

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

THAYSA FERNANDES MOYA MOREIRA

**DESENVOLVIMENTO DE HIDROGÉIS ANTIMICROBIANOS DE GELATINA
CONTENDO ÁCIDOS ORGÂNICOS PARA APLICAÇÕES ALIMENTÍCIAS**

DISSERTAÇÃO

CAMPO MOURÃO

2018

THAYSA FERNANDES MOYA MOREIRA

**DESENVOLVIMENTO DE HIDROGÉIS ANTIMICROBIANOS DE GELATINA
CONTENDO ÁCIDOS ORGÂNICOS PARA APLICAÇÕES ALIMENTÍCIAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos - PPGTA, da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR, campus Campo Mourão, como requisito para obtenção do título de Mestre em Tecnologia de Alimentos.

Orientadora: Prof^a Dr^a Fernanda Vitória Leimann.

Coorientadora: Prof^a Dr^a Adriana Aparecida Droval.

CAMPO MOURÃO

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

M838d

Moreira, Thaysa Fernandes Moya

Desenvolvimento de hidrogéis antimicrobianos de gelatina contendo ácidos orgânicos para aplicações alimentícias / Thaysa Fernandes Moya Moreira – 2018.

55 f.: il.; 30 cm.

Orientadora: Fernanda Vitória Leimann

Coorientadora: Adriana Aparecida Droval

Dissertação (Mestrado) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos. Campo Mourão, 2018.

Inclui bibliografias.

1. Ácidos orgânicos. 2. Carne microbiologia 3. Alimentos – Dissertações. I. Leimann, Fernanda Vitória, orient. II. Droval, Adriana Aparecida, coorient. III. Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos. IV. Título.

CDD: 664

Biblioteca Câmpus Medianeira
Marci Lucia Nicodem Fischborn CRB 9/1219



TERMO DE APROVAÇÃO

DESENVOLVIMENTO DE HIDROGÉIS ANTIMICROBIANOS DE GELATINA CONTENDO ÁCIDOS ORGÂNICOS PARA APLICAÇÕES ALIMENTÍCIAS

Por

THAYSA FERNANDES MOYA MOREIRA

Essa dissertação foi apresentada às 08:30 horas, do dia 19 de fevereiro de 2018, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Tecnologia de Produtos Alimentícios, Linha de Pesquisa Ciência e Tecnologia de Alimentos, no Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos - PPGTA, da Universidade Tecnológica Federal do Paraná. O(a) candidato(a) foi arguido(a) pela Banca Examinadora composta pelos professores abaixo assinados. Após deliberação, a Banca Examinadora considerou o trabalho APROVADO.

Prof(a). Dr(a). Fernanda Vitória Leimann
(Orientadora – PPGTA)

Prof(a). Dr(a). Regiane da Silva Gonzalez
(Membro Interno – UTFPR-CM)

Prof(a). Dr(a). Maria Filomena Barreiro
(Membro Externo – Instituto Politécnico de Bragança)

* A via original com as assinaturas encontra-se na secretaria do programa.

AGRADECIMENTOS

Meus primeiros agradecimentos são a Deus, obrigada senhor por mais uma etapa de crescimento e aprendizado em meio a felicidades e dificuldades da vida.

Gostaria de agradecer minha família, Tadeu Moreira, Elaine Fernandes Moya Moreira e Thiago Fernandes Moya Moreira por todo amor, estarem sempre comigo e serem o meu amparo em todas as situações.

Ao Lucas Ricken Garcia, meu amor e companheiro, não tenho palavras para descrever toda minha gratidão por seu auxílio nesta etapa, que vão desde um simples olhar de conforto até os fins de semana no laboratório.

Não poderia deixar de agradecer minha orientadora Fernanda Vitória Leimann que é muito mais do que uma orientadora (não que seja pouco), pois diante de todas as funções está sempre disponível para nos ajudar tanto nas metodologias, experimentos e escritas quanto nas angústias. Obrigada por tudo professora, um dia quero ser uma profissional tão competente quanto você é.

Gostaria de agradecer pela contribuição da Adriele Rodrigues dos Santos, muito obrigada por toda a disponibilidade, e me ensinar o prazer e desafios da microbiologia.

Tamires Barlati Vieira da Silva, obrigada pela parceria e auxílios de todas as horas, tornando os dias cansativos muito mais alegres.

E a todos que colaboraram de alguma forma com este trabalho com um pouco de seus conhecimentos: Anielle de Oliveira, professora Adriana Aparecida Droval, professor Odinei Hess Gonçalves, professora Regiane Gonzalez e professor Benício Alves de Abreu Filho, fica a minha sincera gratidão pela disponibilidade e desejo tudo de bom para vocês.

RESUMO

MOREIRA, T. F. M. **Desenvolvimento de hidrogéis antimicrobianos de gelatina contendo ácidos orgânicos para aplicações alimentícias**. 55 f. 2018. Dissertação de Mestrado (Mestrado em Tecnologia de Alimentos), Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Campo Mourão, 2018.

A demanda elevada de carne traz preocupações para a segurança alimentar devido a susceptibilidade às contaminações que podem ocasionar doenças transmitidas por alimentos (DTA). Dentre os fatores alarmantes estão as inconformidades na higienização de equipamentos relacionadas a ação inadequada dos sanitizantes. Com isso, aliado a necessidade de desenvolvimento de tecnologias verdes e redução do consumo de água, novos sanitizantes estão em ascensão. Uma das alternativas é a utilização de ácidos orgânicos, como o ácido láctico e o ácido acético, que apresentam atividade antimicrobiana e, por serem considerados seguros para a utilização em alimentos, não necessitam serem removidos após a aplicação, o que não ocorre com os sanitizantes tradicionais que necessitam de enxágue. A incorporação desses compostos em hidrogéis, que são estruturas poliméricas reticuladas, pode ser eficaz por sua facilidade de produção e baixo custo. Com isso, o trabalho tem como objetivo desenvolver hidrogéis de gelatina contendo ácidos orgânicos como sanitizantes para aplicação na limpeza interna de moedores de carne. Inicialmente, foram realizadas análises de concentração mínima inibitória e concentração mínima bactericida do ácido láctico e ácido acético conforme o método de microdiluição em caldo, análise de sinergismo na combinação dos ácidos através do índice de concentração inibitória fracionada (FIC) e ensaio de tempo de morte para inibição de *Salmonella Typhimurium*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. A partir da avaliação desses resultados foram produzidas formulações de hidrogéis de gelatina reticulada enzimaticamente (Transglutaminase): sem adição de ácidos orgânicos como controle (C), contendo ácido láctico 1×MIC e 6×MIC (GRL1 e GRL6), contendo ácido acético 1×MIC e 6×MIC (GRA1 e GRA6), contendo combinações de ácido láctico e acético 1×ensaio de sinergismo e 6×ensaio de sinergismo (GRLA1 e GRLA6). O efeito da incorporação dos ácidos orgânicos aos hidrogéis foi avaliado com relação a Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (interação química entre hidrogel e ácidos), Microscopia Eletrônica de Varredura (microestrutura), propriedades mecânicas (texturômetro), porosidade, intumescimento de equilíbrio em água, cinética de intumescimento e modelagem matemática da absorção de água (modelos de Higuchi, Kosmeyers-Peppas, Peppas-Sahlin). Além disso, o efeito antimicrobiano dos hidrogéis foi analisado *in vitro* através de ensaio de tempo de morte nos tempos de 1, 3, 6, 12 e 24 horas. Nos resultados foi possível verificar que o ácido láctico causou modificações estruturais responsáveis pelo aumento da porosidade, compactação da parede celular e diminuição da resistência mecânica, resultando em uma eficácia antibacteriana elevada para todos os microrganismos. Foram processadas amostras de carne antes e depois da aplicação dos hidrogéis previamente hidratados em moedor de carne para avaliar a qualidade da carne processada após sanitização com os hidrogéis por pH e análise microbiológica. Foi possível verificar que a qualidade da carne após a simulação de sanitização com os hidrogéis permaneceu a mesma. Com isso, os hidrogéis de gelatina podem ser uma alternativa viável ao uso de sanitizantes diluídos em água, garantindo a eficácia antimicrobiana comprovada nos estudos.

Palavras-chave: ácidos orgânicos, hidrogéis de gelatina, sanitizante, equipamento cárneo.

ABSTRACT

MOREIRA, T. F. M. **Development of antimicrobial gelatin hydrogels containing organic acids for food applications**. 55 f. 2018. Master thesis (Post-Graduate Program in Food Technology - Academic Master level), Federal Technological University of Paraná. Campo Mourão, 2018.

Intense meat demand brings food safety concerns due to susceptibility to contamination that can lead to foodborne illness. Among the alarming factors are the nonconformities in the hygiene of equipment related to the sanitizer's inadequate action. With that, together with the need to develop green technologies and reduce water consumption, new sanitizers are on the rise. One of the alternatives is the use of organic acids, such as lactic acid and acetic acid, which have antimicrobial activity and, because they are considered safe for use in foods, do not need to be removed after application, which is not the case with sanitizers which need rinsing. The incorporation of these compounds into hydrogels, which are cross-linked polymeric structures, can be effective because of their ease production and low cost. With this, the objective of this work is to develop gelatin hydrogels containing organic acids as sanitizers for application in the internal cleaning of meat grinders. Initially, analyses of minimum inhibitory concentration and minimum bactericidal concentration of the lactic and acetic acids were carried out according to the broth microdilution method, synergism analysis in the combination of the acids through the fractional inhibitory concentration index (FIC) and time-kill for inhibition of *Salmonella* Typhimurium, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. From the evaluation of these results, enzymatically (Transglutaminase) crosslinked gelatin hydrogel formulations were produced: without addition of organic acids as control (C), containing 1xMIC lactic acid and 6xMIC (GRL1 and GRL6), containing 1xMIC acetic acid and 6xMIC (GRA1 and GRA6), containing combinations of lactic and acetic acids 1xsynergism and 6x synergism test (GRLA1 and GRLA6). The effect of the organic acids incorporation on the hydrogels was evaluated with respect to Infrared Spectroscopy by Fourier Transform (chemical interaction between hydrogels and acids), Scanning Electron Microscopy (microstructure), mechanical properties (texturometer), porosity, equilibrium swelling in Water, swelling kinetics and mathematical modeling of water absorption (Higuchi, Kosmeyers-Peppas, Peppas-Sahlin models). In addition, the antimicrobial effect of the hydrogels was analyzed in vitro by time-kill assay at times of 1, 3, 6, 12 and 24 hours. In the results it was possible to verify that lactic acid caused structural modifications responsible for the increase of porosity, cell wall compaction and the decrease of mechanical resistance, resulting in high antibacterial efficacy for all microorganisms. Meat samples were processed before and after the application of hydrogels previously hydrated in meat grinders to evaluate the quality of meat processed after sanitization with the hydrogels by pH and microbiological analysis. It was possible to verify that the meat quality after the sanitization simulation with the hydrogels remained the same. Thus, gelatin hydrogels can be a viable alternative to the use of sanitizers diluted in water, guaranteeing the proven antimicrobial efficacy in the studies.

Key-words: organic acids, gelatin hydrogels, sanitizers, meat processing equipment.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura química do ácido lático.....	18
Figura 2. Estrutura química do ácido lático.....	19
Figura 3. Estrutura química básica da gelatina.....	22
Figura 4. Reação de reticulação de proteína (gelatina) com TGase.....	23
Figura 5. FTIR-UAR espectros de: ácido acético (HAc) e ácido lático (HLA) (A); GRL = hidrogel de gelatina contendo ácido lático, C = controle, GRA = hidrogel de gelatina contendo ácido acético, GRLA = hidrogel de gelatina contendo os ácidos lático e acético (B).....	33
Figura 6. Imagens do Microscópio Eletrônico de Varredura (ampliação de 100 x) dos hidrogéis de gelatina: GRA1 = com ácido acético 1xCIM (A); GRA6 = com ácido acético 6xCIM (B); GRL1 = com ácido lático 1xCIM (C); GRL6 = com ácido lático 6xCIM (D); GRLA1 = com ácido lático e acético 1 x ensaio de sinergia (E); GRLA6 = com ácido lático e acético 6 x ensaio de sinergia (F); C = controle (G).....	34
Figura 7. Teste de punção (N) do: Controle, GRA1 = com ácido acético 1xCIM; GRA6 = com ácido acético 6xCIM; GRL1 = com ácido lático 1xCIM; GRL6 = com ácido lático 6xCIM; GRLA1 = com ácido lático e acético 1 x ensaio de sinergia; GRLA6 = com ácido lático e acético 6 x ensaio de sinergia; ^{a,b} diferentes letras na mesma coluna indicam diferença significativa ($p < 0.05$) pelo teste de Tukey....	34
Figura 8. Grau de intumescimento (%) of: Controle (■) (A); GRA1 = com ácido acético 1xCIM (●) and GRA6 = com ácido acético 6xCIM (○) (B); GRL1 = com ácido lático 1xCIM (▲) and GRL6 = com ácido lático 6xCIM (Δ) (C); GRLA1 = com ácidos lático e acético 1 x ensaio de sinergia (◆) and GRLA6 = com ácidos lático e acético 6 x ensaio de sinergia (◇) (D).....	36
Figura 9. Razão de intumescimento (Q) do: Controle (■) (A); GRA1 = com ácido acético 1xCIM (●), GRA6 = com ácido acético 6xCIM (▲) (B); GRL1 = com ácido lático 1xCIM (◆), GRL6 = com ácido lático 6xCIM (▶) (C); GRLA1 = com ácidos lático e acético 1 x ensaio de sinergia (▼), GRLA6 = com ácidos lático e acético 6 x ensaio de sinergia (◀) (D).....	37
Figura 10. Percentagem de contribuição dos mecanismos de difusão Fickiana (-) e relaxação (--) na cinética de intumescimento dos hidrogéis: Controle (■), GRA1 = com ácido acético 1xCIM (●), GRA6 = com ácido acético 6xCIM (▲), GRL1 = com ácido lático 1xCIM (▼), GRL6 = com ácido lático 6xCIM (◀), GRLA1 = com ácidos lático e acético 1 x ensaio de sinergia (▶) and GRLA6 = com ácidos lático e acético 6 x ensaio de sinergia (◆).....	39
Figura 11. Atividade antibacteriana das formulações de hidrogéis: Controle (▶); GRA1 = com ácido acético 1xCIM (●); GRA6 = com ácido acético 6xCIM (○); GRL1 = com ácido lático 1xCIM (■); GRL6 = com ácido lático 6xCIM (□); GRLA1 = com ácido lático e acético 1 x ensaio de sinergia (▲); GRLA6 = com ácido lático e acético 6 x ensaio de	

sinergia (Δ) contra <i>S. Typhimurium</i> (A), <i>S. aureus</i> (B), <i>P. aeruginosa</i> (C) e <i>E. coli</i> (D).....	41
Figura 12. Atividade antibacteriana das formulações de hidrogéis: Controle (\blacktriangleright); GRA1 = com ácido acético 1xCIM (\bullet); GRA6 = com ácido acético 6xCIM (\circ); GRL1 = com ácido láctico 1xCIM (\blacksquare); GRL6 = com ácido láctico 6xCIM (\square); GRLA1 = com ácido láctico e acético 1 x ensaio de sinergia (\blacktriangle); GRLA6 = com ácido láctico e acético 6 x ensaio de sinergia (Δ) contra <i>S. Typhimurium</i> (A), <i>S. aureus</i> (B), <i>P. aeruginosa</i> (C) e <i>E. coli</i> (D).....	43

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Ácidos orgânicos aplicados em alimentos como antimicrobianos.	17
Tabela 2. Hidrogéis com propriedade antimicrobiana.....	24
Tabela 3. Atividade antibacteriana e ensaio de sinergia dos ácidos láctico e acético.....	31
Tabela 4. Concentração de ácidos aplicados nos hidrogéis..	32
Tabela 5. Cinética de intumescimento dos hidrogéis para diferentes modelos matemáticos.....	38
Tabela 6. Qualidade de amostras de carne processadas em moedor de carnes antes e depois da sanitização com hidrogel.....	42

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
2	OBJETIVOS	12
2.1	OBJETIVO GERAL	12
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	12
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
3.1	HIGIENIZAÇÃO NA INDÚSTRIA DE CARNES	13
3.2	SANITIZAÇÃO	14
3.2.1	Novas tecnologias utilizadas para a desinfecção de superfícies	15
3.3	ÁCIDOS ORGÂNICOS	16
3.3.1	Ácido láctico	18
3.3.2	Ácido acético	19
3.4	HIDROGÉIS	19
3.4.1	Gelatina	21
3.4.2	Transglutaminase	23
3.4.3	Hidrogéis antimicrobianos	24
4	METODOLOGIA	25
4.1	MATERIAIS	25
4.2	MICROORGANISMOS	25
4.3	CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) E CONCENTRAÇÃO BACTERICIDA MÍNIMA (CBM)	25
4.4	AVALIAÇÃO DE SINERGIA DOS ÁCIDOS ORGÂNICOS	26
4.5	SÍNTESE DOS HIDROGÉIS DE GELATINA	27
4.6	CARACTERIZAÇÃO DOS HIDROGÉIS DE GELATINA	27
4.6.1	Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)	27
4.6.2	Microestrutura	28
4.6.3	Cinética de intumescimento	28
4.6.4	Teste de Punção	29
4.7	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA	29
4.8	ANÁLISE ESTATÍSTICA	30
4.9	QUALIDADE DA CARNE APÓS SANITIZAÇÃO COM HIDROGEL	30
5	RESULTADOS E DISCUSSÕES	31
5.1	ATIVIDADE ANTIBACTERIANA E ENSAIO DE SINERGIA DOS ÁCIDOS	31
5.2	CARACTERIZAÇÃO DOS HIDROGÉIS	32
5.2.1	Cinética de Intumescimento	36
5.3	ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DOS HIDROGÉIS	40
5.4	QUALIDADE DA CARNE PROCESSADA EM MOEDOR DE CARNES	42
6	CONCLUSÃO	45
7	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	50
8	REFERÊNCIAS	51

1 INTRODUÇÃO

O comércio mundial de carnes deve apresentar uma demanda crescente até 2025 sustentada pelos países emergentes em consequência do aumento de renda, crescimento populacional e urbanização (OECD-FAO, 2014; VRANKEN et al., 2014; USDA, 2016). Com essa projeção as exportações seguem um ritmo elevado, fator alarmante para a segurança alimentar na indústria cárnea, por ser um ambiente de fácil contaminação devido ao alto teor nutricional, propício ao desenvolvimento de diversos tipos de microrganismos (OECD-FAO, 2014; GUL; SINGH; WANI, 2016).

Essa contaminação pode trazer graves implicações ligadas ao surgimento de Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA) ocasionadas através da ingestão de alimentos contaminados por patógenos entéricos, parasitas ou contaminação química (WHO, 2007; KASUGA et al., 2014). Scallan et al. (2011) estimaram que a cada ano nos Estados Unidos 31 patógenos são responsáveis por cerca de 9,4 milhões de DTAs, resultando em 55,961 mil hospitalizações e 1,351 mil mortes.

A agência americana *Food and Drug Administration* (FDA) criou um banco de dados para relatar minuciosamente os fatores de riscos da incidência de DTAs com o objetivo de estabelecer um patamar para a mudança das medidas adotadas pela indústria. Dentre esses fatores se encontram os equipamentos contaminados, e, apesar dos maiores cuidados nesses quesitos, no ano 2000 foram relatados 45% de inconformidades nas superfícies, utensílios limpos e sanitização nas indústrias de carnes e aves (FDA, 2000; BASTARRACHEA; GODDARD, 2016). A ineficiência do método de higienização pode ocorrer por falta de treinamento dos funcionários, tempo de contato insuficiente do sanitizante e utilização de sanitizantes incompatíveis com a aplicação desejada (CRANDALL et al., 2016; RUTALA; WEBER, 2016).

Quanto aos sanitizantes, além da incompatibilidade na aplicação, o aumento no uso dos sanitizantes geralmente utilizados na desinfecção dos equipamentos tem contribuído para o surgimento de microrganismos resistentes aos desinfetantes, representando um problema potencial (LANGSRUD et al., 2003). Uma das soluções pode ser o uso de novos sanitizantes como água ácida eletrolisada, cloreto de sódio acidificado, cloreto de cetilpiridínio e ácidos orgânicos para eliminar microrganismos patogênicos

superficiais em alimentos (MANI-LÓPEZ; GARCÍA; LÓPEZ-MALO, 2012; PHUA et al., 2014; ZHANG et al., 2016).

Diversos estudos têm verificado a eficácia antimicrobiana dos ácidos orgânicos em produtos cárneos (ZAKI; MOHAMED; EL-SHERIF, 2015; DEGEER et al., 2016; MOHAN; POHLMAN, 2016). Alguns desses são o ácido acético (ácido monocarboxílico) e o ácido láctico (ácido 2-hidroxiopropanóico), ambos considerados seguros para aplicação em produtos cárneos conforme a FDA (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2011). Isso possibilita a aplicação como sanitizante sem a necessidade da etapa de enxague, passo importante para a diminuição de águas residuais, um dos principais indicadores do impacto ambiental e desafios no desenvolvimento de novas tecnologias (DJEKIC, 2015; DJEKIC; TOMASEVIC, 2016).

A incorporação de compostos ativos em hidrogéis também pode ser uma alternativa (ULLAH et al., 2015). Os hidrogéis são polímeros de estrutura tridimensional com alta capacidade de retenção de água dependente de parâmetros como capacidade de absorção de água e do método utilizado para criação de ligações entre as cadeias poliméricas.

A ligação entre as cadeias poliméricas pode ser obtida de forma química, por ligação covalente, ou de forma física, por forças de van der Waals, determinantes na formação das redes tridimensionais (KABIRI et al., 2003; OVIEDO et al., 2008; BHATTARAI; GUNN; ZHANG, 2010).

Um dos polímeros utilizado para a síntese de hidrogéis é a gelatina, proteína obtida através da hidrólise de colágeno existente no tecido conjuntivo ou em pele de animais (KHAN; SCHNEIDER, 2013). Este biopolímero tem se destacado por apresentar vantagens como ser biocompatível, biodegradável, de grande capacidade para a modificação no nível de aminoácidos, possuir aprovação da FDA como um agente de coagulação, possuir baixa imunogenicidade, citotoxicidade e formar hidrogéis através de procedimentos fáceis e de baixo custo (EINERSON; STEVENS; KAO, 2002).

Estudos descrevem a utilização da enzima transglutaminase para a reticulação de hidrogéis de gelatina (HE et al., 2016; LIU et al., 2016b). Essa enzima atua como agente reticulante proporcionando por meio de modificação enzimática a formação de ligações cruzadas das cadeias poliméricas resultando no fortalecimento da estrutura tridimensional (CARVALHO; GROSSO, 2006).

Portanto, a proposta do presente trabalho foi produzir hidrogéis de gelatina reticulados com transglutaminase contendo os ácidos orgânicos, ácido lático e ácido acético, e avaliar a ação sanitizante destes em moedor de carne.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Produzir e caracterizar hidrogéis de gelatina reticulados com enzima transglutaminase contendo ácido lático e ácido acético, quanto suas propriedades antimicrobianas, morfológicas, térmicas, mecânicas e de intumescimento em água, bem como avaliar seu efeito sanitizante em moedor de carne.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar a ação antimicrobiana dos ácidos lático e acético por microdiluição em caldo e análise de sinergismo (índice de concentração inibitória fracionada, CIF) para *Salmonella Typhimurium*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*;
- Avaliar a resistência dos microrganismos *in vitro* após a aplicação dos hidrogéis contendo os ácidos lático e acético por tempo de morte;
- Caracterizar os hidrogéis, com melhor resultado na análise microbiológica, quanto a interação química entre hidrogel e os ácidos (Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier), propriedades térmicas (Calorimetria Diferencial de Varredura), microestrutura (Microscopia Eletrônica de Varredura) e propriedades mecânicas (texturômetro);
- Avaliar o intumescimento de equilíbrio em água e a cinética de intumescimento dos hidrogéis em função do ácido utilizado;
- Determinar o tipo de fenômeno envolvido na absorção de água através de modelagem matemática pelos modelos de Higuchi, Kosmeiers-Peppas, Peppas-Sahlin;
- Determinar o efeito da qualidade da carne antes e após a simulação da sanitização dos hidrogéis por pH e análise microbiológica.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 HIGIENIZAÇÃO NA INDÚSTRIA DE CARNES

A higiene alimentar, de forma geral, pode ser interpretada como todas as ações necessárias para garantir a segurança alimentar durante as fases de produção e consumo dos alimentos assegurando a manutenção da saúde (MOTARJEMI, 2016). Esses requisitos de higiene são muito importantes, pois, de acordo com *World Health Organization* (2015), aproximadamente 600 milhões de pessoas adoecem a cada ano ao consumirem alimentos contaminados e destas, cerca de 420 mil pessoas morrem.

Porcentagens consideráveis da incidência de doenças transmitidas por alimentos são devidas a contaminação microbiana durante o processamento e manipulação dos produtos por possuírem rápido metabolismo causando graves intoxicações alimentares (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2015; BÖHME; BARROS-VELÁZQUEZ; CALO-MATA, 2017).

Em produtos cárneos essa preocupação é ainda maior por ser um ambiente ideal para a propagação de agentes patógenos possuindo uma variedade de nutrientes em sua composição (GUL; SINGH; WANI, 2016). Por isso, a indústria cárnea a fim de controlar e minimizar o risco microbiano segue etapas rígidas de higienização das superfícies existentes no sistema de Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC) como pré-requisito da segurança alimentar (MEAD, 2000).

Essas etapas são separadas basicamente em limpeza e desinfecção. A limpeza consiste em pré-enxague com água quente para a eliminação de resíduos superficiais como partículas de gordura, limpeza com detergente para a remoção de sujidades aderidas e enxague para a remoção do detergente. Já a desinfecção consiste em utilizar sanitizantes para a destruição de microrganismos patogênicos (AESBUC, 2003; BAPTISTA, 2003).

3.2 SANITIZAÇÃO

A sanitização ao englobar os procedimentos de limpeza e desinfecção encontra-se diretamente ligada ao controle de perigos biológicos, químicos e físicos da produção de alimentos. Além das práticas de higiene que proporcionam um ambiente limpo e adequado para a produção, processamento, preparação, armazenamento e distribuição de alimentos, a sanitização fornece uma melhor qualidade, economia, vida de prateleira e estética dos produtos. Portanto, representa uma das ferramentas mais importantes para garantir a qualidade alimentar (KAKURINOV, 2014).

O principal objetivo é remover todos os materiais indesejáveis que podem ser resíduos alimentares, microrganismos, corpos estranhos e produtos químicos de limpeza (HOLAH, 2014). Para realizar um programa de sanitização adequado e econômico é essencial caracterizar a natureza desses materiais a serem removidos através de sua composição química, carboidratos, gorduras ou proteínas (HOLAH; WEST; MCHARDY, 2016).

Além disso, é essencial ter conhecimento do material da superfície em que será realizada a sanitização, pois este apresenta grande influência na seleção correta do composto utilizado na sanitização e avaliação da eficiência de limpeza (KAKURINOV, 2014). Essa preocupação é ampliada também aos equipamentos, que devem ser construídos de materiais adequados, mantidos limpos, instalados de modo a permitir a limpeza da área circundante e, se necessário, desinfetados o suficiente para os fins previstos (MOERMAN; LORENZEN, 2017).

Essa desinfecção pode ser realizada aplicando agentes ou processos químicos e físicos sobre as superfícies. Os agentes químicos são chamados de desinfetantes e sua escolha se baseia em algumas características ideais como: ampla capacidade de destruição microbiana, propriedades não tóxicas, facilidade e segurança no uso, estabilidade, resistência à matéria orgânica e propriedades não corrosivas (BAPTISTA, 2003). Dependendo da aplicação o desinfetante pode apresentar maior limitação quanto a essas características. Por isso, na indústria de alimentos tradicionalmente são utilizados os desinfetantes que possuem em sua estrutura compostos de cloro, compostos de iodo, amônio quaternário e ácidos aniônicos (BERK, 2013; SAPERS, 2014).

3.2.1 Novas tecnologias utilizadas para a desinfecção de superfícies

Tendências e tecnologias emergentes estão sendo pesquisadas em diversos estudos através de novos desinfetantes e métodos de desinfecção. Dentre as alternativas encontradas uma delas está na forma de aplicação do desinfetante, usualmente por contato direto na forma líquida ou espuma (SKÅRA; ROSNES, 2016). A aplicação por nebulização, que consiste na dispersão de uma solução no ar na forma de névoa fina, está sendo considerada efetiva na redução do número de microrganismos em superfícies. Apesar disso essa tecnologia apresenta limitações causadas pela natureza oxidativa dos desinfetantes podendo causar problemas de corrosão (CLARK et al., 2006; MANA et al., 2017).

Neste contexto, Witte et al. (2016) avaliaram a utilização de jateamento com gelo seco na limpeza e desinfecção de equipamentos em laticínios, na qual foi verificado que o método é eficaz apenas para o processo de limpeza, uma vez que a taxa de remoção das bactérias foi inferior ao recomendado de 5 log (CFU mL⁻¹). Liu et al. (2015) analisaram o uso de dióxido de carbono supercrítico (SC-CO₂) como agente de limpeza de equipamentos metálicos, na qual, os resultados indicaram que o SC-CO₂ foi excelente na descontaminação, mas dependente de parâmetros como temperatura, pressão, fluxo e tempo de limpeza.

Além da forma de aplicação existem diversas maneiras para alcançar a descontaminação. Dentre essas a modificação superficial de materiais e combinação de dois ou mais agentes químicos para obter efeito sinérgico na descontaminação (SKÅRA; ROSNES, 2016). Com esse objetivo, Bastarrachea e Goddard (2016) desenvolveram um revestimento antimicrobiano composto por polietilenoimina ramificada (PEI) e copolímero de estireno anidrido maleico (SMA) que demonstrou ser eficaz contra *Escherichia coli* O157:H7 na presença de matéria orgânica ao ser aplicado em um suporte de polipropileno com anidrido maleico. Regalado et al. (2016) obtiveram uma redução bacteriana resultante da decomposição do leite de 5 log (CFU mL⁻¹) ao combinarem água alcalina eletrolisada e água neutra eletrolisada e aplicarem em placas de aço inoxidável por 30 segundos.

Pela legislação, para aplicação e utilização como desinfetante de superfícies que contêm alimentos, o desempenho deve ser avaliado conforme as normas europeias BS EN 1276 e BS EN 13697 contra bactérias, fungos, bactérias formadoras de esporos e

vírus em função do tempo de contato. As normas indicam que os desinfetantes ao serem colocados em superfícies contaminadas devem reduzir 5 log's de bactérias em menos de 5 minutos para aplicações de ação mais rápida, por exemplo, desinfecção de mãos, ou entre 30 a 60 minutos para aplicações mais lentas como tanques de imersão (HOLAH; WEST; MCHARDY, 2016).

3.3 ÁCIDOS ORGÂNICOS

Os ácidos orgânicos são compostos que possuem carbono em sua estrutura. Por apresentarem menos que 10 carbonos, diferenciam-se dos ácidos graxos, que possuem entre 4 e 24 carbonos. Esses carbonos geralmente estão presentes nos grupos carboxílicos podendo ser ligados covalentemente com grupos amida, éster e peptídeos. Os ácidos orgânicos podem existir em duas formas básicas: ácido puro ou tamponado. Entre os ácidos puros estão o ácido láctico, ácido propiônico, ácido acético, ácido cítrico e ácido benzoico enquanto que os sais de cálcio e sódio dos ácidos propiônico, acético, cítrico e benzoico são ácidos orgânicos tamponados. A vantagem dos ácidos orgânicos é devida a sua estrutura simples e tamanho molecular pequeno permitindo a movimentação ao longo das células (THERON; LUES, 2007; PAPAGIANNI, 2011).

Além disso, são considerados ácidos fracos, ou seja, maior parte encontra-se na forma não dissociada quando adicionados em água, dissociando-se apenas com redução no pH (DZIEZAK, 2016).

Essa dissociação do ácido orgânico em solução é relacionada com o pH do sistema e as concentrações de ácido dissociado e protonado através da equação de Henderson-Hasselbalch (Equação 1), descrita em Mcdade et al. (2012).

$$pH = pK_a + \log \frac{[A^-]}{[HA]} \quad (1)$$

Onde pK_a é a constante de dissociação de ácido e $[A^-]$ e $[HA]$ são as concentrações de ácidos dissociados e protonados, respectivamente.

Esses ácidos são encontrados naturalmente nos alimentos, aliado as exigências nutricionais para a disponibilidade de aditivos não nocivos com tratamentos mais leves, a demanda e utilização dos ácidos orgânicos na indústria de alimentos é cada vez mais frequente (THERON; LUES, 2010).

Os ácidos orgânicos e seus sais são adicionados em alimentos principalmente para controlar o pH, evitar a oxidação ou para atuarem como conservantes por possuírem ação antimicrobiana. A aplicação geralmente é feita por aspersão, lavagem ou imersão em solução, dependendo do produto a ser descontaminado. O mecanismo de conservação além de depender do produto, também depende do modo de ação do ácido que pode ser por redução do pH externo, redução no pH interno do produto, permeabilidade da membrana ou acumulação de ânions (BARRY-RYAN, 2015). A Tabela 1 apresenta estudos que obtiveram êxito ao utilizarem ácidos orgânicos em microrganismos e formas de aplicações variadas.

Tabela 1. Ácidos orgânicos aplicados em alimentos como antimicrobianos.

Ácido Orgânico	Microrganismo	Aplicação	Referência
Ácido acético Ácido láctico Ácido levulínico	<i>Escherichia coli</i> O157:H7 <i>Salmonella</i> spp. <i>Listeria monocytogenes</i> <i>E. coli</i> não-O157	Marinado em carne	(FISHER et al., 2016)
Ácido láctico Ácido acético	<i>Staphylococcus aureus</i>	Carne processada	(DE OLIVEIRA et al., 2010)
Ácido sórbico Ácido benzoico	<i>Escherichia coli</i> O157:H7 <i>Listeria monocytogenes</i> <i>Salmonella Enteritidis</i> <i>Staphylococcus aureus</i>	Filmes em anchovas	(ROCHA et al., 2013)
Ácido láctico Ácido levulínico Ácido acético	<i>Salmonella</i> entérica	Imersão de frango em solução	(ZAKI; MOHAMED; EL-SHERIF, 2015)

Fonte: Autoria Própria.

Na indústria de carnes, a maioria dos ácidos orgânicos, como o ácido láctico e o ácido acético, encontram-se entre as substâncias consideradas substâncias seguras para o consumo (GRAS), conforme a legislação da União Europeia e a “*Food and Drug Administration*” (FDA), estando na lista de aditivos autorizados e recomendados como conservantes para utilização em todas as espécies de carne bovina (THERON; LUES, 2010; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2011).

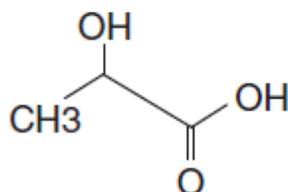
Os ácidos orgânicos também são utilizados como sanitizantes e, por serem substâncias seguras, apresentam vantagens sobre os sanitizantes comuns, como o hipoclorito, em relação às limitações em quantidade de uso e manter-se estável em ambientes com elevada carga orgânica. No entanto, sua atividade antimicrobiana é

geralmente baixa e requer longos tempos de contato combinado com altas concentrações para reduzir a carga microbiana (WARRINER; NAMVAR, 2014).

3.3.1 Ácido láctico

O ácido láctico, que tem sua estrutura química representada na Figura 1, é um ácido monocarboxílico com pKa de 3,79, produzido por fermentação resultante de diversas bactérias ou durante a respiração anóxica. Ocorre em duas formas isoméricas (D-, L-), sendo o isômero L mais eficaz para a inibição de patógenos (MCDADE et al., 2012).

Figura 1. Estrutura química do ácido láctico. Fonte: (PAPAGIANNI, 2011).



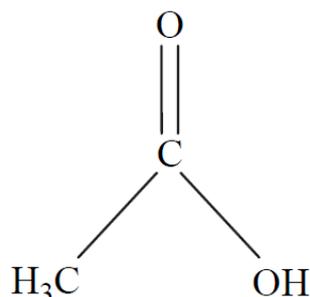
O ácido láctico é utilizado em aplicações como conservantes em indústrias de alimentos, no processamento de couro, em indústrias farmacêuticas e indústrias de cosméticos (JOGLEKAR et al., 2006). Na indústria de cosméticos, o ácido láctico é comumente utilizado para fabricação de produtos que relacionam higiene e estética como hidratantes, rejuvenescedores e produtos de higiene bucal (CASTILLO MARTINEZ et al., 2013).

A produção mundial de ácido láctico cresce a cada ano cerca de 12 a 15% e, da produção total produzida, o setor com maior demanda é o de alimentos, podendo chegar até a 85% por ano (JOGLEKAR et al., 2006; PAPAGIANNI, 2011; QUITMANN; FAN; CZERMAK, 2013). Isto é devido a grande utilização do ácido láctico na conservação de alimentos e como agente de ajuste de pH em bebidas. Além disso, encontra-se incluso como um produto seguro para aplicação em alimentos conforme a FDA com ingestão diária aceitável ilimitada (WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO), 1974; QUITMANN; FAN; CZERMAK, 2013).

3.3.2 Ácido acético

O ácido acético é produzido pela fermentação da celulose através da bactéria *Acetobacter* a partir da deterioração de frutas e outros alimentos (DAVIDSON; BRANEN; JOHN N. SOFOS, 2005; THERON; LUES, 2007; BOVERA et al., 2010). Sua estrutura química, representada na Figura 2, contém apenas um grupo carboxila (COOH) e, por seu pK_a ser de $1,75 \times 10^{-5}$, apresenta maior potencial inibitório do que o ácido láctico para diversos microrganismos (THERON; LUES, 2010).

Figura 2. Estrutura química do Ácido acético. Fonte: (THERON; LUES, 2007).



Este ácido é altamente solúvel em água e, por possuir odor e sabor pungente, a utilização em alimentos é limitada sendo usado principalmente como vinagre, e em produtos em conserva como salsichas e outros derivados de suíno (MANI-LÓPEZ; GARCÍA; LÓPEZ-MALO, 2012). Assim como o ácido láctico, o ácido acético é considerado seguro com quantidades ilimitadas de ingestões diárias aceitáveis para os seres humanos (WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO), 1974; THERON; LUES, 2010; MANI-LÓPEZ; GARCÍA; LÓPEZ-MALO, 2012).

3.4 HIDROGÉIS

Hidrogéis são redes poliméricas com alta capacidade de retenção de água resultantes de ligações formadas entre as cadeias do polímero (AHMED, 2015). Essa hidratação em meio aquoso é devida aos grupos hidrofílicos e à intensidade das ligações, responsáveis por formar a estrutura tridimensional do mesmo e prevenir a dissolução das cadeias no meio (AKHTAR; HANIF; RANJHA, 2016).

Os hidrogéis podem ser classificados como naturais, sintéticos ou híbridos, dependendo da fonte dos polímeros constituintes (BUWALDA et al., 2014). A classificação dos hidrogéis também pode ser baseada na forma de reticulação (química, física ou enzimática), método de preparação, carga elétrica (catiônico, aniônico ou não-iônico), biodegradabilidade (biodegradável ou não-biodegradável), propriedades físicas (inteligentes ou convencionais) e tipo de resposta (bioquímica ou física) (AHMED, 2015; ULLAH et al., 2015; ALESA et al., 2017). Essa classificação pode influenciar em diversas características dos hidrogéis como solubilidade, cristalinidade, biodegradabilidade, propriedades mecânicas e térmicas, permeabilidade, estrutura de rede, resistência mecânica, durabilidade e estabilidade durante o intumescimento e armazenamento (DRAGAN, 2014; MA et al., 2016; ALESA et al., 2017).

Em relação à fonte polimérica, os hidrogéis naturais, como quitosana, alginato, colágeno e gelatina, apresentam menor utilização em diversas aplicações em comparação com os hidrogéis sintéticos. Isto porque estes hidrogéis são hibridizados proporcionando maior vida útil, resistência e capacidade de absorção de água (LIN; METTERS, 2006; ALESA et al., 2017). Apesar disso, os hidrogéis naturais, em aplicações como em fármacos e produtos alimentícios, são bastante úteis, pois apresentam propriedades vantajosas como biocompatibilidade inerente, biodegradabilidade e porções biologicamente reconhecíveis que suportam atividades celulares, propriedades pouco encontradas em polímeros sintéticos (LIN; METTERS, 2006; BAJPAI et al., 2008; JING et al., 2013).

Com isso, a utilização de hidrogéis naturais vem sendo estudada para diversas finalidades. Farjami; Madadlou; Labbafi (2015) utilizaram ácido cítrico para ajustar o pH e a reticulação de proteínas do soro do leite antes ou depois de sua microgelificação por calor e, compararam com microgel convencional produzido por ácido clorídrico. O ácido cítrico demonstrou atuar na reticulação prolongada das proteínas antes da microgelificação através de extensa ligação cruzada, formando um microgel pré-reticulado mais firme, com maior capacidade de retenção de água e uma microestrutura mais densa em comparação com os microgéis convencionais e pós-cruzados. Isto indica uma possível utilização destes microgéis em sistemas de distribuição comestíveis.

Furuike et al. (2017) avaliaram a utilização de hidrogelação como alternativa para o aumento da estabilidade de hidrogel de quitosana ao ser sintetizado pela adição de solução de hidróxido de sódio em uma solução de ácido acético contendo quitosana. Como este hidrogel apresentou longa estabilidade à temperatura ambiente sem redução

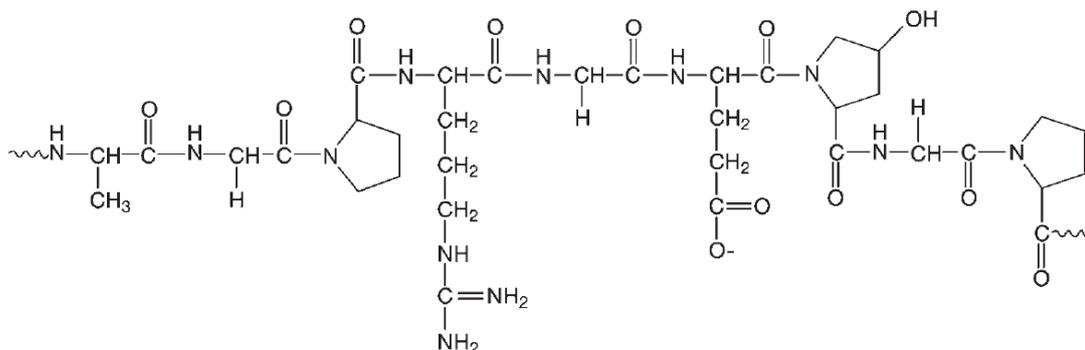
no peso molecular, o hidrogel de quitosana possui potencial para aplicação em biomateriais e materiais funcionais.

Além da modificação dos hidrogéis para proporcionar melhorias em suas características, os hidrogéis também podem ser utilizados no desenvolvimento de novos produtos, na liberação de fármacos e como antimicrobianos. Ha et al. (2016) utilizaram hidrogéis de alginato de cálcio na otimização da produção de análogos de ovas de peixe voador. Sabbagh; Muhamad (2016) estudaram o efeito e a caracterização de diferentes tampões na liberação do fármaco aciclovir existente em hidrogéis de nanocompósito MgO. Konwar et al. (2016) ao sintetizarem hidrogel biofilme de óxido de quitosana, óxido de grafeno e óxido de nanocompósito obtiveram um biofilme antimicrobiano eficiente contra estirpes de *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, e *Cândida albican*, com possibilidade de aplicações potenciais tanto na indústria biomédica como na indústria alimentar.

3.4.1 Gelatina

A gelatina é um biopolímero natural (proteína) obtida através da hidrólise parcial de colágeno animal, considerada hidrólise ácida quando oriunda de colágeno de porco e, alcalina quando o colágeno possui fonte bovina (MOHANTY et al., 2005; ELZOGHBY, 2013). Por ser considerado um material seguro para o consumo pela FDA, possuir baixo preço e alta disponibilidade, é amplamente utilizada em produtos farmacêuticos, cosméticos e produtos alimentares (ELZOGHBY; SAMY; ELGINDY, 2012; SANTORO; TATARA; MIKOS, 2014). A gelatina é uma mistura heterogênea de polipeptídios de cadeia simples ou multifilares, com conformações de hélices de prolina que contém de 300 à 400 aminoácidos, conforme demonstrado na Figura 3 (KOMMAREDDY; SHENOY; AMIJI, 2007).

Figura 3. Estrutura química básica da gelatina. Fonte: (KOMMAREDDY; SHENOY; AMIJI, 2007).



Devido à sua biodegradabilidade e biocompatibilidade em ambientes fisiológicos, este biopolímero tem sido utilizado em diversas aplicações que envolvem a liberação controlada. Dentre os biomateriais empregados como sistema para essa liberação estão os hidrogéis, filmes, microesferas e nanopartículas (KHAN; SCHNEIDER, 2013).

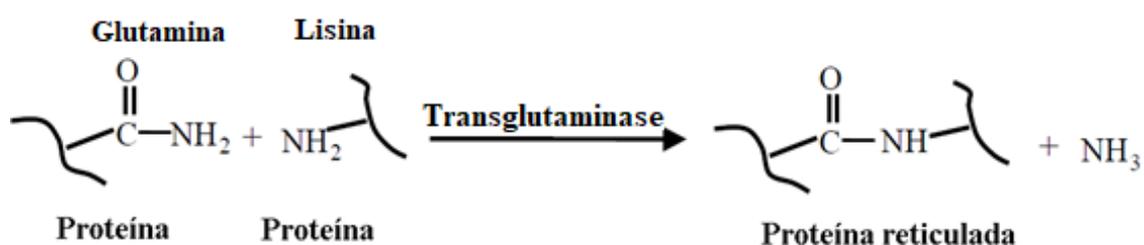
O hidrogel sintetizado a partir de gelatina é uma das diferentes modificações do polímero realizadas para controlar propriedades como biodistribuição, flexibilidade e estabilidade das formulações (KOMMAREDDY; SHENOY; AMIJI, 2007; SANTORO; TATARA; MIKOS, 2014). Czerner et al. (2016) avaliaram modificações nas características mecânicas de géis de gelatina conforme a variação na concentração de gelatina (10 e 30%), fonte de colágeno (bovino ou suíno) e composição de solvente (0 e 40% de glicerol). Com os resultados puderam verificar principalmente que a rigidez do gel depende da concentração e o glicerol apresenta maior atuação na fonte bovina de colágeno.

Gómez-Mascaraque; Soler; Lopez-Rubio (2016) analisaram o impacto do encapsulamento de galato de epigalocatequina (EGCG) em micro-hidrogéis de gelatina e quitosana na distribuição controlada desse bioativo. Os resultados mostraram que a gelatina foi mais adequada como material de parede para a encapsulação do EGCG do que a quitosana, alcançando eficiências de encapsulação maiores, sendo mais efetiva no atraso da liberação de EGCG e degradação em solução aquosa após a digestão gastrointestinal *in vitro*.

3.4.2 Transglutaminase

A transglutaminase é uma enzima pertencente à classe das transferases, definida como γ -glutaminatransferase, comumente encontrada dentro e fora de células de plantas e tecidos animais. É capaz de atuar como catalisador na formação de uma ligação isopeptídica entre o grupo de γ -carboxamida de resíduos glutamina e os grupos amina de primeira ordem de compostos diferentes, por exemplo, proteínas (receptores de um grupamento residual acil). Se a lisina é o receptor desse grupamento acil, conforme a Figura 4, uma molécula é enriquecida com este aminoácido. Assim, a transferência do grupamento acil para uma ligação residual da lisina na cadeia do polipeptídeo induz ao processo de reticulação, ou seja, a formação de ligação cruzada intermolecular entre glutamina e lisina (KIELISZEK; MISIEWICZ, 2014).

Figura 4. Reação de reticulação de proteína (gelatina) com TGase. Fonte: (adaptado de CHEN et al., 2003).



A reticulação é uma alternativa para estabilização e aumento da resistência mecânica de hidrogéis de gelatina. Das formas de reticulação, a reticulação enzimática é preferida para aplicação em produtos biológicos e alimentícios por sua baixa toxicidade, sendo a transglutaminase uma das enzimas mais estudadas para a reticulação de biopolímeros como gelatina e colágeno (CARVALHO; GROSSO, 2006; DONG et al., 2008; ALESA et al., 2017).

He et al. (2016) utilizaram transglutaminase na fabricação de rede microfluídica ramificada circular em hidrogéis de gelatina como alternativa para a construção de tecidos espessos vascularizados em órgãos artificiais. Liu et al. (2016) analisaram a mudança na temperatura de secagem nas propriedades físicas de filmes de gelatina modificados com transglutaminase.

3.4.3 Hidrogéis antimicrobianos

Os hidrogéis com propriedade antimicrobiana tem sido estudado por diversos trabalhos, alguns destes se encontram na Tabela 2.

Tabela 2. Hidrogéis com propriedade antimicrobiana.

Hidrogel	Agente antimicrobiano	Aplicação	Referência
Quitosana e gelatina	Mel	Curativo para ferimentos	Wang et al. (2012)
Metilcelulose	Nanopartículas de óxido de prata	Cicatrização de queimaduras	Hee et al. (2018)
Goma de celulose	Nanopartículas de cobre	Diminuição da infecção no trato urinário causada por patógenos	Al-Enizi et al. (2017)
Quitosana	Nanopartículas de cobre e zinco	Suplemento de alimentos	Rajasekaran; Santra (2015)

Fonte: Aatoria Própria.

Conforme a Tabela 2, a maioria dos hidrogéis com propriedades antimicrobianas são desenvolvidos para aplicação na área médica devido a seu potencial de liberação controlada de diversas drogas e medicamentos antimicrobianos (BUWALDA et al., 2014). Tendo em vista a revisão realizada, há espaço para o desenvolvimento de hidrogéis por meio da utilização de biopolímeros, bem como a incorporação de ácidos orgânicos capazes de conferir propriedade antimicrobiana à esses hidrogéis, podendo ser aplicados em alimentos e superfícies que entram em contato com alimentos, como moedores de carne.

4 METODOLOGIA

4.1 MATERIAIS

Gelatina (Dinâmica, grau analítico), transglutaminase (TGase, ACTIVA WM, 110 unidades.g⁻¹, Ajinomoto Inc.), ácido láctico (85%_{v/v}, Êxodo Científica, grau analítico) e ácido acético glacial (Dinâmica, grau analítico) foram usados na síntese dos hidrogéis. Os meios de cultura utilizados para os microrganismos foram peptona (KASVI), ágar nutriente (Biomark), caldo Mueller Hinton Broth (MHB, Biomark), caldo Brain Heart Infusion (BHI, Biomark), ágar Mueller Hinton (MHA, Biomark), ágar Eosin Methylene (KASVI) para *E. coli*, ágar Enteric Hektoen (KASVI) para *S. Typhimurium* e *P. aeruginosa* e, ágar Baird Parker (Acumedia) para *S. aureus*.

4.2 MICRORGANISMOS

Foram analisadas bactérias Gram-positivas (*Staphylococcus aureus* (ATCC 25923)) e bactérias Gram-negativas (*Salmonella enterica* Typhimurium (ATCC 14028), *Escherichia coli* (ATCC 25922) e *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853)). As bactérias foram incubadas em caldo Mueller Hinton broth à 37°C por 24 h e mantidas em ágar nutriente.

4.3 CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) E CONCENTRAÇÃO BACTERICIDA MÍNIMA (CBM)

A Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) dos ácidos acético e láctico foram determinadas usando o método de microdiluição em caldo (M07-A9/2012) como estabelecido por Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (CLSI, 2012). Para a determinação do CIM, suspensões bacterianas foram padronizadas de acordo com a escala de 0.5 McFarland e diluídas em solução salina 0.85% para obter 5.10⁵ UFC.mL⁻¹.

Em cada poço de uma placa de 96 poços foram adicionados 100 μL de caldo MHB e destes, diluídos ácido láctico e ácido acético (concentrações iniciais de 0,19 a 100 $\mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$ para ácido láctico, e de 0,09 a 50 $\mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$ para ácido acético). Uma alíquota de suspensão bacteriana (10 μL) foi então inoculada em cada poço e incubada a 37°C por 24 h. O CIM foi definido como a menor concentração de compostos que inibiram o crescimento bacteriano. Para a determinação do CBM, uma alíquota de 20 μL a partir de cada poço com crescimento microbiano observado na análise de CIM foi transferido para placa de ágar Mueller Hinton. As placas foram incubadas a 37°C por 24 h e, posteriormente, definido o CBM como a menor concentração que não permite o crescimento bacteriano. Todos os testes foram realizados em triplicata em quatro experimentos diferentes para demonstrar a reprodutibilidade.

4.4 AVALIAÇÃO DE SINERGIA DOS ÁCIDOS ORGÂNICOS

A avaliação de sinergia foi realizada através do Coeficiente de Inibição Fracionada (CIF) em caldo MHB utilizando o método de microdiluição em caldo com a técnica de *checkerboard* em placa de 96 poços (CLSI, 2012). O CIF foi calculado conforme as equações descritas abaixo:

$$CIF_A = \frac{CIM_{A\text{ combinação}}}{CIM_{A\text{ isolado}}} \quad (2)$$

$$CIF_B = \frac{CIM_{B\text{ combinação}}}{CIM_{B\text{ isolado}}} \quad (3)$$

$$CIF = CIF_A + CIF_B \quad (4)$$

Os resultados foram interpretados como sinergismo ($CIF < 0,5$), adição ($0,5 \leq CIF \leq 1$), indiferença ($1 < CIF \leq 4$) ou antagonismo ($CIF > 4$) de acordo com Doern (2014). Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

4.5 SÍNTESE DOS HIDROGÉIS DE GELATINA

Foram preparadas sete formulações de hidrogéis de gelatina: hidrogel controle (C, sem adição de ácidos), hidrogel contendo ácido láctico com a concentração obtida na análise de CIM (GRL1), hidrogel contendo ácido láctico seis vezes a concentração do CIM (GRL6), hidrogel contendo ácido acético com a concentração obtida na análise de CIM (GRA1), hidrogel contendo ácido acético seis vezes a concentração do CIM (GRA6), hidrogel contendo combinações de ácido láctico e acético conforme o resultado da análise de sinergismo (GRLA1) e hidrogel contendo combinações de ácido láctico e acético seis vezes o resultado da análise de sinergismo (GRLA6).

A síntese dos hidrogéis foi realizada de acordo com a metodologia descrita em Simoni et al. (2017) com algumas modificações. Primeiro, a gelatina (4,2 g) foi dissolvida em água destilada (60 mL) a 50 °C sob agitação magnética. Então, transglutaminase (763 mg ou 20 unidades ativas.g⁻¹_{gelatina}) foi adicionada à solução sob agitação durante 15 minutos a 50°C para permitir que ocorresse a reação de reticulação. Posteriormente, os ácidos foram adicionados às formulações. Finalmente, a solução resultante foi vertida num recipiente de alumínio (4 x 9 cm) e imediatamente transferida para um ultra-freezer (-90°C durante 5 horas) e finalmente liofilizada (Liotop 101L, Liobras) durante 120 h. Os procedimentos foram realizados em triplicata para cada condição experimental.

4.6 CARACTERIZAÇÃO DOS HIDROGÉIS DE GELATINA

4.6.1 Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

As interações químicas entre o hidrogel e os ácidos acético e láctico foram caracterizadas por Espectroscopia de Infravermelho com Transformação de Fourier usando um sensor de Reflectância Total Atenuada Universal (FTIR-UATR, Frontier PerkinElmer) com resolução de 2 cm⁻¹ e 32 acumulações.

4.6.2 Microestrutura

Os hidrogéis foram submetidos à Microscopia Electrónica de Varredura (Carl Zeiss / EVO MA 15) para observações morfológicas. As amostras foram mantidas em dessecador com sílica por 1 semana para remover a umidade e recobertas com ouro em *Sputter Coater* (Quanta Quorum Q150R ES) antes das análises.

4.6.3 Cinética de intumescimento

Para a avaliação da cinética de intumescimento dos hidrogéis, as amostras secas de hidrogel (30 x 30 mm) foram pesadas (W_0 , g) e imersas em água destilada (200 mL). Após intervalos de tempo adequados, os hidrogéis foram pesados novamente (W_s , g). A cinética de intumescimento foi determinada pelo grau de intumescimento em cada intervalo de tempo calculado de acordo com a Equação 5.

$$\text{Grau de intumescimento (\%)} = \frac{W_s - W_0}{W_0} \times 100 \quad (5)$$

Para a avaliação o comportamento dos materiais com relação à absorção de água, a razão de intumescimento (Q) foi calculada para cada intervalo tempo avaliado utilizando a Equação 6 e os dados obtidos foram ajustados aos modelos Higuchi, Korsmeyer-Peppas e Peppas-Sahlin (Equações 7, 8 e 9, respectivamente), onde M_t é a massa de água absorvida no tempo “ t ”, M_f representa a água absorvida em um tempo infinito, k , k' , k_d , k_r , m e n são constantes dos modelos avaliados. O método de ajuste não linear por mínimos quadrados foi usado para determinar os parâmetros em cada equação usando MATLAB R2008b (The MathWorks Inc., Natick, EUA). Os valores de k_d e k_r foram utilizados para calcular a porcentagem de contribuição da difusão fickiana (FD) e relaxamento (R), respectivamente, de acordo com a Equação 10 descrita por Machín, Isasi, & Vélaz (2013).

$$Q = \frac{M_t}{M_f} \quad (6)$$

$$M_t / M_f = k' t^{1/2} \quad (7)$$

$$M_t / M_f = k t^n \quad (8)$$

$$M_t / M_f = k_d t^m + k_r t^{2m} \quad (9)$$

$$\frac{R}{F_D} = \frac{k_r}{k_d} t^m \quad (10)$$

4.6.4 Teste de Punção

A força de punção dos hidrogéis foi determinada pelo teste de punção em um texturômetro TA.XT Express Enhanced (Stable Micro Systems). As amostras de hidrogel foram cortadas (30 x 30 mm) após o intumescimento em água por 48 h. Depois disso, os hidrogéis foram perfurados com uma sonda esférica de 3 mm de diâmetro a uma velocidade de teste igual a 1 mm.s⁻¹ a uma distância de penetração igual a 10 mm. O valor da força de punção foi expresso em N.

4.7 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA

A atividade antibacteriana dos hidrogéis contra *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Salmonella Typhimurium* (ATCC 14028), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) e *Escherichia coli* (ATCC 25922) foi determinada usando o método do frasco de agitação modificado (ASTM E2149-01) de acordo com Boonkaew, Suwanpreuksa, Cuttle, Barber, & Supaphol (2014) com algumas modificações. A suspensão bacteriana foi padronizada utilizando a escala 0,5 McFarland e diluída em solução salina (0,85% NaCl) para obter 10⁶ CFU.mL⁻¹. Uma alíquota de 500 µL dessa solução contendo a suspensão bacteriana foi adicionada a um balão Erlenmeyer pré-esterilizado contendo 49,5 ml de água de peptona a 0,1%. Cada hidrogel (20 x 15 mm, 8,0 mm de espessura, aproximadamente 300 mg) foi adicionado aos frascos de Erlenmeyer e incubado a 35°C sob agitação a 150 rpm. Nos intervalos de tempo pré-determinados (0, 1, 3, 6, 12 e 24 h), uma alíquota (100 µL) de cada solução foi diluída em solução salina (NaCl 0,85%) e 20 µL dessas soluções foram colocadas em placas contendo ágar MHA que foram incubadas a 37°C. Após 24 horas, a formação de colônias foi avaliada (em UFC.mL⁻¹) e representada em escala logarítmica.

4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados do teste de punção e da atividade antibacteriana foram submetidos à ANOVA com um nível de significância de 5% e, ao teste de Tukey utilizando o *software* Statistica 7.0 (Statsoft, EUA).

4.9 QUALIDADE DA CARNE APÓS SANITIZAÇÃO COM HIDROGEL

Para avaliação da qualidade da carne após a ação dos hidrogéis (C, GRA6, GRL6 e GRLA6) foram realizadas algumas etapas para que houvesse contaminação e sujidades no moedor. Primeiramente uma amostra de 200 g de carne bovina magra foi processada no moedor de carnes comercial (Britânia). Então o moedor foi mantido exposto ao ambiente por 24h para que houvesse contaminação (do ambiente) e crescimento microbiano, sem que houvesse a limpeza da superfície. No dia seguinte, uma amostra de hidrogel (100 g) previamente hidratada por 4 horas, foi processada no moedor. Na sequência foram processados outros 200 g de carne bovina magra. A carne processada no moedor foi analisada antes e depois do processamento para verificar se o hidrogel existente no moedor interferiu em sua qualidade, quanto ao pH (pHmêtro de carnes, Testo) e análise microbiológica de pesquisa de *Salmonella* spp. conforme o indicado em (ANVISA, 2001) para carne moída e carne "*in natura*". Também foram realizadas análises subjetivas de odor e cor.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 ATIVIDADE ANTIBACTERIANA E ENSAIO DE SINERGIA DOS ÁCIDOS

Os resultados da atividade antibacteriana e do ensaio de sinergia dos ácidos láctico e acético encontram-se na Tabela 3.

Tabela 3. Concentração Inibitória Mínima (CIM), Concentração Bactericida Mínima (CBM) ds ácidos láctico e acético, e Concentração Inibitória Fracionada (CIF) do ensaio de sinergia dos ácidos láctico e acético.

Bactéria	Ácido láctico ($\mu\text{L.mL}^{-1}$)		Ácido acético ($\mu\text{L.mL}^{-1}$)		Ensaio de sinergia	
	CIM	CBM	CIM	CBM	CIF	Classificação
<i>S. aureus</i>	12,50	12,50	0,78	6,25	1,25	Indiferença
<i>S. Typhimurium</i>	6,25	12,50	0,78	3,12	1,00	Adição
<i>P. aeruginosa</i>	6,25	6,25	0,78	3,12	0,74	Adição
<i>E. coli</i>	12,50	12,50	0,78	6,25	0,74	Adição

Fonte: Autoria Própria.

Para todas as bactérias testadas, foram obtidos valores de CIM e CBM maiores para o ácido láctico em comparação com o ácido acético. Estes resultados também foram encontrados por León Peláez et al. (2012) para diferentes cepas de *Aspergillus flavus*.

Isto se dá devido à ação da fração não dissociada do ácido orgânico, responsável pelo efeito antimicrobiano. Essa fração não dissociada do ácido fraco tem maior atividade para penetrar nas células do que os produtos de dissociação. No estudo realizado por León Peláez et al. (2012) os valores experimentais dessa fração foram maiores para o ácido acético em comparação com o ácido láctico. Por isso, conforme a Tabela 3, este ácido necessitou de menores concentrações para inibir os microrganismos estudados.

No ensaio de sinergia dos ácidos foi possível observar que para a bactéria *S. aureus* o resultado indicou indiferença, enquanto que para os demais microrganismos o resultado observado foi classificado como de adição. Isto pode ser um indicativo de que

a ação dos ácidos é independente da parede celular bacteriana e, a combinação dos ácidos foi mais eficiente do que quando aplicados sozinhos (DE OLIVEIRA et al., 2010).

Esses resultados preliminares foram usados para determinar a concentração de ácidos aplicados nos hidrogéis, como detalhado na Tabela 4.

Tabela 4. Concentração dos ácidos para aplicação nos hidrogéis ($\mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$).

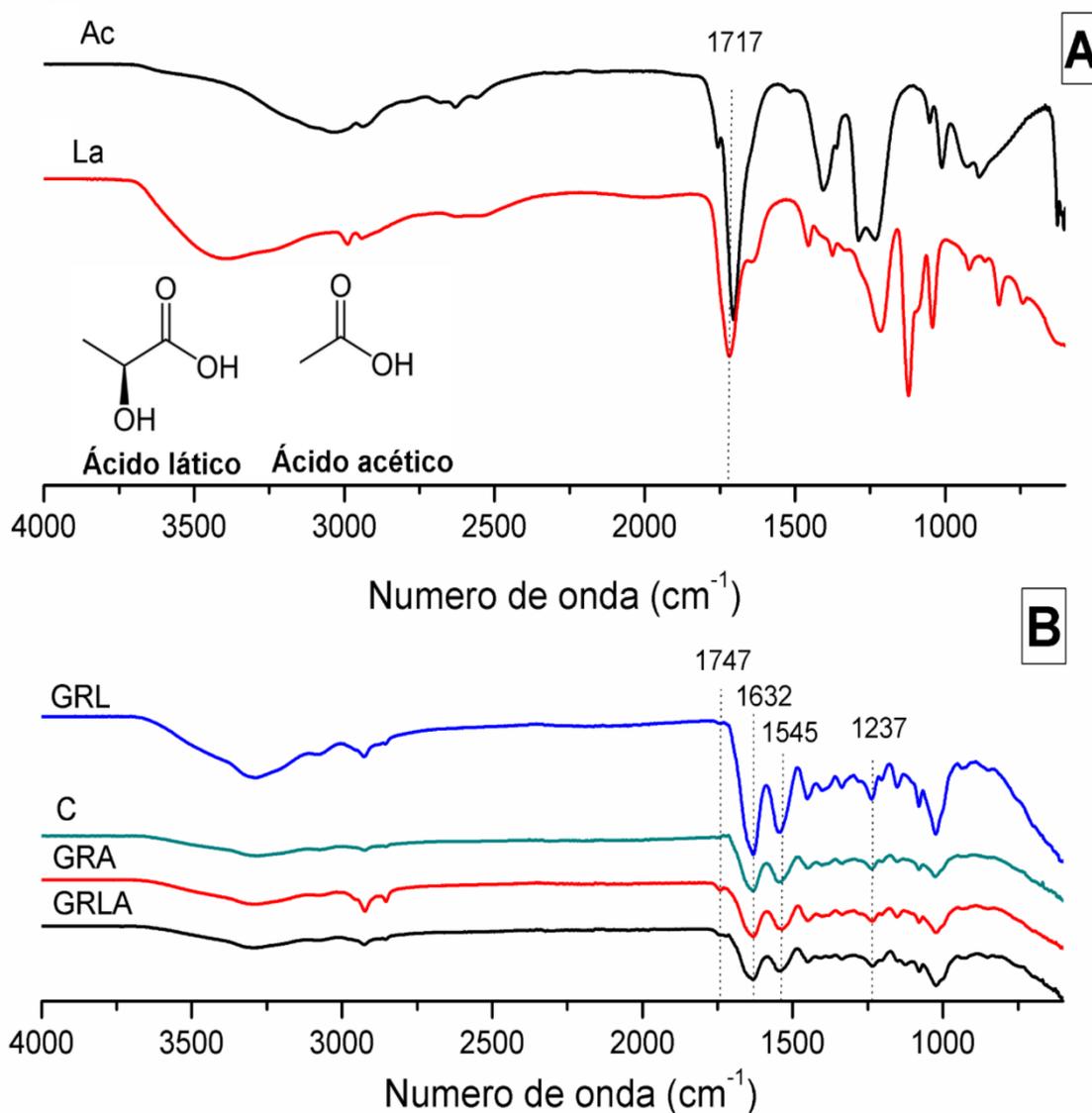
Formulação	Concentração de ácidos ($\mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$)	
	Ácido láctico	Ácido acético
GRA1	-	0,78
GRA6	-	4,68
GRL1	12,5	-
GRL6	75	-
GRLA1	6,25	1,25
GRLA6	37,5	7,5

Fonte: Autoria Própria.

5.2 CARACTERIZAÇÃO DOS HIDROGÉIS

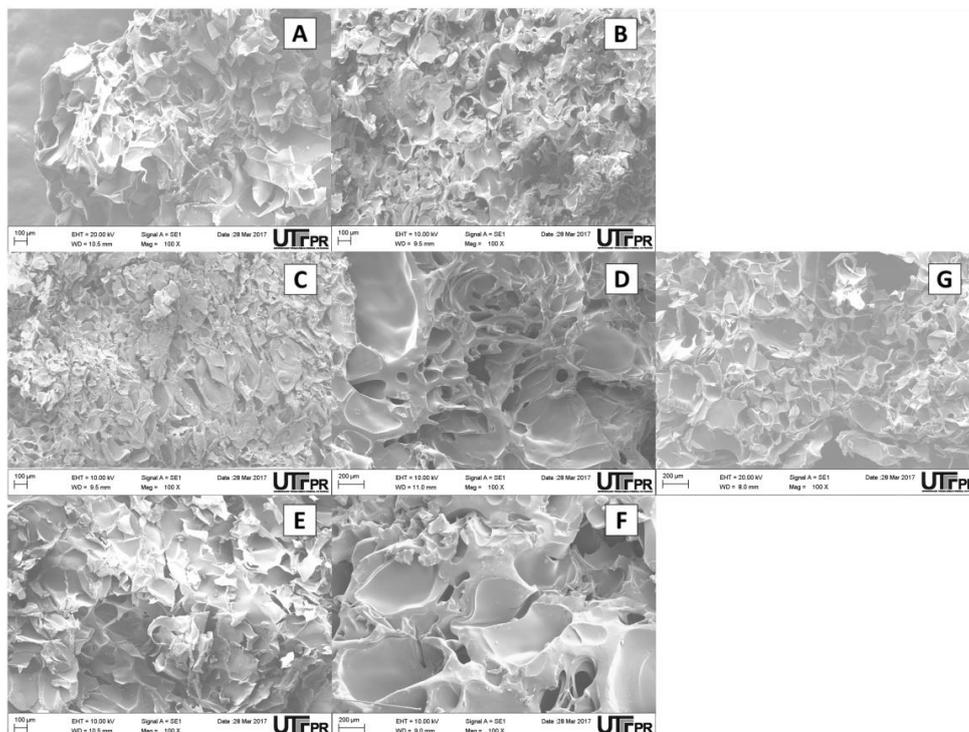
Nas Figuras 5 A e 5 B são apresentados os espectros de FTIR dos ácidos puros (ácido acético (Ac) e ácido acético (La)) e dos hidrogéis (GRL, C, GRA e GRLA), respectivamente. Na Figura 6 encontram-se as imagens obtidas no MEV dos hidrogéis de gelatina reticulados contendo os ácidos láctico e acético (puros ou em combinações). Os resultados do teste de punção podem ser observados na Figura 7.

Figura 5. Espectros FTIR-ATR das amostras de: ácido acético (Ac) e ácido lático (La) (A); GRL = hidrogel de gelatina contendo ácido lático, C = controle, GRA = hidrogel de gelatina contendo ácido acético, GRLA = hidrogel de gelatina contendo os ácidos lático e acético (B).



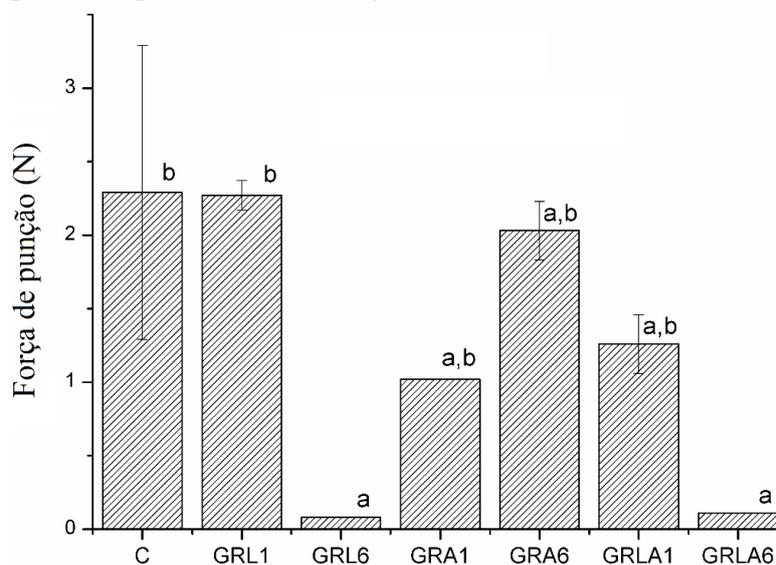
Fonte: Autoria Própria.

Figura 6. Imagens de MEV (ampliação de 100 x) dos hidrogéis de gelatina: GRA1 = com ácido acético 1xCIM (A); GRA6 = com ácido acético 6xCIM (B); GRL1 = com ácido láctico 1xCIM (C); GRL6 = com ácido láctico 6xCIM (D); GRLA1 = com ácido láctico e acético 1 x ensaio de sinergia (E); GRLA6 = com ácido láctico e acético 6 x ensaio de sinergia (F); C = controle (G).



Fonte: Autoria Própria.

Figura 7. Teste de punção (N) do: Controle, GRA1 = com ácido acético 1xCIM; GRA6 = com ácido acético 6xCIM; GRL1 = com ácido láctico 1xCIM; GRL6 = com ácido láctico 6xCIM; GRLA1 = com ácido láctico e acético 1 x ensaio de sinergia; GRLA6 = com ácido láctico e acético 6 x ensaio de sinergia; ^{a,b} diferentes letras indicam diferença significativa ($p < 0.05$) pelo teste de Tukey.



Fonte: Autoria Própria.

Observa-se na Figura 5 (b) que as bandas características dos hidrogéis de gelatina encontradas para todas as formulações foram: amida I, estiramento de C=O (1632 cm^{-1}); amida II, vibração de N-H e C-N (1545 cm^{-1}) e amida III, vibração de C-N e N-H (1237 cm^{-1}) (ROCASALBAS et al., 2013; BISWAL et al., 2016; DE OLIVEIRA PIZZOLI et al., 2016; LIU et al., 2016a; PADHI et al., 2016).

Na Figura 5 A, a banda do estiramento C=O (1717 cm^{-1}) foi verificada para ambos os ácidos (Chitra, Franklin, Sudarsan, Sakthivel, & Guhanathan, 2017). Esta banda também foi verificada para as amostras de hidrogel adicionadas dos ácidos (Figura 5 B), mas com banda deslocada para 1747 cm^{-1} , que pode estar associada à interação entre os ácidos e a matriz de hidrogel. As formulações contendo maiores quantidades de ácido láctico (GRL6 (Figura 6 D) e GRLA6 (Figura 6 F)), mostraram uma microestrutura composta por poros com maiores diâmetros quando comparada com as outras formulações contendo baixas concentrações do ácido (Figura 6 G).

Além disso, com as imagens de MEV nota-se que a estrutura da parede dos poros das amostras contendo ácido láctico (Figura 6 C, D e F) apresenta-se mais espessa. Este resultado pode ser explicado pelo efeito liotrópico da gelatina quando em contato com o ácido láctico. O efeito liotrópico ocorre em duas etapas: intumescimento seguido de ligação de hidrogênio com os peptídeos (GIMÉNEZ et al., 2005).

De acordo com Milch & Murray (1961) a etapa de intumescimento ocorre principalmente em consequência de uma interação eletrovalente entre o agente de intumescimento (ácidos orgânicos) e os grupos iônicos da proteína (gelatina) fortemente carregados. As interações moleculares primárias (eletrostáticas) entre as moléculas de ácido orgânico e os grupos não iônicos de gelatina podem resultar na mudança de volume da fase sólida (intumescimento liotrópico), tornando-se permanente mesmo após a remoção da água.

Os ácidos láctico e acético apresentam estrutura semelhante, podendo se apresentar na forma de dímeros que interagem fortemente através de ligações de hidrogênio. Uma vez que o ácido láctico apresenta um grupo OH adicional na sua estrutura quando comparado ao ácido acético, provavelmente a formação de dímeros ligados ao hidrogênio foi maior para o ácido láctico, permitindo a criação de cavidades porosas maiores com paredes espessas.

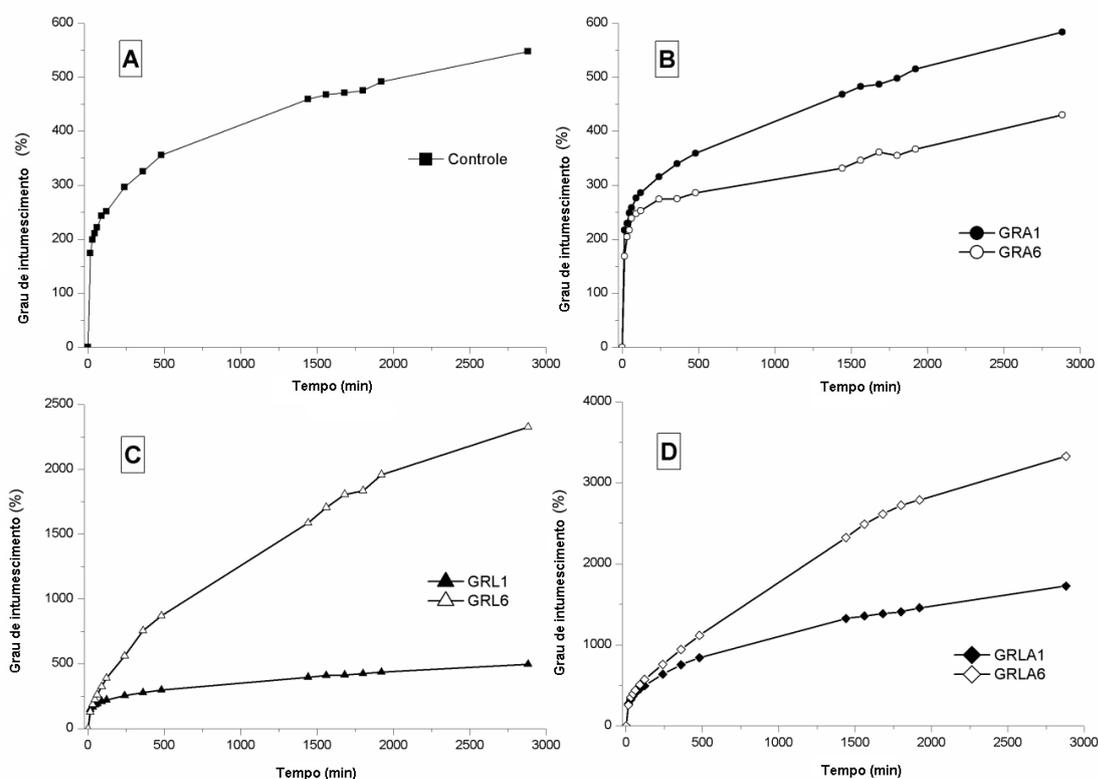
No teste de punção, conforme a Figura 7, pode ser observado uma diferença significativa nas formulações GRL6 e GRLA6 quando comparada à amostra de controle ($p < 0,05$), indicando que a diminuição da resistência ao polímero nesses hidrogéis pode

estar relacionada às modificações na estrutura por interação com o ácido láctico, assim como observado na Figura 6 D e 6 F, na qual estes hidrogéis apresentaram maior porosidade. Essa porosidade pode ter possibilitado maior capacidade de absorção de água, diminuindo a força de punção.

5.2.1 Cinética de Intumescimento

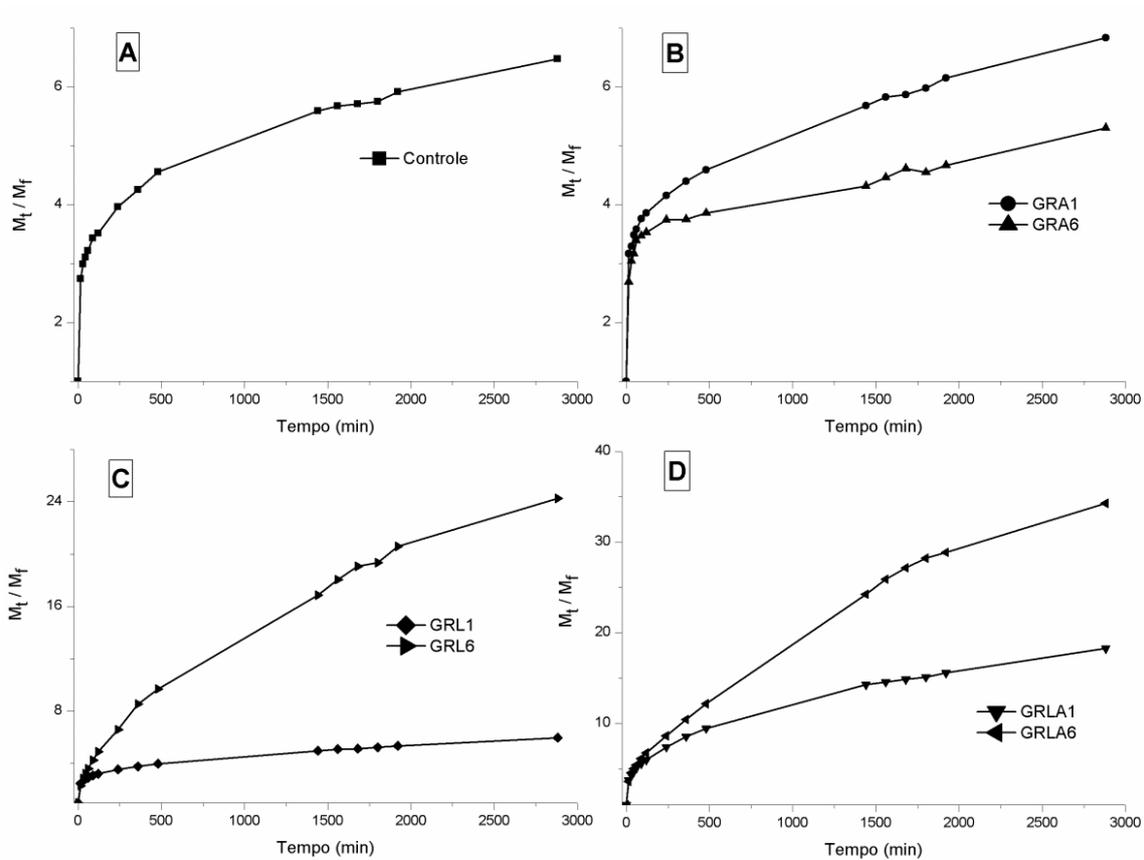
Os resultados do grau de intumescimento estão apresentados na Figura 8. Na Tabela 5 e Figura 9 encontram-se os dados experimentais e os resultados modelados da cinética de intumescimento dos hidrogéis em termos de razão de intumescimento (Q). Para entender o papel de cada mecanismo na absorção de água dessas amostras, as contribuições de difusão de Fickian (F_D) e relaxamento (R) foram calculadas, os resultados são apresentados na Figura 10.

Figura 8. Grau de intumescimento (%) do: Controle (■) (A); GRA1 = com ácido acético 1xCIM (●) and GRA6 = com ácido acético 6xCIM (○) (B); GRL1 = com ácido láctico 1xCIM (▲) and GRL6 = com ácido láctico 6xCIM (△) (C); GRLA1 = com ácidos láctico e acético 1 x ensaio de sinergia (◆) e GRLA6 = com ácidos láctico e acético 6 x ensaio de sinergia (◇) (D).



Fonte: Autoria Própria.

Figura 9. Razão de intumescimento (M_t/M_f) do: Controle (■) (A); GRA1 = com ácido acético 1xCIM (●), GRA6 = com ácido acético 6xCIM (▲) (B); GRL1 = com ácido lático 1xCIM (◆), GRL6 = com ácido lático 6xCIM (▶) (C); GRLA1 = com ácidos lático e acético 1 x ensaio de sinergia (▼), GRLA6 = com ácidos lático e acético 6 x ensaio de sinergia (◄) (D).



Fonte: Autoria Própria.

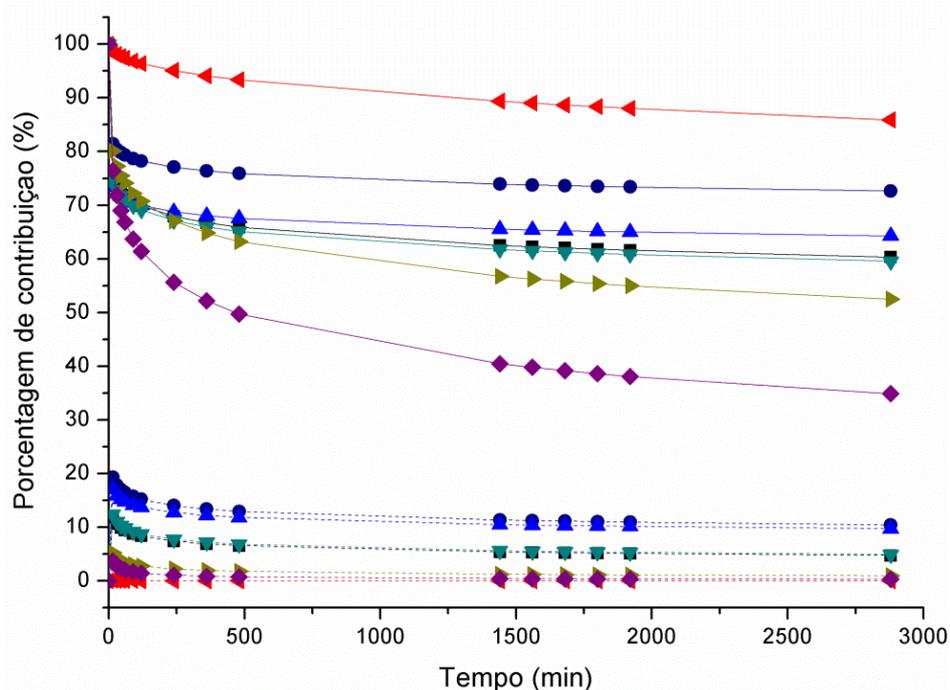
Tabela 5. Resultados obtidos para a modelagem matemática da cinética de intumescimento dos hidrogéis (razão de intumescimento) para os modelos: Higuchi, Korsmeyer-Peppas, Peppas-Sahlin.

		C	GRL1	GRL6	GRA1	GRA6	GRLA1	GRLA6
Higuchi	R ²	-0,0668	-0,0607	0,9973	-0,3339	-1,8076	0,9094	0,9923
	R ² adj	-0,0668	-0,0607	0,9973	-0,3339	-1,8076	0,9094	0,9923
	SSE	36,3997	29,1978	2,5402	45,1359	42,8539	38,9550	14,9026
	RMSE	1,5578	1,3952	0,4115	1,7347	1,6902	1,6115	0,9967
	k'	0,1499	0,1354	0,4563	0,156	0,1235	0,3723	0,6447
Korsmeyer-Peppas	R ²	0,9661	0,9554	0,9973	0,9551	0,9114	0,9945	0,9929
	R ² adj	0,9637	0,9522	0,9971	0,9519	0,9050	0,9941	0,9924
	SSE	1,1570	1,2290	2,5336	1,5196	1,3526	2,3528	13,7464
	RMSE	0,2875	0,2963	0,4254	0,3295	0,3108	0,4099	0,9909
	K	1,587	1,413	0,4492	1,871	2,083	1,239	0,5534
Peppas-Sahlin	N	0,1731	0,175	0,5021	0,1552	0,1069	0,3348	0,5208
	R ²	0,9669	0,9570	0,9974	0,9398	0,9119	0,9961	0,9942
	R ² adj	0,9618	0,9504	0,9970	0,9306	0,8984	0,9955	0,9933
	SSE	1,1301	1,1825	2,4424	2,0359	1,3440	1,6793	11,2530
	RMSE	0,2948	0,3016	0,4335	0,3957	0,3215	0,3394	0,9304
	k _d	1,323	1,194	0,5212	1,766	1,639	1,335	0,8126
	k _r	0,3006	0,2833	0,002098	0,5424	0,4754	0,17	0,09931
M	0,1335	0,1319	0,4655	0,0955	0,08176	0,2461	0,3422	

R² - coeficiente de determinação dos modelos matemáticos; R²adj - coeficiente de determinação do ajuste dos modelos matemáticos; SSE - Soma dos quadrados do erro; RMSE - Soma dos quadrados do erro residual; k', k, n, k_d, k_r, m- constantes dos modelos avaliados.

Fonte: Autoria Própria.

Figura 10. Porcentagem de contribuição dos mecanismos de difusão Fickiana (-) e relaxação (--) na cinética de intumescimento dos hidrogéis: Controle (■), GRA1 = com ácido acético 1xCIM (●), GRA6 = com ácido acético 6xCIM (▲), GRL1 = com ácido láctico 1xCIM (▼), GRL6 = com ácido láctico 6xCIM (◄), GRLA1 = com ácidos láctico e acético 1 x ensaio de sinergia (►) and GRLA6 = com ácidos láctico e acético 6 x ensaio de sinergia (◆).



Fonte: Autoria Própria.

As formulações contendo ácido láctico apresentaram maior grau de intumescimento do que o controle e as formulações contendo apenas ácido acético. Além disso, para as formulações GRLA1 e GRLA6 o aumento no grau de intumescimento foi 3 e 6 vezes quando comparado com o hidrogel controle.

A cinética de intumescimento de todas as amostras de hidrogel foram bem representadas por ambos os modelos de Korsmeyer-Peppas e Peppas-Sahlin. O modelo de Higuchi ajustou os resultados experimentais apenas para as amostras GRL6 e GRLA6. Como o modelo de Higuchi representa a difusão de Fickian e, os outros modelos (Korsmeyer-Peppas e Peppas-Sahlin) representam mecanismos combinados de difusão e relaxação, os dados experimentais das amostras de GRL6 e GRLA6 também apresentaram ajuste.

Isso pode ser um indicativo de que o grau de intumescimento dessas duas amostras pode ser controlado pelos mecanismos combinados de difusão e relaxação (MACHÍN; ISASI; VÉLAZ, 2013). Portanto, para todas as amostras a água absorvida na matriz dos

hidrogéis provavelmente pode ser controlada por ambos mecanismos. Para avaliar a magnitude de cada mecanismo no comportamento de intumescimento dos hidrogéis foi realizado uma análise de modelos constantes bem como a porcentagem de contribuição da difusão Fickiana (F_D) e relaxação (R), conforme apresentado na Figura 10.

Na Figura 10 pode ser observado que o processo difusional foi mais importante para o hidrogel GRL6 durante toda a cinética de intumescimento, por outro lado, para a amostra GRLA6, o mecanismo difusional foi mais importante no início do processo de intumescimento do que no estágio final.

A constante “n” existente no modelo matemático de Korsmeyer-Peppas é um expoente difusional que depende do mecanismo envolvido e da forma geométrica que (cilindro, esfera ou placa) do hidrogel testado. Quanto à influência da forma, esses modelos mostraram que, em casos de comportamento Fickiano puro, o expoente “n” possui os valores limitantes de 0,50, 0,45 e 0,43 na liberação em placas, cilindros e esferas, respectivamente (RITGER; PEPPAS, 1987).

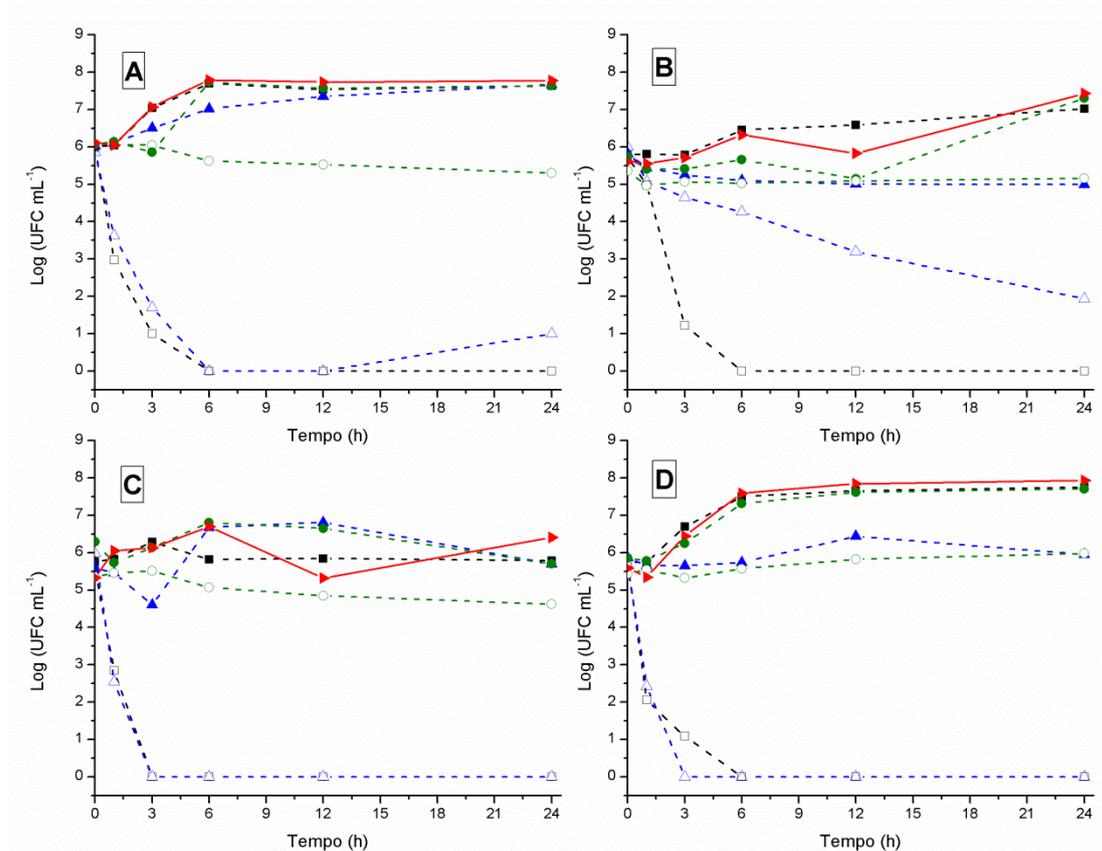
Pode observar-se na Tabela 5 que a constante “n” de Korsmeyer-Peppas para amostras GRL6 e GRLA6 foi igual a 0,5021 e 0,5208, respectivamente, corroborando as contribuições de Higuchi, Fickian (F_D) e relaxamento (R) ao demonstrarem um comportamento Fickiano dessas amostras (Figura 10). Pode-se concluir que a microestrutura altamente porosa das amostras GRL6 e GRLA6 (Figura 6) permitiu que o mecanismo de difusão predominasse no processo de absorção de água.

O mecanismo de relaxação apresentou uma contribuição importante nas amostras GRA1 e GRA6. Isto foi confirmado pelas constantes k_d e k_r do modelo Peppas-Sahlin na qual, para essas amostras, apresentaram valores mais altos de constante de relaxação quando comparados às demais amostras.

5.3 ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DOS HIDROGÉIS

Na Figura 11 são apresentados os resultados da redução logarítmica (10^6 CFU.mL⁻¹) do crescimento microbiano de *S. Typhimurium* (A), *S. aureus* (B), *P. aeruginosa* (C) e *E. coli* (D) durante o contato com o hidrogel controle e hidrogéis contendo os ácidos orgânicos.

Figura 11. Atividade antibacteriana das formulações de hidrogéis: Controle (►); GRA1 = com ácido acético 1xCIM (●); GRA6 = com ácido acético 6xCIM (○); GRL1 = com ácido lático 1xCIM (■); GRL6 = com ácido lático 6xCIM (□); GRLA1 = com ácido lático e acético 1 x ensaio de sinergia (▲); GRLA6 = com ácido lático e acético 6 x ensaio de sinergia (△) contra *S. Typhimurium* (A), *S. aureus* (B), *P. aeruginosa* (C) e *E. coli* (D).



Fonte: Autoria Própria.

As amostras adicionadas de ácidos orgânicos 1xCIM não apresentaram diferença estatística da amostra controle, demonstrando que essas formulações não foram efetivas na inibição das bactérias avaliadas. Uma possível explicação para tal efeito pode ser devido à interação entre os ácidos e a matriz de gelatina, não liberando totalmente estes para que apresentasse atividade antimicrobiana mesmo sendo adicionadas concentrações verificadas na análise de CIM.

Por outro lado, as formulações contendo seis vezes a concentração de CIM (6xCIM), diminuíram o crescimento microbiano após 1 hora de contato com os microrganismos avaliados. Além disso, os hidrogéis contendo 6xCIM apresentaram ação similar para as bactérias gram-positivas e gram-negativas, como demonstrado na análise antibacteriana dos ácidos puros (Tabela 2).

De acordo com os protocolos do CLSI a diferença entre a atividade bacteriostática e bactericida ocorre através da verificação da redução de pelo menos 3 Log (UFC.mL⁻¹) para ter efeito considerado como bactericida (CHEN et al., 2016). Portanto, como a formulação GRA6 apenas inibiu o crescimento bacteriano, esta formulação pode ser considerada bacteriostática.

Para as formulações GRL6 e GRLA6 não houve diferença significativa ($p > 0,05$) para todas as bactérias gram-negativas a partir de 1 até 24 horas de contato. O crescimento microbiano de *S. Typhimurium* ocorreu às 24 horas, o que pode ser devido à adaptação da *Salmonella* a condições sub-letais em ambiente ácido, entrando no chamado estágio viável, mas não cultivável (MANI-LÓPEZ; GARCÍA; LÓPEZ-MALO, 2012; MIKULA et al., 2014). Para o *S. aureus* (gram-positivo), houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre as amostras GRL6 e GRLA6, podendo considerar a amostra GRL6 como bactericida para todas as bactérias e, para a amostra GRLA6 como bacteriostático apenas para o *S. aureus*.

Portanto, as formulações GRL6 e GRLA6 demonstraram maior atividade bactericida através de reduções microbianas consideráveis em poucas horas com baixas concentrações de ácidos láctico e acético.

5.4 QUALIDADE DA CARNE PROCESSADA EM MOEDOR DE CARNES

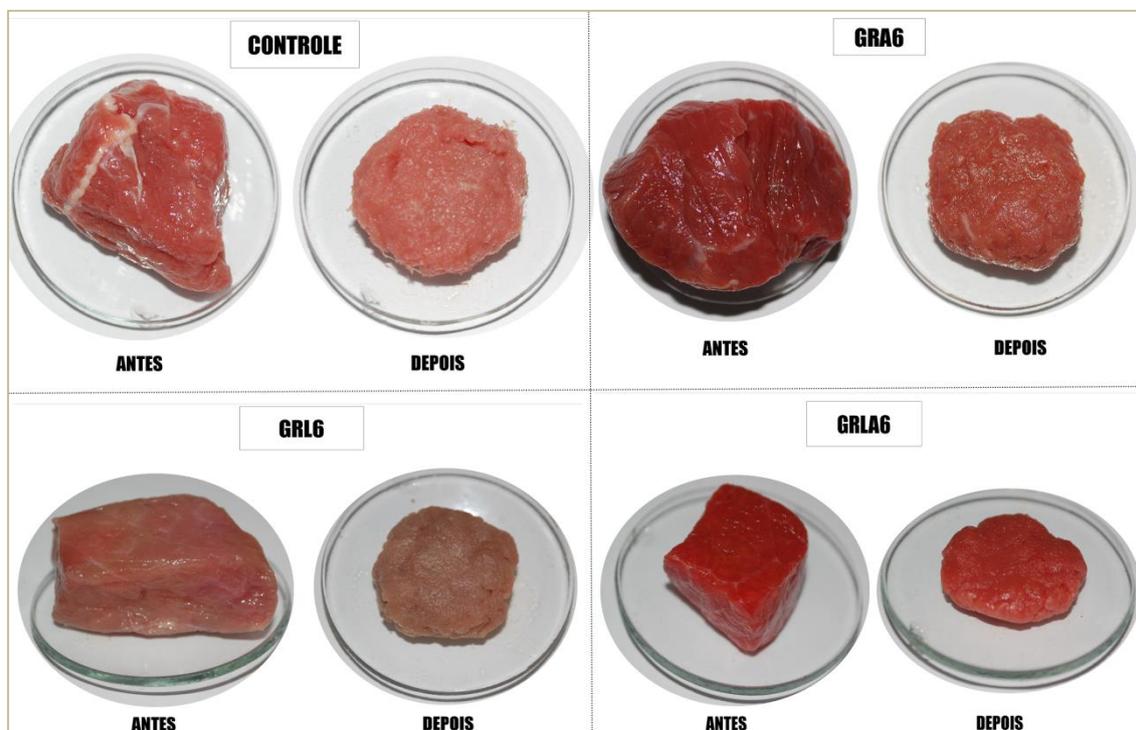
Na Tabela 6 e Figura 12 são apresentados os resultados obtidos na análise de qualidade da carne processada antes e depois da simulação de sanitização com os hidrogéis.

Tabela 6. Qualidade de amostras de carne processadas em moedor de carnes antes e depois da sanitização com os hidrogéis: Controle; GRA6 = com ácido acético 6xCIM; GRL6 = com ácido láctico 6xCIM; GRLA6 = com ácido láctico e acético 6 x ensaio de sinergia.

Hidrogel usado na sanitização	Análise da carne	<i>Salmonella</i> spp.				pH
		Uréia	H ₂ S	Lis	Mot.	
Controle	Antes	+	+	+	+	5,52 ^b ±0,01
	Depois	+	+	+	+	5,58 ^a ±0,00
GRA6	Antes	+	+	+	+	5,65 ^a ±0,02
	Depois	+	+	+	+	5,61 ^a ±0,02
GRL6	Antes	+	+	-	+	5,52 ^a ±0,01
	Depois	+	+	-	+	5,04 ^b ±0,18
GRLA6	Antes	+	+	+	+	5,50 ^a ±0,01
	Depois	+	+	+	+	5,44 ^a ±0,07

*Resultados expressos em média ± desvio padrão; a,b letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey.; Provas bioquímicas presuntivas: Teste da Uréia, Produção de H₂S, descarboxilação da lisina (Lis), Motilidade (Mot.). Fonte: Autoria Própria.

Figura 12. Aparência das amostras de carne processadas em moedor de carnes antes e depois da sanitização com os hidrogéis: Controle; GRA6 = com ácido acético 6xCIM; GRL6 = com ácido lático 6xCIM; GRLA6 = com ácido lático e acético 6 x ensaio de sinergia.



Fonte: Autoria Própria.

Os resultados de pH, descritos na Tabela 6, apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$) apenas entre as amostras processada antes e depois da sanitização com o hidrogel controle e com o GRL6. Apesar disso, essa diferença não demonstrou afetar a qualidade da carne com relação a este parâmetro, pois todas as amostras obtiveram valores de pH que variaram entre 5,04 e 5,65, podendo ser consideradas como carnes adequadas para o consumo conforme descrito em Brasil (1981).

Ainda, analisando os padrões descritos em Brasil (1981), pode-se verificar conforme a Figura 12, que as características sensoriais de aspecto, coloração, consistência e odor da carne estavam dentro do indicado ao possuir aspecto uniforme, coloração com variação do vermelho rosado ao vermelho pardo, consistência firme sem limosidade e odor suave.

Conforme a RDC nº 12, de janeiro de 2001 (BRASIL, 2001), nos padrões microbiológicos para carne moída deve-se apresentar ausência de *Salmonella* spp. nas amostras analisadas para que possa ser realizada a comercialização. Na Tabela 6, são

mostrados os resultados das provas bioquímicas representadas como positivo (+) ou negativo (-) para as colônias típicas de *Salmonella* de acordo com suas características. Com isso, apenas a prova bioquímica de LIA (descarboxilação da lisina – Lis) apresentou resultado negativo para *Salmonella* spp. para amostras de carne antes e depois de ser processado o hidrogel GRL6, portanto, para esta análise, todas as amostras foram consideradas contendo *Salmonella* spp. Este resultado demonstrou que os hidrogéis não interferiram na qualidade da carne, uma vez que as amostras de carne processadas após os hidrogéis já possuíam contaminação microbiana.

Como a carne avaliada já estava contaminada não foi possível verificar a qualidade da carne devido a possíveis degradações por ação microbiana após o processamento. Essa contaminação no moedor de carne pode ser avaliada em trabalhos futuros por meio do desenvolvimento de metodologias com quantidades de microrganismos adequadas para a validação da aplicação dos hidrogéis como sanitizantes da superfície do moedor pois através de testes realizados não foi possível chegar a resultados suficientes de contaminação para esta comprovação.

6 CONCLUSÃO

Os hidrogéis de gelatina antibacterianos foram obtidos pela incorporação dos ácidos láctico e acético na matriz dos hidrogéis. Foi observado efeito de adição na análise de sinergia desses ácidos para *Salmonella Typhimurium*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli* enquanto que para *Staphylococcus aureus* foi verificado efeito de indiferença. A interação entre os ácidos orgânicos e a matriz dos hidrogéis foi evidenciada por resultados de espectroscopia bem como por mudanças na microscopia dos causados pela presença de ambos os ácidos. Além disso, o ácido láctico induziu à um efeito liotrópico na microscopia dos hidrogéis criando poros com maiores diâmetros quando comparados com as outras amostras. A cinética de intumescimento indicou um modelo com predominância dos mecanismos de difusão durante a absorção de água dentro da matriz dos hidrogéis secos. Essas formulações também demonstraram uma menor resistência do polímero através do teste de punção. Os hidrogéis contendo os ácidos orgânicos apresentaram efeito bactericida ou bacteriostático dependendo da concentração de ácidos adicionados e de microrganismo analisado, indicando que os hidrogéis de gelatina contendo os ácidos láctico e acético possuem potencial para utilização como sanitizante de moedor de carnes. Como os hidrogéis possuem materiais aceitos na formulação de alimentos, poderiam ser utilizados como sanitizante sem a etapa de enxague. Portanto, foi possível verificar que a qualidade da carne após a simulação de sanitização com os hidrogéis permaneceu a mesma, ou seja, o processamento de carne no moedor após a sanitização com os hidrogéis pode ser viável.

7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Para os trabalhos futuros podem ser consideradas as seguintes sugestões:

- Avaliação do efeito antimicrobiano ao utilizar outros ácidos orgânicos;
- Avaliação da ação dos hidrogéis em biofilmes microbianos formados em superfícies de aço inoxidável contendo substrato de carne;
- Utilização dos hidrogéis como sanitizante de outras superfícies de contato com alimentos como centrifugas, batedeiras e fatiadores.

8 REFERÊNCIAS

- AESBUC. Manual de Higienização na Indústria Alimentar. 2003. Disponível em: <http://www2.esb.ucp.pt/twt/seg_alim/codigosguias/Manual_higienizacao.pdf>.
- AHMED, E. M. Hydrogel: Preparation, characterization, and applications: A review. **Journal of Advanced Research**, v. 6, n. 2, p. 105–121, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jare.2013.07.006>>.
- AKHTAR, M. F.; HANIF, M.; RANJHA, N. M. Methods of synthesis of hydrogels . . . A review. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 24, n. 5, p. 554–559, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jsps.2015.03.022>>.
- AL-ENIZI, A. M.; AHAMAD, T.; AL-HAJJI, A. B.; AHMED, J.; AHMAD, A.; ALSHEHRI, S. M. antimicrobial agents against urinary tract infection (UTI) pathogens. **International Journal of Biological Macromolecules**, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.11.057>>.
- ALESA, D.; DINIZ, L.; OTÁVIO, J.; SILVA, C.; RIBEIRO-COSTA, R. M. A review of the designs and prominent biomedical advances of natural and synthetic hydrogel formulations. **European Polymer Journal journal**, v. 88, n. 1, p. 373–392, 2017.
- BAJPAI, A. K.; SHUKLA, S. K.; BHANU, S.; KANKANE, S. Responsive polymers in controlled drug delivery. **Progress in Polymer Science (Oxford)**, v. 33, n. 11, p. 1088–1118, 2008.
- BAPTISTA, P. **Higienização de equipamentos e instalações na industria agro-alimentar**. [s.l: s.n.]
- BARRY-RYAN, C. Physical and chemical methods for food preservation using natural antimicrobials. In: **Handbook of Natural Antimicrobials for Food Safety and Quality**. [s.l.] Elsevier, 2015. p. 211–228.
- BASTARRACHEA, L. J.; GODDARD, J. M. Applied Surface Science Self-healing antimicrobial polymer coating with efficacy in the presence of organic matter. **Applied Surface Science**, v. 378, p. 479–488, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.apsusc.2016.03.198>>.
- BERK, Z. Cleaning, Disinfection, Sanitation. In: **Food Process Engineering and Technology**. [s.l.] Elsevier, 2013. p. 637–650.
- BHATTARAI, N.; GUNN, J.; ZHANG, M. Chitosan-based hydrogels for controlled, localized drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 62, n. 1, p. 83–99, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.addr.2009.07.019>>.
- BISWAL, D.; ANUPRIYA, B.; UVANESH, K.; ANIS, A.; BANERJEE, I.; PAL, K. Effect of mechanical and electrical behavior of gelatin hydrogels on drug release and cell proliferation. **Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials**, v. 53, p. 174–186, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jmbbm.2015.08.017>>.
- BÖHME, K.; BARROS-VELÁZQUEZ, J.; CALO-MATA, P. Fingerprinting for

Detecting Contaminants in Food. In: **Food Protection and Security**. [s.l.] Elsevier, 2017. p. 15–42.

BOONKAEW, B.; SUWANPREUKSA, P.; CUTTLE, L.; BARBER, P. M.; SUPAPHOL, P. Hydrogels Containing Silver Nanoparticles for Burn Wounds Show Antimicrobial Activity Without Cytotoxicity. v. 40215, p. 1–10, 2014.

BOVERA, F.; MARONO, S.; DI MEO, C.; PICCOLO, G.; IANNACCONE, F.; NIZZA, a. Effect of mannanoligosaccharides supplementation on caecal microbial activity of rabbits. **Animal**, v. 4, n. 9, p. 1522–1527, 2010.

[CSL STYLE ERROR: reference with no printed form.]

[CSL STYLE ERROR: reference with no printed form.]

BUWALDA, S. J.; BOERE, K. W. M.; DIJKSTRA, P. J.; FEIJEN, J.; VERMONDEN, T.; HENNINK, W. E. Hydrogels in a historical perspective: From simple networks to smart materials. **Journal of Controlled Release**, v. 190, p. 254–273, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2014.03.052>>.

CARVALHO, R. A. De; GROSSO, C. R. F. Efeito do tratamento térmico e enzimático nas propriedades de filmes de gelatina. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 3, p. 495–501, 2006.

CASTILLO MARTINEZ, F. A.; BALCIUNAS, E. M.; SALGADO, J. M.; DOMÍNGUEZ GONZÁLEZ, J. M.; CONVERTI, A.; OLIVEIRA, R. P. de S. Lactic acid properties, applications and production: A review. **Trends in Food Science and Technology**, v. 30, n. 1, p. 70–83, 2013.

CHEN, B.-J.; JAMALUDIN, N. S.; KHOO, C.-H.; SEE, T.-H.; SIM, J.-H.; CHEAH, Y.-K.; HALIM, S. N. A.; SENG, H.-L.; TIEKINK, E. R. T. In vitro antibacterial and time kill evaluation of mononuclear phosphane-gold(I) dithiocarbamates. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 163, p. 68–80, 2016. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0162013416302264>>.

CHEN, T.; EMBREE, H. D.; BROWN, E. M.; TAYLOR, M. M.; PAYNE, G. F. Enzyme-catalyzed gel formation of gelatin and chitosan: Potential for in situ applications. **Biomaterials**, v. 24, n. 17, p. 2831–2841, 2003.

CHITRA, G.; FRANKLIN, D. S.; SUDARSAN, S.; SAKTHIVEL, M.; GUHANATHAN, S. Indole-3-acetic acid/diol based pH-sensitive biological macromolecule for antibacterial, antifungal and antioxidant applications. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 95, p. 363–375, fev. 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.11.068>>.

CLARK, J.; BARRETT, S. P.; ROGERS, M.; STAPLETON, R. Efficacy of super-oxidized water fogging in environmental decontamination. **Journal of Hospital Infection**, v. 64, n. 4, p. 386–390, 2006.

CLSI. **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Second Informational Supplement**. [s.l.: s.n.]v. 32

CRANDALL, P. G.; O'BRYAN, C. A.; GRINSTEAD, D. A.; DAS, K.; ROSE, C.; SHABATURA, J. J. Role of ethnographic research for assessing behavior of employees

during cleaning and sanitation in food preparation areas. **Food Control**, v. 59, p. 849–853, 2016. Disponível em:
<<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0956713515300967>>.

CZERNER, M.; FASCE, L. A.; MARTUCCI, J. F.; RUSECKAITE, R.; FRONTINI, P. M. Deformation and fracture behavior of physical gelatin gel systems. **Food Hydrocolloids**, v. 60, p. 299–307, 2016. Disponível em:
<<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.04.007>>.

DAVIDSON, P. M.; BRANEN, A. L.; JOHN N. SOFOS, a. L. B. P. M. D. **Antimicrobials in Food**. [s.l.: s.n.]v. 145

DE OLIVEIRA PIZZOLI, A. P.; MARCHIORE, N. G.; DE SOUZA, S. J.; DE FREITAS SANTOS, P. D.; GONÇALVES, O. H.; YAMASHITA, F.; BRACHT, L.; SHIRAI, M. A.; LEIMANN, F. V. Antimicrobial PLA/TPS/gelatin sheets with enzymatically crosslinked surface containing silver nanoparticles. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 133, n. 8, p. 1–8, 2016.

DE OLIVEIRA, C. E. V.; STAMFORD, T. L. M.; NETO, N. J. G.; DE SOUZA, E. L. Inhibition of *Staphylococcus aureus* in broth and meat broth using synergies of phenolics and organic acids. **International Journal of Food Microbiology**, v. 137, n. 2–3, p. 312–316, 2010. Disponível em:
<<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2009.11.019>>.

DEGEER, S. L.; WANG, L.; HILL, G. N.; SINGH, M.; BILGILI, S. F.; BRATCHER, C. L. Optimizing application parameters for lactic acid and sodium metasilicate against pathogens on fresh beef, pork and deli meats. **Meat science**, v. 118, p. 28–33, 2016. Disponível em:
<<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0309174016300699>>.

DJEKIC, I. Environmental impact of meat industry – current status and future perspectives. **Procedia Food Science**, v. 5, n. 5, p. 61–64, 2015. Disponível em:
<<http://dx.doi.org/10.1016/j.profoo.2015.09.025>>.

DJEKIC, I.; TOMASEVIC, I. Environmental impacts of the meat chain – Current status and future perspectives. **Trends in Food Science & Technology**, v. 54, p. 94–102, 2016. Disponível em:
<<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0924224416300309>>.

DOERN, C. D. When does 2 plus 2 equal 5? A review of antimicrobial synergy testing. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 52, n. 12, p. 4124–4128, 2014.

DONG, Z. J.; XIA, S. Q.; HUA, S.; HAYAT, K.; ZHANG, X. M.; XU, S. Y. Optimization of cross-linking parameters during production of transglutaminase-hardened spherical multinuclear microcapsules by complex coacervation. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 63, n. 1, p. 41–47, 2008.

DRAGAN, E. S. Design and applications of interpenetrating polymer network hydrogels. A review. **Chemical Engineering Journal**, v. 243, p. 572–590, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cej.2014.01.065>>.

DZIEZAK, J. D. Acids: Natural Acids and Acidulants. In: **Encyclopedia of Food and Health**. [s.l.] Elsevier, 2016. p. 15–18.

EINERSON, N. J.; STEVENS, K. R.; KAO, W. J. Synthesis and physicochemical analysis of gelatin-based hydrogels for drug carrier matrices. **Biomaterials**, v. 24, n. 3, p. 509–523, 2002.

ELZOGHBY, A. O. Gelatin-based nanoparticles as drug and gene delivery systems: Reviewing three decades of research. **Journal of Controlled Release**, v. 172, n. 3, p. 1075–1091, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2013.09.019>>.

ELZOGHBY, A. O.; SAMY, W. M.; ELGINDY, N. A. Protein-based nanocarriers as promising drug and gene delivery systems. **Journal of Controlled Release**, v. 161, n. 1, p. 38–49, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2012.04.036>>.

FARJAMI, T.; MADADLOU, A.; LABBAFI, M. Characteristics of the bulk hydrogels made of the citric acid cross-linked whey protein microgels. **Food Hydrocolloids**, v. 50, p. 159–165, 2015.

FDA. Report of the FDA Retail Food Program Database of Foodborne Illness Risk Factors. 2000.

FISHER, K. D.; BRATCHER, C. L.; JIN, T. Z.; BILGILI, S. F.; OWSLEY, W. F.; WANG, L. Evaluation of a novel antimicrobial solution and its potential for control Escherichia coli O157:H7, non-O157:H7 shiga toxin-producing E. coli, Salmonella spp., and Listeria monocytogenes on beef. **Food Control**, v. 64, p. 196–201, 2016. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0956713515303200>>.

FURUIKE, T.; KOMOTO, D.; HASHIMOTO, H.; TAMURA, H. Preparation of chitosan hydrogel and its solubility in organic acids. **International Journal of Biological Macromolecules**, p. 1–6, 2017. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0141813016327027>>.

GIMÉNEZ, B.; TURNAY, J.; LIZARBE, M. A.; MONTERO, P.; GÓMEZ-GUILLÉN, M. C. Use of lactic acid for extraction of fish skin gelatin. **Food Hydrocolloids**, v. 19, n. 6, p. 941–950, 2005.

GÓMEZ-MASCARAQUE, L. G.; SOLER, C.; LOPEZ-RUBIO, A. Stability and bioaccessibility of EGCG within edible micro-hydrogels. Chitosan vs. gelatin, a comparative study. **Food Hydrocolloids**, v. 61, p. 128–138, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.05.009>>.

GUL, K.; SINGH, P.; WANI, A. A. **Chapter 4 - Safety of Meat and Poultry**. [s.l.] Elsevier Inc., 2016.

HA, B.-B.; JO, E.-H.; CHO, S.; KIM, S.-B. Production optimization of flying fish roe analogs using calcium alginate hydrogel beads. **Fisheries and Aquatic Sciences**, v. 19, n. 1, p. 30, 2016. Disponível em: <<http://fas.biomedcentral.com/articles/10.1186/s41240-016-0031-y>>.

HE, J.; CHEN, R.; LU, Y.; ZHAN, L.; LIU, Y.; LI, D.; JIN, Z. Fabrication of circular microfluidic network in enzymatically-crosslinked gelatin hydrogel. **Materials Science and Engineering C**, v. 59, p. 53–60, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.msec.2015.09.104>>.

HEE, M.; PARK, H.; CHAN, H.; RA, S.; JUNG, J.; HO, W. Injectable methylcellulose

hydrogel containing silver oxide nanoparticles for burn wound healing. **Carbohydrate Polymers**, v. 181, n. December 2017, p. 579–586, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.11.109>>.

HOLAH, J. T. Cleaning and disinfection practices in food processing. In: **Hygiene in Food Processing**. [s.l.] Elsevier, 2014. p. 259–304.

HOLAH, J.; WEST, S.; MCHARDY, M. Hygiene Requirements in Food Service. In: **Handbook of Hygiene Control in the Food Industry**. [s.l.] Elsevier, 2016. p. 205–219.

JING, G.; WANG, L.; YU, H.; AMER, W. A.; ZHANG, L. Recent progress on study of hybrid hydrogels for water treatment. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 416, n. 1, p. 86–94, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfa.2012.09.043>>.

JOGLEKAR, H. G.; RAHMAN, I.; BABU, S.; KULKARNI, B. D.; JOSHI, A. Comparative assessment of downstream processing options for lactic acid. **Separation and Purification Technology**, v. 52, n. 1, p. 1–17, 2006.

KABIRI, K.; OMIDIAN, H.; HASHEMI, S. A.; ZOHURIAAN-MEHR, M. J. Synthesis of fast-swelling superabsorbent hydrogels: Effect of crosslinker type and concentration on porosity and absorption rate. **European Polymer Journal**, v. 39, n. 7, p. 1341–1348, 2003.

KAKURINOV, V. Cleaning and Disinfection. In: **Encyclopedia of Food Safety**. [s.l.] Elsevier Ltd., 2014. 4p. 211–225.

KASUGA, F.; TORGERSON, P. R.; SILVA, N. R. De; FE, E. M.; ROKNI, M. B.; ZHOU, X.; SRIPA, B.; GARGOURI, N. The global burden of foodborne parasitic diseases : an update. v. 30, n. 1, 2014.

KHAN, S. A.; SCHNEIDER, M. Improvement of Nanoprecipitation Technique for Preparation of Gelatin Nanoparticles and Potential Macromolecular Drug Loading. **Macromolecular Bioscience**, v. 13, n. 4, p. 455–463, 2013.

KIELISZEK, M.; MISIEWICZ, A. Microbial transglutaminase and its application in the food industry. A review. **Folia microbiologica**, v. 59, n. 3, p. 241–250, 2014.

KOMMAREDDY, S.; SHENOY, D. B.; AMIJI, M. M. Gelatin Nanoparticles and Their Biofunctionalization. In: **Nanotechnologies for the Life Sciences**. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2007. 1p. 330–352.

KONWAR, A.; KALITA, S.; KOTOKY, J.; CHOWDHURY, D. Chitosan-Iron Oxide Coated Graphene Oxide Nanocomposite Hydrogel: A Robust and Soft Antimicrobial Biofilm. **ACS Applied Materials and Interfaces**, v. 8, n. 32, p. 20625–20634, 2016.

LANGSRUD, S.; SIDHU, M. S.; HEIR, E.; HOLCK, A. L. Bacterial disinfectant resistance—a challenge for the food industry. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 51, n. 4, p. 283–290, 2003.

LEÓN PELÁEZ, A. M.; SERNA CATAÑO, C. A.; QUINTERO YEPES, E. A.; GAMBA VILLARROEL, R. R.; DE ANTONI, G. L.; GIANNUZZI, L. Inhibitory activity of lactic and acetic acid on *Aspergillus flavus* growth for food preservation.

Food Control, v. 24, n. 1–2, p. 177–183, 2012. Disponível em:
<<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2011.09.024>>.

LIN, C. C.; METTERS, A. T. Hydrogels in controlled release formulations: Network design and mathematical modeling. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 58, n. 12–13, p. 1379–1408, 2006.

LIU, F.; CHIOU, B.; AVENA-BUSTILLOS, R. J.; ZHANG, Y.; LI, Y.; MCHUGH, T. H.; ZHONG, F. Food Hydrocolloids Study of combined effects of glycerol and transglutaminase on properties of gelatin films. **Food hydrocolloids**, p. 1–9, 2016a. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.10.004>>.

LIU, F.; MAJEED, H.; ANTONIOU, J.; LI, Y.; MA, Y.; YOKOYAMA, W.; MA, J.; ZHONG, F. Tailoring physical properties of transglutaminase-modified gelatin films by varying drying temperature. **Food Hydrocolloids**, v. 58, p. 20–28, 2016b.

LIU, W.; LI, M.; SHORT, T.; QING, X.; HE, Y.; LI, Y.; LIU, L.; ZHANG, H.; ZHANG, H. Supercritical carbon dioxide cleaning of metal parts for remanufacturing industry. **Journal of Cleaner Production**, v. 93, p. 339–346, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jclepro.2015.01.014>>.

MA, S.; YU, B.; PEI, X.; ZHOU, F. Structural hydrogels. **Polymer (United Kingdom)**, v. 98, p. 516–535, 2016.

MACHÍN, R.; ISASI, J. R.; VÉLAZ, I. Hydrogel matrices containing single and mixed natural cyclodextrins. Mechanisms of drug release. **European Polymer Journal**, v. 49, n. 12, p. 3912–3920, 2013.

MANA, T. S. C.; SITZLAR, B.; CADNUM, J. L.; JENCSON, A. L.; KOGANTI, S.; DONSKEY, C. J. Evaluation of an automated room decontamination device using aerosolized peracetic acid. **American Journal of Infection Control**, v. 45, n. 3, p. 327–329, mar. 2017. Disponível em:
<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27866755> & <http://linkinghub.elsevier.com/trieve/pii/S0196655316309592>>.

MANI-LÓPEZ, E.; GARCÍA, H. S.; LÓPEZ-MALO, A. Organic acids as antimicrobials to control Salmonella in meat and poultry products. **Food Research International**, v. 45, n. 2, p. 713–721, 2012. Disponível em:
<<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2011.04.043>>.

MCDADE, D.; PATRICK, R. M.; RIZVI, S. S. H.; KNORR, D.; LABUZA, T. P. **Organic Meat Production and Processing**. Oxford, UK: Wiley-Blackwell, 2012.

MEAD, G. C. HACCP in primary processing: poultry. In: **HACCP in the Meat Industry**. [s.l.] Elsevier, 2000. p. 123–153.

MIKULA, P.; KALHOTKA, L.; JANCULA, D.; ZEZULKA, S.; KORINKOVA, R.; CERNY, J.; MARSALEK, B.; TOMAN, P. Evaluation of antibacterial properties of novel phthalocyanines against Escherichia coli - Comparison of analytical methods. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 138, p. 230–239, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2014.04.014>>.

MILCH, R. A.; MURRAY, R. A. Studies of alcaptonuria : Mechanisms of swelling of

homogentisic acid-collagen preparations. **Arthritis & Rheumatism**, v. 4, n. 3, p. 253–267, jun. 1961. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/art.1780040304>>.

MOERMAN, F.; LORENZEN, K. Hygienic Design of Open Food Processing Equipment. In: **Food Protection and Security**. [s.l.] Elsevier, 2017. p. 101–166.

MOHAN, A.; POHLMAN, F. W. Role of organic acids and peroxyacetic acid as antimicrobial intervention for controlling *Escherichia coli* O157: H7 on beef trimmings. **LWT - Food Science and Technology**, v. 65, p. 868–873, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2015.08.077>>.

MOHANTY, B.; ASWAL, V. K.; KOHLBRECHER, J.; BOHIDAR, H. B. Synthesis of gelatin nanoparticles via simple coacervation. **Journal of Surface Science and Technology**, v. 21, n. 3–4, p. 149–160, 2005.

MOTARJEMI, Y. The Starting Point. In: **Handbook of Hygiene Control in the Food Industry**. [s.l.] Elsevier, 2016. p. 1–11.

OECD-FAO. **OECD-FAO Agricultural Outlook 2014-2023 OECD-FAO Agricultural Outlook**. [s.l.: s.n.]

OVIEDO, I. R.; MENDEZ, N. A. N.; GOMEZ, M. P. G.; RODRIGUEZ, H. C.; MARTINEZ, A. R. Design of a physical and nontoxic crosslinked poly(vinyl alcohol) hydrogel. **International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials**, v. 57, n. 12, p. 1095–1103, 2008. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/00914030802341661>>.

PADHI, J. R.; NAYAK, D.; NANDA, A.; RAUTA, P. R.; ASHE, S.; NAYAK, B. Development of highly biocompatible Gelatin & i-Carrageenan based composite hydrogels: In depth physiochemical analysis for biomedical applications. **Carbohydrate Polymers**, v. 153, p. 292–301, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.07.098>>.

PAPAGIANNI, M. Organic Acids. In: **Comprehensive Biotechnology**. Second Edition. [s.l.] Elsevier, 2011. 1p. 109–120.

PHUA, L. K.; NEO, S. Y.; KHOO, G. H.; YUK, H. G. Comparison of the efficacy of various sanitizers and hot water treatment in inactivating inoculated foodborne pathogens and natural microflora on mung bean sprouts. **Food Control**, v. 42, p. 270–276, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.02.013>>.

QUITMANN, H.; FAN, R.; CZERMAK, P. Acidic Organic Compounds in Beverage, Food, and Feed Production. In: **Advances in biochemical engineering/biotechnology**. [s.l.: s.n.]123p. 91–141.

RAJASEKARAN, P.; SANTRA, S. Hydrothermally Treated Chitosan Hydrogel Loaded with Copper and Zinc Particles as a Potential Micronutrient-Based Antimicrobial Feed Additive. **Frontiers in veterinary science**, v. 2, n. November, p. 62, 2015.

REGALADO, C.; CASTA, E.; JIM, R.; GARCÍA-ALMEND, B. E. Evaluation of electrolyzed water as cleaning and disinfection agent on stainless steel as a model surface in the dairy industry. v. 60, p. 320–328, 2016.

RITGER, P. L.; PEPPAS, N. A. A simple equation for description of solute release I.

Fickian and non-fickian release from non-swellaable devices in the form of slabs, spheres, cylinders or discs. **Journal of Controlled Release**, v. 5, n. 1, p. 23–36, 1987.

ROCASALBAS, G.; FRANCESKO, A.; TOURIÑO, S.; FERNÁNDEZ-FRANCOS, X.; GUEBITZ, G. M.; TZANOV, T. Laccase-assisted formation of bioactive chitosan/gelatin hydrogel stabilized with plant polyphenols. **Carbohydrate Polymers**, v. 92, n. 2, p. 989–996, 2013.

ROCHA, M. da; LOIKO, M. R.; TONDO, E. C.; PRENTICE, C. Physical, mechanical and antimicrobial properties of Argentine anchovy (*Engraulis anchoita*) protein films incorporated with organic acids. **Food Hydrocolloids**, v. 37, p. 213–220, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2013.10.017>>.

RUTALA, W. A.; WEBER, D. J. Monitoring and improving the effectiveness of surface cleaning and disinfection. **American Journal of Infection Control**, v. 44, n. 5, p. e69–e76, maio 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ajic.2015.10.039>>.

SABBAGH, F.; MUHAMAD, I. I. Acrylamide-based hydrogel drug delivery systems: Release of Acyclovir from MgO nanocomposite hydrogel. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, v. 72, p. 182–193, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jtice.2016.11.032>>.

SANTORO, M.; TATARA, A. M.; MIKOS, A. G. Gelatin carriers for drug and cell delivery in tissue engineering. **Journal of Controlled Release**, v. 190, p. 210–218, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2014.04.014>>.

SAPERS, G. M. Disinfection of Contaminated Produce with Conventional Washing and Sanitizing Technology. In: **The Produce Contamination Problem**. [s.l.] Elsevier, 2014. 1p. 389–431.

SCALLAN, E.; HOEKSTRA, R. M.; ANGULO, F. J.; TAUXE, R. V.; WIDDOWSON, M. A.; ROY, S. L.; JONES, J. L.; GRIFFIN, P. M. Foodborne illness acquired in the United States-Major pathogens. **Emerging Infectious Diseases**, v. 17, n. 1, p. 7–15, 2011.

SIMONI, R. C.; LEMES, G. F.; FIALHO, S.; GONÇALVES, O. H.; GOZZO, A. M.; CHIARADIA, V.; SAYER, C.; SHIRAI, M. A.; LEIMANN, F. V. Effect of drying method on mechanical, thermal and water absorption properties of enzymatically crosslinked gelatin hydrogels. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 89, n. 2, p. 1–11, 2017.

SKÅRA, T.; ROSNES, J. T. Emerging Methods and Principles in Food Contact Surface Decontamination/Prevention. In: **Innovation and Future Trends in Food Manufacturing and Supply Chain Technologies**. [s.l.] Elsevier, 2016. p. 151–172.

THERON, M.; LUES, J. **Organic Acids and Food Preservation**. [s.l.] CRC Press, 2010.

THERON, M. M.; LUES, J. F. R. Organic Acids and Meat Preservation: A Review. **Food Reviews International**, v. 23, n. 2, p. 141–158, 2007. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/87559120701224964%5Cnhttp://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/87559120701224964#.Vo7s8PI96M8>>.

ULLAH, F.; BISYRUL, M.; JAVED, F.; AKIL, H. Classification, processing and application of hydrogels: A review. *v. 57*, p. 414–433, 2015.

USDA. USDA Agricultural Projections to 2025. **United States Department of Agriculture (USDA)**, n. February 2016, p. 99, 2016.

VRANKEN, L.; AVERMAETE, T.; PETALIOS, D.; MATHIJS, E. Curbing global meat consumption: Emerging evidence of a second nutrition transition. **Environmental Science and Policy**, *v. 39*, p. 1–12, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.envsci.2014.02.009>>.

WANG, T.; ZHU, X. K.; XUE, X. T.; WU, D. Y. Hydrogel sheets of chitosan, honey and gelatin as burn wound dressings. **Carbohydrate Polymers**, *v. 88*, n. 1, p. 75–83, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.11.069>>.

WARRINER, K.; NAMVAR, A. Postharvest washing as a critical control point in fresh produce processing: alternative sanitizers and wash technologies. In: **Global Safety of Fresh Produce**. [s.l.] Elsevier, 2014. p. 71–102.

WHO. **WHO Initiative to Estimate the Global Burden of Foodborne Diseases**. [s.l.: s.n.]

WITTE, A. K.; BOBAL, M.; DAVID, R.; BLÄTTLER, B.; SCHODER, D.; ROSSMANITH, P. SC. **LWT - Food Science and Technology**, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2016.10.024>>.

[CSL STYLE ERROR: reference with no printed form.]

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **WHO estimates of the global burden of foodborne diseases: foodborne disease burden epidemiology reference group 2007-2015**. [s.l.] World Health Organization 2015, 2015.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Toxicological evaluation of certain food additives with a review of general principles and of specifications. Seventeenth Report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives**. [s.l.: s.n.]

ZAKI, H. M. B. A.; MOHAMED, H. M. H.; EL-SHERIF, A. M. A. Improving the antimicrobial efficacy of organic acids against *Salmonella enterica* attached to chicken skin using SDS with acceptable sensory quality. **LWT - Food Science and Technology**, *v. 64*, n. 2, p. 558–564, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2015.06.012>>.

ZHANG, C.; CAO, W.; HUNG, Y. C.; LI, B. Disinfection effect of slightly acidic electrolyzed water on celery and cilantro. **Food Control**, *v. 69*, p. 147–152, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.04.039>>.