedades viscosas do gel, que permite avaliar, por exemplo, a integração tecidual do implante.
- Módulo complexo (G^*) é energia armazenada e devolvida após a imposição de tensão, que também é definida como a soma do módulo elástico G' e o módulo viscoso G'' e δ o ângulo de fase, normalmente calculado como $\tan \delta = G'' / G'$;
- Coesividade: é a capacidade do gel de manter-se junto e a sua forma mesmo sob condições de estresse;

Assim mesmo, o comportamento elástico ou viscoso dos preenchedores a base de AH depende também da concentração e do peso molecular do polímero e na frequência usada durante estas medidas (Figura 2). Em baixas frequências, que correspondem a forças com longa duração agindo no material, o comportamento viscoso domina. Em altas frequências, correspondendo a forças de curta duração, o comportamento elástico domina. Isso significa que as forças de longa duração fazem a solução deformar permanentemente, e forças de ação curta, como extrusão do produto por uma agulha ou cânula, dão origem a deformações que podem se recuperar parcialmente. Geralmente, à medida que G' (ou viscosidade linear) aumenta, dificulta a extrusão do AH. Conseqüentemente, torna-se necessário adicionar quantidades variadas de AH sem ou com baixa quantidade de crosslinked, facilitando a lubrificação do gel, na hora da extrusão, porém diminuindo a

coesividade dos produtos. Portanto, os produtos com um G' mais alto são menos coesos quando existe uma maior quantidade de AH livre ou com baixa quantidade de crosslinked (EDSMAN et al., 2012).

Por outro lado, é relevante ponderar outras variáveis que podem alterar as propriedades físicas dos preenchedores a base de AH durante o processo de implantação, o qual é comumente realizado com seringas, agulhas e cânulas. Nesse sentido, não seria errado hipotetizar que o calibre da agulha, tamanho da seringa e/ou cânula e a força e a técnica de injeção poderiam modificar a forma como o material flui durante a sua implantação, influenciando diretamente nas suas propriedades reológicas (viscosidade e elasticidade) (SUNDARAM et al., 2010). O processo de extrusão pela agulha ou cânula, impõe alta tensão de cisalhamento ao AH, que assume o comportamento de um fluido majoritariamente viscoso à medida que flui para fora do dispositivo de aplicação. Entretanto, uma vez implantado no tecido facial, onde é exposto a baixas forças de cisalhamento inerentes do tecido mole, o material exibe um comportamento elástico, capaz de recuperar sua forma original. Segundo Costa et al. (2013), um preenchedor possui uma boa reologia quando após sua passagem por uma agulha ou cânula se mantém intacto e suas propriedades reológicas inalteradas.

Embora, a literatura recomende a utilização de agulhas de pequeno calibre (27G – 30G), para reduzir o desenvolvimento de hematomas, sangramentos, dor, edema e intercorrências após o procedimento de preenchimento; o gel de AH utilizado deve possuir partículas de dimensões adequadas para passar por agulhas finas utilizando uma força de extrusão aceitável. No entanto, a maioria das partículas dos preenchedores a base de AH são maiores do que o diâmetro interno das agulhas e cânulas utilizadas corriqueiramente na prática clínica, sugerindo a hipótese de que as propriedades físicas dessas partículas mudam à medida que o gel passa pela agulha, principalmente em preenchedores a base de AH com partículas maiores e maior crosslinking (LEE et al., 2020); devido à necessidade de aplicar uma maior força no momento da extrusão do material preenchedor. A bula da grande maioria de preenchedores a base de AH com alto crosslinking disponíveis no mercado, preconiza também a utilização de agulhas de 27G e 30G para a implantação deste tipo de AH, porém no estudo de Lee et al. (2020), os autores observaram mudanças no tamanho das partículas e das propriedades físicas do gel a base de AH com alto crosslinked após passagem por agulhas de 30G. Os autores

assumiram que as mudanças nos parâmetros físicos que determinam as propriedades reológicas do preenchimento a base de AH, como o tamanho de partícula e a quantidade de crosslinked, podem causar desvios no desempenho clínico deste material. Da mesma forma, no estudo de Frank et al. (2021), os autores testaram a passagem de gels de AH com alto crosslinked por agulhas de 27G e 30G e reportaram uma mudança significativa negativa nas propriedades reológicas destes gels. Os autores recomendam o uso de agulhas de 27G para preenchedores a base de AH com alto crosslinked.

A literatura tem recomendado o uso de cânulas em vez de agulhas nos procedimentos de preenchimento, para minimizar possíveis perfurações vasculares evitando desta forma intercorrências severas após o procedimento de preenchimento com AH (ROGERIO et al., 2021). Cânulas são instrumentos com uma ponta cega, o que significa arredondado, sem corte, e devem ser a primeira escolha em áreas e/ou situações em que as propriedades de corte da agulha podem causar um maior dano tecidual (BRAVO et al., 2021). Não obstante o uso de uma cânula pode ser considerado mais seguro do que usar uma agulha, a segurança absoluta não pode ser garantida em injeções utilizando cânulas mesmo em injetores experientes, pois depende do calibre da cânula (cânulas maiores são recomendadas) (BELEZNAY et al., 2015). Da mesma forma que com as agulhas, a bula dos preenchedores a base de AH com alto crosslinked disponíveis no mercado, recomendam o uso de cânulas mais finas, porém com o diâmetro suficiente para não se assemelhar a uma agulha. Nesse sentido, diversos calibres de cânulas têm sido recomendados, abrangendo desde cânulas de 30G até 27G, sendo os calibres de 27G e 25G os mais recomendados pelas marcas comerciais. Porém, não existem estudos avaliando a influência do calibre das cânulas, nas propriedades reológicas de AH com alto crosslinked. Desta forma, existe uma necessidade de avaliar a presença dessas alterações reológicas do AH após passagem por diferentes calibres de cânulas, uma vez que estas alterações poderão comprometer os resultados clínicos esperados assim como a segurança do material injetado.

Sendo assim, o objetivo do presente trabalho laboratorial foi avaliar as propriedades reológicas de preenchedores a base de AH com alto crosslinked após passagem por cânulas de diferentes calibres.

2 ARTIGO

2 ARTIGO

O artigo apresentado foi formatado para submissão de acordo com as normas da revista "*Plastic and Reconstructive Surgery*"

"Does cannula's size alter rheological properties of hyaluronic acid filler?"

Andrea L **Sisnando**, DDS¹; Vasudev V. **Nayak**, PhD^{2,3}; Mariana B **Câmara-Sousa**, DDS, MSc, PhD¹; Omar **Morphy**, DDS¹; Gisele RD **Furtado**, DDS, MSc¹; Célia M **Rizzatti-Barbosa**, DDS, MSc, PhD¹; Giancarlo **De la Torre Canales**, DDS, MSc, PhD^{1,4}

1. Ingá University Center, Uningá, Paraná, Brazil
2. Department of Mechanical and Aerospace Engineering, New York University, Tandon School of Engineering, Brooklyn, New York, USA
3. Biomaterials Division – Department of Molecular Pathobiology, New York University College of Dentistry, New York, New York, USA
4. Clinical Research Unit (CRU) – Centro de Investigação Interdisciplinária Egas Moniz (CiiEM), Egas Moniz, Cooperativa de Ensino Superior, CRL, Caparica, Portugal

Corresponding author:

Giancarlo De la Torre Canales, DDS, MSc, PhD

Interdisciplinar Investigation Center Egas Moniz, University Institute Egas Moniz
Quinta da Granja, 2829-511 Monte de Caparica - Caparica - Portugal

E-mail: giank_28@hotmail.com; Instagram: [@drgian_delatorre](https://www.instagram.com/drgian_delatorre)

Financial Disclosure Statement: The authors have the following to disclose:

The authors declare that no conflict or financial interests exist.

Presented at (if applicable):

The presented study was not presented in any scientific event.

Short Running Head (no more than 40 characters in length):

Cannulas alter hyaluronic acid features

Abstract

This study aimed to assess alterations in rheological properties of different commercial Hyaluronic Acid (HA) gels after passage through cannulas of different size (22G – 25G). Five commercial brands of HA fillers with high crosslinking were analyzed: Rennova Ultra Deep®, Restylane Lyft®, Ultra Lift – Hialurox®, Belotero Volume® and E.P.T.Q. 500®. Five syringes of each commercial brand were required to measure all variables. The rheological characterization of the 5 HA fillers assessed, was performed using an automated controlled stress rheometer. Fillers were placed on the plate of the rheometer and analyzed before and after passage through cannulas of 22-G and 25-G. The rheological analyses were performed three times for each filler brand and for each cannula size by a researcher blinded to the commercial brands and not involved in any other part of the study. The data processing was performed with TRIOS software. For data analysis, the frequencies of 0.1 and 2 Hz were used. Results showed an increase in G' and G'' as the frequency was increased. At higher strains, differences in behavior between groups were observed with fillers A, B, C, and E, exhibiting a cross over between G' and G'' , whereas filler D showed no such distinct cross over. Fillers passed through 25G cannula exhibited the same characteristics. Additionally, groups B, C, D, and E irrespective of the size of the cannula, showed no cross over with relatively constant G' and G'' throughout the frequency range of the experiment. At physiologically relevant settings (0.1 Hz to 2 Hz) cannulas size seem not alter the rheological properties of high crosslink HA fillers.

Keywords: Hyaluronic acid. Crosslink. Fillers.

INTRODUCTION

Hyaluronic acid (HA) is a naturally non-sulfated high molecular weight glycosaminoglycan that is composed of repeating polymeric disaccharides of D-glucuronic acid and N-acetyl-D-glucosamine linked via a β (1,4)-glycosidic bond^{1,2}. HA can be found in the adult human body and can be identified in the skin, where it plays an important role providing constant moisture to the skin through its ability to bind considerable amounts of water. With aging, there is an increase in the degradation and a decrease in the synthesis of HA, resulting in the loss of elasticity and flexibility, leading to the formation of wrinkles and dehydration^{3,4}. Due to its unique biosafety properties, such as biodegradability, biocompatibility, nontoxicity, bioresorption and nonimmunogenicity, the use of injectable HA fillers has become a standard treatment procedure for aesthetic facial rejuvenation^{5,6}. In addition, according to the International Society of Aesthetic Plastic Surgery (ISAPS) survey, the number of aesthetic procedures using HA injectables has increased 20.0% from

2016 to 2020⁷. Consequently, a wide range of products has also been greatly created through innovative gel manufacturing technologies⁸.

Even though HA fillers products can share the same indications, they present very different rheologic and physicochemical properties^{9,8}. The amount of HA, the size of the particles and the use of different cross-linking processes (used to prolong the degradation time of HA fillers in vivo)^{10,11}, have been pointed out to significantly affect the properties of HA gels that contribute to the esthetic outcomes¹². In addition, these properties differentiate HA gels functionally and guide clinicians' selection of the proper product for an specific clinical need. However, even though the most suitable HA gel is used for a particular region of the face, the diameter of the needle or cannula used to inject the gel, could alter its rheologic and physicochemical properties¹³. Studies have not reported a consensus about the recommended size of the needles for HA gels injections since they could diminish and increase specific complications from this procedure¹⁴. Nevertheless, previous published data about HA gel particle size confirmed that the gel particle sizes are larger than needle sizes¹⁵. In addition, rheological studies have demonstrated changes in gel particle size, extrusion forces and physical properties after passing the gels through the small-bore needles (27G – 30G)^{16,13,17}.

Considering that recent literature has recommended the use of cannulas instead of needles in filling procedures, to minimize possible vascular perforations, thus avoiding severe complications after the HA filling procedure^{18,19}, it would be expected that rheological properties of HA gels could also be altered after passing specially through smaller size cannulas. Notwithstanding, no previous study has measured potential changes in rheological properties that may occur after a HA gel passes through a small-diameter cannula. Therefore, this study aimed to assess if the rheological properties of different commercial HA gels change after passage through cannulas of different size (22G – 25G).

METHODS

Materials

A total of 5 commercial brands of HA fillers with high crosslinking were analyzed. In order to blind the rheological properties assessments, the commercial labels of the fillers were removed, and each filler was identified by a different color

and number as follows (Figure 1): a-blue) Rennova Ultra Deep® (Panaxia LTD Bat Sheva 1, Israel); b-yellow) Restylane Lyft® (Q-Med AB/Galderma, Uppsala, Sweden); c-green) Ultra Lift – Hialurox® (Termofrio Ltda, São Carlos, Brazil); d-red) Belotero Volume® (ANTEIS S.A. Genebra, Switzerland), e-orange) E.P.T.Q. 500® (JETEMA Co., Ltd., Seoul, Korea). Five syringes of each commercial brand were required to measure all variables. No financial support was received from any of the HA fillers commercial brands included in the study.

Rheological Test

The rheological characterization of the 5 HA fillers assessed, was performed using an automated controlled stress rheometer (TA-Instruments AR-1500ex, New Castle, NE, USA) equipped with a parallel plate geometry (diameter of 40 mm; gap 500 μm) at a temperature of 25°C²⁰. The experiments were performed within the linear viscoelastic range. The elastic (G') and viscous (G'') moduli and the proportion of elastic to viscous moduli ($\tan \delta$) were determined using the following parameters: amplitude sweep of 0.01 to 1000% with a fixed frequency of 1 Hz, and frequency sweep range of 0.1 to 5 Hz. Each filler was placed on the plate of the rheometer and analyzed before and after passage through cannulas of 22-G and 25-G. The rheological analyses were performed three times for each HA commercial brand for each cannula size by a researcher blinded to the commercial brands and not involved in any other part of the study. The data processing was performed with TRIOS software (TA-Instruments, New Castle, NE, USA). For data analysis, the frequencies of 0.1, 0.5 and 2 Hz were used, since it has been suggested that these frequencies are physiologically relevant for skin and facial indications^{21,22,23,24}.

RESULTS

Data at physiologically relevant settings (0.1 Hz to 2 Hz), showed an increase in G' and G'' as the frequency was increased (Figures 1 and 2). To summarize, oscillatory amplitude measurements of fillers passed through the 22G cannula indicated identical behavior at lower oscillation strains (< 10%) where the storage modulus was observed to dominate over the loss modulus (Figure 3). At higher strains (>10%), differences in behavior between groups were observed with fillers A, B, C, and E, exhibiting a cross over between G' and G'' , whereas filler D showed no

such distinct cross over. Fillers passed through 25G cannula exhibited the same characteristics (Figure 4).

Oscillatory frequency measurements of fillers passed through both the cannula sizes exhibit similar behavior (Figures 5 and 6). Filler A exhibits a dominant storage modulus, increasing with an increase in angular frequency. More importantly, a cross over exists at an angular frequency of 10 rad/sec, above which loss modulus is seen to dominate for the duration of the experiment. All other groups, irrespective of the size of the cannula, showed no such cross over with relatively constant G' and G'' throughout the frequency range of the experiment. Complex moduli of all groups passed through both cannula sizes were seen to reduce corresponding to an increase in angular frequency.

Figure 1

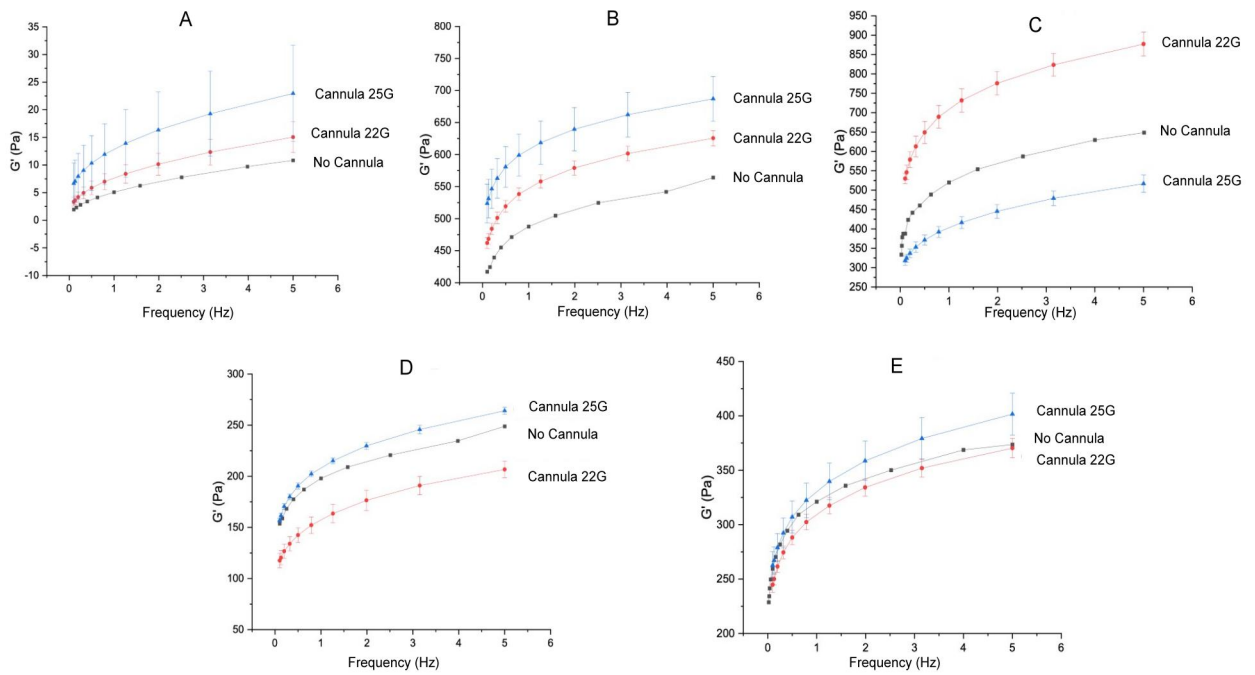


Figure 1. G' graphs of the samples analyzed before and after passing through cannulas 22G and 25G.

Figure 2

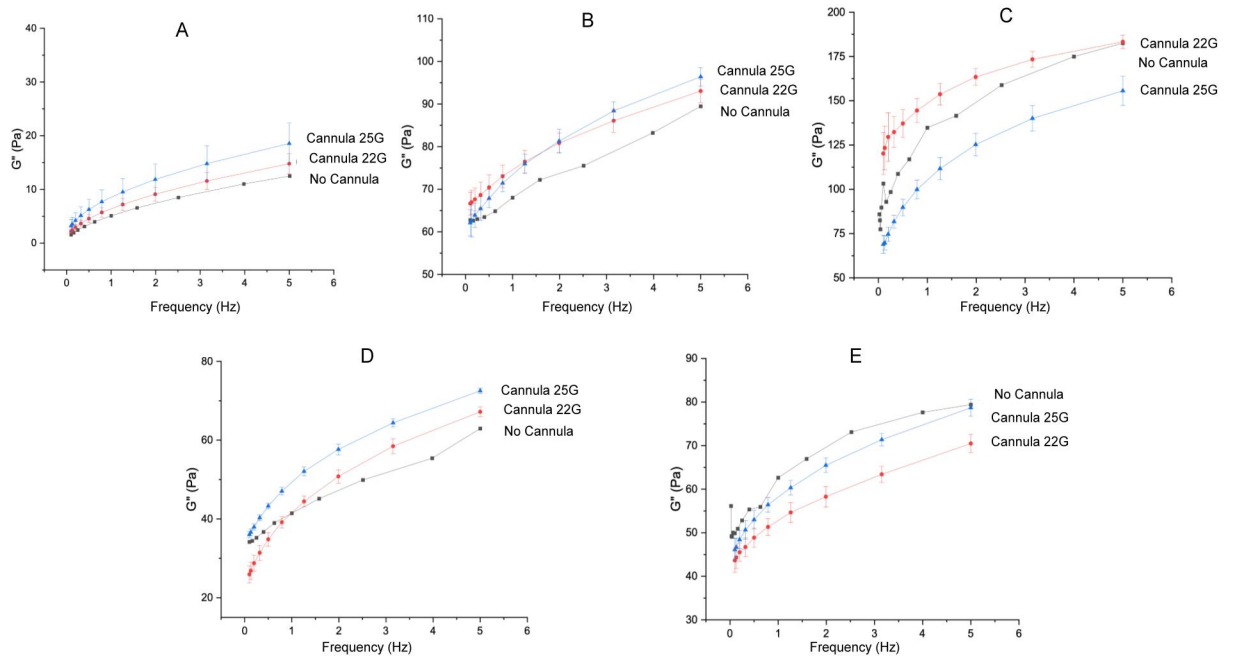


Figure 2. G'' graphs of the samples analyzed before and after passing through cannulas 22G and 25G.

Figure 3

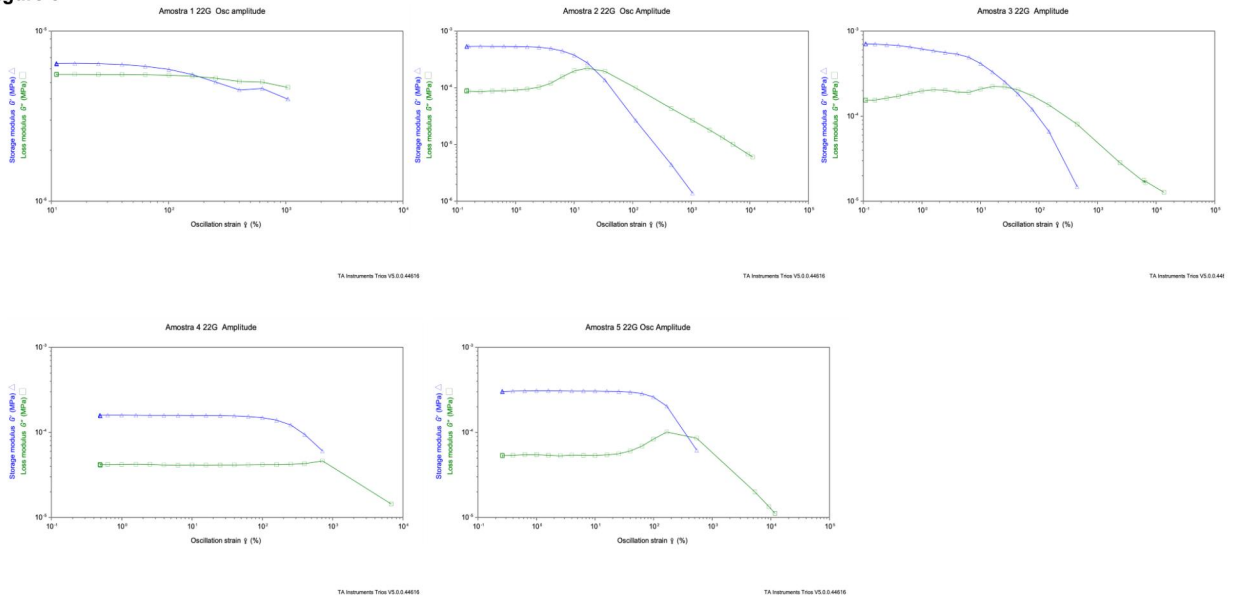


Figure 3. Oscillatory amplitude measurements of fillers passed through cannula 22G

Figure 4

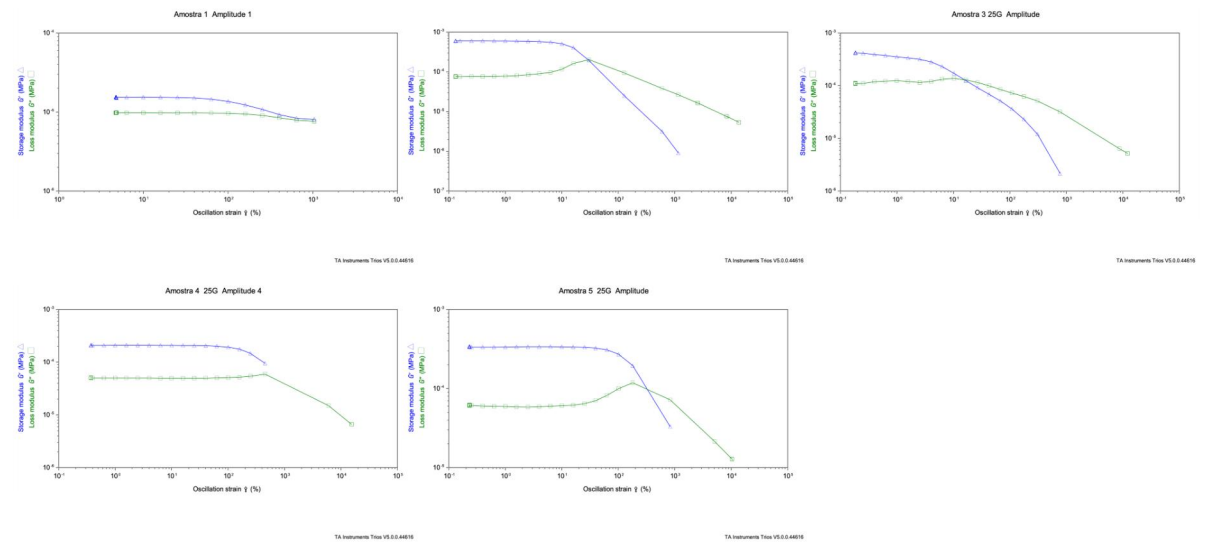


Figure 4. Oscillatory amplitude measurements of fillers passed through cannula 22G

Figure 5

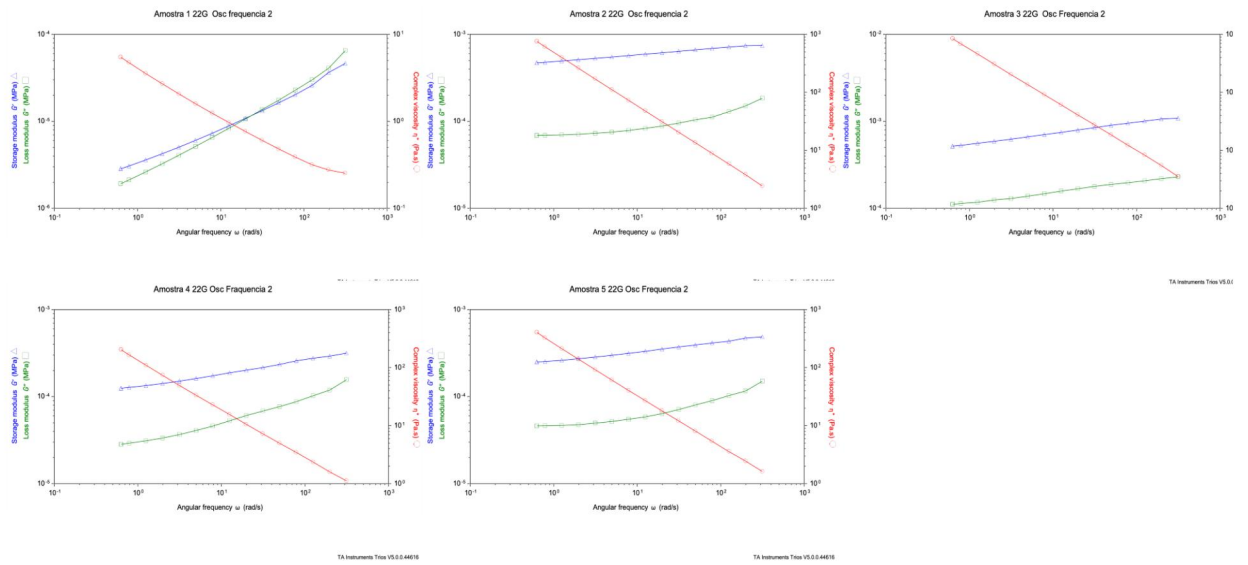


Figure 5. Oscillatory frequency measurements of fillers passed through cannula 22G

Figure 6

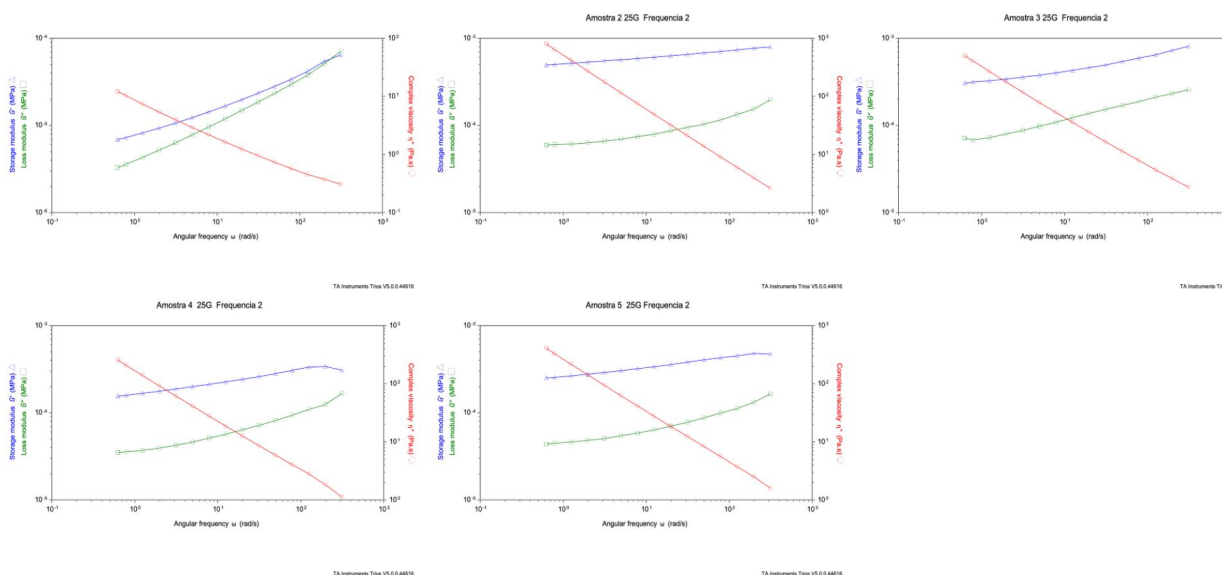


Figure 6. Oscillatory frequency measurements of fillers passed through cannula 25G

DISCUSSION

Injectable HA fillers have become the gold standard for aesthetic facial rejuvenation. This has led to research and development of a wide range of products aimed at improving the treatment of such conditions¹³. However, this variety has caused a paucity in data pertaining to the rheological behavior of the fillers and their comparison under the same testing conditions. This study aimed at analyzing the rheological behavior of 5 such commercially available fillers after passage through small diameter cannulas.

In the process of rheological characterization of a viscoelastic material, the relationship between its mechanical properties and strain rate have been well established – with the overall modulus of the system expected to increase with an increase in strain rate/rate of loading²⁵. The materials presented in this study were seen to behave similarly due to the apparent increase in G' and G'' with an increase in both strain amplitude applied in unit time, and frequency.

Measuring the strain amplitude dependence of G' and G'' has been noted in literature to be a preferred first step in characterizing such viscoelastic behavior²⁷. It is expected that a strain sweep test would establish the extent of the linearity of the material under a load. In this study, the strain sweep measurements indicated a

linear behavior upto 10% strain irrespective of the cannula size used. The rheological properties of a viscoelastic material were seen to be independent of strain up to this critical value of 10%. Beyond the critical strain, the material's behavior was observed to be non-linear. This was seen as a decline in the storage modulus. Below 10% strain, the structure was intact, and the material behaved like a solid indicating that the material is highly structured, with $G' > G''$. Increasing the strain above the critical strain was seen to have disrupted this network structure for the duration of the experiment in fillers A, B, C and E, indicating more fluid like behavior at high strain rates ($G'' > G'$). Group D, however, did present a decrease in G' , but did not exhibit a cross over between G' and G'' hinting towards only a partial disruption of the structure even at high strain amplitudes. This could be attributed to its particle size and different molecular weight.

In a frequency sweep, measurements are generally made over a range of oscillation frequencies at a constant oscillation amplitude and temperature⁶. Below the critical strain, the elastic modulus G' is nearly independent of frequency, due to behavior like a structured or solid-like material. On the contrary, if the frequency dependence of storage modulus is greater, the material is more fluid-like. In the case of the 5 fillers presented in this study, fillers B, C, D and E presented more solid-like behavior with G' being maintained relatively constant over the range of applied frequencies. G' of filler A on the other hand, exhibited a change of one order of magnitude between the start and end of the experiment highlighting predominantly fluid-like behavior.

While the experiments highlight critical aspects of rheological behavior of the fillers, it is vital to identify a particular filler that remains solid-like after passing through cannulas for volumize the tissues undergoing the treatment²⁶. The 5 high crosslink fillers used in this study do present such desirable solid-like, volumizing behavior. However, for a majority of fillers, this was seen to be true only at low frequencies/strain amplitudes. filler D presented predominantly solid-like behavior even at high frequencies and strain amplitudes without completely losing its structure indicating its ability to be pushed out of a cannula at a variety of physiologically relevant frequencies²⁷. It is expected from rheological evaluation that filler D has the potential to withstand its shape after extrusion, but this would have to be confirmed with extensive follow-up studies.

Even though our results could not be extrapolated entirely to the clinical practice, some clinical considerations could be done. As all the HA fillers assessed in the present study were of high crosslink, it is expected that they behave as a solid filler after a stress in order to volumize and restructure some regions of the face, which are the main indications of these types of fillers. Therefore, the rheological properties of most of the assessed fillers indicated identical behavior at lower oscillation strains (physiological strains) after passing through both cannulas, maintaining their solid behavior. Also, it is important to consider the use of cannulas instead of needles for these indications, since it was demonstrated that high crosslinked HA fillers loss their rheological properties after passing through small needles size (27G-30G)^{10,22}.

CONCLUSION

Based on our findings, it can be concluded that at physiologically relevant settings for face tissues, the cannulas size seems not alter the rheological properties of high crosslink HA fillers.

REFERÊNCIAS

1. Kenne L et al. Modification and cross-linking parameters in hyaluronic acid hydrogels - Definitions and analytical methods. *Carbohydrate polymers*, v. 91, n. 1, p. 410-418, 2013.
2. Öhrlund JA, Kulichikhin, VG. The myth of the “biphasic” hyaluronic acid filler. *Dermatol. Surg.* 2015, 41, S358-S364.
3. Beasley KL, Weiss MA, Weiss A. Hyaluronic acid fillers: a comprehensive review. *Facial Plastic Surgery*, v. 25, n. 02, p. 086-094, 2009.
4. Lee DY, Cheon C, Son S, Kim Y, Kim J. Influence of Molecular Weight on Swelling and Elastic Modulus of Hyaluronic Acid Dermal Fillers Influence of Molecular Weight on Swelling and Elastic Modulus of Hyaluronic Acid Dermal Fillers. *Polymer* 2015, 39, 976-980.
5. LIN, Yuan; PHAN-THIEN, Nhan; CHEONG KHOO, Boo. Normal stress differences behavior of polymeric particle suspension in shear flow. *Journal of Rheology*, v. 58, n. 1, p. 223-235, 2014.
6. Michaud T. Rheology of hyaluronic acid and dynamic facial rejuvenation: topographical specificities. *Journal of cosmetic dermatology*, v. 17, n. 5, p. 736-743, 2018.
7. Faivre J et al. Advanced Concepts in Rheology for the Evaluation of Hyaluronic Acid–Based Soft Tissue Fillers. *Dermatologic Surgery*, v. 47, n. 5, p. e159, 2021.

8. International Society of Aesthetic Plastic Surgery. ISAPS international survey on aesthetic /Cosmetic procedures performed in 2020 [Internet]. Available from: https://www.isaps.org/wp-content/uploads/2022/01/ISAPS-Global-Survey_2020.pdf.
9. Fagien S, Bertucci V, Von Grote E, Mashburn JH. Rheologic and Physicochemical Properties Used to Differentiate Injectable Hyaluronic Acid Filler Products. *Plast Reconstr Surg*. 2019 Apr; 143(4):707e-720e. doi: 10.1097/PRS.0000000000005429. PMID: 30921116; PMCID: PMC7597953.
10. Frank, Konstantin et al. Influence of Rheological Properties and Needle Size on Extrusion Forces of Hyaluronic Acid Based Soft Tissue Fillers. *Journal of Drugs in Dermatology: JDD*, v. 20, n. 5, p. 498-502, 2021.
11. Michelels P, Sarazin D, Tran C, Salomon D. Effect of different crosslinking technologies on hyaluronic acid behavior: A visual and microscopic study of seven hyaluronic acid gels. *J Drugs Dermatol*. 15: 600-606. 2016.
12. Tang S. et al. Fabrication and characterization of porous hyaluronic acid-collagen composite scaffolds. *Journal of Biomedical Materials Research Part A: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials*, v. 82, n. 2, p. 323-335, 2007.
13. Xu X et al. Hyaluronic acid-based hydrogels: from a natural polysaccharide to complex networks. *Soft Matter*, v. 8, n. 12, p. 3280-3294, 2012.
14. Choi MS. Basic rheology of dermal filler. *Arch Plast Surg*. 2020 Jul;47(4):301-304. doi: 10.5999/aps.2020.00731. Epub 2020 Jul 15. PMID: 32718107; PMCID: PMC7398800.
15. Lee, W et al. Soft tissue filler properties can be altered by a small-diameter needle. *Dermatologic Surgery*, v. 46, n. 9, p. 1155-1162, 2020.
16. Lazzeri D, Agostini T, Figus M, Nardi M, et al. Blindness following cosmetic injections of the face. *Plast Reconstr Surg* 2012; 129:995-1012.
17. Lee W, Hwang SG, Oh W, Kim CY et al. Practical guidelines for hyaluronic acid soft-tissue filler use in facia rejuvenation. *Dermatol Surg*, 2019
18. Pavicic T, Mohmand HM, Yankova M, Schenck TL, Frank K, Freytag DL, Green JB, Hamade H, Cassuto D, Cotofana S. Influence of needle size and injection angle on the distribution pattern of facial soft tissue fillers. *J Cosmet Dermatol*. 2019 Jul 8. doi: 10.1111/jocd.13066. Epub ahead of print. PMID: 31282607..
19. Frank K, Schenck TL, Gavril D, Swift A, Liew S, Freytag DL, Kaiser A, Green JB, Beleznyay K, Cotofana S. Influence of Rheological Properties and Needle Size on Extrusion Forces of Hyaluronic Acid Based Soft Tissue Fillers. *J Drugs Dermatol*. 2021 May 1;20(5):498-502. doi: 10.36849/JDD.5237. PMID: 33938685.
20. Beleznyay K, Carruthers JD, Humphrey S, Jones D. Avoiding and treating blindness from fillers: a review of the world literature. *Dermatol Surg* 2015; 41:1097-117.
21. ROGERIO, Victor et al. Features to consider for mimicing tissues in orofacial aesthetics with optimal balance technology and non-animal stabilized hyaluronic acid (Restylane®): The MIMT concept. *Journal of Stomatology, Oral and Maxillofacial Surgery*, 2021.
22. RASPALDO, Hervé. Volumizing effect of a new hyaluronic acid sub-dermal facial filler: a retrospective analysis based on 102 cases. *Journal of Cosmetic and Laser Therapy*, v. 10, n. 3, p. 134-142, 2008.
23. Lorenc ZP, Öhrlund Å, Edsman K. Factors Affecting the Rheological Measurement of Hyaluronic Acid Gel Fillers. *J Drugs Dermatol*. 2017 Sep 1;16(9):876-882. PMID: 28915282.

24. Sundaram H, Voigts B, Beer K, Meland M. Comparison of the rheological properties of viscosity and elasticity in two categories of soft tissue fillers: calcium hydroxylapatite and hyaluronic acid. *Dermatol Surg*. 2010;36(Suppl 3):1859-1865.
25. Sundaram H, Cassuto D. Biophysical characteristics of hyaluronic acid soft-tissue fillers and their relevance to aesthetic applications. *Plast Reconstr Surg*. 2013;132(4 Suppl 2):5S-21S.
26. Ascher B, Rzany B, Sundaram H. (Chairs). *Fillers: From characteristics to recommendations*. Consensus panel discussion. Consensus panel discussion at: International Master Course on Aging Skin 2013 Annual Meeting; January 31, February 3, 2013; Paris, France.
27. Lorenc ZP, Öhrlund Å, Edsman K. Factors Affecting the Rheological Measurement of Hyaluronic Acid Gel Fillers. *J Drugs Dermatol*. 2017 Sep 1;16(9):876-882. PMID: 28915282.
28. Paul AJ, Penelope CG, Soren Hvidt. Basic Rheology for biologists. *Methods in Cell Biology, Academic Press*, v. 83, 2007, p. 1-27. ISSN 0091-679X. ISBN 9780123705006. [https://doi.org/10.1016/S0091-679X\(07\)83001-9](https://doi.org/10.1016/S0091-679X(07)83001-9).
29. Bergström J. Linear viscoelasticity. *Mechanics of solid polymers. William Andrew Publishing*, 2015, p. 309-351. ISBN 9780323311502. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-31150-2.00006-6>.
30. Yuan Lin, Nhan Phan-Thien, Boo Cheong Khoo., "Normal stress differences behavior of polymeric particle suspension in shear flow", *Journal of Rheology* 58, 223-235 (2014) <https://doi.org/10.1122/1.4855496>.

3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados do nosso estudo são de extrema importância, uma vez que os preenchedores de AH oferecidos no mercado para uma indicação específica, parecem ser semelhantes; porém, as suas características físicas, reológicas e os métodos de fabricação não são. Desta forma, é necessário o conhecimento e entendimento das propriedades físicas e reológicas de cada preenchedor de AH, assim como a interação com os tecidos nos quais foram implantados.

Ademais, estudos avaliando as propriedades reológicas de diferentes marcas de AH possibilitam que os pesquisadores e clínicos entendam como este material reage sob estresse mecânico durante a aplicação ou após a implantação do produto, tanto a curto como a longo prazo. Conseqüentemente, a reologia pode ajudar os profissionais a selecionarem o produto adequado, seu plano de inserção e a indicação para cada região facial.

Finalmente, devemos mencionar que um preenchedor deve possuir propriedades reológicas apropriadas que determinem sua eficácia na aplicabilidade clínica. Eles devem apresentar viscosidade, sendo capazes de se deformar suficientemente no ato de ser injetado, quando submetido a um estresse, e elasticidade para recuperar sua forma original, após sua extrusão pela cânula. Portanto, um AH ideal deve ser viscoelástico. Desta forma, o nosso estudo proporciona informações importantes sobre quais marcas disponíveis no mercado apresentam preenchedores de alto crosslink com propriedades reológicas semelhantes às do preenchedor de AH ideal

4 RELEVÂNCIA E IMPACTO DO TRABALHO PARA SOCIEDADE

4 RELEVÂNCIA E IMPACTO DO TRABALHO PARA A SOCIEDADE

O presente trabalho esclarece o profissional injetor sobre as alterações reológicas que podem ocorrer em preenchedores a base de AH, após passagem por cânulas de diferentes calibres. Os nossos resultados, ajudarão ao clínico na tomada de decisão sobre qual produto e cânula deve ser utilizado para determinada área, diminuindo assim os riscos de intercorrências e o custo de tratamento com a otimização da quantidade utilizada dos preenchedores.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

ATTENELLO, Natalie Huang; MAAS, Corey S. Injectable fillers: review of material and properties. **Facial Plastic Surgery**, v. 31, n. 01, p. 029-034, 2015.

BELEZNAY, K, CARRUTHERS, J.D.; HUMPHREY, S.; JONES D. Avoiding and treating blindness from fillers: a review of the world literature. **Dermatol Surg** 2015; 41:1097–117

BILLON, R.; HERSANT, B.; MENINGAUD, J. P. Hyaluronic acid rheology: Basics and clinical applications in facial rejuvenation. In: **Annales de chirurgie plastique et esthetique**. 2017. p. 261-267.

BRAVO, Bruna Souza Felix et al. Supraperiosteal application of hyaluronic acid with cannula: Is it possible?. **Journal of Cosmetic Dermatology**, v. 20, n. 10, p. 3177-3180, 2021.

BRETAS, Rosário ES; D'ÁVILA, A. Marcos. **Reologia de polímeros fundidos**. São Carlos: Ed. UFSCAR-2000 196p, 2000.

CHANG, Liuyi; ZHANG, Jingliang; JIANG, Xiaolu. Comparative Properties of Hyaluronic Acid Hydrogel Cross-linked with 1, 4-Butanediol Diglycidyl Ether Assayed Using a Marine Hyaluronidase. In: **IOP Conference Series: Materials Science and Engineering**. IOP Publishing, 2019. p. 012007.

CORRÊA, N. et al. Avaliação do comportamento reológico de diferentes géis hidrofílicos. **Revista Brasileira De Ciências Farmacêuticas**, v. 41, n.1, p. 73-78, 2005.

COSTA, Adilson et al. Rheological characteristics of hyaluronic acid based dermal fillers before and after flowing through needles. **Surg Cosmet Dermatol**, v. 5, n. 1, p. 88-91, 2013.

EDSMAN, K., Nord, L.I., ÖHRLUND, Å., LÄRKNER, H.; KENNE, A.H. Gel properties of hyaluronic acid dermal fillers. **Dermatologic Surgery**, 2012, 38(7pt2), 1170-1179.

FRANK, Konstantin et al. Influence of Rheological Properties and Needle Size on Extrusion Forces of Hyaluronic Acid Based Soft Tissue Fillers. **Journal of Drugs in Dermatology: JDD**, v. 20, n. 5, p. 498-502, 2021.

ISAPS, International Society of Aesthetic Plastic Surgery. international survey on Aesthetic. **Cosmetic procedures performed in 2019** [Internet]. Available from: <https://www.isaps.org/wp-content/uploads/2020/12/Global-Survey-2019.pdf>

ISAPS, International Society of Aesthetic Plastic Surgery. ISAPS international survey on aesthetic. **Cosmetic procedures performed in 2020** [Internet]. Available from: https://www.isaps.org/wp-content/uploads/2022/01/ISAPS-Global-Survey_2020.pdf

KABLIK, Jeffrey et al. Comparative physical properties of hyaluronic acid dermal fillers. **Dermatologic Surgery**, v. 35, p. 302-312, 2009.

KOLARSICK, Paul AJ; KOLARSICK, Maria Ann; GOODWIN, Carolyn. Anatomy and physiology of the skin. **Journal of the Dermatology Nurses' Association**, v. 3, n. 4, p. 203-213, 2011.

LEE, Won et al. Soft tissue filler properties can be altered by a small-diameter needle. **Dermatologic Surgery**, v. 46, n. 9, p. 1155-1162, 2020.

LIMA, Camila Cantu; MACHADO, Aline Rafela da Silva Rodrigues; MARSON, Renan Fava. A utilização de implantes faciais a base de ácido hialurônico. **Revista Conexão Eletrônica**. Três Lagoas, MS, v. 13, p. 1-11, 2016.

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

MICHAUD, Thierry. Rheology of hyaluronic acid and dynamic facial rejuvenation: topographical specificities. **Journal of Cosmetic Dermatology**, v. 17, n. 5, p. 736-743, 2018.

MONHEIT, Gary D. Hyaluronic acid fillers: Hylaform and Captique. **Facial Plastic Surgery Clinics**, v. 15, n. 1, p. 77-84, 2007.

NUSGENS, B. V. Hyaluronic acid and extracellular matrix: a primitive molecule?. In: **Annales de Dermatologie et de Vénérologie**. 2010. p. S3-8.

ÖHRLUND, Åke. Factors affecting the rheological measurement of hyaluronic acid gel fillers. **Journal of Drugs in Dermatology**, v. 16, n. 9, p. 876-882, 2017.

PATRICK MICHEELS, M. D.; DIDIER SARAZIN, M. D.; CHRISTIAN TRAN, M. D. Effect of different crosslinking technologies on hyaluronic acid behavior: a visual and microscopic study of seven hyaluronic acid gels. **Journal of Drugs in Dermatology**, v. 15, n. 5, p. 600-606, 2016.

PRICE, R.D.; BERRY, M.G.; NAVSARIA, H.A; Hyaluronic acid: the scientific and clinical evidence. **J Plast Reconstr Aesthet Surg**. 2007;60(10):1110-9. doi: 10.1016/j.bjps.2007.03.005. Epub 2007 Apr 26. PMID: 17466613.

REDBORD, Kelley Pagliai; BUSSO, Mariano; HANKE, C. William. Soft-tissue augmentation with hyaluronic acid and calcium hydroxyl apatite fillers. **Dermatologic Therapy**, v. 24, n. 1, p. 71-81, 2011.

ROGERIO, Victor et al. Features to consider for mimicing tissues in orofacial aesthetics with optimal balance technology and non-animal stabilized hyaluronic acid (Restylane®): The MIMT concept. **Journal of Stomatology, Oral and Maxillofacial Surgery**, 2021.

SUNDARAM, Hema et al. Comparison of the rheological properties of viscosity and elasticity in two categories of soft tissue fillers: calcium hydroxylapatite and hyaluronic acid. **Dermatologic Surgery**, v. 36, p. 1859-1865, 2010.

SUNDARAM, Hema; CASSUTO, Daniel. Biophysical characteristics of hyaluronic acid soft-tissue fillers and their relevance to aesthetic applications. **Plastic And Reconstructive Surgery**, v. 132, n. 4S-2, p. 5S-21S, 2015.

TEZEL, Ahmet; FREDRICKSON, Glenn H. The science of hyaluronic acid dermal fillers. **Journal of Cosmetic and Laser Therapy**, v. 10, n. 1, p. 35-42, 2008.

VAN LOGHEM, Jani et al. Consensus on the Use of Hyaluronic Acid Fillers from the Cohesive Polydensified Matrix Range: Best Practice in Specific Facial Indications. Clinical, **Cosmetic and Investigational Dermatology**, v. 14, p. 1175, 2021.