UNISO

Universidade de Sorocaba.
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas

PROTOCOLO OPERACIONAL 09/2026

PRODUÇÃO DE HIDROGÉIS À BASE DE GELATINA.

Autores:

Samanta Helena Martins de Oliveira
Anna Lúcia Vieira Corrêa
Giovanna Ferreira de Melo
Gabriella Silverio Pires
Giovanna Soares de Camargo
Isabela Vieira Coraio
Jair Vaz Nogueira Jr
Gabriel Pereira Machado
Patrícia Lius Melo Alves
Angela Faustino Jozala

Sorocaba
2026

APRESENTAÇÃO

Este documento apresenta o desenvolvimento de um protocolo para produção de um hidrogel à base de gelatina, nanocelulose bacteriana e compostos bioativos, destinado à obtenção de uma matriz com potencial de aplicação como curativo e sistema tópico de liberação de agentes terapêuticos. O protocolo contempla as etapas de preparo da matriz, incorporação dos componentes, conformação, tratamento e obtenção das membranas por liofilização.

O sistema proposto combina as propriedades da gelatina e da nanocelulose bacteriana. A gelatina apresenta biocompatibilidade, biodegradabilidade e capacidade de formar redes tridimensionais, podendo favorecer processos relacionados à adesão, migração e proliferação celular. A nanocelulose bacteriana, por sua vez, apresenta estrutura porosa, elevada capacidade de retenção de água e resistência mecânica, características relevantes para sua utilização em curativos e sistemas de liberação de substâncias bioativas.

A formulação também incorpora sericina, nisina e mupirocina. A sericina apresenta propriedades que podem contribuir para o desempenho mecânico e funcional do biomaterial, além de características antioxidantes, antibacterianas e anti-inflamatórias. A nisina, por sua vez, é um peptídeo antimicrobiano com potencial de aplicação em sistemas de liberação controlada e possível utilização em associação com antibióticos.

O protocolo estabelece a incorporação dos componentes à solução de gelatina, incluindo 4 mL de nanocelulose bacteriana, 2 mL de sericina, 2,76 mL de nisina preparada em EDTA 20 mM e a solução de mupirocina, seguida pela conformação das amostras, exposição à radiação UV e liofilização. Ao final do processo, são obtidas membranas de hidrogel/scaffold acondicionadas em sachês de alumínio.

O produto tecnológico apresenta, portanto, potencial para aplicação no desenvolvimento de curativos multifuncionais, associando uma matriz polimérica de gelatina e nanocelulose bacteriana à incorporação de agentes com propriedades antimicrobianas. A combinação desses componentes possibilita a obtenção de um sistema destinado à aplicação tópica, com potencial para atuar como matriz de suporte e veículo para liberação de substâncias bioativas.

Conteúdo

Gelatina 4
Celulose Bacteriana 4
Sericina 4
Nisina 4
ETAPA 1 - SOLUBILIZAÇÃO DA GELATINA 5
ETAPA 2 - INCORPORAÇÃO DOS COMPONENTES À MATRIZ DE GELATINA 6
ETAPA 3 - DISTRIBUIÇÃO DA FORMULAÇÃO EM PLACA 8
ETAPA FINAL: LIOFILIZAÇÃO E ACONDICIONAMENTO DAS AMOSTRAS 9
REFERÊNCIAS 11

Gelatina

A gelatina é produzida pela hidrólise da tripla hélice do colágeno e apresenta características importantes para o uso em sistemas de liberação, como baixa antigenicidade, estabilidade físico-química, biocompatibilidade e biodegradabilidade, além de conter sequências de arginina-glicina-asparagina (RGD), essenciais para adesão, diferenciação e proliferação celular, favorecendo a epitelização e formação de tecido de granulação durante a cicatrização. (Mohanto *et al*., 2023)

Devido às suas características de versatilidade, a gelatina é amplamente utilizada no desenvolvimento de sistemas de liberação de hidrogéis, apresentando propriedades mecânicas capazes de serem moduladas conforme o tecido a ser reparado, enquanto sua rede tridimensional possibilita suporte ao crescimento, migração e diferenciação celular. Os hidrogéis de gelatina podem adsorver moléculas bioativas ou fármacos em sua matriz, permitindo liberação controlada em aplicações como analgesia, cicatrização e regeneração tecidual. Além disso, seu desempenho pode ser potencializado pela combinação com outros polímeros naturais ou sintéticos. (Bao *et al*., 2023; Lu *et al*., 2022).

Celulose Bacteriana

A celulose bacteriana (CB) é um polissacarídeo produzido por algumas espécies de bactérias e tem sido amplamente estudada devido às suas propriedades como alta pureza, excelente resistência mecânica, estrutura porosa tridimensional e elevada capacidade de retenção de água, que favorece a incorporação de ativos. Devido às suas características estruturais únicas, a CB pode ser aplicada diretamente em curativos, promovendo a cicatrização de feridas, apresentando potencial no tratamento de feridas crônicas, úlceras e queimaduras. (Liang, 2023; Sulaeva *et al*., 2015).

Outra aplicação relevante da CB é como sistema de liberação de medicamentos (drug delivery), podendo ser funcionalizada com agentes ativos como antibióticos ou compostos antimicrobianos, o que é fundamental para manter níveis terapêuticos constantes do fármaco, especialmente em casos de substâncias com meia-vida curta, como os antibióticos betalactâmicos. (Liang, 2023; Sulaeva *et al*., 2015).

Sericina

A sericina é uma proteína hidrofílica, um polímero natural cujas estruturas é formada por grupos polares, como carboxila, hidroxila e amino, o que permite sua combinação com outros polímeros, realização de reticulação e formação de misturas, promovendo melhora na resistência mecânica do biomaterial, além de promover propriedades antioxidantes, antibacterianas e anti-inflamatórias. Tais fatos embasam sua ampla exploração no âmbito de curativos, além de possuir aplicações alimentícias, cosméticas e biomédicas. (Das *et al.*, 2021; Al Masud *et al*., 2021; Tao *et al*., 2021).

Nisina

A nisina é um peptídeo pertencente à classe dos lantibióticos, produzida por *Lactococcus lactis* e outras bactérias Gram-positivas. A nisina já possui aplicação reconhecida na indústria alimentícia como um conservante natural e tem ganhado destaque no campo biomédico devido à sua eficácia contra cepas resistentes devido à sua capacidade de romper biofilmes e gerar potencial sinérgico com antibióticos tradicionais, reforçando o potencial da nisina como adjuvante terapêutico em sistemas de liberação controlada (Shin *et al*., 2016; Gedarawatte *et al*., 2021; Barbosa *et al*., 2021 Musiejuk).

PROTOCOLO DE PRODUÇÃO DO HIDROGEL

ETAPA 1 - SOLUBILIZAÇÃO DA GELATINA.

1.1. Preparo das soluções estoque

Preparar separadamente as soluções de ácido cítrico e citrato de sódio tri-hidratado, conforme descrito a seguir.

Solução de ácido cítrico

1. Adicionar aproximadamente 70 mL de água purificada em um balão volumétrico de 100 mL.
2. Pesar 3,824 g de ácido cítrico e transferir quantitativamente para o balão.
3. Homogeneizar até completa dissolução.
4. Completar o volume para 100 mL com água purificada.
5. Homogeneizar novamente.

Solução de citrato de sódio

1. Adicionar aproximadamente 70 mL de água purificada em um segundo balão volumétrico de 100 mL.
2. Pesar 6,234 g de citrato de sódio tri-hidratado e transferir quantitativamente para o balão.
3. Homogeneizar até completa dissolução.
4. Completar o volume para 100 mL com água purificada.
5. Homogeneizar novamente.

Nota: As massas descritas correspondem ao preparo das soluções estoque utilizadas para obtenção do tampão citrato. A forma de hidratação dos reagentes deve ser mantida constante entre os experimentos.

1.2. Preparo do tampão citrato 0,1 mol/L, pH 5,0

Para obtenção de 150 mL de tampão citrato 0,1 mol/L, transferir para um recipiente ou balão volumétrico adequado:

- 47,61 mL da solução de citrato de sódio;
- 27,39 mL da solução de ácido cítrico.

Adicionar água purificada até completar o volume final de 150 mL e homogeneizar cuidadosamente.

Determinar o pH utilizando pHmetro previamente calibrado. O tampão deverá apresentar pH 5,0 ± 0,2.

Caso necessário, realizar pequenos ajustes de pH utilizando as próprias soluções de ácido cítrico ou citrato de sódio, adicionadas gradualmente, e verificar novamente o pH após cada adição.

1.3. Solubilização da gelatina

1. Transferir os 150 mL do tampão citrato, pH 5,0 ± 0,2, para um béquer de capacidade adequada.

2. Cobrir o béquer com papel-alumínio para minimizar perdas por evaporação.
3. Aquecer o tampão até aproximadamente 80 °C.
4. Após atingir a temperatura estabelecida, retirar 100 mL do tampão aquecido e transferir para um béquer contendo barra magnética.
5. Manter o sistema sob agitação magnética e aquecimento controlado.
6. Pesar 15,0 g de gelatina em pó.
7. Adicionar a gelatina gradualmente aos 100 mL de tampão aquecido, mantendo agitação constante durante toda a adição, a fim de evitar a formação de grumos.
8. Manter a mistura sob agitação e aquecimento até a completa solubilização da gelatina, caracterizada pela obtenção de uma solução homogênea e sem partículas visíveis.
9. A solução obtida corresponde a uma formulação contendo 15% (m/v) de gelatina.
10. Retirar imediatamente uma alíquota de 10 mL da solução de gelatina para utilização na etapa subsequente.
11. Manter a alíquota sob aquecimento brando e agitação, suficiente para preservar sua fluidez e evitar a gelificação antes da incorporação dos demais componentes.

Ponto crítico: evitar o resfriamento da solução após a solubilização da gelatina, pois a redução da temperatura pode aumentar rapidamente sua viscosidade e comprometer a homogeneização nas etapas seguintes.

ETAPA 2 - INCORPORAÇÃO DOS COMPONENTES À MATRIZ DE GELATINA

Esta etapa deverá ser realizada em condições assépticas, em cabine de fluxo laminar previamente higienizada, utilizando materiais, recipientes e soluções estéreis sempre que aplicável.

2.1. Condicionamento da solução de gelatina

Após a solubilização da gelatina descrita na Etapa 1, retirar uma alíquota de 10,0 mL da solução de gelatina a 15% (m/v).

Manter a solução sob agitação magnética branda durante o resfriamento.

Aguardar até que a temperatura da solução atinja 40 ± 2 °C antes da incorporação dos demais componentes.

Confirmar a temperatura utilizando termômetro ou dispositivo previamente higienizado.

Ponto crítico: não adicionar os componentes bioativos enquanto a solução de gelatina estiver próxima à temperatura utilizada para sua solubilização. A temperatura de 40 ± 2 °C deverá ser mantida durante a etapa de incorporação, de modo a preservar a fluidez da matriz e reduzir a exposição dos componentes a temperaturas elevadas.

2.2. Incorporação da nanocelulose bacteriana

- Manter os 10,0 mL da solução de gelatina sob agitação magnética constante.
- Adicionar lentamente 4,0 mL da dispersão de nanocelulose bacteriana.
- Manter a mistura sob agitação durante 1 minuto.

Verificar visualmente a distribuição homogênea da nanocelulose na matriz antes de prosseguir.

A concentração da dispersão de nanocelulose bacteriana utilizada deverá ser previamente definida, registrada e mantida constante em todos os lotes experimentais.

2.3. Incorporação da sericina

Adicionar 2,0 mL da solução de sericina à mistura obtida na etapa anterior.

Manter a formulação sob agitação magnética durante 1 minuto.

Verificar a homogeneidade da preparação antes da próxima adição.

A concentração da solução de sericina deverá ser registrada e padronizada para todos os experimentos.

2.4. Incorporação da nisina

- Utilizar solução de nisina a 0,1 g/mL, previamente preparada em solução de EDTA 20 mmol/L.
- Adicionar 2,76 mL da solução de nisina à formulação.
- Manter a mistura sob agitação magnética durante 1 minuto.
- Evitar agitação excessiva para minimizar a formação de espuma e incorporação de bolhas de ar.
- Considerando a adição de 2,76 mL de uma solução de nisina a 0,1 g/mL, serão incorporados 276 mg de nisina à formulação.

2.5. Incorporação do antimicrobiano

- Adicionar 0,40 mL da solução do antimicrobiano em estudo.
- Registrar, para cada experimento:
- nome do antimicrobiano;
- concentração da solução estoque;
- solvente ou veículo utilizado;
- volume adicionado;
- concentração final do antimicrobiano na formulação.
- Manter a formulação sob agitação por aproximadamente 1 minuto antes da adição do tampão.

2.6. Ajuste do volume final e homogeneização

- Adicionar 0,84 mL de solução tampão citrato, pH 5,0 ± 0,2.
- Manter a formulação sob agitação magnética por 5 minutos, mantendo a temperatura em aproximadamente 40 ± 2 °C.

Ao final, verificar visualmente a formulação quanto à:

- homogeneidade;
- presença de agregados;
- formação de precipitado;
- separação de fases;
- formação excessiva de espuma ou bolhas de ar.

Caso a formulação apresente aspecto homogêneo, prosseguir imediatamente para a etapa subsequente.

2.7. Pontos críticos do processo

- Manter a ordem de adição dos componentes constante entre os diferentes lotes.
- Realizar a incorporação dos componentes a 40 ± 2 °C.
- Não permitir que a solução de gelatina resfrie excessivamente a ponto de iniciar sua gelificação.
- Evitar temperaturas elevadas durante a incorporação da sericina, nisina e antimicrobiano.
- Utilizar sempre a mesma velocidade de agitação, quando possível, registrando o valor em rpm.
- Evitar agitação excessiva e formação de bolhas de ar.
- Padronizar e registrar as concentrações da nanocelulose bacteriana, sericina e antimicrobiano.
- Registrar qualquer alteração visual da formulação durante o preparo, como precipitação, agregação ou separação de fases.

Prosseguir para a etapa seguinte logo após a homogeneização final, evitando variações decorrentes do resfriamento da matriz.

ETAPA 3 - DISTRIBUIÇÃO DA FORMULAÇÃO EM PLACA

1. Após a homogeneização final da formulação, distribuir 400 µL da preparação em cada poço de uma placa estéril de 24 poços. (Figura 1)

2. Realizar a distribuição cuidadosamente, procurando manter o volume e a mesma espessura de material em todos os poços.

3. Após o preenchimento, posicionar a placa aberta na cabine de fluxo laminar.

4. Expor as amostras à radiação ultravioleta (UV) durante 15 minutos.

5. Manter constante, entre todos os experimentos, a posição da placa e a distância entre as amostras e a fonte de radiação UV.

6. Ao término da exposição, proteger imediatamente a placa contra contaminação e proceder à preparação das amostras para a etapa de liofilização.

Ponto crítico: o tempo de exposição à radiação UV deverá ser rigorosamente padronizado.

Recomenda-se registrar também o comprimento de onda da lâmpada UV, a distância entre a fonte de radiação e a placa e, quando disponível, a potência ou irradiância do equipamento, garantindo maior reprodutibilidade do procedimento.

Figura 1 – Aspecto das amostras de hidrogel distribuídas em placa de 24 poços.

Fonte: Elaboração própria.

ETAPA FINAL: LIOFILIZAÇÃO E ACONDICIONAMENTO DAS AMOSTRAS

Após a etapa de exposição à radiação UV, encaminhar as placas contendo as amostras para congelamento prévio à liofilização.

1. Manter as amostras congeladas até que todo o volume esteja completamente solidificado.
2. Transferir as amostras congeladas para o liofilizador.
3. Realizar a liofilização até completa remoção da água e obtenção de estruturas secas e dimensionalmente estáveis.
4. Ao término do processo, retirar cuidadosamente as amostras dos poços, evitando danos à sua estrutura.
5. Inspecionar visualmente as amostras quanto à integridade, uniformidade, presença de fissuras, deformações ou alterações de aspecto.
6. Transferir individualmente as amostras liofilizadas para sachês de alumínio apropriados para armazenamento.
7. Remover, sempre que possível, o excesso de ar do interior da embalagem e realizar a selagem térmica dos sachês.
8. Identificar cada embalagem com, no mínimo:

- código da formulação;
- número do lote;
- data de preparo;
- identificação do antimicrobiano utilizado;
- condição de armazenamento.

Manter as amostras acondicionadas até sua utilização nos ensaios subsequentes.

Pontos críticos do processo

- Utilizar o mesmo volume de 400 µL por poço em todas as amostras.
- Padronizar as condições de exposição à radiação UV.

- Garantir o congelamento completo das amostras antes da liofilização.
- Padronizar os parâmetros do ciclo de liofilização entre os diferentes lotes.
- Evitar exposição prolongada das amostras liofilizadas à umidade ambiente.
- Realizar o acondicionamento nos sachês imediatamente após a retirada do liofilizador.
- Garantir a completa vedação das embalagens antes do armazenamento.

REFERÊNCIAS

AL MASUD, M. A. *et al*. Green synthesis of silk sericin embedded silver nanoparticles and their antibacterial application against multidrug-resistant pathogens. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, v. 19, n. 1, art. 74, 2021.

BAO, Y. *et al*. Artemisinin loaded silk fibroin/gelatin composite hydrogel for wound healing and tumor therapy. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 16, n. 6, art. 104782, 2023.

BARBOSA, A. A. T. *et al*. Nisin resistance in Gram-positive bacteria and approaches to circumvent resistance for successful therapeutic use. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 47, n. 3, p. 376-385, 2021

DAS, G. *et al*. Sericin based nanoformulations: a comprehensive review on molecular mechanisms of interaction with organisms to biological applications. **Journal of Nanobiotechnology**, v. 19, n. 1, art. 30, 2021.

GEDARAWATTE, S. T. G. *et al*. Antimicrobial efficacy of nisin-loaded bacterial cellulose nanocrystals against selected meat spoilage lactic acid bacteria. **Carbohydrate Polymers**, v. 251, art. 117096, 2021.

LIANG, S. Advances in drug delivery applications of modified bacterial cellulose-based materials. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 11, art. 1252706, 2023.

LU, Y. *et al*. A physicochemical double-cross-linked gelatin hydrogel with enhanced antibacterial and anti-inflammatory capabilities for improving wound healing. **Journal of Nanobiotechnology**, v. 20, n. 1, art. 426, 2022.

MOHANTO, S. *et al*. Advancements in gelatin-based hydrogel systems for biomedical applications: a state-of-the-art review. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 253, parte 5, art. 127143, 2023.

MUSIEJUK, M.; KAFARSKI, P. Engineering of nisin as a means for improvement of its pharmacological properties: a review. **Pharmaceuticals**, v. 16, n. 8, art. 1058, 2023.

SHIN, J. M. et al. Biomedical applications of nisin. **Journal of Applied Microbiology**, v. 120, n. 6, p. 1449-1465, 2016.

SULAEVA, I. et al. Bacterial cellulose as a material for wound treatment: properties and modifications. A review. **Biotechnology Advances**, v. 33, n. 8, p. 1547-1571, 2015.

TAO, G. et al. Fabrication of antibacterial sericin based hydrogel as an injectable and mouldable wound dressing. **Materials Science and Engineering: C**, v. 119, art. 111597, 2021.