



UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR  
Ciências

# Desenvolvimento de filmes antimicrobianos para aplicação na indústria alimentar

Ângela Maria Leite da Silva

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em  
**Bioquímica**  
(2º ciclo de estudos)

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Doutora Fernanda da Conceição Domingues

Co-orientadora: Doutora Sónia Cristina Lopes de Sousa

Covilhã, setembro de 2015



Este trabalho foi financiado por Fundos FEDER através do Programa Operacional Fatores de Competitividade - COMPETE e por Fundos Nacionais através da FCT - Fundação para a Ciência e a Tecnologia no âmbito do projeto «Alimentos funcionais com resveratrol para controlar e prevenir a colonização patogénica de carne de aves» (PTDC/AGR-ALI/121876/2010).





# Agradecimentos

Ao finalizar esta dissertação não poderia deixar de agradecer a todas as pessoas que contribuíram de um certo modo para este trabalho.

Começo por agradecer à professora Fernanda Domingues por ter orientado este trabalho, o seu incentivo e o seu espírito científico. Agradeço-lhe toda a disponibilidade, compreensão e amizade.

À Sónia Sousa, não só por me ter co-orientado, mas também pelo apoio laboratorial em todos os momentos cruciais deste trabalho assim como todas as sugestões para a melhoria deste. Também lhe agradeço a compreensão, o incentivo e a amizade.

À Andreia Duarte, por todo o apoio laboratorial que me deu no Centro de Investigação em Ciências da Saúde e pelo seu espírito crítico. De uma forma especial e sincera, agradeço toda a disponibilidade por me ter instruído novos conhecimentos na área de microbiologia e pela amizade.

À professora Ana Ramos por todos os conhecimentos que me transmitiu dos filmes. Agradeço a todos os membros do grupo Materiais Fibrosos e Tecnologias Ambientais por me terem acolhido, especialmente à Vera e à Cláudia. Também agradeço a todos os membros do Centro de Investigação de Ciências da Saúde.

À Eng.<sup>a</sup> Ana Paula Gomes e ao João Matos, do Centro de Ótica, agradeço pelo auxílio na preparação das amostras para Microscopia Eletrónica de Varrimento e na posterior aquisição das imagens.

Não poderia de deixar de agradecer ao Ângelo Luís pela partilha de conhecimentos e ideias, pelo incentivo laboratorial e amizade.

Por fim, agradeço às pessoas mais importantes da minha vida, aos meus pais e ao meu irmão. Pela família unida que somos.



## Resumo

*Campylobacter coli* e *Campylobacter jejuni* são os principais agentes infecciosos causadores de doença gastrointestinal no mundo. Nos humanos, a principal via de contaminação é o manuseamento, a preparação e o consumo de carne de aves contaminada, sobretudo a carne de frango. As embalagens antimicrobianas são uma forma de embalagens ativas, que permitem a redução e inibição do crescimento de microrganismos que possam estar presentes nos alimentos ou no próprio material das embalagens. Os derivados de celulose são uma fonte importante de biomateriais para a formação de filmes antimicrobianos (AM) e a incorporação de compostos fenólicos nestes filmes, tem vindo a demonstrar grandes potencialidades. O resveratrol (RV) é um composto fenólico de origem natural que apresenta diversas propriedades benéficas para a saúde humana, incluindo propriedades antimicrobianas. No entanto a sua baixa solubilidade em meio aquoso e a sua baixa disponibilidade limitam a sua aplicação. Para ultrapassar estas limitações é feita a sua complexação com ciclodextrinas. Neste trabalho foram desenvolvidos filmes AM em monocamada baseados em carboximetilcelulose (CMC), e em bicamada baseados em acetato de celulose e hidroxietilcelulose. Como agente AM foi incorporado o RV e o seu complexo de inclusão com a hidroxipropil- $\gamma$ -ciclodextrina (HP- $\gamma$ -CD). Foram avaliadas as propriedades físicas destes filmes e a atividade antimicrobiana contra *C. coli* e *C. jejuni* pelo método de difusão em disco. Também foi quantificada a percentagem de libertação dos agentes AM em estudo nos filmes em bicamada para etanol a 10%. Como a regulação e a inibição de patógenos alimentares pode ser regulada por fenómenos de *quorum sensing* (QS), foi estudada a interferência dos filmes com incorporação de RV e da sua forma complexada nesse processo de comunicação. Foi ainda avaliada a atividade anti-*Campylobacter* dos filmes em bicamada aplicados num modelo alimentar, usando para este efeito a carne de frango. Os resultados demonstraram que ambos os agentes AM tornaram os filmes de CMC e os filmes em bicamada mais elásticos e menos resistentes. Os filmes em bicamada com incorporação do complexo de inclusão de RV foram os mais hidrofílicos, comparativamente com os de RV na forma livre e o controlo. Os ensaios de libertação demonstraram que os agentes AM foram totalmente libertados dos filmes em bicamada, ao fim de 10 dias à temperatura de 4 e 20°C. Também foi demonstrado que os filmes em bicamada inibiram o crescimento das estirpes testadas na área de contacto dos filmes com a superfície de agar e formaram um halo de inibição, enquanto os filmes de CMC apenas inibiram o crescimento na zona de contacto. Mostrou-se que os filmes em bicamada possuíam atividade anti-QS através da inibição da produção de violaceína superior a 70%. Por fim, foi observada uma redução das Unidades Formadoras de Colónias de *C. coli* e *C. jejuni*, dependente da temperatura de incubação, por ação dos filmes em bicamada testados no peito de frango. Em suma, este estudo demonstrou o elevado potencial dos filmes

AM biodegradáveis com incorporação de RV e da sua forma complexada com HP- $\gamma$ -CD no controlo de *Campylobacter* em carne de frango.

## Palavras-chave

Filmes antimicrobianos; Derivados de celulose; Resveratrol; Complexo de inclusão de resveratrol; *Campylobacter*.



# Abstract

*Campylobacter coli* and *Campylobacter jejuni* are among the biggest worldwide causes of human bacterial gastroenteritis. The source of human infection is mainly associated with handling, preparation and consumption of contaminated poultry meat, mainly chicken meat. Antimicrobial packaging is one of the types of active packaging that allows to reduce and to inhibit the microbial growth already contained in the food or in the packaging material itself. Cellulose derivatives are an important source of biomaterials for the preparation of antimicrobial (AM) films and the incorporation of phenolic compounds in those films has demonstrated great antimicrobial potential. Resveratrol (RV) is a phenolic compound of natural origin with several beneficial properties for human health, including antimicrobial properties. However, its low solubility in aqueous media and its low stability limit its potential applications. To overcome these drawbacks it is commonly complexed with cyclodextrins. In this work it was developed an AM monolayer film based on carboxymethylcellulose (CMC), and a bilayer one based on cellulose acetate and hydroxyethylcellulose. As AM agent, it was incorporated RV and RV complexed with hydroxypropyl- $\gamma$ -cyclodextrin (HP- $\gamma$ -CD). The physical properties of these films and its antimicrobial activity against *C. coli* and *C. jejuni* were evaluated by the disk diffusion method. The release percentage of the AM agents in bilayer films for 10% ethanol was also quantified. Being the regulation and the inhibition of foodborne pathogens regulated by quorum sensing phenomena, the impact of the films which was incorporated with RV and its complex form in this communication process was studied. It was also evaluated the anti-*Campylobacter* activity of the bilayer films applied in a food model, using for this purpose chicken meat. The results showed that the CMC and bilayer films with both AM agents become more elastic and less resistant. The bilayer films incorporated with RV inclusion complex were more hydrophilic when compared with the ones with RV in its pure form and with the control film. The release tests showed that the AM agents were totally released from the bilayer films after 10 days at 4 and 20°C. It was also shown that the bilayer films inhibited the growth of the tested strains in the contact area of the films with the agar surface and formed an inhibition zone, while the CMC films only inhibited the growth in the contact area. It was shown that the bilayer films had anti-QS activity demonstrated by the inhibition of the violacein production by more than 70%. Finally, when the bilayer films were tested in the chicken breast it was observed that Colonies Forming Units reduction of *C. jejuni* and *C. coli* was dependent on the incubation temperature. In sum, this study demonstrated the high potential of biodegradable AM films with the incorporation of RV and its inclusion complex with HP- $\gamma$ -CD for the control of *Campylobacter* in chicken meat.

## Keywords

Antimicrobial films; Cellulose derivatives; Resveratrol; Resveratrol inclusion complex; *Campylobacter*.



# Índice

Capítulo 1. Introdução Geral	1
1.1. <i>Campylobacter</i> spp.	1
1.1.1. Principais fontes de contaminação	2
Capítulo 2. Embalagens Ativas	4
2.1. Embalagens antimicrobianas	5
2.1.1. Propriedades antimicrobianas do resveratrol	8
2.2. Filmes antimicrobianos	11
2.2.1. Definição e tipo de filmes antimicrobianos	11
2.2.2. Biopolímeros utilizados na preparação de filmes	13
2.2.2.1. Celulose e derivados	14
2.2.3. Preparação de filmes antimicrobianos	16
2.2.4. Tipos de filmes antimicrobianos	17
2.2.5. Avaliação das propriedades físicas de filmes	18
2.2.6. Avaliação da atividade antimicrobiana de filmes	21
Capítulo 3. Objetivos	24
Capítulo 4. Materiais e Métodos	25
4.1. Preparação dos filmes antimicrobianos	25
4.1.1. Agentes antimicrobianos	25
4.1.2. Filmes antimicrobiano	25
4.2. Avaliação das propriedades físicas	27
4.3. Avaliação da atividade antimicrobiana	30
4.3.1. Microrganismos	30
4.3.2. Teste de difusão em disco	30
4.4. Avaliação da atividade anti- <i>quorum sensing</i>	31
4.5. Ensaio de libertação dos compostos antimicrobianos nos filmes em bicamada	31
4.6. Aplicação dos filmes antimicrobianos em bicamada num modelo alimentar (peito de frango)	32
Capítulo 5. Resultados e Discussão	34
5.1. Filmes de carboximetilcelulose	34
5.1.1. Avaliação das propriedades físicas dos filmes de carboximetilcelulose	35
5.1.2. Avaliação da atividade antimicrobiana dos filmes de carboximetilcelulose	42
5.1.3. Modificação das propriedades dos filmes de carboximetilcelulose pela incorporação de ácidos gordos	46
5.2. Filmes de hidroxietilcelulose	49
5.3. Filmes de acetato de celulose	51
5.4. Filmes em bicamada: acetato de celulose e hidroxietilcelulose	52

5.4.1. Avaliação das propriedades físicas dos filmes em bicamada	54
5.4.2. Ensaios de libertação dos agentes antimicrobianos, RV e Cl, a partir dos filmes em bicamada	62
5.4.3. Avaliação da atividade antimicrobiana dos filmes em bicamada	64
5.4.4. Avaliação da atividade anti- <i>quorum sensing</i> dos filmes em bicamada	66
5.4.5. Aplicação dos filmes em bicamada num modelo alimentar de peito de frango	69
Capítulo 6. Conclusões e Perspetivas Futuras	73
Referências Bibliográficas	75
Anexo - Artigo Submetido	85



# Lista de Figuras

<b>Figura 1:</b> Estrutura química do <i>trans</i> -RV [34].	8
<b>Figura 2:</b> Estrutura química de $\alpha$ -CDs, $\beta$ -CDs e $\gamma$ -CDs [46].	10
<b>Figura 3:</b> Representação ilustrativa da cavidade interna e externa das CDs (Adaptada de [48]).	10
<b>Figura 4:</b> Sistemas de filmes que podem ser aplicados na indústria alimentar (Adaptada de [52]).	12
<b>Figura 5:</b> Biopolímeros (Adaptada de [53]).	13
<b>Figura 6:</b> Estrutura química da celulose (Adaptada de [57]).	14
<b>Figura 7:</b> Estrutura química do diacetato de celulose [56].	15
<b>Figura 8:</b> Estrutura química da carboximetilcelulose [57].	15
<b>Figura 9:</b> Estrutura química da hidroxietilcelulose [61].	16
<b>Figura 10:</b> Representação esquemática do ângulo de contacto (Adaptada de [71]).	20
<b>Figura 11:</b> Formas que um líquido pode adquirir aquando aplicado numa superfície sólida (Adaptada de [71]).	20
<b>Figura 12:</b> Modelo de cor CIELAB (Adaptada de [76]).	21
<b>Figura 13:</b> Fotografia de um filme de carboximetilcelulose.	34
<b>Figura 14:</b> Imagens da morfologia dos filmes de CMC obtidas por microscopia eletrónica de varrimento. À esquerda imagens da superfície dos filmes; à direita imagens do corte transversal. (A) e (B) filme CMC; (C) e (D) filme CMC+RV; (E) e (F) filme CMC+10%G; (G) e (H) filme CMC+10%G+RV; A ampliação encontra-se indicada nas micrografias.	40
<b>Figura 14 (continuação):</b> Imagens da morfologia dos filmes de CMC obtidas por microscopia eletrónica de varrimento. À esquerda imagens da superfície dos filmes; à direita imagens do corte transversal. (I) e (J) filme CMC+25%G; (K) e (L) filme CMC+25%G+RV; (M) e (N) filme CMC+50%G+CD; A ampliação encontra-se indicada nas micrografias.	41
<b>Figura 15:</b> Fotografias do teste de difusão em disco dos filmes antimicrobianos de CMC em <i>C. jejuni</i> 225421 (A) ação de RV e (B) ação do CI e CD.	44
<b>Figura 16:</b> Fotografia do teste de difusão em disco dos filmes antimicrobianos de CMC em <i>C. jejuni</i> 225421 em que se visualizam os cristais de RV com concentração igual a 10 vezes o MIC (A) CMC + RV; (B) CMC + 10%G + RV; (C) CMC + 25%G + RV.	45
<b>Figura 17:</b> Fotografia do teste de difusão em disco dos filmes de HEC a 1% (m/m). A - Filme controlo; B - HEC com 0,05% de RV; C - HEC com 0,1% de RV.	50

<b>Figura 18:</b> Filme de hidroxietilcelulose a 4% (m/m).	51
<b>Figura 19:</b> Fotografias de filmes de AC obtidos a diferentes temperaturas de secagem. A - 22°C; B-40°C; C-70°C; D- 90°C e E-100°C.	52
<b>Figura 20:</b> Fotografia do filme em bicamada constituído por uma camada de AC e por outra de HEC.	53
<b>Figura 21:</b> Imagens da morfologia de filmes em bicamada obtidas por microscopia eletrónica de varrimento. Imagens do corte transversal dos filmes à esquerda e à direita a superfície (A) e (B) filme C; (C) e (D) filme RV <sub>2</sub> ; (E) e (F) filme CD; (G) e (H) filme Cl <sub>1</sub> ; A ampliação encontra-se indicada nas micrografias.	61
<b>Figura 22:</b> Taxa de libertação dos agentes antimicrobianos: RV <sub>1</sub> (♦), RV <sub>2</sub> (■), Cl <sub>1</sub> (▲) e Cl <sub>2</sub> (●), em etanol a 10%, a 4°C (A) e a 20°C (B) incorporados nos filmes de bicamada (média ± desvio-padrão).	62
<b>Figura 23:</b> Percentagem de inibição da produção de violaceína por ação dos filmes antimicrobianos em bicamada.	67
<b>Figura 24:</b> Inibição do QS por ação do RV incorporado em filmes de bicamada. 1- Filme C; 2 - Filme RV <sub>1</sub> ; 3 - Filme RV <sub>2</sub> .	68
<b>Figura 25:</b> Inibição do QS por ação do Cl incorporado em filmes de bicamada. 1- Filme CD; 2 - Filme Cl <sub>1</sub> ; 3 - Filme Cl <sub>2</sub> .	68
<b>Figura 26:</b> log UFC/mL de <i>C. coli</i> das amostras de peito de frango envolvidas com os filmes antimicrobianos em bicamada a 4 e 20°C no período de 72h.	70
<b>Figura 27:</b> log UFC/mL de <i>C. jejuni</i> nas amostras de peito de frango envolvidas com os filmes antimicrobianos em bicamada a 4 e 20°C no período de 72h.	71
<b>Figura 28:</b> log UFC/mL da mistura de ambas as estirpes nas amostras de peito de frango envolvidas com os filmes antimicrobianos em bicamada a 4 e 20°C no período de 72h.	71

**Nota:** Figuras 13, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 24 e 25 tiradas por Ângela Silva.



# Lista de Tabelas

<b>Tabela 1:</b> Exemplos de aplicação de embalagens ativas para uso na indústria alimentar (Adaptada de [15]).	5
<b>Tabela 2:</b> Exemplos de agentes AM utilizados em sistemas de embalagens alimentares (Adaptada de [15]).	7
<b>Tabela 3:</b> Parâmetros da tensão superficial (mN/m) dos líquidos utilizados nas medições do ângulo de contacto [84].	28
<b>Tabela 4:</b> Valores das coordenadas cromáticas do fundo branco padrão utilizado na medição.	29
<b>Tabela 5:</b> Concentração ( $\mu\text{g/mL}$ ) dos agentes antimicrobianos incorporados nos filmes de CMC.	35
<b>Tabela 6:</b> Propriedades estruturais dos filmes de CMC (média $\pm$ desvio-padrão).	35
<b>Tabela 7:</b> Propriedades mecânicas dos filmes de CMC (média $\pm$ desvio-padrão).	37
<b>Tabela 8:</b> Concentração (% m/v) dos agentes antimicrobianos presente em cada 1 cm de disco de filme.	42
<b>Tabela 9:</b> Avaliação da atividade antimicrobiana, por difusão em disco, de filmes CMC contra <i>C. coli</i> e <i>C. jejuni</i> .	42
<b>Tabela 10:</b> Concentração ( $\mu\text{g/mL}$ ) dos agentes antimicrobianos, igual a 10 vezes o MIC, incorporadas nos filmes de CMC.	45
<b>Tabela 11:</b> Avaliação da atividade antimicrobiana por difusão em disco.	46
<b>Tabela 12:</b> Ângulo de contacto dos filmes de CMC e com incorporação de RV.	47
<b>Tabela 13:</b> Ângulo de contacto dos filmes de CMC com incorporação de ácidos gordos sem adição de Tween 80 (média $\pm$ desvio-padrão).	47
<b>Tabela 14:</b> Ângulo de contacto dos filmes de CMC com incorporação de ácidos gordos com adição de Tween 80 (média $\pm$ desvio-padrão).	49
<b>Tabela 15:</b> Espessura dos filmes em monocamada e bicamada de AC e HEC (média $\pm$ desvio-padrão).	53
<b>Tabela 16:</b> Valores das propriedades estruturais dos filmes em bicamada (média $\pm$ desvio-padrão).	54
<b>Tabela 17:</b> Valores das propriedades mecânicas e de barreira dos filmes em bicamada (média $\pm$ desvio-padrão).	56

<b>Tabela 18:</b> Valores do ângulo de contacto ( $^{\circ}$ ) e da energia livre de superfície ( $\gamma$ ) dos filmes antimicrobianos em bicamada com dois líquidos diferentes (média $\pm$ desvio-padrão).	58
<b>Tabela 19:</b> Valores das propriedades óticas dos filmes em bicamada (média $\pm$ desvio-padrão).	59
<b>Tabela 20:</b> Concentração (%) dos agentes antimicrobianos presente em cada 1 cm de disco de filme.	64
<b>Tabela 21:</b> Diâmetros (mm) dos halos de inibição e da área de contacto dos filmes para as estirpes de <i>Campylobacter</i> (média $\pm$ desvio-padrão).	64
<b>Tabela 22:</b> Diâmetros (mm) dos halos de inibição de violaceína pelos filmes antimicrobianos em bicamada.	66
<b>Tabela 23:</b> log UFC/mL de <i>C. coli</i> , <i>C. jejuni</i> e mistura das duas estirpes das amostras de peito de frango envolvidas com os filmes antimicrobianos em bicamada a 4 e 20°C no período de 72h.	69



# Lista de Abreviaturas e Acrónimos

A - Alongamento

AC - Acetato de celulose

AG - Ácidos gordos

AL - Ácido linoleico

AM - Antimicrobianos

AO - Ácido oleico

CD - Ciclodextrina

CI - Complexo de Inclusão

CMC - Carboximetilcelulose

DMSO - Dimetilsulfóxido

DO - Densidade ótica

EC - Etilcelulose

G - Glicerol

HEC - Hidroxiethylcelulose

HPMC - Hidroxipropilmetilcelulose

HP- $\gamma$ -CD - Hidroxipropil- $\gamma$ -ciclodextrina

HR - Humidade Relativa

IT - Índice de tração

MC - Metilcelulose

ME - Módulo Elástico

MIC - *Minimum Inhibitory Concentration*

OA - Óleo alimentar

QS - *quorum sensing*

RV - Resveratrol

SEM - *Scanning Electron Microscopy*

UFC - Unidades Formadoras de Colónias

WVTR - *Water Vapor Transmission Rate*



# Lista de Publicações e Comunicações

## Artigo

Ângela Silva, Andreia Duarte, Sónia Sousa, Ana Ramos, Fernanda Domingues - “Characterization and antimicrobial activity of cellulose derivatives films incorporated with a resveratrol inclusion complex” submetido à revista *Journal of Food Science and Technology* a 18/09/2015 (Manuscript number: JFST-D-15-01648).

## Comunicações em painel

9<sup>th</sup> World Congress on Polyphenols Applications, 3 a 5 de Junho de 2015, St. Julian’s, Malta, Ângela Silva, Andreia Duarte, Sónia Sousa, Fernanda Domingues - “Characterization and anti-*Campylobacter* activity of cellulose derivatives films incorporated with resveratrol”, Póster 26, Book of Abstracts pág. 115, ISBN: 978-2-35609-073-7;

5<sup>th</sup> MoniQA International Conference, Food and Health - Risks and Benefits, 16 a 18 de Setembro de 2015, Porto, Portugal, Andreia Duarte, Ângela Silva, Ângelo Luís, Mónica Oleastro, Fernanda Domingues - “*Coriandrum essential* oil and its major compound linalool to control the foodborne pathogen *Campylobacter* spp.”, Póster 49, Book of Abstracts pág. 182, ISBN: 978-3-9504109-0-7;

5<sup>th</sup> MoniQA International Conference, Food and Health - Risks and Benefits, 16 a 18 de Setembro de 2015, Porto, Portugal, Ângela Silva, Andreia Duarte, Sónia Sousa, Fernanda Domingues - “Characterization and antimicrobial activity of cellulose derivatives films incorporated with resveratrol inclusion complex”, Póster 51, Book of Abstracts pág. 184, ISBN: 978-3-9504109-0-7.



# Capítulo 1. Introdução Geral

Alguns produtos alimentares são perecíveis por natureza e como tal, durante a sua preparação, o seu armazenamento e a sua distribuição, exigem ser protegidos contra o processo de deterioração, de forma a manter o tempo de vida útil [1]. A procura de produtos minimamente processados, facilmente preparados assim como a globalização do comércio de alimentos conferem grandes desafios para a segurança e qualidade alimentar [1]. Os alimentos podem ser sujeitos a contaminações por microrganismos, podendo muitos deles desencadear reações indesejáveis, provocando alterações nas características organolépticas dos alimentos [1]. Assim, o crescimento microbiano é uma das maiores preocupações na indústria alimentar, pois algumas bactérias e fungos podem causar doenças [1]. Como tal, muitos estudos têm-se focado em patogéneos alimentares tais como: *Campylobacter*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens*, *Aspergillus niger* e *Saccharomyces cerevisiae* [1],[2]. Nos humanos, as bactérias *Campylobacter* spp. podem causar uma doença designada por campilobacteriose, a qual é uma infeção gastroentérica [3]. Nos países industrializados, *Campylobacter coli* (*C. coli*) e *Campylobacter jejuni* (*C. jejuni*) são os principais agentes infecciosos causadores de doença gastrointestinal [4]. Os casos clínicos de campilobacteriose têm excedido os casos de infeções provocadas por espécies de *Salmonella*, *Shigella* ou *Escherichia coli* enteropatogénica, e ainda com tendência crescente [4]. Em Portugal, a principal espécie que infeta os humanos é *C. jejuni*, no entanto a prevalência de *C. coli* é superior ao que é reportado nos países ocidentais [4]. Quando ingeridas, estas bactérias podem causar um quadro clínico descrito como diarreias inflamatórias, febre e dores abdominais [4]. No entanto, podem surgir complicações mais graves como septicémias, infeções extra-intestinais e sequelas neurológicas, como a síndrome de Guillain-Barré [4],[5]. A campilobacteriose pode ser severa em indivíduos imunocomprometidos, crianças e idosos [5]. De modo a minimizar as contaminações microbianas, a tecnologia alimentar tem procurado de forma crescente, alternativas inovadoras para cumprir tal objetivo [6]. As embalagens antimicrobianas são uma forma de embalagens ativas, as quais permitem a redução e inibição do crescimento de microrganismos que possam estar presentes nos alimentos ou no próprio material das embalagens [6].

## 1.1. *Campylobacter* spp.

*Campylobacter* spp. é um género de bactérias Gram-negativas, espirais, que apresentam flagelos unipolares ou bipolares, não formam esporos, são termófilas, tendo a capacidade de crescer entre 37 e 42°C [5], [7], [8]. Uma característica particular destas bactérias é o facto de serem microaerófilas, crescendo assim numa atmosfera que contenha aproximadamente 10% de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>), 5% de oxigénio (O<sub>2</sub>) e 85% de azoto (N<sub>2</sub>) [7], [5]. Estes microrganismos colonizam o intestino de animais domésticos e de quinta, tais como: ovelhas,

bovinos, suínos e aves, sendo estes últimos os principais reservatórios [9]. Por exemplo, no intestino de frangos de aviário o género *Campylobacter* spp. estabelece uma relação de comensalismo com o hospedeiro, o que resulta num elevado número de aves colonizadas [9]. Os fatores de virulência específicos deste género de bactérias ainda não foram claramente esclarecidos, provavelmente devido às semelhanças de patogénese que podem existir entre o género *Campylobacter* e outros patogéneos [5]. No entanto foram identificados alguns fatores de virulência tais como: a motilidade mediada por flagelos, a adesão bacteriana na mucosa intestinal, a capacidade invasiva e a capacidade de produzirem toxinas [5]. A formação de biofilmes e a resistência a antibióticos tornam estas bactérias ainda mais persistentes [3], [5]. A capacidade de formação de biofilmes é um modo bem caracterizado de crescimento e de sobrevivência bacteriana, em que as bactérias aderidas a superfícies e envolvidas pela matriz se encontram protegidas contra condições de stresse ambiental, como por exemplo, a radiação ultravioleta (UV) [10]. Uma característica particular dos biofilmes é a sua extrema resistência a agentes antimicrobianos (AM) e desinfetantes comparativamente com as células planctónicas [10]. Os fatores envolvidos na formação dos biofilmes por *Campylobacter* spp. ainda não são totalmente conhecidos, embora hajam estudos que demonstrem o papel dos flagelos e a regulação de genes que possam estar envolvidos [10]. A resistência aos antibióticos em *Campylobacter* está a emergir globalmente, sendo descrita por diversos autores e reconhecida pela Organização Mundial de Saúde (OMS) como um problema importante na saúde pública [5]. Diversos estudos que compararam a evolução do padrão de resistência deste género de bactérias a antibióticos, verificaram uma rápida evolução em isolados clínicos e estirpes isoladas de alimentos, tendo estas estirpes resistências aos principais antibióticos no tratamento de campilobacteriose [3], [5]. Como por exemplo, fluoroquinolonas, aminoglicósidos, tetraciclinas, beta-lactâmicos e macrólidos [3], [5].

### **1.1.1. Principais fontes de contaminação**

Devido à natureza microaerófila do microrganismo *Campylobacter* há pouca transmissão entre humanos, como tal esta infeção pode ser considerada uma zoonose dado que este microrganismo é comensal em animais para consumo humano [11]. Assim, nos humanos, a principal via de contaminação é o manuseamento, a preparação e o consumo de carne de aves contaminada, sobretudo a carne de frango [8], [4]. Por exemplo, durante o processo de abate de frangos de aviário, *C. jejuni* sobrevive nas carcaças destes animais onde a pressão de O<sub>2</sub> é baixa [11]. A carne de frango é dos alimentos mais consumidos na maioria dos países industrializados e em desenvolvimento, devido ao seu baixo custo [5]. Apesar de ser uma carne magra, é uma fonte de proteínas, rica em aminoácidos essenciais, e fonte de vitaminas e minerais [5]. Deste modo, nos últimos anos o número de casos de campilobacteriose tem vindo a aumentar [5]. Porém, existem outras fontes de contaminação, como o consumo de leite não pasteurizado, a carne vermelha e o contacto com animais domésticos [5]. A água

contaminada também pode ser outra fonte de contaminação devido à presença de fezes de animais ou humanos [9].

Contudo *Campylobacter* spp. é sensível a algumas condições ambientais, como humidades baixas, secagem, ao stresse de congelamento e descongelamento, ao O<sub>2</sub>, entre muitos outros, razão pela qual, de um modo geral, se deve concentrar nestes fatores para controlar estes microrganismos patogénicos [5]. Atualmente existem diversos métodos para diminuir a contaminação destas bactérias, tais como a desinfeção de caixas que são utilizadas durante o abate e o processamento da carne de frango, assim como a descontaminação dos materiais através do dióxido de cloro, ácidos orgânicos, fosfato trissódico, irradiação por luz UV, calor e por luz pulsada de elevada intensidade [12]. As embalagens ativas são uma tecnologia em rápido desenvolvimento que podem ser aplicadas nos alimentos, como a carne de frango, para controlar surtos infecciosos de origem alimentar [12].

## Capítulo 2. Embalagens Ativas

Numa perspetiva histórica, o Homem tem-se esforçado para desenvolver meios que possam proteger os alimentos naturais ou manufacturados contra a sua deterioração [13]. Assim, no progresso da produção e processamento dos alimentos surgiram as embalagens alimentares [13]. As embalagens tradicionais são destinadas a protegerem os alimentos de uma forma mecânica, assim como de fatores externos, como os microrganismos, o oxigénio, a luz, o calor, a humidade, entre muitos outros [14], [15]. No entanto, os materiais constituintes deste tipo de embalagens devem ser de natureza inerte e deverá ocorrer uma mínima interação entre os alimentos e as embalagens [15]. Durante décadas, as novas tecnologias na indústria alimentar, tentaram desenvolver embalagens em resposta às exigências dos consumidores ou às tendências da produção industrial, no sentido da preservação de produtos em conserva, frescos e saborosos, de forma a prolongar a sua qualidade [15]. Contudo, devido à globalização dos mercados, ao modo de vida dos consumidores, a procura de alimentos mais naturais e das preocupações ambientais, tem sido um desafio para a indústria alimentar o desenvolvimento de novos e melhores conceitos de embalagens [14], [15], [16]. Deste modo, de forma a cumprir tais princípios surgem as embalagens ativas, inteligentes e edíveis [16].

As embalagens ativas podem proporcionar uma melhor qualidade e segurança alimentar, assim como combater os problemas ecológicos [17]. O princípio básico das embalagens ativas baseia-se nas propriedades intrínsecas do polímero utilizado para o material da embalagem, ou da introdução de substâncias específicas no interior desse mesmo polímero [14]. As propriedades intrínsecas do polímero podem dar origem à função ativa ou então através da introdução de um composto ativo no interior da cadeia polimérica [14]. O agente ativo pode ser incorporado no interior do material da embalagem ou sobre a sua superfície, como por exemplo, em estruturas de multicamadas ou em elementos particulares das embalagens (por exemplo, saquetas e adesivos) [14]. Os agentes ativos que podem ser adicionados são diversos, tais como ácidos orgânicos, enzimas, bacteriocinas, fungicidas, extratos naturais, iões, entre muitos outros [14]. Assim como os materiais em que estes são incorporados, os quais podem ser: papéis, plásticos, metais ou a combinação entre estes materiais [14]. Dependendo do objetivo de aplicação, estas embalagens podem fornecer diferentes soluções, isto é, se o produto alimentar tem uma maior suscetibilidade ao processo de oxidação, então a embalagem deve ser incorporada com um agente absorvente de  $O_2$  ou um agente antioxidante [18]. Se a deterioração do alimento é provocada pela humidade ou por condensação, a embalagem deve ser incorporada com um agente absorvente de humidade [18]. Desta forma, este tipo de embalagens é um veículo de compostos ativos a fim de manterem a elevada concentração dos agentes conservantes na superfície dos alimentos [19].

Contudo, devido à possível interação que estas embalagens podem ter com os alimentos, foi necessário avaliar a sua segurança, comparativamente com as embalagens tradicionais [15]. Ou seja, a migração dos compostos ativos para os alimentos, a utilização incorreta das embalagens devido à insuficiente rotulagem, a operação não eficaz das embalagens, entre outros [15]. Alguns exemplos de aplicação de embalagens ativas para uso na indústria alimentar encontram-se enumerados na tabela 1.

Como tal, o Regulamento da União Europeia 1935/2004 e o Regulamento 450/2009/EC descrevem a possibilidade das embalagens ativas serem utilizadas na Europa [15],[18]. As definições estabelecidas nestes regulamentos consideram os materiais e os objetos ativos: “materiais e objetos que se aplicam para alargar o prazo de validade ou manter/melhorar o estado dos alimentos embalados” [15]. Deste modo, estes são idealizados de forma a incorporarem ou libertarem substâncias para os alimentos, ou então para o ambiente que os envolvem [15].

**Tabela 1:** Exemplos de aplicação de embalagens ativas para uso na indústria alimentar (Adaptada de [15]).

Propriedades de absorção	O <sub>2</sub> , CO <sub>2</sub> , humidade, etileno, aromas, impurezas e luz UV
Propriedades de libertação	Etanol, CO <sub>2</sub> , antioxidantes, conservantes, dióxido de enxofre, aromas e pesticidas
Propriedades de remoção	Catalisador de remoção de componentes alimentares: lactose e colesterol
Controlo da temperatura	Materiais isolantes, embalagens de auto-arrefecimento e de auto-aquecimento, embalagens sensíveis à temperatura
Controlo microbiano	Luz UV e materiais de embalagem com a superfície tratada

## 2.1. Embalagens antimicrobianas

O crescimento microbiano é a principal fonte de deterioração dos alimentos, o que gera uma grande preocupação devido ao facto de diversos microrganismos serem potencialmente patogénicos [1], [20]. A composição dos alimentos pode determinar o crescimento e a proliferação dos microrganismos, pois estes requerem água, fontes de carbono (como açúcares e álcoois), fontes de azoto (como os aminoácidos), vitaminas do complexo B,

minerais, entre muitos outros [13]. No entanto, parâmetros extrínsecos como o pH, a humidade, a temperatura e a atmosfera gasosa também podem influenciar o crescimento microbiano [13]. Portanto, de forma a inibir o crescimento de patógenos alimentares surge o sistema de embalagens antimicrobianas, as quais são um dos tipos de embalagens ativas [21]. Assim como são uma tecnologia alternativa aos processos não térmicos, que não impedem o crescimento dos microrganismos resistentes ao calor e aos seus esporos [20]. Nesta tecnologia, no sistema das embalagens ou até mesmo nos polímeros utilizados para a sua formação, são incorporados agentes AM de origem natural ou sintética [20], [21]. Deste modo, quando os sistemas de embalagem possuem atividade antimicrobiana limitam ou previnem o crescimento de microrganismos, estendendo a fase *lag* e reduzindo a taxa de crescimento, ou diminuindo a contagem de microrganismos viáveis [20], [22].

A escolha do agente AM a ser incorporado na matriz das embalagens depende de alguns fatores, tais como: o microrganismo alvo; a eficácia deste contra esse microrganismo e das possíveis interações entre o agente AM; o polímero formador do filme; e outros componentes presentes nos alimentos [16]. Estes fatores são bastante relevantes para o desenvolvimento de filmes, pois estas interações podem modificar a atividade antimicrobiana e as características dos filmes [16]. Nas embalagens alimentares de plástico, têm sido incorporados diferentes agentes AM de origem sintética, como por exemplo, ácidos orgânicos e inorgânicos, metais, álcoois, compostos de amónio ou aminas, entre outros [12]. Contudo, as restrições impostas pelas agências reguladoras e pela indústria alimentar à utilização de aditivos alimentares de origem sintética, e o facto de os agentes AM de origem natural terem uma melhor aceitação por parte dos consumidores, a incorporação destes agentes em embalagens alimentares tem sido cada vez maior [20]. Os agentes AM naturais incorporados em embalagens antimicrobianas mais descritos são: ácidos orgânicos (acético, láctico, málico e cítrico); óleos essenciais (tomilho, alecrim, sálvia, cravo-da-índia, orégãos, manjerição e cássia) assim como os seus componentes maioritários (eugenol, linalool, timol e geraniol); enzimas obtidas a partir de fontes animais (lisozima e lactoferrina); bacteriocinas (nisina, natamicina e pediocina); polímeros com atividade antimicrobiana (como por exemplo, o quitosano); e por fim os compostos fenólicos [1], [16], [23]. Alguns exemplos de agentes AM utilizados em sistemas de embalagens alimentares encontram-se descritos na tabela 2.

**Tabela 2:** Exemplos de agentes AM utilizados em sistemas de embalagens alimentares (Adaptada de [21]).

Antimicrobianos		Materiais de embalagens	Alimentos	Microrganismos
Ácidos orgânicos	Ácido benzóico	PE LDPE	Simulante de Filetes de Tilápia	Teste de migração de bactérias totais
	Sorbatos	LDPE MC/quitosano Amido/glicerol	Meio de cultura de queijo; peito de frango	Leveduras, ensaio de migração de bolores, ensaio de migração.
	Anidrido sórbico	PE	Meio de cultura	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>bolores</i>
Enzimas	Lisozima, Nisina, EDTA	SPI, zeína	Meio de cultura	<i>Escherichia coli</i> , <i>Lactobacillus plantarum</i>
	Lisozima imobilizada	PVOH, nylon, AC	Meio de cultura	Teste da atividade da lisozima
Bacteriocinas	Nisina	PE HPMC	Meio de cultura de bife	<i>Brocothrix thermospacta</i> , <i>Staphylococcus aureus</i>
	Ácido láurico	Zeína	Simulantes	Ensaio de migração
Fungicidas	Benomyl	Ionómero	Meio de cultura	Bolores
	Imazalil	LDPE PE	Queijo	
Polímeros	Quitosano	Quitosano/papel	Morangos	<i>E. coli</i>
	Quitosano/Extrato de erva	LDPE	Meio de cultura	<i>E. coli</i> , <i>Lb. plantarum</i> , <i>Fusarium oxysporum</i> , <i>S. cerevisiae</i>
	UV/nylon irradiado por laser	Nylon	Meio de cultura	<i>Enterococcus faecalis</i> , <i>S. aureus</i>
Extratos naturais	Extratos de sementes de uva	LDPE/nylon	Carne moída	Aeróbios, coliformes
	Extrato de cravinho	LDPE	Meio de cultura	<i>E. coli</i> , <i>Lb. plantarum</i> , <i>Fusarium oxysporum</i> , <i>S. cerevisiae</i>
	Eugenol/Cinamaldeído	Quitosano	Presunto	<i>Enterobacter</i> , bactérias lácticas, <i>Lb. sakei Serratia spp.</i>
	Extrato de rábano	Papel	Carne moída	<i>E. coli</i>
Óleos essenciais	Óleo essencial de cravinho	Cravinho e citronela	Filmes para embalagens alimentares	<i>Aspergillus niger</i> , <i>Bacillus coagulans</i> , <i>Bacillus cereus</i>

PE - polietileno; HDPE - polietileno de alta densidade; LDPE - polietileno de baixa densidade; AC - acetato de celulose; HPMC - hidroxipropilmetilcelulose; MC - metilcelulose;

A incorporação de compostos fenólicos nas embalagens ativas apresenta um elevado potencial de atividade antimicrobiana e antioxidante nos alimentos, tendo sido já demonstrada a eficácia deste tipo de compostos em *C. jejuni* [12]. Por exemplo, no estudo desenvolvido por Alkan *et al.* foram desenvolvidos filmes de zeína com incorporação de diferentes concentrações de ácido gálico, contra diferentes estirpes de *C. jejuni* [12]. Neste estudo, concluiu-se que os filmes foram eficazes nas estirpes testadas, dependendo contudo das concentrações utilizadas [12]. Outra evidência experimental foi o trabalho desenvolvido por Klančnik *et al.*, no qual a eficácia de diferentes extratos de plantas e de compostos fenólicos foi testada, nomeadamente o ácido carnósico e rosmarínico, em diferentes bactérias [24]. Estes autores concluíram, que entre as bactérias testadas a mais sensível aos compostos fenólicos foi *C. jejuni* [24]. Por fim, o estudo de Giteru *et al.* demonstrou a eficácia de filmes com incorporação de quercetina (composto fenólico) e óleo essencial de citral contra *C. jejuni*, *L. monocytogenes* e *Pseudomonas fluorescens* [25]. De acordo com os resultados destes estudos, existe um elevado potencial do uso de compostos fenólicos em materiais de embalagens antimicrobianas contra *Campylobacter* [12], [25].

### 2.1.1. Propriedades antimicrobianas do resveratrol

O resveratrol (RV), 3,4',5-trihidroxiestilbeno, é um composto fenólico de origem natural, que pode ser encontrado em diversas bebidas e alimentos, tais como o vinho tinto, as uvas, as amoras, os amendoins, o chocolate, entre muitos outros [26], [27]. No entanto, este composto ficou inicialmente conhecido pela sua extração a partir de raízes secas de *Polygonum cuspidatum*, planta que é utilizada para a preparação do chá de *Itadori*, o qual é tradicionalmente utilizado na China e no Japão, como um ingrediente ativo para o tratamento de infeções fúngicas, reações inflamatórias, alergias, hipertensão e dislipidémias [28]. O RV existe sob a forma de dois isómeros, o *trans*-RV (figura 1) e o *cis*-RV, sendo o *trans*-RV a sua forma biologicamente ativa [29], [30]. Relativamente às suas propriedades físico-químicas, o RV é um composto fotossensível, pouco solúvel em água e em lípidos, mas solúvel em álcoois [31] [32]. Por exemplo, em etanol é solúvel até 50 mg/mL e em dimetilsulfóxido (DMSO) até 16 mg/mL enquanto em água apenas é solúvel de 0,021 - 0,030 mg/mL [32]. Também é bastante reativo, sendo muito suscetível a reações com o oxigénio dissolvido, onde se formam diversos produtos de degradação [31]. Porém, este composto tem vindo a ser extensivamente estudado devido ao seu largo espetro de atividade biológica na saúde humana, assim como as suas propriedades antioxidantes, pois pode prevenir doenças cardiovasculares, neuronais, diabetes ou até mesmo inibir a carcinogénese [33]-[36].

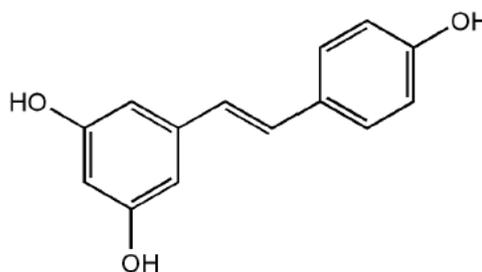


Figura 1: Estrutura química do *trans*-RV [34].

Para além da sua atividade antioxidante também possui atividade antimicrobiana, protegendo as plantas quando estas são atacadas por diversos microrganismos [33]. Nos últimos anos, diversos estudos têm demonstrado a atividade do RV no controlo de infeções de origem fúngica, bacteriana e virais [36]. Ao nível bacteriano foi evidenciada a atividade bacteriostática contra bactérias Gram-positivas, como por exemplo, em *S. aureus* [27]. O estudo realizado por Selma *et al.* constatou que o RV pode ter a capacidade de inibir a adesão e a síntese de citocinas em células epiteliais do intestino, aquando da adesão de agentes patogénicos de origem alimentar, como *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* e *Listeria monocytogenes* [37]. Razão pela qual este composto apresenta um elevado potencial na prevenção de infeções de origem alimentar [37]. Por outro lado, o estudo realizado por Ferreira *et al.* comprovou que este composto apresenta atividade bactericida contra *Arcobacter butzleri* e *Arcobacter cryaerophilus*, o qual pode atuar através de diferentes mecanismos de ação [38]. Também foi descrita a atividade antimicrobiana deste composto em diferentes estirpes de *Helicobacter pylori*, pois poderá inibir a atividade de urease limitando assim a sobrevivência destas bactérias no estômago [39]. Por sua vez, também foi demonstrada a ação de oligómeros de RV na inibição de biofilmes de *E. coli* O157:H7 e *Pseudomonas aeruginosa* [40]. A nível das propriedades antifúngicas do RV foi descrito que este composto inibe o crescimento de fungos filamentosos, assim como tem efeito fungicida em *Candida albicans* [41]. Similarmente foi constatado que o RV apresenta um elevado potencial para funcionar como um agente antifúngico contra infeções sistémicas [41], [28]. Outros estudos também demonstraram que o RV apresentava atividade antimicrobiana contra bactérias como *S. aureus*, *Enterococcus faecalis*, e *Pseudomonas aeruginosa* e fungos como *Mentagrophytes*, *Trichophyton tonsurans*, *Trichophyton rubrum*, *Epidermophyton floccosum* e *Microsporum gypseum* [28]. O RV também pode afetar uma grande variedade de vírus, como por exemplo, a família *Herpesviridae*, HIV-1, vírus *influenza*, entre outros [36].

Deste modo, o RV apresenta um elevado potencial no controlo de diversos microrganismos patogénicos devido às suas propriedades antimicrobianas [42]. Nesse sentido e como ainda apresenta fortes propriedades antioxidantes, pode ser um potencial composto a utilizar na prevenção da contaminação e deterioração dos alimentos [42].

No entanto, para a aplicação do RV na indústria alimentar têm que ainda ser ultrapassados alguns problemas, como a sua baixa solubilidade em meio aquoso e a sua baixa estabilidade [43]. Uma das soluções encontrada foi a sua complexação com ciclodextrinas [32], [43]-[45]. As ciclodextrinas (CDs) são oligossacáridos em forma cíclica que derivam do amido, os quais são constituídos por seis ( $\alpha$ -CD), sete ( $\beta$ -CD), oito ( $\gamma$ -CD) ou mais resíduos de glucose unidos por ligações glicosídicas  $\alpha(1-4)$ , tal como se visualiza na figura 2 [44], [46]. Outra particularidade destas moléculas é o facto de apresentarem na sua estrutura grupos hidroxilo, os quais permitem a ligação a diferentes compostos [43], [47]. Assim, o arranjo estereoquímico das unidades de glucose que formam estes oligossacáridos, resulta numa

cavidade interna hidrofóbica e numa cavidade externa hidrofílica (figura 3) [48]. Por este motivo as CDs podem ser consideradas como cápsulas vazias, as quais podem incluir diversas moléculas, formando deste modo complexos de inclusão com essas moléculas e aumentando-lhes a biodisponibilidade [43], [44]. Uma vez que as CDs de origem natural, principalmente a  $\beta$ -CD, apresentam solubilidade limitada em meio aquoso, estes compostos são modificados quimicamente, como por exemplo, os derivados de hidroxipropilo da  $\beta$ -CD e  $\gamma$ -CD (HP- $\beta$ -CD e HP- $\gamma$ -CD) tal como muitos outros [43], [45].

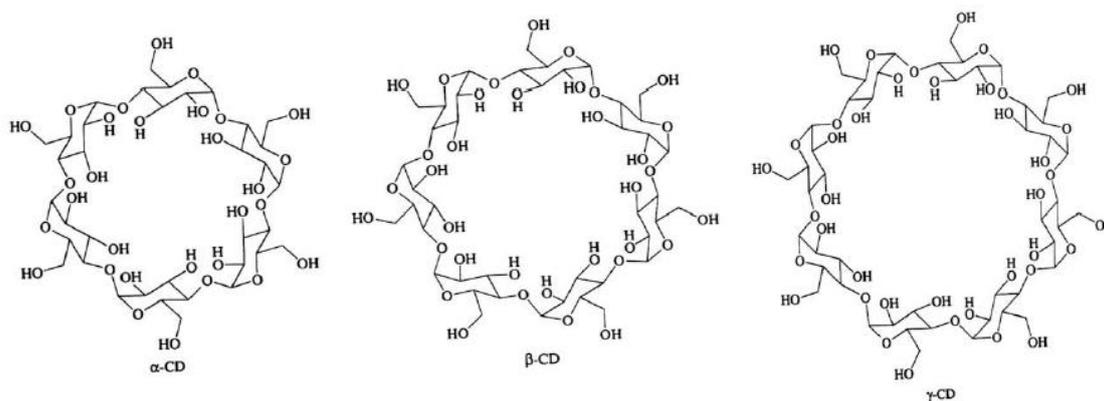


Figura 2: Estrutura química de  $\alpha$ -CDs,  $\beta$ -CDs e  $\gamma$ -CDs [46].

Na indústria alimentar, estes compostos têm vindo a ser aplicados com diferentes fins e são reconhecidos como seguros pela *Food and Drug Administration* (FDA) nos Estados Unidos da América [46], [49]. As CDs na indústria alimentar podem ter funções como aditivos alimentares, retenção de compostos indesejados, evitar contaminações microbiológicas, estabilizantes de aromas e podem permitir uma libertação controlada de determinados constituintes alimentares [46], [50]. Os estudos sobre a complexação de CDs com o RV demonstraram que estas moléculas têm a capacidade de aumentar de forma significativa a solubilidade aquosa do RV, melhoram e mantêm a atividade antioxidante do composto e ainda protegem o RV dos fatores ambientais externos, tais como a temperatura, a luz e o pH [49]. Deste modo, o RV complexado com as CDs pode ser aplicado na indústria alimentar [49].

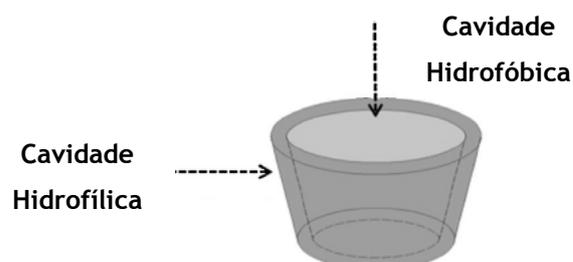


Figura 3: Representação ilustrativa da cavidade interna e externa das CDs (Adaptada de [48]).

## 2.2. Filmes antimicrobianos

A incorporação direta dos agentes AM na superfície dos alimentos pode apresentar algumas desvantagens, pois as substâncias ativas podem ser neutralizadas ao entrarem em contacto com o alimento, ou então difundirem-se rapidamente da superfície para o interior do alimento [51]. Por outro lado, a incorporação de agentes bactericidas ou bacteriostáticos em formulações de alimentos, como por exemplo a carne, pode resultar numa inativação parcial desses agentes pelos constituintes dos alimentos, e como tal pode ter apenas um efeito limitado na microflora presente na superfície do produto [51]. Assim, a utilização de filmes como embalagens pode ser mais eficiente, pois os agentes AM podem migrar lentamente a partir do material das embalagens para a superfície do alimento, ajudando assim a manter as concentrações elevadas em que estes são necessários [51].

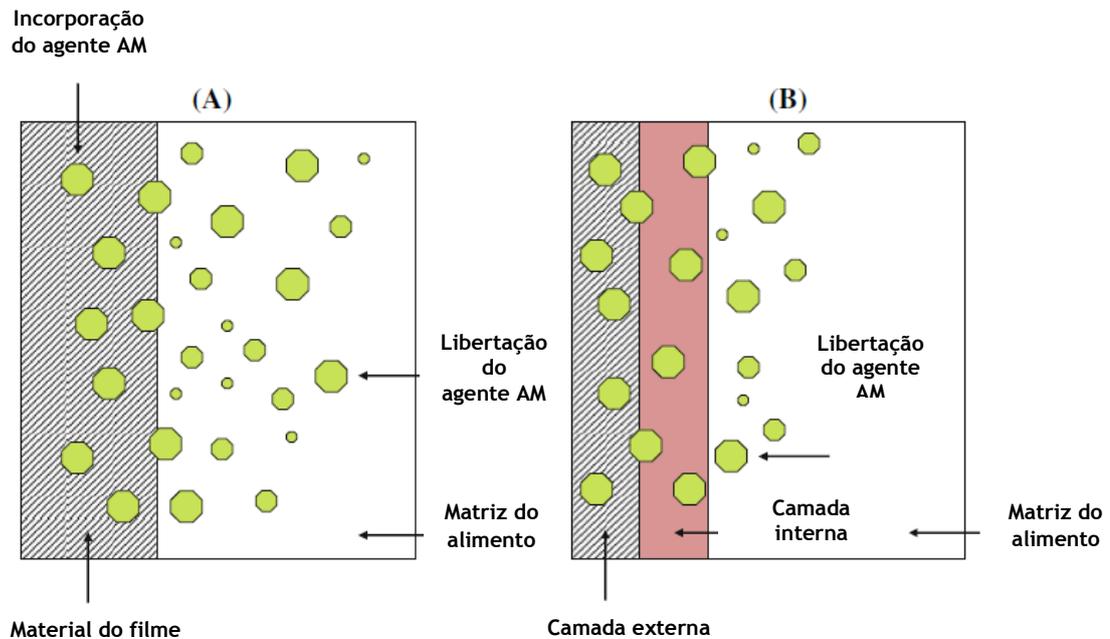
### 2.2.1. Definição e tipo de filmes antimicrobianos

Um filme pode ser definido como uma película que é formada pela secagem da solução do polímero preparada separadamente do alimento, que posteriormente é aplicado [22]. Os filmes podem ser formados por diferentes polímeros, nos quais podem ser incorporados diversos compostos AM [52].

Os filmes utilizados como embalagens antimicrobianas podem ser divididos em dois grupos:

1. Filmes que permitem a libertação do agente AM;
2. Filmes que não libertam os compostos AM mas que inibem o crescimento microbiano à superfície do alimento [52].

No primeiro grupo, o agente AM encontra-se no interior da matriz ou na superfície do material do filme que pode ser aplicado nos alimentos, podendo ser libertado totalmente ou então numa quantidade específica para a superfície dos alimentos, de forma a atuar como um agente biocida [52]. A figura 4 representa esquematicamente este tipo de filmes, em que em (A) o sistema do filme incorpora o agente AM numa única camada, e este vai-se libertando gradualmente para o interior da matriz do alimento; em (B) o sistema do filme possui duas camadas, cuja camada interior pode ser útil para controlar a libertação do agente AM [52]. Relativamente ao segundo grupo, a atividade antimicrobiana apenas ocorre quando os microrganismos entram em contacto com a superfície do material do filme [52]. Porém, para ambos os tipos de sistemas é essencial o contacto direto com o alimento [52]. Assim, esta tecnologia pode ser uma opção adequada para alimentos embalados a vácuo como: o queijo, a carne, o peixe ou as aves domésticas [52].



**Figura 4:** Sistemas de filmes que podem ser aplicados na indústria alimentar (Adaptada de [52]).

Diversos fatores devem ser considerados durante o desenvolvimento de filmes AM, pois a seleção do polímero assim como o agente AM podem influenciar as propriedades do filme AM resultante [2], [23]. Estes englobam: o tipo e as propriedades do polímero; as características do agente AM (polaridade, compatibilidade com o polímero e carga iônica); a estabilidade do agente AM ao calor durante o processamento; temperatura de armazenamento do filme; difusão do composto AM e alteração das propriedades físicas do filme [2], [23]. A incorporação dos agentes AM nos filmes poderá afetar as propriedades físicas, mecânicas e de processamento [2]. Por exemplo, quando um agente AM polar é incorporado num polímero apolar pode condicionar as propriedades físicas e mecânicas do filme resultante [2]. Mas se o agente AM é compatível com o polímero, nesse caso estas propriedades são minimamente afetadas [2]. A carga iônica do agente AM também é importante, pois poderá influenciar a sua difusão da matriz polimérica do filme [23]. Assim, a escolha do agente AM muitas vezes é restrita, devido à incompatibilidade deste com o polímero do filme ou pela sua instabilidade térmica durante o processo de extrusão [23].

A temperatura de armazenamento e a temperatura durante a preparação de filmes pode influenciar a atividade antimicrobiana dos compostos ativos a incorporar nos filmes [23]. Normalmente, o aumento da temperatura pode aumentar a migração dos agentes ativos incorporados no filme e deteriorar a ação protetora dos filmes AM, devido às elevadas taxas de difusão [23]. Contudo, a taxa de difusão do agente AM e da sua concentração nos filmes deverá ser tal, de forma a garantir a sua eficácia durante o tempo de conservação do alimento [23]. De salientar, que as condições de temperatura durante a preparação de filmes, deverão ser previstas de forma a minimizar o seu efeito sobre a atividade antimicrobiana dos

compostos ativos [23]. Os componentes constituintes dos alimentos também podem influenciar a eficiência e a difusão dos agentes AM, assim como as próprias características físico-químicas [23]. Por exemplo, o pH de um produto pode alterar a taxa de crescimento dos microrganismos alvo, podendo assim alterar o grau de ionização (dissociação/associação) destes agentes ativos [23]. Todavia, os alimentos apresentam características químicas diferentes de modo que são conservados em diferentes condições, o que pode provocar padrões de crescimento da microflora distintos [23]. Além disto, a atividade antimicrobiana e a estabilidade do agente AM poderão ser influenciadas pela atividade da água ( $a_w$ ) dos próprios alimentos, não desprezando o facto de cada alimento possuir a sua própria microflora [23]. Assim, quando se pretende desenvolver um filme com incorporação de um agente AM, a cinética de libertação dos agentes AM deverá ser de tal forma, a preservar a concentração acima da concentração inibitória do microrganismo alvo [23].

### 2.2.2. Biopolímeros utilizados na preparação de filmes

Os filmes preparados a partir de materiais sintéticos como os plásticos, por exemplo os poliésteres, as poliamidas, entre muitos outros, têm provocado sérios problemas a nível ecológico [2]. Por este motivo os filmes preparados a partir de materiais biodegradáveis têm tido uma maior procura [2]. Os biopolímeros podem ser divididos em diferentes grupos de acordo com a origem das matérias-primas e da sua produção, tal como se encontra ilustrado na figura 5 [53].

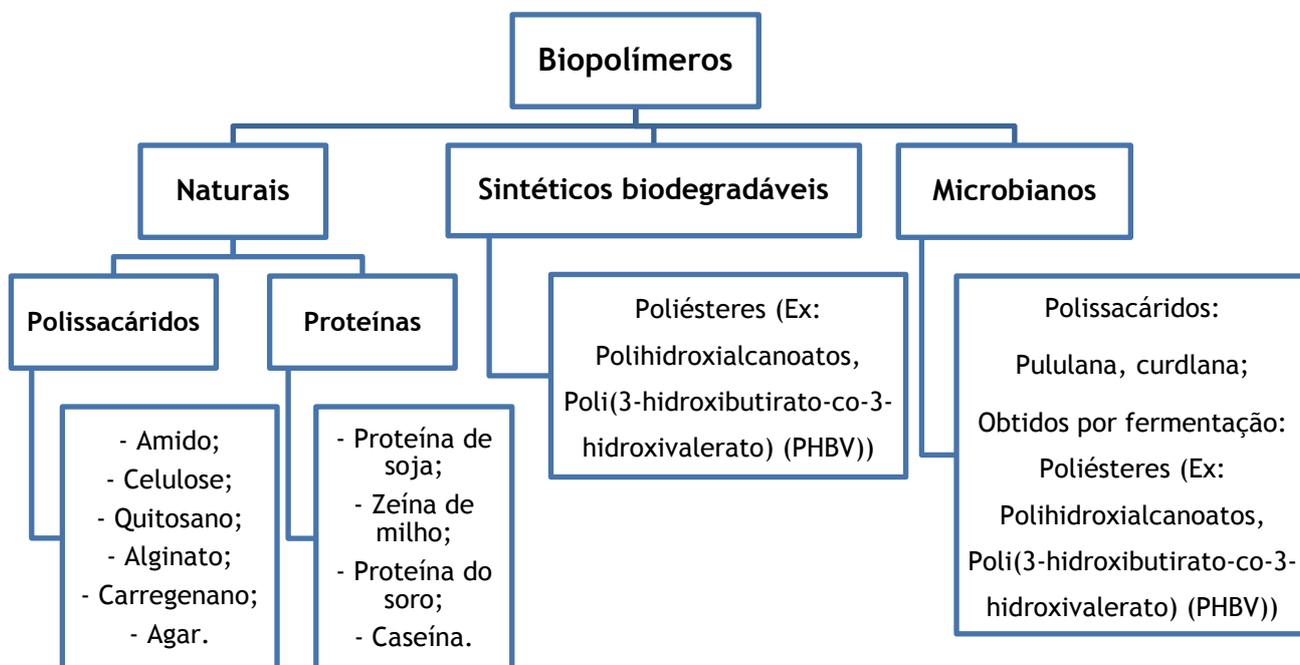
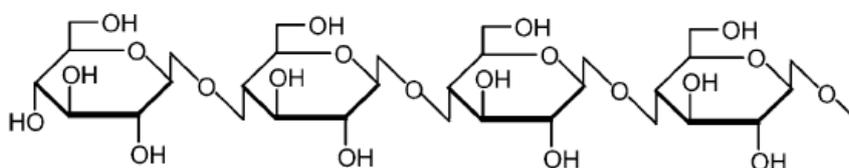


Figura 5: Biopolímeros (Adaptada de [53]).

Os filmes preparados a partir de polissacáridos são os de maior interesse para sistemas de embalagens antimicrobianas, contudo materiais como proteínas, lípidos e resinas também são estudados [2], [22]. Os polissacáridos são polímeros naturais que dependendo da sua origem podem ter carga neutra ou então ter carga iônica [22]. Estes encontram-se envolvidos no metabolismo energético das plantas (o amido) e dos animais (o glicogênio), como também atuam na função estrutural das células vegetais (por exemplo, a celulose e a pectina) e de animais, como no exoesqueleto de artrópodes e de outros animais (a quitina) [22]. A biodegradabilidade destes materiais não é a única vantagem, pois apresentam também baixo-custo e solubilidade em água [54]. Como tal, não requerem o uso de solventes orgânicos durante a sua preparação [54]. Os filmes de polissacáridos caracterizam-se por serem uma boa barreira aos gases ( $\text{CO}_2$  e  $\text{O}_2$ ), uma fraca barreira ao vapor de água e apresentam baixas propriedades mecânicas, comparativamente aos filmes preparados a partir de polímeros sintéticos [2], [22].

### 2.2.2.1. Celulose e derivados

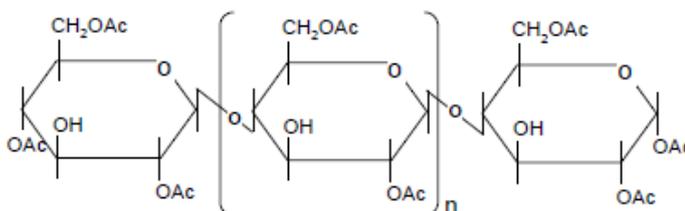
A celulose (figura 6) é o polissacárido mais abundante, tendo este uma função estrutural na parede celular das plantas [16], [54]. É constituída por cadeias lineares de unidades de D-glucose unidas por ligações glicosídicas  $\beta(1\rightarrow4)$  [16], [54]. Este polímero é frequentemente modificado obtendo-se diferentes derivados, pois é altamente cristalino, insolúvel e apresenta um elevado peso molecular [54], [55]. Os derivados de celulose como os ésteres de celulose (por exemplo, acetato de celulose) e os éteres de celulose (por exemplo, metilcelulose, hidroxietilcelulose, carboximetilcelulose, hidroxipropilmetilcelulose, entre outros) são uma importante fonte de biomateriais na área alimentar [56]. Em geral, os filmes preparados a partir de derivados de celulose caracterizam-se por serem flexíveis, transparentes, resistentes, permeáveis ao vapor de água mas resistentes ao  $\text{O}_2$ ,  $\text{CO}_2$  e lípidos [16], [22].



**Figura 6:** Estrutura química da celulose (Adaptada [57]).

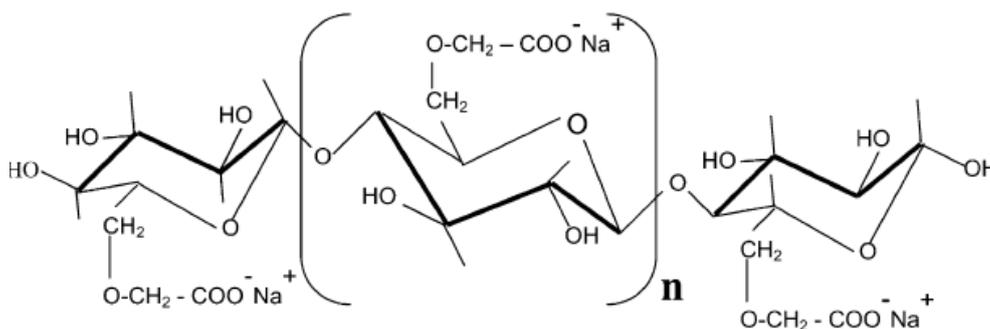
Acetato de celulose (AC) é um termo genérico para diferentes ésteres de acetato de celulose, na figura 7 está representada a estrutura química do diacetato de celulose [56]. Esta foi a matéria-prima utilizada para a produção das primeiras fibras sintéticas comerciais [56]. Relativamente à sua solubilidade difere dos outros derivados de celulose, pois é solúvel em solventes orgânicos tais como a acetona, o dioxano, o diclorometano e o ácido acético [58].

No entanto, a sua solubilidade depende maioritariamente do grau de substituição [58]. É um polímero atóxico, não irritável, apresenta boas propriedades físicas, resistência a microrganismos e baixo custo. Razões pelas quais tem inúmeras aplicações na indústria farmacêutica e alimentar, sendo amplamente utilizado em embalagens alimentares sob a forma de filmes rígidos [56], [59].



**Figura 7:** Estrutura química do diacetato de celulose [56].

A carboximetilcelulose (CMC), figura 8, é um éter de celulose de carga aniônica, que resulta da substituição de alguns grupos hidroxilo das unidades de glucose presentes na celulose, por grupos carboximeto [56], [57]. Apresenta boas características para a formação de filmes, pois é solúvel em água, dissolvendo-se facilmente em água fria, e apresenta elevada viscosidade [56]. Por ser atóxica, biocompatível, biodegradável, hidrofílica e ter uma boa capacidade de formação de filmes, tem diversas aplicações nas indústrias alimentar, farmacêutica, papelreira e têxtil. Por exemplo, na indústria alimentar é utilizada como estabilizante e aditivo, de forma a melhorar os produtos e o seu processamento [60]. A CMC é dos derivados de celulose que não apresenta efeitos nocivos para a saúde humana [59].



**Figura 8:** Estrutura química da carboximetilcelulose [57].

A hidroxietilcelulose (HEC), figura 9, é um éter de celulose, não iônico e solúvel em água [61]. Dissolve-se facilmente em água fria e água quente, e pode ser utilizado para a preparação de soluções com uma ampla gama de viscosidades, razão pela qual tem a capacidade de formar filmes [62]. Estes caracterizam-se por apresentarem resistência moderada, excelente flexibilidade e transparência [62]. Para além da produção de filmes, este polímero apresenta diversas aplicações, tais como espessante, estabilizante,

emulsionante e dispersante, tendo também a capacidade de reter água. Na indústria é o espessante mais utilizado em tintas látex [61].

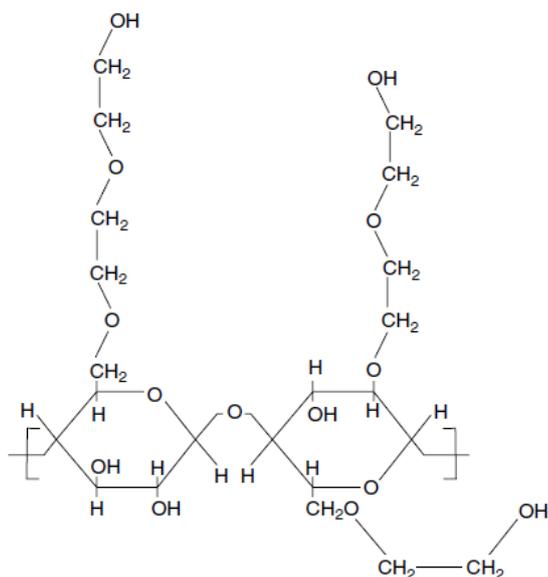


Figura 9: Estrutura química da hidroxiethylcelulose [61].

### 2.2.3. Preparação de filmes antimicrobianos

As principais técnicas utilizadas na preparação de filmes AM biodegradáveis são semelhantes às utilizadas na preparação de plásticos sintéticos e compreendem métodos de processamento a húmido e a seco [2]. O método de processamento a húmido consiste na evaporação do solvente; esta técnica é a mais utilizada à escala laboratorial para a preparação deste tipo de filmes [2]. As técnicas de processamento a seco englobam os métodos de compressão e de extrusão dos biopolímeros, os quais foram modificados de forma a tornarem-se termoplásticos [2].

A água, o etanol ou a combinação de ambos são os principais solventes utilizados na preparação de filmes [16]. Durante o processo de secagem dos filmes o controlo da temperatura é um fator importante, pois elevadas temperaturas aumentam a evaporação do solvente, produzindo assim uma estrutura não suficientemente contínua e coesiva [16]. Após a seleção dos polímeros e o método de preparação a usar há ainda outros componentes que têm que ser adicionados para a preparação dos filmes nomeadamente plastificantes, lípidos e surfatantes [22].

Na maioria dos casos, para a formação de filmes com base em polissacáridos é necessária a presença de plastificantes [22]. Os plastificantes são agentes de baixo peso molecular que quando incorporados num filme polimérico, se posicionam entre as moléculas do polímero [22]. Deste modo, os plastificantes interferem nas interações polímero-polímero originando

filmes mais flexíveis e conseqüentemente melhoram o seu manuseamento [22]. No caso dos filmes de polissacáridos não incluem na sua constituição um plastificante, tornam-se duros e quebradiços, podendo apresentar microfissuras, o que provoca o aumento da permeabilidade ao vapor de água [22]. Contudo, a adição de plastificantes pode conferir desvantagens, pois devido à sua estrutura hidrofílica promovem uma maior afinidade dos filmes à água, aumentando desta forma a permeabilidade ao vapor de água [22]. Diversos estudos demonstraram a aplicação de plastificantes biodegradáveis em filmes de polímeros naturais tais como: polióis (como o glicerol, sorbitol, manitol e o polietilenoglicol (PEG)), ácidos gordos (como o ácido cítrico, oleico, málico e linoleico), lecitinas, monossacáridos (como a glucose, manose, frutose e sacarose) e ceras [63]. No entanto a água também pode atuar como um plastificante, sendo a humidade relativa (HR) um dos parâmetros mais analisados, pois este influencia a estrutura dos filmes [19], [22]. Contudo, em filmes de biopolímeros o glicerol é o plastificante mais utilizado, devido à sua melhor estabilidade e compatibilidade com as cadeias dos biopolímeros hidrofílicos, comparativamente com outros plastificantes [16], [63].

As propriedades hidrofílicas dos filmes de polissacáridos são uma das suas maiores desvantagens, pois apresentam elevada permeabilidade ao vapor de água, o que de certo modo pode ser uma possível origem de contaminação microbiana [22]. Como tal, de modo a diminuir a permeabilidade ao vapor de água, poderão ser adicionados lípidos, de forma a utilizar as suas características hidrofóbicas [22], [64]. Vários são os tipos de lípidos adicionados: ácidos gordos, ceras e resinas [65].

Os surfatantes ou emulsionantes são agentes de atividade superficial de natureza anfipática, devido às suas propriedades simultâneas de hidrofobicidade e hidrofílicidade, os quais são adicionados de forma a aumentar a estabilidade da emulsão na formulação dos filmes [22], [64]. Os mais utilizados na preparação de filmes são: os polisorbatos (Tween), lecitinas, glicerol, ácidos gordos, ésteres de ácidos gordos, monoestearato de etilenoglicol, monoestearato de glicerol e ésteres de sacarose [64].

#### **2.2.4. Tipos de filmes antimicrobianos**

Há vários tipos de filmes antimicrobianos, filmes em monocamada ou multicamada [23], [66] [67]. Os filmes em monocamada permitem a libertação do agente AM para o alimento por difusão, o que poderá ser uma desvantagem, porque a libertação rápida resulta no consumo rápido do agente AM num curto período de tempo, e por isso a concentração mínima requerida para a inibição do crescimento microbiano não é mantida na superfície do alimento [66]. Com o intuito de otimizar a libertação do agente AM, os filmes em multicamada poderão ser a melhor alternativa, pois a utilização de embalagens com diferentes camadas apresentam a vantagem do agente AM ser incorporado numa camada fina, cuja libertação é controlada de acordo com a espessura do filme [23], [67]. Por outro lado, se a libertação for

demasiado lenta, podem iniciar-se as reações de deterioração na superfície do alimento [66]. Também há, no entanto, situações em que a produção de filmes não pode ser realizada a partir de um único polímero, pois existem polímeros que apresentam propriedades vantajosas para um determinado requisito, mas podem possuir outras propriedades desfavoráveis [68]. Deste modo, a indústria alimentar requer filmes em multicamada, de forma a combinar as vantagens de cada polímero num único filme e assim compensar as suas desvantagens individuais [23] [68].

Têm sido desenvolvidos filmes AM em multicamada de forma a poderem ser aplicados como embalagens alimentares [67]. Por exemplo, Guiga *et al.* 2010 propuseram um filme AM em multicamada, constituído por três camadas baseadas em derivados de celulose: etilcelulose (EC) como camada externa e hidroxipropilmetilcelulose (HPMC) como camada interna; a lecitina de soja foi utilizada como agente ativo de superfície, o que permitiu a coesão entre as camadas hidrofílica (HPMC) e hidrofóbica (EC), e como agente AM foi usada a nisina [67]. Neste estudo, verificou-se que o filme apresentava propriedades mecânicas, óticas e antimicrobianas satisfatórias, por sua vez, este filme foi eficaz na libertação controlada do agente AM [67]. Outro exemplo foi o de Uz *et al.* 2011 em que desenvolveram filmes em mono e multicamada de AC, com incorporação de sorbato de potássio como agente AM [66]. Concluiu-se que a taxa de libertação do agente AM diminuiu com o aumento do teor de AC, isto é, comparativamente com os resultados dos filmes em monocamada, os filmes em multicamada permitiram a libertação controlada do agente AM [66]. Por fim, Boumail *et al.* 2012 caracterizaram um filme de difusão em tricamada, com incorporação de agentes AM naturais para aplicação direta em vegetais [69]. Neste filme, a camada interna foi preparada com celulose nanocristalina (NCC) e metilcelulose (MC), e incorporada com uma formulação de agentes AM naturais [69]. Os investigadores concluíram que o filme apresentou propriedades físicas satisfatórias, libertação controlada dos agentes AM e atividade antimicrobiana nas bactérias patogénicas testadas [69].

### **2.2.5. Avaliação das propriedades físicas de filmes**

A potencialidade dos filmes para as embalagens alimentares depende essencialmente de propriedades como: barreira ao vapor de água, ao O<sub>2</sub>, ao CO<sub>2</sub>, aos sabores, aos aromas e às gorduras, entre o alimento e o exterior [19], [22]. O filme deve igualmente manter a integridade do alimento, conferindo-lhe proteção mecânica [19], [22]. Porém, todas estas propriedades dependem de fatores, tais como o polímero utilizado, os constituintes adicionados, as condições de armazenamento e o tipo de aplicação [22].

Devido à diversidade de materiais existentes, é necessário determinar as propriedades de barreira sempre que existem alterações na formulação do filme [22]. As propriedades de barreira mais estudadas são a permeabilidade ao vapor de água e a permeabilidade ao O<sub>2</sub>, no entanto também se estuda a permeabilidade ao CO<sub>2</sub> [19]. A permeabilidade é definida como

um fluxo, que é medido em estado estacionário, e descreve em que extensão um soluto se difunde através do filme [22]. Assim, a difusão está relacionada com a concentração do soluto em ambos os lados do filme [22]. De forma a compreender melhor as propriedades de barreira, é necessário ter em conta algumas características dos filmes, assim como, a estrutura do polímero, o grau de polaridade, o espaço intersticial entre as moléculas do polímero (isto é, o volume livre), a mobilidade das cadeias do polímero (isto é, a cristalinidade) e o alinhamento das ramificações do polímero na cadeia principal (ou seja, a orientação) [22].

Na avaliação da capacidade dos filmes protegerem os alimentos contra danos mecânicos são determinadas as propriedades de resistência, tais como:

- **Módulo de Young/Elástico** - permite determinar a rigidez do filme. Obtém-se a partir da razão entre a tensão de rutura e a deformação, e é expresso em Pa.
- **Resistência à tração** - indica a força máxima de rutura por unidade de largura do provete, a qual é expressa em N/m. A razão entre o valor da resistência à tração e a gramagem do filme corresponde ao índice de tração, e é expresso em Nm/g.
- **Alongamento à rutura** - indica a capacidade de um material para alongar antes da rutura, quando submetido a uma força de tensão, isto é, o grau em que o filme pode alongar antes de quebrar e é expresso em percentagem [19], [70].

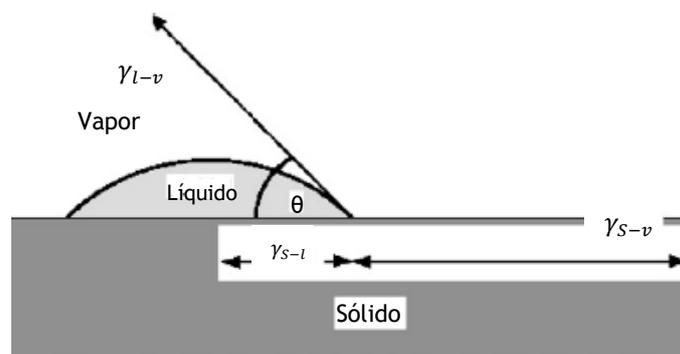
Os valores das propriedades mecânicas dos filmes podem depender de alguns fatores, como o tipo e a concentração do polímero [22]. Por exemplo, o aumento de concentração do polímero pode levar a um aumento dos valores de resistência à tração, levando a uma estrutura mais forte do filme; por outro lado, a presença e o aumento da concentração de plastificante podem levar ao aumento dos valores de alongamento e à diminuição da resistência à tração [22].

A análise da solubilidade dos filmes está associada com a sua integridade em sistemas aquosos, a sua resistência à água e à sua biodegradabilidade, sendo muito importante para as embalagens alimentares [19]. No caso das embalagens antimicrobianas, quando o objetivo é proporcionar a preservação de alimentos com elevada quantidade de água e a libertação de AM, são necessários filmes com baixa solubilidade [19].

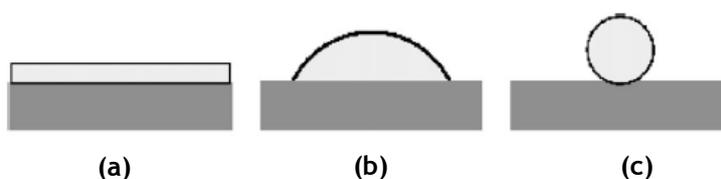
De forma a avaliar a hidrofiliicidade ou a hidrofobicidade da superfície dos filmes usa-se a técnica de medição do ângulo de contacto [71] [72]. O ângulo de contacto ( $\theta$ ) é definido como o ângulo formado entre o filme e a linha tangente no ponto de contacto da gota do líquido (por exemplo, a água) com a superfície [72]. A representação esquemática do ângulo de contacto encontra-se na figura 10, em que  $\gamma_{S-v}$  é a tensão superficial do sólido,  $\gamma_{l-v}$  é a tensão superficial do líquido e por fim  $\gamma_{S-l}$  é a tensão interfacial entre o sólido e o líquido [71]. Quando uma gota de um líquido é colocada sobre uma superfície sólida, o líquido

difunde-se em toda a superfície sólida formando uma película fina ou então espalha-se de uma forma limitada permanecendo assim uma gota sobre a superfície [71]. No caso de um líquido formar um filme uniforme na superfície, isto é  $\theta = 0^\circ$ , considera-se que o sólido é completamente molhado por esse líquido (figura 11a) [71]. No caso de se formar um ângulo de contacto finito, ou seja  $\theta > 0^\circ$ , alguns autores consideram que o sólido é parcialmente molhado enquanto outros fazem distinção de acordo com o tamanho do ângulo de contacto [71]. Por exemplo, pode definir-se como molhante qualquer líquido que forme um ângulo inferior ou igual a  $30^\circ$  num sólido [71]. Entre  $30^\circ$  e  $89^\circ$  o sistema pode ser considerado como parcialmente molhante (figura 11b) mas se o ângulo for superior ou igual a  $90^\circ$ , o sistema já é considerado como não molhante (figura 11c) [71].

As medições do ângulo de contacto permitem também calcular a energia de superfície tal como as suas componentes polar e dispersiva, utilizando diferentes modelos teóricos sendo o método de Owens-Wendt um dos mais usados [72].



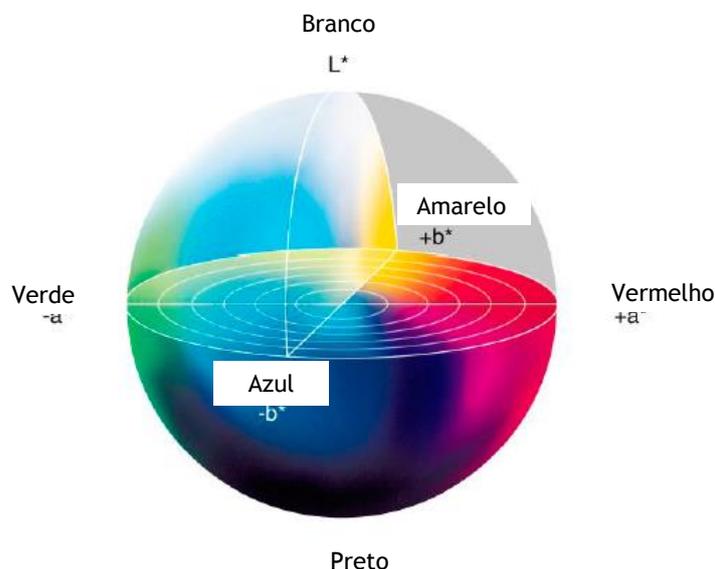
**Figura 10:** Representação esquemática do ângulo de contacto (Adaptada de [71]).



**Figura 11:** Formas que um líquido pode adquirir aquando aplicado numa superfície sólida (Adaptada de [71]).

A cor do filme pode ser um fator importante para a sua aceitação pelo consumidor [22]. A avaliação deste parâmetro baseia-se no modelo de cor CIELAB, o qual é normalmente utilizado para representar numericamente as cores percebidas [73]. Neste modelo,  $L^*$  representa a luminosidade, cujo valor varia entre 0 (preto) e 100 (branco);  $a^*$  e  $b^*$  representam as coordenadas cromáticas [73]. As tonalidades, verde e vermelho correspondem a valores negativos e positivos da coordenada  $a^*$ , respetivamente, enquanto as tonalidades

azul e amarelo correspondem a valores negativos e positivos da coordenada  $b^*$ , respectivamente. O sistema de cor CIELAB encontra-se representado na figura 12 [73]. Para além da cor, a transparência também é um fator relevante para o consumidor, pois é necessário a visibilidade do produto [74]. A transparência é a característica de um material que lhe permite transmitir a luz, sendo possível ter uma visão nítida através dele [75].



**Figura 12:** Modelo de cor CIELAB (Adaptada de [76]).

A morfologia da superfície dos filmes AM pode ser estudada com o auxílio da técnica de microscopia eletrônica de varrimento (SEM do inglês *Scanning Electron Microscopy*) [52]. As micrografias da superfície dos filmes permitem explicar as alterações estruturais resultantes da incorporação dos agentes AM na matriz polimérica [52]. Estas alterações podem provocar transformações significativas nos filmes, levando por exemplo à formação de poros na matriz do polímero o que influencia as propriedades de tração e barreira [52]. O nível de modificações nos filmes depende particularmente da interação entre o polímero e o agente AM utilizado [52].

### 2.2.6. Avaliação da atividade antimicrobiana de filmes

Diversos métodos têm sido descritos para avaliar *in vitro* a atividade antimicrobiana de filmes [16]. A escolha do método depende de diversos fatores, tais como: a finalidade do teste, do agente AM, das características dos microrganismos alvo a testar, entre outros [16]. Por exemplo, quando o filme é aplicado sobre um alimento, a eficácia deste é avaliada através da contagem da população microbiana que originalmente se encontra presente no alimento ou então da população inoculada durante o armazenamento do alimento a testar [16]. No entanto, deve-se observar que a libertação do agente AM incorporado no filme exerce uma elevada influência na sua eficácia [16]. Nalgumas aplicações a velocidade de libertação do agente AM também é um fator importante, pois uma libertação rápida permite controlar o

crescimento microbiano no alimento, e uma libertação lenta permite garantir um certo nível do agente AM na superfície, de forma a controlar a contaminação externa [16]. Deste modo, a determinação da velocidade de libertação em conjunto com a avaliação da atividade antimicrobiana ao longo do tempo, permite otimizar o desenvolvimento de filmes com potencial para a aplicação em embalagens ativas [16].

Um dos testes de avaliação das propriedades antimicrobianas dos filmes é o teste da difusão em disco [16]. Este teste consiste na aplicação de um disco do filme, com incorporação de um agente AM a testar, sobre uma placa de agar inoculada com o microrganismo alvo [16]. Ao longo do tempo de incubação, o agente AM difunde-se do filme para o meio de cultura, o qual elimina ou inibe o crescimento do microrganismo [16]. Deste modo, forma-se uma área sem crescimento detetável a olho nu, ou seja um halo de inibição, cujo diâmetro é medido [16], [19]. Este método é simples e de fácil aplicação, e normalmente é usado como um passo de *screening*, de forma a testar se o agente AM incorporado na matriz do filme inibe o crescimento microbiano num tempo pré-fixo [16]. No entanto, é difícil comparar as medidas quantitativas dos halos de inibição com outros estudos devido às diversas condições específicas dos ensaios, incluindo o tamanho e a forma do filme, do agente AM, do microrganismo alvo, da temperatura, do tempo de incubação, entre outros fatores [16].

Outro método utilizado para avaliar a redução logarítmica da população microbiana devido ao filme AM baseia-se na determinação do número de Unidades Formadoras de Colónias (UFC) [19]. A contagem das UFC tem como fundamento a colocação de um filme numa solução de meio com agar para o crescimento de microrganismos, e a remoção de amostras a partir da solução ao longo do tempo [19]. As amostras retiradas são plaqueadas em meio com agar, e posteriormente as colónias são contadas [19]. Assim, desta forma mede-se a redução logarítmica da população microbiana devido ao filme AM [19]. Este método é vantajoso para modelos alimentares, pois os resultados podem inferir o que pode ocorrer quando o filme entra em contacto com uma superfície contaminada [16].

Um teste também usado para avaliação das propriedades antimicrobianas é a avaliação da inibição do *quorum sensing* (QS) [77]. Recentemente, a resistência e a patogenicidade dos principais agentes infecciosos alimentares tais como: *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Campylobacter* e *Listeria monocytogenes* podem estar relacionadas com os mecanismos de comunicação intercelular como o QS [77]. O QS baseia-se na síntese, libertação e perceção de moléculas sinalizadoras que permitem monitorizar a densidade celular [77], [78]. Para além disto, permite que as bactérias Gram-positivas e Gram-negativas regulem algumas atividades fisiológicas, como a secreção de fatores de virulência, a formação de biofilmes, a motilidade e a esporulação [77], [78]. Assim, a regulação da proliferação de patogéneos alimentares ou a sua inibição por QS poderá ser uma boa estratégia para garantir a segurança e qualidade alimentar [77]. A bactéria *Chromobacterium violaceum* é o modelo utilizado para determinar

o efeito dos filmes na inibição do QS [77]-[79]. Esta bactéria produz um pigmento de cor violeta designado por violaceína, usando-o como resposta da comunicação intercelular [77]. Deste modo, através da análise da produção deste pigmento é possível avaliar a interferência dos compostos neste processo [77].

## Capítulo 3. Objetivos

Nos países desenvolvidos, *Campylobacter* spp. é o principal agente infeccioso de origem alimentar que causa doença gastrointestinal. Deste modo, de forma a controlar e prevenir a colonização patogénica em alimentos, torna-se importante o desenvolvimento de filmes biodegradáveis com incorporação de compostos naturais, neste caso o resveratrol, para o controlo de *Campylobacter*. Como tal, os objetivos específicos deste trabalho foram:

1. Selecionar os biopolímeros para o estudo e preparar as dispersões dos biopolímeros e do resveratrol, assim como do complexo de inclusão com resveratrol;
2. Preparar o filme com o resveratrol, a hidroxipropil- $\gamma$ -ciclodextrina e o complexo de inclusão com o resveratrol;
3. Caracterizar os filmes quanto à permeabilidade, resistência e aparência;
4. Testar a eficácia dos filmes desenvolvidos contra duas estirpes isoladas de *Campylobacter* (*C. coli* 873 e *C. jejuni* 225421);
5. Avaliar o efeito dos filmes antimicrobianos desenvolvidos no *quorum sensing*;
6. Quantificar por HPLC-DAD a percentagem de libertação de resveratrol e do seu complexo de inclusão incorporados nos filmes para um simulante alimentar, etanol a 10%.
7. Avaliar a atividade anti-*Campylobacter* dos filmes aplicados num modelo alimentar, usando para este efeito a carne de frango.

## Capítulo 4. Materiais e Métodos

### 4.1. Preparação dos filmes antimicrobianos

#### 4.1.1. Agentes antimicrobianos

Uma solução de *trans*-RV (*TCl Europe N.V.*) de concentração 32 mg/mL foi preparada em DMSO (*Merk*). O complexo de inclusão (CI) de RV com HP- $\gamma$ -CD (MM=1580g/mol; *Sigma-Aldrich*) foi preparado como descrito anteriormente por Silva *et al.* [43]. Resumidamente, a solução de CD foi preparada com uma concentração de 0,3 M em água ultra-pura (*Millipore*, EUA). Após dissolução, 1 mL desta solução de CD foi adicionado a 25 mg de RV. A suspensão resultante foi homogeneizada no vórtex e sonicada durante 1h, num banho de água e gelo, de forma a não sobreaquecer as amostras. Posteriormente colocou-se a suspensão de CD e RV num agitador orbital a 25°C, 250 rpm durante 24h. A suspensão foi protegida da luz durante todo o procedimento. Após o tempo de incubação, a solução foi filtrada com filtros de 0,22  $\mu$ m (*Millipore*, EUA) [43]. A concentração de RV no CI foi quantificada de acordo com o método de cromatografia líquida de alta eficiência com detetor de diodos (HPLC-DAD do inglês *High Performance Liquid Chromatography with Diode Array Detector*) descrito previamente por Silva *et al.* [43]. Para tal, foi utilizado um sistema de cromatografia líquida de ultra-alta pressão (UPLC do inglês *Ultra-High Performance Liquid Chromatography*), sistema da série *Agilent 1290* (*Agilent Technologies*, EUA) com uma coluna analítica de HPLC de fase reversa *Zorbax 300 SB-C<sub>18</sub>* com 4,6 mm de diâmetro, 150 mm de comprimento e 5  $\mu$ m de tamanho de poro. A fase móvel utilizada para a quantificação foi constituída por uma mistura de ácido fórmico a 0,1% (v/v) e acetonitrilo, numa proporção de 52:48 (v/v), que foi previamente filtrada a vácuo com filtros de 0,2  $\mu$ m e sonicada durante 30 min para eliminar possíveis bolhas de ar. Quanto às condições cromatográficas, foi utilizado um fluxo isocrático de 1,0 mL/min, a coluna foi mantida a uma temperatura de 25°C e as amostras e o injetor a 4°C. O comprimento de onda do detetor DAD foi definido a 306 nm para a deteção de *trans*-RV. A concentração de RV foi determinada pelo método validado por Silva *et al.* [43], tendo por base a reta de calibração traçada com várias concentrações de RV (1-100  $\mu$ g/mL) e tendo em conta o fator de ponderação  $\frac{1}{x^2}$  [43].

#### 4.1.2. Filmes antimicrobianos

- Filmes de carboximetilcelulose

Os filmes de CMC (*Sigma-Aldrich*) foram preparados a 1% (m/m). Para a sua obtenção, o biopolímero foi dissolvido em água destilada a 70°C, sob agitação magnética durante 1h. Após a solução estar à temperatura ambiente, adicionou-se como plastificante o glicerol (*Merk*), em proporções de 10 e 25% relativamente à massa de CMC, e manteve-se a solução em agitação magnética durante 30 min. Seguidamente foi adicionado o agente AM, RV ou CI,

obtendo-se uma concentração final de 500 µg/mL e 1300 µg/mL, respetivamente. As misturas foram homogeneizadas durante 30 min à temperatura ambiente. No entanto, o CI foi adicionado à solução com 25% de glicerol relativamente à massa total de polímeros (CMC + CD), pois em testes preliminares, as percentagens inferiores de glicerol, nomeadamente 10 e 25%, (em relação à massa de CMC) os filmes tornaram-se quebradiços e difíceis de manusear. Foram também preparados dois grupos de filmes que funcionaram como controlo. Para tal, no primeiro grupo, o filme foi preparado sem a incorporação dos agentes AM; no segundo grupo, preparou-se um filme em que o CI foi substituído pela mesma quantidade de CD. Após a preparação das misturas, estas foram vertidas em caixas de Petri de poliestireno (8 cm de diâmetro) e deixadas secar ao ar, protegidas da luz, numa atmosfera controlada de 22°C e 50% HR durante 6 dias. Após este tempo de secagem, obtiveram-se os filmes que foram armazenados nas mesmas condições até à sua caracterização e avaliação da atividade antimicrobiana.

- **Adição de ácidos gordos em filmes de carboximetilcelulose**

De forma a aumentar a hidrofobicidade dos filmes de CMC foram incorporados ácidos gordos (AG) na sua formulação, tendo sido testados o ácido oleico (AO, *Merk*), o ácido linoleico (AL, *Fluka*), o azeite (obtido num hipermercado local, na Covilhã) e o óleo alimentar (OA, obtido num hipermercado local, na Covilhã). Os AG referidos têm a particularidade de serem líquidos à temperatura ambiente e como tal, são facilmente miscíveis com os biopolímeros sem recorrer a elevadas temperaturas. Como agente AM, apenas foi utilizado o RV. Os filmes foram preparados segundo o protocolo descrito por Ghasemlou *et al.* 2011 [80], com algumas modificações. Resumidamente, após a preparação da solução de CMC e da adição de glicerol (10% m/m) como descrito no ponto 4.1.2., adicionaram-se os respetivos AG a 15% (m/m) em relação à massa de CMC. Posteriormente adicionou-se como emulsionante o Tween 80 (*Sigma-Aldrich*), a 1% (m/m) relativamente à massa de AG. A solução foi homogeneizada com o auxílio do homogeneizador *IKA T25-Digital Ultra Turrax*, à temperatura ambiente durante 3 min a 20000 rpm. Logo após a homogeneização, cada solução contendo os AG foi arrefecida, de forma a incorporar o RV, o qual foi adicionado com concentração final de 750 µg/mL. De seguida, as soluções estiveram durante 10 min sob agitação magnética, foram vertidas em caixas de Petri de vidro e secas ao ar, a 22°C e 50% HR, protegidas da luz. Foram preparados filmes que funcionaram como controlo, aos quais não foi adicionado o agente AM. Todos os filmes foram armazenados no escuro, a 22°C e 50% HR até à sua caracterização e avaliação da atividade antimicrobiana.

- **Filmes em bicamada**

Os filmes AM em bicamada são constituídos por uma camada externa de AC e uma camada ativa interna de HEC, tendo sido concebidos pelo método de evaporação do solvente. Os filmes de AC (MM=100,000 g/mol; *Acros Organics*) foram preparados a 1% (m/m) enquanto os filmes de HEC (*Fluka*) foram preparados a 4% (m/m). O biopolímero AC foi dissolvido em

acetona (*Sharlau*) sob agitação magnética durante 1h à temperatura ambiente. De seguida, a solução foi colocada num caixa de Petri de vidro e seca a 100°C durante 20 min. Na obtenção dos filmes de HEC, o biopolímero foi dissolvido em água destilada a 80°C, sob agitação magnética durante 1h, e de seguida a solução foi arrefecida à temperatura ambiente. Posteriormente adicionou-se a lecitina de soja (*Tokyo Chemical Industry CO.*) como agente de ligação e o glicerol (*Merk*) como plastificante numa proporção de 10% (m/m) relativamente à massa dos polímeros presentes na solução (HEC e CD). A lecitina de soja foi incorporada na solução e homogeneizada com o auxílio do homogeneizador *IKA T25-Digital Ultra Turrax*, à temperatura ambiente durante 10 min a 12000 rpm. Logo após a homogeneização, adicionou-se o glicerol e a solução foi mantida sob agitação magnética durante 30 min. Em seguida, o RV foi adicionado, obtendo-se uma concentração final de 500 µg/mL (RV<sub>1</sub>) e 750 µg/mL (RV<sub>2</sub>); e o Cl foi adicionado a 2500 µg/mL (Cl<sub>1</sub>) e 7500 µg/mL (Cl<sub>2</sub>). As misturas foram homogeneizadas durante 30 min à temperatura ambiente, sendo posteriormente adicionadas ao filme de AC preparado previamente, e secas na estufa a 30°C durante 6h. Também foram preparados filmes que funcionaram como controlo. Para tal, um filme foi preparado sem a incorporação dos agentes AM, e num outro filme, o Cl<sub>2</sub> foi substituído por igual quantidade de CD. Após a secagem, todos os filmes foram armazenados a 22°C e 50% HR até à sua utilização para caracterização e avaliação da atividade antimicrobiana.

## 4.2. Avaliação das propriedades físicas

Os filmes foram caracterizados em termos de espessura, gramagem, propriedades de resistência, velocidade de transmissão do vapor de água, energia de superfície, cor, transparência e morfologia.

- **Espessura e gramagem**

A espessura foi medida com base na norma ISO 534:2011 [81], usando o micrómetro *Adamel Lhomargy*, modelo MI 20, cuja precisão é de 0,001 mm. Foram realizadas sete medições em diferentes locais de cada amostra e os valores médios destas foram utilizadas para calcular as propriedades de resistência. Os filmes foram pesados de acordo com base na norma ISO 536:1995 [82] numa balança analítica. A gramagem foi calculada a partir da razão entre a massa e a área dos filmes. Foram utilizadas três amostras de cada filme.

- **Propriedades de resistência**

As determinações do índice de tração (IT), do alongamento (A) e do módulo elástico (ME) foram realizadas com base na norma ISO 1924/1:1992 [83] usando o equipamento *Thwing-Albert Instrument Co.*, modelo *EJA series*. Os filmes foram cortados em retângulos com a dimensão de 7 x 1,5 cm. Os ensaios foram realizados sob condições de 22°C e 50% HR e os resultados obtidos são os valores médios de seis medições para cada filme.

- **Ângulo de contacto e energia de superfície**

A energia de superfície e as respetivas componentes polar e dispersiva foram determinadas a partir da medição do ângulo de contacto, formado pelas gotas de cada um dos dois líquidos utilizados na superfície dos filmes, segundo o método de Owens-Wendt. Os líquidos utilizados foram a água desionizada e o diiodometano (*Aldrich*, 99% pureza), cujos parâmetros da tensão superficial são apresentados na tabela 3. As medições foram realizadas no equipamento OCAH 200 da *DataPhysics Instruments*, aplicando o método da gota sésil. O ângulo de contacto resultou da média dos valores obtidos para sete gotas.

**Tabela 3:** Parâmetros da tensão superficial (mN/m) dos líquidos utilizados nas medições do ângulo de contacto [84].

Líquido	$\gamma^{\text{Total}}$	$\gamma^{\text{d}}$	$\gamma^{\text{p}}$
Água desionizada	72,80	21,80	51,00
Diiodometano	50,80	50,80	0

$\gamma^{\text{Total}}$  - Energia livre de superfície total;  $\gamma^{\text{d}}$  - Componente dispersiva;  $\gamma^{\text{p}}$  - Componente polar.

O modelo de Owens-Wendt assume a aditividade das contribuições polares e das contribuições apolares. As contribuições polares resultam da interação entre dois dipolos permanentes, as quais são designadas por interações de Keeson, e dipolo permanente-dipolo induzido, as quais se designam por interações de Debye [82]. As contribuições apolares ou dispersivas resultam da interação entre dois dipolos induzidos, designadas por interações de London [85]. A energia de superfície e as respetivas componentes polar e dispersiva foram determinadas pela equação 1 [86]:

$$\gamma_{LV} (1 + \cos \theta) = 2 \sqrt{\gamma_{SV}^{\text{d}} \cdot \gamma_{LV}^{\text{d}}} + 2 \sqrt{\gamma_{SV}^{\text{p}} \cdot \gamma_{LV}^{\text{p}}} \quad (1)$$

Nesta equação, os índices superiores p e d correspondem à componente polar e dispersiva da tensão superficial, respetivamente. Para tal, devem ser utilizados no mínimo dois líquidos teste, cuja tensão superficial, componente polar e dispersiva sejam conhecidas [83].

- **Teor de matéria seca**

O teor de matéria seca de cada amostra foi determinado com base na norma ISO 638:2008 [87], pela diferença de massa dos filmes antes e após a secagem a 100°C durante 24h. Os ensaios foram realizados em triplicado.

- **Propriedades óticas**

As medições da cor e transparência foram realizadas no espectrofotómetro *Color Touch 2* da *Technidyne*, com utilização do iluminante D65 e observador a 10°. Os valores das coordenadas cromáticas: L\* (luminosidade), a\* (vermelho-verde) e b\* (amarelo-azul) foram obtidos a partir de três medições em cada um dos filmes, realizadas sobre um fundo branco padrão. Na tabela

4, encontram-se registados os valores das coordenadas cromáticas do fundo branco padrão utilizado na medição da cor.

**Tabela 4:** Valores das coordenadas cromáticas do fundo branco padrão utilizado na medição.

L*	a*	b*
96,81	0,11	3,50

A transparência foi determinada com base na equação referenciada na norma ISO 22891:2013 [88], através dos valores de refletância dos filmes colocados sobre um fundo branco e um fundo preto padrão.

- **Microestrutura**

A análise da microestrutura dos filmes foi realizada por SEM no equipamento *Hitachi S-2700* com uma voltagem de aceleração de 10 kV. A preparação das amostras foi realizada de acordo com o protocolo usado por Pastor *et al.* 2013 [89]. Resumidamente, as amostras foram revestidas por uma camada de ouro de forma a ser possível visualizar a superfície e o corte transversal dos filmes. Para as observações transversais, os filmes foram criofaturados por imersão em azoto líquido.

- **Velocidade de transmissão do vapor de água**

A determinação da permeabilidade ao vapor de água foi realizada com base na norma ASTM E96-1995 [90]. Nas panelas foi colocado o meio absorvente (cloreto de cálcio anidro), obtendo-se 0% HR no interior das mesmas. Colocaram-se os filmes sobre a panela e as bordas foram seladas com cera aquecida, de modo a que a vedação ficasse perfeita e a transmissão do vapor de água ocorresse apenas através da área exposta do filme (50 cm<sup>2</sup>). Os conjuntos de teste foram acondicionados no laboratório à temperatura de 22°C e 50% HR, e pesados periodicamente durante 32h. A velocidade de transmissão do vapor de água (WVTR do inglês *Water Vapor Transmission Rate*) foi determinada a partir do declive da zona linear do gráfico do aumento da massa em relação ao tempo, dividido pela área exposta do filme. O ensaio foi realizado em duplicado para cada amostra.

- **Análise estatística**

Nos ensaios da avaliação das propriedades físicas dos filmes AM em bicamada foi realizada a análise estatística dos dados, através do teste paramétrico ANOVA e as diferenças entre grupos foram comparadas pelo *test post hoc Tukey's*, usando o *software GraphPad Prism*<sup>®</sup> sendo consideradas as variáveis em avaliação como significativamente dependentes quando o valor de prova do teste for  $p < 0,05$ .

## 4.3. Avaliação da atividade antimicrobiana

### 4.3.1. Microrganismos

Neste estudo, duas estirpes de referência (*C. coli* ATCC 33559 e *C. jejuni* ATCC 33560) e duas estirpes isoladas de *Campylobacter spp.* (*C. coli* 873 e *C. jejuni* 225421) foram utilizadas, em que *C. jejuni* 225421 foi isolada de carne fresca de aves, e *C. coli* 873 foi isolada de uma amostra de fezes de um doente com gastroenterite aguda [4]. Ambas as estirpes foram conservadas em meio *Brain Heart Infusion (BHI, Liofilchem, Itália)*, suplementado com 20% (v/v) de glicerol (*Himedia*) a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Antes dos testes antimicrobianos, cada estirpe foi inoculada em placas de meio *Brucella (Oxoid, Inglaterra)* suplementado com 5% de sangue desfibrinado de cavalo (*Oxoid, Inglaterra*), de forma a garantir as condições ótimas de crescimento e pureza.

### 4.3.2. Teste de difusão em disco

A avaliação da atividade antimicrobiana dos filmes pelo método de difusão em disco foi realizada segundo o protocolo descrito por Alkan *et al.* [12] e como recomendado pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)*, protocolo M2-A8, com algumas modificações [91]. Os discos dos filmes, com aproximadamente 1 cm de diâmetro, foram cortados em condições de assepsia. Previamente à realização do ensaio, o inóculo foi preparado por suspensão direta das colónias numa solução de 0,85% de cloreto de sódio (*NaCl; Fisher Chemical*), e a densidade ótica (DO) foi ajustada para 0,5 unidades de McFarland (a que corresponde a  $1-2,0 \times 10^8$  Unidades Formadoras de Colónias/mL (UFC/mL)). Posteriormente mergulhou-se uma zaragatoa estéril na suspensão previamente preparada, girou-se várias vezes e apertou-se firmemente contra a parede interna do tubo, acima do nível do líquido, de modo a retirar o excesso de inóculo da zaragatoa. Numa placa de *Müller-Hinton Agar (MHA, Liofilchem, Itália)*, suplementado com 5% de sangue desfibrinado de cavalo, foi inoculada a suspensão bacteriana, esfregando-se a zaragatoa em toda a superfície do agar. Este procedimento foi repetido 3 vezes, girando a placa aproximadamente  $60^{\circ}$  de cada vez, de forma a garantir uniformemente a distribuição do inóculo em toda a placa. No final, passou-se a zaragatoa na margem da placa de agar e deixou-se secar aproximadamente 5 min. Os discos dos filmes previamente preparados foram colocados na superfície das placas anteriormente inoculadas e pressionados ao encontro do agar, de forma a assegurar o contacto completo com a superfície do mesmo. Por fim, as placas foram incubadas em condições de microaerofília (6%  $\text{O}_2$ , 7,1% de  $\text{CO}_2$  e 3,6% de  $\text{H}_2$ ), a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 48h. Após o tempo de incubação, os diâmetros dos halos de inibição à volta do disco do filme foram medidos, em mm, com o auxílio de uma régua. O halo de inibição foi considerado como a área sem crescimento visível a olho nu. Por sua vez, o crescimento das bactérias na área de contacto nos filmes com a superfície de agar também foi analisada visualmente. Os testes foram efetuados em duplicado e de forma independente.

#### 4.4. Avaliação da atividade anti-*quorum sensing*

O efeito dos filmes em bicamada com incorporação de RV e de CI no QS foi estudado usando a estirpe biossensor *Chromobacterium violaceum* ATCC 12472, através do ensaio de difusão em disco e da quantificação da produção do pigmento (violaceína). Os filmes testados foram os de bicamada, e prepararam-se tal como descrito no ponto 4.1.2. Para a realização dos ensaios seguiu-se o procedimento descrito por Alvarez *et al.* [77], com algumas modificações. Resumidamente, a estirpe *C. violaceum* ATCC 12472 foi inoculada em meio sólido *Luria-Bertani* (LB) agar (*Pronadisa*) e incubada *overnight* a 30°C, e posteriormente transferida para 20 mL de meio LB *broth* (*Sigma-Aldrich*) e incubou-se a 30°C a 150 rpm durante 16h. Após a incubação acertou-se a  $DO_{600nm}$  a 1, e inoculou-se uma placa de meio LB agar, com o auxílio de uma zaragatoa tal como descrito no ponto 4.3.2. Posteriormente transferiram-se os discos dos filmes, em condições de assepsia, para a placa previamente inoculada e incubou-se a 30°C, durante 24h. Após a incubação, mediu-se o halo de inibição de crescimento e de inibição da produção do pigmento com o auxílio de uma régua. A inibição do crescimento foi medida como diâmetro 1 ( $d_1$ ) enquanto a inibição do crescimento e a inibição do pigmento foram medidas como diâmetro 2 ( $d_2$ ), ambos medidos em mm. Deste modo, a inibição do QS foi determinada ao subtrair-se os diâmetros de inibição do crescimento bacteriano ( $d_1$ ) e ( $d_2$ ). Assim, a inibição do QS ( $d_2 - d_1$ ) será a inibição da produção de violaceína em torno dos discos dos filmes. Este ensaio foi realizado em duplicado, de forma independente.

Para a quantificação da inibição da produção do pigmento procedeu-se da seguinte forma: para tubos rolhados estéreis foram transferidos, em condições de assepsia, os discos dos filmes previamente preparados tal como descrito no ponto 4.3.2. Após o acerto do inóculo da estirpe biossensor,  $DO_{600nm}$  a 1 em meio LB *broth*, transferiram-se 1500  $\mu$ L para os tubos que continham os discos dos filmes e incubou-se a 30°C e 150 rpm durante 16h. Após a incubação, transferiu-se 1 mL de cada tubo para um *ependorf* estéril e centrifugou-se durante 10 min a 11000 rpm de forma a precipitar a violaceína insolúvel. Posteriormente, o sobrenadante foi descartado, e o *pellet* foi solubilizado em 1 mL de DMSO, os *ependorfs* foram agitados no vórtex durante 30s e centrifugou-se novamente a 11000 rpm. Neste passo, as células bacterianas sedimentaram e a violaceína foi extraída no sobrenadante. Após este procedimento, foram transferidos 200  $\mu$ L do sobrenadante correspondente a cada amostra para placas de 96 poços e efetuou-se a leitura da  $DO_{585nm}$ , os resultados foram expressos em percentagem (%) de inibição da produção de violaceína.

#### 4.5. Ensaio de libertação dos compostos antimicrobianos nos filmes em bicamada

A percentagem de libertação de RV e CI incorporados nos filmes, foi determinada de acordo com o protocolo de Noronha *et al.* 2014 [72] e o etanol (*Carlo Herba*) a 10% (v/v), foi utilizado como simulante alimentar para produtos de carne fresca como descrito no

Regulamento da Comissão Europeia No 10/2011. Para simular as condições de temperatura/tempo de conservação de alimentos como a carne, os ensaios foram realizados à temperatura de refrigeração de 4°C e temperatura ambiente de 20°C, durante 10 dias, no escuro. Para tal procedeu-se da seguinte forma: os discos dos filmes, com aproximadamente 1 cm de diâmetro, foram totalmente imersos em tubos de vidro com 15 mL de etanol a 10% (v/v). Durante o período de ensaio, foram retirados 1 mL de cada amostra (às 0h, 3h, 6h, 12h, 24h, 2 dias, 3 dias, 6 dias, 8 dias e 10 dias) filtrados em filtros de 0,22 µm (*Millipore*, EUA) e congelados até a quantificação pelo método de HPLC-DAD previamente descrito por Silva *et al.* 2014 [43] e como se encontra referido no ponto 4.1.1. Os resultados foram determinados em percentagem de libertação e o ensaio foi realizado em triplicado, em ensaios independentes.

#### **4.6. Aplicação dos filmes antimicrobianos em bicamada num modelo alimentar (peito de frango)**

A atividade anti-*Campylobacter* dos filmes foi estudada num modelo alimentar, peito de frango, segundo o protocolo descrito por Mild *et al.* [92], com algumas modificações.

- **Produto alimentar, filmes e microrganismos.**

Os peitos de frango, frescos e não congelados foram obtidos num hipermercado local, na Covilhã. Os filmes AM em bicamada foram preparados de acordo com o ponto 4.1.2. e de acordo com os resultados obtidos no ponto 4.3.2., apenas foram testados quatro filmes em bicamada, em que um filme não foi incorporado com os agentes AM; dois filmes foram incorporados com os agentes AM, RV e CI, de concentração final 0,075% e 0,25%, respetivamente; e por último, um filme com a mesma concentração de CI foi substituído pela adição de CD. Os microrganismos testados neste ensaio foram *C. coli* 873 e *C. jejuni* 225421.

- **Preparação do inóculo**

Resumidamente, cada estirpe foi inoculada em placas de meio *Brucella* suplementado com 5% de sangue desfibrinado de cavalo e incubadas em condições de microaerofilia a 37°C. Após 24h de incubação, leu-se a  $DO_{620nm}$  inicial e acertou-se o inóculo a 0,05 e posteriormente procedeu-se a uma pré-incubação. Para tal, em dois *erlenmeyers* rolhados estéreis, foram adicionados 20 mL de meio *Müller-Hinton broth* (MHB, *LiofilChem*, Itália) e o inóculo correspondente, os quais foram dispostos numa jarra de microaerofilia. De seguida, a jarra foi colocada no orbital a 37°C, a 100 rpm, durante 6h. Por último, leu-se a  $DO_{620nm}$  e acertou-se a 0,015 (correspondendo aproximadamente a  $1,0 \times 10^8$  UFC/mL) em água peptonada tamponada (BPW do inglês *buffered peptone water*, *Oxoid*, Inglaterra), e fez-se uma diluição de 1:10 para a obtenção de uma suspensão de aproximadamente  $1,0 \times 10^7$  UFC/mL.

- **Preparação do modelo alimentar**

Os peitos de frango foram cortados em pedaços de 2,5 g em condições de assepsia, com o auxílio de um bisturi e colocados numa caixa de Petri de vidro com tampa. Posteriormente, as amostras foram esterilizadas em água a ferver durante 40s de forma a inativar a flora presente. De seguida, foram arrefecidas em caixas de Petri de poliestireno estéreis, descobertas na câmara de fluxo laminar durante 1h. Após o arrefecimento das amostras, estas foram inoculadas com uma das culturas de *C. coli*, *C. jejuni* e mistura das duas estirpes (*C. coli* e *C. jejuni*) na suspensão previamente preparada. Resumidamente, num tubo de *Falcon* de 50 mL, adicionou-se BPW e a suspensão do inóculo, as amostras foram mergulhadas durante 5 min. Logo após a inoculação, as amostras foram colocadas em caixas de Petri de plástico estéreis, previamente identificadas, e incubadas numa estufa a 42°C, 10% CO<sub>2</sub>, durante 1h para permitir a adesão das bactérias na superfície das amostras. Após a secagem, cada amostra correspondente a cada estirpe, foi colocada em sacos de plástico estéreis de *Stomacher* de 50 mL (*Stomacher*<sup>®</sup> 80 *Biomaster Bags*), onde se efetuou uma diluição de 1:10 (47,5 mL de BPW e 2,5 g de amostra). Posteriormente as amostras foram colocadas no *Stomacher*<sup>®</sup> 80 *Biomaster* durante 60s à velocidade normal. Após permanência no *Stomacher* durante 60s recolheram-se 200 µL para a contagem bacteriana, através do método das diluições sucessivas e posterior plaqueamento em meio seletivo mCCDA (*Campylobacter Blood-Free Selective Agar Base - modified CCDA-Preston*, *Oxoid*, Inglaterra) e meio MHA, suplementado com 5% de sangue defibrinado de cavalo. Estas amostras correspondem às 0h. As restantes foram envolvidas, de forma asséptica, com os filmes AM. Neste ensaio foram compreendidos dois controlos, em que o primeiro consistiu numa amostra inoculada e envolvida com um filme sem o agente AM e sem CD, e o segundo numa amostra também inoculada mas sem filme. De forma a simular as condições de temperatura/tempo de conservação da carne de frango, as amostras foram incubadas em jarras de microaerofília a 20°C como temperatura ambiente, e a 4°C como temperatura de refrigeração, durante 72h. Após a incubação, os filmes foram retirados das amostras na câmara de fluxo laminar e estas foram ao *Stomacher* procedendo da mesma forma, como descrito anteriormente para as amostras das 0h. Cada ensaio foi realizado em triplicado e de forma independente.

## Capítulo 5. Resultados e Discussão

### 5.1. Filmes de carboximetilcelulose

O estudo do desenvolvimento de filmes AM iniciou-se pela seleção do biopolímero para a sua preparação. O primeiro biopolímero a ser testado foi a CMC (figura 13), pois é um dos derivados de celulose mais utilizado na preparação de filmes [93]. Para além disso, é solúvel em água, apresenta elevada viscosidade e não apresenta efeitos tóxicos e alergénicos [93]. A utilização de plastificantes é necessária em filmes de polissacáridos, pois estes aumentam a flexibilidade, diminuem a fragilidade e melhoram as propriedades mecânicas dos filmes [93], [94]. O glicerol (G) é dos plastificantes mais utilizados na preparação de filmes [94], razão pela qual foi o escolhido neste estudo. Nos filmes de CMC foram testadas três concentrações diferentes de glicerol, nomeadamente, 10, 25 e 50%, relativamente à massa do biopolímero (CMC). No entanto, a concentração mais elevada (50%) não apresentou bons resultados, pois os filmes tornaram-se difíceis de manusear porque se tornaram pegajosos. Assim, na preparação destes filmes, para a caracterização e avaliação da sua atividade antimicrobiana apenas foi adicionado 10 e 25% de glicerol. Os agentes AM adicionados foram o RV e o CI, e a concentração incorporada nos filmes de CMC foi baseada num estudo prévio, no qual foi determinada a concentração mínima inibitória (MIC do inglês *Minimum Inhibitory Concentration*) de RV e de CI para as estirpes de *Campylobacter* em estudo [49]. Sabendo que para estas estirpes, o MIC para o RV variou entre 50-100 µg/mL (0,05 - 0,1 % m/v) e que para o CI variou entre 64-256 µg/mL (0,064 - 0,256 % m/v) [49], fixou-se uma concentração de cinco vezes o MIC para ser incorporada nestes filmes. Na tabela 5, encontram-se apresentadas as concentrações dos agentes AM, em µg/mL, em filmes de CMC. A CD também foi adicionada aos filmes de CMC, de modo a ser um controlo do CI. Os filmes com incorporação de CD e CI foram preparados de forma a conterem o teor de sólidos totais iguais ao filme com incorporação de RV e 25% de glicerol, isto é, de forma a terem uma gramagem teórica semelhante a este filme. Esta otimização resultou do facto de, em ensaios preliminares, se ter verificado que os filmes preparados com uma gramagem superior, e com 10% de glicerol, eram difíceis de manusear e eram quebradiços.



Figura 13: Fotografia de um filme de carboximetilcelulose.

**Tabela 5:** Concentração ( $\mu\text{g/mL}$ ) dos agentes antimicrobianos incorporados nos filmes de CMC.

Agente antimicrobiano	Concentração do agente antimicrobiano ( $\mu\text{g/mL}$ )
RV	500
CI	1300

### 5.1.1. Avaliação das propriedades físicas dos filmes de carboximetilcelulose

Os filmes de CMC foram caracterizados ao nível das propriedades estruturais, nomeadamente a gramagem e a espessura, resistência e morfologia. A gramagem é definida como a quantidade de massa por unidade de área do filme e é expressa em  $\text{g/m}^2$  [95], [96]. O valor da gramagem corresponde à razão entre a massa e a área da amostra [95], [96]. A espessura corresponde à distância perpendicular entre as duas superfícies do filme [95]. Os valores obtidos para as propriedades estruturais dos filmes de CMC encontram-se registados na tabela 6.

**Tabela 6:** Propriedades estruturais dos filmes de CMC (média  $\pm$  desvio-padrão).

Filmes	Propriedades Estruturais	
	Gramagem ( $\text{g/m}^2$ )	Espessura ( $\mu\text{m}$ )
CMC	$54,37 \pm 0,12$	$40,10 \pm 0,42$
CMC + 10% G	$57,80 \pm 1,50$	$38,70 \pm 0,42$
CMC + 25% G	$64,94 \pm 0,37$	$42,40 \pm 0,28$
CMC + RV	$121,95 \pm 0,25$	$98,00 \pm 0,85$
CMC + 10% RV	$122,57 \pm 0,12$	$93,00 \pm 0,00$
CMC + 25% G + RV	$117,19 \pm 0,25$	$85,90 \pm 0,71$
CMC + 25% G + CD	$53,13 \pm 8,35$	$38,10 \pm 1,56$
CMC + 25% G + CI	$58,60 \pm 0,62$	$57,20 \pm 6,79$

CMC (Carboximetilcelulose); G (Glicerol); RV (Resveratrol); CD (Ciclodextrina);

CI (Complexo de inclusão).

Segundo os resultados obtidos, o valor da gramagem mais elevado foi registado para o filme de CMC com incorporação de 10% de G e com RV ( $122,57 \pm 0,12 \text{ g/m}^2$ ) e o valor inferior, para o filme de CMC com incorporação de 25% de G e CD ( $53,13 \pm 8,35 \text{ g/m}^2$ ). Como se pode verificar pela tabela 6, à medida que a concentração de glicerol aumenta nos filmes, a gramagem também aumenta. Mas tal não ocorre para os filmes com incorporação de RV, pois o filme com maior concentração de glicerol apresenta um valor inferior aos restantes filmes

com incorporação deste agente AM. Este resultado não era esperado, pois à medida que se adicionam agentes (plastificantes, antimicrobianos, entre outros) maior é a quantidade de massa, logo maior é o valor da gramagem. Tal pode ter ocorrido, porque o tempo necessário para secagem da solução com incorporação de RV e obtenção do filme correspondente (9 dias), foi superior ao dos restantes que apenas demoraram 6 dias. Assim, os filmes com incorporação de RV podiam não estar totalmente secos, razão pela qual estes filmes apresentaram gramagens elevadas. Relativamente aos filmes com incorporação de CD e CI, a gramagem do filme com CD é inferior ao filme com CI. Este resultado é coerente, pois o teor de sólidos do filme com CI é superior, dado que está presente o resveratrol complexado com a HP- $\gamma$ -CD, enquanto no filme de CD apenas está presente a HP- $\gamma$ -CD. No entanto, em ambos os filmes o valor da gramagem deveria ser equivalente ao filme de RV e 25% G, pois a quantidade de solução colocada nas caixas de Petri foi ajustada de modo a obter-se a mesma gramagem. Possivelmente este resultado poderá dever-se mais uma vez ao maior teor de humidade do filme de RV e 25% G.

Relativamente ao valor da espessura dos filmes de CMC testados, como também se visualiza na tabela 6, os valores variaram entre  $38,10 \pm 1,56 \mu\text{m}$  e  $98,00 \pm 0,85 \mu\text{m}$ , sendo o valor mais baixo o do filme com incorporação de CD e o mais elevado o do filme com incorporação de RV. Este resultado deve-se ao facto de a gramagem afetar a espessura, isto é, o filme com maior gramagem é aquele que também apresenta maior espessura e vice-versa. No entanto, a espessura do filme apenas com o biopolímero (CMC) deveria ser inferior aos restantes filmes tal como foi demonstrado noutros estudos [93], [97]. Mas o valor da espessura do filme de CMC com 10% G apresentou um valor inferior a este filme, assim como o filme de CD. Para além do já mencionado efeito da gramagem sobre a espessura, também o glicerol e os agentes AM podem afetar as ligações entre as cadeias de CMC, alterando assim a microestrutura do filme com conseqüente impacto sobre a espessura [88], [92]. De um modo geral, pelos resultados obtidos, a incorporação dos agentes AM nos filmes de CMC aumentou a gramagem e a espessura, comparativamente com os filmes controlo, o que indica que o RV e CI alteraram o arranjo estrutural das cadeias do polímero nos filmes.

Comparando os resultados dos valores de espessura obtidos nos filmes de CMC descritos anteriormente, estes não foram muito distintos de outros estudos de filmes de CMC. Por exemplo, no estudo desenvolvido por Dashipour *et al.* 2015 verificou-se que a espessura dos filmes de 1% (m/v) de CMC com incorporação de 1,2 e 3% (v/v) de óleo essencial de *Zataria multiflora* variou entre 35 e 85  $\mu\text{m}$  [93]. Outro exemplo foi o estudo desenvolvido por Dashipour *et al.* 2013 que descreve que a espessura dos filmes de 1% (m/v) de CMC com incorporação de 1,2 e 3% (v/v) de óleo essencial de cravinho variou entre 34 e 90  $\mu\text{m}$  [97].

Nos materiais para embalagem, a capacidade de resistência e o alongamento são propriedades importantes que devem ser avaliadas, pois assim é possível prever as suas

propriedades mecânicas em futuras aplicações alimentares [93]. Na tabela 7 encontram-se os valores obtidos para as propriedades mecânicas analisadas, as quais foram: o módulo elástico, o índice de tração e por último o alongamento. É importante referir que em diversos estudos relativos à caracterização de filmes, uma das propriedades mecânicas analisadas é a resistência à tração. Mas pelo facto de os filmes obtidos apresentarem valores de gramagem diferentes, normalizou-se a resistência à tração com a gramagem, avaliando-se assim ao índice de tração.

**Tabela 7:** Propriedades mecânicas dos filmes de CMC (média  $\pm$  desvio-padrão).

Filmes	Propriedades Mecânicas		
	Módulo Elástico (MPa)	Índice de tração (Nm/g)	Alongamento (%)
CMC	5766,91 $\pm$ 751,87	64,4 $\pm$ 0,71	4,57 $\pm$ 0,33
CMC + 10% G	4700,10 $\pm$ 269,34	59,53 $\pm$ 2,80	8,27 $\pm$ 0,97
CMC + 25% G	3481,91 $\pm$ 246,28	39,47 $\pm$ 3,36	10,19 $\pm$ 1,93
CMC + RV	448,07 $\pm$ 277,51	12,53 $\pm$ 0,93	32,32 $\pm$ 11,70
CMC + 10% G + RV	377,52 $\pm$ 194,81	9,17 $\pm$ 3,45	25,55 $\pm$ 3,30
CMC + 25% G + RV	268,69 $\pm$ 144,32	8,63 $\pm$ 4,09	25,06 $\pm$ 7,81
CMC + 25% G + CD	2912,19 $\pm$ 653,49	8,7 $\pm$ 1,13	13,58 $\pm$ 4,95
CMC + 25% G + CI	1371,675 $\pm$ 412,14	13,95 $\pm$ 4,88	1,81 $\pm$ 0,55

CMC (Carboximetilcelulose); G (Glicerol); RV (Resveratrol); CD (Ciclodextrina); CI (Complexo de inclusão).

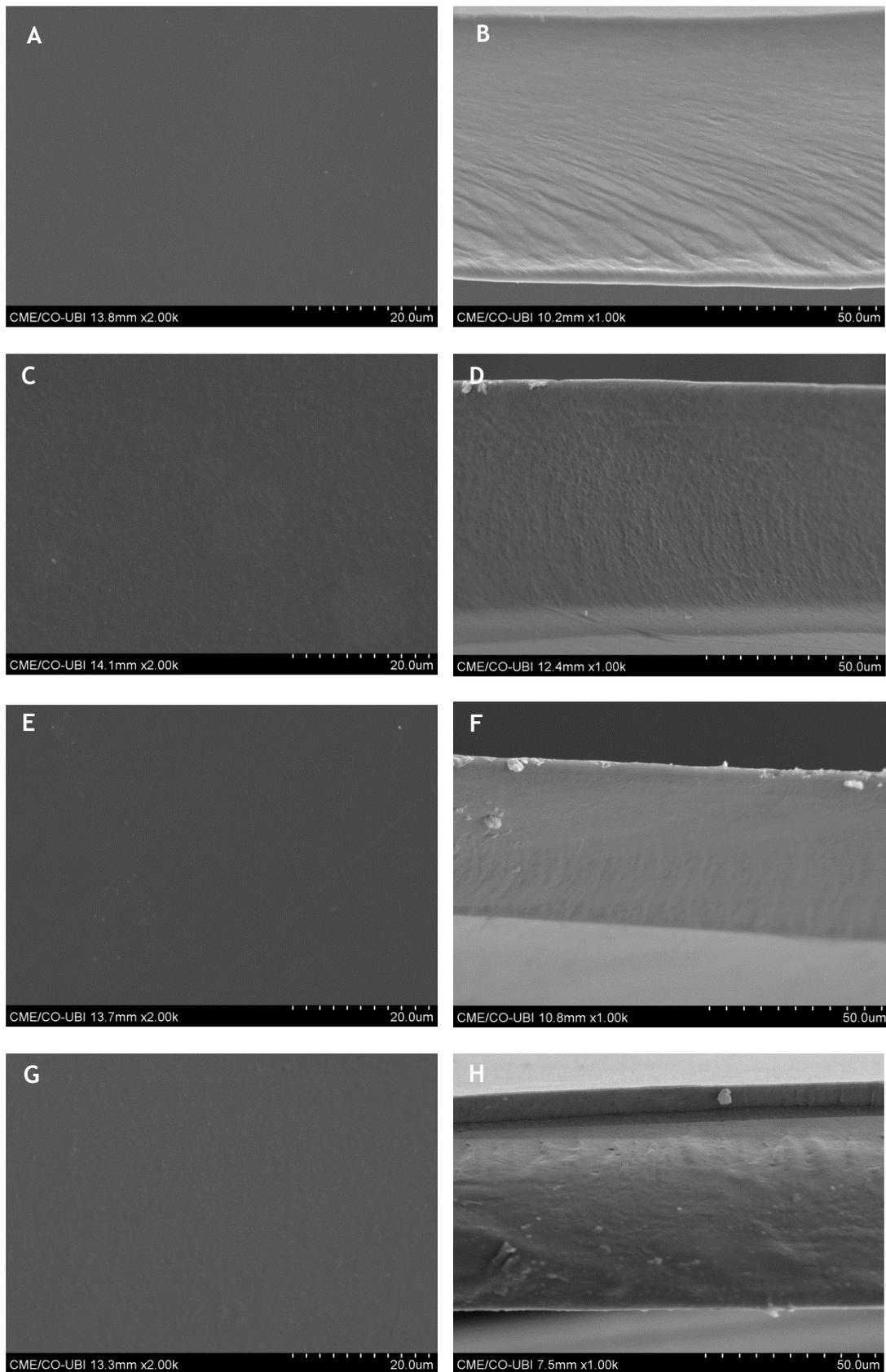
Segundo os resultados obtidos, o filme controlo de CMC foi o que apresentou o maior valor do ME (5766,91  $\pm$  751,87 MPa) e de IT (64,4  $\pm$  0,71 Nm/g), também apresentando o segundo valor mais baixo de A (4,57  $\pm$  0,33 %). Estes resultados podem dever-se às ligações por pontes de hidrogénio entre as cadeias da CMC, pois estas ligações contribuem para uma maior coesão e uma baixa flexibilidade em filmes que não contêm um plastificante [71]. Como se pode observar na tabela 7, à medida que a concentração de glicerol aumenta, os valores do ME e de IT diminuem, enquanto os valores de A aumentam. Ao assumir que o glicerol é uma molécula de baixo peso molecular, esta ocupa os espaços intermoleculares entre as cadeias do polímero e como tal reduz a formação de ligações por pontes de hidrogénio entre as cadeias [89]. Consequentemente, a mobilidade molecular aumenta obtendo-se um filme mais flexível [89]. A incorporação de RV levou a uma diminuição do ME e do IT, tornando assim os filmes mais suscetíveis à rutura. Segundo a literatura, a diminuição do IT é um comportamento típico deste tipo de filmes, em que a incorporação de compostos não miscíveis pode provocar descontinuidades estruturais na matriz do polímero, diminuindo assim as forças de coesão [89], [98], [99]. Outra possível justificação para os valores obtidos das propriedades de resistência pela incorporação de RV pode estar relacionada com as possíveis alterações estruturais induzidas por este agente AM na matriz polimérica (CMC) [89].

O RV pode ter formado pequenas zonas cristalinas nos filmes de CMC, provocando assim a diminuição da tensão de rutura do filme, assim como a diminuição do ME [89]. No entanto o alongamento aumentou, o que pode indicar que o resveratrol pode ter tido um efeito semelhante ao do glicerol, tal como descrito anteriormente.

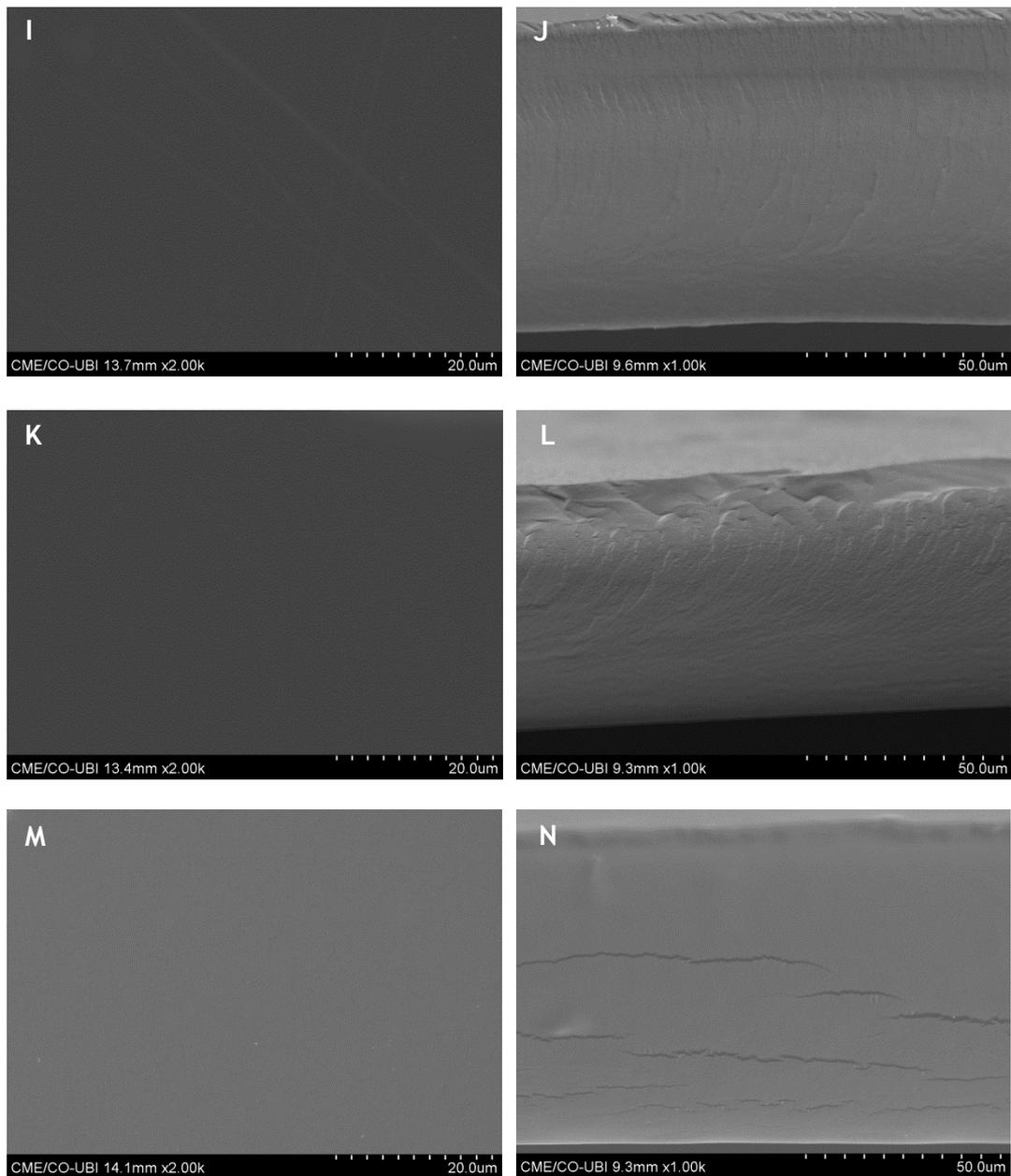
A incorporação de CD tornou os filmes de CMC quebradiços, e portanto difíceis de manusear, o que se justifica pelo facto de os valores de IT do filme com incorporação de CD serem inferiores aos de RV (com exceção do filme CMC + 25% G+ RV), como se visualiza na tabela 7. Atendendo que os grupos hidroxilo presentes nas CDs podem formar ligações secundárias com outros grupos químicos, podem reduzir a mobilidade molecular dos polímeros em que se encontram incorporadas, como tal esperar-se-ia uma diminuição do A e um aumento do ME, com a incorporação da CD [100]. Contudo, verificou-se que o filme CMC + 25% G + CD comparativamente ao filme CMC + 25% G apresenta maior A, e menor ME e IT. Este resultado deve-se ao facto, de o teor de glicerol adicionado (25%) ter como base a massa total dos polímeros (CMC + CD) no primeiro caso, e apenas a massa de CMC no segundo caso. Assim, a quantidade de glicerol é superior no filme CMC + 25% G + CD, resultando num filme mais flexível devido ao efeito plastificante do glicerol. O filme CMC + 25% G + CI, comparativamente ao filme de RV + 25% G e ao filme CMC + 25% G + CD, apresenta um valor muito inferior de A. Provavelmente porque o CI incorporado na matriz de CMC interage fortemente com a matriz polimérica, restringindo o seu movimento e como tal diminuindo o A. Também os valores de ME e IT diminuíram comparativamente ao filme CMC + 25% G. O aumento do valor de IT, comparativamente com o filme CMC + 25% G + RV, pode dever-se ao aumento das ligações estruturais entre o polímero e o CI. Em suma, os filmes com incorporação de agentes AM tornaram-se mais elásticos e menos resistentes, comparativamente com filme só de CMC.

Recorrendo à técnica de Microscopia Eletrónica de Varrimento pretendeu-se analisar a estrutura morfológica dos filmes de CMC, na superfície e na secção transversal, sendo as imagens apresentadas na figura 14. Durante a preparação das amostras para a análise da microestrutura dos filmes, não foi possível avaliar o filme de CI, pois como se tornou muito quebradiço, durante o processo de criofratura a amostra quebrou totalmente. Segundo as imagens da figura 14A e 14B, a estrutura do filme de CMC pode ser considerada homogénea, contínua, compacta, lisa e sem irregularidades. Estes resultados coincidem com os encontrados noutros estudos para filmes de CMC [12], [93], [97]. A adição de glicerol não alterou a superfície dos filmes, tal como se observa nas figuras 14E, 14F, 14I e 14J. A incorporação de RV (figuras 14C, 14D, 14G, 14H, 14K e 14L) não provocou irregularidades consideráveis nos filmes, independentemente da concentração de glicerol, tal como observado por Pastor *et al.* 2013 em filmes de MC (2% m/v) com incorporação de RV (0,1 % m/v) [89].

As alterações estruturais são mais pronunciadas na superfície dos filmes CMC + RV (figura 14C) e CMC + 10% G + RV (figura 14G), comparativamente com o filme CMC + 25% G + RV (figura 14K), o qual apresenta uma superfície mais homogênea. Tal pode ter ocorrido, devido às forças retrativas induzidas pela matriz polimérica da CMC durante a evaporação do solvente, no processo de secagem dos filmes [93]. Relativamente ao filme CMC + 50% G + CD (figura 14M e 14N) verifica-se a presença de fissuras na imagem relativa ao corte do filme. Estas fissuras poderão ter ocorrido aquando do processo de criofratura, possivelmente devido ao elevado teor de glicerol presente no filme. Assim pode-se concluir que a incorporação de RV nos filmes de CMC não alterou a sua estrutura, contrariamente ao observado por adição de óleos essenciais que provocavam descontinuidades na matriz de filmes de derivados de celulose [72], [93], [97], [98].



**Figura 14:** Imagens da morfologia dos filmes de CMC obtidas por microscopia eletrônica de varrimento. À esquerda imagens da superfície dos filmes; à direita imagens do corte transversal. (A) e (B) filme CMC; (C) e (D) filme CMC+RV; (E) e (F) filme CMC+10%G; (G) e (H) filme CMC+10%G+RV; A ampliação encontra-se indicada nas micrografias.



**Figura 14 (continuação):** Imagens da morfologia dos filmes de CMC obtidas por microscopia eletrónica de varrimento. À esquerda imagens da superfície dos filmes; à direita imagens do corte transversal. (I) e (J) filme CMC+25%G; (K) e (L) filme CMC+25%G+RV; (M) e (N) filme CMC+50%G+CD; A ampliação encontra-se indicada nas micrografias.

### 5.1.2. Avaliação da atividade antimicrobiana dos filmes de carboximetilcelulose

A atividade antimicrobiana dos filmes de CMC foi testada de forma qualitativa contra *C. coli* 873 e *C. jejuni* 225421 pelo teste de difusão em disco. Este teste é um método simples e de fácil aplicação, o qual é normalmente utilizado como um passo de *screening*, de forma a testar se o agente AM incorporado na matriz do filme inibe o crescimento microbiano [16]. Relativamente às estirpes, *C. coli* 873 e *C. jejuni* 225421, foram escolhidas pelo facto de serem estirpes isoladas de fontes humanas e alimentares respetivamente, e já estarem caracterizadas geneticamente e ser conhecido o seu antibiograma [4]. Os discos dos filmes testados apresentavam 1 cm de diâmetro e as concentrações dos agentes AM em percentagem (% m/v), por disco de filme, encontram-se apresentadas na tabela 8. Como se observou que os filmes não formaram um halo de inibição, as propriedades antimicrobianas dos filmes apenas foram avaliadas pela presença ou ausência do crescimento das bactérias em estudo, na área de contacto do disco do filme com a superfície de agar de forma visual. Os resultados obtidos encontram-se registados na tabela 9.

**Tabela 8:** Concentração (% m/v) dos agentes antimicrobianos presente em cada 1 cm de disco de filme.

Agente antimicrobiano	Concentração (% m/v)
RV	0,05
CI	0,13

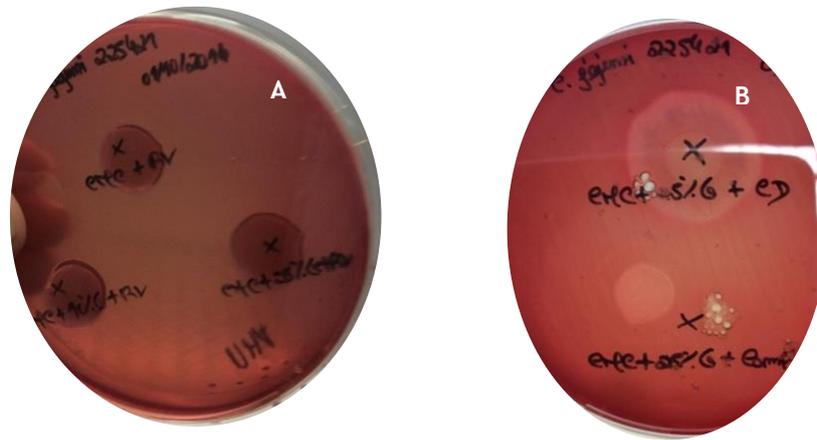
**Tabela 9:** Avaliação da atividade antimicrobiana, por difusão em disco, de filmes CMC contra *C. coli* e *C. jejuni*.

Filmes	Área de contacto	
	<i>C. coli</i> 873	<i>C. jejuni</i> 225421
CMC	-	-
CMC + 10% G	-	-
CMC + 25% G	-	-
CMC + RV	+	+
CMC + 10% G + RV	+	+
CMC + 25%G + RV	+	+
CMC + 25% G + CD	-	-
CMC + 25% G + CI	+	+

+ Representa efeito inibitório; - Representa ausência de efeito inibitório.

Pelos resultados obtidos na tabela 9, os filmes controlo (CMC; CMC+10%G; CMC+25%G) e o filme com incorporação de CD, não apresentaram atividade antimicrobiana assim como o filme CD, tal como esperado atendendo que não têm incorporado os agentes AM. Relativamente aos filmes de CMC com incorporação de RV e CI, não se verificou a formação de um halo de inibição, tal como se visualiza na figura 15. No entanto, como visualmente não ocorreu crescimento das bactérias ao nível do filme, ou seja, na área de contacto deste com a superfície de agar, sugere que o RV e o CI se libertaram do filme e difundiram-se pelo agar. Como está descrito por Duarte *et al.* 2015, que estes compostos possuem atividades bacteriostática e bactericida nas estirpes em estudo [49] a razão pela qual os filmes de RV e CI não formaram um halo de inibição nas estirpes testadas, pode dever-se à interação entre os agentes AM com o biopolímero (CMC) que conseqüentemente não permitiu a libertação total destes compostos. Contudo, existem outros fatores que influenciam a libertação de agentes ativos incorporados em filmes para o meio, nomeadamente a polaridade e a pouca solubilidade [2], [23]. Por exemplo, o efeito observado nos filmes de RV pode dever-se à baixa afinidade química e pouca solubilidade deste composto em solventes aquosos [89]. No estudo desenvolvido por Pastor *et al.* 2013 verificou-se que filmes de quitosano (1% m/m) e filmes de MC (2% m/m) com incorporação de 0,01% (m/v) e 0,1% (m/v) de RV não apresentaram atividade antifúngica contra *Penicillium italicum* e *Botrytis cinerea*, ainda que tivesse sido previamente demonstrado que a utilização isolada deste composto apresentava atividade contra fungos [89].

Não se verificaram diferenças entre o efeito antibacteriano do RV e de CI. Sabe-se que o CI apresenta um efeito anti-*Campylobacter* mais lento quando comparado com o RV na forma pura, o que pode significar uma libertação mais controlada e um efeito mais controlado deste composto AM [49]. Contudo, existem outros estudos que demonstraram a atividade antibacteriana de agentes AM, nomeadamente óleos essenciais, incorporados em filmes de CMC [93], [97], [101]. Por exemplo, no estudo de Dashipour *et. al* 2015 verificou-se a atividade antimicrobiana de filmes de 1% (m/v) de CMC com incorporação de 1, 2 e 3% (v/v) de óleo essencial de *Zataria multiflora* contra *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Salmonella Typhimurium*, pelo método de difusão em disco [93]. O que indica que os compostos lipofílicos que constituem este óleo essencial foram libertados do filme de CMC, tendo assim ação contra as estirpes testadas, no entanto as bactérias Gram-negativas demonstraram ser mais resistentes do que as bactérias Gram-positivas devido à presença da membrana externa que é mais impermeável a este tipo de compostos [93]. Porém, é difícil comparar os resultados obtidos neste estudo com outros estudos devido às condições específicas dos ensaios, como por exemplo, o polímero que constitui o filme, o seu tamanho e a forma, o agente AM, o microrganismo alvo, entre outros fatores [13].



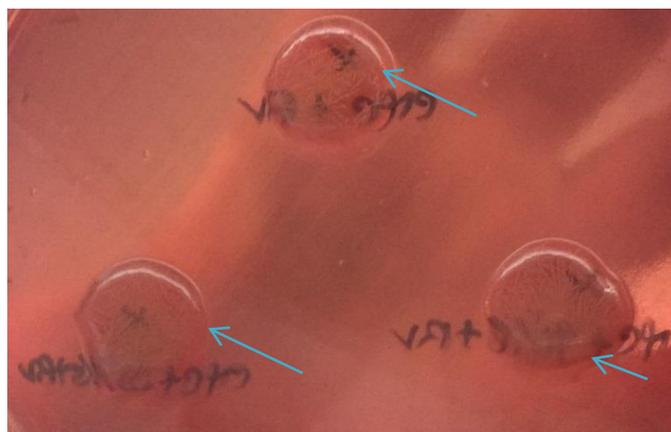
**Figura 15:** Fotografias do teste de difusão em disco dos filmes antimicrobianos de CMC em *C. jejuni* 225421 (A) ação de RV e (B) ação do CI e CD.

Tendo em conta que os filmes testados não apresentaram um halo de inibição e que o complexo de inclusão do RV apresenta atividade antimicrobiana de forma mais lenta, repetiram-se os ensaios. Inicialmente as placas de MHA (suplementadas com 5% de sangue desfibrinado de cavalo), inoculadas com *C. coli* 873 e *C. jejuni* 225421, na presença dos filmes de CMC (mantendo a mesma concentração dos agentes AM) foram incubadas durante 48h em condições de microaerofilia a 4°C. A temperatura foi escolhida de modo a simular a temperatura de refrigeração dos alimentos, nomeadamente a carne fresca de frango. Após o período de incubação verificou-se que os agentes AM testados difundiram-se para o meio de cultura, no entanto como os microrganismos não cresceram devido às condições inadequadas, as placas foram incubadas a 37°C por mais um período de 48h em microaerofilia, a fim de testar a eficácia do RV e do CI na inibição do crescimento das estirpes de *Campylobacter* em estudo. Após o período de incubação das placas referidas anteriormente, verificou-se que ocorreu crescimento em todas as placas. Os resultados obtidos foram semelhantes aos observados na tabela 9. Por isso, incubaram-se novamente as placas por um período de mais 24h, ou seja, num total de 72h para verificar se existia alguma diferença nos resultados. Mas tal não ocorreu, pois os resultados foram novamente semelhantes. Assim, concluiu-se que a temperatura de refrigeração e o tempo de incubação não influenciou a libertação dos agentes AM incorporados nos filmes de CMC. Em ambos os ensaios, observou-se que os filmes de CMC com incorporação de RV e CI de concentração igual a cinco vezes o MIC, inibiram por contacto as estirpes de *Campylobacter* em estudo. Deste modo foram testados filmes de CMC incorporados com concentração igual a 10 vezes o MIC de ambos os agentes AM (tabela 10).

**Tabela 10:** Concentração ( $\mu\text{g/mL}$ ) dos agentes antimicrobianos, igual a 10 vezes o MIC, incorporadas nos filmes de CMC.

Agente antimicrobiano (10 x MIC)	Concentração do agente antimicrobiano	
	( $\mu\text{g/mL}$ )	(% m/v)
RV	1000	0,1
CI	2500	0,25

Deste ensaio concluiu-se, que o RV e CI não inibiram o crescimento de ambas as estirpes de *Campylobacter*, mas foi novamente visível que não ocorreu crescimento destas bactérias na área de contacto dos filmes com a superfície de agar (tabela 11). No entanto foram observados pequenos cristais de RV nos filmes com incorporação deste agente AM, tal como se visualiza na figura 16. No estudo desenvolvido por Pastor *et al.* 2013 também foi observado em amostras de filmes de MC (2% m/m) com incorporação de maior concentração de RV (0,1% m/v), a formação de cristais com formas dendríticas comuns dos compostos moleculares na forma pura [89]. A formação dos cristais de RV nos filmes de CMC pode indicar que durante o processo de secagem dos filmes, o composto separou-se do biopolímero formando uma dispersão, quando o nível de saturação é alcançado [89], [102]. Assim concluiu-se que os filmes de CMC com incorporação de RV e CI, independentemente das concentrações testadas nestes ensaios (tabela 8 e tabela 10) não formaram um halo de inibição, mas inibiram o crescimento de *C. coli* e *C. jejuni* por contacto.



**Figura 16:** Fotografia do teste de difusão em disco dos filmes antimicrobianos de CMC em *C. jejuni* 225421 em que se visualizam os cristais de RV com concentração igual a 10 vezes o MIC (A) CMC + RV; (B) CMC + 10%G + RV; (C) CMC + 25%G + RV.

**Tabela 11:** Avaliação da atividade antimicrobiana por difusão em disco.

Filmes	Área de contacto	
	<i>C. coli</i> 873	<i>C. jejuni</i> 225421
CMC+RV	+	+
CMC + 10% G + RV	+	+
CMC + 25%G + RV	+	+
CMC + 25% G + CI	+	+

+ Representa efeito inibitório; - Representa ausência de efeito inibitório.

### 5.1.3. Modificação das propriedades dos filmes de carboximetilcelulose pela incorporação de ácidos gordos

Os filmes de CMC são eficazes como barreira ao oxigénio, dióxido de carbono e lípidos, mas são pouco resistentes à transmissão do vapor de água [94]. No presente estudo, analisou-se o grau de hidrofiliicidade da superfície dos filmes de CMC com incorporação de RV por ser facilmente incorporado nestes filmes, sendo a concentração utilizada de 750 µg/mL (isto é, 7,5 vezes o MIC para as estirpes de *Campylobacter* em estudo [49]). A incorporação do plastificante, o glicerol, foi apenas de 10% (m/m), pois segundo a literatura, a elevadas concentrações, as moléculas de glicerol podem agregar-se com outras moléculas de glicerol, levando à abertura da estrutura do polímero e consequentemente aumentando a permeabilidade às moléculas de água [94]. A técnica utilizada para determinar o grau de hidrofiliicidade e hidrofobicidade dos filmes foi a medição do ângulo de contacto com água, pois é uma forma simples de avaliação [59], [72]. Como se pode observar na tabela 12, a incorporação do glicerol diminuiu o ângulo de contacto do filme de CMC aproximadamente 10°, logo a hidrofiliicidade do filme aumentou. Este resultado deve-se à natureza hidrofílica das moléculas de glicerol, as quais favorecem a adsorção de moléculas de água e como tal diminuem o ângulo de contacto [94]. O RV aumentou ligeiramente o ângulo de contacto comparativamente com o filme incorporado apenas com glicerol, possivelmente devido à natureza lipofílica deste composto [89]. No entanto, comparativamente com o filme de CMC o filme CMC + 10%G + RV apresenta menor ângulo de contacto, mais uma vez devido à presença do glicerol.

As propriedades de barreira ao vapor de água dos filmes de CMC podem ser melhoradas ao incorporar substâncias hidrofóbicas, como por exemplo os lípidos [94]. Os ácidos gordos (AG), como por exemplo o ácido oleico (AO), são alguns dos derivados de lípidos que podem melhorar as propriedades de barreira à humidade de filmes hidrofílicos [94]. Em ensaios preliminares incorporaram-se em filmes de CMC o ácido esteárico (AE) e o ácido palmítico (AP). No entanto, após o período de secagem dos filmes, verificou-se que estes não ficaram homogéneos pois apresentaram grânulos, o que pode indicar que durante a preparação dos filmes, estes AG não foram devidamente homogeneizados, pois apresentam pontos de fusão

elevados ( $\approx 70^\circ$ ), isto é, estes AG solidificaram logo que a solução começou a arrefecer [103]. Por esta razão, optou-se por adicionar AG líquidos à temperatura ambiente e facilmente miscíveis com o biopolímero sem recorrer a elevadas temperaturas. Os AG adicionados foram o AO, o AL, o OA e o azeite. A razão pela qual o OA e o azeite foram escolhidos foi por serem constituídos por uma mistura de AG, sendo o AO um dos seus constituintes maioritários [59],[104]. Também foi estudado o efeito da incorporação do surfatante Tween 80, pois segundo a literatura é dos surfatantes mais utilizados para ajudar na emulsão dos AG incorporados em filmes de polissacáridos [94]. O ângulo de contacto com água foi medido na parte superior e inferior dos filmes de CMC com incorporação dos AG, com o intuito de avaliar alterações de hidrofiliidade. Os resultados encontram-se registados nas tabelas 13 e 14.

**Tabela 12:** Ângulo de contacto dos filmes de CMC e com incorporação de RV.

Filmes	Ângulo de contacto ( $^\circ$ )
	Água
CMC	52,61 $\pm$ 10,51
CMC+ 10%G	42,26 $\pm$ 2,11
CMC+10%G+RV	45,26 $\pm$ 2,75

**Tabela 13:** Ângulo de contacto dos filmes de CMC com incorporação de ácidos gordos sem adição de Tween 80 (média  $\pm$  desvio-padrão).

Filmes	Ângulo de contacto ( $^\circ$ )	
	Água	
	Superior	Inferior
CMC	54,25 $\pm$ 0,99	49,91 $\pm$ 0,78
AO	46,29 $\pm$ 2,66	44,43 $\pm$ 2,27
AO + RV	44,19 $\pm$ 4,63	45,1 $\pm$ 3,87
AL	58,32 $\pm$ 2,24	65,02 $\pm$ 5,5
AL + RV	39,92 $\pm$ 6,63	39,66 $\pm$ 3,67
OA	104,97 $\pm$ 1,31	55,37 $\pm$ 6,7
OA + RV	57,31 $\pm$ 6,59	51,06 $\pm$ 8,28
Azeite	71,17 $\pm$ 2,95	58,8 $\pm$ 6,11
Azeite + RV	50,72 $\pm$ 3,08	40,53 $\pm$ 2,95

CMC - carboximetilcelulose; G - glicerol; AO - ácido oleico; AL - ácido linoleico; OA - Óleo alimentar; RV- resveratrol.

De acordo com os resultados apresentados na tabela 13, os filmes de CMC com incorporação dos AG apresentaram comportamentos distintos. O AO tornou ainda mais hidrofílicos os filmes de CMC, ou seja, o ângulo de contacto é menor comparativamente com o filme controlo (CMC). Este resultado é oposto ao que se esperaria, pois a característica hidrofóbica do AO

permite diminuir a capacidade de absorção das moléculas de água pelas macromoléculas de CMC [94]. Logo, os resultados obtidos podem indicar que existiu uma distribuição não homogênea deste lípido nos filmes testados. No entanto, a concentração de AO incorporada nos filmes também pode ter influenciado os baixos resultados do ângulo de contacto obtidos, isto é, se a concentração do AO fosse maior, os valores do ângulo de contacto podiam ter aumentado [105]. No estudo desenvolvido por Vargas *et al.* 2009 verificou-se que em filmes de 1% (m/m) de quitosano, a incorporação de diferentes concentrações de AO, nomeadamente, 0, 1, 2 e 4% (m/v), influenciou os valores do ângulo de contacto, pois quanto maior é a concentração do AG, maiores são os valores do ângulo de contacto [105]. Tal comportamento pode ser atribuído ao desenvolvimento de interações moleculares entre os componentes que formam os filmes [105].

Relativamente aos restantes AG em estudo, isto é, o AL, o OA e o azeite diminuíram a hidrofiliabilidade (maior ângulo de contacto) dos filmes de CMC, tal como esperado. A incorporação de AG pode imobilizar as cadeias do polímero, que por sua vez, reduz a tendência da CMC interagir com as moléculas de água [94]. O OA foi o único que conferiu hidrofobicidade ao filme de CMC ( $104,97 \pm 1,31^\circ$ ). A incorporação do azeite diminuiu significativamente a hidrofiliabilidade do filme de CMC ( $71,17 \pm 2,95^\circ$ ). Estes resultados podem dever-se aos poucos locais livres que existem na matriz do polímero para interagirem com a água, devido ao aumento das cadeias hidrofóbicas dos AG que constituem o OA e o azeite [105]. A diferença observada entre o OA e o azeite pode estar relacionada com a sua constituição de AG, por exemplo, segundo a literatura o OA é constituído entre 13-40% de AO e 40-74% de AL, enquanto o azeite é constituído entre 55-83% e 3,5-21% respetivamente [104]. Pelos resultados obtidos o AL apresentou valores do ângulo de contacto superiores (topo:  $58,32 \pm 2,24^\circ$ ; inverso:  $65,02 \pm 5,5^\circ$ ) ao do AO (topo:  $46,29 \pm 2,66^\circ$ ; inverso:  $44,43 \pm 2,27^\circ$ ), quer na parte superior quer na inferior, o que pode indicar que pode ser uma das razões pela qual os valores do ângulo de contacto do OA foram superiores aos do azeite, contudo estes óleos vegetais apresentam outros constituintes, nomeadamente o ácido palmítico, fosfolípidos, tocoferóis, entre muitos outros [104].

De um modo geral, a incorporação do RV diminuiu o ângulo de contacto, comparativamente com os filmes dos AG sem o RV. Devido à natureza lipofílica do RV, a inclusão deste composto deveria aumentar os valores do ângulo de contacto com água, mas tal não ocorreu, o que pode indicar que a incorporação deste composto não provocou alterações estruturais no polímero.

Comparando os resultados obtidos da tabela 13 com os da tabela 14, a adição do surfatante (Tween 80) nos filmes de CMC incorporados com o AO e o AL, aumentou o ângulo de contacto tanto na face superior como na face inferior, isto é, diminuiu a hidrofiliabilidade dos filmes. Mas tal não se verificou nos filmes com incorporação de OA e de AL, pois diminuiu o ângulo de

contacto. Estes resultados poderão significar que o Tween 80 interagiu de forma diferente com os AG estudados. Provavelmente este surfatante melhora a estabilidade da emulsão dos AG puros, contrariamente ao que aconteceu com o AO e o azeite. À semelhança do que aconteceu nos filmes sem adição de surfactante, verificou-se que a incorporação do RV nos filmes com Tween 80 diminuiu o ângulo de contacto. Provavelmente este resultado deveu-se ao maior teor de humidade dos filmes com incorporação de RV, comparativamente ao que não contém este agente AM.

Comparando os valores do ângulo de contacto obtidos na parte superior e inferior dos filmes, com e sem adição do surfatante verificou-se que, em geral, os valores são muito diferentes. Assim, concluiu-se que a distribuição dos AG nos filmes não foi homogénea. Outra possível explicação é que uma porção dos lípidos tende a migrar da parte inferior para a superfície do filme, devido à diferença de densidades das duas fases [94]. No estudo de Pereda *et al.* 2012 verificou-se que tal acontecia em filmes de quitosano 2% (m/v) com incorporação de 15% (m/m) de azeite [59]. Em suma, o efeito dos diferentes lípidos pode estar relacionado com a sua capacidade de formar emulsões estáveis, afetando assim a distribuição dos lípidos nos filmes [106].

**Tabela 14:** Ângulo de contacto dos filmes de CMC com incorporação de ácidos gordos com adição de Tween 80 (média  $\pm$  desvio-padrão).

Filmes	Ângulo de contacto (°)	
	Superior	Inferior
AO	53,59 $\pm$ 2,22	48,35 $\pm$ 6,66
AO + RV	39,41 $\pm$ 10,73	39,49 $\pm$ 8,48
AL	60,69 $\pm$ 2,55	75,11 $\pm$ 4,46
AL + RV	49,41 $\pm$ 2,64	48,55 $\pm$ 2,7
OA	81,09 $\pm$ 17,65	53,26 $\pm$ 0,52
OA + RV	38,97 $\pm$ 6,65	49,97 $\pm$ 4,38
Azeite	44,94 $\pm$ 4,61	52,68 $\pm$ 2,78
Azeite + RV	44,38 $\pm$ 6,71	25,82 $\pm$ 6,25

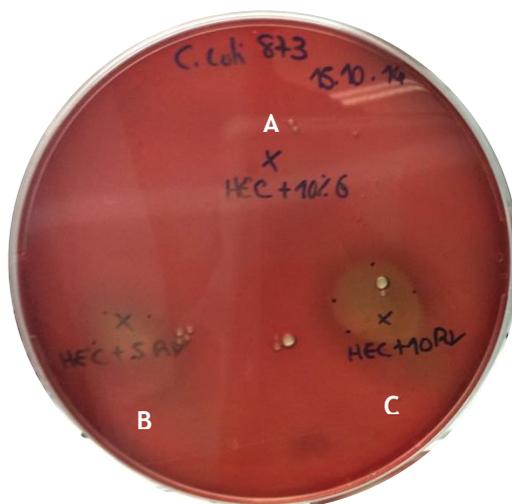
CMC - Carboximetilcelulose; G - Glicerol; AO - Ácido oleico; AL - Ácido linoleico; OA - Óleo alimentar; RV- Resveratrol.

## 5.2. Filmes de hidroxietilcelulose

De acordo com os resultados apresentados no ponto 5.1.2., verificou-se que os filmes de CMC com incorporação dos agentes AM em estudo, apenas inibiram as estirpes de *Campylobacter* testadas na área de contacto do disco do filme com a superfície de agar. Por esta razão foram testados novos biopolímeros para obter um filme antimicrobiano com as características desejadas, isto é, um filme que apresentasse boas propriedades físicas e que formasse um

halo de inibição contra *C. coli* e *C. jejuni*. Inicialmente foi testada a HEC, a qual é um éter de celulose de carga não iónica [58]. Nos ensaios preliminares os filmes de HEC foram inicialmente preparados a 1% (m/m), incorporou-se o glicerol como plastificante a 10% (m/m) pela razão explicada no ponto 5.1.3. Como agente AM apenas se incorporou o RV, tendo em conta que é melhor incorporado nos filmes, isto é, não torna os filmes quebradiços como acontece com os filmes de CI. As concentrações de RV testadas foram 500 µg/mL (0,05% num cm de filme) e 1000 µg/mL (0,1% num cm de filme).

A atividade antimicrobiana foi apenas testada contra *C. coli* 873 e verificou-se que, nos ensaios de difusão em disco, durante a colocação dos discos dos filmes nas placas de agar, estes se solubilizaram (figura 17). Após o período de incubação de 48h, foram observados halos de inibição de 19 mm no caso da concentração de RV mais baixa (figura 17B) e de 22 mm para a concentração mais elevada (figura 17C). Tendo em conta os resultados obtidos, verificou-se que com os filmes de HEC foi possível obter halos de inibição contra *C. coli* 873, pois como o polímero se solubilizou ao entrar em contacto com o agar, o agente AM libertou-se e exerceu a sua atividade, razão pela qual a concentração mais elevada deste agente AM formou o maior halo de inibição.



**Figura 17:** Fotografia do teste de difusão em disco dos filmes de HEC a 1% (m/m). A - Filme controlo; B - HEC com 0,05% de RV; C - HEC com 0,1% de RV.

Para a continuação deste estudo, foram preparados filmes de HEC a 4% (m/m), uma vez que se verificou que este polímero se dissolveu facilmente mesmo a teores de sólidos mais elevados (figura 18). Os filmes com incorporação de CD foram testados de forma a analisar se existia compatibilidade com a HEC. Os filmes preparados com a gramagem teórica total, com 10% de glicerol, eram difíceis de manusear e quebradiços, tal como os filmes de CMC. Deste modo, foi necessário otimizar os filmes de HEC com CD, tendo estes sido preparados de forma a conterem o teor de sólidos totais igual ao filme com incorporação de RV e de 10% de glicerol, isto é, de forma a ter uma gramagem teórica semelhante a este filme. O mesmo

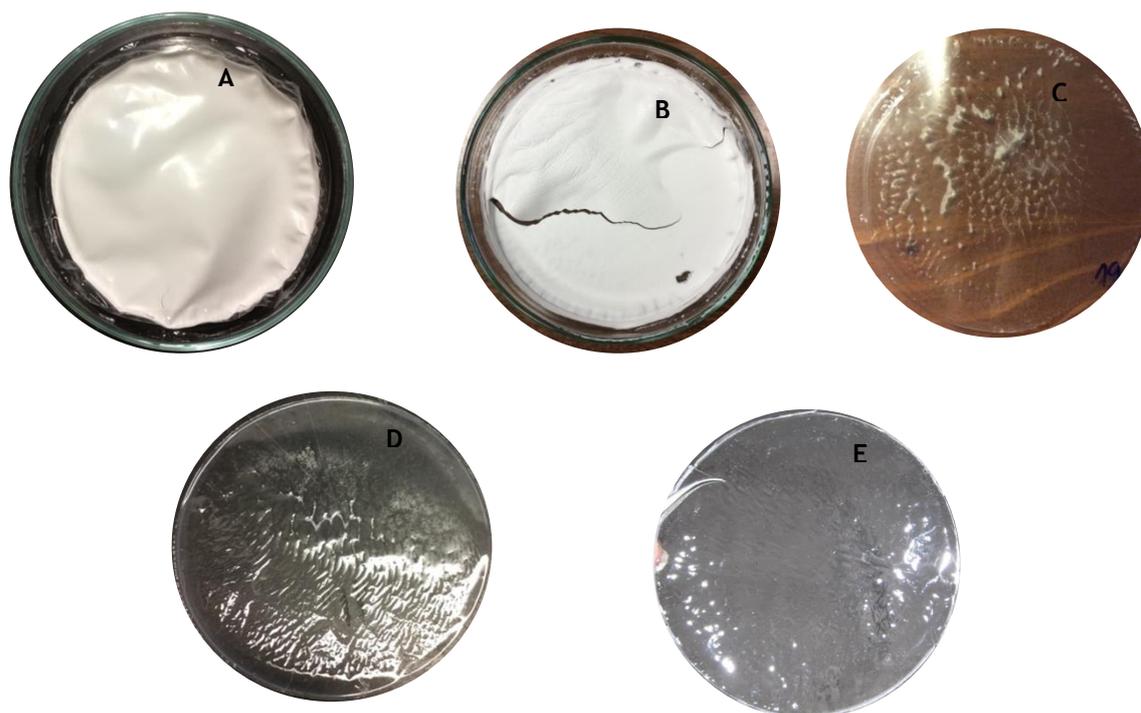
sucedeu com o filme com incorporação de Cl, pois o comportamento deste filme foi semelhante ao do filme com incorporação de CD.



**Figura 18:** Filme de hidroxietilcelulose a 4% (m/m).

### **5.3. Filmes de acetato de celulose**

Também foram preparados filmes de acetato de celulose, o qual é um éster de celulose [58]. Este derivado de celulose difere na solubilidade relativamente à CMC e à HEC, pois ao contrário destes biopolímeros, apenas é solúvel em solventes orgânicos como por exemplo, a acetona [55]. Diversos estudos descrevem a preparação de filmes de AC [66], [107]-[109], numa concentração de 1% (m/m). Inicialmente os filmes foram secos numa atmosfera controlada de 22°C e 50% HR em caixas de Petri de vidro, mas obteve-se um filme opaco de cor branca (figura 19A) e nas paredes da caixa de vidro formou-se uma película transparente. Assim, outras temperaturas de secagem foram testadas de forma a obter um filme transparente, tais como: 40°C, 50°C, 70°C, 80°C, 90°C e 100°C. Alguns exemplos são apresentados na figura 19. A temperatura de secagem à qual se obteve um filme de AC transparente foi de 100°C. Como o RV pode perder a sua atividade acima dos 55°C [110], não foi incorporado neste filme, apesar do excelente aspeto que o filme apresentava.



**Figura 19:** Fotografias de filmes de AC obtidos a diferentes temperaturas de secagem. A - 22°C; B-40°C; C-70°C; D- 90°C e E-100°C.

#### **5.4. Filmes em bicamada: acetato de celulose e hidroxietilcelulose**

O facto de terem sido obtidos halos de inibição nos filmes de HEC testados com incorporação de RV (tal como descrito no ponto 5.2.), e de se terem obtido filmes transparentes de AC, pensou desenvolver-se um filme em bicamada com o intuito de ultrapassar as limitações individuais apresentadas por cada um desses polímeros. Deste modo, realizaram-se testes preliminares de forma a escolher a formulação correta para a obtenção de um filme em bicamada constituído por uma camada externa de AC e uma camada interna de HEC. Foi necessário assegurar a compatibilidade entre os polímeros, isto é, entre as duas camadas, através da incorporação de um agente de ligação assim como também assegurar a compatibilidade dos agentes AM no filme. A utilização de agentes de ligação, como por exemplo as lecitinas, entre diferentes camadas, pode compensar a incompatibilidade entre diferentes polímeros [67]. Assim, utilizou-se como agente de ligação a lecitina de soja. O estudo iniciou-se pela preparação do filme em bicamada e pela verificação da compatibilidade entre a HEC e o AC.

A compatibilidade entre os biopolímeros testados pode ser confirmada pela medição da espessura, isto é, se a espessura do filme em bicamada for o resultado da soma da espessura dos filmes de AC e HEC em monocamada, indica que estes filmes ficaram sobrepostos, mas se

o resultado for inferior indica que ocorreu coesão entre as diferentes camadas [67]. A medição da espessura do filme resultante encontra-se registada na tabela 15.

**Tabela 15:** Espessura dos filmes em monocamada e bicamada de AC e HEC (média  $\pm$  desvio-padrão).

Filmes		Espessura ( $\mu\text{m}$ )
Monocamada	AC	$52,7 \pm 6,89$
	HEC	$37,5 \pm 13,37$
Bicamada	AC + HEC	$70,5 \pm 9,52$

AC - Acetato de celulose; HEC - Hidroxietilcelulose.

A espessura do filme em monocamada de AC foi de  $52,7 \pm 6,89 \mu\text{m}$  e do filme em monocamada de HEC foi de  $37,5 \pm 13,37 \mu\text{m}$ . Deste modo, se não tivesse ocorrido coesão entre as diferentes camadas, a espessura total do filme em bicamada seria de  $90,2 \mu\text{m}$ . Contudo, as medições demonstraram que a espessura total foi de  $70,5 \pm 9,52 \mu\text{m}$ , o que indicou que os filmes em monocamada de HEC e AC misturaram-se parcialmente, resultando assim na coesão das diferentes camadas (figura 20).



**Figura 20:** Fotografia do filme em bicamada constituído por uma camada de AC e por outra de HEC.

Deste modo, os agentes AM (RV e CI) foram incorporados no filme de HEC, sendo esta a camada ativa. As concentrações de RV incorporadas foram:  $500 \mu\text{g/mL}$  ( $\text{RV}_1$ ) e  $750 \mu\text{g/mL}$  ( $\text{RV}_2$ ) e as concentrações de CI foram  $2500 \mu\text{g/mL}$  ( $\text{CI}_1$ ) e  $7500 \mu\text{g/mL}$  ( $\text{CI}_2$ ). As concentrações de RV e de CI testadas basearam-se no estudo prévio de Duarte *et al.* 2015 [49] e nos resultados obtidos da atividade antimicrobiana no ponto 5.1.2. No entanto, na camada ativa após a adição da lecitina de soja, adicionou-se 10% (m/m) de glicerol, de forma a aumentar a flexibilidade dos filmes, atendendo a que a CD e o CI tornaram os filmes quebradiços e portanto difíceis de manusear.

### 5.4.1. Avaliação das propriedades físicas dos filmes em bicamada

Os filmes foram inicialmente caracterizados em termos de gramagem, espessura e teor de matéria seca. Estas características foram agrupadas em propriedades estruturais, cujos valores obtidos se encontram registados na tabela 16.

**Tabela 16:** Valores das propriedades estruturais dos filmes em bicamada (média  $\pm$  desvio-padrão).

Filmes	Propriedades Estruturais		
	Gramagem ( $\text{g/m}^2$ )	Espessura ( $\mu\text{m}$ )	Teor de matéria seca (%)
C	$70,90 \pm 1,48^a$	$56,70 \pm 1,36^a$	$87,07 \pm 0,83^a$
CD	$42,79 \pm 2,10^b$	$37,90 \pm 1,49^b$	$94,30 \pm 1,16^b$
RV <sub>1</sub>	$75,40 \pm 1,00^c$	$53,70 \pm 1,32^a$	$85,76 \pm 0,33^a$
RV <sub>2</sub>	$75,33 \pm 0,79^c$	$52,00 \pm 0,89^a$	$86,78 \pm 1,42^a$
CI <sub>1</sub>	$57,17 \pm 0,57^d$	$40,30 \pm 3,68^b$	$93,76 \pm 1,33^b$
CI <sub>2</sub>	$43,81 \pm 0,77^b$	$41,00 \pm 8,24^b$	$94,22 \pm 1,12^b$

C (Filme controlo); CD (Filme controlo de ciclodextrina); RV<sub>1</sub> (Filme com 500  $\mu\text{g/mL}$  de resveratrol); RV<sub>2</sub> (Filme com 750  $\mu\text{g/mL}$  de resveratrol); CI<sub>1</sub> (Filme com 2500  $\mu\text{g/mL}$  de complexo de inclusão); CI<sub>2</sub> (Filme com 7500  $\mu\text{g/mL}$  de complexo de inclusão).

As diferentes letras presentes na mesma coluna indicam a diferença significativa ( $p < 0,05$ ).

De acordo com os resultados obtidos, a gramagem dos filmes variou entre  $42,79 \pm 2,10$  e  $75,40 \pm 1,00 \text{ g/m}^2$ . Comparando o filme C com os filmes de RV, CD e CI observaram-se diferenças significativas ( $p < 0,05$ ). Relativamente à concentração dos agentes AM, não se observaram diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre RV<sub>1</sub> e RV<sub>2</sub>, mas foram observadas entre CI<sub>1</sub> e CI<sub>2</sub>. A análise da espessura dos filmes é considerada um parâmetro importante, pois pode influenciar as propriedades biológicas e o prazo de validade do alimento que se encontra revestido [72]. A espessura obtida para os filmes em bicamada variou entre  $37,90 \pm 1,49$  e  $56,70 \pm 1,36 \mu\text{m}$ . Ao comparar a espessura do filme controlo (C) com os filmes de RV verificou-se que a incorporação do agente AM diminuiu a espessura do filme, contudo estas diferenças não foram significativas ( $p < 0,05$ ). Comparando a espessura do filme de CD com os filmes de CI, não se observaram diferenças significativas, assim como, entre os filmes com as diferentes concentrações dos agentes AM testadas (RV<sub>1</sub> com RV<sub>2</sub> e CI<sub>1</sub> com CI<sub>2</sub>).

Segundo a literatura ao aumentar a concentração do agente ativo incorporado em filmes de polissacáridos, a espessura dos filmes também aumenta [72], mas tal não se verificou nestes filmes em estudo. A possível razão pela qual a incorporação dos agentes ativos ter diminuído a espessura comparativamente com o filme C, pode estar relacionada com a natureza dos polímeros das duas camadas (AC e HEC) assim como os aditivos (o glicerol ou a lecitina de soja) uma vez que estes podem influenciar a espessura destes filmes pelas possíveis

interações que se formam com as matrizes poliméricas [67], [72]. Outra possível explicação para este facto pode dever-se à perda dos compostos presentes no filme durante o processo de secagem do mesmo, pois em alguns casos verificou-se a existência de uma película nas paredes da caixa de Petri. A formação desta película reduz a quantidade total de sólidos que contribui para a espessura dos filmes, tal como foi observado no estudo desenvolvido por Sánchez-González *et al.* 2011 em filmes de 1% (m/m) de HPMC e filmes de 1% (m/m) de quitosano com incorporação de 0,5, 1 e 2% (m/m) de óleo essencial de limão, óleo essencial de bergamota e óleo essencial de melaleuca [99].

Relativamente ao teor de matéria seca, os valores aumentaram nos filmes com incorporação de CD e de CI, como também é visualizado na tabela 16, o que indica que estes filmes apresentaram pouca quantidade de moléculas de água na sua matriz. Não se observaram diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre o filme C e os filmes de RV, assim como entre os filmes de CD e CI. Não foram igualmente observadas diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre RV<sub>1</sub> com RV<sub>2</sub> e CI<sub>1</sub> com CI<sub>2</sub>, o que pode indicar que as concentrações que foram testadas dos agentes AM não influenciaram este parâmetro.

A capacidade de resistência dos materiais dos filmes assim como o alongamento são fatores importantes para prever as suas propriedades mecânicas em futuras aplicações como embalagens alimentares [93]. No entanto, a análise da permeabilidade ao vapor de água também é um parâmetro importante, ao permitir controlar a humidade presente nos alimentos e assim permite entender as possíveis interações que possam existir entre o soluto e o polímero que constitui o filme [16]. Deste modo, os resultados das propriedades mecânicas e de barreira dos filmes em bicamada encontram-se registados na tabela 17.

Pela análise da tabela 17, verifica-se que o valor do ME não diminuiu significativamente ( $p < 0,05$ ) com a adição de RV, e aumentou significativamente ( $p < 0,05$ ) com a adição de CD e CI, quando comparado com o filme controlo. O ÍT diminuiu com a adição de RV (RV<sub>1</sub>: 9,76 ± 0,64 Nm/g; RV<sub>2</sub>: 10,30 ± 1,15 Nm/g) e aumentou com a adição de CI (CI<sub>1</sub>: 27,58 ± 2,91 Nm/g; CI<sub>2</sub>: 14,26 ± 3,11 Nm/g) e de CD (18,42 ± 4,32 Nm/g), em relação ao filme controlo (11,88 ± 1,01 Nm/g). De acordo com os resultados obtidos no presente estudo, o aumento da concentração dos agentes AM resultou num menor valor de A. Tal como foi observado e explicado nos filmes de CMC analisados no ponto 5.1.1., a incorporação de RV levou a uma diminuição do ME e do IT, tornando os filmes menos resistentes à rutura. No estudo desenvolvido por Pastor *et al.* 2013 verificou-se que o ME foi influenciado pela incorporação do RV nas matrizes dos polímeros estudados (HPMC e quitosano), tendo sido verificado que o RV provocava alterações estruturais dessas matrizes [89]. Também como se verifica na tabela 17 os valores do A dos filmes com incorporação de RV aumentaram, o que pode indicar que este agente AM pode ter ocupado os espaços intermoleculares entre as cadeias da HEC,

reduzindo a formação de ligações por pontes de hidrogênio entre as cadeias deste polímero, aumentando assim a mobilidade molecular e consequentemente a flexibilidade destes filmes.

**Tabela 17:** Valores das propriedades mecânicas e de barreira dos filmes em bicamada (média  $\pm$  desvio-padrão).

Filmes	Propriedades Mecânicas			Propriedades de barreira
	Módulo Elástico (MPa)	Índice de tração (Nm/g)	Alongamento (%)	WVTR (g/m <sup>2</sup> .dia)
C	358,28 $\pm$ 30,97 <sup>a</sup>	11,88 $\pm$ 1,01 <sup>ad</sup>	29,75 $\pm$ 5,19 <sup>a</sup>	75,20 $\pm$ 2,36 <sup>ac</sup>
CD	1604,30 $\pm$ 139,20 <sup>bc</sup>	18,42 $\pm$ 4,32 <sup>be</sup>	1,93 $\pm$ 0,65 <sup>b</sup>	401,07 $\pm$ 33,09 <sup>b</sup>
RV <sub>1</sub>	320,00 $\pm$ 40,11 <sup>a</sup>	9,76 $\pm$ 0,64 <sup>a</sup>	43,76 $\pm$ 8,24 <sup>c</sup>	125,10 $\pm$ 6,75 <sup>a</sup>
RV <sub>2</sub>	340,49 $\pm$ 29,59 <sup>a</sup>	10,30 $\pm$ 1,15 <sup>a</sup>	38,35 $\pm$ 6,11 <sup>ac</sup>	126,77 $\pm$ 5,06 <sup>a</sup>
CI <sub>1</sub>	1501,51 $\pm$ 11,78 <sup>c</sup>	27,58 $\pm$ 2,91 <sup>c</sup>	4,57 $\pm$ 0,28 <sup>b</sup>	34,14 $\pm$ 0,34 <sup>c</sup>
CI <sub>2</sub>	1280,83 $\pm$ 465,20 <sup>c</sup>	14,26 $\pm$ 3,11 <sup>de</sup>	1,73 $\pm$ 0,52 <sup>b</sup>	228,23 $\pm$ 14,86 <sup>d</sup>

C (Filme controle); CD (Filme controle de ciclodextrina); RV<sub>1</sub> (Filme com 500  $\mu$ g/mL de resveratrol); RV<sub>2</sub> (Filme com 750  $\mu$ g/mL de resveratrol); IC<sub>1</sub> (Filme com 2500  $\mu$ g/mL de complexo de inclusão); CI<sub>2</sub> (Filme com 7500  $\mu$ g/mL de complexo de inclusão).

As diferentes letras presentes na mesma coluna indicam a diferença significativa ( $p < 0,05$ ).

O filme com incorporação de CD apresentou o maior valor do ME (1604,30  $\pm$  139,20), aumentando significativamente ( $p < 0,05$ ) quando comparado com os filmes C, RV<sub>1</sub> e RV<sub>2</sub>. No entanto o filme CI<sub>1</sub> apresentou um valor do ME semelhante (1501,51  $\pm$  11,78) ao filme com incorporação de CD. O aumento do valor do ME e a diminuição do A pela incorporação de CD nos filmes em bicamada pode ser devido aos grupos hidroxilo presentes nas CDs, os quais podem formar ligações secundárias com outros grupos químicos (como por exemplo, grupos éter ou no caso da HEC, grupos hidroxilo), reduzindo assim a mobilidade molecular e aumentando a resistência à deformação [100]. Em suma, as propriedades de resistência à tração dos filmes com incorporação de CI foram claramente mais influenciadas do que nos filmes com incorporação de RV.

Os valores da transmissão do vapor de água para os vários filmes também se encontram apresentados na tabela 17. A incorporação de RV nos filmes aumentou ligeiramente os valores de WVTR, quando comparado com o filme C, porém não apresentou significado estatístico. Os resultados obtidos neste estudo podem estar relacionados com o efeito de plastificação do RV, como se observou anteriormente pelos baixos valores de ME e simultaneamente elevados valores de A, pois o efeito de plastificação dos filmes aumenta os valores de WVTR [111]. Estes resultados não coincidem com o estudo de Pastor *et al.* 2013, o qual descreve uma pequena diminuição nos valores da permeabilidade ao vapor de água, aquando da

incorporação de RV numa matriz polimérica (quitosano e MC) [89]. Segundo este autor, as alterações estruturais induzidas pela incorporação de RV não envolvem grandes alterações na velocidade de transferência de massa de moléculas de água [89].

De acordo com a tabela 17, não se observam diferenças significativas dos valores de WVTR entre os filmes RV<sub>1</sub> e de RV<sub>2</sub>, o mesmo não ocorre entre os filmes de CI<sub>1</sub> e CI<sub>2</sub>. O filme CI<sub>1</sub> apresentou o menor valor de WVTR, enquanto os filmes CD e CI<sub>2</sub> apresentaram os maiores valores. Estes resultados podem ser devidos à presença de CD no CI, a qual provoca uma alteração na estrutura da matriz do filme. O valor de WVTR depende da quantidade de CD presente nos filmes, por exemplo, o filme CI<sub>1</sub> apresentou uma menor concentração de CD presente e em simultâneo apresentou um maior valor de WVTR. Sun *et al.* 2014 descreve o mesmo resultado para baixas concentrações de CD em filmes de quitosano com incorporação de óleos essenciais [78]. Segundo este autor, a estrutura rígida da CD, assim como as suas possíveis interações com o polímero constituinte do filme, podem criar um impedimento estérico e diminuir a mobilidade dos segmentos, limitando assim a transmissão do vapor de água [78]. O mesmo autor descreve o aumento dos valores de WVTR para elevadas concentrações de CD [78], o que coincide com os resultados obtidos neste estudo. Assim o teor elevado de CD pode aumentar a difusão da água devido à presença de espaços vazios nas matrizes [78], [111]. Deve no entanto referir-se que durante os ensaios, a camada ativa dos filmes com CD apresentaram fissuras, pois estes eram frágeis, o que pode ter influenciado a sua permeabilidade tornando-os assim mais permeáveis ao vapor de água (menor WVTR).

As propriedades da superfície dos filmes também são fatores importantes, pois dão indicação da capacidade do polímero absorver a humidade, e portanto permitem prever o comportamento dos filmes quando aplicados numa superfície sólida [59]. A medição do ângulo de contacto é um método simples de avaliar a hidrofiliabilidade dos filmes, quando se utiliza a água como líquido teste. [59]. Os valores do ângulo de contacto e da energia livre de superfície ( $\gamma$ ) para os diferentes filmes, encontram-se apresentados na tabela 18.

Os resultados obtidos demonstraram que a adição de RV nos filmes em bicamada aumentou significativamente ( $p < 0,05$ ) o ângulo de contacto com a água, comparativamente com os filmes de CD e CI. Mas não se observaram diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre o filme C e os filmes RV. A incorporação de RV diminuiu a hidrofiliabilidade dos filmes, isto é, valores mais elevados do ângulo de contacto com água e valores baixos da componente polar da energia da superfície ( $\gamma^p$ ). Este facto poderá dever-se à natureza lipofílica do RV [112]. Entre os filmes RV<sub>1</sub> e RV<sub>2</sub> não se observam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) mas tal não ocorre com o líquido apolar diiodometano. Ainda relativamente ao ângulo de contacto com o diiodometano, esperar-se-ia que os filmes com RV apresentassem um valor inferior comparativamente aos restantes filmes. A já mencionada natureza lipofílica do RV deveria aumentar a interação entre os filmes e o líquido apolar (diiodometano). Os filmes CD e CI mostram valores do

ângulo de contacto com a água significativamente mais baixos ( $p < 0,05$ ), e consequentemente valores mais elevados de  $\gamma^P$ , o que indica que nestes filmes a afinidade pela água é mais elevada, comparativamente aos filmes de RV e ao filme C. Este resultado poderá dever-se à presença dos grupos hidroxilo presentes na CD, os quais lhe conferem hidrofiliade [48]. De entre todos os filmes testados, o filme  $Cl_2$  é o que apresenta os valores menores do ângulo de contacto com a água, e os valores mais elevados da energia de superfície e respetiva componente polar, o que indica que este filme é o que interage mais com a água.

**Tabela 18:** Valores do ângulo de contacto ( $^\circ$ ) e da energia livre de superfície ( $\gamma$ ) dos filmes antimicrobianos em bicamada com dois líquidos diferentes (média  $\pm$  desvio-padrão).

Filmes	Ângulo de contacto ( $^\circ$ )		Owens - Wendt		
	Água	Diiodometano	$\gamma^T$ (mN/m)	$\gamma^d$ (mN/m)	$\gamma^P$ (mN/m)
C	63,60 $\pm$ 0,80 <sup>a</sup>	55,28 $\pm$ 1,58 <sup>a</sup>	45,02	31,28	13,74
CD	54,30 $\pm$ 2,44 <sup>b</sup>	42,50 $\pm$ 4,87 <sup>b</sup>	54,52	38,33	16,19
RV <sub>1</sub>	68,15 $\pm$ 2,58 <sup>a</sup>	47,71 $\pm$ 2,09 <sup>c</sup>	45,13	35,54	9,59
RV <sub>2</sub>	65,41 $\pm$ 3,79 <sup>a</sup>	52,25 $\pm$ 2,10 <sup>ad</sup>	44,99	33,01	11,98
Cl <sub>1</sub>	57,78 $\pm$ 5,49 <sup>b</sup>	50,31 $\pm$ 2,70 <sup>acd</sup>	50,07	34,10	15,97
Cl <sub>2</sub>	46,44 $\pm$ 2,25 <sup>c</sup>	51,60 $\pm$ 2,29 <sup>cd</sup>	56,73	33,38	23,35

$\gamma^T$  - Energia livre de superfície total;  $\gamma^d$  - Componente dispersiva;  $\gamma^P$  - Componente polar.

C (Filme controlo); CD (Filme controlo de ciclodextrina); RV<sub>1</sub> (Filme com 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de resveratrol);

RV<sub>2</sub> (Filme com 750  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de resveratrol); IC<sub>1</sub> (Filme com 2500  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de complexo de inclusão);

Cl<sub>2</sub> (Filme com 7500  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de complexo de inclusão).

As diferentes letras presentes na mesma coluna indicam a diferença significativa ( $p < 0,05$ ).

A cor e a transparência dos filmes são fatores importantes ao nível da aparência e da aceitação por parte do consumidor como embalagens alimentares [113], [114]. Por esta razão, a avaliação das propriedades da cor ( $L^*$ ,  $a^*$  e  $b^*$ ) e da transparência dos filmes foi importante. Os resultados obtidos encontram-se registados na tabela 19.

Pelos resultados apresentados na tabela 19, observa-se que a incorporação da CD e de CI aumentou a sua luminosidade ( $L^*$ ), e a incorporação dos agentes antimicrobianos, RV e CI, afetou as coordenadas cromáticas  $a^*$  e  $b^*$  comparativamente com o filme controlo. Os filmes com incorporação de RV apresentaram valores de  $a^*$  negativos, enquanto os filmes de CI exibiram valores de  $a^*$  positivos. Relativamente à coordenada cromática  $b^*$ , todos os filmes aproximaram-se da cor amarela, sustentada pelos valores positivos desta coordenada. Os valores da transparência em todos os filmes foram elevados, não se visualizando diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre os filmes de RV e o C, e entre os filmes de CD e CI. No entanto, a incorporação de CD e de CI aumentou um pouco os valores de transparência, comparativamente com o filme C. Como se verifica nos parâmetros óticos analisados, não existem grandes diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) nos filmes com incorporação das diferentes

concentrações dos agentes AM, isto é, entre o filme RV<sub>1</sub> e RV<sub>2</sub> e entre o filme CI<sub>1</sub> e CI<sub>2</sub>. Logo, pode-se concluir que a concentração dos agentes AM em estudo não influenciou as propriedades óticas dos filmes em bicamada. Deste modo, o facto de os agentes AM testados não terem influenciado de forma considerável os parâmetros óticos, pode estar relacionado com a ausência de alterações estruturais, isto é, a estrutura dos filmes é homogénea.

**Tabela 19:** Valores das propriedades óticas dos filmes em bicamada (média ± desvio-padrão).

Filmes	Parâmetros da cor			Transparência
	L*	a*	b*	
C	92,29 ± 0,22 <sup>ac</sup>	-0,34 ± 0,02 <sup>a</sup>	11,03 ± 0,66 <sup>a</sup>	94,98 ± 0,03 <sup>a</sup>
CD	93,47 ± 0,10 <sup>b</sup>	0,10 ± 0,01 <sup>b</sup>	4,66 ± 0,04 <sup>b</sup>	96,18 ± 0,26 <sup>b</sup>
RV <sub>1</sub>	92,33 ± 0,34 <sup>ac</sup>	-0,16 ± 0,03 <sup>c</sup>	9,32 ± 0,89 <sup>c</sup>	94,68 ± 0,30 <sup>a</sup>
RV <sub>2</sub>	91,92 ± 0,17 <sup>a</sup>	-0,27 ± 0,02 <sup>d</sup>	10,77 ± 0,40 <sup>a</sup>	94,62 ± 0,51 <sup>a</sup>
CI <sub>1</sub>	93,18 ± 0,14 <sup>b</sup>	0,12 ± 0,01 <sup>b</sup>	5,67 ± 0,08 <sup>b</sup>	95,99 ± 0,02 <sup>b</sup>
CI <sub>2</sub>	92,90 ± 0,30 <sup>cb</sup>	0,31 ± 0,02 <sup>e</sup>	5,18 ± 0,10 <sup>b</sup>	95,61 ± 0,40 <sup>b</sup>

L\* - luminosidade; a\* - verde-vermelho; b\* - azul-amarelo.

C (Filme controlo); CD (Filme controlo de ciclodextrina); RV<sub>1</sub> (Filme com 500 µg/mL de resveratrol);

RV<sub>2</sub> (Filme com 750 µg/mL de resveratrol); CI<sub>1</sub> (Filme com 2500 µg/mL de complexo de inclusão);

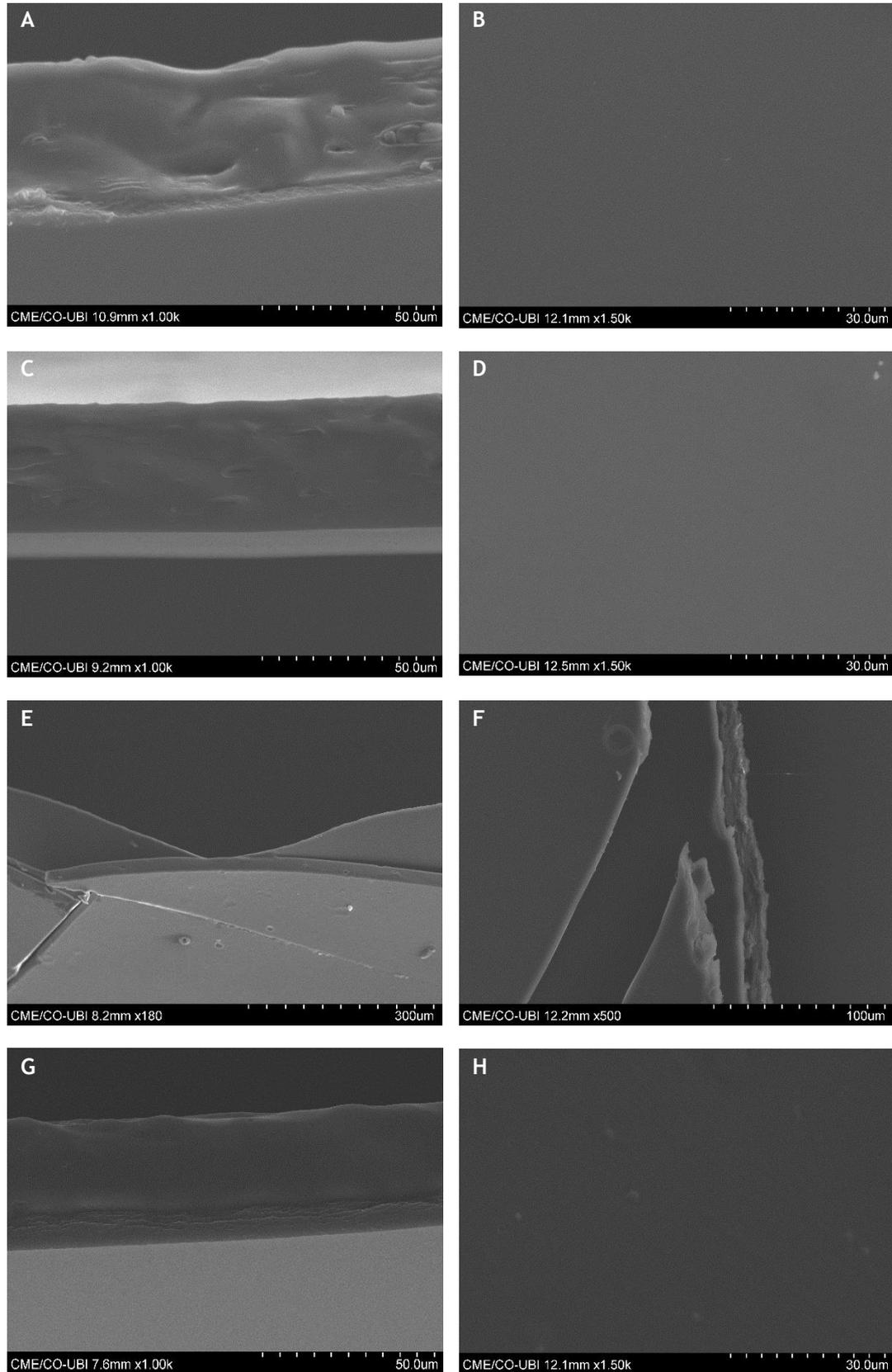
CI<sub>2</sub> (Filme com 7500 µg/mL de complexo de inclusão).

As diferentes letras presentes na mesma coluna indicam a diferença significativa (p <0,05).

Contudo, alguns estudos demonstram que a adição de vários compostos, como por exemplo, agentes ativos, influencia a cor nativa dos filmes. Por exemplo, Noronha *et al.* 2014 evidenciou que a inclusão de nanocápsulas de α-tocoferol em filmes de MC alterou a cor dos filmes, assim como a concentração também influenciou esta propriedade [72]. O autor Moradi *et al.* 2012 também observou alterações na cor de filmes de quitosano com incorporação de extrato de sementes de uvas [115]. Assim como Pastor *et al.* 2013 evidenciou que as propriedades óticas de filmes de MC com incorporação de RV foram alteradas de acordo com a concentração deste composto [89]. No entanto, Moradi *et al.* 2012 demonstrou que adição de óleo essencial de *Zataria multiflora* em filmes de quitosano não altera as propriedades óticas [115].

A Microscopia Eletrónica de Varrimento permite a análise da microestrutura dos filmes, e é útil na compreensão das relações entre as características estruturais, as propriedades mecânicas, óticas e a permeabilidade ao vapor de água [93]. A figura 21 mostra as micrografias da superfície e do corte transversal do filme C, RV<sub>2</sub>, CD e CI<sub>1</sub>. Na figura 21A observa-se o corte transversal do filme C, tendo a percepção das diferentes camadas, em que a camada superior é HEC e a camada inferior AC. Na camada de HEC visualiza-se a presença de alguns poros, pois durante a evaporação do solvente algumas bolhas de ar podem ter ficado aprisionadas. A microestrutura dos filmes de RV<sub>2</sub> (figura 21C) e do CI<sub>1</sub> (figura 21G) é mais homogénea, sendo mais fácil diferenciar as duas camadas que constituem os filmes

comparativamente com o filme C (figura 21A). Como se pode visualizar pela figura 21E e 21F, o filme de CD apresenta irregularidades e parece perceptível que não existiu coesão entre as duas camadas, o que pode ser explicado pela rigidez estrutural que a CD promove nos filmes [100]. A superfície dos filmes (figura 21B, D e H) foi homogênea, o que indica que a incorporação dos agentes AM no filme de HEC não alterou a rugosidade da superfície dos filmes. Pelos resultados obtidos no presente trabalho, o efeito da incorporação de RV em filmes de HEC está em conformidade com os resultados obtidos por Pastor *et al.* 2013 em filmes de MC [89]. No entanto, este autor evidenciou que a incorporação deste composto em filmes de quitosano alterou a sua microestrutura assim como a rugosidade, particularmente em concentrações mais elevadas de RV [89]. Deste modo, o efeito da incorporação de RV em filmes é dependente da matriz do polímero, pois este agente AM pode alterar a formação de pontes de hidrogénio entre as moléculas do polímero [89].



**Figura 21:** Imagens da morfologia de filmes em bicamada obtidas por microscopia eletrônica de varrimento. Imagens do corte transversal dos filmes à esquerda e à direita a superfície (A) e (B) filme C; (C) e (D) filme RV<sub>2</sub>; (E) e (F) filme CD; (G) e (H) filme CI<sub>1</sub>; A ampliação encontra-se indicada nas micrografias.

### 5.4.2. Ensaios de libertação dos agentes antimicrobianos, RV e CI, a partir dos filmes em bicamada

Os ensaios de libertação dos agentes antimicrobianos, RV e CI, a partir dos filmes em bicamada foram efetuados para um simulante alimentar para produtos de carne fresca, etanol a 10%, como descrito no Regulamento da Comissão Europeia No 10/2011. O teste foi realizado a duas temperaturas, a 4°C para simular a temperatura de refrigeração e a 20°C para simular a temperatura ambiente. O período de simulação do tempo de conservação dos alimentos, como por exemplo a carne de frango fresca, foi durante 10 dias. Os agentes AM libertados dos filmes em bicamada foram quantificados por HPLC-DAD. A figura 22 mostra o perfil destes ensaios.

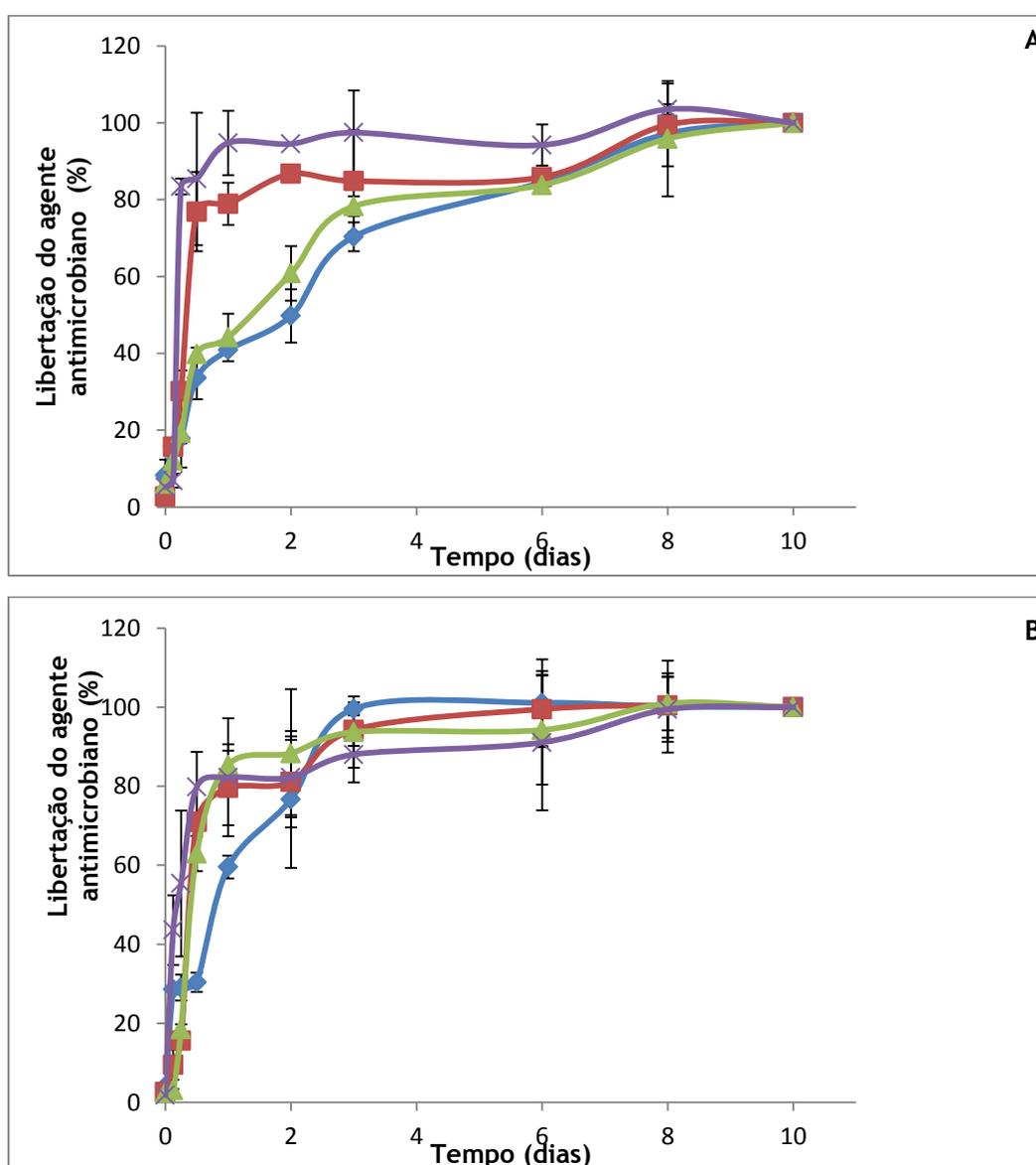


Figura 22: Taxa de libertação dos agentes antimicrobianos: RV<sub>1</sub> (♦), RV<sub>2</sub> (■), CI<sub>1</sub> (▲) e CI<sub>2</sub> (●), em etanol a 10%, a 4°C (A) e a 20°C (B) incorporados nos filmes de bicamada (média ± desvio-padrão).

Como se pode visualizar no gráfico 22A, à temperatura de 4°C observa-se uma taxa de libertação mais rápida dos filmes com incorporação de RV<sub>2</sub> e CI<sub>2</sub>, com aproximadamente 80% após 1h de incubação de ambos os compostos. Os filmes com incorporação de RV<sub>1</sub> e CI<sub>1</sub> apenas alcançam este valor ao fim de 6 dias de incubação. Por sua vez, à temperatura de 20°C (figura 22B), com exceção do filme com incorporação de RV<sub>1</sub>, todos os filmes apresentaram o mesmo comportamento, isto é, o RV<sub>1</sub> libertou-se de forma mais lenta do filme comparativamente com os restantes compostos. Por exemplo, ao fim de 1 dia de incubação, RV<sub>2</sub>, CI<sub>1</sub> e CI<sub>2</sub> libertaram-se aproximadamente 80% dos filmes, enquanto RV<sub>1</sub> libertou-se do filme aproximadamente 60%. Após 3 dias de incubação, a 20°C (figura 22B), a percentagem de libertação dos compostos AM foi semelhante para os 4 filmes em bicamada e mais rápida do que à temperatura de 4°C (figura 22A). Pelos resultados obtidos, a taxa de libertação dos compostos testados aparenta ser dependente da temperatura e da concentração do agente AM, e a inclusão de CD não influenciou o comportamento. O estudo desenvolvido por Mild *et al.* 2011 descreveu que a libertação de compostos AM (carvacrol e cinamaldeído) incorporados em filmes edíveis baseados em maçã, é cineticamente desfavorável a temperaturas baixas (4°C) mas favorável a temperaturas mais elevadas (nomeadamente 23°C) [92]. No entanto, a libertação de agentes ativos incorporados em filmes, por exemplo agentes AM, para o meio, não depende apenas da temperatura e da concentração, como também da solubilidade, do solvente e da polaridade [89]. A baixa afinidade química e a solubilidade do RV em soluções aquosas podem explicar as diferenças observadas, comparativamente com o CI.

Neste estudo, esperava-se que a libertação de CI fosse de uma forma controlada para o simulante alimentar, atendendo que o RV está complexado com a CD. A aplicação de CDs em embalagens alimentares ativas tem sido amplamente investigada, e mostrou-se que alguns compostos complexados são dispersos de forma homogénea e são libertados lentamente a partir de uma matriz polimérica [116]. Mas a libertação de RV complexado com a HP-γ-CD foi semelhante à libertação de RV na forma livre. No estudo desenvolvido por Noronha *et al.* 2014 observou-se que em filmes de MC incorporados com nanocápsulas de α-tocoferol, estes compostos foram libertados mais rapidamente do que era esperado, atendendo que se encontravam encapsulados [72]. Mas a libertação rápida pode ser devida à maior afinidade das nanocápsulas e do α-tocoferol para o solvente (etanol a 95%) do que a matriz hidrofílica de MC, precisamente devido à natureza hidrofóbica destes compostos [72]. Tal pode ter ocorrido com o CI nos filmes em bicamada, pois o RV pode ter sido libertado mais rapidamente por ter uma maior afinidade para o solvente orgânico do que para a matriz hidrofílica da camada ativa (HEC) e da CD, pois o etanol aumenta a solubilidade do RV. Em suma, o RV e CI foram libertados totalmente ao fim de 10 dias em ambas as temperaturas testadas.

### 5.4.3. Avaliação da atividade antimicrobiana dos filmes em bicamada

A atividade antimicrobiana dos filmes em bicamada foi testada de forma qualitativa contra duas estirpes de referência (*C. coli* ATCC 33559 e *C. jejuni* ATCC 33560) e duas estirpes isoladas (*C. coli* 873 e *C. jejuni* 225421), pelo teste de difusão em disco. Os discos dos filmes testados apresentavam 1 cm de diâmetro, as concentrações em percentagem (% m/v) por cada disco de filme encontram-se apresentadas na tabela 20. O tamanho do halo de inibição foi medido à volta do disco em mm, e visualmente foi analisado o crescimento das bactérias na área de contacto do disco do filme com a superfície de agar. Os resultados obtidos encontram-se apresentados na tabela 21.

**Tabela 20:** Concentração (%) dos agentes antimicrobianos presente em cada 1 cm de disco de filme.

Agente antimicrobiano	Concentração (% m/v)
RV <sub>1</sub>	0,05
RV <sub>2</sub>	0,075
IC <sub>1</sub>	0,25
IC <sub>2</sub>	0,75

**Tabela 21:** Diâmetros (mm) dos halos de inibição e da área de contacto dos filmes para as estirpes de *Campylobacter* (média ± desvio-padrão).

Filmes	Diâmetros dos halos de inibição (mm) e área de contacto			
	<i>C. coli</i> 873	<i>C. coli</i> ATCC 33559	<i>C. jejuni</i> 225421	<i>C. jejuni</i> ATCC 33560
C	10 (±)	10 (±)	10 (±)	10 (±)
CD	10 (±)	10 (±)	10 (±)	10 (±)
RV <sub>1</sub>	14,00 ± 1,41 (+)	12,50 ± 0,71 (+)	12,50 ± 0,71 (+)	14,50 ± 3,50 (++)
RV <sub>2</sub>	16,50 ± 2,12 (++)	13,50 ± 0,71 (++)	15,50 ± 0,71 (++)	10 (+)
CI <sub>1</sub>	14,00 ± 1,41 (++)	11,50 ± 0,71 (+)	14,00 ± 1,41 (++)	13,00 ± 1,40 (++)
CI <sub>2</sub>	12,00 ± 0,00 (+)	10 (+)	13,50 ± 2,12 (+)	11,50 ± 0,71 (+)

± As bactérias retraem na área de contacto do filme com o agar;

+ Presença de um halo de inibição.

Como se pode verificar na tabela 21 os filmes controlo, C e CD, não apresentaram atividade antimicrobiana em todas as estirpes testadas, tal como era de esperar atendendo que não contêm os agentes AM (RV e CI). No entanto, as estirpes testadas não cresceram na área de

contacto destes filmes com a superfície de agar, o que indica que o filme impediu o crescimento das bactérias sem formar um halo de inibição. Os filmes com incorporação de RV apresentaram melhor atividade antimicrobiana do que os filmes com incorporação de CI. Tal diferença pode dever-se ao facto de o RV na forma livre se difundir mais rapidamente para o agar e exercer a sua atividade, enquanto na sua forma complexada (CI) a sua libertação é mais lenta [49]. De acordo com os resultados obtidos, à medida que a concentração de RV aumenta a atividade antimicrobiana também aumenta, isto é, o filme RV<sub>2</sub> apresenta maiores halos de inibição nas estirpes testadas do que RV<sub>1</sub>, com exceção da estirpe *C. jejuni* ATCC 33560, onde o filme RV<sub>2</sub> não inibiu o crescimento destas bactérias, pois não formou um halo de inibição.

Nos filmes com incorporação de CI, o comportamento foi diferente dos de RV, pois o filme com menor concentração do agente AM, ou seja, CI<sub>1</sub> apresentou maiores halos de inibição do que o filme CI<sub>2</sub>. O filme CI<sub>1</sub> inibiu o crescimento de todas as estirpes testadas, ao contrário do filme CI<sub>2</sub>, o qual não inibiu o crescimento de *C. coli* ATCC 33559. O mesmo comportamento se verificou pela análise da área de contacto do disco do filme com a superfície de agar, pois os filmes RV<sub>2</sub> e CI<sub>1</sub> foram os que exerceram melhor atividade, pois com a exceção da estirpe de referência de *C. jejuni*, as bactérias não cresceram sob os filmes. No entanto existem poucos estudos na literatura, sobre o desenvolvimento de filmes AM com incorporação de compostos fenólicos contra *Campylobacter* spp. para que possam ser comparados os resultados obtidos neste estudo. Recentemente, Alkan *et al.* 2011 demonstrou a atividade antimicrobiana de filmes de zeína (proteína presente no milho) com incorporação de ácido gálico contra duas estirpes isoladas de *C. jejuni* (uma estirpe isolada de humanos e outra isolada de carcaças de frango) [12]. Neste estudo verificou-se que os filmes demonstraram atividade antimicrobiana nas bactérias isoladas dependente da concentração do agente AM testada, isto é, quanto maior a concentração do agente AM maior é a atividade antimicrobiana [12].

O estudo desenvolvido por Giteru *et al.* 2015, também descreveu a inibição do crescimento de uma estirpe de *C. jejuni* isolada de humanos, por ação de filmes de cahirina (proteína presente em grãos de cereais de sorgo) com incorporação de óleo essencial de citral e quercetina (polifenol) [25]. Neste trabalho os filmes com incorporação de maiores concentrações de óleo essencial de citral apresentaram uma forte atividade antimicrobiana contra *C. jejuni* [25]. Comparando estes estudos com o presente trabalho, o mesmo se verificou para os filmes com incorporação de RV nas estirpes isoladas. Em suma, os resultados obtidos indicam que o filme de RV<sub>1</sub> e o filme de CI<sub>1</sub> foram entre os filmes em bicamada testados, os que mostraram melhores propriedades antimicrobianas contra as estirpes de *Campylobacter* estudadas. Deste modo, estes filmes apresentam potencial para serem utilizados como embalagens AM para melhorar a segurança e a qualidade dos alimentos, nomeadamente a carne de frango.

#### 5.4.4. Avaliação da atividade anti-*quorum sensing* dos filmes em bicamada

O *quorum sensing* é um mecanismo de sinalização intercelular e um regulador de transcrição genes, que pode estar relacionado com a resistência e a patogenicidade das bactérias Gram-negativas e Gram-positivas responsáveis por contaminações alimentares [77], [78], [117]. Por este motivo, diversos autores referem que a inibição e a regulação destas bactérias pelo QS pode ser uma boa alternativa para assegurar a qualidade e segurança nos produtos alimentares [77]. Assim, no presente trabalho estudou-se a influência dos filmes em bicamada com incorporação de RV e de CI no QS, utilizando a estirpe biossensor *Chromobacterium violaceum* ATCC 12472. Esta estirpe, como resposta da comunicação intercelular, produz um pigmento de cor violeta, a violaceína. Ao analisar a produção deste pigmento é possível avaliar a interferência dos filmes AM neste processo. Para tal, realizou-se o teste de difusão em disco e quantificou-se a produção do pigmento em contacto com os filmes AM. Os resultados da eficácia dos filmes AM no QS obtidos encontram-se registados na tabela 22 e na figura 23.

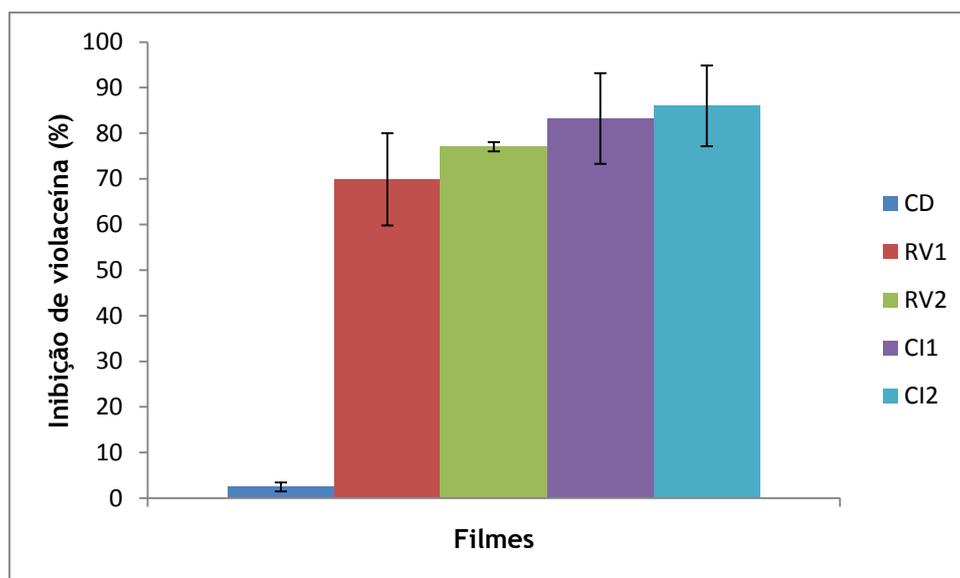
**Tabela 22:** Diâmetros (mm) dos halos de inibição de violaceína pelos filmes antimicrobianos em bicamada.

Filmes	Halos de inibição (diâmetros mm)		
	Inibição do crescimento ( $d_1$ )	Inibição do crescimento + pigmento ( $d_2$ )	Inibição do QS ( $d_2-d_1$ )
C	10,0 ± 0,00	10,0 ± 0,00	0
CD	10,0 ± 0,00	10,0 ± 0,00	0
RV <sub>1</sub>	14,5 ± 0,71	14,5 ± 0,71	0
RV <sub>2</sub>	17,0 ± 0,00	17,0 ± 0,00	0
CI <sub>1</sub>	16,0 ± 0,00	22,0 ± 1,40	6,0 ± 1,40
CI <sub>2</sub>	15,0 ± 0,00	17,5 ± 3,50	2,5 ± 3,50

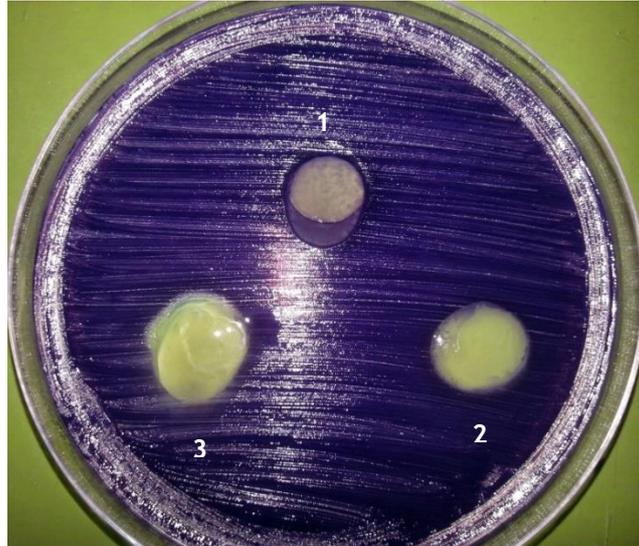
De acordo com os halos de inibição apresentados na tabela 22 o filme controlo (C) e CD não inibiram o crescimento de *C. violaceum* assim como não apresentaram atividade anti-QS. Os filmes com incorporação de RV demonstraram atividade antimicrobiana dependente da concentração, no entanto não inibiram o QS (figura 24). O filme com incorporação da concentração mais elevada de RV (RV<sub>2</sub>) demonstrou maior atividade antimicrobiana. Uma possível explicação pode estar relacionada com a cinética de libertação do agente AM, tal como demonstrado no ponto 5.4.2. Como se visualiza na figura 22B, ambos RV<sub>1</sub> e RV<sub>2</sub> libertaram-se de forma mais lenta dos filmes do que CI, o que pode indicar que o RV não exerceu totalmente a sua atividade, razão pela qual ambos os filmes não inibiram o QS. Relativamente aos filmes com incorporação de CI apresentaram atividade antimicrobiana e

anti-QS (figura 25), no entanto a menor concentração de CI (CI<sub>1</sub>) foi a que apresentou uma forte atividade antimicrobiana e anti-QS. Uma possível explicação para as diferenças observadas, também pode estar relacionada com a taxa de libertação do CI para o agar, isto é, o CI<sub>1</sub> difundiu-se mais rapidamente do que CI<sub>2</sub>, o que pode indicar que o RV libertou-se mais rapidamente no filme CI<sub>1</sub> exercendo assim a sua atividade.

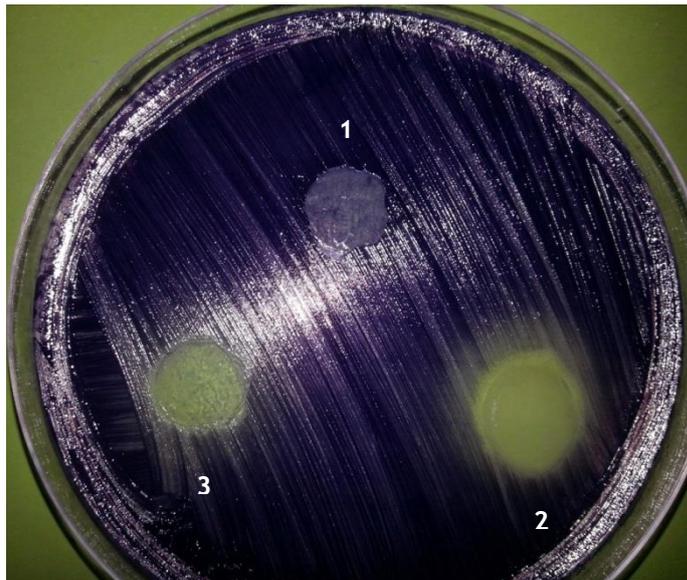
A capacidade dos agentes AM na inibição da produção de violaceína pela *C. violaceum* foi observada (figura 23), pois todos os filmes com incorporação dos agentes AM em estudo demonstraram a capacidade de reduzir a produção deste pigmento. Os filmes com incorporação de RV e CI reduziram a produção de violaceína com uma percentagem superior a 70%, enquanto os filmes controlo (C e CD) não apresentaram nenhum efeito. No entanto, os filmes com incorporação dos agentes AM demonstraram que a inibição da produção de violaceína é dependente da concentração, pois as concentrações mais elevadas (RV<sub>2</sub> e CI<sub>2</sub>) inibiram em maior percentagem. Diversos estudos têm demonstrado o potencial de agentes ativos de origem natural com atividade anti-QS, mas poucos demonstraram a sua atividade quando incorporados em filmes. O autor Alvarez *et al.* 2014 demonstrou a atividade anti-QS de filmes de pectina com incorporação de óleo essencial de orégãos [77]. Segundo este estudo, a perda do pigmento violeta de *C. violaceum* indica a inibição do QS por ação dos compostos bioativos [77]. Por esta razão e de acordo com os resultados obtidos, este estudo mostrou o potencial do RV e de CI incorporados nestes filmes AM em bicamada, como inibidores do QS. Assim, estes filmes AM podem ser uma boa estratégia para a conservação de alimentos.



**Figura 23:** Percentagem de inibição da produção de violaceína por ação dos filmes antimicrobianos em bicamada.



**Figura 24:** Inibição do QS por ação do RV incorporado em filmes de bicamada. 1- Filme C; 2 - Filme RV<sub>1</sub>; 3 - Filme RV<sub>2</sub>.



**Figura 25:** Inibição do QS por ação do Cl incorporado em filmes de bicamada. 1- Filme CD; 2 - Filme Cl<sub>1</sub>; 3 - Filme Cl<sub>2</sub>.

#### 5.4.5. Aplicação dos filmes em bicamada num modelo alimentar de peito de frango

A aplicação de agentes AM de origem natural incorporados em filmes podem contribuir para a redução de *Campylobacter* spp. em carne de aves, como por exemplo, a carne de frango [118]. No presente trabalho, os filmes AM em bicamada demonstraram uma forte atividade antimicrobiana contra as estirpes isoladas de *C. coli* 873 e *C. jejuni* 225421 tal como demonstrado no ponto 5.4.3. Como se verificou, os filmes RV<sub>2</sub> e CI<sub>1</sub> apresentaram maior atividade antimicrobiana contra estas bactérias. Deste modo, o principal objetivo desta tarefa foi determinar os efeitos antimicrobianos dos filmes em bicamada com incorporação de RV<sub>2</sub> e CI<sub>1</sub> contra as estirpes de *C. coli* 873, *C. jejuni* 225421 e para ambas (mistura), num modelo alimentar, peito de frango contaminado artificialmente. As temperaturas testadas foram a 4°C de modo a simular a temperatura de refrigeração e a 20°C como temperatura ambiente. Depois do período de 72h de incubação dos filmes com o frango, as amostras foram recolhidas para a contagem bacteriana. Estas foram plaqueadas em meio *Brucella* (suplementado com 5% de sangue desfibrinado de cavalo) e meio seletivo mCCDA, de forma a controlar possíveis contaminações. No meio *Brucella* não se observaram contaminações e como os resultados foram semelhantes aos do meio seletivo e sem diferenças significativas, utilizaram-se os valores médios de todos os ensaios. Os valores encontram-se apresentados na tabela 23.

**Tabela 23:** log UFC/mL de *C. coli*, *C. jejuni* e mistura das duas estirpes das amostras de peito de frango envolvidas com os filmes antimicrobianos em bicamada a 4 e 20°C no período de 72h.

Tempo de incubação	Filmes	log (UFC/mL)			
		Temperatura (°C)	<i>C. coli</i> 873	<i>C. jejuni</i> 225421	Mistura
0 h	Controlo		4,68 ± 0,16	4,24 ± 0,48	4,52 ± 0,02
	C <sup>+</sup>	4	5,20 ± 0,27	5,30 ± 0,01	5,19 ± 0,00
B		20	5,26 ± 0,23	4,60 ± 4,48	4,26 ± 0,76
	72 h	B	4	5,11 ± 0,07	5,08 ± 0,00
20			3,90 ± 0,14	4,09 ± 4,12	3,85 ± 0,33
RV <sub>2</sub>		4	5,05 ± 0,10	4,43 ± 0,18	4,90 ± 0,14
		20	3,31 ± 0,13	4,09 ± 4,12	3,47 ± 0,35
CD		4	5,09 ± 0,03	4,73 ± 0,09	5,17 ± 0,15
		20	3,35 ± 0,19	4,09 ± 4,12	3,45 ± 0,10
CI <sub>1</sub>		4	4,96 ± 0,08	4,59 ± 0,23	5,06 ± 0,10
		20	2,97 ± 0,21	4,09 ± 4,12	3,30 ± 0,00

UFC - Unidades formadoras de colónias; C<sup>+</sup> (Controlo positivo de crescimento); B (Filme sem a incorporação de RV, CD e CI); RV<sub>2</sub> (Filme com 750 µg/mL de resveratrol); CI<sub>1</sub> (Filme com 2500 µg/mL de complexo de inclusão); CD (filme com ciclodextrina).

Inicialmente fez-se um controlo às 0h para garantir a uniformidade do inóculo, para tal as amostras foram inoculadas e realizou-se logo a contagem das UFC. Como controlo utilizou-se uma amostra inoculada e envolvida com um filme sem o agente AM e sem CD (B), e o segundo controlo consistiu numa amostra também inoculada mas sem filme (Controlo positivo, C<sup>+</sup>). O filme B comparativamente com os filmes com incorporação de RV e CI não apresentou redução expressiva em ambas as estirpes e na mistura. No entanto, comparando os resultados observados na tabela 23 do filme C<sup>+</sup> com o filme B, este reduziu as estirpes em estudo à temperatura de 20°C, o que pode indicar que o filme em contacto com a superfície do alimento contaminado pode inibir o crescimento destas bactérias, mas o mesmo não se observou para a temperatura de refrigeração. Relativamente aos filmes com incorporação dos agentes AM, para a estirpe *C. coli* 873 o filme de RV<sub>2</sub> resultou numa redução de log 5,05 a 4°C e numa redução de log 3,31 para 20°C. Comparando com o filme de CI<sub>1</sub>, para a mesma estirpe, a redução a 4°C foi de log 4,96 e a 20°C foi de log 2,97. As diferenças observadas entre RV<sub>2</sub> e do RV na sua forma complexada não foram expressivas. Na mistura de ambas as estirpes também foram observadas diferenças. Por exemplo, ao comparar o filme C<sup>+</sup> com o filme RV<sub>2</sub> apenas ocorreu uma redução de log 5,19 para log 4,90. Para a estirpe *C. jejuni* 225421 a redução em ambas as temperaturas foi semelhante, demonstrando reduções de log 4,43 para 4°C e log 4,09 para 20°C por ação do filme de RV<sub>2</sub> e por ação do filme de CI<sub>1</sub> demonstrou reduções de log 4,59 para 4°C e log 4,09 para 20°C. Também não ocorreram diferenças expressivas na redução de todas as estirpes, por ação do filme CI<sub>1</sub> comparativamente com o filme CD. Os resultados obtidos neste estudo são mais perceptíveis através da observação dos gráficos das figuras 26, 27 e 28.

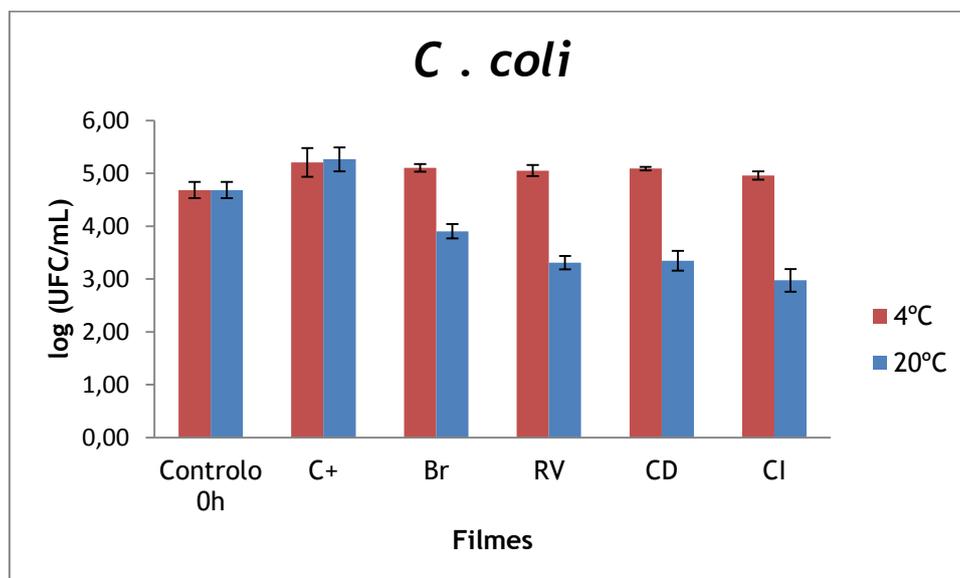
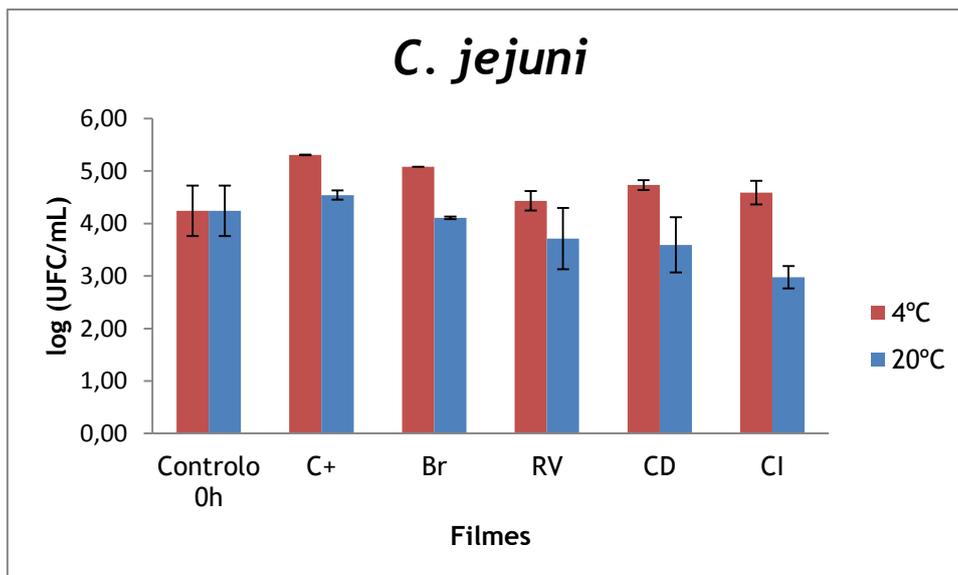
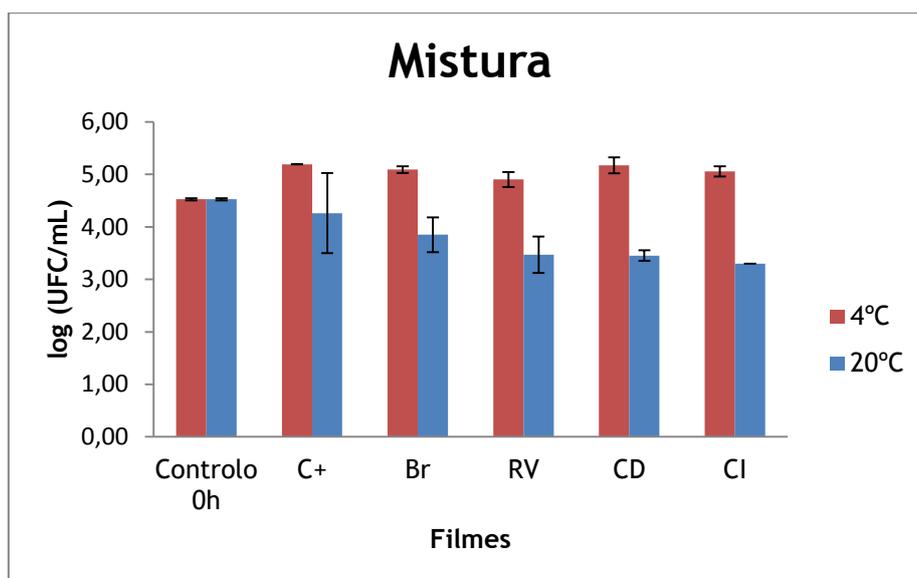


Figura 26: log UFC/mL de *C. coli* das amostras de peito de frango envolvidas com os filmes antimicrobianos em bicamada a 4 e 20°C no período de 72h.



**Figura 27:** log UFC/mL de *C. jejuni* nas amostras de peito de frango envolvidas com os filmes antimicrobianos em bicamada a 4 e 20°C no período de 72h.



**Figura 28:** log UFC/mL da mistura de ambas as estirpes nas amostras de peito de frango envolvidas com os filmes antimicrobianos em bicamada a 4 e 20°C no período de 72h.

A razão pela qual não foram observadas grandes reduções das UFC das estirpes em estudo com os filmes de RV<sub>2</sub> e CI<sub>1</sub>, comparativamente com os controlos 0h, C<sup>+</sup> e B, pode estar relacionada com o modelo alimentar utilizado e com a concentração dos agentes AM (RV e CI) presentes nos filmes em bicamada. Os resultados observados também podem indicar que as possíveis interações entre o RV e CI com os componentes do peito de frango (como por exemplo, proteínas ou lípidos) impediram o contacto direto entre estes agentes AM e os microrganismos presentes no modelo alimentar. Os lípidos e as proteínas presentes nos

alimentos podem atuar como uma barreira física para os agentes AM, protegendo deste modo os microrganismos [119].

Relativamente ao efeito da temperatura, a inativação de ambas as estirpes foi maior à temperatura de 20°C do que à temperatura de refrigeração (4°C), embora as estirpes em estudo sejam consideradas termófilas, cujas condições ótimas de crescimento variam entre 37 a 42°C [5], [7], [8]. Por exemplo, a maioria das estirpes de *C. jejuni* é incapaz de crescer abaixo de 30°C, no entanto estas bactérias por vezes têm a capacidade de sobreviver a temperaturas de refrigeração devido às suas características psicrófilas [92]. A análise deste ensaio pode explicar o comportamento de *Campylobacter* spp. durante o armazenamento de carne de frango a diferentes temperaturas, nomeadamente a 4 e 20°C. A presença de ácidos gordos em forma cíclica nas membranas celulares destas bactérias, permitem-lhes manter a fluidez e a integridade da membrana celular, sem necessitarem de alterar a composição desses ácidos gordos a baixas temperaturas [120].

## Capítulo 6. Conclusões e Perspetivas Futuras

Ao longo deste trabalho foram estudados diversos polímeros derivados de celulose (CMC, HEC, AC e HEC-AC) com incorporação de resveratrol e da sua forma complexada com a HP- $\gamma$ -CD com vista à sua aplicação no controlo de *Campylobacter* em carne de aves.

O primeiro filme a ser desenvolvido neste trabalho foi o filme de CMC no qual foi incorporado RV e CI. A análise das propriedades estruturais e de resistência dos filmes de CMC demonstraram que a incorporação de RV e de CI aumentou a gramagem e a espessura, e tornaram os filmes mais elásticos e menos resistentes. Através da morfologia dos filmes de RV observou-se que este agente AM não provocou irregularidades nos filmes. Estes filmes demonstraram inibir o crescimento de *C. coli* 873 e de *C. jejuni* 225421 na área de contacto dos filmes com a superfície de agar. Com vista a melhorar as propriedades de barreira ao vapor de água dos filmes de CMC, foram incorporados ácidos gordos (AO, AL, OA e azeite), juntamente com o RV, tendo-se verificado que o OA foi o único que conferiu hidrofobicidade ao filme de CMC enquanto o RV aumentou a hidroflicidade.

Com o intuito de melhorar as propriedades antimicrobianas dos filmes, foram testados novos biopolímeros para obter um filme antimicrobiano com as características desejadas, isto é, um filme que apresentasse boas propriedades físicas e que simultaneamente formasse um halo de inibição contra *C. coli* e *C. jejuni*. Inicialmente foi testada a HEC, que apesar de formar halos de inibição contra estes microrganismos, teve a desvantagem de se dissolver quando entrava em contacto com a superfície do meio de cultura. Quando se tentou melhorar estas propriedades e incorporar o RV e o CI, os filmes com incorporação de CI tornaram-se quebradiços e difíceis de manusear. Seguidamente prepararam-se filmes de AC, em que só foi possível obter filmes transparentes, quando estes eram secos a 100°C, temperatura incompatível para incorporação de RV.

Foram desenvolvidos filmes em bicamada, constituídos por uma camada externa de AC e uma camada interna de HEC. A lecitina de soja foi utilizada como agente de ligação entre as duas camadas. O RV e o CI foram incorporados nos filmes como agentes AM com duas concentrações distintas ( $RV_1 = 500 \mu\text{g/mL}$ ;  $RV_2 = 750 \mu\text{g/mL}$ ;  $CI_1 = 2500 \mu\text{g/mL}$ ;  $CI_2 = 7500 \mu\text{g/mL}$ ). A avaliação da resistência dos filmes em bicamada demonstrou que a incorporação do CI influenciou de forma significativa o IT e o ME destes filmes, tornando-os mais resistentes. Os filmes com incorporação de CD e de  $CI_2$  apresentaram os maiores valores de velocidade de transmissão do vapor de água. A incorporação de RV diminuiu a hidroflicidade dos filmes, enquanto nos filmes com incorporação de CD e de CI aumentou a hidroflicidade.

Os ensaios de libertação de RV e CI, a partir dos filmes em bicamada para o simulante alimentar, etanol a 10%, demonstraram que os agentes AM foram libertados totalmente ao fim de 10 dias à temperatura de 4 e 20°C. No entanto, a taxa de libertação dos compostos testados dependeu da temperatura e da concentração do agente AM. Na avaliação da atividade antimicrobiana destes filmes, verificou-se que o filme de RV<sub>1</sub> e o filme de CI<sub>1</sub> foram os mais eficazes na inibição do crescimento de *C. coli* e *C. jejuni*, sendo visível a formação de halos de inibição. Avaliou-se ainda a atividade destes filmes sobre o QS, utilizando a estirpe biossensor *Chromobacterium violaceum* ATCC 12472, tendo-se demonstrado que os filmes com incorporação de CI apresentaram atividade antimicrobiana e anti-QS, ao contrário dos filmes com incorporação de RV na sua forma livre que apenas apresentaram atividade antimicrobiana. Todos os filmes, com incorporação de RV e CI, também demonstraram atividade anti-QS através da inibição da produção de violaceína superior a 70%.

Como o efeito antimicrobiano dos filmes com incorporação de RV<sub>2</sub> e CI<sub>1</sub> foi mais acentuado nas estirpes isoladas de *Campylobacter*, estudou-se a sua aplicação em amostras de peito de frango. Neste ensaio verificaram-se apenas ligeiras reduções do número de UFC de *C. coli* 873, *C. jejuni* 225421 e da mistura de ambas as estirpes, mas verificou-se que as temperaturas de 4 e 20°C influenciaram o resultado dos ensaios, tendo sido observado que à temperatura de 20°C ocorreu uma maior redução das UFC das estirpes em estudo.

Em conclusão, o presente trabalho não só contribuiu para o desenvolvimento de filmes biodegradáveis com incorporação de RV na forma livre e na forma complexada com a HP-γ-CD, para futuras aplicações como embalagens alimentares para o controlo de *C. coli* e *C. jejuni*, como também contribuiu para evidenciar as potencialidades deste composto no controlo deste microrganismo.

Para futuras aplicações dos filmes antimicrobianos em bicamada como embalagens alimentares será necessário desenvolver filmes com concentrações mais elevadas de resveratrol e da sua forma complexada com a HP-γ-CD, de forma a testar a atividade antimicrobiana num modelo alimentar, nomeadamente a carne de frango. A potencial atividade inibitória dos filmes em bicamada em biofilmes de *Campylobacter* spp. também poderá ser avaliada. Terão que ser realizados estudos sobre a possível influência dos filmes com incorporação de RV e de CI nas características nutricionais e organolépticas da carne de frango. Será também importante avaliar os filmes desenvolvidos neste trabalho noutros patógenos alimentares nomeadamente *Arcobacter butzleri*, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*, *Salmonella* Typhimurium, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*.

## Referências Bibliográficas

- [1] A. Lucera, C. Costa, A. Conte, M. A Del Nobile, "Food applications of natural antimicrobial compounds," *Front. Microbiol.*, doi: 10.3389/fmicb.2012.00287;
- [2] K. K. Kuorwel, M. J. Cran, K. Sonneveld, J. Miltz, S. W. Bigger, "Antimicrobial activity of biodegradable polysaccharide and protein-based films containing active agents," *J. Food Sci.*, 76, 3, R90-R102, 2011;
- [3] K. Wiczorek, J. Osek, "Antimicrobial resistance mechanisms among *Campylobacter*," *Biomed Res. Int.*, doi.org/10.1155/2013/340605;
- [4] A. Duarte, A. Santos, V. Manageiro, A. Martins, M. J. Fraqueza, M. Caniça, F. C. Domingues, M. Oleastro, "Human, food and animal *Campylobacter* spp. isolated in Portugal: High genetic diversity and antibiotic resistance rates," *Int. J. Antimicrob. Agents*, 44, 4, 306-313, 2014;
- [5] J. Silva, D. Leite, M. Fernandes, C. Mena, P. A. Gibbs, P. Teixeira, "*Campylobacter* spp. as a Foodborne Pathogen: A Review," *Front. Microbiol.*, doi:10.3389/fmicb.2011.00200;
- [6] P. Appendini, J. H. Hotchkiss, "Review of antimicrobial food packaging," *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.*, 3, 2, 113-126, 2002;
- [7] T. Humphrey, S. O'Brien, M. Madsen, "*Campylobacters* as zoonotic pathogens: a food production perspective," *Int. J. Food Microbiol.*, 117, 3, 237-257, 2007;
- [8] B. M. Allos, "*Campylobacter jejuni* Infections: update on emerging issues and trends," *Clin. Infect. Dis.*, 32, 8, 1201-1206, 2001;
- [9] G. Gharst, O. a Oyarzabal, S. K. Hussain, "Review of current methodologies to isolate and identify *Campylobacter* spp. from foods," *J. Microbiol. Methods*, 95, 1, 84-92, 2013;
- [10] M. Reuter, A. Mallett, B. M. Pearson, A. H. M. Van Vliet, "Biofilm formation by *Campylobacter jejuni* is increased under aerobic conditions," *Appl. Environ. Microbiol.*, 76, 7, 2122-2128, 2010;
- [11] N. M. Iovine, "Resistance mechanisms in *Campylobacter jejuni*," 4, 3, 230-240, 2013;
- [12] D. Alkan, L. Y. Aydemir, I. Arcan, H. Yavuzdurmaz, H. I. Atabay, C. Ceylan, "Development of Flexible Antimicrobial Packaging Materials against *Campylobacter jejuni* by Incorporation of Gallic Acid into Zein-Based Films," 59, 11003-11010, 2011;
- [13] C. N. Cutter, "Microbial control by packaging: a review," *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 42, 2, 151-161, 2002;

- [14] D. Dainelli, N. Gontard, D. Spyropoulos, E. Zondervan-van den Beuken, P. Tobback, "Active and intelligent food packaging: legal aspects and safety concerns," *Trends Food Sci. Technol.*, 19, S103-S112, 2008;
- [15] D. Restuccia, U. G. Spizzirri, O. I. Parisi, G. Cirillo, M. Curcio, F. Iemma, F. Puoci, G. Vinci, N. Picci, "New EU regulation aspects and global market of active and intelligent packaging for food industry applications," *Food Control*, 21, 11, 1425-1435, 2010;
- [16] C. A. Campos, L. N. Gerschenson, S. K. Flores, "Development of Edible Films and Coatings with Antimicrobial Activity," *Food Bioprocess Technol.*, 4, 6, 849-875, 2010;
- [17] M. Ozdemir, J. D. Floros, "Active food packaging technologies," *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 44, 3, 185-193, 2004;
- [18] D. A. Pereira de Abreu, J. M. Cruz, P. Paseiro Losada, "Active and Intelligent Packaging for the Food Industry," *Food Rev. Int.*, 28, 2, 146-187, 2012;
- [19] S. A. Valencia-Chamorro, L. Palou, M. A. Del Río, M. B. Pérez-Gago, "Antimicrobial edible films and coatings for fresh and minimally processed fruits and vegetables: a review," *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 51, 9, 872-900;
- [20] K. N. Turhan, "Cellulose based packaging films containing natural antimicrobial agents," *J. Hyg. Eng. Des.*, Review paper UDC 579.67;
- [21] B. Malhotra, A. Keshwani, H. Kharkwal, "Antimicrobial food packaging: potential and pitfalls," *Front. Microbiol.*, doi:10.3389/fmicb.2015.00611;
- [22] A. C. Pinheiro, M. A. Cerqueira, B. W. S. Souza, J. T. Martins, J. A. Teixeira, A. A. Vicente, "Utilização de revestimentos/filmes edíveis para aplicações alimentares," *Boletim de Biotecnologia*, 18-28, 2010;
- [23] C. Pérez-Pérez, C. Regalado-González, C. A. Rodríguez-Rodríguez, J. R. Barbosa-Rodríguez, F. Villaseñor-Ortega, "Incorporation of antimicrobial agents in food packaging films and coatings," *Food Biotechnol.*, 661, 2, 193-216, 2006;
- [24] A. Klančnik, S. S. Možina, Q. Zhang, "Anti-*Campylobacter* activities and resistance mechanisms of natural phenolic compounds in *Campylobacter*," *PLoS One*, doi:10.1371/journal.pone.0051800 ;
- [25] S. G. Giteru, R. Coorey, D. Bertolatti, E. Watkin, S. Johnson, Z. Fang, "Physicochemical and antimicrobial properties of citral and quercetin incorporated kafirin-based bioactive films," *Food Chem.*, 168, 341-347, 2015;
- [26] C. Counet, D. Callemien, S. Collin, "Chocolate and cocoa: New sources of *trans*-resveratrol and *trans*-piceid," *Food Chem.*, 98, 4, 649-657, 2006;

- [27] L. Paulo, S. Ferreira, E. Gallardo, J. A. Queiroz, F. Domingues, "Antimicrobial activity and effects of resveratrol on human pathogenic bacteria," *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 26, 8, 1533-1538, 2010;
- [28] J. Lee, D. G. Lee, "Novel Antifungal Mechanism of Resveratrol: Apoptosis Inducer in *Candida albicans*," *Curr. Microbiol.*, 70, 3, 383-389, 2015;
- [29] V. Sanna, A. M. Roggio, S. Siliani, M. Piccinini, S. Marceddu, A. Mariani, M. Sechi, "Development of novel cationic chitosan-and anionic alginate-coated poly(D,L-lactide-co-glycolide) nanoparticles for controlled release and light protection of resveratrol.," *Int. J. Nanomedicine*, 7, 5501-5516, 2012;
- [30] V. Filip, M. Plocková, J. Šmidrkal, Z. Špičková, K. Melzoch, Š. Schmidt, "Resveratrol and its antioxidant and antimicrobial effectiveness," *Food Chem.*, 83, 4, 585-593, 2003;
- [31] M. Sessa, R. Tsao, R. Liu, G. Ferrari, F. Donsì, "Evaluation of the stability and antioxidant activity of nanoencapsulated resveratrol during *in vitro* digestion.," *J. Agric. Food Chem.*, 59, 23, 12352-12360, 2011;
- [32] G. Davidov-Pardo, D. J. McClements, "Resveratrol encapsulation: Designing delivery systems to overcome solubility, stability and bioavailability issues," *Trends Food Sci. Technol.*, 38, 2, 88-103, 2014;
- [33] P. Jeandet, B. Delaunois, A. Aziz, D. Donnez, Y. Vasserot, S. Cordelier, E. Courot, "Metabolic engineering of yeast and plants for the production of the biologically active hydroxystilbene, resveratrol.," *J. Biomed. Biotechnol.*, doi:10.1155/2012/579089;
- [34] M. A. Markus, B. J. Morris, "Resveratrol in prevention and treatment of common clinical conditions of aging," *Clin. Interv. Aging*, 3, 2, 331-339, 2008;
- [35] M. I. Fernández-Mar, R. Mateos, M. C. García-Parrilla, B. Puertas, E. Cantos-Villar, "Bioactive compounds in wine: Resveratrol, hydroxytyrosol and melatonin: A review," *Food Chem.*, 130, 4, 797-813, 2012;
- [36] M. Campagna, C. Rivas, "Antiviral activity of resveratrol.," *Biochem. Soc. Trans.*, 38, 50-53, 2010;
- [37] M. V. Selma, M. Larrosa, D. Beltrán, R. Lucas, J. C. Morales, F. Tomás-Barberán, J. C. Espín, "Resveratrol and some glucosyl, glucosylacyl, and glucuronide derivatives reduce *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella typhimurium*, and *Listeria monocytogenes* Scott A adhesion to colonic epithelial cell lines," *J. Agric. Food Chem.*, 60, 30, 7367-7374, 2012;
- [38] S. Ferreira, F. Silva, J. a Queiroz, M. Oleastro, F. C. Domingues, "Resveratrol against *Arcobacter butzleri* and *Arcobacter cryaerophilus*: activity and effect on cellular functions.," *Int. J. Food Microbiol.*, 180, 62-8, 2014;

- [39] L. Paulo, M. Oleastro, E. Gallardo, J. A. Queiroz, and F. Domingues, "Antimicrobial properties of resveratrol : a review," pp. 1225-1235, 2011;
- [40] J.-H. Lee, Y.-G. Kim, S. Y. Ryu, M. H. Cho, J. Lee, "Resveratrol Oligomers Inhibit Biofilm Formation of *Escherichia coli* O157:H7 and *Pseudomonas aeruginosa*.,” *J. Nat. Prod.*, 77, 1,168-72, 2014;
- [41] H. J. Jung, I. A. Hwang, W. S. Sung, H. Kang, B. S. Kang, Y. B. Seu, D. G. Lee, "Fungicidal effect of resveratrol on human infectious fungi.,” *Arch. Pharm. Res.*, 28, 5, 557-560, 2005;
- [42] L. Paulo, M. Oleastro, E. Gallardo, J. A. Queiroz, F. Domingues, "Anti-*Helicobacter pylori* and urease inhibitory activities of resveratrol and red wine,” *Food Res. Int.*, 44, 4, 964-969, 2011;
- [43] F. Silva, A. Figueiras, E. Gallardo, C. Nerín, F. C. Domingues, "Strategies to improve the solubility and stability of stilbene antioxidants: a comparative study between cyclodextrins and bile acids.,” *Food Chem.*, 145, 115-25, 2014;
- [44] J. M. López-Nicolás, P. Rodríguez-Bonilla, L. Méndez-Cazorla, F. García-Carmona, "Physicochemical study of the complexation of pterostilbene by natural and modified cyclodextrins.,” *J. Agric. Food Chem.*, 57, 12, 5294-300, 2009;
- [45] Z. Lu, B. Cheng, Y. Hu, Y. Zhang, G. Zou, "Complexation of resveratrol with cyclodextrins: Solubility and antioxidant activity,” *Food Chem.*, 113, 1,17-20, 2009;
- [46] G. Astray, C. Gonzalez-Barreiro, J. C. Mejuto, R. Rial-Otero, J. Simal-Gándara, "A review on the use of cyclodextrins in foods,” *Food Hydrocoll.*, 23, 7,1631-1640, 2009;
- [47] C. Folch-Cano, M. Yazdani-Pedram, C. Olea-Azar, "Inclusion and functionalization of polymers with cyclodextrins: current applications and future prospects.,” *Molecules*, 19, 9, 14066-14079, 2014;
- [48] E. Pinho, M. Grootveld, G. Soares, M. Henriques, "Cyclodextrins as encapsulation agents for plant bioactive compounds.,” *Carbohydr. Polym.*, 101, 121-35, 2014;
- [49] A. Duarte, A. C. Alves, S. Ferreira, F. Silva, F. C. Domingues, "Resveratrol inclusion complexes: Antibacterial and anti-biofilm activity against *Campylobacter* spp. and *Arcobacter butzleri*,” *Food Res. Int.*, doi.org/10.1016/j.foodres.2015.05.047;
- [50] C. López-de-Dicastillo, R. Catalá, R. Gavara, P. Hernández-Muñoz, "Food applications of active packaging EVOH films containing cyclodextrins for the preferential scavenging of undesirable compounds,” *J. Food Eng.*, 104, 3, 380-386, 2011;
- [51] S. Quintavalla, L. Vicini, "Antimicrobial food packaging in meat industry,” *Meat Sci.*, 62, 3, 373-380, 2002;

- [52] L. Bastarrachea, S. Dhawan, S. S. Sablani, "Engineering Properties of Polymeric-Based Antimicrobial Films for Food Packaging," *Food Eng. Rev.*, 3, 2, 79-93, 2011;
- [53] J. W. Rhim, H. M. Park, C. S. Ha, "Bio-nanocomposites for food packaging applications," *Prog. Polym. Sci.*, 38, 10-11, 1629-1652, 2013;
- [54] H. Arnon, R. Granit, R. Porat, E. Poverenov, "Development of polysaccharides-based edible coatings for citrus fruits: a layer-by-layer approach.," *Food Chem.*, 166, pp. 465-72, 2015;
- [55] R. Chandra, R. Rustgi, "Biodegradable polymers," *Prog. Polym. Sci.*, 23, 97, 1273-1335, 1998;
- [56] S. Paunonen, "Strength and barrier enhancements of Cellophane and cellulose derivative films: A review," *BioResources*, 8, 2, 3098-3121, 2013;
- [57] R. N. Tharanathan, "Biodegradable films and composite coatings: past, present and future," *Trends Food Sci. Technol.*, 14, 3, 71-78, 2003;
- [58] S. Fischer, K. Thümmel, B. Volkert, K. Hettrich, I. Schmidt, K. Fischer, "Properties and applications of cellulose acetate," *Macromol. Symp.*, 262, 1, 89-96, 2008;
- [59] M. Pereda, G. Amica, N. E. Marcovich, "Development and characterization of edible chitosan/olive oil emulsion films," *Carbohydr. Polym.*, 87, 2, 1318-1325, 2012;
- [60] M. Pereda, G. Amica, I. Rácz, N. E. Marcovich, "Preparation and characterization of sodium caseinate films reinforced with cellulose derivatives," *Carbohydr. Polym.*, 86, 2, 1014-1021, 2011;
- [61] L. A. Burmeister, *Coating materials and surface coatings*, Chapter 23, "Hydroxyethylcellulose", Ed. Arthur A. Tracton, 1-5, 2007;
- [62] S. P. Li, S. A. Martellucci, R. D. Bruce, A. C. Kinyon, M. B. Hay, J. D. H. Lii, "Evaluation of the film-coating properties of a hydroxyethyl cellulose / hydroxypropyl methylcellulose polymer system," *Drug Dev. Ind. Pharm.*, 28, 4, 389-401, 2002;
- [63] M. G. A. Vieira, M. A. Da Silva, L. O. Dos Santos, M. M. Beppu, "Natural-based plasticizers and biopolymer films: A review," *Eur. Polym. J.*, 47, 3, 254-263, 2011;
- [64] R. Villalobos, P. Hernández-Muñoz, A. Chiralt, "Effect of surfactants on water sorption and barrier properties of hydroxypropylmethylcellulose films," *Food Hydrocoll.*, 20, 4, 502-509, 2006;
- [65] V. Morillon, F. Debeaufort, G. Blond, M. Capelle, A. Voilley, "Factors affecting the moisture permeability of lipid-based edible films: a review.," *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 42, 1, 67-89, 2002;

- [66] M. Uz, S. A. Altinkaya, "Development of mono and multilayer antimicrobial food packaging materials for controlled release of potassium sorbate," *LWT - Food Sci. Technol.*, 44,10, 2302-2309, 2011;
- [67] W. Guiga, Y. Swesi, S. Galland, E. Peyrol, P. Degraeve, I. Sebti, "Innovative multilayer antimicrobial films made with Nisaplin® or nisin and cellulosic ethers: Physico-chemical characterization, bioactivity and nisin desorption kinetics," *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.*, 11, 2, 352-360, 2010;
- [68] M. Process, "Multilayer films: a solution for demanding food packaging applications," *Food Anal. Pack. Ingrid. Process.*, 3,19-22, 2006;
- [69] A. Boumail, S. Salmieri, E. Klimas, P. O. Tawema, J. Bouchard, M. Lacroix, "Characterization of trilayer antimicrobial diffusion films (ADFs) based on methylcellulose-polycaprolactone composites," *J. Agric. Food Chem.*, 61, 4, 811-821, 2013;
- [70] K. Niskanen, P. Kärenlampi, *Papermaking Science and Technology - Paper physics*, Book 16, Chapter 5, "In-plane tensile properties",Tappi Press, Finlândia, 2000;
- [71] B. Ghanbarzadeh, M. Musavi, a. R. Oromiehie, K. Rezayi, E. Razmi Rad, J. Milani, "Effect of plasticizing sugars on water vapor permeability, surface energy and microstructure properties of zein films," *LWT - Food Sci. Technol.*, 40, 7, 1191-1197, 2007;
- [72] C. M. Noronha, S. M. de Carvalho, R. C. Lino, P. L. M. Barreto, "Characterization of antioxidant methylcellulose film incorporated with  $\alpha$ -tocopherol nanocapsules.," *Food Chem.*, 159, 529-35, 2014;
- [73] J. Vaarasalo, *Papermaking science and tecnhnology:Pulp and paper testing*, Book 17,Chapter 8, Fapet Oy, Finlândia,163-181, 1999;
- [74] J. Lange, Y. Wyser, "Recent innovations in barrier technologies for plastic packaging - A Review," *Packag. Technol. Sci.*, 16, 4,149-158, 2003;
- [75] J. H. Han, J.D. Floros, "Casting antimicrobial packaging films and measuring their physical properties and antimicrobial activity, *J. Food. Plastic Film Sheeting*, 13,287-298, 1993;
- [76] J. E. Agudo, P. J. Pardo, H. Sánchez, Á. L. Pérez, M. I. Suero, "A low-cost real color picker based on arduino," *Sensors*, 14, 7, 11943-11956, 2014;
- [77] M. V. Alvarez, L. A. Ortega-Ramirez, M. M. Gutierrez-Pacheco, A. T. Bernal-Mercado, I. Rodriguez-Garcia, G. A. Gonzalez-Aguilar, A. Ponce, M. D. R. Moreira, S. I. Roura, J. F. Ayala-Zavala, "Oregano essential oil-pectin edible films as anti-quorum sensing and food antimicrobial agents," *Front. Microbiol.*, 5, 1-7, 2014;

- [78] J. Zhang, X. Rui, L. Wang, Y. Guan, X. Sun, M. Dong, "Polyphenolic extract from *Rosa rugosa* tea inhibits bacterial quorum sensing and biofilm formation," *Food Control*, 42, 125-131, 2014;
- [79] M. V. Alvarez, M. R. Moreira, A. Ponce, "Antiquorum Sensing and Antimicrobial Activity of Natural Agents With Potential Use in Food," *J. Food Saf.*, 32, 3, 379-387, 2012;
- [80] M. Ghasemlou, F. Khodaiyan, A. Oromiehie, M. S. Yarmand, "Characterization of edible emulsified films with low affinity to water based on kefir and oleic acid," *Int. J. Biol. Macromol.*, 49, 3, 378-384, 2011;
- [81] ISO 534:2011 - Paper and board - Determination of thickness, density and specific volume, International Organization of Standardization, Geneva, Switzerland;
- [82] ISO 536:1995 - Paper and board - Determination of grammage. International Organization of Standardization. Geneva, Switzerland;
- [83] ISO 1924/1:1992 - Paper and board - Determination of tensile properties - Part 1: Constant rate of loading method, International Organization of Standardization, Geneva, Switzerland;
- [84] R. Good, C. Van Oss, "The Modern Theory of Contact Angles and the Hydrogen Bond Components of Surface Energies," *Mod. Approaches to Wettability*, 1-27, 1992;
- [85] M. Rankl, S. Laib, S. Seeger, "Surface tension properties of surface-coatings for application in biodiagnostics determined by contact angle measurements," *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, 30, 3, 177-186, 2003;
- [86] M. Adão, B. Saramago, A. Fernandes, "Estimation of the Surface Properties of Styrene-Acrylonitrile Random Copolymers from Contact Angle Measurements.," *J. Colloid Interface Sci.*, 217, 1, 94-106, 1999;
- [87] ISO 638:2008 - Paper, board and pulps - Determination of dry matter content - oven-drying method. International Organization of Standardization. Geneva, Switzerland;
- [88] ISO 22891:2013 - Paper - Determination of transmittance by diffuse reflectance measurement. International Organization of Standardization. Geneva, Switzerland;
- [89] C. Pastor, L. Sánchez-González, A. Chiralt, M. Cháfer, C. González-Martínez, "Physical and antioxidant properties of chitosan and methylcellulose based films containing resveratrol," *Food Hydrocoll.*, 30, 1, 272-280, 2013;
- [90] ASTM E96:1995 Standard test methods for water vapor transmission of materials. American Society for Testing and Materials, Philadelphia, PA, USA;
- [91] CLSI, M2-A8, "Padronização dos Testes de Sensibilidade a Antimicrobianos por Disco-difusão: Norma Aprovada," 2003, Oitava Edição 23.1;

- [92] R. M. Mild, L. A. Joens, M. Friedman, C. W. Olsen, T. H. Mchugh, B. Law, S. Ravishankar, "Antimicrobial edible apple films inactivate antibiotic resistant and susceptible *Campylobacter jejuni* strains on chicken breast," *J. Food Sci.*, 76, 3, 2011;
- [93] A. Dashipour, V. Razavilar, H. Hosseini, S. Shojaee-Aliabadi, J. B. German, K. Ghanati, M. Khakpour, R. Khaksar, "Antioxidant and antimicrobial carboxymethyl cellulose films containing *Zataria multiflora* essential oil," *Int. J. Biol. Macromol.*, 72, 606-613, 2015;
- [94] B. Ghanbarzadeh, H. Almasi, "Physical properties of edible emulsified films based on carboxymethyl cellulose and oleic acid," *Int. J. Biol. Macromol.*, 48, 1, 44-49, 2011;
- [95] B. Thompson, *Printing materials: science and technology*. Pira International, 1998;
- [96] O. Tillmann, *Handbook of paper and board*, Chapter 12, "Testing of paper and board", 467-474, Ed. Holik Hed, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 2006;
- [97] A. Dashipour, R. Khaksar, H. Hosseini, S. Shojaee-Aliabadi, K. Ghanati, "Physical, antioxidant and antimicrobial characteristics of carboxymethyl cellulose edible film cooperated with clove essential oil", *Zahedan J. Res. Med. Sci.*, 16, 8, 34-42, 2014;
- [98] L. Sánchez-González, C. González-Martínez, A. Chiralt, M. Cháfer, "Physical and antimicrobial properties of chitosan-tea tree essential oil composite films," *J. Food Eng.*, 98, 4, 443-452, 2010;
- [99] L. Sánchez-González, A. Chiralt, C. González-Martínez, M. Cháfer, "Effect of essential oils on properties of film forming emulsions and films based on hydroxypropylmethylcellulose and chitosan," *J. Food Eng.*, 105, 2, 246-253, 2011;
- [100] A. Miro, I. D'Angelo, A. Nappi, P. La Manna, M. Biondi, L. Mayol, P. Musto, R. Russo, M. I. La Rotonda, F. Ungaro, F. Quaglia, "Engineering poly(ethylene oxide) buccal films with cyclodextrin: A novel role for an old excipient?," *Int. J. Pharm.*, 452, no. 1-2, pp. 283-291, 2013;
- [101] B. A. Behbahani, F. T. Yazdi, A. Mortazavi, M. Gholian, F. Zendeboodi, A. Vasiee, "Antimicrobial effect of Carboxy Methyl Cellulose (CMC) containing aqueous and ethanolic *Eucalyptus camaldulensis* L. leaves extract against *Streptococcus pyogenes*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus epidermidis*," 5, 2, 59-69, 2014;
- [102] F. Caruso, J. Tanski, A. Villegas-Estrada, M. Rossi, "Structural basis for antioxidant activity of *trans*-resveratrol: Ab initio calculations and crystal and molecular structure," *J. Agric. Food Chem.*, 52, 24, 7279-7285, 2004;
- [103] E. Colla, P. J. D. A. Sobral, F. C. Menegalli, "*Amaranthus cruentus* flour edible films: Influence of stearic acid addition, plasticizer concentration, and emulsion stirring speed on water vapor permeability and mechanical properties," *J. Agric. Food Chem.*, 54, 18, 6645-6653, 2006;

- [104] M.A. Grompone, *Vegetable oils in food technology. Composition, properties and uses*, Chapter 5, "SunFlower oil", 145-251, Second Edition, Ed Frank D. Gunstone, Wiley Blackwell 2011;
- [105] M. Vargas, A. Albors, A. Chiralt, C. González-Martínez, "Characterization of chitosan-oleic acid composite films," *Food Hydrocoll.*, 23, 2, 536-547, 2009;
- [106] M. L. L. Navarro-Tarazaga, M. A. Del Río, J. M. Krochta, M. B. Pérez-Gago, "Fatty acid effect on hydroxypropylmethylcellulose-beeswax edible film properties and postharvest quality of coated 'ortanique' mandarins," *J. Agric. Food Chem.*, 56, 22, 10689-10696, 2008;
- [107] A. A. M. De Melo, R. M. Geraldine, M. F. A. Silveira, M. C. Lopes, C. Silva, T. H. Fernandes, A. N. De Oliveira, "Microbiological Quality and Other Characteristics of Refrigerated Chicken Meat in," 1419-1427, 2012;
- [108] F. J. Rodríguez, A. Torres, Á. Peñaloza, H. Sepúlveda, M. J. Galotto, A. Guarda, J. Bruna, "Development of an antimicrobial material based on a nanocomposite cellulose acetate film for active food packaging.," *Food Addit. Contam. Part A. Chem. Anal. Control. Expo. Risk Assess.*, 31, 3, 342-53, 2014;
- [109] N. Y. Abou-Zeid, A. I. Waly, N. G. Kandile, A. A. Rushdy, M. A. El-Sheikh, H. M. Ibrahim, "Preparation, characterization and antibacterial properties of cyanoethylchitosan/cellulose acetate polymer blended films," *Carbohydr. Polym.*, 84, 1, 223-230, 2011;
- [110] Š. Zupančič, Z. Lavrič, J. Kristl, "Stability and solubility of *trans*-resveratrol are strongly influenced by pH and temperature," doi.org/10.1016/j.ejpb.2015.04.002;
- [111] C. López-de-Dicastillo, M. Gallur, R. Catalá, R. Gavara, P. Hernandez-Muñoz, "Immobilization of B-cyclodextrin in ethylene-vinyl alcohol copolymer for active food packaging applications," *J. Memb. Sci.*, 353, 184-191, 2010;
- [112] J. M. López-Nicolás, P. Rodríguez-Bonilla, F. García-Carmona, "Cyclodextrins and antioxidants.," *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 54, 2, 251-76, 2014;
- [113] P. C. Srinivasa, M. N. Ramesh, K. R. Kumar, R. N. Tharanathan, "Properties and sorption studies of chitosan-polyvinyl alcohol blend films," *Carbohydr. Polym.*, 53, 4, 431-438, 2003;
- [114] M. J. Fabra, P. Talens, A. Chiralt, "Microstructure and optical properties of sodium caseinate films containing oleic acid-beeswax mixtures," *Food Hydrocoll.*, 23, 3, 676-683, 2009;
- [115] M. Moradi, H. Tajik, S. M. Razavi Rohani, A. R. Oromiehie, H. Malekinejad, J. Aliakbarlu, M. Hadian, "Characterization of antioxidant chitosan film incorporated

with *Zataria multiflora* Boiss essential oil and grape seed extract,” *LWT - Food Sci. Technol.*, 46, 2, 477-484, 2012;

- [116] A. Sanches-Silva, D. Costa, T. G. Albuquerque, G. G. Buonocore, F. Ramos, M. C. Castilho, A. V. Machado, H. S. Costa, “Trends in the use of natural antioxidants in active food packaging: a review.,” *Food Addit. Contam. Part A*, 31, 3, 374-95, 2014;
- [117] P. N. Skandamis, G. J. E. Nychas, “Quorum sensing in the context of food microbiology,” *Appl. Environ. Microbiol.*, 78, 16, 5473-5482, 2012;
- [118] A. N. Olaimat, Y. Fang, R. a Holley, “Inhibition of *Campylobacter jejuni* on fresh chicken breasts by κ-carrageenan/chitosan-based coatings containing allyl isothiocyanate or deodorized oriental mustard extract.,” *Int. J. Food Microbiol.*, 187, 77-82, 2014;
- [119] M. R. Moreira, A. G. Ponce, C.E. DEL VALLE, S. I. ROURA, “Effects of clove and tea tree oils on *Escherichia coli* O157:H7 in blanched spinach and minced cooked beef”, *J. Food Process. Pres.*,31, 379-391, 2007;
- [120] R. A. Hughes, K. Hallett, T. Cogan, M. Enser,T. Humphrey, “The response of *Campylobacter jejuni* to low temperature differs from that of *Escherichia coli*,” *Appl. Environ. Microbiol.*, 75, 19, 6292-6298, 2009.

# Anexo - Artigo Submetido

Title Page

1        **Characterization and antimicrobial activity of cellulose derivatives**  
2                    **films incorporated with a resveratrol inclusion complex**

3

4        Ângela Silva<sup>1</sup>, Andreia Duarte<sup>1</sup>, Sónia Sousa<sup>2</sup>, Ana Ramos<sup>2</sup>, Fernanda C. Domingues<sup>1\*</sup>

5

6        <sup>1</sup>CICS-UBI – Health Sciences Research Centre, University of Beira Interior, Avenida Infante D.  
7        Henrique, 6200-506 Covilhã, Portugal

8        <sup>2</sup>FibEnTech - Fiber Materials and Environmental Technologies Research Unit, University of  
9        Beira Interior, Rua Marquês d'Ávila e Bolama, 6201-001 Covilhã, Portugal.

10

11

12        \*Corresponding author:

13        CICS-UBI - Health Sciences Research Centre

14        University of Beira Interior

15        Av. Infante D. Henrique

16        6200-506 Covilhã, Portugal

17        Phone: +351 275 319 827

18        Fax: +351 275 319 730

19        E-mail: fdomingues@ubi.pt

20

21

22

23

1 **Abstract**

2 The aim of this study was to develop an active film based on cellulose derivatives  
3 (hydroxyethylcellulose and cellulose acetate), while using resveratrol and its inclusion  
4 complex with hydroxypropyl- $\gamma$ -cyclodextrin as active agents. These films were prepared  
5 by the casting method. The structural, mechanical, barrier, surface free energy, optical  
6 and release properties were analyzed. The antimicrobial activity of these films against  
7 *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli* and *Arcobacter butzleri* was evaluated by  
8 the agar diffusion method. The anti-quorum sensing (QS) activity of films was also  
9 studied using the biosensor strain *Chromobacterium violaceum* ATCC 12472. The  
10 active films developed in this work besides being transparent, inhibit the growth of the  
11 tested strain and had anti-QS activity. This study showed the potential of these active  
12 films as a new approach to preserving poultry meat.

13

14 **Keywords:** cellulose derivatives films; resveratrol; inclusion complex; active  
15 packaging; antibacterial.

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25

26 **1. Introduction**

27 Microbial growth is a major concern on food products because some microorganisms  
28 can potentially cause food-borne illness (Lucera et al. 2012; Turhan 2013).  
29 *Campylobacter* spp., mostly *Campylobacter coli* and *Campylobacter jejuni* are among  
30 the biggest worldwide causes of human bacterial gastroenteritis (Duarte et al. 2014).  
31 The source of human infection is mainly associated to the consumption of undercooked  
32 poultry meat and handling of raw meat (Corry and Atabay 2001; Duarte et al. 2014).  
33 Similarly, *Arcobacter* is another pathogen commonly found in poultry meat, in  
34 particular *A. butzleri* which is considered to be a serious hazard to human health (Corry  
35 and Atabay 2001; Wesley and Miller 2010). Recently, the pathogenesis of bacteria  
36 linked to food spoilage has been associated to intercellular communication mechanisms  
37 like quorum sensing (QS) (Alvarez et al. 2012; Alvarez et al. 2014). These mechanisms  
38 also enable bacteria to regulate some physiological activities, such as biofilm formation  
39 and antibiotic resistance (Alvarez et al. 2012). So, it has been demonstrated that the  
40 regulation or inhibition of food bacterial proliferation by QS can be a good strategy for  
41 food preservation (Alvarez et al. 2012; Alvarez et al. 2014). Antimicrobial packaging is  
42 one of the active packaging concepts that are an innovative option to inhibiting  
43 microbial growth on the foods while maintaining safety and quality (Turhan 2013). The  
44 antimicrobial agents are incorporated into the packaging material, maintaining their  
45 activity for a longer period of time (Lucera et al. 2012; Turhan 2013). In the food  
46 packaging industry, due to environmental concerns and consumer demand for more  
47 natural foods, films and coatings prepared from biodegradable materials, as well as  
48 those which incorporate natural antimicrobial agents are increasingly being used  
49 (Campos et al. 2010; Kuorwel et al. 2011; Lucera et al. 2012; El-Fawal 2014).

50 Biodegradable polysaccharide-based films have a potential to be used in antimicrobial  
51 packaging systems or in combination with antimicrobial agents (Kuorwel et al. 2011).  
52 Cellulose derivatives such as cellulose esters (e.g. cellulose acetate) and cellulose ethers  
53 (e.g. methylcellulose, hydroxyethylcellulose and others) are an important source of  
54 biomaterials in food packaging (Paunonen 2013). Cellulose derivatives films are  
55 flexible, transparent, tough, highly sensible to water and resistant to fats and oils  
56 (Campos et al. 2010).

57 The use of phenolic compounds in active packaging has shown a potent antimicrobial  
58 and antioxidant activity in food (Alkan et al. 2011; Pastor et al. 2013). Resveratrol  
59 (3,4',5-trihydroxystilbene) is a polyphenolic compound commonly encountered in  
60 several foods and drinks, such as red wine, grapes, berries, peanuts and pistachios  
61 (Paulo et al. 2010). This compound has antimicrobial properties against several  
62 pathogens which, together with its antioxidant properties, are beneficial for human  
63 health (Paulo et al. 2010; Ferreira et al. 2014). However, resveratrol has poor solubility,  
64 is photosensitive and is susceptible to oxidation (Delmas et al. 2011). Due to these  
65 problems, the complexation of this compound in aqueous medium with molecules such  
66 as cyclodextrins (CDs) is a common procedure to increase their solubility, stability and  
67 bioavailability (López-Nicolás et al. 2014; Silva et al. 2014; Duarte et al. 2015b). CDs  
68 are naturally occurring cyclic oligosaccharides derived from starch with six or more  
69 glucose residues linked by  $\alpha(1-4)$  glycosidic bonds and the steric arrangement of these  
70 glucose units in the CDs molecules results in a hydrophobic inner cavity and  
71 hydrophilic outer surface (Folch-Cano et al. 2014; López-Nicolás et al. 2014). CDs have  
72 been used in the food industry mainly as food additives, to suppress unpleasant odors or  
73 tastes, to avoid microbiological contaminations and for stabilization of flavours (Astray  
74 et al. 2009). In addition to the inclusion of stilbenes in several CDs, the antimicrobial

75 and antioxidant properties of these inclusion complexes against several foodborne  
76 pathogens has been studied (Duarte et al. 2015a; Duarte et al. 2015b). Recently  
77 multilayer films have gained relevance in the food packaging industry, because they  
78 combine the advantages of a single polymer into one film and compensate for their  
79 single disadvantages (Arnon et al. 2015). Therefore, the aim of this study was to design  
80 a bilayer active film based on two cellulose derivatives (hydroxyethylcellulose (HEC)  
81 and cellulose acetate (CA)) and to use resveratrol and its inclusion complex with  
82 hydroxypropyl- $\gamma$ -cyclodextrin as active agents. The physical properties, the  
83 antimicrobial and anti-QS activities of these bilayer films were then evaluated.

84

## 85 **2. Material and methods**

### 86 **2.1. Chemicals**

87 *trans*-Resveratrol was obtained from TCI Europe N.V. and hydroxypropyl- $\gamma$ -  
88 cyclodextrin (HP- $\gamma$ -CD;  $M_w = 1580$  g/mol) from Sigma-Aldrich. Cellulose acetate (CA;  
89  $M_w = 100,000$  g/mol; Acros Organics), hydroxyethylcellulose (HEC; Fluka), acetone  
90 (Sharlau), soybean lecithin (Tokyo Chemical Industry CO.) and glycerol (Merck) were  
91 also used.

### 92 **2.2. Preparation of antimicrobial agents**

93 A stock solution of 32 mg/mL of resveratrol was prepared in dimethylsulfoxide  
94 (DMSO). The inclusion complex (IC) of resveratrol with HP- $\gamma$ -CD was prepared as  
95 previously described by Silva et al. (2014) and the resveratrol concentration in the IC  
96 was quantified using the previously described HPLC-DAD method (Silva et al. 2014).

### 97 **2.3. Bacterial strains**

4

98 In this study, two reference strains (*C. coli* ATCC 33559 and *C. jejuni* ATCC 33560)  
99 and two *Campylobacter* spp. isolates (*C. coli* 873 and *C. jejuni* 225421) were used, as  
100 well as, two *Arcobacter butzleri* isolates (AB36/11 and INSA 776) and one reference  
101 strain (*A. Butzleri* LMG 10828) (Duarte et al. 2015a). All the strains were stored in  
102 Brain Heart Infusion (BHI) broth with 20% (v/v) glycerol at  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  and prior to  
103 susceptibility testing each strain was inoculated on blood agar plates supplemented with  
104 5% defibrinated horse blood (Oxoid, England), to ensure optimal growth.

#### 105 **2.4. Antimicrobial bilayer films preparation**

106 The antimicrobial bilayer films were composed of an external CA layer and an internal  
107 HEC active layer and were obtained by the casting method.

##### 108 **2.4.1. Preparation of cellulose acetate film**

109 1% (w/w) CA was dissolved in acetone and homogenized for 1 h at a room temperature.  
110 The solution was then cast on a glass Petri dish at  $100\text{ }^{\circ}\text{C}$  for 20 min.

##### 111 **2.4.2. Preparation of antimicrobial HEC film-forming solutions**

112 4% (w/w) HEC polymer was dissolved in distilled water at  $80\text{ }^{\circ}\text{C}$  with magnetic stirring  
113 for 1 h and the solution was then cooled at room temperature. After that, soy lecithin  
114 and glycerol were added, respectively, as binder and plasticizer at 10% (w/w) of the  
115 total polymers weight (HEC and CD). Soybean lecithin was added to the solution and  
116 was homogenized with rotor-stator homogenizer (IKA T25-Digital Ultra Turrax) at  
117 room temperature for 10 min at 12000 rpm. Then, glycerol was added and mixed under  
118 continuous magnetic stirring for 30 min. Afterwards, resveratrol was added to the  
119 solution at final concentrations of 0.05% (w/v) (RV<sub>1</sub>) and 0.075% (w/v) (RV<sub>2</sub>), and the  
120 inclusion complex was added at 0.25% (w/v) (IC<sub>1</sub>) and 0.75% (w/v) (IC<sub>2</sub>). The mixtures

121 were homogenized for 30 min at room temperature, added to the previously prepared  
122 CA film on a glass Petri dish and cast at 30 °C for 6 h. A film without resveratrol or IC,  
123 referred to as C, and another film, named as CD, wherein the amount of the complex  
124 was replaced by the same amount of CD were prepared as control films. After casting,  
125 all these films were stored at 22 °C and 50% relative humidity (RH) until their use for  
126 characterization and antimicrobial assays.

## 127 **2.5. Films characterization**

### 128 **2.5.1. Structural Properties**

#### 129 **2.5.1.1. Basis weight**

130 Basis weight was obtained according to ISO 536:1995 and denotes the mass per unit of  
131 area of the tested sample.

#### 132 **2.5.1.2. Film thickness**

133 Thickness was acquired according to ISO 534:2011 using an Adamel Lhomargy model  
134 MI 20 micrometer. Seven measurements were taken at different locations of each film  
135 sample and the mean values were used to calculate the mechanical properties.

#### 136 **2.5.1.3. Dry matter content**

137 Dry matter content of samples was assessed by gravimetric analysis according to ISO  
138 11465:1993 standard. The weight of films was measured before and after drying at 100  
139 °C for 24 h and three samples of each film was used.

### 140 **2.5.2. Mechanical properties**

141 Tensile strength, elongation and Young's modulus of films were achieved on a tensile  
142 tester (Thwing-Albert Instrument Co., EJA series) based on ISO 1924/1 standard.  
143 Some changes to the conventional method were required, namely, the initial gap  
144 between grips was 5 cm and the separation rate of 5 mm/min. All the tests were  
145 performed at  $23 \pm 2^\circ\text{C}$  and  $50 \pm 5\%$ . Values are the mean of six measurements in each  
146 film sample.

#### 147 **2.5.3. Water Vapor Transmission Rate**

148 The water vapor transmission rate (WVTR) was measured according to a modified  
149 ASTM E96-1995 method. The cups, which contained anhydrous calcium chloride  
150 desiccant (0% RH assay cup), were covered with the films. The mouths of the cups  
151 were sealed with melted paraffin and the test assemblies were under testing conditions  
152 of  $22^\circ\text{C}$  and 50% RH. The cups were weighed periodically, to determine the amount of  
153 moisture transferred through the sample into the desiccant. WVTR was achieved in the  
154 steady state of the weight versus time graph and calculated dividing the slope of the line  
155 by the exposed film area. Three replicates from each sample were tested.

#### 156 **2.5.4. Contact angle and surface free energy**

157 Contact angle measurements were carried out on an OCAH 200 DataPhysics instrument  
158 by the sessile drop method using distilled water and diiodomethane as test probe liquids  
159 to determine the surface energy parameters of each film, using the Owens-Wendt  
160 approach (Owens and Wendt 1969). Surface tension of the used liquids can be found in  
161 the literature (Good and Oss 1991). At least seven measurements were made and the  
162 average was taken.

#### 163 **2.5.5. Optical Properties**

164 The color and transparency of each film were assessed on a Color Touch 2  
165 spectrophotometer (Technidyne) using a measurement geometry of D65/10°. Color  
166 coordinates L\* (lightness), a\* (red-green) and b\* (yellow-blue) were obtained with three  
167 measurements around the samples against a white standard background (L\* = 96.81, a\*  
168 = 0.11 and b\* = 3.50). The transparency was calculated based on the equation  
169 referenced in the ISO 2289.

#### 170 **2.5.6. Scanning Electron Microscopy (SEM)**

171 Microstructural analysis of the films was performed according to Noronha et al. (2014).  
172 This analysis was carried out on a Hitachi S-2700 scanning electron microscope at 10  
173 kV accelerating voltage. The samples were prepared using the procedure described by  
174 Pastor et al. (2013). Briefly, the samples were coated with a gold layer allowing for  
175 surface and cross section visualization. For cross sectional observations, the films were  
176 cryofractured by immersion in liquid nitrogen.

#### 177 **2.6. Release tests**

178 The percentage of resveratrol and IC released from films was determined according to  
179 Noronha et al. (2014), with ethanol 10 % (v/v) being used as a food simulant for fresh  
180 meat products as described in the European Commission regulation No 10/2011. The  
181 applied time/temperature combination to simulate storage and ambient temperature was  
182 4 °C and 20 °C, respectively, for 10 days. Briefly, film samples were totally immersed  
183 in glass tubes with 15 mL of ethanol 10% (v/v). Then the samples were filtered and the  
184 percentage of resveratrol and IC released was determined using the previously described  
185 HPLC-DAD method (Silva et al. 2014). The experiment was carried out in triplicate.

#### 186 **2.7. Antimicrobial activity of films**

187 The antimicrobial activity of films was assessed by the agar diffusion method according  
188 to Alkan et al. (2011) and to the standard M2-A8 from Clinical Laboratory Standards  
189 Institute (CLSI 2003) with a few modifications. Film discs (1 cm in diameter) were  
190 prepared from each film under aseptic conditions. Before testing, the inoculum was  
191 prepared by direct suspension of colonies in sterile solution of 0.85% sodium chloride  
192 and the optical density was adjusted to 0.5 McFarland unit ( $\approx 1 \times 10^8$  colony forming  
193 units/mL (CFU/mL)). The plates were incubated at 37 °C for 48 h under  
194 microaerophilic conditions. The size diameter (mm) of the inhibition zone (colony-free  
195 perimeter) was measured and the growth of the bacteria at the contact area of films with  
196 the agar surface was visually examined (Giteru et al. 2015).

## 197 **2.8. Anti-QS activity of the films**

198 The biosensor strain *Chromobacterium violaceum* ATCC 12472 was used to determine  
199 the anti-QS effect of films with resveratrol and IC. The bacteria suspension of *C.*  
200 *violaceum* was grown aerobically in Luria-Bertani (LB) broth at 30 °C and 250 rpm  
201 overnight (Alvarez et al. 2014).

### 202 **2.8.1. Disc diffusion assay**

203 *C. violaceum* inoculum was adjusted to an optical density of 1 at 600 nm. Then, LB agar  
204 plates were spread with the inoculum and the discs of films were placed over the plates  
205 and incubated at 30 °C for 24 h. The inhibition halos were measured according to  
206 Alvarez et al. (2014) with some modifications. The growth inhibition was measured as  
207 diameter (d1) in mm and both growth and pigment inhibition were measured as  
208 diameter (d2) in mm. The QS inhibition was determined by subtracting the bacterial  
209 growth inhibition diameter (d1) from diameter (d2). Thus QS inhibition (d2-d1) was the

210 inhibition of violacein production around the discs. The assay was performed in  
211 triplicate.

### 212 **2.8.2. Quantification of pigment production**

213 The violacein production by *C. violaceum* when exposed to the different films was also  
214 quantified, according to Alvarez et al. (2014) with minor modifications. Inoculum was  
215 adjusted to an OD<sub>600nm</sub> of 0.1 and the films were added to the inoculum. After 24 h of  
216 incubation, 1 mL of culture from each sample was centrifuged at 11000 rpm for 10 min.  
217 Then, the supernatant was discarded, and the pellet was solubilized in 1 mL of DMSO,  
218 vortexed for 30 s and centrifuged at 11000 rpm for 10 min. Finally, 20 µL of  
219 supernatant were transferred to 96-well microtiter plate to measure the OD at 585 nm.  
220 The results were expressed as percentage of violacein production.

### 221 **2.9. Statistical Analysis**

222 Data was analyzed by one-way ANOVA test and differences between groups were  
223 compared by Tukey's *post hoc* tests. A *p* value of <0.05 was used to indicate  
224 statistically significant differences.

225

### 226 **3. Results and Discussion**

227 Preliminary tests were done to choose the bilayer film formulation, ensuring the  
228 compatibility between the polymers, the appropriate incorporation of binding agent  
229 (soybean lecithin) and the incorporation of the active agents (resveratrol and IC).  
230 According to Guiga et al. (2010) the use of binding agents, such as lecithin, between  
231 different layers can compensate the incompatibility of the polymers. Firstly, in this  
232 study, a bilayer film composed with an external CA layer and an inner layer of HEC

233 mixed with soybean lecithin was prepared. When the CD and IC were incorporated, it  
234 was observed that the films were brittle and difficult to handle. So, in order to improve  
235 the film properties and handling, a plasticizer was added. According to literature,  
236 glycerol is a common plasticizer used in cellulose derivatives films, making it the  
237 plasticizer of choice for further developing the films.

### 238 **3.1. Structural properties**

239 Table 1 shows the values of basis weight of the films, ranging from  $42.79 \pm 2.10$  to  
240  $75.40 \pm 1.00$  g/m<sup>2</sup>. The thickness of the films ranged between  $37.90 \pm 1.49$  and  $56.70 \pm$   
241  $1.36$   $\mu\text{m}$ , as presented in table 1. No significant differences of thickness were observed  
242 when comparing the control film with the films containing resveratrol or when  
243 comparing the CD film with the IC films. The thickness values are related to the basis  
244 weight and may be also affected by the cohesion between layers and by the  
245 microstructure of the active layer (Guiga et al. 2010). Since small errors are and  
246 indicator of good films homogeneity, it can be concluded that IC films are less  
247 homogeneous than the others. The dry matter content increased with the IC and CD  
248 incorporation, as showed in table 1, indicating that these films have small amount of  
249 water molecules in their matrix. No significant difference was observed between the  
250 control film and RV films, nor between the CD and IC films.

### 251 **3.2. Mechanical Properties**

252 Table 1 also presents the values of the EM, TI and %E of the films. The EM decrease  
253 negligibly with the addition of RV and increased significantly with the addition of CD  
254 and IC, when compared to the control film. From the analysis of this data, it results that  
255 a strong correlation exists between the water content and the mechanical properties. The  
256 three samples containing about 6 wt% are brittle and stiff, while the samples not

257 containing CD, which showed an equilibrium moisture content of about 13 wt%,  
258 resulted to be more ductile (Yakimets et al. 2005). According to Pastor et al. (2013) the  
259 elastic modulus parameter is influenced by the incorporation of resveratrol on different  
260 polymer matrix because this compound induces structural changes. This author found  
261 that resveratrol addition has an opposite effect on EM of chitosan or methylcellulose  
262 films. In turn, Miro et al. (2013) described that the addition of HP- $\beta$ -CD to  
263 poly(ethylene oxide) films affected significantly the mechanical properties. For  
264 example, the EM increased and the %E decreased, because the hydroxyl groups of CDs  
265 can form secondary bonds (e.g. with ether groups), reducing the molecular mobility and  
266 thus increasing the resistance to deformation. Therefore, the increase of CD content  
267 induces the formation of an increasingly brittle material. According to the results of our  
268 work the %E increased in RV films when compared to the control film, whereas for the  
269 IC films it decreased. In addition, the increase in the concentration of antimicrobial  
270 agent, resulted in films with slightly lower elongation.

### 271 **3.3. Water Vapor Transmission Rate**

272 The WVTR results are presented in table 1. When compared to the control film, the  
273 incorporation of resveratrol slightly increased the WVTR value, however without  
274 statistical significance. This result is in disagreement with a previous study, that  
275 described a slight reduction on the water vapor permeability with the resveratrol  
276 incorporation in the polymer matrix (Pastor et al. 2013). However, according to Pastor  
277 et al. (2013) the structural changes induced by the incorporation of this compound did  
278 not involve important changes in the mass transfer rate of water molecules. The results  
279 obtained in our study may be attributed to the plasticization effect of the resveratrol  
280 given by the low values of EM and simultaneously by the higher values of elongation at  
281 break, since that according to (López-de-Dicastillo et al. 2010) the plasticization of the

282 films increases the WVTR. Even though no significant differences in WVTR between  
283 RV<sub>1</sub> and RV<sub>2</sub> films were observed, this was not the case between IC<sub>1</sub> and IC<sub>2</sub> films. The  
284 IC<sub>1</sub> film exhibited the lowest WVTR, while CD and IC<sub>2</sub> presented the highest WVTR  
285 values. This result may be caused by the CD present in the IC that changes the matrix  
286 structure. The effect on WVTR value is dependent of the CD content on the film. IC<sub>1</sub>  
287 film has lower CD content and simultaneously the lowest WVTR. Sun et al. (2014)  
288 described the same result for low concentrations of CD. According to this author, the  
289 interactions and the structural rigidity of the CD could create steric hindrance and  
290 decrease segmental mobility while, limiting the water vapor transmission. The same  
291 authors observed an increase of WVTR for high CD concentrations that is in agreement  
292 with our results, since CD and IC<sub>2</sub> films have high CD content compared with IC<sub>1</sub> film,  
293 and presented higher WVTR values. So, the higher CD content can increase the water  
294 diffusion due to the presence of voids in the matrices (López-de-Dicastillo et al. 2010;  
295 Sun et al. 2014). On the other hand, during the tests the active layer showed cracks,  
296 because the films were brittle, which could have influenced its permeability, making the  
297 films more permeable to the water vapor.

#### 298 **3.4. Contact angle and surface free energy**

299 The contact angles and surface free energy values are presented in table 2. The results  
300 show that the addition of resveratrol significantly increased the water contact angle  
301 when compared to the IC films. The resveratrol incorporation decreased the  
302 hydrophilicity (low water contact angle and polar component of surface energy) due to  
303 the lipophilic nature of this stilbene (López-Nicolás et al. 2014). No significant  
304 difference was observed between the RV<sub>1</sub> and RV<sub>2</sub> films but the opposite occurred with  
305 the apolar liquid diiodomethane. The IC and CD films showed significantly lower water  
306 contact angle and consequently higher polar component of surface energy in

307 comparison to the RV and control films, due to the hydrophilic nature of the CD.  
308 According to the results presented in table 2, the IC<sub>2</sub> film showed the lowest water  
309 contact angle and the highest total surface free energy, which means that this film has  
310 more affinity to water.

### 311 **3.5. Optical properties**

312 Table 3 shows the values of the color coordinates (L\*, a\*, b\*) and the transparency of  
313 the films. The incorporation of CD and IC on the films increased the lightness (L\*) and  
314 the addition of the antimicrobial agents affected the chromaticity coordinates a\* and b\*.  
315 Resveratrol films showed a smaller greenness, given by the negative a\* values, as  
316 compared to the control film. In contrast, IC films showed redness, given by the positive  
317 a\* values, when compared to control films. Regarding the transparency, all the films  
318 showed high values of this parameter, and the incorporation of CD and IC increased the  
319 transparency. Taking into account all the optical parameters, there are no major  
320 differences between the films with different concentrations of the antimicrobial agents.  
321 Other studies have shown that the addition of various compounds into film-forming  
322 solutions can change the native color of the films. For example, Noronha et al. (2014)  
323 found that the inclusion of  $\alpha$ -tocopherol nanocapsules suspension into methylcellulose-  
324 based films changed the color of the films. The same finding was observed by Moradi et  
325 al. (2012) on chitosan films incorporated with grape seed extract. However, the addition  
326 of *Zataria multiflora* Boiss essential oil in the same chitosan films did not affect the  
327 color of the films (Moradi et al. 2012). According to Pastor et al. (2013), the color  
328 properties of the methylcellulose-based films are affected when the resveratrol content  
329 increases, but for chitosan-based films this effect is barely noticeable.

330

331 **3.6. Scanning electron microscopy**

332 Fig. 1 shows the micrographs of the cross section and the surface of the control (C),  
333 RV<sub>1</sub>, CD and IC<sub>2</sub> films. As shown in Fig. 1a, the cross section of control film (C) was  
334 irregular and showed voids on the HEC layer. The microstructure of resveratrol and IC  
335 films (Fig.1c and 1g) is more homogeneous and it is easier to differentiate the two  
336 layers. As can be seen in the Fig.1e and 1f, the CD film exhibited irregularities and it  
337 seems that there is no cohesion between the two layers, which could be explained by the  
338 structural rigidity of the CD. The surface of all films was homogeneous (Fig.1b, 1d and  
339 1h) suggesting that the incorporation of these antimicrobial agents on HEC-based films  
340 did not change the surface roughness of the films. The results obtained in the present  
341 study concerning to the effect of resveratrol addition into HEC films are in agreement  
342 with those obtained by Pastor et al. (2013) in methylcellulose-based films. However,  
343 this author found that the incorporation of resveratrol on chitosan films modified the  
344 film microstructure and surface roughness, especially when higher concentrations of  
345 resveratrol were used. Thus, the effect of the resveratrol incorporation on the roughness  
346 and microstructure of the films depends on the polymer matrix and how the resveratrol  
347 can change the hydrogen bonds formation between polymer molecules (Pastor et al.  
348 2013).

349 **3.7. Release Assays**

350 Fig. 2 displays the release profiles of resveratrol and IC from the bilayer films to a food  
351 stimulant (ethanol 10%) at 4 °C (Fig. 2a) and 20 °C (Fig. 2b). At 4 °C it was observed a  
352 faster release rate for the RV<sub>2</sub> and IC<sub>2</sub> films, with about 80 % of resveratrol and IC,  
353 respectively, being released after 1h of incubation. However, for the RV<sub>1</sub> and IC<sub>1</sub> films,  
354 only after 6 days of incubation it was possible to observe a release of 80% for both

355 compounds. In turn, at 20 °C the behavior was similar for all the tested films, with the  
356 exception of the RV<sub>1</sub> film, which had a slower release. In sum, after 3 days of  
357 incubation at 20 °C, the percentage of released compound was similar for the four active  
358 films and faster than the same experiment at 4 °C. It seems that the release rate is  
359 dependent on the temperature and final concentration of agent, and the inclusion of CD  
360 did not affect the behavior. Similarly, it has been described that the release of the  
361 antimicrobials from the films is kinetically unfavorable under cold temperatures and it  
362 is released more efficiently at warmer temperatures (Mild et al. 2011). Since the release  
363 of an active agent into the medium involves several factors, such as solubility, solvent  
364 and migrant polarities (Pastor et al. 2013), the low chemical affinity and solubility of  
365 resveratrol in aqueous solutions could explain the differences observed when compared  
366 with the IC. In the current study, a control release of the IC into the food simulant was  
367 expected since resveratrol was encapsulated in CD, however, the release of the  
368 resveratrol complexed was similar to the free resveratrol. The application of CDs in  
369 smart and active food packaging has been recently reviewed, since complexed  
370 substances are homogeneously dispersed and slowly released from the polymer matrix  
371 (Sanches-Silva et al. 2014).

### 372 **3.8. Antimicrobial activity of the films**

373 The antibacterial activity of bilayer active films against *Campylobacter* and *Arcobacter*  
374 strains is presented in table 4. The concentration of the antimicrobial agents was  
375 selected based on the previously determined MIC values (Duarte et al. 2015a). The  
376 control films (C and CD) as expected, showed no inhibition against all tested strains.  
377 Visual observations of the contact area (the contact area with the agar surface) also  
378 revealed that cells of all the strains did not grow under the film. Films containing  
379 resveratrol showed more antibacterial activity than IC films. According to the results,

380 when the resveratrol concentration increased the antimicrobial activity also increased,  
381 except for the strains *C. jejuni* ATCC 33560 and *A. butzleri* AB36/11. The IC films  
382 showed lower antimicrobial activity compared to RV, for example, the IC<sub>2</sub> film  
383 exhibited no inhibition against the tested *Arcobacter* strains, while IC<sub>1</sub> film showed  
384 inhibition halos for all the *Campylobacter* strains, but no antimicrobial activity was  
385 observed against the *A. butzleri* AB36/11. Giteru et al. (2015), also described a growth  
386 inhibition by kafirin-based films composed by citral and a citral plus quercetin mixture  
387 as active agents against *C. jejuni*, strain from human origin. Nonetheless, in the  
388 literature, studies about the development of antimicrobial films containing phenolic  
389 compounds against *Campylobacter* spp. are scarce. Recently, Alkan et al. (2011)  
390 demonstrated the antimicrobial activity of zein-based films incorporated with gallic acid  
391 against *C. jejuni*, in a concentration-dependent manner. In our study, it was observed  
392 that the films were more active against *Campylobacter* spp. than *A. butzleri*, which is  
393 discrepant with previous results concerning the antimicrobial activity of the resveratrol  
394 and IC against these two pathogens (Duarte et al. 2015a). However, this difference  
395 could be due to the fact that in the present study the active compounds (resveratrol and  
396 IC) needs to be released from the polymer matrix in order to exert its activity. And, as  
397 previously demonstrated, this release rate is influenced by temperature and  
398 concentration. In sum, more studies are required to clarify the different antimicrobial  
399 action of the films against *Campylobacter* and *Arcobacter* spp.

### 400 **3.9. Anti-QS activity of the films**

401 Table 5 shows the efficacy of the active films to inhibit QS of *C. violaceum*. The control  
402 film and CD film did not affect the *C. violaceum* growth and exhibited no anti-QS  
403 activity. The resveratrol films demonstrated antibacterial activity but did not reveal QS  
404 inhibition, although the IC films showed antibacterial and anti-QS activity. This result

405 could be due to the different solubility between resveratrol and the IC, since to exert  
406 activity resveratrol needs to diffuse into the agar medium. Concerning the capacity of  
407 active agents to inhibit the production of violacein by the *C. violaceum*, it was observed  
408 that all the tested films with antimicrobial agents showed the ability to reduce the  
409 violacein production. Resveratrol and IC films reduced the violacein production by  
410 more than 70% and the control films had no effect on the violacein production (table 5).  
411 The loss of purple pigment in *C. violaceum* is an indication of QS inhibition by  
412 bioactive products (Alvarez et al. 2014). The results obtained in this study reflect the  
413 potential of resveratrol and IC incorporated in active films, as promising QS inhibitors.  
414 These active films can be an interesting strategy for food preservation.

#### 415 **4. Conclusion**

416 Currently, films and coatings prepared from biodegradable materials, such as cellulose  
417 derivatives, with the incorporation of natural antimicrobial agents are increasingly used  
418 in food packaging. From this work, it was possible to conclude that the addition of  
419 resveratrol inclusion complexes to a cellulose bilayer film significantly affected the  
420 mechanical resistance and extensibility of the developed films. When compared to the  
421 resveratrol and control films, these films are more hydrophilic. In addition, these films  
422 showed high values of transparency and inhibited the growth of all *Campylobacter*  
423 strains tested. The capacity of these films to inhibit the QS mechanism was also  
424 demonstrated. In sum, this study showed the good potential of these active films  
425 incorporated with a natural antibacterial agent to control foodborne pathogens, which  
426 could be considered as a new approach to preserve poultry meat and increase its shelf  
427 life.

428

429 **Acknowledgements**

430 This work was supported by FEDER funds through Programa Operacional Factores de  
431 Competitividade – COMPETE and by National Funds through Fundação para a Ciência  
432 e Tecnologia (FCT) [project PTDC/AGR-ALI/121876/2010]. The authors would like to  
433 thank Ana Paula Gomes for acquiring the SEM data.

434

435 **References**

436 Alkan D, Aydemir LY, Arcan I, et al (2011) Development of Flexible Antimicrobial  
437 Packaging Materials against *Campylobacter jejuni* by Incorporation of Gallic Acid  
438 into Zein-Based Films. 11003–11010.

439 Alvarez MV., Moreira MR, Ponce A (2012) Antiquorum Sensing and Antimicrobial  
440 Activity of Natural Agents With Potential Use in Food. J Food Saf 32:379–387.

441 Alvarez MV., Ortega-Ramirez L A., Gutierrez-Pacheco MM, et al (2014) Oregano  
442 essential oil-pectin edible films as anti-quorum sensing and food antimicrobial  
443 agents. Front Microbiol 5:1–7.

444 Arnon H, Granit R, Porat R, Poverenov E (2015) Development of polysaccharides-  
445 based edible coatings for citrus fruits: a layer-by-layer approach. Food Chem  
446 166:465–72.

447 Astray G, Gonzalez-Barreiro C, Mejuto JC, et al (2009) A review on the use of  
448 cyclodextrins in foods. Food Hydrocoll 23:1631–1640.

449 Campos CA., Gerschenson LN, Flores SK (2010) Development of Edible Films and  
450 Coatings with Antimicrobial Activity. *Food Bioprocess Technol* 4:849–875.

451 CLSI, Institute CLS (2003) CLSI document M2-A8 - Standardization of the  
452 antimicrobial susceptibility tests for disc-diffusion; approved standard - (8th Ed.).  
453 Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne PA,

454 Corry JE, Atabay HI (2001) Poultry as a source of *Campylobacter* and related  
455 organisms. *Symp Ser Soc Appl Microbiol* 96S–114S.

456 Delmas D, Aires V, Limagne E, et al (2011) Transport, stability, and biological activity  
457 of resveratrol. *Ann N Y Acad Sci* 1215:48–59.

458 Duarte A, Alves AC, Ferreira S, et al (2015a) Resveratrol inclusion complexes:  
459 Antibacterial and anti-biofilm activity against *Campylobacter* spp. and *Arcobacter*  
460 *butzleri*. *Food Res Int*. doi: 10.1016/j.foodres.2015.05.047

461 Duarte A, Martinho A, Luís Â, et al (2015b) Resveratrol encapsulation with methyl-  $\beta$  -  
462 cyclodextrin for antibacterial and antioxidant delivery applications. *LWT-Food Sci*  
463 *Technol* 63:1254-1260.

464 Duarte A, Santos A, Manageiro V, et al (2014) Human, food and animal *Campylobacter*  
465 spp. isolated in Portugal: High genetic diversity and antibiotic resistance rates. *Int J*  
466 *Antimicrob Agents* 44:306–13.

467 El-Fawal G (2014) Preparation, characterization and antibacterial activity of  
468 biodegradable films prepared from carrageenan. *J Food Sci Technol* 51:2234–  
469 2239.

470 Ferreira S, Silva F, Queiroz JA, et al (2014) Resveratrol against *Arcobacter butzleri* and  
471 *Arcobacter cryaerophilus*: activity and effect on cellular functions. Int J Food  
472 Microbiol 180:62–8.

473 Folch-Cano C, Yazdani-Pedram M, Olea-Azar C (2014) Inclusion and functionalization  
474 of polymers with cyclodextrins: current applications and future prospects.  
475 Molecules 19:14066–79.

476 Giteru SG, Coorey R, Bertolatti D, et al (2015) Physicochemical and antimicrobial  
477 properties of citral and quercetin incorporated kafirin-based bioactive films. Food  
478 Chem 168:341–347.

479 Good RJ, Oss CJ van (1991) Modern Approaches to Wettability Applications. Plenum  
480 Press, New York (NY).

481 Guiga W, Swesi Y, Galland S, et al (2010) Innovative multilayer antimicrobial films  
482 made with Nisaplin® or nisin and cellulosic ethers: Physico-chemical  
483 characterization, bioactivity and nisin desorption kinetics. Innov Food Sci Emerg  
484 Technol 11:352–360.

485 Kuorwel KK, Cran MJ, Sonneveld K, et al (2011) Antimicrobial activity of  
486 biodegradable polysaccharide and protein-based films containing active agents. J  
487 Food Sci 76:R90–R102.

488 López-de-Dicastillo C, Gallur M, Catalá R, et al (2010) Immobilization of  $\beta$ -  
489 cyclodextrin in ethylene-vinyl alcohol copolymer for active food packaging  
490 applications. J Memb Sci 353:184–191.

- 491 López-Nicolás JM, Rodríguez-Bonilla P, García-Carmona F (2014) Cyclodextrins and  
492 antioxidants. Crit Rev Food Sci Nutr 54:251–76.
- 493 Lucera A, Costa C, Conte A, Del Nobile MA (2012) Food applications of natural  
494 antimicrobial compounds. Front Microbiol 3:287.
- 495 Mild RM, Joens L a., Friedman M, et al (2011) Antimicrobial edible apple films  
496 inactivate antibiotic resistant and susceptible *Campylobacter jejuni* strains on  
497 chicken breast. J Food Sci. doi: 10.1111/j.1750-3841.2011.02065.x
- 498 Miro A, D'Angelo I, Nappi A, et al (2013) Engineering poly(ethylene oxide) buccal  
499 films with cyclodextrin: A novel role for an old excipient? Int J Pharm 452:283–  
500 291.
- 501 Moradi M, Tajik H, Razavi Rohani SM, et al (2012) Characterization of antioxidant  
502 chitosan film incorporated with *Zataria multiflora* Boiss essential oil and grape  
503 seed extract. LWT - Food Sci Technol 46:477–484.
- 504 Noronha CM, De Carvalho SM, Lino RC, Barreto PLM (2014) Characterization of  
505 antioxidant methylcellulose film incorporated with  $\alpha$ -tocopherol nanocapsules.  
506 Food Chem 159:529–535.
- 507 Owens DK, Wendt RC (1969) Estimation of the surface free energy of polymers. J Appl  
508 Polym Sci 13:1741–1747.
- 509 Pastor C, Sánchez-González L, Chiralt A, et al (2013) Physical and antioxidant  
510 properties of chitosan and methylcellulose based films containing resveratrol. Food  
511 Hydrocoll 30:272–280.

512 Paulo L, Ferreira S, Gallardo E, et al (2010) Antimicrobial activity and effects of  
513 resveratrol on human pathogenic bacteria. *World J Microbiol Biotechnol* 26:1533–  
514 1538.

515 Paunonen S (2013) Strength and barrier enhancements of cellophane and cellulose  
516 derivative films: A review. *BioResources* 8:3098–3121.

517 Sanches-Silva A, Costa D, Albuquerque TG, et al (2014) Trends in the use of natural  
518 antioxidants in active food packaging: a review. *Food Addit Contam Part A*  
519 31:374–395.

520 Silva F, Figueiras A, Gallardo E, et al (2014) Strategies to improve the solubility and  
521 stability of stilbene antioxidants: a comparative study between cyclodextrins and  
522 bile acids. *Food Chem* 145:115–125.

523 Sun X, Sui S, Ference C, et al (2014) Antimicrobial and Mechanical Properties of  $\beta$ -  
524 Cyclodextrin Inclusion with Essential Oils in Chitosan Films. *J Agric Food Chem*  
525 62:8914–8918.

526 Turhan K (2013) Cellulose based packaging films containing natural antimicrobial  
527 agents. *J Hyg Eng Des* 5:13–17.

528 Wesley I V, Miller GW (2010) *Arcobacter*: an opportunistic human food-borne  
529 pathogen. *Emerg Infect* 9:185–211.

530 Yakimets I, Wellner N, Smith AC, et al (2005) Mechanical properties with respect to  
531 water content of gelatin films in glassy state. *Polymer (Guildf)* 46:12577–12585.

532

533

534 **Figure Captions**

535

536 **Figure 1.** SEM micrographs of control film cross-section (a); control film surface (b);  
537 RV<sub>2</sub> film cross-section (c); RV<sub>2</sub> film surface (d); CD film cross-section (e); CD film  
538 surface (f); IC<sub>1</sub> film cross-section (g) and IC<sub>1</sub> film surface (h). Magnification is  
539 indicated in the micrographs.

540

541

542

543 **Figure 2.** Release rate into ethanol 10% at 4 °C (a) and 20 °C (b) of the compounds  
544 from the RV<sub>1</sub> (◆), RV<sub>2</sub> (■), IC<sub>1</sub> (▲) and IC<sub>2</sub> (●) films. Results are presented as  
545 mean±standard deviation of three independent experiments.

Figure

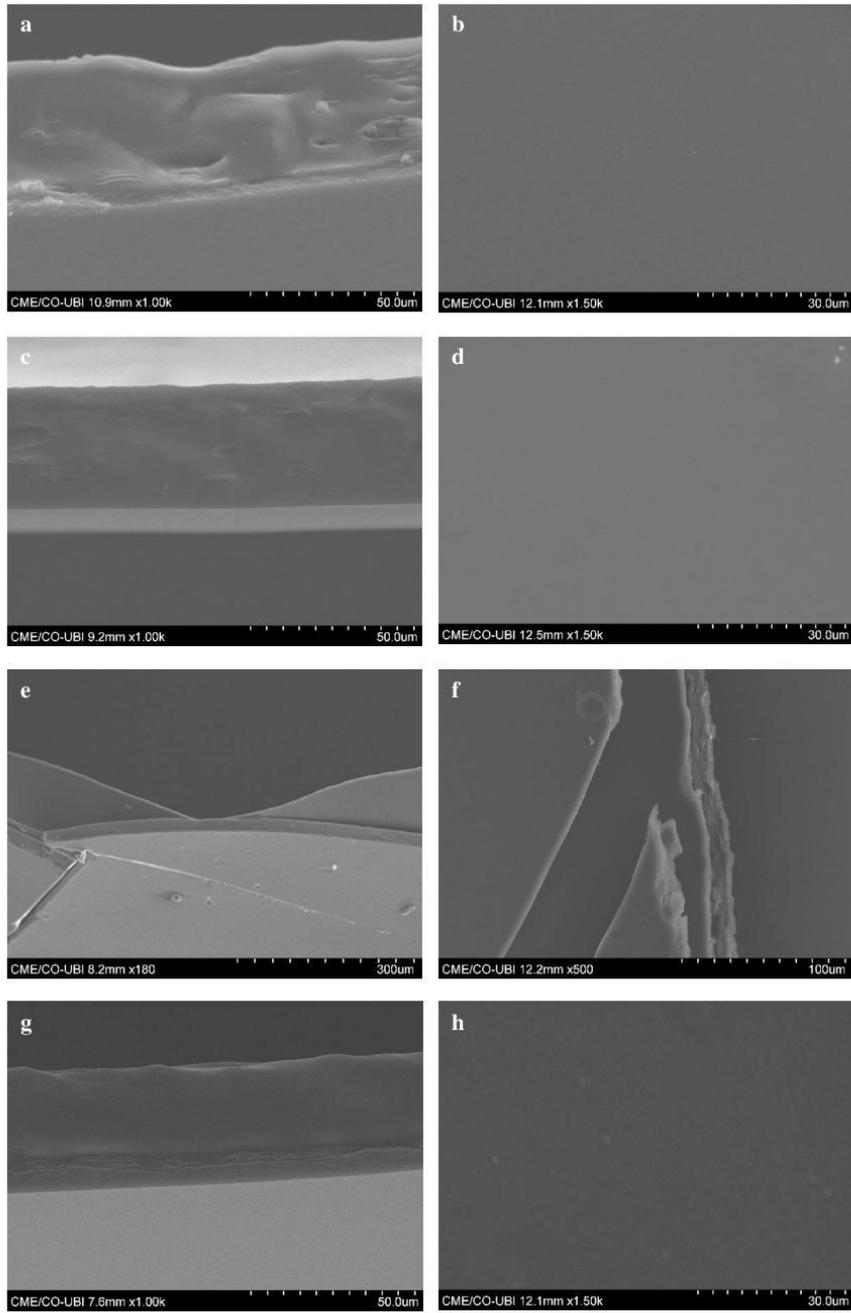


Figure 1.

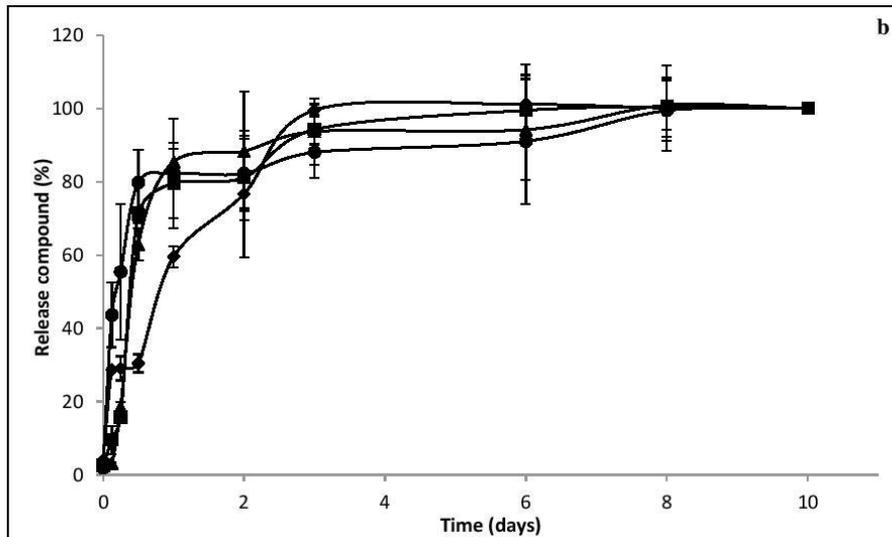
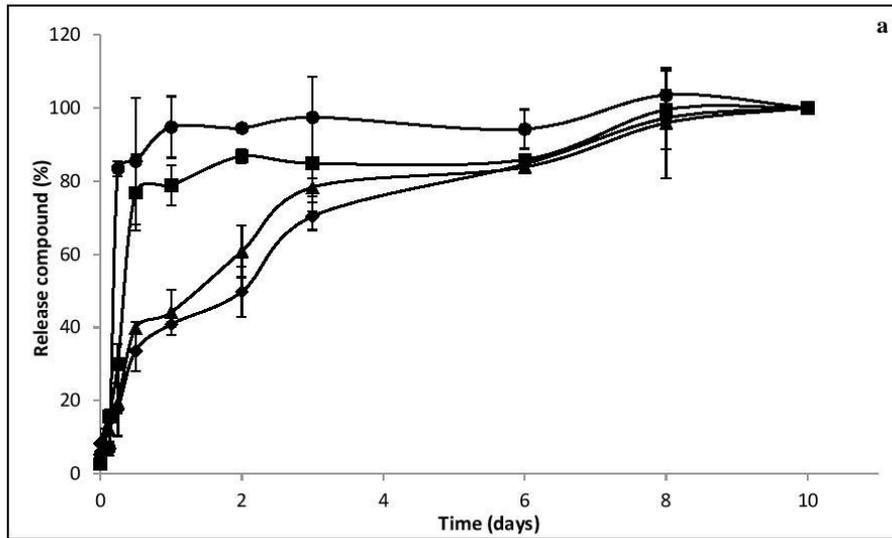


Figure 2.

Table

**Table 1.** Structural and mechanical properties, and water vapor transmission rate (WVTR) of bilayer films. Values are given as mean  $\pm$  standard deviation.

Films	Structural properties			Mechanical properties				Barrier property WVTR ( $g/m^2 \cdot day$ )
	Basis weight ( $g/m^2$ )	Thickness ( $\mu m$ )	Dry matter content (%)	Elastic Modulus (MPa)	Tensile Index (Nm/g)	Elongation at break (%)		
C	70.90 $\pm$ 1.48 <sup>a</sup>	56.70 $\pm$ 1.36 <sup>a</sup>	87.07 $\pm$ 0.83 <sup>a</sup>	358.28 $\pm$ 30.97 <sup>a</sup>	11.88 $\pm$ 1.01 <sup>ad</sup>	29.75 $\pm$ 5.19 <sup>a</sup>	75.20 $\pm$ 2.36 <sup>ac</sup>	
CD	42.79 $\pm$ 2.10 <sup>b</sup>	37.90 $\pm$ 1.49 <sup>b</sup>	94.30 $\pm$ 1.16 <sup>b</sup>	1604.30 $\pm$ 139.20 <sup>bc</sup>	18.42 $\pm$ 4.32 <sup>bc</sup>	1.93 $\pm$ 0.65 <sup>b</sup>	401.07 $\pm$ 33.09 <sup>b</sup>	
RV <sub>1</sub>	75.40 $\pm$ 1.00 <sup>c</sup>	53.70 $\pm$ 1.32 <sup>a</sup>	85.76 $\pm$ 0.33 <sup>b</sup>	320.00 $\pm$ 40.11 <sup>a</sup>	9.76 $\pm$ 0.64 <sup>d</sup>	43.76 $\pm$ 8.24 <sup>c</sup>	125.10 $\pm$ 6.75 <sup>c</sup>	
RV <sub>2</sub>	75.33 $\pm$ 0.79 <sup>c</sup>	52.00 $\pm$ 0.89 <sup>a</sup>	86.78 $\pm$ 1.42 <sup>a</sup>	340.49 $\pm$ 29.59 <sup>a</sup>	10.30 $\pm$ 1.15 <sup>a</sup>	38.35 $\pm$ 6.11 <sup>ac</sup>	126.77 $\pm$ 5.06 <sup>a</sup>	
IC <sub>1</sub>	57.17 $\pm$ 0.57 <sup>d</sup>	40.30 $\pm$ 3.68 <sup>b</sup>	93.76 $\pm$ 1.33 <sup>b</sup>	1501.51 $\pm$ 11.78 <sup>c</sup>	27.58 $\pm$ 2.91 <sup>c</sup>	4.57 $\pm$ 0.28 <sup>b</sup>	34.14 $\pm$ 0.34 <sup>c</sup>	
IC <sub>2</sub>	43.81 $\pm$ 0.77 <sup>b</sup>	41.00 $\pm$ 8.24 <sup>b</sup>	94.22 $\pm$ 1.12 <sup>b</sup>	1280.83 $\pm$ 465.20 <sup>c</sup>	14.26 $\pm$ 3.11 <sup>de</sup>	1.73 $\pm$ 0.52 <sup>b</sup>	228.23 $\pm$ 14.86 <sup>d</sup>	

C (control film); CD (cyclodextrin control film); RV<sub>1</sub> (0.05% resveratrol film); RV<sub>2</sub> (0.075% resveratrol film); IC<sub>1</sub> (0.25% inclusion complex film); IC<sub>2</sub> (0.75% inclusion complex film).

Different letters in the same column indicate significant different ( $p < 0.05$ ).

**Table 3.** Color coordinates and transparency of bilayer films. Values are given as mean  $\pm$  standard deviation.

Films	Color Parameters			Transparency (%)
	L*	a*	b*	
<b>C</b>	92.29 $\pm$ 0.22 <sup>ac</sup>	-0.34 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup>	11.03 $\pm$ 0.66 <sup>a</sup>	94.98 $\pm$ 0.03 <sup>a</sup>
<b>CD</b>	93.47 $\pm$ 0.10 <sup>b</sup>	0.10 $\pm$ 0.01 <sup>b</sup>	4.66 $\pm$ 0.04 <sup>b</sup>	96.18 $\pm$ 0.26 <sup>b</sup>
<b>RV<sub>1</sub></b>	92.33 $\pm$ 0.34 <sup>ac</sup>	-0.16 $\pm$ 0.03 <sup>c</sup>	9.32 $\pm$ 0.89 <sup>c</sup>	94.68 $\pm$ 0.30 <sup>a</sup>
<b>RV<sub>2</sub></b>	91.92 $\pm$ 0.17 <sup>a</sup>	-0.27 $\pm$ 0.02 <sup>d</sup>	10.77 $\pm$ 0.40 <sup>a</sup>	94.62 $\pm$ 0.51 <sup>a</sup>
<b>IC<sub>1</sub></b>	93.18 $\pm$ 0.14 <sup>b</sup>	0.12 $\pm$ 0.01 <sup>b</sup>	5.67 $\pm$ 0.08 <sup>b</sup>	95.99 $\pm$ 0.02 <sup>b</sup>
<b>IC<sub>2</sub></b>	92.90 $\pm$ 0.30 <sup>cb</sup>	0.31 $\pm$ 0.02 <sup>c</sup>	5.18 $\pm$ 0.10 <sup>b</sup>	95.61 $\pm$ 0.40 <sup>b</sup>

L\*: lightness; a\*: red-green; b\*: yellow-blue.

C (control film); CD (cyclodextrin control film); RV<sub>1</sub> (0.05% resveratrol film); RV<sub>2</sub> (0.075% resveratrol film); IC<sub>1</sub> (0.25% inclusion complex film); IC<sub>2</sub> (0.75% inclusion complex film).

Different letters in the same column indicate significant different (p < 0.05).



**Table 4.** Antimicrobial activity of bilayer active films by disk diffusion assay. Diameters (mm) of inhibition zones of the films against *Campylobacter* and *Arcobacter* strains (Mean  $\pm$  Standard Deviation).

Films	Inhibition zone (mm) and contact area							
	<i>C. coli</i> 873	<i>C. coli</i> ATCC 33559	<i>C. jejuni</i> 225421	<i>C. jejuni</i> ATCC 33560	<i>A. butzleri</i> AB36/11	<i>A. butzleri</i> INSA 776	<i>A. butzleri</i> LMG10828	
<b>C</b>	10.0 $\pm$ 0.0 ( $\pm$ )	10.0 $\pm$ 0.0 ( $\pm$ )	10.0 $\pm$ 0.0 ( $\pm$ )	10.0 $\pm$ 0.0 ( $\pm$ )	10.0 $\pm$ 0.0 ( $\pm$ )	10.0 $\pm$ 0.0 ( $\pm$ )	10.0 $\pm$ 0.0 ( $\pm$ )	
<b>CD</b>	10.0 $\pm$ 0.0 ( $\pm$ )	10.0 $\pm$ 0.0 ( $\pm$ )	10.0 $\pm$ 0.0 ( $\pm$ )	10.0 $\pm$ 0.0 ( $\pm$ )	10.0 $\pm$ 0.0 ( $\pm$ )	10.0 $\pm$ 0.0 ( $\pm$ )	10.0 $\pm$ 0.0 ( $\pm$ )	
<b>RV<sub>1</sub></b>	14.0 $\pm$ 1.4 (+)	12.5 $\pm$ 0.7 (+)	12.5 $\pm$ 0.7 (+)	14.5 $\pm$ 3.5 (++)	13.5 $\pm$ 0.7 (+)	11.5 $\pm$ 0.7 (+)	11.5 $\pm$ 0.7 (+)	
<b>RV<sub>2</sub></b>	16.5 $\pm$ 2.1 (++)	13.5 $\pm$ 0.7 (++)	15.5 $\pm$ 0.7 (++)	10.0 $\pm$ 0.0 (+)	11.0 $\pm$ 0.0 (+)	12.5 $\pm$ 0.7 (+)	12.0 $\pm$ 0.0 (+)	
<b>IC<sub>1</sub></b>	14.0 $\pm$ 1.4 (++)	11.5 $\pm$ 0.7 (+)	14.0 $\pm$ 1.4 (++)	13.0 $\pm$ 1.4 (++)	10.0 $\pm$ 0.0 (+)	11.0 $\pm$ 0.00 (+)	12.0 $\pm$ 0.0 (+)	
<b>IC<sub>2</sub></b>	12.0 $\pm$ 0.0 (+)	10.0 $\pm$ 0.0 (+)	13.5 $\pm$ 2.1 (+)	11.5 $\pm$ 0.7 (+)	10.0 $\pm$ 0.0 (+)	10.0 $\pm$ 0.0 (+)	10.0 $\pm$ 0.0 (+)	

$\pm$  Weak cells retraction at the contact area; + clear inhibition zone present (Giteru et al. 2015).

C (control film); CD (cyclodextrin control film); RV<sub>1</sub> (0.05% resveratrol film); RV<sub>2</sub> (0.075% resveratrol film); IC<sub>1</sub> (0.25% inclusion complex film); IC<sub>2</sub> (0.75% inclusion complex film).

**Table 5.** Anti-QS activity of bilayer active films by disk diffusion method and inhibition of violacein production using *Chromobacterium violaceum* ATCC 12472 as biosensor strain. Values are given as mean  $\pm$  standard deviation.

Films	Inhibition zones (diameter in mm)			Inhibition of violacein production (%)
	Growth inhibition (d1)	Growth + pigment inhibition (d2)	QS inhibition (d2-d1)	
<b>C</b>	ND	ND	ND	0 <sup>a</sup>
<b>CD</b>	ND	ND	ND	2.45 $\pm$ 0.99 <sup>a</sup>
<b>RV<sub>1</sub></b>	14.5 $\pm$ 0.7	14.5 $\pm$ 0.7	0	69.89 $\pm$ 10.09 <sup>b</sup>
<b>RV<sub>2</sub></b>	17.0 $\pm$ 0.0	17.0 $\pm$ 0.0	0	77.07 $\pm$ 1.02 <sup>b</sup>
<b>IC<sub>1</sub></b>	16.0 $\pm$ 0.0	22.0 $\pm$ 1.4	6.0 $\pm$ 1.4	83.24 $\pm$ 9.94 <sup>b</sup>
<b>IC<sub>2</sub></b>	15.0 $\pm$ 0.0	17.5 $\pm$ 3.5	2.5 $\pm$ 3.5	86.00 $\pm$ 8.86 <sup>b</sup>

ND – not detected inhibition.

C (control film); CD (cyclodextrin control film); RV<sub>1</sub> (0.05% resveratrol film); RV<sub>2</sub> (0.075% resveratrol film); IC<sub>1</sub> (0.25% inclusion complex film); IC<sub>2</sub> (0.75% inclusion complex film).

Different letters in the same column indicate significant different ( $p < 0.05$ ).

