

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE
PORTO ALEGRE – UFCSPA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIAS**

Gabriela Kaufmann

**Avaliação do potencial tecnológico
de hidrogéis de quitosana reticulados
com genipina na entrega oral de
fármacos**

UFCSPA
Universidade Federal de Ciências da Saúde
de Porto Alegre

**Porto Alegre
2022**

Gabriela Kaufmann

Avaliação do potencial tecnológico de hidrogéis de quitosana reticulados com genipina na entrega oral de fármacos

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biociências da Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre como requisito para a obtenção do grau de Mestre.

Orientador(a): Dra. Tanira Alessandra Silveira Aguirre
Coorientador(a): Dra. Márcia Inês Goettert

**Porto Alegre
2022**

Catálogo na Publicação

Kaufmann, Gabriela

Avaliação do potencial tecnológico de hidrogéis de quitosana reticulados com genipina na entrega oral de fármacos / Gabriela Kaufmann. -- 2022.

85 p. : il., graf., tab. ; 30 cm.

Dissertação (mestrado) -- Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Programa de Pós-Graduação em BioCiências, 2022.

Orientador(a): Tanira Alessandra Silveira Aguirre ;
coorientador(a): Márcia Inês Goettert.

1. Quitosana. 2. Genipina. 3. Reticulação de cadeias poliméricas. 4. Sistema de entrega controlado de fármacos. I. Título.

Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da UFCSPA com os dados
fornecidos pelo(a) autor(a).

INSTITUIÇÕES FINANCIADORAS

Este trabalho foi desenvolvido na Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (Laboratório de Imunoterapia e Central Analítica) em parceria com a Universidade do Vale do Taquari – Univates (Laboratórios de Biotecnologia e Química Geral). Contou com suporte financeiro de ambas as Instituições e do projeto 17/2551-0000 779-4 da FAPERGS.

AGRADECIMENTOS

Com muito carinho e gratidão encerro mais um ciclo, um sonho realizado. Sozinha não teria chegado a lugar algum, sempre tive apoio de pessoas especiais, as quais não poderia deixar de agradecer:

A minha família pelo apoio incondicional, pela paciência e por todo o amor. Em muitos momentos vocês foram essenciais nesta conquista, mesmo sem entender minhas práticas e formulações. Pai e mãe, mais uma vez vocês sonharam comigo, foram meu equilíbrio nestes três anos, amo vocês. Meu irmão Wagner e cunhada Grazielle, mesmo estando longe, sei que sempre estiveram comigo, amo vocês.

Ao meu noivo e companheiro de vida, Gabriel. Obrigada por estar sempre ao meu lado. Você mais uma vez me acompanhou, foi suporte e compreensivo. Em muitos momentos estive ausente, mas você sempre me incentivou a continuar. Eu te amo!

A minha orientadora, professora Tanira Alessandra Silveira Aguirre. Você acreditou em mim quando em 2019 fizemos nossa primeira reunião. Alguns meses depois já estávamos escrevendo nosso projeto. Até então você nem me conhecia, mas depositou sua confiança em mim. Obrigada pela paciência, empatia e por todos os ensinamentos. Mesmo conhecendo minha rotina, sempre dizia: “Vai dar certo, vamos conseguir”. Você é uma professora fantástica!

Ao meu local de trabalho e aos meus coordenadores, antigos e atuais, por me apoiarem e compreenderem minhas faltas. Com certeza sem esse apoio não teria concluído o mestrado. Obrigada!

A minha segunda família, meus amigos e colegas de trabalho. Obrigada por todo incentivo e compreensão. Sei que sempre estiveram comigo. Guardo no coração todas as palavras e abraços que recebi.

A UFCSPA e ao PPG Biociências por me proporcionarem este sonho. Muito obrigada! Aos alunos da professora Tanira por me auxiliarem nas práticas, ao pessoal do Laboratório Central Analítica e a professora Manuela Poletto Klein.

A professora Márcia Inês Goettert, minha co-orientadora, e à Univates por acreditarem no meu trabalho e por disponibilizarem o espaço para minhas práticas. Agradeço a todos os funcionários e bolsistas que me ajudaram nesta jornada, pessoal do Laboratório de Química e dos Laboratórios de Biotecnologia.

De coração, agradeço a todos que me incentivaram a estar aqui. Vocês fizeram parte disto!

*“Sonho que se sonha só, é só um sonho que se sonha só.
Mas sonho que se sonha junto, é realidade”.*

Raul Seixas

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
1.1 Quitosana	11
1.2 Genipina	17
1.3 Hidrogéis	19
1.4 Entrega controlada de fármacos	23
1.5 Diclofenaco de sódio	27
2. JUSTIFICATIVA	28
3. OBJETIVOS	29
3.1 Objetivos específicos	29
4. ARTIGO CIENTÍFICO	31
5. DISCUSSÃO	61
6. CONCLUSÕES	64
7. PERSPECTIVAS	64
8. REFERÊNCIAS	65
9. APÊNDICE	72
ANEXO 1 – Extração da genipina	72
ANEXO 2 – Histórico das formulações.	75
ANEXO 3 - Curvas e fórmulas utilizadas para calcular a concentração de diclofenaco de sódio nos diferentes ensaios.	77
10. CURRÍCULO LATTES	81

LISTA DE ABREVIATURAS

COX-1 - ciclo-oxigenase-1

COX-2 - ciclo-oxigenase-2

MTT - brometo de 3-(4,5-dimetiliazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio

TGI – trato gastrointestinal

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Processo de desacetilação da quitina

Figura 2 - Estrutura química da quitosana

Figura 3 - Reticulação de cadeias poliméricas entre quitosana e genipina

Figura 4 - Estrutura química da genipina

Figura 5 - Comportamento do hidrogel com alterações no pH do meio

Figura 6 - Concentração do fármaco *versus* tempo na liberação convencional e controlada

Figura 7 - Mecanismos de liberação controlada a partir de matrizes poliméricas

Figura 8 - Estrutura química do diclofenaco de sódio

RESUMO

A quitosana, polímero biodegradável extraído a partir da quitina, vem se destacando na indústria farmacêutica como carreador de fármacos. A genipina, composto natural extraído a partir do Jenipapo, atua como agente reticulante natural. Sendo assim, o presente trabalho objetivou desenvolver e caracterizar hidrogéis de quitosana reticulados com genipina e avaliar *in vitro* o perfil de liberação do diclofenaco de sódio. Além disso, objetivou-se avaliar a citotoxicidade *in vitro* dos componentes utilizados na obtenção dos hidrogéis, bem como de frações liberadas contendo o fármaco em diferentes meios de dissolução. A formulação obtida foi caracterizada em termos de morfologia macroscópica e microscopia, perfil termoquímico e perfil de intumescimento. O perfil de liberação do fármaco foi analisado através de ensaio de dissolução *in vitro* em pH 1,2 e 6,8, e também em fluidos intestinais simulados em pH 3,0 e 7,0. A citotoxicidade foi avaliada através do teste de MTT em células MRC5 e Caco-2, com tratamentos de 6 e 24 h. A formulação final apresentou as seguintes concentrações: quitosana 1,250% (m/v), genipina 0,185% (m/v) e diclofenaco sódico 0,250% (m/v). A partir dos ensaios caracterizamos o hidrogel como um dispositivo altamente poroso, com perfil de intumescimento e perfil de liberação dependentes de pH e com características intrínsecas de promoção de proteção entérica. A liberação em pH ácido foi mínima ($10\% \pm 0,43$) em comparação à liberação em 5 h em pH próximo ao neutro ($70\% \pm 13,5$). Testes de citotoxicidade dos componentes e da formulação revelaram propriedades não tóxicas em ambas linhagens celulares, apresentando viabilidades entre $75\% (\pm 5,94)$ e $106\% (\pm 3,71)$ nas duas concentrações mais baixas testadas. A formulação desenvolvida neste estudo é biocompatível e possui potencial para liberação controlada de diclofenaco de sódio administrado pela via oral.

ABSTRACT

Chitosan, a biodegradable polymer extracted from chitin, has been standing out in the pharmaceutical industry as a drug carrier. Genipin, a natural compound extracted from genipap, acts as a natural crosslinking agent. Therefore, the present study aimed to develop and characterize chitosan hydrogels crosslinked with genipin and evaluate the *in vitro* release profile of sodium diclofenac. In addition, to evaluate the *in vitro* cytotoxicity of the components used to obtain the hydrogel, as well as the released fractions containing sodium diclofenac in different media. The formulation obtained was characterized in terms of macroscopic and microscopic morphology, thermochemical profile and swelling profile. The drug release profile was analyzed through *in vitro* dissolution at pH 1,2 and 6,8, and also in simulated intestinal fluids at pH 3,0 and 7,0. Cytotoxicity was evaluated through the MTT assay on MRC5 and Caco-2 cells, with 6 and 24 h treatments. The final formulation presented the following concentrations: chitosan 1,250% (w/v), genipin 0,185% (w/v) and sodium diclofenac 0,250% (w/v). Based on the tests, we characterized the hydrogel as a highly porous dosage form, with a swelling and release profiles pH-dependent and intrinsic enteric protection. Release at acidic pH was minimal ($10\% \pm 0,43$) compared to 5 h release at pH near to neutral ($70\% \pm 13,5$). Cytotoxicity tests of the components and the formulation revealed non-toxic properties in both cell lines, showing viability between $75\% (\pm 5,94)$ and $106\% (\pm 3,71)$ at the two lower concentrations tested. The formulation developed in this study has the potential for drug controlled release of sodium diclofenac orally administered, ensuring biocompatibility.

1. INTRODUÇÃO

Este trabalho discorre sobre produtos naturais, quitosana e genipina, utilizados para o desenvolvimento de uma formulação de hidrogel para entrega oral controlada de diclofenaco de sódio. A quitosana é um polímero biodegradável obtido a partir da quitina. Sua estrutura química possui alta porcentagem de grupos amino reativos e, devido a isto, a quitosana pode ser processada, modificada e transformada tanto em relação à sua estrutura química, quanto à sua forma física (TIAN et al., 2020). Um dos processos que possibilita esta modificação é a reticulação de suas cadeias poliméricas. Esse processo consiste na formação de cadeias poliméricas híbridas, através da união de cadeias da quitosana com a de outros compostos (PRASANTHI et al., 2016).

Diversos compostos têm sido utilizados como agentes reticulantes, como por exemplo a genipina e o glutaraldeído. No entanto, devido a suas características naturais, a genipina tem se destacado neste papel. Extraída a partir do jenipapo, a genipina possui propriedades naturais que possibilitam sua utilização no processo de reticulação, formando compostos bioestáveis e biocompatíveis (GAO et al., 2014; VO et al., 2021).

Diferentemente da liberação convencional, em que o fármaco é liberado de forma imediata, a liberação controlada permite manter a concentração plasmática em níveis terapêuticos por um período prolongado. De forma gradual, o sistema controlado libera o fármaco retardando ou prolongando sua dissolução (BADER; PUTNAM, 2014; RAO et al., 2015).

1.1 Quitosana

A quitosana é o principal produto derivado da desacetilação da quitina, o segundo polímero mais abundante da natureza, depois da celulose. Sua história inicia no século XIX, em 1859, quando iniciaram as discussões sobre formas de

desacetilação da quitina (DASH et al., 2011; MENDES et al., 2011; PARHI, 2013). De acordo com alguns autores, nos últimos 20 anos houve um aumento expressivo de trabalhos científicos relacionados à quitosana e suas variações estruturais, revelando seu potencial em diversas bioaplicações (DU et al., 2015; ALI; AHMED, 2017; MUXIKA et al., 2017; PEERS; MONTEMBAULT; LADAVIÈRE, 2020).

A quitina, composto do qual se origina a quitosana, é um polímero natural, de grande abundância, extraído a partir de exoesqueletos de crustáceos e de insetos, e a partir da parede celular de alguns fungos. Evidenciando esta abundância, Bróqua et al. (2019) estimam que cerca de 100 bilhões de toneladas de quitina e seus derivados são produzidos anualmente (BROQUÁ et al., 2019). Este biopolímero apresenta uma estrutura molecular muito similar à da celulose, diferenciando-se apenas pela presença de grupos acetamino. Desta forma, a quitina se torna um composto insolúvel em meio aquoso e na maioria de solventes orgânicos, sendo solúvel apenas em meio ácido diluído. Esta característica é o maior fator limitante para a utilização da quitina na indústria em geral (LARANJEIRA; FÁVERE, 2009; MENDES et al., 2011; MUXIKA et al., 2017).

O processo de obtenção da quitosana a partir da quitina ocorre através da hidrólise alcalina, um processo termoquímico, que utiliza NaOH em altas temperaturas, para promover a desacetilação da quitina (Figura 1). Alguns fatores que afetam as características da quitosana obtida podem ser ajustados durante o processo de desacetilação, como por exemplo: tempo e temperatura da reação, concentração do álcali, razão quitina/álcali, tamanho das cadeias de quitina, entre outros fatores. Estes ajustes de processo originam diferentes configurações de quitosana e grau de desacetilação, sendo empregadas em variados formatos, como hidrogéis, membranas e cápsulas (MENDES et al., 2011; SHUKLA et al., 2013).

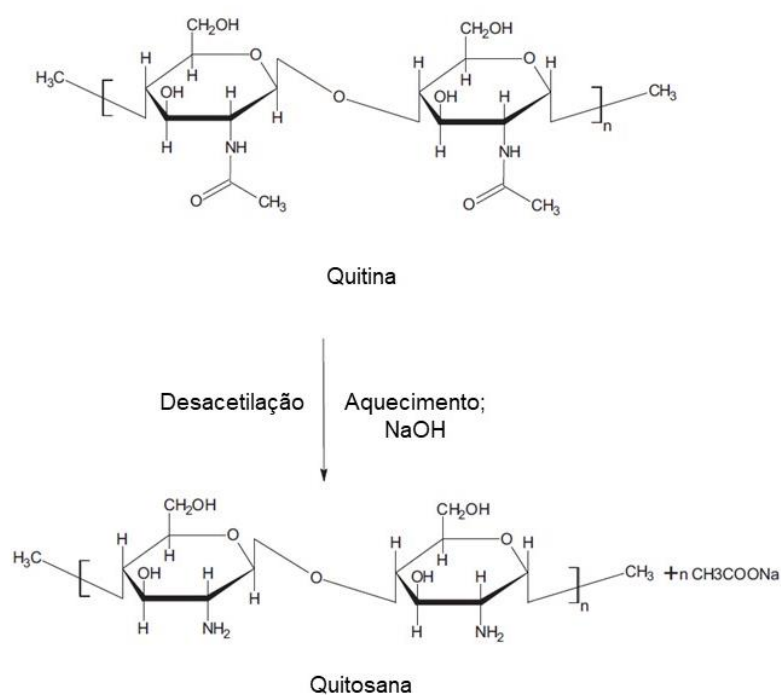


Figura 1 – Processo de desacetilação da quitina. Adaptado de (SHUKLA *et al.*, 2013).

A estrutura química da quitosana é caracterizada como uma cadeia linear, composta por N-acetil-2-desoxi-D-glucosamina e 2-amino-2-desoxi-D-glucosamina, possuindo ligações (1→4) - β -glicosídica nas unidades de repetição (Figura 2) (JAYAKUMAR *et al.*, 2011; PEERS; MONTEBAULT; LADAVIÈRE, 2020). Devido a este tipo de ligação, a quitosana apresenta uma estrutura cristalina, com a presença de ligações de hidrogênio intra- e intermolecular. Em relação à solubilidade da quitosana, a presença de grupos amino (NH_2) caracterizam esta propriedade da molécula. Em soluções ácidas diluídas ($\text{pH} < 6,0$) as aminas encontram-se protonadas, com carga positiva, e tornam a quitosana um composto polieletrólito catiônico solúvel em soluções aquosas. Por outro lado, quando há um aumento do pH ($\text{pH} > 6,0$), as aminas tornam-se desprotonadas e a quitosana perde sua carga e se torna insolúvel (SHUKLA *et al.*, 2013).

Ainda em relação à sua estrutura química, a quitosana, assim como a maioria dos polissacarídeos e proteínas, se apresenta como um composto termoplástico, pois suas cadeias poliméricas individuais são mantidas por ligações fracas, como ligações de van der Waals. Devido a esta característica e ao fato deste composto possuir alta porcentagem de grupos amino reativos, a quitosana pode ser processada, modificada e transformada tanto em relação à sua estrutura química, quanto à sua forma física (SILVA; FIDELES; FOOK, 2015). Essa versatilidade é evidenciada pela quantidade de trabalhos científicos que vêm utilizando a quitosana em diferentes formas, como hidrogéis, mini-esferas, pós, nanopartículas, esponjas, filmes, entre outros produtos (PUJANA et al., 2013; BIERBRAUER et al., 2014; SHARIATINIA; JALALI, 2018; SORASITTHIYANUKARN et al., 2021).

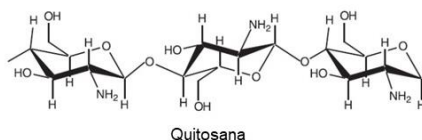


Figura 2 – Estrutura química da quitosana. Adaptado de (JAYAKUMAR et al., 2011).

Na área medicinal, a quitosana tem sido extensivamente estudada quanto às suas propriedades biológicas. Dentre as mais citadas estão a capacidade antioxidante, antimicrobiana e anti-inflamatória, a inibição da formação de biofilmes e a ação cicatrizante (MOHAMMADI et al., 2021). Além destas propriedades biológicas, a quitosana também vem desempenhando um excelente papel na área farmacêutica, mais precisamente na liberação controlada de fármacos, sendo utilizada como transportador para administração prolongada de fármacos, em formulações de administração oral, nasal, transdérmica e tópica, e ainda para administração de vacinas, proteínas e até mesmo para transporte de genes

(TAVARIA et al., 2013; SILVA; FIDELES; FOOK, 2015; SHARIATINIA, 2019; PEERS; MONTEMBault; LADAVIÈRE, 2020).

A utilização deste polímero biodegradável como carreador de medicamentos possibilita que o fármaco seja liberado de forma controlada, melhorando a sua biodisponibilidade e a concentração terapêutica desejada. Além disso, a quitosana também pode ser utilizada como sistema de intensificação de absorção do fármaco devido a sua característica de mucoadesividade (PEERS; MONTEMBault; LADAVIÈRE, 2020). O emprego da quitosana neste ramo farmacêutico pode ser realizado através de esferas, microsferas ou hidrogéis e alguns fatores permitem que essa sistemática de liberação controlada seja mais eficaz, como a combinação fármaco/polímero, quantidade e características químicas do fármaco e peso molecular do polímero (SILVA; FIDELES; FOOK, 2015).

A estrutura química da quitosana também pode ser modificada por um processo conhecido como reticulação de cadeias poliméricas. Este processo está relacionado com a união das cadeias poliméricas da quitosana ou com a formação de cadeias poliméricas híbridas, através da união de cadeias da quitosana com a de outros compostos. Este processo de modificação química é empregado com o intuito de aumentar a estabilidade física e térmica da quitosana, assim como sua permeabilidade, rigidez e capacidade de imobilizar estruturas celulares e proteicas. Como exemplo, pode-se citar o emprego da quitosana no desenvolvimento de sistemas de liberação controlada de fármacos, em que se faz necessário o processo de reticulação, pois para esta finalidade são necessárias matrizes permeáveis a água e aptas a aprisionar, transportar e liberar substâncias (GONSALVES et al., 2011; GARNICA-PALAFox; SÁNCHEZ-ARÉVALO, 2016; YU et al., 2021).

O processo de reticulação ocorre através de reações entre os sítios reativos específicos das unidades estruturais da quitosana com os sítios ativos de alguns reagentes reticulantes. Quimicamente, essas reações ocorrem entre os grupos amino e hidroxilas da quitosana, e podem ter caráter permanente ou reversível, de acordo com o mecanismo utilizado (ativação por interações iônica, por luz ultravioleta ou por ligações covalentes) (Figura 3) (YU et al., 2021). Por sua vez, os

reagentes de reticulação devem ser compostos com baixa massa molar e que possuam grupos funcionais reativos capazes de formar ligações intra- ou intercadeias poliméricas. Compostos como genipina, glutaraldeído, formaldeído, glioxal e sulfatos são exemplos de reagentes que possuem a capacidade de reticular a quitosana (GONSALVES et al., 2011; MATOS et al., 2015; PEERS; MONTEBAULT; LADAVIÈRE, 2020).

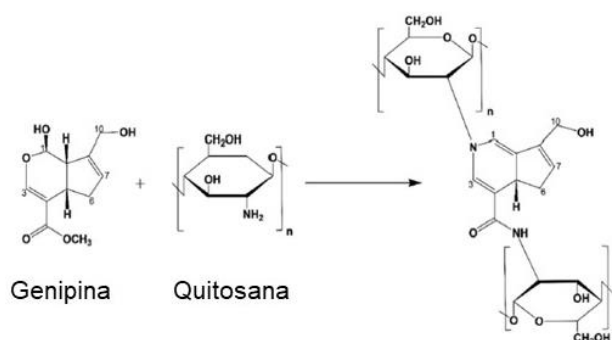


Figura 3 – Reticulação de cadeias poliméricas entre quitosana e genipina. Adaptado de (YU et al., 2021).

Já em relação à citotoxicidade da quitosana, diversos estudos avaliaram através de cultivo celular a viabilidade de diferentes linhagens celulares frente à exposição da quitosana pura, ou quitosana mais agente reticulante. Estes estudos apresentaram a quitosana em formas variadas, como nanofibras, hidrogéis ou sistema micelar e em todos a viabilidade celular não foi afetada, evidenciando que a quitosana é um composto biocompatível e não tóxico a células testadas (LAU et al., 2018; WU et al., 2018; HAN et al., 2020). Potencializando estas características, um estudo realizado por Real et al. (2018), avaliou a utilização de nanocápsulas de quitosana para entrega controlada de triclabendazol. Além disso, os autores investigaram a citotoxicidade do composto em linhagem Caco-2, e o mesmo achado foi observado, a quitosana se mostrou como um composto biocompatível e não tóxico (REAL et al., 2018).

1.2 Genipina

Isolada a partir de *Genipa americana* Linnaeus (popularmente conhecida como Jenipapeiro) ou da *Gardenia jasminoides* Ellis, a genipina, uma molécula aglicona extraída a partir do geniposídeo, é um composto natural tradicionalmente utilizado na medicina oriental como agente hepatoprotetor e anti-inflamatório. O processo de extração é realizado com a enzima β -glicosidase, responsável pela hidrólise do geniposídeo, envolvendo procedimentos químicos ou microbiológicos (KIM; JEONG; MOON, 2012; DIMIDA et al., 2015; HOBBS et al., 2018). O processo microbiológico, de acordo com Muzzareli (2009), que envolve a utilização do fungo *Penicillium nigricans*, produtor da enzima hidrolítica, é um processo mais fastidioso e manual, quando comparado ao processamento químico (MUZZARELLI, 2009).

Devido a sua estrutura química (Figura 4), a genipina vem sendo amplamente utilizada como agente reticulador, formando compostos bioestáveis e biocompatíveis. Este processo que ocorre entre a genipina e o grupo amino primário do agente reticulado pode ser evidenciado pela alteração da cor do composto para um tom azulado, indicando a presença de alterações químicas na cadeia da genipina. Assim, a genipina é caracterizada como um agente reticulante natural, sendo utilizada com compostos como quitosana, colágeno e gelatina (BERGER et al., 2004; DIMIDA et al., 2015; YU et al., 2021). Além desta funcionalidade, a genipina também é utilizada como corante natural de alimentos, sendo testada e aprovada por diversos órgãos como *Food and Drug Administration* (FDA) e *FAO/WHO Joint Expert Committee on Food Additives*. A coloração azulada, proveniente da fruta da gardênia, é resultante da reação da genipina com aminoácidos e proteínas hidrolisadas (HOBBS et al., 2018).

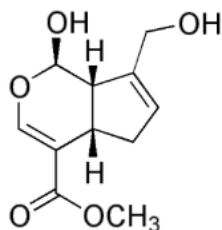


Figura 4 – Estrutura química da genipina. Adaptado de (HARRIS; LECUMBERRI; HERAS, 2010).

A genipina atua como um agente reticulador natural e diversos estudos vêm demonstrando que essa substância apresenta melhores resultados em termos de citotoxicidade em relação a outros agentes reticulantes, como o glutaraldeído (GARNICA-PALAFIX; SÁNCHEZ-ARÉVALO, 2016; RAZI et al., 2018). Um estudo *in vitro* realizado com fibroblastos 3T3 avaliou a citotoxicidade da genipina em comparação ao glutaraldeído com teste de MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiliazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio). Os resultados demonstraram que a genipina é cerca de 10.000 vezes menos citotóxica que o glutaraldeído e que a capacidade de proliferação das colônias celulares foram 5.000 maiores com a presença da genipina (SUNG et al., 1999).

Kawamura et al. (2021) avaliaram a citotoxicidade de dispositivos de quitosana com genipina, como agente reticulante. Os testes foram realizados pela metodologia WST-8 em linhagem V79 (fibroblastos de pulmão de hamster). Os dispositivos contendo diferentes concentrações de genipina, aquecida ou não, permaneceram em contato com as células por 1 hora. Excelentes resultados foram encontrados com concentrações entre 0 e 0,02 mM de genipina (KAWAMURA et al., 2021).

Outro grupo de pesquisadores avaliou a biodegradação e biocompatibilidade de hidrogéis de quitosana reticulados com genipina. Testes de biodegradação foram conduzidos em soluções contendo lisozima. Em tempos pré-determinados, foram realizadas leituras de fluorescência intrínseca dos hidrogéis para verificar as alterações. Os testes de citotoxicidade foram conduzidos com fibroblastos 3T3 pela metodologia de MTT. Duas linhagens (RAW 264.7 e DC 2,4) foram utilizadas para

testes de indução de inflamação. Hidrogéis com altas concentrações (4,4 mM) de genipina não induziram efeitos citotóxicos, bem como indicadores de inflamação. Ainda, os autores sugerem a utilização deste dispositivo como um adjuvante do sistema imunológico para expressão de interferon β (VO et al., 2021). Ambos estudos trazem excelentes resultados de biocompatibilidade para estas linhagens em questão, porém, linhagens como MRC5 e Caco-2 ainda não foram utilizadas em estudos similares, reforçando a necessidade de realizar os testes de citotoxicidade propostos em nosso estudo.

1.3 Hidrogéis

Em 1993, Almdal et al. (1993) descreveram géis como compostos macios, sólidos ou semi-sólidos, formados a partir de dois componentes, sendo um deles líquido e presente em grandes quantidades. Ainda, concluíram que os géis mantêm sua forma sob a tensão do seu próprio peso e se deformam sob estresse mecânico (ALMDAL et al., 1993). No entanto, quando há a presença de água como solvente, chamados este composto de hidrogel (PEERS; MONTEMBault; LADAVIÈRE, 2020).

Neste sentido, os hidrogéis são considerados compostos formados por redes tridimensionais de ligações hidrofílicas, que vêm atraindo atenção em diversos ramos biotecnológicos devido a características de biocompatibilidade, hidrofiliçidade, adaptabilidade e capacidade de resposta (HEIMBUCK et al., 2019). Além disto, os hidrogéis se destacam pela grande capacidade de absorver e reter grandes quantidades de água sem se dissolver (SHARIATINIA; JALALI, 2018). Esta propriedade está relacionada com a densidade das ligações hidrofílicas que são encontradas nas cadeias poliméricas do hidrogel (PEERS; MONTEMBault; LADAVIÈRE, 2020).

Diversos hidrogéis já foram descritos na literatura, sejam eles à base de polímeros sintéticos, como poliacrilamida ou ácido poliacrílico (XUE et al., 2019; FERRAG et al., 2021; LIANG et al., 2021), ou à base de polímeros naturais, como

quitosana, alginato e gelatina (BAYSAL et al., 2013; UBAID; MURTAZA, 2018; SHARIATINIA; JALALI, 2018). E, de acordo com Shariatinia e Jalali (2018), os hidrogéis naturais têm atraído mais atenção devido à sua natureza ecologicamente correta, além de apresentarem características de biodegradabilidade e produção de baixo custo (SHARIATINIA; JALALI, 2018). Ainda, os hidrogéis podem ser classificados de acordo com o mecanismo de produção utilizado, que podem ser: ligações químicas ou interações físicas. As ligações químicas são predominantemente representadas por ligações covalentes. Por outro lado, as interações físicas, também conhecidas como interações reversíveis, são formadas por interações secundárias como atração eletrostática e interações hidrofóbicas (BERGER et al., 2004; DU et al., 2015; PEERS; MONTEMBault; LADAVIÈRE, 2020; VO et al., 2021).

Diante dessas características e ao fato da quitosana ser um composto obtido de fonte natural e renovável, biodegradável e biocompatível, hidrogéis a base de quitosana têm sido foco de diversas pesquisas como carreador de fármacos (BHATTARAI; GUNN; ZHANG, 2010; CRACIUN et al., 2019; PEERS; MONTEMBault; LADAVIÈRE, 2020; TIAN et al., 2020). Além disso, para se desenvolver um hidrogel para liberação controlada de fármacos parâmetros como tipo de polímero, natureza do agente reticulante e grau de reticulação são determinantes para desempenhar o papel proposto (HEIMBUCK et al., 2019). Peers et al. (2020) destacam que é através dos poros hidrofílicos da estrutura tridimensional de um hidrogel à base de quitosana que ocorre a incorporação do fármaco, criando uma barreira de difusão e dificultando a liberação do mesmo (PEERS; MONTEMBault; LADAVIÈRE, 2020).

Peers et al. (2020) e Vo et al. (2021) convergem quando afirmam que hidrogéis de quitosana para entrega de fármacos hidrofílicos devam ser elaborados a partir de processos químicos e físicos (PEERS; MONTEMBault; LADAVIÈRE, 2020; VO et al., 2021). Estes processos ocorrem entre os grupos amino e hidroxilas livres da quitosana e o agente reticulante. Como excelente agente reticulador, a genipina possui alta seletividade, formando compostos heterocíclicos com a quitosana (VO et al., 2021). Tian et al. (2020) afirmam que hidrogéis de quitosana formados a partir de ambos processos apresentam excelentes resultados na

entrega de fármacos, além de serem facilmente biodegradados pelo organismo humano (TIAN et al., 2020).

Os hidrogéis podem receber estímulos químicos e/ou físicos e (de acordo com cada estímulo gerado) diferentes características serão observadas, como deformação e mobilidade. Os estímulos químicos compreendem força iônica, pH, composição do solvente e espécies moleculares. Já os estímulos físicos estão relacionados com campo magnético ou elétrico, pressão e temperatura (SHARIATINIA; JALALI, 2018). Além destes estímulos externos, condições como tamanho do poro do hidrogel e grau de reticulação também são determinantes para se estabelecer a atividade da liberação do fármaco. Pois quanto maior for a taxa de intumescimento e conseqüentemente maior o tamanho do poro, maior será a difusão do fármaco através do hidrogel (PEERS; MONTEMBault; LADAVIÈRE, 2020).

Ao adicionar um agente reticulante na formação do hidrogel, a taxa de difusão do fármaco pode ser controlada, por exemplo, em função do pH do meio de liberação, através da protonação dos grupos aminos da quitosana em ambientes ácidos (Figura 5) (BERGER et al., 2004; DU et al., 2015; PEERS; MONTEMBault; LADAVIÈRE, 2020; TIAN et al., 2020). Além disto, a quantidade de agente reticulante utilizada está intimamente relacionada com o intumescimento do hidrogel e com o tamanho do poro. Quanto maior o grau de reticulação, menor será a capacidade da quitosana de formar ligações de hidrogênio com água, e conseqüentemente menor será a taxa de intumescimento devido à diminuição do tempo de relaxamento das cadeias poliméricas. Assim, tem-se uma liberação do fármaco de forma controlada (BERGER et al., 2004).

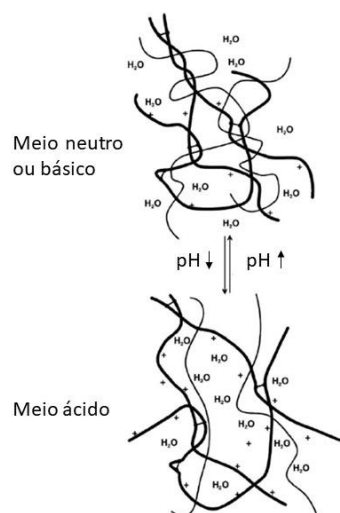


Figura 5 – Comportamento de um hidrogel de quitosana reticulado covalentemente com polímero modelo em diferentes meios de dissolução. Adaptado de (BERGER et al., 2004).

Ubaid e Murtaza (2018) desenvolveram um hidrogel de quitosana/gelatina reticulado com genipina para entrega controlada de metformina. Diferentes concentrações de genipina foram utilizadas para se analisar o perfil de liberação do fármaco, que foi conhecido através de ensaio de dissolução *in vitro* em solução gástrica simulada (pH 1,2). A liberação foi mediada através do pH do meio de liberação e do grau de reticulação. Por fim, os autores concluem que quanto maior for o grau de reticulação, menor será a taxa de liberação do fármaco, ponto importante para o desenvolvimento de estruturas aplicadas em liberação controlada (UBAID; MURTAZA, 2018).

Devido à grande aplicabilidade dos hidrogéis, Gao et al. (2014) avaliaram hidrogéis de quitosana e genipina em relação a viabilidade e adesão celular. O estudo em questão avaliou o comportamento de fibroblastos L929 em relação à presença do hidrogel. Técnicas como MTT e microscopia eletrônica de varredura foram utilizadas para se conhecer o perfil da linhagem celular utilizada no estudo.

Resultados promissores foram observados, os hidrogéis não causaram efeitos citotóxicos e ainda mostraram ótimos resultados como suporte para adesão e crescimento celular. Já em relação ao grau de reticulação, os autores concluem que a adesão celular está positivamente relacionada a este parâmetro, pois quanto maior a taxa de reticulação e maior a rigidez do hidrogel, melhores resultados na adesão foram encontrados (GAO et al., 2014).

1.4 Entrega controlada de fármacos

A absorção, distribuição, metabolismo e excreção de fármacos ocorre de forma dinâmica no organismo. Após a administração *in vivo*, os picos e vales que excedem a janela terapêutica em uma curva de concentração plasmática do fármaco *versus* tempo, estão relacionados respectivamente com a indução de efeitos indesejáveis e a redução do efeito terapêutico (WANG et al., 2020). Para minimizar estas características indesejáveis, sistemas de liberação modificada/controlada podem ser empregados. Nesses sistemas podemos controlar as taxas de liberação do agente terapêutico com diversos objetivos, como por exemplo: minimizar a frequência das dosagens dos fármacos, reduzir efeitos tóxicos e melhorar a eficácia (KUMMAR et al., 2011; BADER; PUTNAM, 2014).

Os fármacos, de forma geral, podem ser liberados através de métodos convencionais ou métodos modificados, sejam eles utilizados para fins profiláticos, terapêuticos ou ainda para fins de diagnóstico. A liberação convencional ou imediata é aquela em que o fármaco é liberado imediatamente após a administração, e ocorre aumento brusco e rápido da concentração do fármaco no organismo (BADER; PUTNAM, 2014). Por outro lado, de acordo com Rao et al. (2015), o termo liberação modificada é entendido como um processo em que as características de liberação do fármaco em relação ao tempo e/ou localização são escolhidas para atingir objetivos terapêuticos não oferecidos por formas convencionais (RAO et al., 2015).

Neste sentido, a liberação modificada é aquela caracterizada por modular a liberação do fármaco, retardando ou prolongando sua dissolução (Figura 6) (LIECHTY et al., 2010; BADER; PUTNAM, 2014; OLIVEIRA, 2018). Sendo assim, a administração dos fármacos neste sistema pode ser realizada em intervalos de tempo menos frequentes se comparada aos sistemas convencionais. Tal característica, muitas vezes, se torna responsável por aumentar a adesão do paciente ao tratamento e evita níveis tóxicos ou níveis subterapêuticos do fármaco no organismo (PEZZINI; SILVA; FERRAZ, 2007; VILLANOVA; ORÉFICE; CUNHA, 2010).

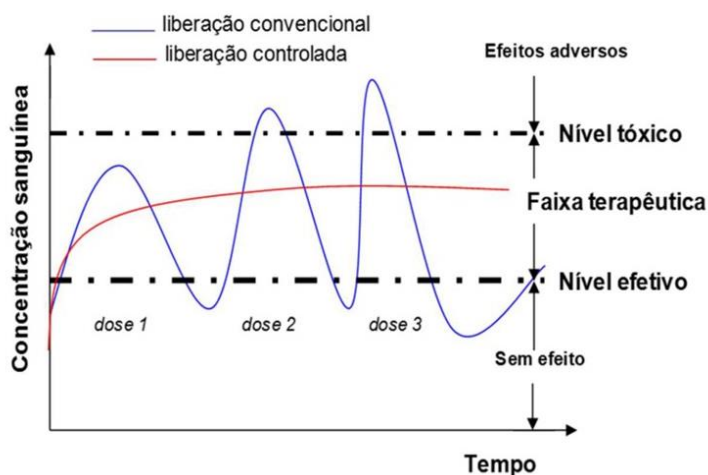


Figura 6 – Concentração plasmática do fármaco *versus* tempo na liberação convencional e controlada após administração oral. Adaptado de (OLIVEIRA, 2018).

Os métodos modificados compreendem liberações prolongadas, direcionadas, pulsáteis ou ainda, retardadas. O tipo prolongado pode ser caracterizado por duas dosagens, a primeira, de maior concentração, responsável por induzir o efeito farmacológico inicial, e a segunda, de menor concentração, que mantém esse efeito por um período prolongado ou ainda por uma única dosagem, liberando o fármaco de forma mais prolongada. A liberação direcionada libera o fármaco no local de ação desejado ou próximo a ele. Já a liberação pulsátil é caracterizada por conter várias doses do ativo na mesma formulação, se

assemelhando com a liberação convencional. No entanto, a liberação de uma segunda dose ocorre somente quando o fármaco atinge seu nível plasmático mais baixo, próximo ao nível subterapêutico. Por fim, a liberação retardada é responsável por liberar o fármaco de forma tardia, que pode ser modulada por interações fisiológicas do meio ou em função do tempo. Este tipo de liberação normalmente é representado pelas formas farmacêuticas gastrorresistentes ou entéricas (ALLEN; POPOVICH; ANSEL, 2013; RAO et al., 2015).

De acordo com Parhi (2019), um sistema de entrega controlada de fármacos é composto por um ou mais agentes farmacológicos ativos e um carreador adequado. Ainda, afirma que o sucesso deste sistema depende de fatores como tipo de polímero, propriedades do fármaco, doença a ser tratada, dosagens e via de administração (PARHI, 2019). A via oral de administração, para Huang et al. (2016), é a via mais conveniente e confortável para o paciente (HUANG et al., 2016a). No entanto, um dos maiores desafios na entrega controlada via administração oral é a passagem da formulação através do trato gastrointestinal, estando suscetível a grandes variações de pH e à atividade enzimática (BHATTARAI; GUNN; ZHANG, 2010; YU et al., 2021).

A liberação do fármaco a partir de dispositivos à base de quitosana envolve mecanismos como: erosão, intumescimento, difusão e biodegradação (Figura 7). A erosão é a perda da massa polimérica do dispositivo, desencadeada pelo processo de intumescimento. À medida que a água penetra, mudanças ocorrem na superfície do polímero, liberando o fármaco. Já o mecanismo de intumescimento envolve a penetração de grande quantidade de água, permitindo que o fármaco se propague para fora da formulação. Para este mecanismo, alguns fatores como hidrofiliabilidade, taxa de intumescimento e densidade das cadeias poliméricas desempenham um papel importante na taxa de liberação do fármaco (KUMMAR et al., 2011; PARHI, 2019).

Os sistemas controlados por difusão podem ser do tipo matricial ou reservatório. O tipo matricial é caracterizado pela distribuição homogênea do fármaco em todo o polímero. Já o tipo reservatório apresenta o fármaco dentro de um núcleo, que determina a taxa de liberação do fármaco. Em ambos, a matriz

polimérica irá determinar a taxa de liberação do fármaco à medida que fluidos de sistema gastrointestinal entram em contato com a formulação (PEZZINI; SILVA; FERRAZ, 2007; PARHI, 2019). Por fim, o mecanismo de biodegradação envolve cisão da cadeia polimérica devido a ação enzimática ou ação do pH do meio de liberação (PARHI, 2019).

A quitosana, como um polímero biodegradável, não tóxico e de grande abundância, tem chamado a atenção nas áreas de biomedicina e farmácia, atuando na liberação controlada (VILLANOVA; ORÉFICE; CUNHA, 2010). Corroborando com este fato, diversos estudos vêm reforçando o potencial da quitosana como mecanismo para liberação controlada de fármacos (BHATTARAI; GUNN; ZHANG, 2010; VAGHANI; PATEL; SATISH, 2012; PEERS; MONTEMBault; LADAVIÈRE, 2020; TIAN et al., 2020). E, como forma de melhorar a ação da quitosana, o processo de reticulação com um agente natural, como a genipina, também vem ganhando espaço nas pesquisas. Por meio da reticulação covalente, as cadeias da quitosana são ligadas às cadeias de genipina, alterando algumas propriedades, como a estabilidade química e térmica, rigidez natural e permeabilidade (MUZZARELLI, 2009; GARNICA-PALAFOX; SÁNCHEZ-ARÉVALO, 2016; CUNHA et al., 2021; VO et al., 2021; YU et al., 2021).

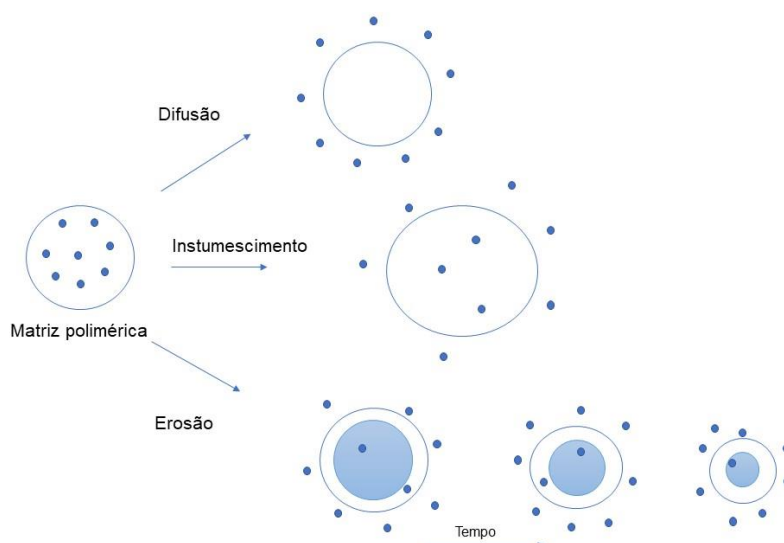


Figura 7 – Mecanismos de liberação controlada a partir de matrizes poliméricas. Fonte: do autor.

1.5 Diclofenaco de sódio

O diclofenaco de sódio (Figura 8) é um fármaco hidrofílico fracamente ácido classificado como anti-inflamatório não esteroidal. Devido a sua estrutura química, o diclofenaco de sódio apresenta baixa solubilidade em água e ligeira solubilidade em metanol e ácido acético glacial. Já em relação a sua farmacocinética, o fármaco é rapidamente absorvido pelo organismo e distribuído no plasma e nos tecidos. De acordo com Pantziarka et al. (2006), a meia vida do diclofenaco é 1,8 horas após a administração oral (PANTZIARKA et al., 2016; GULL et al., 2020). Além disso, Geller et al. (2012) afirma que quando administrado oralmente, o diclofenaco está sujeito ao metabolismo de primeira passagem, com apenas 60% do fármaco atingindo a circulação sistêmica em sua forma inalterada (GELLER et al., 2012). O fármaco que foi desenvolvido inicialmente por Ciba-Geigy (Novartis), está disponível atualmente em sua forma genérica a nível mundial (PANTZIARKA et al., 2016).

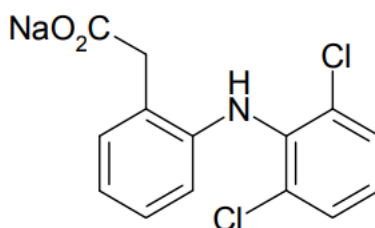


Figura 8 – Estrutura química do diclofenaco de sódio (STOEF et al., 2012).

Amplamente utilizado no tratamento da dor na artrite reumatoide e outras condições musculoesqueléticas, além de enxaqueca e gota aguda, o diclofenaco de sódio tem seu uso limitado devido à alta incidência de efeitos indesejáveis. Os principais efeitos indesejáveis estão relacionados ao trato gastrointestinal, como dor estomacal, náuseas e de forma mais crônica, gastrite (STOEF et al., 2012; PANTZIARKA et al., 2016). Este fármaco atua inibindo enzimas ciclo-oxigenase-1 (COX-1) e ciclo-oxigenase-2 (COX-2). A COX-1 está relacionada à produção de prostaglandinas que atuam na proteção da parede do estômago. Já a COX-2, além atuar também na produção de prostaglandinas, desempenha um importante papel na inflamação (GELLER et al., 2012).

2. JUSTIFICATIVA

Este trabalho teve como intuito desenvolver e caracterizar uma formulação a base de produtos naturais para a entrega controlada de diclofenaco de sódio. Para isto, utilizamos a quitosana, adquirida comercialmente, e a genipina, extraída *in house*, cujo processo de extração também caracterizou um objetivo específico (ANEXO 1). A utilização da genipina obtida *in house* em formulações para entrega controlada de fármacos é uma característica inédita e merece ser destacada, uma vez que auxilia na diminuição dos custos relacionados a obtenção da formulação, visto que a genipina adquirida comercialmente possui um custo elevado. As relações entre as massas de quitosana e genipina presentes na formulação

desenvolvida são relações ainda não empregadas para a aplicação aqui proposta. Além disso, não foram encontrados estudos na literatura que reportam o desenvolvimento de hidrogéis de quitosana reticulados com genipina para a entrega do fármaco diclofenaco de sódio.

Para conhecer o perfil de liberação do fármaco, realizamos dois ensaios de dissolução. O ensaio que simula o trato gastrointestinal é um ensaio que ainda não está presente na metodologia de grande parte de estudos já publicados, mas sentimos a necessidade de inseri-lo, já que este ensaio mimetiza todos os processos da digestão, com a adição de enzimas específicas. Além disso, buscamos conhecer a citotoxicidade de todos os componentes da formulação, assim como de frações retiradas dos ensaios de liberação do fármaco, para analisar os efeitos citotóxicos para as células escolhidas. Diante destes fatos, justificamos a importância da realização de todos os objetivos propostos aqui.

3. OBJETIVOS

Desenvolver e caracterizar hidrogéis de quitosana reticulados com genipina para a liberação controlada de diclofenaco de sódio e conhecer o perfil de citotoxicidade *in vitro* das formulações.

3.1 Objetivos específicos

- a) Desenvolver e caracterizar os hidrogéis de quitosana reticulados com genipina contendo o fármaco diclofenaco de sódio em termos de morfologia, perfil termoquímico e capacidade de intumescimento.
- b) Avaliar o perfil de liberação *in vitro* do fármaco diclofenaco de sódio incorporado aos hidrogéis em meios de liberação e em fluidos intestinais simulados.

- c) Avaliar a citotoxicidade *in vitro* da quitosana e da genipina separadas ou combinadas fisicamente em diferentes concentrações, mas na mesma proporção dos hidrogéis em células MRC5 e Caco-2.
- d) Avaliar a citotoxicidade *in vitro* das frações liberadas a partir dos hidrogéis de quitosana reticulados com genipina contendo o fármaco diclofenaco de sódio em meios de dissolução (pH 1,2 e pH 6,8) em células MRC5 e Caco-2.
- e) Avaliar a citotoxicidade *in vitro* das frações liberadas a partir dos hidrogéis de quitosana reticulados com genipina contendo o fármaco diclofenaco de sódio em diferentes fluidos intestinais simulados em células MRC5 e Caco-2.

4. ARTIGO CIENTÍFICO

O trabalho realizado durante o mestrado originou o manuscrito intitulado: *Evaluation of the technological potential of chitosan hydrogels crosslinked with genipin in oral drug delivery of sodium diclofenac*. Esse artigo está apresentado a seguir e está formatado de acordo com as orientações para os autores (<https://www.journals.elsevier.com/carbohydrate-polymers>) da revista Carbohydrate Polymers (fator de impacto: 9.381) para a qual será submetido.

Assim como na dissertação, o artigo tem como objetivo geral desenvolver e caracterizar hidrogéis de quitosana reticulados com genipina para entrega controlada de diclofenaco de sódio. A caracterização do hidrogel envolve análises de morfologia, perfil termoquímico e perfil de intumescimento. Para conhecer o perfil de liberação do fármaco foram realizados ensaios de dissolução *in vitro* em soluções tampão com pH 1,2 e 6,8 e fluidos contendo enzimas e diferentes pHs a fim de mimetizar o trato gastrointestinal humano. Ainda, objetivou-se conhecer a citotoxicidade dos componentes individuais do hidrogel, bem como de frações retiradas das análises de liberação do fármaco. A citotoxicidade foi realizada em células MRC5 e Caco-2 e em 6 e 24 horas de tratamento com diferentes concentrações dos analitos.

A partir dos objetivos propostos, desenvolvemos com sucesso um hidrogel de quitosana e genipina para entrega controlada de fármacos. Caracterizamos o hidrogel como uma formulação altamente porosa, com perfil de intumescimento e liberação do fármaco dependentes de pH. Observamos alta taxa de intumescimento em pH ácido, e reversão com o aumento do pH. Em relação à liberação do fármaco, em ambos os ensaios observamos mínima liberação ($10\% \pm 0,43$) em pH ácido e maiores quantidades ($70\% \pm 13,5$) em pH próximo ao neutro, sugerindo proteção entérica à formulação. Já em relação à citotoxicidade, constatamos viabilidade celular entre $75\% (\pm 5,94)$ e $106\% (\pm 3,71)$, para ambas as linhagens nas últimas concentrações testadas, sugerindo propriedades não tóxicas da formulação desenvolvida nas linhagens em questão.

**Evaluation of the technological potential of chitosan hydrogels crosslinked
with genipin in oral drug delivery of sodium diclofenac**

Gabriela Kaufmann^a, Manuela Poletto Klein^b, Márcia Inês Goettert^c e Tanira
Alessandra Silveira Aguirre^{d*}

^aPrograma de Pós-Graduação em Biociências, Universidade Federal de Ciências
da Saúde de Porto Alegre, Porto Alegre - RS – Brazil. E-mail:
gkaufmann@ufcspa.edu.br

^bPrograma de Pós-Graduação em Ciências da Nutrição, Universidade Federal de
Ciências da Saúde de Porto Alegre, Porto Alegre - RS – Brazil. E-mail:
manuelap@ufcspa.edu.br

^cPrograma de Pós-Graduação Biotecnologia, Universidade do Vale do Taquari –
Univates, Lajeado - RS – Brazil. E-mail: marcia.goettert@univates.br

^dPrograma de Pós-Graduação em Biociências, Universidade Federal de Ciências
da Saúde de Porto Alegre, Porto Alegre - RS – Brazil. E-mail:
tanira@ufcspa.edu.br

*Corresponding Author: Dra. Tanira Alessandra Silveira Aguirre
Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre
Rua Sarmiento Leite, 245
Porto Alegre/RS, 90050-170, Brazil
Tel. +55(51) 3303-8755
E-mail: tanira@ufcspa.edu.br

Abstract

Sodium diclofenac is widely used in the treatment of pain in rheumatoid arthritis and other musculoskeletal conditions, however it has limited use due to the high incidence of undesirable effects related to the gastrointestinal tract. A hydrogel composed of chitosan (1,250% w/v) and genipin (0,185% w/v) was developed for the controlled delivery of sodium diclofenac (0,250% w/v). The hydrogel was characterized as a highly porous dosage form, with pH-dependent swelling and release profiles. Dissolution studies revealed minimal drug release ($10\% \pm 0,43$) at pH 1,2 and greater drug release ($70\% \pm 13,5$) at pH 6,8 at 5 h. Similar results were found in the gastrointestinal tract simulation release. Minimal release at gastric simulation, $6,1\% (\pm 1,96)$ at 2 h, with increased release in intestinal fluid simulation, $88,2\% (\pm 5,02)$ after 2 h at this pH. The MTT results revealed that the hydrogel components did not induce cytotoxic effects, presenting cellular viability between $75\% (\pm 5,94)$ and $106\% (\pm 3,71)$ for MRC5 and Caco-2 cells at the two lowest concentrations of all components tested. Fractions taken from the dissolution assays were also analyzed for cytotoxicity and excellent viability results were found, between $71\% (\pm 4,07)$ and $106\% (\pm 15,14)$ in both strains, for concentrations tested between 50% and 5%. Our findings suggest that the proposed formulation could be a potential candidate for a gastro-resistant drug delivery system of sodium diclofenac.

Keywords: chitosan; genipin; crosslinked; drug delivery systems.

1. Introduction

Hydrogels are a three-dimensional network formed by a polymeric material with hydrophilic characteristics, which allows the absorption of significant water without dissolving (Cui et al., 2014). Extensive research concerning their applicability in scientific areas revealed promising results in terms of biocompatibility, flexibility, and reactivity properties (Bhattarai et al., 2010; Gao et al., 2014; Ubaid & Murtaza, 2018; Heim buck et al., 2019). In addition, hydrogels

AA - acid acetic / COX-1 - ciclo-oxigenase-1 / COX-2 - ciclo-oxigenase-2 / CS – chitosan / DSC - Differential Scanning Calorimetry / GEN – genipin / GIT - gastrointestinal tract / MTT - (3-(4,5-dimethyliazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) / SD - standard deviation / SEM - scanning electron microscopy / SEM - standard error of mean / SGF - Simulated Gastric Fluid / SIF - Simulated Intestinal Fluid / SSF - Simulated Salivary Fluid

based on natural polymers, such as chitosan, attract attention, especially in the pharmaceutical area, for having low toxicity and being susceptible to enzymatic degradation (Garnica-Palafox & Sánchez-Arévalo, 2016; Vo et al., 2021). Thus, biodegradable hydrogels are potential frameworks for controlled drug delivery, especially in oral or mucosal delivery (Xu et al., 2015; Yu et al., 2021).

Chitosan is a cationic and natural polymer extracted from chitin by alkaline hydrolysis. Chitin, the second most abundant natural polymer in nature, is found in the exoskeleton of crustaceans and insects, and in the cell wall of some fungi. The chemical structure of chitosan is characterized as a linear chain, composed of N-acetyl-2-deoxy-D-glucosamine and 2-deoxy-D-glucosamine, with (1→4) β -glycosidic bonds in the repeat units (Jayakumar et al., 2011; Broquá et al., 2019). Due to its easy accessibility and properties such as biodegradability, biocompatibility, and antibacterial action, chitosan can be used as a support for controlled drug delivery (Li et al., 2015). Its solubility is dependent on the protonation of its amino groups and the pH of the dissolution medium. At this point, the process of crosslinking polymeric chains aims to improve the permeability, as well as the physical and chemical stability of chitosan. In hydrogels, this process, which is responsible for developing hybrid compounds, occurs from chemical and/or physical interactions, comprising covalent bonds, hydrogen bonds, and secondary interactions, such as electrostatic attraction (Dash et al., 2011; Shariatinia & Jalali, 2018; Peers et al., 2020; Vo et al., 2021).

Genipin is a natural product usually extracted from the fruit *Genipa americana* Linnaeus (popularly known as genipap) and from the fruit of *Gardenia jasminoides* Ellis, which has medicinal properties as a hepatoprotective and anti-inflammatory agent (Kim et al., 2012; Hobbs et al., 2018). Genipin has been studied as a natural crosslinking agent because of its favorable chemical characteristics and for forming biostable and biocompatible products (Muzzarelli, 2009; Hobbs et al., 2018). The crosslinking process with genipin occurs with the reactive primary amino groups from aminoacids, proteins, or chitosan, releasing a bluish color. Genipin has high chemical selectivity and plays an important role with natural polymers such as chitosan in controlled drug delivery (Harris et al., 2010; Hobbs et al., 2018; Ubaid & Murtaza, 2018; Vo et al., 2021; Yu et al., 2021). In addition, it has low toxicity

compared to other cross-linking agents, such as glutaraldehyde. Cytotoxic studies revealed that genipin is 10,000 times less cytotoxic compared to glutaraldehyde, in 3T3 fibroblast cells (Sung et al., 1999).

According to Peers et al. (2020) and Vo et al. (2021), chitosan-based hydrogels can be crosslinked by chemical and physical processes with genipin, to manage parameters like porosity, swelling rate, and mechanical strength (Peers et al., 2020; Vo et al., 2021). Therefore, the higher the crosslinking rate, the lower the hydrogel swelling rate, and consequently, the lower the drug release (Ubaid & Murtaza, 2018). Furthermore, the cross-linking agent can control drug release according to the pH of the medium. These parameters are indispensable in the elaboration of structures for controlled delivery, aiming to know the kinetics release of the therapeutic agent (Ubaid & Murtaza, 2018).

Vaghani, Patel, and Satish (2012) affirm that the development of technologies for controlled delivery with biodegradable polymers is one of the most evolving branches of science (Vaghani, Patel & Satish, 2012). In this aspect, hydrogels represent a class with excellent results in “smart” drug delivery (Narayanaswamy & Torchilin, 2019). One of the major obstacles in this field is the burst release, which releases the therapeutic agent suddenly, fast and uncontrolled immediately after administration (Peers et al., 2020). Controlled drug delivery systems desire to know and control the release kinetics, releasing the drug gradually, thus reaching therapeutic levels for a long time and decreasing unwanted effects (Patil et al., 2016; Narayanaswamy & Torchilin, 2019).

Hydrophilic characteristics of chitosan hydrogels allow hydrophilic drugs to be incorporated easily. On the other hand, hydrophobic drugs can also be incorporated, but with strong challenges (Thanou et al., 2001; Peers et al., 2020). Sodium diclofenac, a widely used hydrophilic drug, is classified as a non-steroidal anti-inflammatory with analgesic, antipyretic and anti-inflammatory activity. Despite its excellent applicability, this drug has limited use due to a high rate of undesirable effects such as stomach pain, nausea and gastritis. These effects are caused by the inhibitory action of sodium diclofenac on enzymes (COX-1 and COX-2) that act on the production of prostaglandins. (Pantziarka et al., 2016; Gull et al., 2020; Ailincai

et al., 2021). Gull et al. (2020) developed a chitosan-polyvinylpyrrolidone-based hydrogel with epichlorohydrin as a crosslinking agent for controlled delivery of sodium diclofenac. Among the analyzes performed in this study, the authors evaluated the encapsulation rate and drug release profile. Promising results were revealed, showing an encapsulation efficiency of 84%, when the crosslinking agent was added, and a release profile of >90% of the drug in 130 min. Both characteristics were related to the crosslinking rate with epichlorohydrin, bringing satisfactory results with the increase in the concentration of this polymer (Gull et al., 2020).

Oral drug administration is the most convenient route for patients, however, many drugs become susceptible to physiological barriers, such as an acidic environment in the gastric fluid (Huang et al., 2016). Besides, for many people, the intake of oral medication can cause some sort of discomfort during the stomach residence time of the drug or its absorption. In the development of controlled drug delivery systems, intestinal release can be intended, as it is a region of high absorption and because it has a microbiota capable of degrading natural compounds (Berger et al., 2004; Philip & Philip, 2010; Du et al., 2015). In this way, chitosan hydrogels with chemically and physically modified chains may protect the drug at gastric pH and gradually dissolve in the intestinal portion, maintaining a high bioavailability of the drug (Du et al., 2015). Moreover, chitosan can be degraded by lysozyme, an enzyme that is present in the intestinal portion, through cleavage and destruction of its functional groups (Vo et al., 2021).

Based on the exposed above, in this work, the technological potential of chitosan-based hydrogels crosslinked with genipin was evaluated for the controlled delivery of sodium diclofenac. To our knowledge this is the first time that this specific hydrogel is reported, and that a chitosan/genipin hydrogel is proposed for the oral delivery of sodium diclofenac. Furthermore, the use of genipin extracted *in house* characterize the innovative potential of this work. In addition, drug dissolution tests simulating the GI tract and *in vitro* cytotoxicity tests with fractions taken from these assays have not yet been observed at the literature.

2. Experimental

2.1 Materials

Glacial acetic acid P.A. (Synth); high purity chitosan powder (Sigma-Aldrich, Prod. Number 448869) with 157,82 kDa of weight-average molar mass and degree of deacetylation of 79,0% according to Ribeiro et al. (2021); lyophilized genipin, extracted *in house* from genipap (Luma Frutas Exóticas) according to Bellé et al. (2018); sodium diclofenac, density 0,683 g cm⁻³ (Infinity Pharma); sterile ultrapure water Milli-Q® (Merck).

2.2 Preparation of chitosan/genipin hydrogels

The chitosan/genipin hydrogels were prepared as follows: the chitosan solution (2,5% w/v) was prepared by dissolving 0,125 g of chitosan in 5 mL of deionized water, containing 5% (v/v) of acetic acid at room temperature. After complete solubilization, 0,025 g of sodium diclofenac was added to this solution. Genipin (0,37% w/v) was dissolved in 5 mL of phosphate buffer solution (pH 6,0). Then, the solutions were mixed, in the rate chitosan to genipin of 6,7:1 (Bellé et al., 2018). The solutions were stirred for 5 min and sonicated for more 5 min. The entire formulation (10mL) was placed in a 1,5 mm diameter silicone tubing, held in an upright position. Afterwards, it was stored at 2 to 8 °C during 24 h, followed by 12 h at room temperature. For all analyzes, fragments of the central part of the silicone tubing were used, in order to ensure the proper structure and moisture. The final formulation had the following concentrations: chitosan 1,250% (w/v), genipin 0,185% (w/v) and sodium diclofenac 0,250% (w/v).

2.3 Characterization

2.3.1 Scanning electron microscopy

The morphology analysis was performed using a scanning electron microscopy (SEM) EVO 10 (Zeiss), at 7 kV. Formulation samples were firstly submerged in liquid nitrogen for 3 min and freeze-dried using a bench lyophilizer (LIOBRAS, L101) for 48 h (Heimbuck et al., 2019). Samples were cut transversely

to image the hydrogel networks' cross-section. Sample was mounted to the sample stub using double-sided carbon tape and coated with conductive gold. The images were obtained with magnifications of 60x, 250x and 500x. The estimated network pore sizes were calculated using twenty pores with Image J software. Pore sizes are shown as mean \pm SD.

2.3.2 Differential Scanning Calorimetry Analysis (DSC)

Differential Scanning Calorimetry (DSC) analysis was performed on DSC-60 (Shimadzu), in standard aluminum pans, at a heating rate of 10 °C/min in the temperature range of 100-600 °C. All hydrogel components were analyzed separately, as well as the powder physical mixture and the complete formulation.

2.3.3 Quantification of sodium diclofenac in hydrogels

The total amount of sodium diclofenac incorporated into de hydrogels was determined for samples with a surface area of 0,48 cm² of the hydrogel in 10 mL of pH 6,8 phosphate buffer. The average weight of the hydrogel samples in this analysis was estimated in 0,155 g (\pm 0,01). The samples were incubated for 24 h at ambient temperature, then vortexed for 5 min. Afterwards, the samples were diluted using methanol:water (1:1 v/v) and analyzed on HPLC DAD (Shimadzu) equipment using a validated method. 20 μ L of the sample was injected into a Waters Nova-Pak[®] C18 (60 Å, 4 μ m, 150 x 3,9mm) column at 40 °C, eluted in an isocratic mode (using 70% methanol and 30% 0,01 M pH 3,0 phosphate buffer – KH₂PO₄ + H₃PO₄ – as a mobile phase) at a flow rate of 1 mL/min. UV detection was set to 276 nm. The results were used to determine the concentration of sodium diclofenac for the samples used in the dissolution studies.

2.4 Swelling studies

To determine the swelling rate of the chitosan/genipin hydrogels samples with a surface area of 0,48 cm² were taken. The analysis was carried out in hydrochloric

acid 0,16 M buffer pH 1,2 for 2 h, followed by potassium phosphate 0,10 M buffer pH 6,8 for 22 h. The weight of the hydrogel was determined at specific times, after absorbing excess liquid on filter paper. The swelling rate (SW) was calculated using the Equation (1):

$$SW (\%) = \frac{W_s \times 100}{W_d} \quad (1)$$

Where W_d represents the dry sample and W_s the swollen sample.

2.5 *In vitro* dissolution

Hydrogels samples with a surface area of 0,48 cm² with average weight of 0,127 g (\pm 0,01) were submitted to *in vitro* dissolution test, in Shaker MA 830 (Marconi), with constant temperature and agitation (51 rpm). The study was performed in 10 mL of pH 1,2 hydrochloric acid 0,16 M for 2 h, followed by potassium phosphate 0,10 M buffer pH 6,8 for 22 h at 37 °C. Hydrogel samples were added at pH 1,2 and after 2 h transferred to pH 6,8. Aliquots of 1 mL were taken out at determined time intervals and the same volume of fresh buffer was replaced. The sodium diclofenac release concentration was analyzed on HPLC DAD (Shimadzu) equipment. Experiments were performed in quadruplicate. The release rate was calculated with Equation (2):

$$In\ vitro\ release\ (\%) = \frac{(concent.\ drug\ released\ \times\ 100)}{concent.\ released\ drug\ theor.} \quad (2)$$

The theoretical concentration was calculated based on the weight of the hydrogel sample and the amount of sodium diclofenac determined in 2.3.3.

The release data obtained after dissolution test carried in buffers was fitted to the empirical Weibull equation and mathematical dependent models (Baker-Londsdale, Korsmeyer-Peppas, Hixson-Crowell, Higuchi, and First order) using the software SigmaPlot (Systat Software Inc) version 14. Automatic initial parameter

estimation functions are used for each of these equations, and subsequent iterations are made by the software until the final convergence of the data.

2.6 Simulated gastrointestinal tract (GIT) fluids dissolution studies

Simulation analysis of the gastrointestinal tract was performed with some adaptations of conditions previously reported (Minekus et al., 2014), in a metabolic bath MA 093 (Marconi), at 37 °C and reciprocating agitation. Oral, gastric, and intestinal fluids were filtered with a vacuum filtration system (0,45 µm). In each phase, enzymes (α-amylase; porcine pepsin; pancreatin, and fresh bile, all from Sigma-Aldrich) were added according to the protocol. Hydrogel samples with a surface area of 0,48 cm² with average weight of 0,152 g (± 0,01) were added to 5 mL of oral fluid (pH 7,0) for 1 min. This 1 min phase is designed to mimic exposure of the formulation to salivary conditions during swallow process. Then, the entire content was mixed with 5 mL of gastric fluid (pH 3,0), remaining in incubation for 2 h. Finally, the fluids were mixed with 10 mL of intestinal fluid (pH 7,0), for a further 2 h of incubation. During the experiment, the pH was controlled and adjusted according to each phase. Aliquots from the gastric and intestinal phases were withdrawn at predetermined times (1 and 2 h) for cytotoxicity assays and drug release concentration analysis. The release rate in GIT was calculated with Equation (3):

$$Release\ GIT\ (\%) = \frac{(concent.\ drug\ released\ x\ 100)}{concent.\ released\ drug\ theory} \quad (3)$$

The theoretical concentration was calculated on the weight of the hydrogel sample and the amount of sodium diclofenac determined in 2.3.3.

2.7 *In vitro* cytotoxicity

The cytotoxicity of the individual components, physical mixture and the complete formulation of the chitosan/genipin hydrogel was evaluated through cell

viability assays in Caco-2 (colorectal adenocarcinoma epithelial) and MRC5 (human lung fibroblasts), kept in an incubator at 37 °C with 5 % CO₂. MRC5 cells were maintained with DMEM High Glucose culture medium and fetal bovine serum (10% v/v). MRC5 cells manipulation cycles occurred at 48 h intervals. As for the Caco-2 cells, DMEM Low Glucose culture medium, fetal bovine serum (10% v/v), and non-essential amino acids (1% m/v) were used, with a cell cycle of approximately 62 h. All components were tested in serial dilutions of individual stock solutions which were 2,5 times less concentrated than the final formulation (chitosan 0,5% w/v and acid acetic 1% w/v); except for genipin (0,75% w/v), in which the stock solution prepared for this component was 4 times more concentrated than the final formulation. The cytotoxicity test of chitosan physically mixed with genipin was performed with different concentrations of chitosan and genipin, but always maintaining the proportions used in the hydrogel formulation. Samples from 24 h of *in vitro* dissolution studies and all-time points of dissolution in simulated gastrointestinal tract fluids were also evaluated by MTT in order to evaluate the whole formulation effect.

Cytotoxicity assays were performed using the MTT (3-(4,5-dimethyliazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) reduction method (Berridge & Tan, 1993). For both strains we used cells passages between 5 and 20. Cells were grown in a 96-well plate at a concentration of $2,0 \times 10^4$ cells/mL per well. After 24 h of incubation, treatments were added, which remained in contact with the cells for 6 h or 24 h. For each experiment, a positive control (hydrogen peroxide) and negative control (culture medium enriched with fetal bovine serum) were used. After 6 h or 24 h of incubation, the treatment was withdrawn and then 200 µL of culture medium with 10% (m/v) of MTT were added. The plate was incubated at 37 °C for 3 h, and afterward, the culture medium was removed and 200 µL of DMSO (dimethylsulfoxide) was added to each well for formazan solubilization. Finally, the absorbances were read at 570 nm, in the Spectramax i3 (Molecular Devices) equipment. The percentage of reduced MTT was calculated using Equation (4):

$$Viability = 100 \times \frac{Sample\ absorbance}{Negative\ control\ absorbance} \quad (4)$$

We considered viability below 70% as a cytotoxic potential according to ISO 10993-5 and Srivastava et al. 2018 (International Organization for Standardization, 2009; Srivastava et al., 2018).

2.9 Statistical analysis

Results are reported as mean \pm standard deviation (SD) or mean \pm standard error of the mean (SEM). For cytotoxicity assays, a one-way ANOVA test was performed. Statistical significance is defined as * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ and *** $p < 0,001$. Graphs and statistical analyzes were performed using the software GraphPad Prism version 5.0.

3. Results and discussion

3.1 Characterization

3.1.1 SEM

The macroscopic and morphological (different magnifications) analyses of the hydrogel are shown in Figure 1. The macroscopic analysis of the hydrogel revealed a homogeneous and consistent dosage form, with a shiny surface and a bluish color (Figure 1A). Figure 1B and 1C represents the internal part of the hydrogel, while Figure 1D and 1E presents a side surface. The SEM images of chitosan/genipin hydrogel displayed a highly porous structure, with an average pore size of $21,12 \mu\text{m} (\pm 5,25)$, which provided a good surface area for drug release. The organization and distribution of pores may have been influenced by the freezing and lyophilization processes (Heimbuck et al., 2019). The high density of the hydrogel network seen in the images may favor swelling and drug release characteristics (Ubaid & Murtaza, 2018). The surface side of the formulation showed lower porosity in relation to the internal part, due to direct contact with the silicon tubing, during the hydrogel preparation. Due to this characteristic, it is suspected that drug release is carried out in large quantities through the internal pores of the formulation.

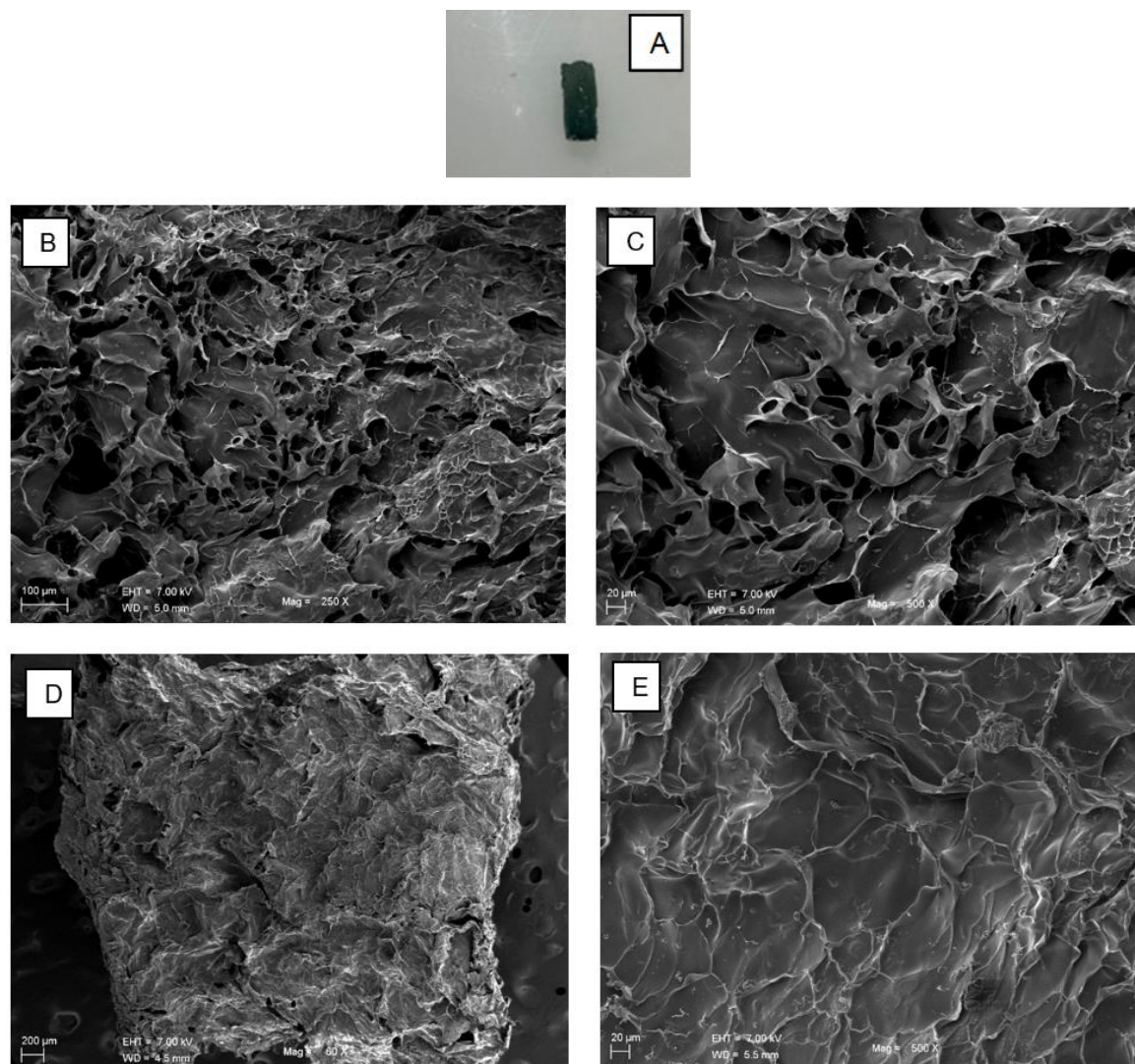


Figure 1 – Macroscopic image (A). SEM images of the internal part of the hydrogel (B: 250x - scale bar of 100 μm and C: 500x - scale bar of 20 μm) and image of the surface side of the hydrogel (D: 60x - scale bar of 200 μm and E: 500x - scale bar of 20 μm).

3.1.2 DSC analyses

DSC thermograms of pure chitosan, genipin, or sodium diclofenac, the powder physical mixture of components, and the hydrogel are shown in Figure 2. The chitosan thermogram shows a characteristic exothermic peak at 302 $^{\circ}\text{C}$, suggestive of degradation due to dehydration and depolymerization (Nair et al.,

2019). Sodium diclofenac has an endothermic peak at 285 °C, in agreement with the reported melting point of this substance (Swain et al., 2015). It is important to highlight that genipin used in this work was extracted in-house from genipap. The genipin thermogram shows a slight exothermic peak at 245 °C, similar to the finding described by Dimida et al. (2015) in the analysis of genipin from Wako chemicals USA. This peak indicates the rearrangement of the cyclic rings of the chain, according to the authors. The analysis of the powder physical mixture components was performed according to the proportions used in the hydrogel, showing the characteristic peak of chitosan, the component in the greatest amount of the formulation. The other components, genipin and sodium diclofenac, present in smaller amounts, had their peaks retracted, related to limits of detection of the equipment itself, dispersion in the polymer matrix, or crystallization (Babu et al., 2008). Due to the strong interactions between the components and the rearrangement of the chains, the hydrogel thermogram presents a specific configuration, making it difficult to distinguish any pure component, as already described by other studies (Ubaid & Murtaza, 2018; Kawamura et al., 2021).

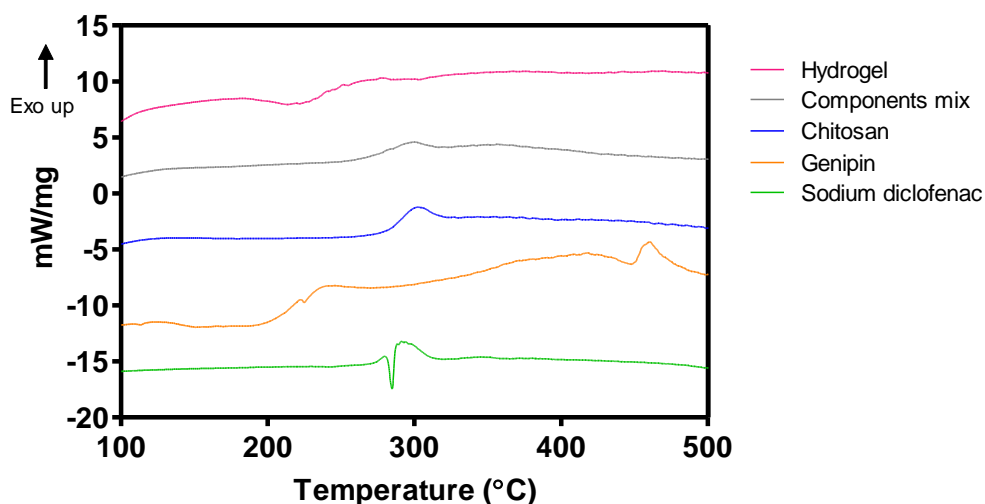


Figure 2 – DSC thermograms of individual components (chitosan, genipin or sodium diclofenac), components mix (chitosan + genipin + sodium diclofenac at the same ratio of formulation) and hydrogel.

3.2 Swelling studies

Hydrogels are structures widely used for their ability to absorb large amounts of water. Here, it is considered that the hydrogel has approximately 98 % (w/w) of water incorporated since the middle part of the silicon tubing was always employed in all experiments and it is assumed that no water loss has occurred. The swelling rate of the chitosan/genipin hydrogel samples is shown in Figure 3. All samples showed a high swelling rate at pH 1,2, with a decrease at pH 6,8, revealing a rapid response to the pH of the dissolution media. This profile can be explained as a function of the low pH at which swelling is dominated by the chitosan cationic network. In a lower pH medium, the protonation leads to chain relaxation, proton diffusion, and dissociation of secondary interactions (Berger et al., 2004). Meanwhile, the electrostatic force between the -NH_3^+ groups of chitosan leads to the expansion of the polymer chain, allowing more water into the hydrogel. As the pH increases to 6,8, the amino groups become deprotonated, inducing the formation of inter- and intra-molecular hydrogen bonds leading to crystalline domains and reducing the hydrophilicity of the hydrogel (Zhao et al., 2011; Cui et al., 2014). Furthermore, as the pH increases erosion of the hydrogel matrix that was observed and release of sodium diclofenac may have influenced the swelling results. This erosion process can be given as loss of polymeric mass of the formulation observed at the end of the experiment (Parhi, 2019).

Cui et al. (2014) developed a chitosan/gelatin hydrogel crosslinked genipin and evaluated the swelling profile with different concentrations of chitosan (1, 2 and 3% w/v), gelatin (2, 5 and 8% w/v) and genipin (0,2, 0,5 and 0,8 mM) at pH 1,2 and pH 7,4. The authors characterized the swelling profile as “superfast” and pH-dependent, with a higher rate at pH 1,2 and decrease at pH 7,4 (CUI et al., 2014). Furthermore, the swelling profile could be controlled by the crosslinking agent concentration, as there was an inverse relationship between the crosslinking agent concentration and the swelling rate. The more crosslinking agent leaves fewer free amino groups for ionization and strengthens the interaction between the polymers of the hydrogel (Ubaid & Murtaza, 2018). Here, our hydrogel presented 1,25% (w/v) equivalent to 79,2 μM for chitosan and 8,18 mM of genipin, suggesting that there is an excess of the crosslinking agent based on molarity.

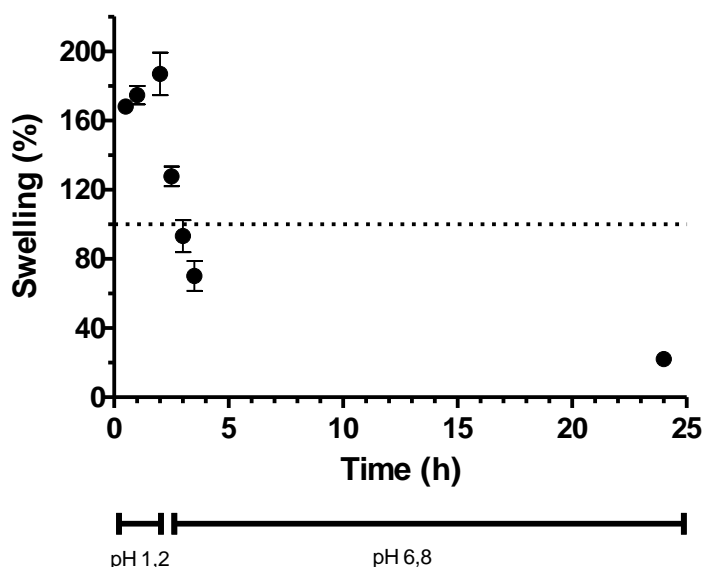


Figure 3 – Swelling profile of chitosan/genipin hydrogels at pH 1,2 (2 h) and pH 6,8 (22 h). The data are mean \pm SD, n=3.

3.3 *In vitro* dissolution

When hydrogels were prepared, 0,025 g of sodium diclofenac were added, and a theoretical concentration of the drug was calculated for the complete formulation. Thus, the analytical concentration found was 2714,84 μg (\pm 262,00) of sodium diclofenac per gram of wet hydrogel. This value was used throughout all dissolution studies in order to obtain uniformized results. Figure 4 shows the release profile of the drug sodium diclofenac. During release at pH 1,2 approximately 10% (\pm 0,43) of the drug was released, while at pH 6,8, in 5 h, 70% (\pm 2,63) was released. The release reached 100% (\pm 12,47) only after 24 h. Our findings reveal a release profile inversely proportional to the swelling. At pH 6,8 the hydrogel has its mass reduced and, consequently, less polymer in the formulation. This loss in hydrogel mass can facilitate drug release by erosion mechanisms (Wang et al., 2020). Recently, a study developed chitosan/alginate microspheres for controlled release of ciprofloxacin and reported a pH-dependent release profile for the drug and polymer matrix erosion, corroborating with our findings (Kyzioł et al., 2017). At acidic pH, chitosan has its amino groups protonated, while genipin remains on its non-

ionized carboxylic groups, forming a network that may reduce the drug release rate. On the other hand, at basic pH, chitosan loses its positive charge, while genipin becomes negatively charged (Ubaid & Murtaza, 2018). After dissolution studies, it was observed that the hydrogel almost disappears in the media, suggestive of the erosion process (Parhi, 2019). It seems that there is a change in the solubility of the chitosan/genipin complex at pH 6,8 compared to pure chitosan, which may be due to modifications in the chitosan matrix caused by crosslinking with genipin (Pujana et al., 2013). However, a study carried out by Bellé et al. (2018) suggests that the crosslinking degree between chitosan and genipin is favored in solutions with a pH greater than 5,5 (Bellé et al., 2018).

An attempt to elucidate the drug release mechanism employed the data of the first 60% of the release curves to fit to different equations. The Weibull function displayed global goodness of fit indicated by a correlation coefficient (r^2) of 0,9898 ($\pm 2,7673$) displaying a sigmoidal curve with exponent $b > 1$ indicative of a complex release mechanism (Papadopoulou et al., 2006). Further five mathematical dependent models were tested: Baker-Londsdale, $r^2 = 0,4838$ ($\pm 19,9743$); Korsmeyer-Peppas, $r^2 = 0,8494$ ($\pm 10,9950$); Hixson-Crowell, $r^2 = 0,7092$ ($\pm 14,9918$); Higuchi, $r^2 = 0,5190$ ($\pm 19,2812$); First order, $r^2 = 0,66831$ ($\pm 15,6488$). Korsmeyer-Peppas presented the best fit among all, although r^2 is below 0,9 and it probably did not represent completely the release profile. In this model, the value of n characterizes the release mechanism of the drug, and here n value was 1,6731 ($\pm 0,2184$) (Ritger & Peppas, 1987), indicating the mechanism which controlled the release of sodium diclofenac from hydrogel was the 'super case II transport'. For this particular case, the dominant mechanism for transport is diffusion due to the swelling of the polymeric matrix. Thus, the drug release profile from the formulation developed in our study may present more than one mechanism acting simultaneously probably because of hydrogel characteristics, such as crosslinking strength, changes in water solubility of the resulting polymer, and chemical properties of the drug. Sodium diclofenac is a weakly acidic drug that presents low solubility at acidic pH, so the release tends to be difficult. On the other hand, in solutions with a near to neutral pH, drug release from hydrogel may be facilitated by drug ionization processes (Grimling & Pluta, 2006).

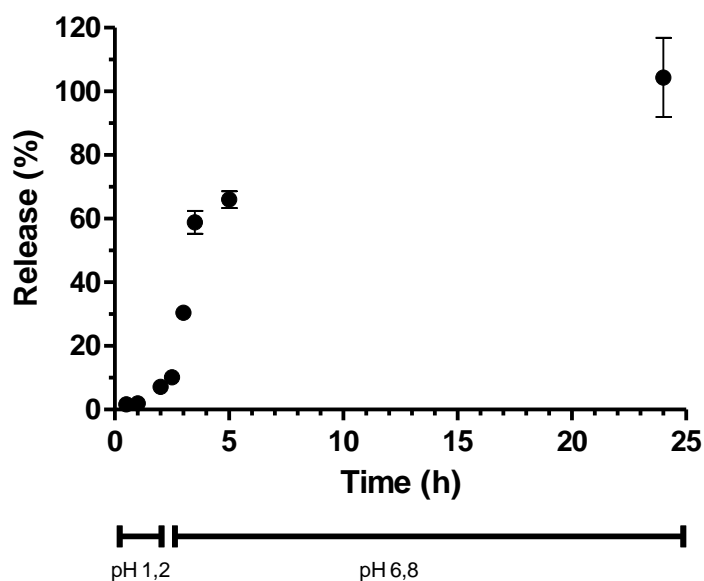


Figure 4 – *In vitro* release profile of sodium diclofenac at pH 1,2 (2 h) and pH 6,8 (22 h). The data are mean \pm SD, n=4.

3.4 Simulated GIT fluids dissolution studies

During oral controlled drug delivery formulations development, parameters such as bioaccessibility and bioavailability of the drug after passing through the gastrointestinal tract are necessary to evaluate the potential of the dosage form (Sorasitthyanukarn et al., 2021). The formulation is susceptible to significant pH changes over the human GI tract, ranging from 1 to 7,5 (Bhattarai et al., 2010). Besides being sensitive to pH, chitosan has excellent mucoadhesive properties, allowing prolonged contact with the intestinal mucosa *in vivo*, improving the drug bioavailability (Mohammadi et al., 2021). And although this was not accessed in this study, it may improve the performance of the proposed hydrogel. Figure 5 shows the drug release profile in GIT simulated fluids. The results reveal minimal drug release at 1 and 2 h of gastric simulation, 4,9% (\pm 2,6), and 6,1% (\pm 1,96) respectively. In the intestinal fluid simulation, there was a release of 80,5% (\pm 0,21) after 1 h and 88,2% (\pm 5,03) for 2 h at this pH. These results support the results found in the *in vitro* dissolution test since there was a greater drug release at higher pH compared to acidic pH. Although it is well known that sodium diclofenac has

weak acid characteristics and may be better absorbed in an acidic environment *in vivo*. Our *in vitro* dissolution studies employing buffers and simulated GIT fluids suggest that this formulation presents an alternative dosage form for sodium diclofenac with enteric protection without the need for capsule coating with synthetic polymers.

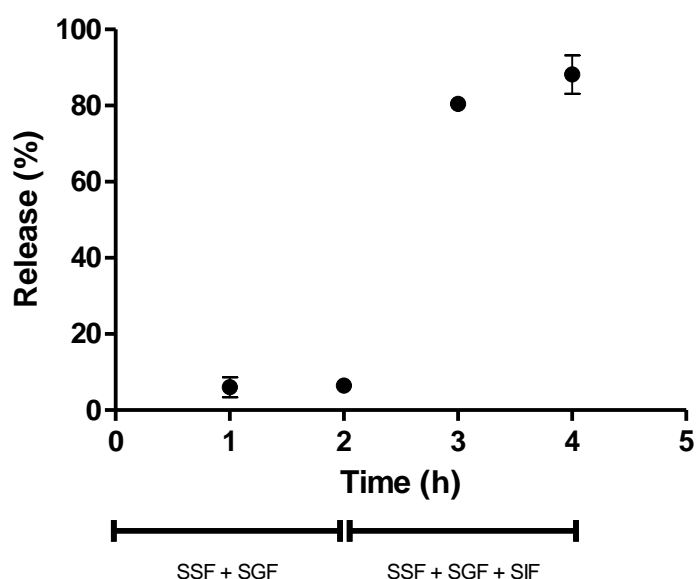


Figure 5 – Simulated GIT release profile of sodium diclofenac at SSF + SGF (2 h) and SSF + SGF + SIF (2 h). SSF - simulated salivary fluid; SGF - simulated gastric fluid and SIF - simulated intestinal fluid. The data are mean \pm SD, n=6.

3.5 Cytotoxicity

The MTT assays were applied to evaluate the cytotoxicity of the formulation components, as well as the media after dissolution studies. Figure 6 shows the 6 h and 24 h MTT results of the formulation components. Significant results were found compared to the positive control, especially at the lowest concentrations. In general, our results show cell viability between 75% (\pm 5,94) and 92% (\pm 5,68) at the two lowest concentrations of all components tested in MRC5 cells. In Caco-2 cells, the cell viability was between 87% (\pm 4,68) and 106% (\pm 3,71). Concerning the physical

mixture test of chitosan and genipin, in both strains, better results were found in the two lowest concentrations tested of chitosan (0,05% and 0,0025% w/v) and genipin (0,0075% and 0,00375% w/v). The Caco-2 strain showed a more resistant profile compared to MRC5. Viability in Caco-2 cells remained between 91% ($\pm 5,11$) and 102% ($\pm 13,44$). Data not shown in Figure 6.

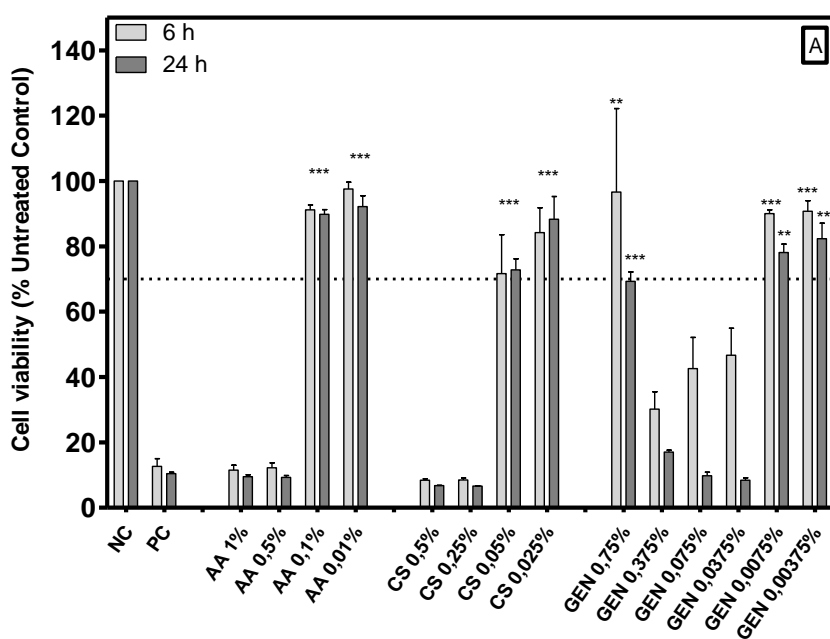
Interestingly, we found high viability in MRC5 cells, mainly at 6 h, at the first (0,75% w/v) genipin concentration tested. However, this high viability is an artifact that can be explained by the fact that genipin reacts with proteins and amino groups found in fetal bovine serum, forming a bluish pigment. This pigmentation can induce errors in the absorbance reading of the tests (Wang et al., 2011).

Specifically, for genipin, Kawamura et al. (2021) found cell viability between 60 e 100% for concentrations of 0 – 0,1 mM (0,002% w/v) of a commercial genipin tested on Chinese hamster lung fibroblast V79 cells. Higher concentrations of genipin (0,5 – 5 mM or 0,011 – 0,11% w/v) showed cell viability below 60% (Kawamura et al., 2021). Here for our in-house extracted genipin, similar results were seen in human lung fibroblasts MRC5 cells, and more than 70% cell viability was observed on Caco-2 cells for concentrations of 0,075% (w/v) (3,3 mM) and below of genipin.

Caco-2 cells showed a more resistant profile in our study, responding better to treatments of corresponding concentrations than MRC5 cells. This acceptability should be highlighted since Caco-2 culture gets so close to the real intestinal portion. High cell viability was also seen for cytotoxicity tests of gelatin/chitosan/polyvinyl alcohol hydrogels. on HT29-MTX-E12 cells (human colorectal adenocarcinoma). Sterilized hydrogel extracts at different concentrations (100, 50, 25, 12,5, and 0%) displayed viability >80% (Rodríguez-Rodríguez et al., 2020). Sterilization of the extracts may have potentiated the non-toxic action of chitosan. In our study, we used lower concentrations of chitosan and did not sterilize any solution.

In both strains evaluated, we observed better results at 6 h when compared to 24 h results. Taking into account that drugs are likely to be in contact with intestinal epithelia for less than 24 h *in vivo*, studies carried out at 6 h may be more

informative. Overall, MTT results indicated that hydrogel components were not cytotoxic against MRC5 and Caco-2 cells at concentrations approximately 25 times lower than that found in complete hydrogel formulation (Table 1). However, we must consider that the hydrogel complete formulation is prepared from 10 mL total volume, and it would be split to be orally administered. Furthermore, the formulation will be probably diluted in the patient digestive tract fluids, and cytotoxicity analysis of dissolution media (Table 1, Figure 7) may represent a more realistic comparison to that found *in vivo*.



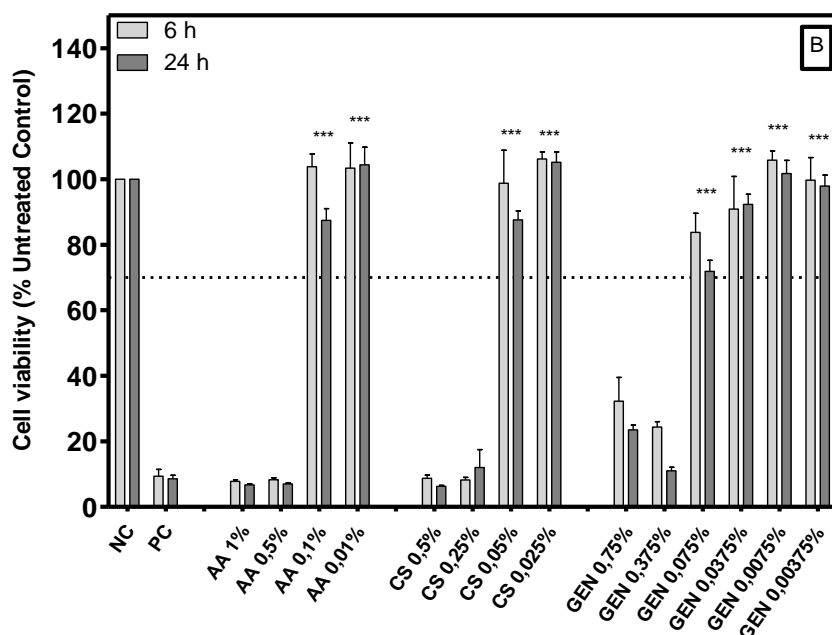
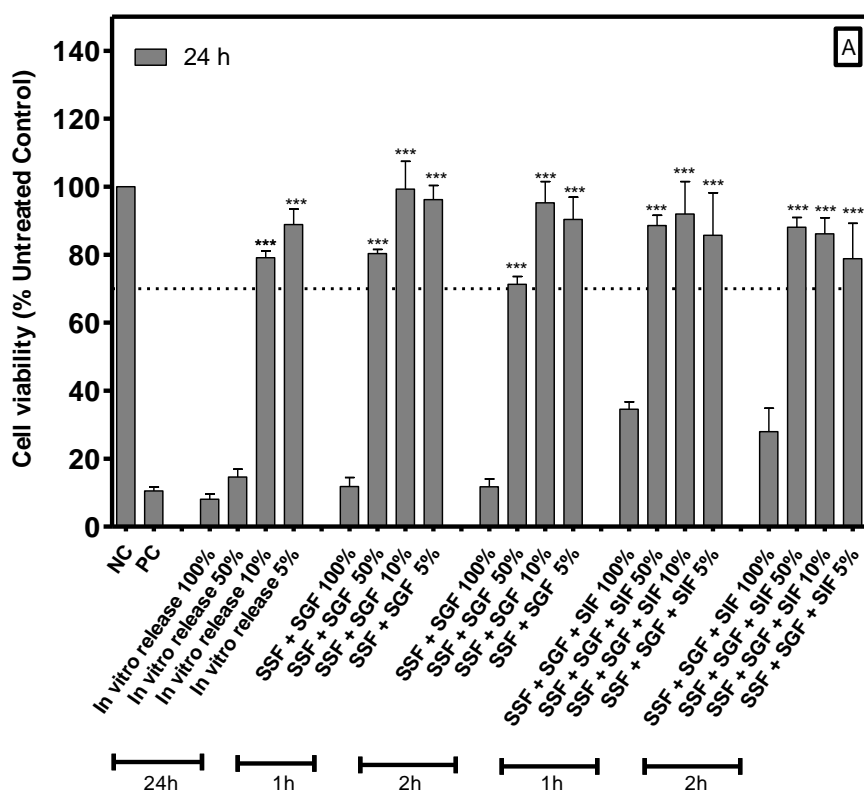


Figure 6 – The effect of hydrogel components on the viability of A: MRC5 and B: Caco-2 cells (NC: negative control / PC: positive control / AA: acid acetic / CS: chitosan / GEN: genipin). The data are mean \pm SEM, n=3 (wells and plates triplicate) for each cell culture (one-way ANOVA: **p<0,01, ***p<0,001).

	Chitosan		Genipin		Acetic acid		Sodium diclofenac	
	μ M	% (w/v)	mM	% (w/v)	mM	% (v/v)	mM	% (w/v)
Hydrogel	79,20	1,250	8,18	0,185	440,00	2,500	8,44	0,250
<i>In vitro</i> dissolution	1,09	0,017	0,113	0,0020	5,74	0,034	0,116	0,0034
SSF + SGF	1,29	0,020	0,133	0,0030	6,78	0,040	0,137	0,0040
SSF + SGF + SIF	1,07	0,016	0,110	0,0025	5,65	0,033	0,114	0,0033

Table 1 – concentration of each component present in the original hydrogel formulation and after dissolution studies named as *in vitro* dissolution and simulated GIT fluids (SSF: simulated salivary fluid / SGF: simulated gastric fluid / SIF: simulated intestinal fluid).

Cells treated with 100% (w/v) of the dissolution media showed decreased viability since no culture medium was incorporated into the treatment. This is reversed when we dilute the treatment with a culture medium (concentrations between 50 and 5% w/v). For these concentrations, our findings reveal cell viability between 71% ($\pm 4,07$) and 106% ($\pm 15,14$) for both strains. Except for the treatment with *in vitro* dissolution fluid, which showed viability of 14% ($\pm 3,99$) in MRC5 cells at a concentration of 50% (w/v). In this study, we also tested the dissolution media without the formulation as a control (data not shown here), and the results found are almost equal to those in Figure 7. Due to this, we concluded that the formulation did not present an isolated cytotoxic effect in MRC5 and Caco-2 cells, but a combined effect with the dissolution fluids.



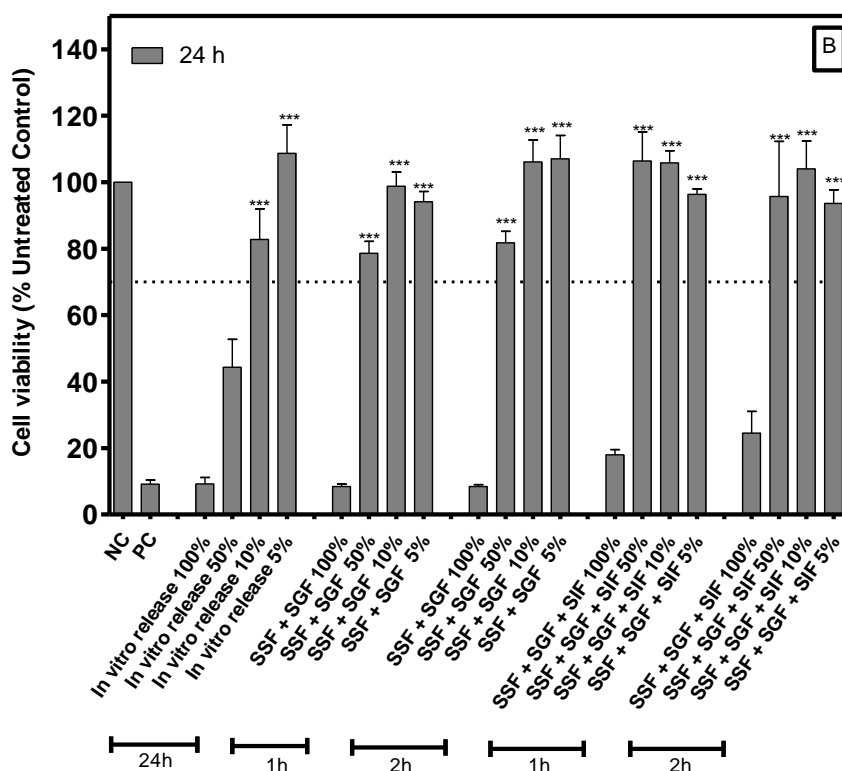


Figure 7 - The effect of the complete formulation after dissolution studies on the viability of A: MRC5 and B: Caco-2 cells (NC: negative control / PC: positive control / *In vitro* release: dissolution studies / SSF: simulated salivary fluid / SGF: simulated gastric fluid / SIF: simulated intestinal fluid). The data are mean \pm SEM, n=3 (wells and plates triplicate) for each cell culture (one-way ANOVA: ***p<0,001).

4. Conclusion

We successfully prepared chitosan crosslinked genipin hydrogel containing sodium diclofenac. Our findings suggest that the proposed formulation displays a pH-dependent drug release profile, which may provide intrinsic enteric protection. Additionally, MTT assays showed that the formulation components and the hydrogel did not induce cytotoxic effects in MRC5 and Caco-2 cells over 6 and 24 h. The formulation developed in this study is formed by naturally occurring substances and demonstrated excellent results as a dosage form for a gastro-resistant drug delivery system.

Funding: This work was supported by Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre and Universidade do Vale do Taquari – Univates. Also received support by Project number 17/2551-0000 779-4 – FAPERGS.

References

- Ailincăi, D., Agop, M., Marinas, I. C., Zala, A., Irimiciuc, S. A., Dobreci, L., Petrescu, T. C., & Volovat, C. (2021). Theoretical model for the diclofenac release from PEGylated chitosan hydrogels. *Drug Delivery*, 28(1), 261–271. <https://doi.org/10.1080/10717544.2021.1876181>
- Babu, V. R., Hosamani, K. M., & Aminabhavi, T. M. (2008). Preparation and in-vitro release of chlorothiazide novel pH-sensitive chitosan-N,N'-dimethylacrylamide semi-interpenetrating network microspheres. *Carbohydrate Polymers*, 71(2), 208–217. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2007.05.039>
- Bellé, A. S., Hackenhaar, C. R., Spolidoro, L. S., & Rodrigues, E. (2018). Efficient enzyme-assisted extraction of genipin from genipap (*Genipa americana* L.) and its application as a crosslinker for chitosan gels. *Food Chemistry*, 246, 266–274. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.11.028>
- Berger, J., Reist, M., Mayer, J. M., Felt, O., Peppas, N. A., & Gurny, R. (2004). Structure and interactions in covalently and ionically crosslinked chitosan hydrogels for biomedical applications. In *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* (Vol. 57, Issue 1, pp. 19–34). Elsevier. [https://doi.org/10.1016/S0939-6411\(03\)00161-9](https://doi.org/10.1016/S0939-6411(03)00161-9)
- Berridge, M. v., & Tan, A. S. (1993). Characterization of the Cellular Reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): Subcellular Localization, Substrate Dependence, and Involvement of Mitochondrial Electron Transport in MTT Reduction. In *Archives of Biochemistry and Biophysics* (Vol. 303, Issue 2, pp. 474–482). <https://doi.org/10.1006/abbi.1993.1311>
- Bhattarai, N., Gunn, J., & Zhang, M. (2010). Chitosan-based hydrogels for controlled, localized drug delivery. In *Advanced Drug Delivery Reviews* (Vol. 62, Issue 1, pp. 83–99). <https://doi.org/10.1016/j.addr.2009.07.019>
- Broquá, J., Zanin, B. G., Flach, A. M., Mallmann, C., Taborda, F. G. D., Machado, L. E. L., Alves, S. M. L., Silva, M. M., & Dias, R. J. S. P. (2019). Methods of Chitin Production a Short Review. *Am J Biomed Sci & Res*, 307–314. <https://doi.org/10.34297/AJBSR.2019.03.000682>

- Cui, L., Jia, J., Guo, Y., Liu, Y., & Zhu, P. (2014). Preparation and characterization of IPN hydrogels composed of chitosan and gelatin cross-linked by genipin. *Carbohydrate Polymers*, *99*, 31–38. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.08.048>
- Dash, M., Chiellini, F., Ottenbrite, R. M., & Chiellini, E. (2011). Chitosan—A versatile semi-synthetic polymer in biomedical applications. *Progress in Polymer Science*, *36*(8), 981–1014. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2011.02.001>
- Du, H., Liu, M., Yang, X., & Zhai, G. (2015). The design of pH-sensitive chitosan-based formulations for gastrointestinal delivery. In *Drug Discovery Today* (Vol. 20, Issue 8, pp. 1004–1011). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2015.03.002>
- Gao, L., Gan, H., Meng, Z., Gu, R., Wu, Z., Zhang, L., Zhu, X., Sun, W., Li, J., Zheng, Y., & Dou, G. (2014). Effects of genipin cross-linking of chitosan hydrogels on cellular adhesion and viability. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, *117*, 398–405. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2014.03.002>
- Garnica-Palafox, I. M., & Sánchez-Arévalo, F. M. (2016). Influence of natural and synthetic crosslinking reagents on the structural and mechanical properties of chitosan-based hybrid hydrogels. *Carbohydrate Polymers*, *151*, 1073–1081. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.06.036>
- Grimling, B., & Pluta, J. (2006). In vitro investigation of sodium diclofenac adsorption on sucralfate. *Acta Poloniae Pharmaceutica - Drug Research*, *63*(6), 515–520.
- Gull, N., Khan, S. M., Butt, O. M., Islam, A., Shah, A., Jabeen, S., Khan, S. U., Khan, A., Khan, R. U., & Butt, M. T. Z. (2020). Inflammation targeted chitosan-based hydrogel for controlled release of diclofenac sodium. *International Journal of Biological Macromolecules*, *162*, 175–187. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.06.133>
- Harris, R., Lecumberri, E., & Heras, A. (2010). Chitosan-genipin microspheres for the controlled release of drugs: Clarithromycin, tramadol and heparin. *Marine Drugs*, *8*(6), 1750–1762. <https://doi.org/10.3390/md8061750>
- Heimbuck, A. M., Priddy-Arrington, T. R., Sawyer, B. J., & Caldorera-Moore, M. E. (2019). Effects of post-processing methods on chitosan-genipin hydrogel properties. *Materials Science and Engineering C*, *98*, 612–618. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2018.12.119>
- Hobbs, C. A., Koyanagi, M., Swartz, C., Davis, J., Maronpot, R., Recio, L., & Hayashi, S. (2018). Genotoxicity evaluation of the naturally-derived food colorant, gardenia blue, and its precursor, genipin. *Food and Chemical Toxicology*, *118*, 695–708. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.06.001>

- Huang, G. Q., Cheng, L. Y., Xiao, J. X., Wang, S. Q., & Han, X. N. (2016). Genipin-crosslinked O-carboxymethyl chitosan-gum Arabic coacervate as a pH-sensitive delivery system and microstructure characterization. *Journal of Biomaterials Applications*, 31(2), 193–204. <https://doi.org/10.1177/0885328216651393>
- International Organization for Standardization. (2009). *Biological evaluation of medical devices-form. 2009*.
- Jayakumar, R., Prabakaran, M., Kumar, P. T. D., Nair, S. v, & Tamura, H. (2011). Biomaterials based on chitin and chitosan in wound dressing applications. *Biotechnology Advances*, 29(3), 322–337. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.01.005>
- Kawamura, T., Yunoki, S., Ohyabu, Y., Uraoka, T., & Muramatsu, K. (2021). Crosslinking efficacy and cytotoxicity of genipin and its activated form prepared by warming it in a phosphate buffer: A comparative study. *Materials*, 14(21). <https://doi.org/10.3390/ma14216600>
- Kim, E. S., Jeong, C. S., & Moon, A. (2012). Genipin, a constituent of *Gardenia jasminoides* Ellis, induces apoptosis and inhibits invasion in MDA-MB-231 breast cancer cells. *Oncology Reports*, 27(2), 567–572. <https://doi.org/10.3892/or.2011.1508>
- Kyziół, A., Mazgala, A., Michna, J., Regiel-Futyra, A., & Sebastian, V. (2017). Preparation and characterization of alginate/chitosan formulations for ciprofloxacin-controlled delivery. *Journal of Biomaterials Applications*, 1–13. <https://doi.org/10.1177/0885328217714352>
- Li, Y. H., Cheng, C. Y., Wang, N. K., Tan, H. Y., Tsai, Y. J., Hsiao, C. H., Ma, D. H. K., & Yeh, L. K. (2015). Characterization of the modified chitosan membrane cross-linked with genipin for the cultured corneal epithelial cells. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 126, 237–244. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2014.12.029>
- Minekus, M., Almingier, M., Alvito, P., Ballance, S., Bohn, T., Bourlieu, C., Carrière, F., Boutrou, R., Corredig, M., Dupont, D., Dufour, C., Egger, L., Golding, M., Karakaya, S., Kirkhus, B., le Feunteun, S., Lesmes, U., Maclerzanka, A., MacKie, A., ... Brodkorb, A. (2014). A standardised static in vitro digestion method suitable for food-an international consensus. *Food and Function*, 5(6), 1113–1124. <https://doi.org/10.1039/c3fo60702j>
- Mohammadi, Z., Eini, M., Rastegari, A., & Tehrani, M. R. (2021). Chitosan as a machine for biomolecule delivery: A review. *Carbohydrate Polymers*, 256(July 2020), 117414. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.117414>
- Muzzarelli, R. A. A. (2009). Genipin-crosslinked chitosan hydrogels as biomedical and pharmaceutical aids. *Carbohydrate Polymers*, 77(1), 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2009.01.016>

- Nair, R. S., Morris, A., Billa, N., & Leong, C. O. (2019). An Evaluation of Curcumin-Encapsulated Chitosan Nanoparticles for Transdermal Delivery. *AAPS PharmSciTech*, 20(2), 1–13. <https://doi.org/10.1208/s12249-018-1279-6>
- Narayanaswamy, R., & Torchilin, V. P. (2019). Hydrogels and their applications in targeted drug delivery. *Molecules*, 24(3). <https://doi.org/10.3390/molecules24030603>
- Pantziarka, P., Sukhatme, V., Bouche, G., Meheus, L., & Sukhatme, V. P. (2016). Repurposing Drugs in Oncology (ReDO) - Diclofenac as an anti-cancer agent. *Ecancermedicalscience*, 10, 1–28. <https://doi.org/10.3332/ecancer.2016.610>
- Papadopoulou, V., Kosmidis, K., Vlachou, M., & Macheras, P. (2006). On the use of the Weibull function for the discernment of drug release mechanisms. *International Journal of Pharmaceutics*, 309(1–2), 44–50. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2005.10.044>
- Parhi, R. (2019). *Chitin and Chitosan in Drug Delivery* (Vol. 12, pp. 175–239). <https://doi.org/10.1007/978-94-007-5961-9>
- Patil, S., Mhaskar, A., & Mundhada, D. (2016). A review on novel drug delivery system: a recent trend. *International Journal of Current Pharmaceutical & Clinical Research*, 6(2), 89–93.
- Peers, S., Montembault, A., & Ladavière, C. (2020). Chitosan hydrogels for sustained drug delivery. In *Journal of Controlled Release* (Vol. 326, pp. 150–163). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2020.06.012>
- Philip, A. K., & Philip, B. (2010). Colon Targeted Drug Delivery Systems: A Review on Primary and Novel Approaches. *Oman Medical Journal*, 25(2), 70–78. <https://doi.org/10.5001/omj.2010.24>
- Pujana, M. A., Pérez-Álvarez, L., Iturbe, L. C. C., & Katime, I. (2013). Biodegradable chitosan nanogels crosslinked with genipin. *Carbohydrate Polymers*, 94(2), 836–842. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.01.082>
- Ribeiro, J. C. V., Forte, T. C. M., Tavares, S. J. S., Andrade, F. K., Vieira, R. S., & Lima, V. (2021). The effects of the molecular weight of chitosan on the tissue inflammatory response. *Journal of Biomedical Materials Research - Part A*, 109(12), 2556–2569. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.37250>
- Ritger, P. L., & Peppas, N. A. (1987). A simple equation for description of solute release II. Fickian and anomalous release from swellable devices. *Journal of Controlled Release*, 5(1), 37–42. [https://doi.org/10.1016/0168-3659\(87\)90035-6](https://doi.org/10.1016/0168-3659(87)90035-6)
- Rodríguez-Rodríguez, R., Velasquillo-Martínez, C., Knauth, P., López, Z., Moreno-Valtierra, M., Bravo-Madrugal, J., Jiménez-Palomar, I., Luna-Bárceñas, G., Espinosa-Andrews, H., & García-Carvajal, Z. Y. (2020). Sterilized

- chitosan-based composite hydrogels: Physicochemical characterization and in vitro cytotoxicity. *Journal of Biomedical Materials Research - Part A*, 108(1), 81–93. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.36794>
- Shariatinia, Z., & Jalali, A. M. (2018). Chitosan-based hydrogels: Preparation, properties and applications. *International Journal of Biological Macromolecules*, 115, 194–220. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.04.034>
- Sorasitthyanukarn, F. N., Muangnoi, C., Rojsitthisak, P., & Rojsitthisak, P. (2021). Chitosan-alginate nanoparticles as effective oral carriers to improve the stability, bioavailability, and cytotoxicity of curcumin diethyl disuccinate. *Carbohydrate Polymers*, 256(July 2020), 117426. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.117426>
- Srivastava, G. K., Alonso-Alonso, M. L., Fernandez-Bueno, I., Garcia-Gutierrez, M. T., Rull, F., Medina, J., Coco, R. M., & Pastor, J. C. (2018). Comparison between direct contact and extract exposure methods for PFO cytotoxicity evaluation. *Scientific Reports*, 8(1), 1–9. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-19428-5>
- Sung, H. W., Huang, R. N., Huang, L. H., & Tsai, C. C. (1999). In vitro evaluation of cytotoxicity of a naturally occurring cross-linking reagent for biological tissue fixation. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 10(1), 63–78. <https://doi.org/10.1163/156856299X00289>
- Swain, R. P., Nagamani, R., & Panda, S. (2015). Formulation, in vitro characterization and stability studies of fast dispersing tablets of diclofenac sodium. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 5(7), 94–102. <https://doi.org/10.7324/JAPS.2015.50715>
- Thanou, M., Verhoef, J. C., & Junginger, H. E. (2001). Oral drug absorption enhancement by chitosan and its derivatives. In *Advanced Drug Delivery Reviews* (Vol. 52). www.elsevier.com/locate/drugdeliv
- Ubaid, M., & Murtaza, G. (2018). Fabrication and characterization of genipin cross-linked chitosan/gelatin hydrogel for pH-sensitive, oral delivery of metformin with an application of response surface methodology. *International Journal of Biological Macromolecules*, 114, 1174–1185. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.04.023>
- Vaghani, S. S., Patel, M. M., & Satish, C. S. (2012). Synthesis and characterization of pH-sensitive hydrogel composed of carboxymethyl chitosan for colon targeted delivery of ornidazole. *Carbohydrate Research*, 347(1), 76–82. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2011.04.048>
- Vo, N. T. N., Huang, L., Lemos, H., Mellor, A. L., & Novakovic, K. (2021). Genipin-crosslinked chitosan hydrogels: Preliminary evaluation of the in vitro

- biocompatibility and biodegradation. *Journal of Applied Polymer Science*, 138(34). <https://doi.org/10.1002/app.50848>
- Wang, C., Lau, T. T., Loh, W. L., Su, K., & Wang, D. A. (2011). Cytocompatibility study of a natural biomaterial crosslinker-Genipin with therapeutic model cells. *Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials*, 97 B(1), 58–65. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.31786>
- Wang, S., Liu, R., Fu, Y., & Kao, W. J. (2020). Release Mechanisms and Applications of Drug Delivery Systems for Extended-Release. *Expert Opinion on Drug Delivery*, 0(0). <https://doi.org/10.1080/17425247.2020.1788541>
- Xu, J., Strandman, S., Zhu, J. X. X., Barralet, J., & Cerruti, M. (2015). Genipin-crosslinked catechol-chitosan mucoadhesive hydrogels for buccal drug delivery. *Biomaterials*, 37, 395–404. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2014.10.024>
- Yu, Y., Xu, S., Li, S., & Pan, H. (2021). Genipin-cross-linked hydrogels based on biomaterials for drug delivery: A review. In *Biomaterials Science* (Vol. 9, Issue 5, pp. 1583–1597). Royal Society of Chemistry. <https://doi.org/10.1039/d0bm01403f>
- Zhao, S. P., Li, L. Y., Cao, M. J., & Xu, W. L. (2011). PH- and thermo-sensitive semi-IPN hydrogels composed of chitosan, N-isopropylacrylamide, and poly(ethylene glycol)-co-poly(ϵ -caprolactone) macromer for drug delivery. *Polymer Bulletin*, 66(8), 1075–1087. <https://doi.org/10.1007/s00289-010-0390-y>

5. DISCUSSÃO

Neste trabalho objetivou-se avaliar o potencial, em termos de perfil de liberação *in vitro* e citotoxicidade de hidrogéis de quitosana reticulados com genipina para entrega oral de diclofenaco de sódio. Nosso objetivo inicial era desenvolver microesferas ao invés de hidrogéis, no entanto, testes de dissolução *in vitro* apresentaram concentrações muito baixas do fármaco após 24 h de ensaios em pH 1,2 (2 h) e pH 6,8 (22 h). Diferentes estratégias de formulações foram realizadas, mas resultados insatisfatórios persistiram (Anexo 1). Por meio de revisão da literatura arquitetou-se um projeto para desenvolvimento de hidrogéis, estruturas 3D, maleáveis com capacidade de grande absorção de água. A partir disto, testes preliminares foram realizados e resultados adequados foram achados.

Diante disso, iniciou-se a caracterização do hidrogel. Características como morfologia, capacidade de absorção de água e perfil termoquímico foram analisadas. A análise da morfologia do hidrogel através de imagens de microscopia eletrônica de varredura revelou uma estrutura com alta porosidade. Os poros apresentaram tamanho médio de 21,12 μm ($\pm 5,25$), promovendo ótimas condições para a liberação do fármaco. A parte lateral do hidrogel também foi analisada, e encontramos uma superfície mais lisa e com menor quantidade de poros, devido ao contato com a mangueira de silicone durante a preparação da formulação. O perfil de intumescimento realizado em tampão ácido seguido de tampão próximo ao neutro revelou a capacidade retenção de tampão em pH ácido com expansão da rede polimérica do hidrogel. Estes achados corroboram com estudos descritos na literatura e são explicados devido a protonação dos grupamentos amino da quitosana e pela expansão de sua cadeia polimérica (DU et al., 2015; UBAID; MURTAZA, 2018). Baseado nestes resultados, concluímos que o hidrogel desenvolvido tem sua atividade dependente do pH do meio de dissolução.

Para elucidar a liberação do fármaco, análises *in vitro* e com meios simulados do TGI foram realizadas. E através de análises da concentração do fármaco utilizado constatamos que a liberação em pH ácido, simulando a porção gástrica, foi mínima em comparação à liberação em pH próximo ao neutro ou fluidos

intestinais. O estudo de dissolução *in vitro* conduzido em pH 1,2 revelou que aproximadamente 10% ($\pm 0,43$) da concentração analítica do diclofenaco de sódio foi liberada em 2 horas e 70% ($\pm 13,5$) em 5 horas no pH 6,8. Observamos uma característica intrínseca de proteção entérica que pode ser conferida pelo hidrogel proposto. A genipina, através da reticulação de cadeias poliméricas, forma ligações fortes com a quitosana e auxilia no controle do intumescimento e da erosão do hidrogel (YU et al., 2021). Ainda, a liberação do fármaco também pode ser modulada por características de solubilidade da quitosana e do próprio diclofenaco de sódio. A baixa ionização do diclofenaco de sódio em soluções com pH ácido dificulta a dissolução do fármaco. Por outro lado, o aumento do pH do meio de dissolução pode facilitar a liberação do fármaco da formulação (GRIMLING; PLUTA, 2006). Modelagem matemática dos dados do ensaio de dissolução *in vitro* revelaram uma liberação do tipo complexa, com diferentes mecanismos atuando na liberação do fármaco a partir da matriz do hidrogel.

De acordo com Du et al. (2015), algumas doenças sistêmicas patologias do sistema nervoso necessitam de tratamentos com grande absorção de fármaco na porção intestinal e poucos efeitos adversos. Neste sentido, dispositivos, como o desenvolvido neste estudo, chamam a atenção por apresentarem este perfil de liberação. Ainda mais por conterem compostos como a quitosana, que além de ser natural, apresenta potencial de mucoaderência, apesar disso não ter sido avaliado nesse trabalho. Tal característica prolonga o tempo de contato entre a mucosa e a formulação, aumentando assim, a biodisponibilidade do fármaco na porção intestinal (DU et al., 2015).

E além dessas características, a quitosana e a genipina, principais componentes do hidrogel desenvolvido, apresentam ótimos resultados em termos de biocompatibilidade. Diversos estudos já avaliaram o comportamento de diferentes linhagens celulares frente a estes compostos e diferentes formulações. Neste estudo também avaliamos a viabilidade celular dos componentes do hidrogel, em frações retiradas da dissolução *in vitro* e da simulação do TGI. Os testes foram realizados em 6 e 24 horas para conhecermos a citotoxicidade da degradação da formulação em um período normal (2 a 6 horas) do trânsito gastrointestinal e uma extrapolação de 24 horas (NAEEM et al., 2020). Escolhemos trabalhar com células

Caco-2 por melhor se aproximarem da mucosa humana tendo em vista a via de administração sugerida neste trabalho, e com células MRC5 por serem células humanas e apresentarem perfil mais sensível quando comparadas com células Caco-2.

Em relação aos componentes, testamos diluições seriadas, sendo a primeira diluição 2,5 vezes menor que a concentração presente na formulação final; exceto para a genipina que apresentou a solução estoque 4 vezes mais concentrada que o hidrogel para esse componente. Esta condição de redução da concentração inicial para as análises foi assumida uma vez que a formulação final administrada será uma parte do hidrogel preparado em cada lote e ainda será diluída pelos fluidos presente no trato gastrointestinal, pensado em uma administração *in vivo*.

Por mais que características não tóxicas já tenham sido reportadas, também objetivamos conhecer a citotoxicidade da quitosana e da genipina, separadas e misturas fisicamente. Diferentemente de estudos descritos na literatura, a genipina utilizada para desenvolver o hidrogel foi extraída *in house* a partir do Jenipapo. Diante deste fato, justificamos a necessidade de realizar os testes de viabilidade celular e também o incremento na concentração da solução estoque para essa substância.

Observamos melhores resultados de viabilidade, entre 99% ($\pm 11,9$) e 106% ($\pm 3,71$), em células Caco-2 e em 6 horas de tratamento. Esta linhagem apresentou perfil com maior aceitabilidade aos tratamentos. Estes achados sustentam a biocompatibilidade dos componentes, uma vez que a linhagem Caco-2 melhor se aproxima às células presentes na porção intestinal *in vivo*. Além disso, o tempo do trânsito normal de um trato gastrointestinal se aproxima aos resultados de 6 horas de tratamento. Estes resultados corroboram com achados já descritos em relação à efeitos não citotóxicos da quitosana e da genipina (WU et al., 2018; RODRÍGUEZ-RODRÍGUEZ et al., 2020; KAWAMURA et al., 2021).

O teste de citotoxicidade da quitosana misturada fisicamente com a genipina foi realizado com diferentes concentrações de quitosana e de genipina, mas sempre mantendo as proporções utilizadas na formulação do hidrogel. Em ambas as linhagens, melhores resultados foram encontrados nas duas concentrações mais

baixas testadas de quitosana (0,05% e 0,0025%) e de genipina (0,0075% e 0,00375%). E mais uma vez, a linhagem Caco-2 mostrou perfil mais resistente em comparação à MRC5. A viabilidade nas células Caco-2 permaneceu entre 91% (\pm 5,11) e 102% (\pm 13,44), corroborando com nossos demais achados.

Já em relação a citotoxicidade das frações retiradas dos meios de dissolução, observamos viabilidade baixa na primeira concentração (100%), com aumento considerável nas diluições subsequentes. Este perfil de viabilidade também foi observado nos testes que realizamos somente com os meios. Ressaltamos que no protocolo empregado aqui, as concentrações de 100% não possuem meio de cultura, desfavorecendo as atividades das células. Desta forma, sugerimos que a formulação não desempenhou um efeito isolado de citotoxicidade, mas sim, um efeito combinado com os meios usados no ensaio de dissolução.

6. CONCLUSÕES

Foi desenvolvido com sucesso um hidrogel à base de polímeros naturais, quitosana e genipina, para a entrega controlada de diclofenaco de sódio através de administração oral. A genipina, extraída *in house*, desempenhou um excelente papel como agente reticulador. Através de diversos ensaios, observamos que a formulação do hidrogel desenvolvida é um dispositivo natural com potencial para utilização na entrega controlada de diclofenaco de sódio, com perfil gastroresistente e que não apresenta citotoxicidade em células MRC5 e Caco-2 nas concentrações avaliadas.

7. PERSPECTIVAS

A formulação desenvolvida neste estudo poderá ser acondicionada dentro de cápsulas de gelatina mole para ser administrada oralmente. Além de auxiliar na administração do hidrogel, a cápsula mantém a umidade da formulação, auxiliando na preservação das propriedades aqui descritas. Trabalhos futuros podem ser desenvolvidos para aumentar a compreensão deste dispositivo em termos de

mecanismos de reticulação e modulação do perfil de liberação do fármaco. Ainda, estudos *in vivo* e outros possíveis alvos terapêuticos também são pontos passíveis de serem analisados. Por fim, uma característica muito importante, e já ressaltada, é a utilização de produtos naturais, como a quitosana e a genipina, em tempos de apelo a mais ações sustentáveis e renováveis. Sabe-se que a indústria farmacêutica gera muito resíduo ao ambiente, portanto, formulações naturais, como a desenvolvida neste estudo, devem ser cada vez mais incentivadas pela pesquisa.

8. REFERÊNCIAS

- AILINCAI, D. et al. Theoretical model for the diclofenac release from PEGylated chitosan hydrogels. **Drug Delivery**, v. 28, n. 1, p. 261–271, 2021.
- ALI, A.; AHMED, S. A Review on Chitosan and its Nanocomposites in Drug Delivery. **International Journal of Biological Macromolecules**, p. 1–47, 2017.
- ALLEN, L. V.; POPOVICH, N. G.; ANSEL, H. C. **Formas Farmacêuticas e Sistemas de Liberação de Fármacos**. 9º ed. Porto Alegre: [s.n.].
- ALMDAL, K. et al. Towards a Phenomenological Definition of the Term “Gel”. **Polymer Gels and Networks**. [s.l: s.n.].
- BABU, V. R.; HOSAMANI, K. M.; AMINABHAVI, T. M. Preparation and in-vitro release of chlorothiazide novel pH-sensitive chitosan-N,N'-dimethylacrylamide semi-interpenetrating network microspheres. **Carbohydrate Polymers**, v. 71, n. 2, p. 208–217, 2008.
- BADER, R. A.; PUTNAM, D. A. **Engineering Polymer Systems for Improved Drug Delivery**. New Jersey: Wiley, 2014.
- BAYSAL, K. et al. Chitosan/alginate crosslinked hydrogels: Preparation, characterization and application for cell growth purposes. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 59, p. 342–348, ago. 2013.
- BELLÉ, A. S. et al. Efficient enzyme-assisted extraction of genipin from genipap (*Genipa americana* L.) and its application as a crosslinker for chitosan gels. **Food Chemistry**, v. 246, p. 266–274, 2018.
- BERGER, J. et al. Structure and interactions in covalently and ionically crosslinked chitosan hydrogels for biomedical applications European. **Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, Elsevier, 2004.

BERRIDGE, M. V; TAN, A. S. Characterization of the Cellular Reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): Subcellular Localization, Substrate Dependence, and Involvement of Mitochondrial Electron Transport in MTT Reduction. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, 1993.

BHATTARAI, N.; GUNN, J.; ZHANG, M. Chitosan-based hydrogels for controlled, localized drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, 31 jan. 2010.

BIERBRAUER, K. L. et al. Characterization and bacterial adhesion of chitosan-perfluorinated acid films. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 114, p. 201–208, 2014.

BROQUÁ, J. et al. Methods of Chitin Production a Short Review. **Am J Biomed Sci & Res**, p. 307–314, 2019.

CRACIUN, A. M. et al. Nitrosalicyl-imine-chitosan hydrogels based drug delivery systems for long term sustained release in local therapy. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 536, p. 196–207, 15 fev. 2019.

CUI, L. et al. Preparation and characterization of IPN hydrogels composed of chitosan and gelatin cross-linked by genipin. **Carbohydrate Polymers**, v. 99, p. 31–38, 2014.

CUNHA, R. B. DA et al. Obtenção, caracterização e uso de genipina como agente reticulante de hidrogeis de quitosana. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 10, p. e183101018711, 8 ago. 2021.

DASH, M. et al. Chitosan—A versatile semi-synthetic polymer in biomedical applications. **Progress in Polymer Science**, v. 36, n. 8, p. 981–1014, ago. 2011.

DIMIDA, S. et al. Genipin-cross-linked chitosan-based hydrogels: Reaction kinetics and structure-related characteristics. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 132, n. 28, p. 1–8, 2015.

DU, H. et al. The design of pH-sensitive chitosan-based formulations for gastrointestinal delivery. **Drug Discovery Today**, Elsevier Ltd, , 1 ago. 2015.

FERRAG, C. et al. Polyacrylamide hydrogels doped with different shapes of silver nanoparticles: Antibacterial and mechanical properties. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 197, 1 jan. 2021.

GAO, L. et al. Effects of genipin cross-linking of chitosan hydrogels on cellular adhesion and viability. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 117, p. 398–405, 2014.

GARNICA-PALAFIX, I. M.; SÁNCHEZ-ARÉVALO, F. M. Influence of natural and synthetic crosslinking reagents on the structural and mechanical properties of chitosan-based hybrid hydrogels. **Carbohydrate Polymers**, v. 151, p. 1073–1081, 20 out. 2016.

- GELLER, M. et al. Utilização do diclofenaco na prática clínica: revisão das evidências terapêuticas e ações farmacológicas. **Revista Brasileira De Clínica Médica**, v. 10, n. 1, p. 29–38, 2012.
- GONSALVES, A. A. et al. Diferentes estratégias para a reticulação de quitosana. **Química Nova**, v. 34, n. 7, p. 1215–1223, 2011.
- GRIMLING, B.; PLUTA, J. In vitro investigation of sodium diclofenac adsorption on sucralfate. **Acta Poloniae Pharmaceutica - Drug Research**, v. 63, n. 6, p. 515–520, 2006.
- GULL, N. et al. Inflammation targeted chitosan-based hydrogel for controlled release of diclofenac sodium. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 162, p. 175–187, 2020.
- HAN, Y. et al. A Chitosan-Based Micellar System as Nanocarrier For the Delivery of Paclitaxel. **Polymers**, v. 12, n. 380, p. 1–16, 2020.
- HARRIS, R.; LECUMBERRI, E.; HERAS, A. Chitosan-genipin microspheres for the controlled release of drugs: Clarithromycin, tramadol and heparin. **Marine Drugs**, v. 8, n. 6, p. 1750–1762, 2010.
- HEIMBUCK, A. M. et al. Effects of post-processing methods on chitosan-genipin hydrogel properties. **Materials Science and Engineering C**, v. 98, p. 612–618, 1 maio 2019.
- HOBBS, C. A. et al. Genotoxicity evaluation of the naturally-derived food colorant, gardenia blue, and its precursor, genipin. **Food and Chemical Toxicology**, v. 118, p. 695–708, 2018.
- HUANG, G. Q. et al. Genipin-crosslinked O-carboxymethyl chitosan-gum Arabic coacervate as a pH-sensitive delivery system and microstructure characterization. **Journal of Biomaterials Applications**, v. 31, n. 2, p. 193–204, 2016.
- JAYAKUMAR, R. et al. Biomaterials based on chitin and chitosan in wound dressing applications. **Biotechnology Advances**, v. 29, n. 3, p. 322–337, maio 2011.
- KAWAMURA, T. et al. Crosslinking efficacy and cytotoxicity of genipin and its activated form prepared by warming it in a phosphate buffer: A comparative study. **Materials**, v. 14, n. 21, 2021.
- KIM, E. S.; JEONG, C. S.; MOON, A. Genipin, a constituent of Gardenia jasminoides Ellis, induces apoptosis and inhibits invasion in MDA-MB-231 breast cancer cells. **Oncology Reports**, v. 27, n. 2, p. 567–572, 2012.
- KUMMAR, B. P. et al. Microparticulate drug delivery system: a review. **Indian Journal of Pharmaceutical Science & Research**, v. 1, n. 1, p. 19–37, 2011.

- KYZIOŁ, A. et al. Preparation and characterization of alginate/chitosan formulations for ciprofloxacin-controlled delivery. **Journal of Biomaterials Applications**, p. 1–13, 26 ago. 2017.
- LARANJEIRA, M. C. M.; FÁVERE, V. T. Quitosana: Biopolímero Funcional com Potencial Industrial Biomédico. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 672–678, 2009.
- LAU, Y. T. et al. Genipin-treated chitosan nanofibers as a novel scaffold for nerve guidance channel design. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 162, p. 126–134, 2018.
- LI, Y. H. et al. Characterization of the modified chitosan membrane cross-linked with genipin for the cultured corneal epithelial cells. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 126, p. 237–244, 2015.
- LIANG, Y. et al. Preparation of stretchable and self-healable dual ionically cross-linked hydrogel based on chitosan/polyacrylic acid with anti-freezing property for multi-model flexible sensing and detection. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 193, p. 629–637, 15 dez. 2021.
- LIECHTY, W. B. et al. Polymers for Drug Delivery Systems. **Annu Rev Chem Biomol Eng.**, n. 1, p. 149–173, 2010.
- MATOS, B. N. et al. Chitosan nanoparticles for targeting and sustaining minoxidil sulphate delivery to hair follicles. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 75, p. 225–229, 2015.
- MENDES, A. A. et al. Aplicação de quitosana como suporte para a imobilização de enzimas de interesse industrial. **Química Nova**, v. 34, n. 5, p. 831–840, 2011.
- MINEKUS, M. et al. A standardised static in vitro digestion method suitable for food-an international consensus. **Food and Function**, v. 5, n. 6, p. 1113–1124, 2014.
- MOHAMMADI, Z. et al. Chitosan as a machine for biomolecule delivery: A review. **Carbohydrate Polymers**, v. 256, n. July 2020, p. 117414, 2021.
- MUXIKA, A. et al. Chitosan as a bioactive polymer: Processing, properties and applications. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 105, p. 1358–1368, 2017.
- MUZZARELLI, R. A. A. Genipin-crosslinked chitosan hydrogels as biomedical and pharmaceutical aids. **Carbohydrate Polymers**, v. 77, n. 1, p. 1–9, 2009.
- NAEEM, M. et al. Advances in colon-targeted nano-drug delivery systems: challenges and solutions. **Archives of Pharmacal Research**, v. 43, n. 1, p. 153–169, 2020.
- NAIR, R. S. et al. An Evaluation of Curcumin-Encapsulated Chitosan Nanoparticles for Transdermal Delivery. **AAPS PharmSciTech**, v. 20, n. 2, p. 1–13, 2019.

NARAYANASWAMY, R.; TORCHILIN, V. P. Hydrogels and their applications in targeted drug delivery. **Molecules**, v. 24, n. 3, 2019.

OLIVEIRA, A. DE S. Desenvolvimento de novos nanocarreadores para liberação controlada de olanzapina e camptotecina. p. 142, 2018.

PANTZIARKA, P. et al. Repurposing Drugs in Oncology (ReDO) - Diclofenac as an anti-cancer agent. **Ecancermedicalscience**, v. 10, p. 1–28, 2016.

PAPADOPOULOU, V. et al. On the use of the Weibull function for the discernment of drug release mechanisms. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 309, n. 1–2, p. 44–50, 2006.

PARHI, R. Chitin and Chitosan in Drug Delivery. In: [s.l: s.n.]. v. 12p. 175–239.

PATIL, S.; MHAISKAR, A.; MUNDHADA, D. A review on novel drug delivery system: a recent trend. **International Journal of Current Pharmaceutical & Clinical Research**, v. 6, n. 2, p. 89–93, 2016.

PEERS, S.; MONTEBAULT, A.; LADAVIÈRE, C. Chitosan hydrogels for sustained drug delivery. **Journal of Controlled Release**, Elsevier v. 326, p. 150–163, 10 out. 2020.

PEZZINI, B. R.; SILVA, M. A. S.; FERRAZ, H. G. Formas farmacêuticas sólidas orais de liberação prolongada: sistemas monolíticos e multiparticulados. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 43, n. 4, p. 491–502, 2007.

PHILIP, A. K.; PHILIP, B. Colon Targeted Drug Delivery Systems: A Review on Primary and Novel Approaches. **Oman Medical Journal**, v. 25, n. 2, p. 70–78, 2010.

PRASANTHI, N. L. et al. A Brief Review on Chitosan and Application in Biomedical Field. **American Journal of Pharm Tech Research**, v. 6, n. 4, 2016.

PUJANA, M. A. et al. Biodegradable chitosan nanogels crosslinked with genipin. **Carbohydrate Polymers**, v. 94, n. 2, p. 836–842, 2013.

RAO, A. A. et al. Oral Controlled Release Drug Delivery System: an Overview. **International Journal of Pharma And Chemical Research**, v. 1, n. 1, p. 6–15, 2015.

RAZI, M. A. et al. Genipin-stabilized caseinatechitosan nanoparticles for enhanced stability and anti-cancer activity of curcumin. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 164, p. 308–315, 2018.

RIBEIRO, J. C. V. et al. The effects of the molecular weight of chitosan on the tissue inflammatory response. **Journal of Biomedical Materials Research - Part A**, v. 109, n. 12, p. 2556–2569, 2021.

RITGER, P. L.; PEPPAS, N. A. A simple equation for description of solute release II. Fickian and anomalous release from swellable devices. **Journal of Controlled Release**, v. 5, n. 1, p. 37–42, 1987.

RODRÍGUEZ-RODRÍGUEZ, R. et al. Sterilized chitosan-based composite hydrogels: Physicochemical characterization and in vitro cytotoxicity. **Journal of Biomedical Materials Research - Part A**, v. 108, n. 1, p. 81–93, 2020.

SHARIATINIA, Z. Pharmaceutical applications of chitosan. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 263, p. 131–194, 2019.

SHARIATINIA, Z.; JALALI, A. M. Chitosan-based hydrogels: Preparation, properties and applications. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 115, p. 194–220, 1 ago. 2018.

SHUKLA, S. K. et al. Chitosan-based nanomaterials: A state-of-the-art review. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 59, p. 46–58, 2013.

SILVA, M. C.; FIDELES, T. B.; FOOK, M. V. L. Esferas de quitosana e quitosana/curcumina pelo método de gelificação ionotrópica: influência da incorporação do fármaco. **Revista Eletrônica de Materiais e Processos**, v. 1, n. 1, p. 21–28, 2015.

SORASITTHIYANUKARN, F. N. et al. Chitosan-alginate nanoparticles as effective oral carriers to improve the stability, bioavailability, and cytotoxicity of curcumin diethyl disuccinate. **Carbohydrate Polymers**, v. 256, n. July 2020, p. 117426, 2021.

STOEF, P. R. et al. Caracterização e qualificação de diclofenaco de sódio como padrão secundário. **Acta Scientiarum - Technology**, v. 34, n. 1, p. 89–95, 2012.

SUNG, H. W. et al. In vitro evaluation of cytotoxicity of a naturally occurring cross-linking reagent for biological tissue fixation. **Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition**, v. 10, n. 1, p. 63–78, 1999.

SWAIN, R. P.; NAGAMANI, R.; PANDA, S. Formulation, in vitro characterization and stability studies of fast dispersing tablets of diclofenac sodium. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v. 5, n. 7, p. 94–102, 2015.

TAVARIA, F. K. et al. A quitosana como biomaterial odontológico: Estado da arte. **Revista Brasileira de Engenharia Biomedica**, v. 29, n. 1, p. 110–120, 2013.

THANOU, M.; VERHOEF, J. C.; JUNGINGER, H. E. Oral drug absorption enhancement by chitosan and its derivatives. **Advanced Drug Delivery Reviews**. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <www.elsevier.com/locate/drugdeliv>.

TIAN, B. et al. Chemical and physical chitosan hydrogels as prospective carriers for drug delivery: A review. **Journal of Materials Chemistry B**, v. 8, n. 44, p. 10050–10064, 28 nov. 2020.

UBAID, M.; MURTAZA, G. Fabrication and characterization of genipin cross-linked chitosan/gelatin hydrogel for pH-sensitive, oral delivery of metformin with an application of response surface methodology. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 114, p. 1174–1185, 2018a.

VAGHANI, S. S.; PATEL, M. M.; SATISH, C. S. Synthesis and characterization of pH-sensitive hydrogel composed of carboxymethyl chitosan for colon targeted delivery of ornidazole. **Carbohydrate Research**, v. 347, n. 1, p. 76–82, 2012.

VILLANOVA, J. C. O.; ORÉFICE, R. L.; CUNHA, A. S. Aplicações Farmacêuticas de Polímeros. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 20, n. 1, p. 51–64, 2010.

VO, N. T. N. et al. Genipin-crosslinked chitosan hydrogels: Preliminary evaluation of the in vitro biocompatibility and biodegradation. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 138, n. 34, 10 set. 2021.

WANG, C. et al. Cytocompatibility study of a natural biomaterial crosslinker-Genipin with therapeutic model cells. **Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials**, v. 97 B, n. 1, p. 58–65, 2011.

WANG, S. et al. Release Mechanisms and Applications of Drug Delivery Systems for Extended-Release. **Expert Opinion on Drug Delivery**, v. 0, n. 0, 2020.

WU, T. et al. Genipin-crosslinked carboxymethyl chitosan nanogel for lung-targeted delivery of isoniazid and rifampin. **Carbohydrate Polymers**, v. 197, n. February, p. 403–413, 2018.

XU, J. et al. Genipin-crosslinked catechol-chitosan mucoadhesive hydrogels for buccal drug delivery. **Biomaterials**, v. 37, p. 395–404, 1 jan. 2015.

XUE, H. et al. Quaternized chitosan-Matrigel-polyacrylamide hydrogels as wound dressing for wound repair and regeneration. **Carbohydrate Polymers**, v. 226, 15 dez. 2019.

YU, Y. et al. Genipin-cross-linked hydrogels based on biomaterials for drug delivery: A review. **Biomaterials Science**, Royal Society of Chemistry, , 7 mar. 2021.

ZHAO, S. P. et al. PH- and thermo-sensitive semi-IPN hydrogels composed of chitosan, N-isopropylacrylamide, and poly(ethylene glycol)-co-poly(ϵ -caprolactone) macromer for drug delivery. **Polymer Bulletin**, v. 66, n. 8, p. 1075–1087, 2011.

9. APÊNDICE

ANEXO 1 – Extração da genipina.

Protocolo de extração da genipina a partir do Jenipapo.

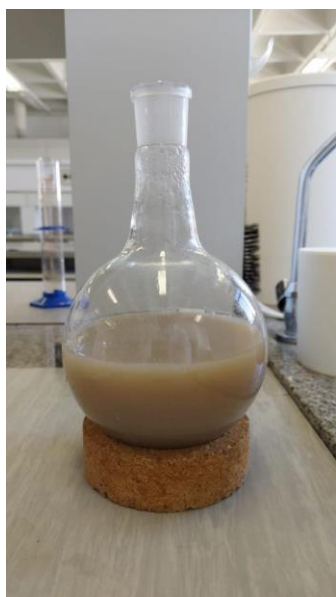
Fonte do Jenipapo: Luma Frutas Exóticas

1. Preparar 2 L de água deionizada pH 3,8 ajustado com ácido cítrico;
2. Higienizar o jenipapo com água, descascar, cortar e pesar o jenipapo;
3. Misturar a água deionizada e o jenipapo em um liquidificador para produzir o purê (usar 200 mL de água para cada 50 g de jenipapo);
 - a. Cuidado: o purê é tolerado até 15 minutos à temperatura ambiente. Deixar o jenipapo na geladeira antes do processamento e usar água deionizada gelada (pH 3,8 ajustado com ácido cítrico) para minimizar a reação da genipina com proteínas (o que leva à formação do corante).
4. Medir o volume resultante em uma proveta;
5. Passar o volume para um Erlenmeyer e aplicar a enzima na concentração de 0,5% v/v (utilizar um Erlenmeyer de volume, no mínimo, quatro vezes maior que a solução aquosa bifásica final – acetato de etila + solução de purê);
6. Em uma capela, adicionar acetato de etila à solução de jenipapo;
7. Agitar suavemente manualmente a cada 5 min durante 1 h para permitir que a reação enzimática ocorra de maneira homogênea paralelamente à migração da genipina para o acetato de etila;
8. Filtrar em uma peneira;
9. Passar para um funil de separação;
10. Aguardar a separação completa das fases;
11. Abrir a saída do funil de separação e descartar a fase inferior;
12. Aguardar a separação completa da fase restante;
13. Abrir a saída do funil de separação retirando a fase inferior até que reste apenas a fase translúcida mais pura de acetato de etila;

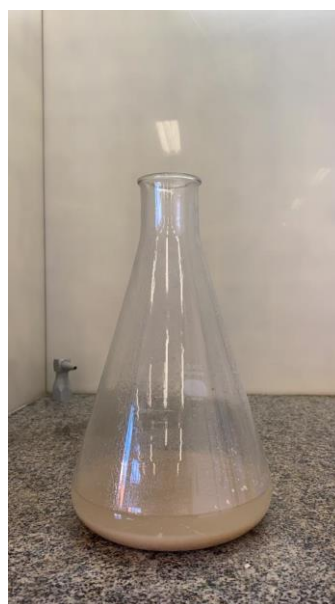
14. Com um balão do rotaevaporar coletar a fase translúcida do funil de separação;
15. Acoplar o balão no rotaevaporar a temperatura de 40°C e vácuo de 35 mmHg para remover o solvente;
16. Após a remoção total do solvente, limpar as paredes do balão com a menor quantidade de solvente possível e transferir para um frasco âmbar de 20 mL;
17. Acoplar o frasco âmbar ao rotaevaporador e evaporar novamente.

Ilustrações do processo e resultados:

Passo 3



Passo 5



Passo 10



Passo 15



Genipina extraída



ANEXO 2 – Histórico das formulações.

O projeto original visava reproduzir microesferas de quitosana reticuladas com genipina conforme Belle et al. (2018) e fazer a aplicação dessas esferas para a liberação controlada do diclofenaco de sódio. Assim, todas as formulações foram desenvolvidas seguindo as condições reportadas por Belle et al. (2018), mantendo 6,7 partes de quitosana para 1 parte de genipina. As microesferas foram preparadas de acordo com a tabela abaixo:

Tabela 1 – diferentes estratégias utilizadas para o desenvolvimento de microesferas de quitosana reticuladas com genipina.

Formulação	Método de incorporação do fármaco	Solução de coagulação	Quantidade de lavagens	Concentração teórica ($\mu\text{g/mL}$)	Concentração analítica ($\mu\text{g/mL}$)
1 ^a	Solução	Tripolifosfato	0	20,00	0,43 ($\pm 0,05$)
2 ^a	Solução	Tripolifosfato	1	18,74	0,16 ($\pm 0,01$)
3 ^a	Solução	H ₂ O + NaOH + álcool	6	18,64	1,94 ($\pm 0,39$)
4 ^a	Adsorção	H ₂ O + NaOH + álcool	6	16,66	0,78 ($\pm 0,35$)

Concentração apresentada como média \pm desvio padrão. Fonte: autor.

Métodos diferentes de incorporação de diclofenaco de sódio foram testados, assim como solução de coagulação, lavagem das microesferas em água destilada e tempos de reticulação. As lavagens foram introduzidas para obter pH próximo a neutralidade, e assim melhorar as condições de reticulação. Foram realizados testes de dissolução *in vitro* para todas as formulações. Os testes foram realizados em Shaker MA 830 (Marconi), com temperatura e agitação constante. Determinado número de esferas foram depositados em 10 mL de solução pH 1,2 por 2 horas. Transcorrido o tempo, as esferas foram transferidas para 10 mL de tampão fosfato pH 6,8, onde permaneceram por mais 22 horas. Alíquotas foram retiradas em tempos específicos para análise da concentração do fármaco em HPLC DAD (Shimadzu). Além destas, alíquotas das lavagens também foram coletadas para conhecer a concentração do fármaco nas mesmas.

Após cálculos para determinar as concentrações teóricas e analíticas, concluiu-se que grande quantidade do fármaco foi perdido nas soluções de coagulação e reticulação de genipina para o 1º teste, e/ou nas lavagens para dos demais testes. Conseqüentemente, uma pequena quantidade do fármaco foi incorporada às microesferas. Tempos diferentes de reticulação também foram observados, mas nenhuma diferença significativa foi observada em relação a liberação do fármaco. Em algumas microesferas foram observadas a presença de pequenas rachaduras após o ensaio de dissolução, formando possíveis canais para a liberação do fármaco.

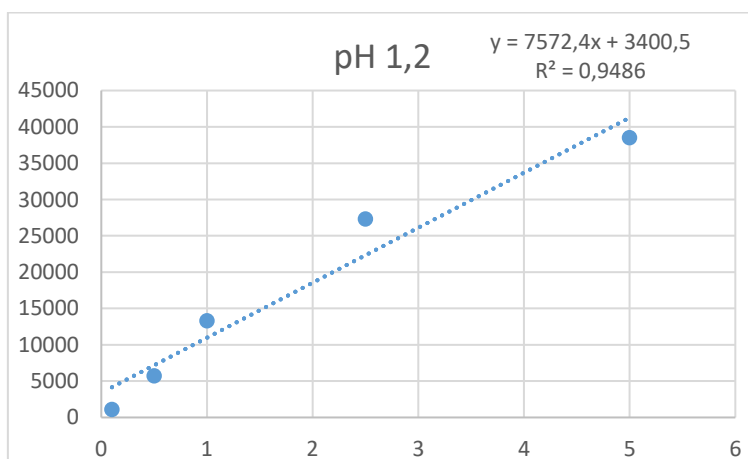
Todas as modificações descritas objetivaram aumentar a concentração de fármaco liberada, mas sem sucesso. Após revisão da literatura, iniciamos as formulações com hidrogéis, seguindo as mesmas condições em termos de concentração pré-estabelecidas.

ANEXO 3 - Curvas e fórmulas utilizadas para calcular a concentração de diclofenaco de sódio nos diferentes ensaios.

O método de quantificação utilizado ao longo do trabalho havia sido previamente validado, porém utilizando água como diluente. Assim, para os diferentes ensaios realizados nesse trabalho, prepararam-se diferentes curvas de linearidade. As curvas a seguir foram utilizadas para calcular a concentração do fármaco. Os gráficos estão apresentados como eixo x sendo a concentração do fármaco ($\mu\text{g/mL}$) e eixo y como a média dos valores obtidos na Cromatografia líquida de alta eficiência. Para isto, 20 μL de amostra foram injetados em coluna Waters Nova-Pak® C18 (60 Å, 4 μm , 150 x 3,9 mm) a 40 °C, eluída em método isocrático (70% de metanol e 30% de tampão de fosfato 0,01M pH 3,0 - KH_2PO_4 + H_3PO_4) a uma taxa de fluxo de 1 mL/min. A detecção de UV foi realizada em 276 nm. Os resultados dos ensaios obtidos foram plotados nas fórmulas para conhecermos a concentração do fármaco.

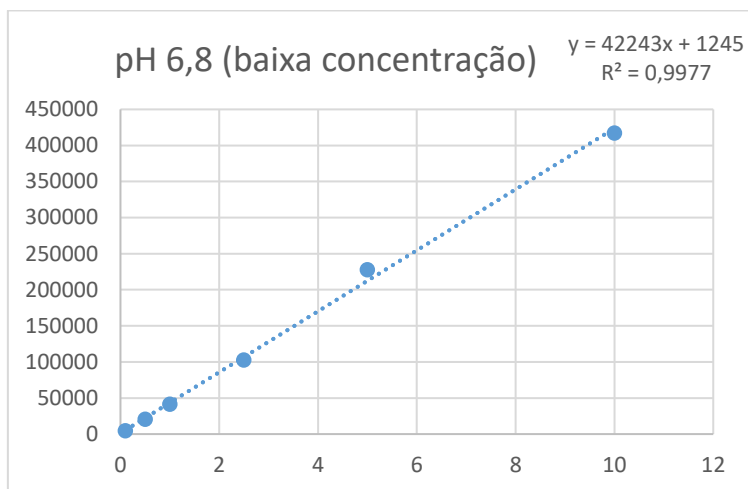
Dissolução *in vitro*:

Curva de calibração baixa em pH 1,2:

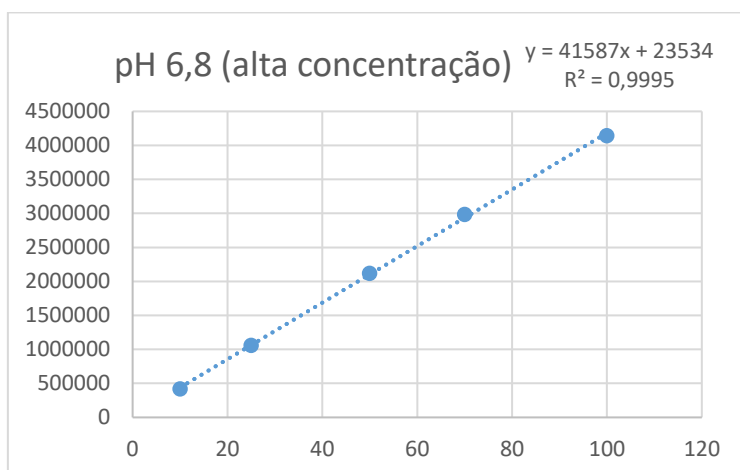


Concentração $\mu\text{g/mL}$	Média	DP
0,1	1073	203,65
0,5	5718	1083,99
1	13278	1701,30
2,5	27332	3368,66
5	38509	7538,47

Curvas de calibração baixa e alta em pH 6,8:



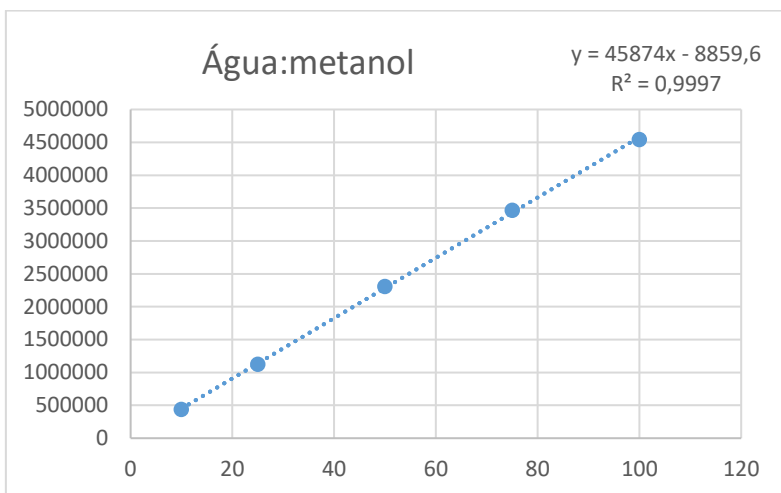
Concentração µg/mL	Média	DP
0,1	4532	406,58
0,5	20604	970,15
1	41320	817,41
2,5	102735	188,79
5	227737	20712,57
10	417375	6052,83



Concentração µg/mL	Média	DP
10	417375	6052,83
25	1059541	12145,27
50	2118885	10234,23
70	2983109	45694,65
100	4143339	20076,88

Análise de teor:

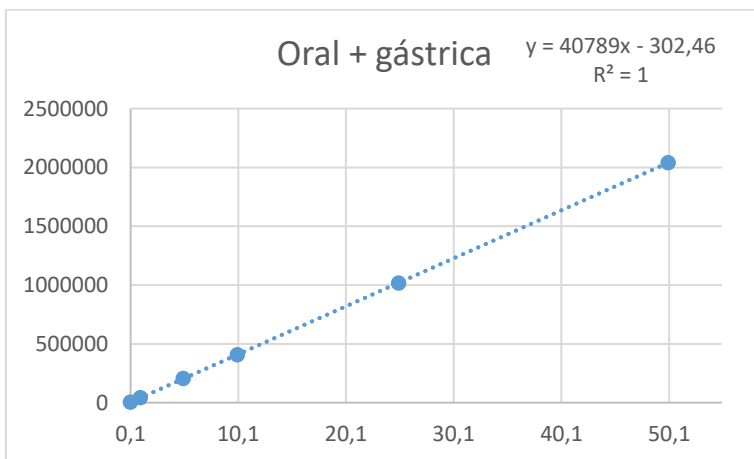
Curva de calibração em água e metanol:



Concentração µg/mL	Média	DP
10	439203	60676,83
25	1123480	19183,81
50	2308808	10267,90
75	3465737	46656,32
100	4545725	109125,7

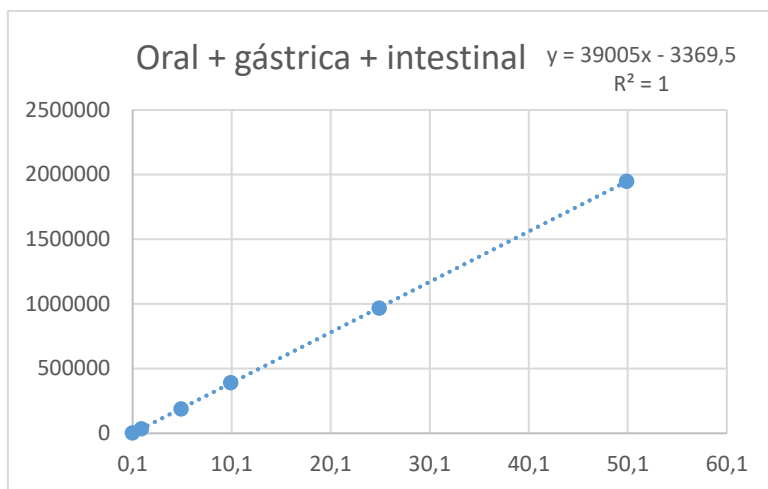
Dissolução em fluidos intestinais simulados:

Curva de calibração em solução oral e gástrica:



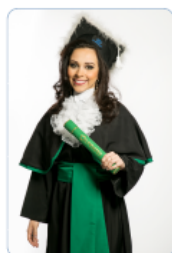
Concentração µg/mL	Média	DP
0,1	4481	246,07
1	41642,5	1133,49
5	203988,5	3070,96
10	406893,5	5066,42
25	1016251	19556,45
50	2040829	29392,31

Curva de calibração em solução oral, gástrica e intestinal:



Concentração µg/mL	Média	DP
0,1	1915	198,0
1	34649	1301,08
5	188894	4597,61
10	390855,5	16237,29
25	969216	7580,18
50	1947607	3252,69

10. CURRÍCULO LATTES



Gabriela Kaufmann

Endereço para acessar este CV: <http://lattes.cnpq.br/0825779500706385>
 ID Lattes: 0825779500706385
 Última atualização do currículo em 29/04/2022

Possui graduação em Biomedicina (2016) - Centro Universitário Univates. Atualmente é Biomédica no Laboratório de Apoio ao Diagnóstico - Saúde Univates. Possui experiência na área de Biologia Molecular, com ênfase no diagnóstico de doenças, e na área de Microbiologia de Alimentos. **(Texto informado pelo autor)**

Identificação

Nome	Gabriela Kaufmann
Nome em citações bibliográficas	KAUFMANN, G.;KAUFMANN, GABRIELA
Lattes iD	http://lattes.cnpq.br/0825779500706385
Orcid iD	https://orcid.org/0000-0003-4458-2463

Endereço

Endereço Profissional	Universidade do Vale do Taquari - UNIVATES. Júlio de Castilhos, 940 - Laboratório de Apoio ao Diagnóstico - Saúde Univates Centro 95900000 - Lajeado, RS - Brasil Telefone: (51) 37147000 Ramal: 5461
------------------------------	--

Formação acadêmica/titulação

2020	Mestrado em andamento em BIOCÊNCIAS (Conceito CAPES 4). Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, UFCSPA, Brasil. Orientador: Taira Alessandra Silveira Aguirre. Coorientador: Márcia Ines Goettert.
2019 - 2020	Especialização em Análises Clínicas e Toxicológicas. (Carga Horária: 360h). Universidade Braz Cubas, UBC, Brasil. Título: -.
2017 - 2018	Especialização em Tomografia computadorizada e Ressonância magnética. Faculdade Método de São Paulo, FAMESP, Brasil. Título: A utilização da ressonância magnética na avaliação do câncer de mama. Orientador: Guilherme Oberto Rodrigues.
2011 - 2016	Graduação em Biomedicina. Universidade do Vale do Taquari - UNIVATES, UNIVATES, Brasil. Título: Ausência de efeito do polimorfismo rs2283265 do gene DRD2 em parâmetros antropométricos de indivíduos adultos. Orientador: Dra. Verônica Contini.
2008 - 2010	Ensino Médio (2º grau). Colégio Bom Jesus São Miguel, CBJSM, Brasil.

Formação Complementar

2018 - 2018	Extensão universitária em II Curso de Toxicidade Genética: curso de verão. (Carga horária: 24h). Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, UFCSPA, Brasil.
2018 - 2018	Treinamento de Recidagem MDS. (Carga horária: 3h). Universidade do Vale do Taquari - UNIVATES, UNIVATES, Brasil.
2018 - 2018	Bioinformática. (Carga horária: 60h). Portal da Educação, -, Brasil.

2018 - 2018	Sistema de Gestão da Qualidade para Laboratórios segundo a NBR ISO/IEC. (Carga horária: 16h). Rede Metrológica RS, -, Brasil.
2017 - 2017	Extensão universitária em Avanços da Oncologia na perspectiva molecular - módulo I. (Carga horária: 9h). Universidade do Vale do Taquari - UNIVATES, UNIVATES, Brasil.
2017 - 2017	Sorotipificação em amostras de Salmonella. (Carga horária: 3h). ABASE, -, Brasil.
2017 - 2017	Boas práticas de fabricação. (Carga horária: 16h). Universidade do Vale do Taquari - UNIVATES, UNIVATES, Brasil.
2017 - 2017	XXIII Princípios Básicos de Imagem por Ressonância Magnética. (Carga horária: 24h). Phymed, -, Brasil.
2017 - 2017	Aperfeiçoamento em Tomografia Computadorizada Multislice módulo I. (Carga horária: 20h). QUALYPIXEL, -, Brasil.
2016 - 2016	Extensão universitária em Métodos Moleculares de Diagnóstico Laboratorial. (Carga horária: 24h). Universidade do Vale do Taquari - UNIVATES, UNIVATES, Brasil.
2016 - 2016	Base de dados SCOPUS e gerenciador de referências MENDELEY. (Carga horária: 2h). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Brasil.
2016 - 2016	Biologia Genética Forense. (Carga horária: 10h). Instituto Galeno, INSTITUTO GALENO, Brasil.
2016 - 2016	Ciências Médicas Forense. (Carga horária: 9h). Renova Cursos, RENOVA CURSOS, Brasil.
2016 - 2016	Genética toxicológica: alterações estruturais e moleculares. (Carga horária: 12h). Astoxi Latin, ASTOXI LATIM, Brasil.
2015 - 2015	Oficinas do curso de Biomedicina - Da teoria à prática, da coleta ao apoio. (Carga horária: 3h). Universidade do Vale do Taquari - UNIVATES, UNIVATES, Brasil.
2014 - 2014	Extensão universitária em Curso Revisando a Biologia Celular do Cancer: da Carcinogênese à terapia. (Carga horária: 27h). Universidade do Vale do Taquari - UNIVATES, UNIVATES, Brasil.
2014 - 2014	Jornada Acadêmica do Curso de Biomedicina - FIV x ICSI - Técnicas de reprod. (Carga horária: 4h). Universidade do Vale do Taquari - UNIVATES, UNIVATES, Brasil.
2014 - 2014	Interpretação dos Requisitos da norma ISO IEC 17025:2005. (Carga horária: 16h). Exactus Metrologia e Qualidade, -, Brasil.

Atuação Profissional

Universidade do Vale do Taquari - UNIVATES, UNIVATES, Brasil.

Vínculo institucional

2020 - Atual

Outras informações

Vínculo: Celetista, Enquadramento Funcional: Biomédica, Carga horária: 40
Realizar o diagnóstico molecular de doenças. Validação de testes, processamento de amostras (Extração do material genético e Técnica de PCR), liberação de resultados.

Vínculo institucional

2013 - 2020

Outras informações

Vínculo: Celetista, Enquadramento Funcional: Auxiliar de Laboratório, Carga horária: 44
Experiência em leitura e repique de análises microbiológicas de alimentos, águas, swabs e efluentes.

Vínculo institucional

2018 - 2018

Vínculo: Voluntário, Enquadramento Funcional: Monitora na disciplina de Biologia Molecular, Carga horária: 30

Vínculo institucional

2018 - 2018

Vínculo: Voluntário, Enquadramento Funcional: Monitora na disciplina de Biologia Molecular, Carga horária: 19

Vínculo institucional

2017 - 2017

Vínculo: Voluntário, Enquadramento Funcional: Monitora na disciplina de Bac. Clínica, Carga horária: 37
Auxiliar e esclarecer dúvidas nas aulas práticas pertinentes à disciplina.

Outras informações

Vínculo institucional

2017 - 2017

Vínculo: Voluntário, Enquadramento Funcional: Monitora na disciplina Micologia Clínica Auxiliar e esclarecer dúvidas nas aulas práticas pertinentes à disciplina.

Outras informações

Vínculo institucional

2017 - 2017

Vínculo: Voluntária, Enquadramento Funcional: Monitora na disciplina Biologia Molecular Auxiliar e esclarecer dúvidas nas aulas práticas pertinentes à disciplina.

Outras informações

Vínculo institucional

2016 - 2016

Vínculo: Estágio, Enquadramento Funcional: Estágio Curricular
Estágio curricular realizado no Laboratório de Microbiologia do Unianálises/Centro Universitário Univates, totalizando 240 horas.

Outras informações

Vínculo institucional
2015 - 2015
Outras informações

Vínculo: Estágio, Enquadramento Funcional: Estágio curricular
Estágio curricular realizado no Laboratório didático de Biologia Molecular do Centro Universitário Univates, totalizando 60 horas.

Laboratório Hermann Ltda., -, Brasil.

Vínculo institucional
2012 - 2013
Outras informações

Vínculo: , Enquadramento Funcional: Auxiliar de Laboratório, Carga horária: 44
Recepcionista e auxiliar de laboratório no setor de exames terceirizados (cadastro e separação de amostras biológicas)

Vínculo institucional
2011 - 2012

Vínculo: Estágio remunerado, Enquadramento Funcional: Estagiário, Carga horária: 30

Hospital de Clínicas de Porto Alegre, HCPA, Brasil.

Vínculo institucional
2016 - 2016

Vínculo: Bolsista, Enquadramento Funcional: Pesquisador no laboratório Biologia Molecular, Carga horária: 20

Laboratório Amplicon Ltda., -, Brasil.

Vínculo institucional
2016 - 2016
Outras informações

Vínculo: Estagiário, Enquadramento Funcional: Estágio curricular, Carga horária: 30
Estágio curricular de 510 horas desenvolvido no Laboratório Amplicon, com ênfase no diagnóstico molecular. Realização de atividades pertinentes ao diagnóstico molecular (extração de DNA de diversos materiais, realização de PCR, detecção de patologias através de eletroforese).

Projetos de pesquisa

2017 - 2018

Aspectos nutrigenéticos de marcadores bioquímicos, antropométricos e comportamentais: implicações para as doenças multifatoriais
Descrição: O estudo das doenças multifatoriais tem recebido uma atenção especial nos últimos anos, devido a sua complexidade, os múltiplos fatores, genéticos e ambientais, envolvidos no seu desenvolvimento e o grande impacto nas sociedades contemporâneas. No entanto, apesar dos avanços obtidos com os estudos de varredura genômica, que identificaram inúmeras variantes genéticas associadas com uma ampla gama de doenças complexas, com a esquizofrenia e a obesidade, por exemplo, esses achados ainda não são capazes de explicar toda a variância atribuível aos genes. Diante disso, novas abordagens de investigação têm sido exploradas, na busca pela identificação dos mecanismos moleculares envolvidas nessas doenças, como a investigação de interações gene-gene e gene-ambiente, destacando-se aqui os estudos nutrigenéticos. Existem na literatura inúmeras evidências relacionando fatores da dieta com o desenvolvimento de doenças multifatoriais metabólicas e, mais recentemente, também tem se destacado o efeito das interações alimentares em transtornos psiquiátricos, como a depressão, a ansiedade e o transtorno de déficit de atenção e hiperatividade. O objetivo geral deste estudo é avaliar os possíveis efeitos das interações entre o consumo alimentar e polimorfismos genéticos sobre desfechos antropométricos, bioquímicos e comportamentais de indivíduos adultos. A amostra será constituída por voluntários adultos, de ambos os sexos, recrutados entre a comunidade acadêmica da Universidade do Vale do Taquari- Univates, Lajeado, RS. Todos os participantes que aceitarem participar do estudo responderão um questionário sobre dados demográficos, hábitos de vida, prática de atividade física, história clínica e histórico familiar. Também realizarão uma anamnese nutricional, avaliação de medidas antropométricas, aferição da pressão arterial e coleta de sangue, para análises bioquímicas e moleculares. Os parâmetros comportamentais selecionados serão investigados por meio de escalas autoaplicáveis. Os polimorfismos genéticos que serão investigados serão selecionados com base em evidências de funcionalidade. Os testes estatísticos específicos de associações e interações serão definidos posteriormente, de acordo cada objetivo a ser avaliado e dependendo da distribuição dos dados. Todos os indivíduos incluídos no estudo assinarão um termo de consentimento livre.
Situação: Concluído; Natureza: Pesquisa.

2016 - 2016

Integrantes: Gabriela Kaufmann - Integrante / Verônica Contini - Coordenador.
INVESTIGAÇÃO GENÉTICO-MOLECULAR DE REARRANJOS COMPLEXOS DA SÍNDROME DE HUNTER: DEFINIÇÕES DO STATUS DE METILAÇÃO E ANÁLISE DE PORTADORAS
Situação: Concluído; Natureza: Pesquisa.
Alunos envolvidos: Graduação: (1) .

Integrantes: Gabriela Kaufmann - Integrante / Sandra Leistner-Segal - Coordenador / Ana Carolina Brusius Facchin - Integrante.

Projetos de extensão

2011 - 2011	Ações Interdisciplinares em Saúde no Bairro Santo Antônio em Lajeado-RS Descrição: Realização de atividades voluntárias no bairro Santo Antônio - Lajeado/RS. As atividades de carácter multidisciplinar tinha o objetivo de auxiliar na saúde de pacientes selecionados.. Situação: Concluído; Natureza: Extensão. Integrantes: Gabriela Kaufmann - Coordenador / Michelle Mergener - Integrante.
--------------------	---

Áreas de atuação

1.	Grande área: Ciências Biológicas / Área: Microbiologia.
2.	Grande área: Ciências Biológicas / Área: Bioquímica / Subárea: Biologia Molecular.
3.	Grande área: Ciências Biológicas / Área: Bioquímica.

Idiomas

Inglês	Compreende Bem, Fala Bem, Lê Bem, Escreve Razoavelmente.
Espanhol	Compreende Razoavelmente, Fala Pouco, Lê Razoavelmente, Escreve Pouco.

Prêmios e títulos

2017	IV JORNADA ACADÊMICA DA BIOMEDICINA E II MOSTRA DE TRABALHOS ACADÊMICOS DA BIOMEDICINA - CCBS - SUBMISSÃO DE RESUMOS SIMPLES, Universidade do Vale do Taquari - Univates.
2016	Prêmio José Katz, Centro Universitário Univates.
2016	III Jornada Acadêmica da Biomedicina e II Mostra de Trabalhos Acadêmicos da Biomedicina, Centro Universitário Univates.

Produções

Produção bibliográfica

Resumos publicados em anais de congressos

- VIEIRA, L.; KAUFMANN, G.; SILVA, G. K. . O USO DO SISTEMA CRISPR-CAS9 NO HIV-1: O QUE PODEMOS ESPERAR?. In: Anais da III Semana Acadêmica do Curso de Medicina da Univates, 2019, Lajeado. O USO DO SISTEMA CRISPR-CAS9 NO HIV-1: O QUE PODEMOS ESPERAR?. Lajeado: Editora Univates, 2019. p. 35-35.
- VIEIRA, L.; KAUFMANN, G.; SILVA, G. K. . O CRISPR-Cas9 pode ser usado para Reparar genes danificados?. In: III Mostra De Trabalhos do Curso de Biomedicina, 2018, Lajeado. Anais da III Mostra De Trabalhos do Curso de Biomedicina. Lajeado: Univates, 2018. v. 1. p. 36-36.
- KONIG, A.; MULLER, M. J.; KAUFMANN, G.; HORST, A. . AVALIAÇÃO DO ESTADO REDOX E CONCENTRAÇÃO DE NITRITOS A PARTIR DA REUTILIZAÇÃO DA MEMBRANA DIALISADORA EM PACIENTES COM DOENÇA RENAL CRÔNICA. In: E-book Centro de Ciências Biológicas e da Saúde - CCBS Univates, 2018, Lajeado. Práticas acadêmicas e atenção à saúde: resumos do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde - CCBS Univates. Lajeado: Univates, 2018. v. 1. p. 11-11.
- KAUFMANN, G.; CONTINI, V. . Ausência de efeito do polimorfismo rs2283265 do gene DRD2 em parâmetros antropométricos de indivíduos adultos. In: XVIII Mostra de Ensino, Extensão e Pesquisa, 2016, Lajeado. Anais da III Mostra De Trabalhos do Curso de Biomedicina. Lajeado: Univates, 2016. v. 18. p. 107-107.

Artigos aceitos para publicação

- KAUFMANN, G.; DRESCH, F.; REHFELDT, S. C. H.; GENRO, J. P.; CONTINI, V. . Dopamina e comportamento alimentar: polimorfismos em receptores dopaminérgicos e fenótipos relacionados à obesidade. CLINICAL AND BIOMEDICAL RESEARCH, 2022.
- KAUFMANN, GABRIELA; TRINDADE, FERNANDA ROCHA DA; RODRIGUES, GUILHERME OBERTO; NOBREGA, ALMIR INÁCIO DA . IMPORTÂNCIA DA UTILIZAÇÃO DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NO AUXÍLIO AO DIAGNÓSTICO DO CÂNCER DE MAMA: UMA REVISÃO SISTEMÁTICA. DESTAQUES ACADÊMICOS, 2021.

Apresentações de Trabalho

-

1. **KAUFMANN, G.;** KLEIN, M. P. ; GOETTERT, M. I. ; AGUIRRE, T. A. S. . AVALIAÇÃO DO EFEITO CITOTÓXICO EM CÉLULAS CACO-2 DE ESFERAS DE QUITOSANA RETICULADAS COM GENIPINA PARA ENTREGA CONTROLADA DE FÁRMACOS. 2021. (Apresentação de Trabalho/Outra).
2. **KAUFMANN, G.;** CAMINI, A. M. . Oficina de Biologia Molecular: do desenho de primers a PCR. 2021. (Apresentação de Trabalho/Outra).
3. **KAUFMANN, G.;** KLEIN, M. P. ; GOETTERT, M. I. ; AGUIRRE, T. A. S. . Avaliação do potencial tecnológico de esferas de quitosana reticuladas com genipina na entrega oral de fármacos. 2020. (Apresentação de Trabalho/Outra).
4. **KAUFMANN, G.;** NICOLAI, G. . Métodos laboratoriais de diagnóstico do SARS-CoV-2. 2020. (Apresentação de Trabalho/Outra).
5. **KAUFMANN, G.** Antioxidantes realmente melhoram sua saúde?. 2019. (Apresentação de Trabalho/Seminário).
6. VIEIRA, L. ; **KAUFMANN, G.** . Edição de genoma: método de CRISPR. 2018. (Apresentação de Trabalho/Conferência ou palestra).
7. VIEIRA, L. ; **KAUFMANN, G.;** SILVA, G. K. . O CRISPR-Cas9 pode ser usado para Reparar genes danificados?. 2018. (Apresentação de Trabalho/Outra).
8. **KAUFMANN, G.;** SILVA, G. K. . Biologia molecular como ferramenta para o diagnóstico de dermatofitoses. 2017. (Apresentação de Trabalho/Outra).
9. **KAUFMANN, G.;** SIMONETTI, S. . Vivências de estudantes do curso de Biomedicina na área de Microbiologia de alimentos. 2017. (Apresentação de Trabalho/Outra).
10. REHFELDT, S. C. H. ; **KAUFMANN, G.;** BASEGIO, K. G. ; DRESCH, F. ; WUNSCH, C. ; CONTINI, V. . Investigação da Associação entre o Polimorfismo rs2283265 no Gene do Receptor de Dopamina DRD2 e o Uso de Nicotina e Álcool em uma Amostra de Indivíduos Adultos de uma Comunidade Acadêmica.. 2016. (Apresentação de Trabalho/Outra).
11. REHFELDT, S. C. H. ; **KAUFMANN, G.;** GENRO, J. P. ; CONTINI, V. . Influência de um polimorfismo no sistema dopaminérgico em parâmetros antropométricos e bioquímicos. 2016. (Apresentação de Trabalho/Congresso).
12. **KAUFMANN, G.;** CONTINI, V. . Ausência de efeito do polimorfismo rs2283265 do gene DRD2 em parâmetros antropométricos de indivíduos adultos. 2016. (Apresentação de Trabalho/Outra).
13. **KAUFMANN, G.** Embriologia. 2011. (Apresentação de Trabalho/Outra).

Eventos

Participação em eventos, congressos, exposições e feiras

1. Encontros Científicos do PPG Biotecnologia. 2016. (Encontro).
2. A Bioquímica nas áreas de Ciências Biológicas e da Saúde. 2015. (Outra).
3. Oficinas do curso de Biomedicina. 2015. (Oficina).
4. O que é e para que serve a memória, ministrada pelo neurocientista doutor Ivan Izquierdo. 2015. (Outra).
5. VIII Ciclo de Palestras da Biomedicina. 2015. (Outra).
6. Aula Inaugural da Medicina. 2014. (Outra).
7. Perícia forense - experiência profissional. 2014. (Outra).
8. Aula Inaugural do Curso de Biomedicina. 2013. (Encontro).
9. VI Ciclo de Palestras da Biomedicina. 2013. (Outra).
10. II Simpósio Interdisciplinar de saúde e ambiente - II SISA e VIII Semana Interdisciplinar em saúde. 2012. (Simpósio).
11. Semana Acadêmica do curso de Ciências Biológicas. 2012. (Outra).
12. V Ciclo de Palestras da Biomedicina - Inserção Regional do Biomedico. 2012. (Outra).

Educação e Popularização de C & T

Apresentações de Trabalho

1. REHFELDT, S. C. H. ; **KAUFMANN, G.;** BASEGIO, K. G. ; DRESCH, F. ; WUNSCH, C. ; CONTINI, V. . Investigação da Associação entre o Polimorfismo rs2283265 no Gene do Receptor de Dopamina DRD2 e o Uso de Nicotina e Álcool em uma Amostra de Indivíduos Adultos de uma Comunidade Acadêmica.. 2016. (Apresentação de Trabalho/Outra).
2. REHFELDT, S. C. H. ; **KAUFMANN, G.;** GENRO, J. P. ; CONTINI, V. . Influência de um polimorfismo no sistema dopaminérgico em parâmetros antropométricos e bioquímicos. 2016. (Apresentação de Trabalho/Congresso).