



# Filmes ativos com resveratrol para controlo de *Campylobacter* spp. e *Arcobacter* spp. em carne de frango

David Passos Morgado Franco Frazão

## Orientadores

Cristina Maria Baptista Santos Pintado

Fernanda da Conceição Domingues

Tese apresentada à Escola Superior Agrária do Instituto Politécnico de Castelo Branco para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Inovação e Qualidade na Produção Alimentar, realizada sob a orientação científica da Professora Doutora Cristina Santos Pintado, do Instituto Politécnico de Castelo Branco, e da Professora Doutora Fernanda da Conceição Domingues, da Universidade da Beira Interior.

Fevereiro 2016



## Composição do júri

### Presidente do júri

Doutor Luís Pedro Mota Pinto de Andrade, Professor Coordenador da Escola Superior Agrária de Castelo Branco

### Vogais

Orientador: Doutora Cristina Maria Baptista Santos Pintado, Professor Adjunto da Escola Superior Agrária de Castelo Branco

Orientador: Doutora Fernanda da Conceição Domingues, Professor Auxiliar da Universidade da Beira Interior

Arguente: Doutora Maria Teresa Pita Pegado Gonçalves Rodrigues Coelho, Professor Adjunto da Escola Superior Agrária de Castelo Branco

Arguente: Doutor Vítor Manuel Delgado Alves, Professor Auxiliar do Instituto Superior de Agronomia



## Agradecimentos

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer às minhas orientadoras por me terem dado a possibilidade de realizar esta tese, especialmente à Prof<sup>a</sup> Cristina que, mesmo com alguma dificuldade de tempo, mostrou sempre dedicação e preocupação ao meu trabalho. Com igual importância, gostaria de agradecer à Eng<sup>a</sup> Manuela Goulão, à Eng<sup>a</sup> Helena Silva, à Eng<sup>a</sup> Conceição Amaro e à D<sup>a</sup> Fernanda Raposo da Escola Superior Agrária pela incansável ajuda e disponibilidade ao longo de todo o meu trabalho. Pela permissão do uso do texturómetro e pelo auxílio nos ensaios de permeabilidade também agradeço, respetivamente, ao CATAA (Associação Centro de Apoio Tecnológico Agro-Alimentar) e ao Professor Vítor Alves (Instituto Superior de Agronomia).

Pelo apoio e interesse no meu percurso, a todos os níveis, agradeço aos meus pais, irmãos e amigos.



Trabalho realizado no âmbito do projeto PTDC/AGR-ALI/121876/2010, financiado pela Fundação para a Ciência e Tecnologia



## Resumo

*Campylobacter* spp. e *Arcobacter* spp. têm sido associadas a doenças de origem alimentar através do consumo de, principalmente, carne de frango. O embalamento de carnes com filmes antimicrobianos pode ser uma estratégia eficaz para, ativamente, controlar contaminações microbianas durante o seu transporte e armazenamento. Assim, no presente trabalho, foram preparados filmes de quitosano (Ch) e/ou metilcelulose (MC) ativos com um complexo de inclusão (CI) de resveratrol (RV) e 2-(hidroxipropil)- $\gamma$ -CD (HP- $\gamma$ -CD) com o intuito de, ao embalar carne de frango, conseguirem controlar *Campylobacter* spp. e *Arcobacter* spp. Os filmes preparados foram caracterizados relativamente às propriedades antimicrobianas, propriedades mecânicas, permeabilidade ao vapor de água e teor de humidade. A melhor formulação filmogénica foi, ainda, caracterizada quanto à atividade antimicrobiana num ensaio de embalamento de carne de frango ao longo de 10 dias. Filmes ativos MC não conseguiram ser preparados devido à formação de um complexo insolúvel e filmes ativos de Ch e de mistura igualitária de Ch/MC demonstraram, nos testes de difusão em agar, atividade antimicrobiana contra *C. jejuni* ATCC 33560 (21-24mm e 10-14mm), *C. coli* ATCC 33559 (zonas de inibição parcial) e *A. butzleri* LMG 6620 (13-16mm e 10-13mm) mas não contra *A. butzleri* LMG 10828. Embora com a mesma tensão máxima de tração (Ch=2,63MPa e Ch/MC=2,77MPa), os filmes ativos de Ch/MC apresentaram um módulo de elasticidade maior (EM=45,58MPa) mas uma capacidade de alongamento (E%=58,63%) cerca de 2 vezes inferior aos filmes ativos de Ch (EM=16,98MPa e E%=128%). A permeabilidade ao vapor de água e o teor de humidade foi similar para os dois tipos de filme ativo (WVP $\approx$ 1,5x10<sup>-9</sup>g/Pa.s.m e teor de humidade $\approx$ 15%). Nos ensaios em carne de frango foi observada uma redução da população microbiana microaerófila de 1-2Log UFC/g em carne de frango não inoculada ou inoculada com *C. jejuni* ATCC 33560 ou *A. butzleri* LMG 6620 embalada com filmes de Ch com e sem RV, em oposição a um aumento de 3Log UFC/g em carne embalada com sacos de poliamida/polietileno comerciais. Foi demonstrada a migração e atividade antimicrobiana do RV, em princípio na forma de CI, dos filmes de Ch e Ch/MC mas uma menor migração na presença da MC devido a uma interação, possivelmente do tipo hidrofóbica, entre a MC e a HP- $\gamma$ -CD, não se concluindo a interação com o RV. Nos ensaios de embalamento de carne de frango foi concluída a atividade antimicrobiana do Ch que ultrapassou a atividade do RV como componente ativo contra a flora microbiana natural da carne de frango e possivelmente contra as estirpes bacterianas inoculadas.

## Palavras-chave

*Arcobacter*; *Campylobacter*; Carne de frango; Filmes ativos; Resveratrol.



## Abstract

*Campylobacter* spp. and *Arcobacter* spp. have been associated to foodborne illnesses mainly through fresh broiler meat consumption. Meat packaging with antimicrobial films may be an effective way to control meat spoilage microorganisms during its storage and distribution. In the present work, chitosan (Ch) and/or methylcellulose (MC) films with an inclusion complex (IC) between resveratrol (RV) and 2-(hydroxypropyl)- $\gamma$ -cyclodextrin (HP- $\gamma$ -CD) were prepared to control *Campylobacter* spp. and *Arcobacter* spp. in broiler meat as an active antimicrobial package. Films were characterized in relation to antimicrobial properties, mechanical properties, water vapor permeability and water content. The best film formulation was, as well, characterized in relation to antimicrobial activity in a packaged fresh broiler meat trial during 10 days storage in refrigeration. MC active films could not be prepared because of the formation of an insoluble complex and Ch and equal mixture of Ch/MC active films, in the agar diffusion test, showed antibacterial properties against *C. jejuni* ATCC 33560 (21-24mm e 10-14mm), *C. coli* ATCC 33559 (partial inhibition zones) and *A. butzleri* LMG 6620 (13-16mm e 10-13mm) but not against *A. butzleri* LMG 10828. . The two types of active film showed similar tensile strength (TS, Ch=2,63MPa and Ch/MC=2,77MPa) but Ch/MC active films presented higher elastic modulus (EM=45,58MPa) and smaller elongation at break (E%=58,63%) when compared with Ch active films (EM=16,98MPa and E%=128%). Furthermore, the two types of active film showed similar water vapor permeability (WVP $\approx$ 1,5x10<sup>-9</sup>g/Pa.s.m) and water content ( $\approx$ 15%). In natural or artificially (*C. jejuni* ATCC 33560 and *A. butzleri* LMG 6620) contaminated broiler meat samples trial, there was a decrease of 1-2Log CFU/g of total microaerophilic bacteria when films based on chitosan with and without RV were used, in opposition to an increase of about 3Log CFU/g with commercial PA/PE packaging. RV migration, probably in the IC, from the active films and anticampylobacter and arcobacter activity was demonstrated. However it was observed a slower RV migration from the active films in the presence of MC, a result of an interaction, possibly hydrophobic, between MC and, at least, HP- $\gamma$ -CD. When natural or artificially contaminated broiler meat was packaged with Ch films it was observed a reduction in total microaerophilic microorganisms due to the Ch activity that had exceeded the RV activity. The results showed Ch antibacterial potential against *Arcobacter* spp., which is not found in literature, and *Campylobacter* spp., which is poorly reported.

## Keywords

Active films; Broiler meat; *Arcobacter*; *Campylobacter*; Resveratrol



# Índice geral

1. Introdução.....	1
2. Enquadramento e fundamentos científicos .....	3
2.1 <i>Campylobacter</i> spp. e <i>Arcobacter</i> spp.....	3
2.2 Estratégias de controlo de contaminações por <i>Campylobacter</i> spp. e <i>Arcobacter</i> spp. em carne de frango .....	8
2.3 Embalagens ativas.....	11
2.3.1 Filmes antimicrobianos .....	12
2.3.2 Biomoléculas como matrizes estruturais de filmes.....	13
2.3.3 Resveratrol como substância ativa .....	17
2.3.4 Enquadramento legislativo .....	20
2.4 Avaliação das propriedades dos filmes .....	23
2.4.1 Propriedades mecânicas .....	23
2.4.2 Permeabilidade ao vapor de água .....	24
2.4.3 Propriedades antimicrobianas .....	27
3. Materiais e métodos .....	29
3.1. Preparação do complexo de inclusão .....	29
3.1.1 Soluções de trabalho.....	29
3.1.2 Estabilidade do complexo de inclusão em pH ácido.....	29
3.1.3 Quantificação do resveratrol complexado .....	29
3.2 Preparação dos filmes .....	30
3.2.1 Quantidade de componente ativo.....	31
3.2.2 Adição de glicerol.....	32
3.3 Avaliação das propriedades dos filmes .....	32
3.3.1 Propriedades antimicrobianas .....	32
3.3.1.1 Estirpes bacterianas .....	32
3.3.1.2 Teste de difusão em agar.....	33
3.3.2 Propriedades mecânicas .....	33
3.3.3 Permeabilidade ao vapor de água .....	35
3.3.4 Teor de humidade.....	36
3.3.5 Ensaio antimicrobianos em carne de frango.....	36
3.3.5.1 Preparação da carne.....	36
3.3.5.2 Inoculação da carne.....	36

3.3.5.3 Embalamento da carne .....	36
3.3.5.4 Análise microbiológica da carne .....	37
3.3.5.5 Avaliação do efeito da secagem da carne.....	37
3.4 Análise estatística .....	37
4. Resultados e discussão .....	39
4.1 Concentração das soluções de trabalho .....	39
4.2 Estabilidade do complexo de inclusão.....	39
4.3 Caracterização dos filmes .....	42
4.3.1 Propriedades antimicrobianas .....	42
4.3.2 Propriedades mecânicas.....	45
4.3.3 Permeabilidade ao vapor de água e teor de humidade.....	47
4.4 Ensaio antimicrobiano em carne de frango.....	48
5. Conclusões .....	53
6. Referências bibliográficas.....	55
Apêndice A: Concentração das soluções de CI.....	63
Apêndice B: Teste de difusão em agar dos filmes .....	67
Apêndice C: Propriedades mecânicas dos filmes .....	73
Apêndice D: Permeabilidade ao vapor de água dos filmes.....	79
Apêndice E: Teor de humidade dos filmes.....	83
Apêndice F: Ensaio antimicrobianos em carne de frango.....	87

## Índice de figuras

<b>Figura 1:</b> Estrutura química de (a) poli( <i>N</i> -acetil- $\beta$ -D-glucosamina) e (b) poli( $\beta$ -D-glucosamina) [56].	15
<b>Figura 2:</b> Estrutura química do polímero de Ch (DA representa o grau de acetilação) [56].	15
<b>Figura 3:</b> Estrutura química da MC (n: número de monómeros) [19].	16
<b>Figura 4:</b> Estrutura química de (a) <i>trans</i> -RV e (b) <i>cis</i> -RV. Adaptado de [65].	18
<b>Figura 5:</b> Estrutura química de $\alpha$ , $\beta$ e $\gamma$ -ciclodextrinas. [76]	19
<b>Figura 6:</b> Filmes quebradiços de Ch e Ch/MC com 2,5mL de solução de Cl adicionados às soluções filmogénicas, obtidos em ensaios preliminares (filmes com solução de HP- $\gamma$ -CD apresentaram-se muito semelhantes).	32
<b>Figura 7:</b> Pratos de teste para avaliação da transferência ao vapor de água: filmes montados nas placas de Petri de 5,3cm de diâmetro com uma solução saturada de NaCl no fundo.	35
<b>Figura 8:</b> Exsiccador fechado (1) com solução de nitrato de magnésio hexahidratado no fundo (2), pratos de teste (3) e medidor de T e HR (4) no tabuleiro e ventoinha (5) no topo, presa na tampa.	35
<b>Figura 9:</b> Equilíbrio dinâmico da formação de um complexo de inclusão (CI) entre uma ciclodextrina (CD) e um composto (M), sendo K a constante de equilíbrio (constante de associação).	40
<b>Figura 10:</b> Resolução matemática da quantidade (em M) de CI ou de RV complexado no equilíbrio para a situação sem diluição e para a situação com diluição.	41
<b>Figura 11:</b> Zonas de inibição total (à esquerda) e de inibição parcial (à direita), obtidos em ensaios preliminares em que se colocou 12 $\mu$ L de solução de CI e de HP- $\gamma$ -CD diretamente na superfície de meio inoculado com <i>C. jejuni</i> ATCC 33559 e <i>C. coli</i> ATCC 33560.	43
<b>Figura 12:</b> Gráfico força de tração (em kgf) vs distância entre os agarradores de uma amostra de filme de Ch com CI e glicerol.	47
<b>Figura 13:</b> Gráfico força de tração (em kgf) vs distância entre os agarradores de uma amostra de filme de Ch/MC com CI e glicerol.	47
<b>Figura 14:</b> Evolução temporal (em dias) da carga microbiana microaerófila de amostras de carne de frango (UFC/g), com ou sem inoculação, embaladas a 60% de vácuo com sacos PA/PE (linha azul descontínua), filmes Ch com CI (linha verde contínua), filmes Ch com HP- $\gamma$ -CD (linha vermelha de pontos).	49
<b>Figura 15:</b> Evolução temporal (em dias) da carga microbiana microaerófila de amostras de carne de frango (UFC/g), inoculadas com <i>C. jejuni</i> ATCC 33560, embaladas a 60% de vácuo com sacos PA/PE (linha azul descontínua), filmes Ch com CI e sacos PA/PE (linha verde contínua) e filmes Ch com HP- $\gamma$ -CD e sacos PA/PE (linha vermelha de pontos).	50

**Figura 16:** Pedacos de carne de frango de 5g embalados, a 60% de vácuo, em saco de PA/PE (à esquerda), em filme de Ch com CI ou HP- $\gamma$ -CD e saco PA/PE exterior (ao centro) e em filme de Ch com CI ou HP- $\gamma$ -CD (à direita). .....50

## Índice de tabelas

<b>Tabela 1:</b> Condições cromatográficas do método HPLC-DAD, para quantificação de <i>trans-RV</i> .....	29
<b>Tabela 2:</b> Preparação das soluções-padrão, usadas na construção da reta de calibração, a partir das soluções de trabalho 1 (100µg RV/mL) e 2 (10µg RV/mL), com diluição em fase móvel (48% Acetonitrilo / 52% Solução aquosa de ácido fórmico a 0,1% v/v).....	30
<b>Tabela 3:</b> Composição das soluções filmogénicas de matriz Ch e Ch/MC usadas para a preparação dos filmes correspondentes.....	31
<b>Tabela 4:</b> Concentração das diluições da solução de CI (23,58mg/mL) em água destilada e em soluções de ácido acético de pH=2 e pH=3 para uma concentração de aproximadamente 1mg/mL. ....	40
<b>Tabela 5:</b> Balanço de massa da complexação entre o RV e a HP-γ-CD com e sem diluição. A diluição feita por adição de 88µL de solução de CI a 2mL de diluente. ....	41
<b>Tabela 6:</b> Diâmetro das zonas de inibição para <i>C. jejuni</i> ATCC 33560 com 12µL de duas soluções de CI com concentrações diferentes e uma solução de HP-γ-CD 0,3M. ....	43
<b>Tabela 7:</b> Média dos diâmetros das zonas de inibição, resultantes da atividade dos filmes Ch e Ch/MC (0,33g polímero e 8,7cm diâmetro) sem CI, com duas quantidades (2,5mL e 4,5mL) de CI e com HP-γ-CD (4,5mL). ....	44
<b>Tabela 8:</b> Tensão máxima de tração (TS), percentagem de alongamento na rutura (E%), módulo de elasticidade (EM), permeabilidade ao vapor de água (WVP) e teor de humidade dos filmes de Ch e Ch/MC (0,33g polímero e 8,7cm diâmetro) com e sem 2,5mL de solução de CI e 10%, desse volume em glicerol. Os valores apresentados são a média ± Desvio-Padrão de n (número) amostras.....	46



## Lista de abreviaturas e siglas

**RV:** Resveratrol;

**MIC:** Concentração mínima inibitória (*Minimum inhibitory concentration*);

**Ch:** Quitosano (*Chitosan*);

**MC:** Metilcelulose;

**CI:** Complexo de inclusão;

**HP- $\gamma$ -CD:** 2-(hidroxipropil)- $\gamma$ -ciclodextrina;

**HP- $\beta$ -CD:** 2-(hidroxipropil)- $\beta$ -ciclodextrina;

**EFSA:** Autoridade Europeia para a Segurança Alimentar (*European Food Safety Authority*);

**ECDC:** Centro Europeu de Prevenção e Controlo das Doenças (*European Centre for Disease Prevention and Control*);

**UE:** União Europeia;

**VBNC:** Viável mas não cultivável (*Viable but nonculturable*);

**HR:** Humidade relativa;

**T:** Temperatura;

**TS:** Tensão máxima de tração (*Tensile strenght*);

**E%:** Percentagem de alongamento na rutura (*Percentage of elongation at break*);

**EM:** Módulo de elasticidade (ou de Young) (*Elastic modulus*);

**WVTR:** Velocidade de transferência de vapor de água (*Water vapour transmission rate*);

**WVP:** Permeabilidade ao vapor de água (*Water vapour permeability*);

**PA/PE:** Poliamida/polietileno



## 1. Introdução

As bactérias dos gêneros *Campylobacter* e *Arcobacter* pertencem à família *Campylobacteraceae* e têm sido associadas a doenças de origem alimentar em humanos, especialmente através do consumo de carne de aves fresca [1], [2]. Dentro do consumo de carne de aves, o risco é maior para a carne de frango devido às grandes quantidades consumidas a nível mundial [3], sendo por isso necessário desenvolver estratégias de controlo e prevenção da contaminação por estes microrganismos nestas carnes.

Embora a maioria dos conservantes sintéticos usados na indústria alimentar sejam eficazes, preocupações relativamente à sua inocuidade têm levado a uma crescente procura por compostos obtidos de fontes naturais, como alternativa mais segura [4], [5]. O resveratrol (3,4',5-trihidroxiestilbeno) (RV) é uma fitoalexina natural encontrada em uvas e em algumas outras fontes vegetais, bastante promissor para uso como conservante natural uma vez que, para além de possuir atividade antimicrobiana contra bactérias, leveduras e fungos filamentosos, apresenta várias propriedades benéficas para a saúde humana [6], [7], [8]. A sua ação antimicrobiana já foi demonstrada contra *Campylobacter* spp. e *Arcobacter* spp. em vários estudos com concentrações mínimas inibitórias (MIC) de 50 ou 100 µg/mL [9], [10], [11].

Filmes ativos como sistemas de libertação controlada de conservantes podem aumentar a eficácia e eficiência dos mesmos durante a distribuição e armazenamento de carnes frescas uma vez que esses compostos podem migrar seletiva e gradualmente para a superfície dos alimentos, prolongando a sua atividade [12]. Materiais edíveis e biodegradáveis, como matrizes estruturais destas embalagens, têm ganho alguma atenção pois possuem baixa toxicidade e contribuem em menor grau para a poluição ambiental quando comparados com materiais sintéticos derivados do petróleo [13]. De entre este tipo de materiais, destacam-se os polissacarídeos que, devido às suas boas propriedades filmogénicas, mecânicas e de permeabilidade a gases [14], podem ser usados como matriz estrutural de filmes ativos para embalamento de carnes a vácuo [12]. O quitosano (Ch) é um derivado da quitina, o segundo polissacarídeo mais abundante na Terra a seguir à celulose [13]. Para além de possuir propriedades antimicrobianas intrínsecas e de apresentar boas propriedades filmogénicas, este biopolímero também apresenta biodegradabilidade e biocompatibilidade (toxicidade considerada nula) com os tecidos humanos [15], [16]. A metilcelulose (MC) é um biopolímero polissacarídico derivado da celulose que também apresenta boas propriedades filmogénicas e consegue formar misturas estáveis com o Ch, podendo melhorar algumas propriedades mecânicas dos filmes resultantes [17], [18]. Para além das propriedades referidas, é não tóxica, não alergénica e não digerível no organismo humano [19].

A incorporação do RV em filmes de Ch e MC já foi conseguida, no entanto, a solubilidade do RV em meio aquoso dificulta a sua migração dos filmes e condiciona a sua atividade antimicrobiana [20]. A formação de um complexo de inclusão (CI) entre o RV e a (2-hidroxipropil)- $\gamma$ -ciclodextrina (HP- $\gamma$ -CD) mostrou ser eficaz no aumento

da solubilidade e da estabilidade do composto [21], mantendo, mas em menor extensão, a atividade antimicrobiana do RV contra *Campylobacter* spp. e *Arcobacter* spp., o que pode significar uma liberação mais controlada e um efeito mais prolongado do composto ativo, tornando este complexo um bom candidato a sistemas de embalagem de liberação controlada [10].

O intuito do presente trabalho foi incorporar o CI de RV em filmes de Ch e/ou MC para controlo de contaminações por *Arcobacter* spp. e *Campylobacter* spp em carne de frango fresca, seguindo os seguintes objetivos:

- Preparar filmes de Ch e MC e um filme compósito de Ch/MC com o CI de RV;
- Avaliar propriedades físicas (propriedades mecânicas, permeabilidade ao vapor de água) e antimicrobianas das melhores formulações filmogénicas;
- Realizar um teste final em carne de frango, usando a formulação filmogénica mais adequada como filme de embalagem, avaliando o seu efeito antimicrobiano.

## 2. Enquadramento e fundamentos científicos

### 2.1 *Campylobacter* spp. e *Arcobacter* spp.

As doenças de origem alimentar representam um problema de saúde pública importante uma vez que afetam significativamente a saúde das populações e têm consequências económicas, sendo a sua tendência para aumentar com o aumento da população mundial e do comércio internacional de alimentos [22]. Segundo o relatório científico da EFSA e ECDC de 2015 acerca das tendências e fontes de zoonoses, foi relatado um total de 5.196 surtos de doenças de origem alimentar em humanos no ano de 2013 na UE que envolveram 43.183 casos de doença, 5.946 hospitalizações e 11 mortes [1]. Destes surtos, 8% dos casos em que se conheceu o agente causal foram associados a *Campylobacter* spp., o que representa uma pequena diminuição comparando com os dados relativos a 2012 [1]. *Campylobacter* spp. tem sido a bactéria patogénica gastrointestinal zoonótica mais frequentemente relatada em humanos na UE desde 2005, com 214.779 casos confirmados de campilobacteriose em humanos no ano de 2013 e com uma clara tendência sazonal de maior ocorrência nos meses de verão [1]. Considerando o grande número de casos de campilobacterioses, a severidade em termos de casos de fatalidade foi bastante baixa (0,05%) mostrando, no entanto um pequeno aumento em relação à média de 0,03% verificada com os quatro anos anteriores (2009-2013) [1]. Para 48,1% dos casos confirmados relatados pela UE, Islândia e Noruega, a maioria foi associado a *C. jejuni* (80,6%), seguindo-se a espécie *C. coli* (7,1%) [1].

O género *Arcobacter*, que também pertence à família *Campylobacteraceae*, tem-se tornado cada vez mais importante nos últimos anos pois algumas espécies têm sido consideradas enteropatogéneos emergentes e possíveis agentes zoonóticos [23]. A incidência e importância clínica deste género estão provavelmente subestimadas devido, principalmente, a limitações nos métodos de deteção e identificação mais correntes [24]. As espécies *A. butzleri*, *A. skirrowii* e *A. cryoaerophilus* têm sido isoladas de infeções em humanos e animais, sendo *A. butzleri* a espécie mais prevalente e relevante [2].

O género *Campylobacter* inclui pequenos bacilos Gram-negativos delgados curvos ou em forma de espiral, móveis através de um único flagelo polar numa ou nas duas extremidades da célula e que, quando se agrupam, podem tomar uma forma em “S” ou “V” [25]. As bactérias do género não fermentam nem oxidam carboidratos, obtendo energia a partir de aminoácidos ou de intermediários do ciclo dos ácidos tricarbóxicos, são não formadoras de esporos e, em condições adversas, podem formar células viáveis mas não cultiváveis (VBNC) [25]. *C. jejuni* e *C. coli*, sendo espécies termotolerantes, conseguem crescer bem entre 37-42°C mas não a menos de 30°C, o que faz com que sejam pouco capazes de se multiplicar fora de um hospedeiro animal [25]. O seu crescimento não ocorre a  $a_w < 0,987$  e a  $pH < 4,9$  ou  $> 9,0$  sendo as condições ótimas  $a_w = 0,997$  e  $pH = 6,5-7,5$  [25]. São bactérias microaerófilas, crescendo em atmosferas com baixa tensão de oxigénio (5% O<sub>2</sub>; 10% CO<sub>2</sub>; 85% N<sub>2</sub>) [25]. Quanto

à sua patogenicidade, no geral, sabe-se que a mobilidade por flagelos, a aderência à mucosa intestinal, a capacidade de invasão e a capacidade de produzir toxinas constituem os principais fatores de virulência [25]. Isolados de *Campylobacter* são extremamente diversos tanto a nível da virulência como a nível da suscetibilidade a antibióticos e a nível das características de crescimento e sobrevivência, o que é explicado, em parte, pela sua competência natural de incorporar DNA exógeno [26].

O género *Arcobacter* caracteriza-se por ser constituído por bacilos Gram-negativos, curvos em “S”, que possuem mobilidade atribuída também por um único flagelo polar numa ou nas duas extremidades da célula sendo, portanto, bastante similares morfológicamente a *Campylobacter* spp. [27]. Tal como *Campylobacter* spp. não fermentam ou oxidam carboidratos, obtendo a sua energia a partir de aminoácidos ou intermediários do ciclo dos ácidos tricarbóxicos [27]. Uma grande diferença entre os dois géneros é o facto de *Arcobacter* conseguir crescer tanto em condições de anaerobiose como de aerobiose, apesar de apresentar um crescimento ótimo também em condições de microaerofilia (3-10% O<sub>2</sub>) [23]. Ainda em relação a *Campylobacter*, as bactérias do género *Arcobacter* crescem num intervalo de temperatura maior, de 15-42°C [23], toleram grandes concentrações de cloreto de sódio e são resistentes à dessecação [2]. Também não formam esporos e foi relatado que conseguem atingir o estado de VBNC [2] [28]. Espécies do género *Arcobacter* têm sido isoladas de vários ambientes e hospedeiros que, em conjunto com as suas condições de crescimento, suportam a ideia de que as espécies deste género conseguem habitar diversos ambientes [2]. A partir da sequenciação do genoma de uma estirpe humana de *A. butzleri* observou-se que uma parte substancial desse genoma incluía genes associados ao crescimento e sobrevivência de bactérias em condições ambientais diversas e que existiam mecanismos e *loci* associados a organismos que não necessitam de um hospedeiro para sobreviver [29]. Wesley e Miller [30] sugerem que as bactérias do género *Arcobacter* sejam organismos de vida livre e naturais de ambientes aquáticos mas com capacidade de se adaptarem a ambientes muito diversos, ocasionalmente, colonizando o trato intestinal de animais e humanos. Quanto à sua patogenicidade, os fatores de virulência mais comumente observados são a capacidade de adesão e citotoxicidade, sendo que a capacidade de invasão de células já foi demonstrada para *A. cryoaerophilus* e *A. butzleri* [2]. Estes fatores de virulência parecem ser muito semelhantes aos de *Campylobacter* e, de facto, o genoma sequenciado para *A. butzleri* [29] revelou a existência de potenciais mecanismos de virulência homólogos aos de *C. jejuni*, não se sabendo se estão ativos ou se desempenham um papel semelhante [2]. No entanto, nesse genoma não se encontrou o gene para a toxina CDT (*cytolethal distending toxin*) que é encontrado em muitas *Campylobacter* spp. e que produz citotoxicidade em células quebrando o DNA de cadeia dupla [2]. Do mesmo modo, os genes que codificam para as flagelinas de *Arcobacter* não são filogeneticamente relacionados com os genes correspondentes de *Campylobacter* [2]. Os flagelos e as suas subunidades proteicas, as flagelinas, estão envolvidos na mobilidade e quimiotaxia das bactérias e desempenham um papel na colonização e invasão das células hospedeiras, sendo as flagelinas o primeiro alvo do

sistema imunitário do organismo hospedeiro [2]. Ainda não foi elucidado se os flagelos podem ser considerados fatores de virulência essenciais para a colonização do trato intestinal por *Arcobacter* spp., como acontece para *C. jejuni* [2]. Foi relatado também que um elevado grau de recombinação genética pode estar na origem da grande heterogeneidade genómica verificada entre isolados de carne de aves [31].

A dose de infeção de *Campylobacter* spp. para humanos é geralmente baixa, o período de incubação é de 2-5 dias e as infeções são, normalmente, auto-limitantes e de curta duração [32]. Os sintomas podem ser desde ligeiros a severos, sendo o quadro clínico mais comum a apresentação de diarreias aquosas e algumas vezes sanguinolentas, dores abdominais, febre, dor de cabeça e náusea [32]. Podem ainda ocorrer infeções extraintestinais ou complicações pós-infeção como artrite reativa e transtornos neurológicos [32]. *C. jejuni* tem sido reconhecida como uma causa antecedente da síndrome Guillain-Barré (paralisia tipo poliomielite) que pode resultar em falha respiratória, disfunções neurológicas severas e até morte [32]. Os fatores que mais influenciam as infeções por *Campylobacter* spp. são a idade (maior ocorrência em crianças menores de 5 anos), a época (maior ocorrência nos meses de verão), as estirpes, a condição imunitária do hospedeiro, as viagens e os fatores demográficos [25].

As infeções por *Arcobacter* podem produzir doença em humanos com sintomas similares às causadas por *Campylobacter* e outros microrganismos patogénicos de origem alimentar [33]. Vandenberg *et al.* [24] observaram que *Arcobacter* era o quarto mais frequente microrganismo tipo *Campylobacter* isolado de amostras de fezes de pacientes humanos e que, embora *A. butzleri* possa ter características microbiológicas e clínicas semelhantes a *C. jejuni*, está bastante mais associada a diarreias aquosas não sanguinolentas. Outros sintomas associados a infeções por *A. butzleri* incluem dores abdominais, náuseas, vómitos e febre [2], [24].

*Campylobacter* spp. são microrganismos comensais frequentemente encontrados em aves, bovinos, suínos e ovinos [25]. Segundo o relatório científico da EFSA e ECDC de 2015, a maioria dos dados de 2013 em animais é em relação a frangos, o que tem sentido uma vez que nesse ano a carne de frango foi, de longe, a fonte de surtos alimentares de campilobacteriose em humanos mais frequentemente identificada [1]. Das 11.475 unidades testadas (lotes no matadouro, bandos em produção e animais testados individualmente), 19,9% foram positivas quanto à presença de *Campylobacter* spp. [1]. No entanto, é importante referir que dentro da UE existe muita variabilidade de resultados entre os estados membros e que a maioria dos dados em animais provem dos países nórdicos que apresentam baixas prevalências devido ao facto de, na sua maioria, terem implementado programas de controlo e monitorização para este agente zoonótico [1]. Tal como no caso dos animais, a maioria dos dados em alimentos recolhidos entre os estados membros e um país europeu não membro da UE é em relação a carne de frango e das 8.022 unidades de carne de frango testadas (por lotes ou individualmente), recolhidas em matadouros, processamento e retalho, 30,4% foram positivas quanto à presença de *Campylobacter*

spp. [1]. As espécies aviárias são os hospedeiros mais comuns para *Campylobacter* spp., provavelmente devido à sua maior temperatura corporal [25] e, embora todas as espécies de aves domésticas para consumo possam ser veículos destes microrganismos, o risco é maior para os frangos por causa das grandes quantidades de carne consumidas [3]. Num estudo realizado em Portugal entre 2009 e 2012 sobre a variabilidade genética de *Campylobacter* spp., em que se compararam os perfis genéticos de isolados do género obtidos de várias fontes (amostras fecais de humanos com gastroenterite aguda, alimentos no retalho e fontes de alimentos de origem animal), reforçou-se a ideia de que as infeções por *Campylobacter* em humanos se devem a diferentes fontes, sendo as aves domésticas a mais importante [34]. De facto, a carne de frango é uma fonte substancial de proteína de alta qualidade e os seus preços são mais baixos que os da carne de bovino ou suíno [25], aspetos que podem justificar o seu amplo consumo. O trato intestinal dos frangos, especialmente o ceco e o colón, contém um grande número de *Campylobacter* spp., as quais podem contaminar a superfície da carcaça se durante o processamento o intestino se romper ou rasgar [35]. Embora se classifiquem estas bactérias como suscetíveis ao ambiente exterior, elas são mais resilientes do que se pensava porque, para além de poderem atingir o estado de VBNC em que conseguem igualmente infetar hospedeiros, também a sua persistência e sobrevivência na superfície das carcaças é fomentada por um microambiente adequado da pele da carcaça [25], [36]. Mesmo em condições de congelamento ou armazenamento a 4°C e em embalagens de atmosfera controlada, elas conseguem persistir [25], [37], [38].

As bactérias do género *Arcobacter* têm sido frequentemente isoladas do trato intestinal e de amostras de fezes de diferentes animais de quinta como aves, bovinos, suínos, ovinos e equinos [23]. Devido à grande prevalência destes microrganismos no trato intestinal e amostras fecais de animais saudáveis e em muitos produtos cárneos de retalho, é sugerido que alimentos de origem animal constituam uma importante rota de potencial transmissão e que a contaminação de carnes ocorre quando as fezes dos animais contaminados entram em contacto com as carcaças [2]. A excreção fecal destes microrganismos é conhecida em aves domésticas e não tem havido relatos de doença nestes animais pelo que, com base nisto, tem sido sugerido que as aves domésticas possam ser um reservatório natural de algumas espécies de *Arcobacter* spp. [2]. Do mesmo modo que para *Campylobacter* spp., pode-se assumir um risco importante para a carne de frango pois é a carne de ave mais amplamente consumida. Estudos em alimentos têm mostrado que as espécies mais prevalentes são a *A. butzleri*, *A. cryoaerophilus* e *A. skirrowii* [39] que são precisamente as espécies isoladas de infeções em humanos e animais, como enunciado anteriormente. Embora seja frequente o isolamento de *Arcobacter* spp. em carcaças de aves, não é tão comum, como é para *Campylobacter* spp., isolá-las de aves vivas, o que pode ser atribuído ao facto de a sua temperatura de crescimento preferencial (30°C) ser inferior à temperatura corporal das aves (39°C), sendo esta última bastante mais adequada para o crescimento de *Campylobacter* spp. [30]. As evidências sugerem que *Arcobacter* spp. colonizam frangos em níveis significativamente inferiores aos de

*Campylobacter* spp., mas que os níveis de contaminação de carcaças são bastante similares para as duas o que pode resultar de contaminações no matadouro ou mudanças após o abate [30]. Segundo Ferreira *et al.* [40] a capacidade de aderência e formação de biofilmes de *A. butzleri* em superfícies, embora fracas, podem explicar, em parte, a sua prevalência e sobrevivência no ambiente de matadouro, podendo também ser uma possível explicação para as discrepâncias entre a baixa prevalência de *Arcobacter* spp. no trato intestinal das galinhas/frangos e a elevada prevalência nas carcaças das mesmas e nos equipamentos. Os mesmos autores também sugerem que *A. butzleri* pode incorporar, como um colonizador secundário, um biofilme já pré-estabelecido, como previamente descrito para *C. jejuni* [40], [41].

O uso prolongado de antibióticos para controlo de doenças em produções modernas de animais para consumo tem levado ao aumento do número de bactérias resistentes a esses antibióticos capazes de causar doença em animais e humanos [42]. Duarte *et al.* [34] estudaram a resistência a antibióticos de 196 estirpes de *Campylobacter* spp. (125 de amostras fecais de humanos com gastroenterite aguda, 39 de alimentos de retalho e 32 de fontes de alimentos de origem animal) isoladas entre 2009 e 2012, em Portugal, concluindo que para as duas espécies identificadas, *C. coli* e *C. jejuni*, existia um grande nível de resistência a quinolonas (ciprofloxacina e ácido nalidíxico) e, embora em menor extensão e com maior prevalência para *C. coli*, à eritromicina (macrólido), resultados estes similares aos de Espanha mas superiores aos de outros países europeus como Alemanha, França e Reino Unido. Ferreira *et al.* [40] estudaram a resistência a antibióticos de 43 isolados de *A. butzleri* recolhidos, em 1 dia, num matadouro em Portugal, observando um grande nível de resistência a vários antibióticos, incluindo quinolonas. Segundo os autores dos dois estudos a resistência a estes grupos de antibióticos está provavelmente relacionado com o seu uso acentuado nos sistemas de produção de animais para consumo em Portugal. Pelos dois grupos de trabalho foi demonstrada a grande suscetibilidade dos isolados de ambos os géneros à gentamicina, no entanto, Duarte *et al.* [34] relataram três isolados de *C. coli* resistentes que pode ser reflexo o uso de aminoglicosídeos em tratamentos veterinários.

## 2.2 Estratégias de controlo de contaminações por *Campylobacter* spp. e *Arcobacter* spp. em carne de frango

A contaminação de carne fresca de aves, especialmente a de frango, por *Campylobacter* spp. e *Arcobacter* spp. constitui um perigo microbiano de origem alimentar para os consumidores. Ao contrário do que acontece atualmente para *Campylobacter* spp., ainda existe pouca informação acerca das estratégias de controlo e prevenção da contaminação por *Arcobacter* spp. ao longo da cadeia alimentar. Contudo e uma vez que são organismos similares, muitas das estratégias usadas para *Campylobacter* spp. poderão ser também adotadas para *Arcobacter* spp..

Cada vez mais os consumidores procuram produtos alimentares com propriedades sensoriais, nutricionais e funcionais melhoradas, a par de produtos que tenham uma imagem tradicional e salubre, que sejam seguros e com um “tempo de prateleira” longo [43]. Adicionalmente a estas exigências, há ainda a referir a preferência por produtos alimentares com o mínimo de processamento e intervenção tecnológica [43]. De modo a ir ao encontro das exigências de mercado, os produtores e reguladores concentraram-se no desenvolvimento e aplicação de sistemas de gestão de segurança e qualidade alimentar baseados numa análise de perigos e na sua prevenção através do controlo, monitorização e documentação de parâmetros críticos ao longo da cadeia alimentar [43], bem como através da adoção de códigos de boas práticas. No entanto, como nunca se consegue uma prevenção completa, medidas intervencionais e de deteção são também necessárias [44].

Existem vários métodos de conservação de carne que visam prevenir ou controlar o crescimento microbiano, no entanto, muitos desses métodos não podem ser aplicados a carnes frescas [45]. As condições a que os alimentos estão sujeitos durante o transporte e ao nível do retalho estão fora do controlo direto dos fabricantes e muitas vezes desviam-se das especificações [43] pelo que a combinação de métodos de conservação com os sistemas de gestão de segurança dos alimentos resulta numa melhorada garantia de segurança, para além de aumentarem o “tempo de prateleira” desses alimentos.

Ao nível da produção primária, sabe-se que a produção de frangos em liberdade acarreta um maior risco de contaminação por *Campylobacter* spp. [3] e que a redução ou eliminação do uso de proteína animal na alimentação bem como o saneamento da água de abastecimento são procedimentos eficazes na redução desse risco de contaminação [25]. O mesmo se poderá deduzir para *Arcobacter* spp. uma vez que as bactérias deste género conseguem sobreviver melhor que as primeiras no meio ambiente e têm necessidades metabólicas muito semelhantes. O uso de antibióticos na criação de animais para alimentação não é uma estratégia correta uma vez que leva ao aumento do número de estirpes com resistência a antibióticos, no entanto, o uso de prebióticos, probióticos, bacteriocinas e bactérias produtoras de bacteriocinas têm mostrado resultados promissores, tendo merecido alguma atenção e investigação

[25]. A aplicação de boas práticas de higiene tem mostrado ser bastante eficaz mas, a este nível, essas práticas são frequentemente violadas [25].

Ao nível dos matadouros, a separação de bandos contaminados de não-contaminados por *Campylobacter* spp. tem provado ser uma estratégia bastante eficaz na redução da disseminação de contaminações, podendo-se usar, para identificar os bandos quanto à contaminação, um teste rápido de PCR com eletroforese [25], [46]. A prevenção da propagação de matéria fecal durante a evisceração de carcaças por rutura do intestino, que contamina tanto a superfície da própria carcaça como promove contaminações cruzadas, tem sido considerada uma das estratégias mais eficazes para prevenir contaminações tanto por *Campylobacter* spp. como por *Arcobacter* spp [25], [47]. O uso de boas práticas de higiene, a este nível, também reduz consideravelmente os níveis de contaminação [25].

Ao nível doméstico e da restauração, as temperaturas e tempos de cozimento são suficientes para matar as bactérias dos dois géneros [25], [47], desde que a carne cozinhada não seja comprometida por contaminações cruzadas posteriores [25]. Devido à capacidade de se aderirem rapidamente a superfícies, existe uma forte probabilidade de ocorrência de contaminações cruzadas por *Campylobacter* spp., sendo recomendada a transferência direta da carne de frango da embalagem para o forno em vez de a lavar em água corrente [25]. O mesmo se pode concluir para *Arcobacter* spp. devido à sua capacidade de aderência a superfícies [40].

Atualmente, existem muitas tecnologias que podem ser usadas para o controlo e prevenção da contaminação de carnes quer por microrganismos deteriorantes quer por microrganismos patogénicos. Como exemplo pode-se referir o processamento térmico, a congelação, a refrigeração, a irradiação ionizante, aplicação de aditivos e uso de embalagens. A combinação de várias tecnologias resulta numa maior diminuição do grau de contaminação [48], sendo este o princípio do conceito *hurdle effect* (efeito de barreiras). Os métodos de processamento térmico e de irradiação ionizante têm mostrado ser dos mais eficazes para o controlo de *Campylobacter* spp. e *Arcobacter* spp. [47], uma vez que estas bactérias não formam esporos e são bastante sensíveis ao calor. No entanto, os métodos de processamento térmico só podem ser aplicados a alguns produtos cárneos e nunca a carnes frescas. Já a irradiação ionizante, embora possa ser aplicada a carnes frescas ou minimamente processadas, a sua aplicação acarreta grandes custos de investimento e alguns problemas de aceitação por parte dos consumidores [49]. O uso de baixas temperaturas (congelação e refrigeração) serve para atrasar ou inibir o crescimento microbiano, não sendo eficaz, no entanto, na redução da população microbiana contaminante inicialmente presente. Embora *Campylobacter* spp. sejam consideradas bactérias fastidiosas elas conseguem persistir na carne de frango armazenada a 4°C e mesmo em condições de congelação, possivelmente devido a um microambiente adequado à sua sobrevivência gerado na pele das carcaças [25]. Como as bactérias do género *Arcobacter* conseguem, no geral, crescer a temperaturas mais baixas, também se pode inferir que consigam, de igual modo, persistir nas mesmas condições.

Os compostos antimicrobianos são um tipo de conservantes que são adicionados aos alimentos para inibirem o crescimento ou matarem os microrganismos [50], podendo ser aplicados durante o abate, o transporte, o processamento e o armazenamento, oferecendo uma boa proteção da carne em combinação com a refrigeração [48]. No entanto, a maioria destes agentes, nas concentrações usadas, funcionam só como bacteriostáticos ou fungistáticos, prevenindo apenas a proliferação microbiana [50] e, sendo aditivos alimentares, estão sujeitos a várias regras e regulamentos com o intuito de prevenir potenciais efeitos adversos para a saúde humana [48]. A variedade de compostos antimicrobianos é enorme, incluindo bacteriocinas, ácidos orgânicos e sais associados, óleos essenciais, polímeros, enzimas e outros compostos químicos sintéticos e naturais [49], havendo uma clara tendência para a procura e uso de compostos antimicrobianos de origem natural [14], [50].

Outras tecnologias não térmicas como a tecnologia de fagos, processamento a altas pressões, aplicação de campos elétricos pulsados e tecnologia de plasma frio também têm sido investigadas para controlo de contaminações microbianas em carnes [49].

## 2.3 Embalagens ativas

O embalamento de produtos cárneos é essencial para assegurar que esses produtos chegam ao consumidor com um nível de qualidade, segurança e conveniência que satisfaça as exigências dos consumidores [12]. O envolvimento de alimentos com uma embalagem tem como primeiro objetivo proteger de danos mecânicos e/ou funcionar como barreira física a contaminações físicas, químicas e microbiológicas [14] provenientes do ambiente externo, ou seja, exercendo funções passivas. As embalagens ativas são embalagens que, para além das suas funções passivas, desempenham uma função ativa na conservação dos alimentos embalados [12], [45], controlando os mecanismos de deterioração ou até melhorando as suas qualidades (por exemplo, sensorial ou nutricional) ao longo do tempo de embalamento. Normalmente, as condições a que os produtos alimentares estão sujeitos no transporte e ao nível do retalho estão fora do controlo direto dos fabricantes e muitas vezes fogem das especificações [43] e, neste sentido, comparativamente às embalagens tradicionais passivas, as embalagens ativas podem assegurar melhor que esses produtos cheguem aos consumidores com a qualidade e segurança adequada.

Os sistemas de embalamento concebidos para manipular o ambiente gasoso à volta dos produtos, têm sido bastante eficazes no retardamento das contaminações microbianas e no aumento do “tempo de prateleira” de carnes [49]. Dentro destes sistemas estão incluídas as embalagens de atmosfera modificada e as embalagens a vácuo. As embalagens de atmosfera modificada tradicionais envolvem a remoção do ar da embalagem com posterior reintrodução de um ambiente gasoso com diferente composição do ar [49] o qual corresponde, normalmente, a uma mistura de dois ou três gases:  $O_2$  para aumentar a estabilidade da cor de carnes vermelhas,  $CO_2$  para inibir o crescimento microbiano e  $N_2$  para manter a forma da embalagem [12]. Este tipo de sistemas de atmosfera modificada têm de ser específicos para cada produto de modo a otimizar o seu “tempo de prateleira”, a sua qualidade sensorial e a sua segurança microbiológica [51]. As embalagens a vácuo podem ser filmes (películas) de baixa permeabilidade a gases estreitamente aplicadas à superfície do produto, sendo o seu efeito conservante resultante do ambiente anaeróbio que se cria dentro da embalagem [12].

O embalamento ativo consiste na incorporação de aditivos com alguma função ativa aos sistemas de embalamento [49], resolvendo alguns problemas associados aos sistemas de embalamento tradicionais. Quanto ao modo de atuação, estas embalagens ativas podem ser classificadas como de absorção ou captação (por exemplo, de  $O_2$ , de  $CO_2$ , de etileno, de humidade e de aromas/sabores), de libertação ou emissão (por exemplo, de  $O_2$ , de  $CO_2$ , antimicrobianos, antioxidantes, enzimas e aromas/sabores) ou de ação por contacto (em que as substâncias ativas estão imobilizadas na parte passiva da embalagem) [49], [52], [53]. Estas embalagens são constituídas por uma parte passiva, de função estrutural, e por uma componente ativa, com função ativa e podendo estar ou não incorporada na parte passiva de modo imobilizado ou não [53].

A componente ativa pode significar unicamente a substância individual ativa com função tecnológica ou então a combinação de substâncias individuais responsáveis pela função tecnológica ativa adequada [53]. Por exemplo, a componente ativa pode ser constituída pela substância ativa e por outra substância que permita a sua migração para o alimento.

As embalagens para alimentos podem tomar várias formas, que aliando-lhes as várias possibilidades de funções ativas, criam um mundo diverso de embalagens ativas, tendo como exemplo os filmes antimicrobianos.

### **2.3.1 Filmes antimicrobianos**

Uma maneira usual de controlar contaminações microbianas é a adição de compostos antimicrobianos (conservantes), por exemplo, sob a forma de *sprays*, diretamente na superfície das carnes, uma vez que essas contaminações ocorrem principalmente à superfície [45]. No entanto, essa aplicação direta leva a que uma grande parte desses compostos antimicrobianos seja neutralizada ou que ocorra uma rápida difusão para zonas onde não é necessária a sua ação [45]. O uso de filmes com compostos antimicrobianos incorporados pode ser mais eficaz neste sentido porque podem permitir a libertação prolongada desses compostos para a superfície das carnes [45], [49] ou porque podem ter ação antimicrobiana por contacto sem ser necessária a migração de compostos ativos. Assim, os filmes antimicrobianos podem ser divididos em dois tipos, aqueles que contêm um composto antimicrobiano incorporado que migra para a superfície do alimento e aqueles em que a migração de compostos não é necessária para inibirem o crescimento microbiano [12].

Os compostos/materiais de que são formados os filmes constituem a matriz filmogénica. Uma matriz filmogénica é composta por um ou mais materiais estruturais (por exemplo, polímeros), responsáveis pela estrutura física do filme, e compostos aditivos. Os aditivos são adicionados às matrizes com dois objetivos diferentes: melhorar as propriedades físicas dos filmes (propriedades mecânicas, estruturais, de manuseamento, de barreira e óticas) ou melhorar a segurança ou qualidade dos produtos alimentares envolvidos (propriedades antimicrobianas, antioxidantes, ao nível de sabores/aromas e da cor e propriedades nutricionais, ou seja, funções ativas) [13]. A incorporação de qualquer substância numa matriz filmogénica muda sempre as propriedades do filme formado, pelo que a otimização da composição da solução filmogénica é dos passos mais importantes na preparação de filmes [54]. A incorporação de compostos antimicrobianos num filme pode ser feita por incorporação direta (física) na matriz filmogénica, por revestimento de um filme pré-existente e/ou por imobilização desses compostos no material filmogénico por meio de ligações químicas (por exemplo, covalentes) [49]. Este último exemplo e/ou o uso de polímeros, como um todo ou parte de uma matriz filmogénica, inerentemente antimicrobianos, constituem os filmes em que a sua ação antimicrobiana é feita por contacto direto e não por migração de compostos.

A não ser no caso em que os compostos antimicrobianos são substâncias voláteis, sendo a sua migração feita através de uma camada de ar, os filmes antimicrobianos necessitam de estar em contacto com a superfície do alimento para conseguirem atuar. A combinação do sistema tradicional de embalagem a vácuo com o conceito de embalagem ativa, usando um filme antimicrobiano, pode ter um efeito combinado na redução de contaminações microbianas em carnes, para além de ser uma maneira conveniente de aplicação destes filmes uma vez que permite o seu contacto direto com a superfície do alimento.

### 2.3.2 Biomoléculas como matrizes estruturais de filmes

O interesse, por parte dos consumidores, em relação à saúde, nutrição e segurança dos alimentos combinado com as preocupações ambientais tem levado à crescente atenção pelas biomoléculas (lípidos, proteínas e polissacarídeos) como potenciais principais componentes de filmes alimentares [13]. Em comparação com filmes sintéticos produzidos com materiais derivados do petróleo, filmes compostos por este tipo de polímeros/macromoléculas têm propriedades mecânicas e de barreira mais fracas [15]. No entanto, o facto de, na sua maioria, serem comestíveis torna-os vantajosos na questão de migração de compostos da embalagem para o alimento que, no caso de materiais derivados do petróleo, pode representar algum risco para a saúde do consumidor [13]. Mas também, o facto de, normalmente, este tipo de compostos terem origem em fontes renováveis e abundantes para além de serem mais facilmente biodegradáveis, leva à diminuição da poluição ambiental [13]. O uso deste tipo de componentes estruturais pode ainda permitir valorizar, criando novos mercados, subprodutos da agricultura ou da indústria que possuam propriedades filmogénicas [13], [45]. Alguns filmes ou revestimentos à base de biomoléculas são bastante eficazes em termos de custos e já são, hoje em dia, bastante utilizados [55], tendo vindo a contribuir para a inovação e renovação do conceito das embalagens ativas [14].

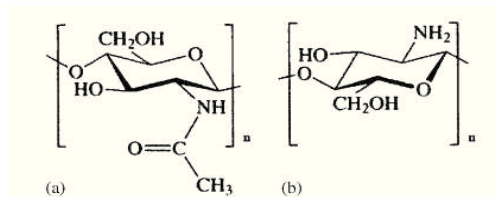
O uso deste tipo de filmes à base de biomoléculas é condicionado por diversas características como o custo, disponibilidade, atributos funcionais/ativos, propriedades mecânicas, propriedades óticas, propriedades de barreira e aceitabilidade sensorial. Essas características dependem do tipo de material usado como matriz estrutural, das condições em que os filmes são formados (por exemplo: solvente, pH, temperatura e concentração) e do tipo e concentração de aditivos [14]. A matriz estrutural pode ser constituída por proteínas e polissacarídeos (biopolímeros), lípidos ou por uma combinação de mais do que um componente estrutural de modo a tirar partido das propriedades de cada um [14]. De um modo geral, as proteínas apresentam boas propriedades mecânicas e estruturais, os lípidos apresentam boas propriedades de barreira à transferência de água (humidade) e os polissacarídeos apresentam relativamente boas propriedades mecânicas, estruturais e de barreira à transferência de moléculas gasosas ( $O_2$  e  $CO_2$ ) [13], [14], [55]. Devido às suas propriedades mecânicas e boa estabilidade estrutural, os biopolímeros (proteínas e polissacarídeos) são as biomoléculas mais amplamente investigadas para

este tipo de aplicação e, dentro destes, os polissacarídeos apresentam a vantagem de proporcionarem aos filmes uma baixa permeabilidade a gases [14]. No entanto, sendo hidrocolóides têm uma elevada permeabilidade à transferência de água [14], pelo que os alimentos envolvidos por este tipo de materiais rapidamente podem perder ou ganhar água, o que não é desejável. A adição de lípidos a estas matrizes estruturais, quer diretamente na matriz quer por revestimento de uma camada já formada (multicamada), pode resolver o problema da permeabilidade ao vapor de água, no entanto, outras propriedades como a transparência podem ser afetadas [14]. Para além disso, é necessário que se forme uma camada lipídica contínua dentro da matriz hidrocolóide ou que a camada lipídica a revestir a camada hidrocolóide não afete as propriedades mecânicas [13], [14].

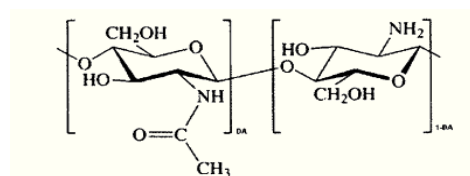
Os polissacarídeos, devido à sua baixa permeabilidade a gases e propriedades mecânicas, são potenciais biomoléculas para uso como materiais estruturais de formação de filmes antimicrobianos para o embalamento a vácuo de carne. Sendo a celulose e a quitina, os polissacarídeos mais abundantes na natureza [13], tem sentido que se façam esforços para o seu uso ou dos seus derivados neste tipo de embalagens.

### 2.3.2.1 Quitosano

O Ch é um polissacarídeo derivado da quitina, obtido por desacetilação da mesma através de hidrólise alcalina ou enzimática na presença da enzima desacetilase de quitina [56]. A quitina é um homopolissacarídeo insolúvel em água, constituído por monómeros *N*-acetil- $\beta$ -D-glucosamina (piranose) ligados entre si por ligações  $\beta(1\rightarrow4)$  (Fig. 1a), encontrado essencialmente nos exosqueletos dos artrópodes e paredes celulares de fungos, tendo uma função estrutural tal como a celulose nos tecidos vegetais [56]. As principais fontes comerciais da quitina são as indústrias alimentares que descascam camarão ou caranguejo, havendo uma valorização de um dos seus subprodutos, mas também pode ser produzida por processos fermentativos [56], [57]. A desacetilação da quitina por hidrólise alcalina ou enzimática faz com que os monómeros *N*-acetil- $\beta$ -D-glucosamina se transformem em  $\beta$ -D-glucosamina (Fig. 1b). Quando o grau de desacetilação da quitina chega perto dos 50% (dependendo da origem do polímero), torna-se solúvel em meio aquoso ácido de pH<6,0 devido à protonação do grupo  $-\text{NH}_2$  da posição C<sub>2</sub> da  $\beta$ -D-glucosamina, no entanto é necessário ter em atenção o efeito de *salting out* que ocorre numa solução iónica concentrada, como acontece por exemplo com excesso de HCl [56]. Quanto maior o grau de desacetilação (maior número de grupos  $-\text{NH}_2$ ) e a sua aleatoriedade, também mais fácil se torna a sua solubilização [56]. O polieletrólito solúvel em meio aquoso é o Ch (Fig. 2), sendo caracterizado tanto pelo seu peso molecular ou número de monómeros (tamanho do polímero) como pelo grau de desacetilação ou de acetilação (inversamente proporcionais) [56]. A quantidade de ácido necessário para a dissolução do Ch depende da quantidade e tipo de Ch a dissolver uma vez que a concentração de protões necessários tem de ser, no mínimo, igual à concentração de grupos  $-\text{NH}_2$  envolvidos [56].



**Figura 1:** Estrutura química de (a) poli(*N*-acetil-β-D-glucosamina) e (b) poli(β-D-glucosamina) [56].



**Figura 2:** Estrutura química do polímero de Ch (DA representa o grau de acetilação) [56].

O Ch tem um grande potencial de uso na indústria alimentar devido às suas propriedades físico-químicas particulares como a biodegradabilidade, biocompatibilidade com tecidos humanos, toxicidade nula e, especialmente, propriedades antifúngicas e antibacterianas [15]. As propriedades antimicrobianas inerentes fazem do Ch uma biomolécula importante para uso como material de embalagem sob a forma de filmes ativos que já têm sido usados com sucesso para a conservação de uma variedade de alimentos [58], [59]. As propriedades antimicrobianas são contra um amplo espectro de microrganismos sendo, no geral, reconhecido que os fungos filamentosos e leveduras são os mais suscetíveis, seguidos pelas bactérias Gram-positivas e, depois, pelas bactérias Gram-negativas [16]. Embora os mecanismos exatos da ação antimicrobiana do Ch não sejam totalmente conhecidos são propostos três modelos que, provavelmente, ocorrem simultaneamente mas com diferentes intensidades dependendo das situações: interação eletrostática entre o Ch e a parede celular dos microrganismos, destabilizando-a; inibição da síntese de mRNA e proteica através da penetração do Ch no núcleo ou citoplasma dos microrganismos e interação com o DNA; formação de uma barreira externa, quelatando metais e suprimindo a disponibilidade de nutrientes essenciais para o crescimento microbiano [60].

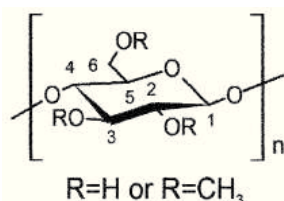
Diferentes moléculas de Ch, estados físicos e condições levam a modos de atuação distintos. Por exemplo, moléculas de baixo peso molecular em solução ou nanopartículas ultrafinas podem penetrar na parede celular dos microrganismos e combinarem-se com o DNA, inibindo a transcrição, mas moléculas de alto peso molecular em solução ou no estado sólido (por exemplo, filmes) interagem com a superfície celular, verificando-se que neste caso a atividade antimicrobiana é normalmente mais eficaz em solução [61].

Os filmes de Ch são facilmente preparados por evaporação de soluções ácidas do polímero (normalmente em ácido acético) e a estrutura linear do polímero leva a que os filmes resultantes sejam duros, algo flexíveis e transparentes, com uma superfície lisa, sem poros ou ranhuras [15], [16]. Sendo o Ch um polissacarídeo, os filmes

resultantes possuem boas propriedades de barreira a gases mas não ao vapor de água.

### 2.3.2.2 Metilcelulose

A MC é o polímero derivado da celulose, mais simples, em que grupos metil (-CH<sub>3</sub>) ligados por uma ligação éter substituem os grupos hidroxilo (-OH) nas posições C2, C3 e/ou C6 dos monómeros β-D-glucopiranosose ligados por ligações β(1→4) [19] (Fig. 3). Os polímeros de celulose possuem função estrutural originando estruturas rígidas [19]. A configuração linear resultante dos monómeros de D-glucose ligados por ligações β(1→4) com ligações de hidrogénio intramoleculares e as ligações de hidrogénio intermoleculares tornam a celulose altamente agregada e com regiões cristalinas altamente ordenadas que resultam na sua insolubilidade em água [19]. A metilação de alguns grupos hidroxilo das moléculas de glucose faz com que haja uma redução no estabelecimento de ligações de hidrogénio e com que os restantes grupos hidroxilo estejam mais suscetíveis à solvatação pela água, resultando num polímero anfifílico (uma parte polar e hidrofílica devido aos grupos -OH e uma parte apolar e hidrofóbica devido aos grupos -CH<sub>3</sub>) que pode ser dissolvido em água, em solventes orgânicos ou numa mistura dos dois [19]. Como os grupos hidroxilo conferem a solubilidade em água, um grau de substituição (metilação) demasiado elevado e/ou não uniforme não é vantajoso para a solubilidade em água da MC, sendo que é normalmente aceite que polímeros de MC com um grau de substituição entre 1,3 e 2,5 são solúveis em água ou em mistura de solventes como água/etanol e com um grau de substituição superior a 2,5 são solúveis em solventes orgânicos [19]. Assim, os polímeros de MC são caracterizados tanto pelo seu peso molecular (ou viscosidade de uma solução aquosa a 2% m/m a 20<sup>o</sup>) como pelo seu grau de substituição [19].



**Figura 3:** Estrutura química da MC (n: número de monómeros) [19].

Soluções aquosas de MC permitem a preparação de filmes flexíveis, transparentes e com boas propriedades de barreira ao oxigénio, a lípidos e também a radiações na zona do ultravioleta e da luz visível [18], [19]. As soluções aquosas são estáveis a uma gama ampla de pH (3-11), no entanto têm a particularidade de formar um gel termoreversível quando aquecidas a uma temperatura de aproximadamente 30<sup>o</sup>C devido a um forte aumento da sua viscosidade resultante do aumento das interações hidrofóbicas [19]. O facto de a MC ser um polímero não iónico faz com que, normalmente, seja possível a mistura com outros polímeros e o facto de ser anfifílico permite funcionar como ligante e estabilizante em muitos tipos de sistemas como, por exemplo, espumas, emulsões, lipossomas e dispersões sólidas [19]. Tal como a

celulose, é não tóxica, não alergénica e não digerível para humanos, sendo até uma fibra interessante para a dieta.

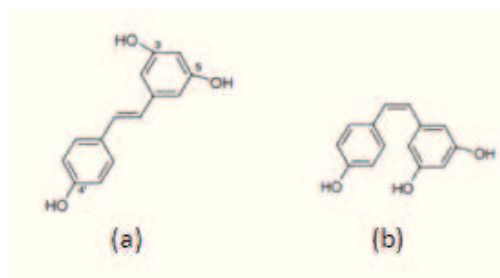
A MC é compatível com o Ch e, conjuntamente com ele, formam filmes com propriedades físicas (solubilidade e propriedades mecânicas) intermédias comparados com os filmes de cada polímero isolado, por um lado melhorando a solubilidade dos filmes de MC e por outro melhorando a flexibilidade dos filmes de Ch [17], [18]. No entanto, segundo Pinotti *et al.* [18] as propriedades de barreira ao vapor de água não diferem significativamente entre os filmes compósitos de Ch e MC e os filmes de cada material.

### 2.3.3 Resveratrol como substância ativa

A exigência, por parte dos consumidores, por alimentos livres de conservantes químicos sintéticos tem levado a indústria a procurar antimicrobianos de ocorrência natural uma vez que representam um menor risco na perceção dos consumidores [62], [63].

As fitoalexinas são compostos de baixo peso molecular produzidos por plantas em resposta a infeções, apresentando atividade biológica contra um amplo espetro de patogéneos humanos e vegetais [64]. O RV é uma fitoalexina natural encontrada em uvas e produtos derivados, vinho, amendoins, arandos, morangos e algumas outras fontes vegetais [6], [7]. O RV é bastante promissor para uso como conservante natural uma vez que apresenta várias propriedades benéficas para a saúde humana como antioxidante, anti-inflamatória, antidiabética, analgésica, cardio-protetora e neuro-protetora [7], [8], para além de ter atividade antimicrobiana contra bactérias, leveduras e fungos filamentosos e ainda capacidade para inibir alguns fatores de virulência das bactérias [6], [9]. Para além da atividade antimicrobiana, as propriedades antioxidantes do RV podem trazer um efeito adicional à conservação de alimentos, especialmente de carne em que um dos mecanismos de deterioração, para além da contaminação microbiana, é a oxidação lipídica. Quando consumido, o RV é absorvido e é rapidamente metabolizado e excretado na urina, parecendo ser bem suportado pelo organismo humano e não havendo relatos de toxicidade significativa [65]. Sendo um estilbeno monomérico, a sua estrutura química é caracterizada por dois anéis de benzeno ligados por uma ponte de etileno que faz com que possa existir na forma *trans*- (E) ou *cis*- (Z) (Fig. 4), das quais o isómero *trans*- é a configuração mais comum e pensa-se ser também a mais ativa biologicamente [21], [66], [67].

Apesar do facto de o mecanismo exato de ação antibacteriana do RV não estar, ainda, completamente elucidado, pensa-se que está relacionado com a inibição da divisão celular e conseqüentemente da multiplicação celular, funcionando mais como bacteriostático [64], embora efeitos bactericidas já tenham sido relatados para *Campylobacter* spp. e *Arcobacter* spp. dependendo da concentração e tempo de atuação [9], [10]. Os seus efeitos são diferentes dependendo do microrganismo e estirpe envolvida e o seu efeito é maior contra bactérias Gram-positivas [64].



**Figura 4:** Estrutura química de (a) *trans-RV* e (b) *cis-RV*. Adaptado de [65].

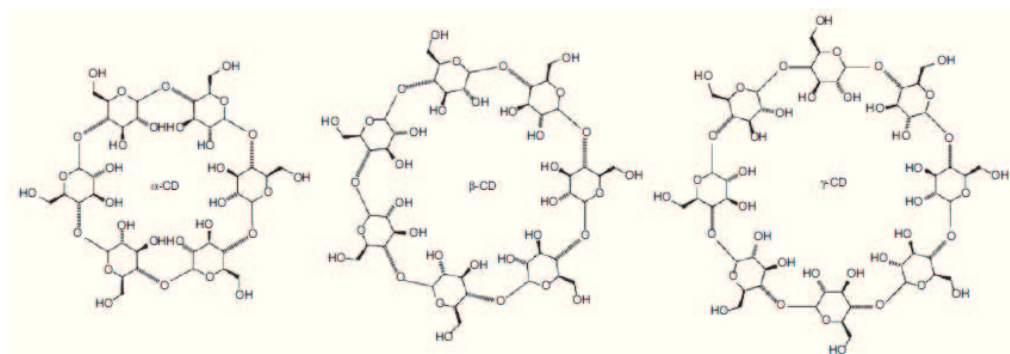
A ação antimicrobiana do RV já foi demonstrada contra *Campylobacter* spp. e *Arcobacter* spp. em vários estudos com MICs de 50 ou 100 µg/mL, avaliadas pelo método de microdiluição [9], [10], [11], parecendo ser mais suscetíveis que outras bactérias patogênicas Gram-negativas (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella typhimurium*, *Pseudomonas aeruginosa*), as quais conseguiram crescer a uma concentração de 400 µg/mL [64]. Segundo Ferreira *et al.* [9], a atividade antimicrobiana do RV pode resultar de uma ação combinada sobre vários alvos celulares, como a inibição da síntese do DNA e a diminuição da atividade metabólica, que podem afetar a divisão celular e levar à morte e lise celular, e não de uma única perturbação direta da membrana. Os mesmos autores observaram ainda que células em crescimento exponencial são mais suscetíveis do que células em estado estacionário, o que corrobora ainda mais a ideia de que o RV tem efeito sob o ciclo celular, e que as bombas de efluxo contribuem para a resistência de *Arcobacter* spp. em relação ao RV [9], fortalecendo a ideia já existente de que esses sistemas são responsáveis pela resistência das bactérias Gram-negativas em relação a este composto [68], [69]. Também foi observada a destruição e/ou desagregação de biofilmes preformados de estirpes dos dois gêneros [10].

A bioatividade do RV permanece ainda um problema devido à sua baixa biodisponibilidade resultante da baixa estabilidade a fatores externos como o ar, a luz e enzimas oxidativas e resultante ainda da baixa solubilidade em meio aquoso [21]. Pastor *et al.* [20] incorporaram o RV em filmes de Ch e de MC, tendo verificado a existência de atividade antioxidante mas não antimicrobiana, o que, segundo os autores, pode resultar da baixa afinidade química e solubilidade do RV com o meio de cultura aquoso.

Lu *et al.* [70] mostraram que a complexação do RV com ciclodextrinas tem bastante potencial uma vez que aumentou a solubilidade do RV em meio aquoso. Os mesmos autores verificaram igualmente um aumento da sua estabilidade e bioatividade, uma vez que foi mantida a sua atividade antioxidante.

Ciclodextrinas são oligossacarídeos cíclicos derivados do amido com seis ( $\alpha$ ), sete ( $\beta$ ), oito ( $\gamma$ ) ou mais unidades de  $\alpha$ -D-glicopiranosose ligadas por ligações  $\alpha(1\rightarrow4)$  [71] (Fig. 5). Estas tomam uma estrutura troncocônica com uma cavidade interior hidrofóbica e uma cavidade exterior hidrofílica, tendo a capacidade de interagir e formar complexos de inclusão com várias moléculas orgânicas, inorgânicas, biológicas e farmacêuticas através de interações não covalentes, tanto em solução como no

estado sólido [72], [73]. Devido ao facto de possuírem toxicidade negligenciável e serem farmacologicamente inativas, as ciclodextrinas já têm sido usadas no desenvolvimento de sistemas de embalagem ativo de libertação controlada [74]. De modo a ultrapassar a solubilidade limitada das ciclodextrinas nativas, têm sido sintetizadas ciclodextrinas modificadas através da substituição dos grupos hidroxilo (-OH) por outros grupos funcionais resultando, por exemplo, em hidroxipropil-ciclodextrinas (HP-CD) ou ciclodextrinas aleatoriamente metiladas (RM-CD) com solubilidade aumentada em meio aquoso [11], [21] e toxicidade diminuída [75].



**Figura 5:** Estrutura química de  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ -ciclodextrinas. [76]

Silva *et al.* [21] estudaram a solubilidade e estabilidade de complexos entre estilbenos (incluindo o RV) e ciclodextrinas (HP- $\beta$ -CD e HP- $\gamma$ -CD) ou ácidos biliares que formam sistemas micelares. O aumento da solubilidade dos estilbenos foi conseguido em maior extensão com as ciclodextrinas e foi observado que ambas as ciclodextrinas formam complexos de inclusão com o RV numa estequiometria de 1:1 [21]. Os autores observaram uma maior interação dos estilbenos com a HP- $\gamma$ -CD o que pode ser devido ao facto de a substituição das ciclodextrinas com grupos hidroxipropil poder resultar num impedimento estérico à volta das moléculas hóspedes, tornando a sua entrada na cavidade hidrofóbica mais difícil, no entanto, e uma vez que a HP- $\gamma$ -CD tem uma cavidade mais larga, pode minimizar esse impedimento estérico [21]. Também observaram que os prótons mais envolvidos na interação do RV com ambas as ciclodextrinas são os da ligação dupla da ponte de etileno e os mais próximos, sugerindo que seja essa parte que esteja dentro da cavidade deixando os grupos hidroxilo do RV nas extremidades, em contacto com o meio hidrofílico [21].

No geral, a complexação permitiu aumentar a fotoestabilização do RV, em termos de isomerização *cis*→*trans*, o que pode ser devido à interação mais forte da ligação dupla da ponte de etileno com o interior das ciclodextrinas bloqueando, em alguma extensão, a conversão [21]. Este é um facto importante pois pensa-se que a conformação *trans* seja mais bioativa que a *cis* [21]. Duarte *et al.* [10] testaram o complexo HP- $\gamma$ -CD com RV contra um isolado de *C. jejuni*, um isolado de *C. coli* e dois isolados de *A. butzleri* mostrando atividade antimicrobiana, no entanto, menor e mais lenta quando comparada com a do composto isolado. Esta observação pode significar uma libertação mais controlada e um efeito mais prolongado do composto ativo

quando incorporado numa embalagem alimentar, tornando este complexo um bom candidato a sistemas de embalagem de libertação controlada [10]. No mesmo estudo, *Arcobacter* spp. mostraram maior suscetibilidade tanto ao RV como ao complexo e também foi demonstrada a capacidade do complexo de inclusão conseguir destruir e/ou desintegrar biofilmes preformados pelas quatro estirpes estudadas [10].

### 2.3.4 Enquadramento legislativo

No desenvolvimento das embalagens alimentares tradicionais o objetivo principal, em termos de segurança dos géneros alimentícios embalados para o consumidor, tem sido uso de materiais de contacto alimentar o mais inertes possível, ou seja, que a interação entre as embalagens e os alimentos seja mínima [77]. No entanto, foram sendo desenvolvidas embalagens ativas e inteligentes que se baseiam numa deliberada interação com os alimentos [77] fazendo com fosse necessário criar-se, ao nível da UE, legislação que consolidasse todos os tipos de embalagens.

O regulamento (CE) nº 1935/2004 relativo aos materiais e objetos destinados a entrar em contacto com os alimentos, tem como objetivo “(...) garantir o funcionamento eficaz interno no que respeita à colocação no mercado comunitário de materiais e objetos destinados a entrar direta ou indiretamente em contacto com os alimentos, construindo simultaneamente a base para garantir um elevado nível de proteção da saúde humana e dos interesses dos consumidores” [78], estabelecendo, no seu artigo 3º, requisitos gerais para qualquer material ou objeto destinado a entrar em contacto com os alimentos e, no seu artigo 4º, requisitos específicos gerais para os materiais e objetos ativos e inteligentes. O regulamento incentiva, ainda, a criação de medidas específicas por grupos de materiais e objetos constantes no seu Anexo I onde, para a importância do presente trabalho, se podem destacar o grupo 1 (Materiais e objetos ativos e inteligentes) e o grupo 10 (plásticos). Entre outras medidas, estabelece também os requisitos e procedimentos gerais para a autorização de substâncias (formação de listas comunitárias) e considerações acerca da rotulagem.

Com base no regulamento (CE) nº1935/2004, foram criados, entre outros, o regulamento (CE) nº 450/2009, relativo aos materiais e objetos ativos e inteligentes destinados a entrar em contacto com os alimentos (grupo 1 do regulamento (CE) nº1935/2004, Anexo I), e o regulamento (CE) nº 10/2011, relativo aos materiais e objetos de matéria plástica destinados a entrar em contacto com os alimentos (grupo 10 do regulamento (CE) nº 1935/2004, Anexo I). Assim, no que diz respeito a embalagens de plástico ativas, a parte passiva da embalagem fica abrangida pelo regulamento (CE) nº 10/2011 e a componente ativa pelo regulamento (CE) nº 450/2009.

O regulamento (CE) nº 450/2009 “(...) estabelece os requisitos específicos para a comercialização de materiais e objetos ativos e inteligentes destinados a entrar em contacto com alimentos” [79] estipulando que esses materiais e objetos devem ser

eficazes e adequados para o uso pretendido e obedecerem aos requisitos do regulamento (CE) nº 1935/2004 e aos requisitos de composição, rotulagem e declaração estabelecidos no próprio regulamento. No que diz respeito aos requisitos de composição, nas componentes de embalagens ativas só podem ser usadas substâncias incluídas na lista comunitária de substâncias autorizadas para esse efeito. No entanto, até ao momento, essa lista não se encontra feita, mas, em derrogação do requisito anterior, podem ser usadas substâncias ativas para libertação ou para imobilização se usadas de acordo com as disposições comunitárias e nacionais pertinentes aplicáveis aos alimentos, como o regulamento (CE) nº 1333/2008 relativo aos aditivos alimentares, o regulamento (CE) nº 1334/2008 relativo aos aromas e a determinados ingredientes alimentares com propriedades aromatizantes utilizados nos e sobre os géneros alimentícios e o regulamento (CE) nº 1332/2008 relativo às enzimas alimentares. Segundo o Anexo I do regulamento (CE) nº 1333/2008 são consideradas as seguintes classes de aditivos pertinentes para o presente trabalho:

Classe 3. “Conservantes: substâncias que prolongam o prazo de conservação dos géneros alimentícios protegendo-os contra a deterioração causada por microrganismos e/ou contra o desenvolvimento de microrganismos patogénicos” [80];

Classe 5. “Agentes de transporte: substâncias utilizadas para dissolver, diluir, dispersar ou de outro modo modificar fisicamente um aditivo alimentar (...) sem alterar a sua função (e sem que elas próprias exerçam quaisquer efeitos tecnológicos), a fim de facilitar o respetivo manuseamento, aplicação ou utilização” [80].

Tanto o RV como a HP- $\gamma$ -CD que se inserem na definição de, respetivamente, conservante e agente de transporte não estão presentes na lista comunitária de aditivos alimentares autorizados pelo que para serem usados como a componente ativa de uma embalagem ativa (filme antimicrobiano) têm de ser primeiro autorizados e incluídos na lista.

O regulamento (CE) nº 10/2011 tem por objetivo estabelecer requisitos específicos para os materiais e objetos de matéria plástica de contacto alimentar. Como plástico ou matéria plástica o regulamento define “polímero ao qual podem ter sido adicionados aditivos ou outras substâncias, que pode constituir o componente estrutural principal de materiais e objetos finais”[81] e como polímero define “qualquer substância macromolecular obtida através de: a) Um processo de polimerização (...); ou b) Modificação química de macromoléculas naturais ou sintéticas; ou c) Fermentação microbiana”[81]. O regulamento estabelece que estes materiais e objetos têm de cumprir os requisitos do regulamento (CE) nº 1935/2004, serem fabricados de acordo com boas práticas de fabrico como consta no regulamento (CE) nº 2023/2006 e cumprirem os requisitos de composição estabelecidos pelo próprio regulamento. No que diz respeito aos requisitos de composição, no fabrico dos materiais e objetos em causa só podem ser usadas as substâncias incluídas na lista da União das substâncias autorizadas para o efeito

(Anexo I do regulamento). Esta lista não menciona os próprios polímeros mas os respetivos monómeros e outras substâncias iniciadoras (por exemplo, cadeias laterais para modificação de polímeros) bem como aditivos (por exemplo, plastificantes como o glicerol) e adjuvantes de polimerização (excluindo os solventes) que permitam produzir o plástico final. Os solventes, não estando na lista, segundo o regulamento, podem ser usados no fabrico de materiais e objetos plásticos nos termos de legislações nacionais, no entanto o regulamento também supõe que “os solventes utilizados no fabrico de plásticos para criar um ambiente de reação adequado sejam removidos durante o processo de fabrico dado que, geralmente, se trata de substâncias voláteis”[81]. De um modo lógico, poder-se-á concluir que se as substâncias usadas como solventes estiverem autorizadas na lista como adjuvantes de polimerização, que segundo o regulamento têm a definição de “(...) qualquer substância utilizada para proporcionar um meio adequado para o fabrico de polímeros ou de plásticos; pode estar presente no material ou objeto final mas não se destina nem a estar presente nem a exercer qualquer efeito físico ou químico nesse material ou objeto;”[81], poderão ser usadas como solventes, ou seja, meio de preparação dos plásticos. O regulamento estabelece ainda que os materiais e objetos plásticos têm de obedecer a limites de migração específicos para cada substância constituinte e ao limite de migração global, especificando esses limites e regras de avaliação dos mesmos, bem como outras restrições e especificações aplicáveis às substâncias constituintes autorizadas. Tanto o regulamento (CE) nº 450/2009 como o regulamento (CE) nº 10/2011 clarificam que as substâncias ativas de libertação incorporadas nos materiais e objetos plásticos de contacto alimentar, devido à sua natureza tecnológica, não têm de respeitar os limites de migração específica nem podem ser contabilizadas na avaliação do limite de migração global da embalagem.

Segundo o regulamento (CE) nº 10/2011 a MC (número de referência CEE do material de embalagem: 66240) está autorizada como aditivo ou adjuvante de polimerização mas não está autorizada como polímero estrutural (monómero ou outra substância iniciadora ou macromolécula obtida por fermentação microbiana) e o Ch nem sequer aparece na lista não estando, portanto, permitido ser usado na produção de plásticos de contacto alimentar.

Como visto anteriormente, na preparação de soluções filmogénicas é usual dissolver o Ch numa solução aquosa de ácido acético e a MC em água. Tanto a água como ácido acético constam na lista da União do regulamento (CE) nº 10/2011 com os números de referência CEE do material de embalagem, respetivamente, 26360/95855 e 10090/30000 podendo ser usados como qualquer tipo de substância inclusive adjuvantes de polimerização. A água, por sua vez, tem uma especificação/restrrição de que tem de estar em conformidade com a diretiva 98/83/CE relativa à qualidade da água destinada ao consumo humano.

## 2.4 Avaliação das propriedades dos filmes

### 2.4.1 Propriedades mecânicas

As informações acerca das propriedades mecânicas de plásticos ajudam a otimizar formulações e processos bem como servir como objeto de controlo de qualidade na sua produção [82]. Tal como os plásticos sintéticos os materiais compostos por biomoléculas (bioplásticos) também podem ser analisados quanto às suas propriedades mecânicas usando os mesmos métodos.

Os testes mais frequentemente realizados para avaliar as propriedades mecânicas podem dividir-se em testes de tração, flexão, compressão e corte [82].

A resistência mecânica de um material pode ser caracterizada, em primeiro lugar, em termos da direção da indução da deformação numa amostra quando lhe é aplicada uma carga/força (ou seja, tipo de tensão: tração, compressão, flexão e corte) e, em segundo lugar, em termos da velocidade a que essa força é aplicada, ou seja, a velocidade de teste (isto porque neste tipo de testes estáticos a máquina de teste vai aplicando cada vez mais força para que ocorra deformação) [82]. Para que se consigam comparar materiais, é necessário que os testes sejam realizados todos nas mesmas condições (por exemplo, velocidade de teste e forma da amostra), sendo a única variável o material [82]. Assim, para que as propriedades mecânicas de diferentes materiais possam ser comparadas os testes têm de ser realizados de igual forma, recorrendo-se usualmente a normas específicas. Ao longo de um teste mecânico, as máquinas de teste vão gravando os valores de força aplicada e de deformação da amostra permitindo construir gráficos, os quais podem ser interpretados para avaliar as propriedades (parâmetros) e comportamento mecânicos dos materiais.

As propriedades de tração, sozinhas, são as mais importantes na determinação da resistência mecânica de um material [82]. A ASTM D882-02: “*Standard test method for tensile properties of thin plastic sheeting*” descreve um método normalizado para avaliação das propriedades mecânicas de tração de películas de plástico, ou seja, filmes. Num teste de tração em filmes, amostras em forma de tiras são agarradas nas suas extremidades e “puxadas” para alongarem a uma determinada velocidade até ao seu ponto de rutura [83]. Durante o teste de tração é construído, pelo *software* da máquina de teste, um gráfico de força aplicada (em Newton, N, ou kilograma-força, kgf) *versus* separação dos agarradores da máquina (em unidades de comprimento, por exemplo, mm) [83]. Este gráfico obtido pode ser, posteriormente, transformado num gráfico de tensão *versus* deformação do material que possui uma forma idêntica [84]. A força é transformada em tensão dividindo-a pela área de secção transversal da amostra e a deformação é calculada dividindo o aumento da distância entre os agarradores pela distância inicial entre eles, não tendo unidades mas podendo ser representada em percentagem [83]. À medida que o material se vai deformando a sua área de secção transversal diminui (devido à diminuição da espessura da amostra e, numa fase final, eventualmente da largura da amostra), o que normalmente não é

contabilizado para o cálculo da tensão aplicada [84]. Às curvas dos gráficos tensão *versus* deformação em que não se considera variações na espessura das amostras chamam-se *Engineering curves* [84]. Qualquer um dos gráficos, equivalentes, pode ser usado para interpretação do comportamento e propriedades (parâmetros) mecânicos da amostra em teste.

Quando um material sólido é sujeito a pequenas forças ou tensões de tração as ligações entre os átomos são esticadas e quando essas forças ou tensões são removidas as ligações entre os átomos relaxam e o material retoma a sua forma original [84]. Esta deformação reversível é chamada de deformação elástica [84]. Para tensões ou forças maiores, planos de átomos deslizam uns sobre os outros e a deformação causada, que não é reversível, é chamada de deformação plástica [84]. Para a maioria dos materiais, existe uma região linear inicial nas curvas obtidas nos testes de tração (curva de tração) [84], na qual existe uma proporcionalidade entre a deformação da amostra e a tensão aplicada (lei de Hooke) que resulta do facto de estar só presente a deformação elástica [82]. O declive desta região inicial linear das curvas de tensão *versus* deformação é o parâmetro chamado módulo de elasticidade ou de Young (EM: *Elastic Modulus*) [84], calculando-se através da divisão de uma tensão escolhida nessa região linear pela deformação correspondente [83]. A partir do momento em que a curva de tração deixa de ser linear é quando começa a deformação plástica e, a partir desse momento, a deformação total da amostra ao longo do teste é resultado da contribuição dos dois tipos de deformação: elástica e plástica [84].

A resistência, ductilidade e comportamento elástico dos materiais são as propriedades mecânicas mais importantes e comuns de avaliar quando se realizam testes de tração [84], [85] que podem ser avaliados, respetivamente, pelos parâmetros: tensão máxima de tração (TS: *Tensile Strength*), percentagem de alongamento na rutura (E%: *Percent of Elongation at Break*) e EM. A TS corresponde ao valor máximo de tensão aplicado ao material durante o teste e a E% ao valor da deformação, em percentagem, quando ocorre a rutura da amostra [84].

#### 2.4.2 Permeabilidade ao vapor de água

Filmes à base de polissacarídeos possuem fracas propriedades de barreira ao vapor de água, ou seja, são bastante permeáveis à sua transferência, o que é uma desvantagem para o embalamento de alimentos [14]. Esta propriedade, torna-se, portanto, muito importante na seleção de formulações filmogénicas envolvendo este tipo de filmes.

A ASTM E96-95 “*Standard Test Methods for Water Vapor Transmission of Materials*” estabelece métodos normalizados para determinação da transmissão de vapor de água dos materiais como, por exemplo, filmes plásticos [86]. A norma estabelece dois tipos de métodos (“*Dessicant Method*” e “*Water Method*”) ambos com possibilidade de variação, devendo-se escolher o método que mais se aproxime das condições reais de uso do material, tendo em conta que resultados obtidos por

diferentes métodos podem não ser concordantes e, portanto, não devem ser comparados [86].

O sistema de teste é composto por pratos de teste, câmara de teste e balança. Os pratos de teste podem assumir qualquer formato e devem ser de uma material não corrosível e impermeável à água, sendo desejável um material de baixo peso [86]. No fundo dos pratos de teste é colocada água destilada ou uma solução salina que produza alta humidade à superfície (“*Water Method*”) e a parte de cima do prato (o bocal) é coberto pela amostra [86]. As áreas cobertas pela solução salina ou água destilada e pela amostra (área de teste) devem ser iguais e a amostra deve ser colocada no prato de teste de uma forma que não permita fugas para além da área de teste [86], usando um selante adequado. A câmara de teste é uma cabine com humidade relativa (HR) e temperatura (T) controladas e registadas ao longo do tempo de teste e com circulação de ar a uma velocidade que permita a manutenção das condições de T e HR homogéneas [86]. Os pratos de teste são colocados na câmara de teste e a sua pesagem ao longo do tempo (balança analítica) permite o cálculo da transferência de vapor de água [86].

Com os dados obtidos, constrói-se um gráfico de perda de peso (em mg) vs tempo decorrido (em min) para cada sistema, dos quais o declive representa a velocidade de transferência de vapor de água (em mg/min) que pode ser transformado em mol/s. No entanto, antes de retirar o declive é necessário efetuar uma análise de regressão ( $R^2 > 0,998$ ) para assegurar que os sistemas se encontram em estado estacionário e, sendo necessário, exclui-se a parte inicial do gráfico em que os sistemas ainda não se encontram em estado estacionário. A velocidade dividida pela área de teste resulta no fluxo de transferência de vapor de água (WVTR, em mol/s.m<sup>2</sup>), equação (1).

$$WVTR \text{ (mol/s.m}^2\text{)} = \frac{\text{declive (mol/s)}}{\text{Área de teste (m}^2\text{)}} \quad (1)$$

Segundo McHugh *et al.* [87] o método de determinação da permeabilidade ao vapor de água (WVP) da norma ASTM E96 não é o indicado para filmes muito hidrofílicos, como os de base polissacarídica ou proteica. Segundo os autores, o método ASTM assume que as resistências à transferência de massa nas fases gasosas dos dois lados do sistema são negligenciáveis [87]. Isso é verdade na parte exterior do sistema desde que seja induzida uma convecção adequada (ventoinha) mas, no entanto, podem ocorrer grandes erros devido ao gradiente de pressão parcial na camada de ar estagnada entre o filme (amostra) e a solução salina dentro do prato de teste quando a resistência dos filmes à passagem do vapor é pequena [87]. Os autores propõem um método de cálculo de WVP que passa por determinar e usar a pressão de vapor à superfície interna do filme (pressão parcial corrigida) e não usar a pressão parcial de vapor à superfície da solução salina para o cálculo de WVP [87].

Assim, tendo por base o método clássico para cálculo da difusão do vapor de água através do ar, calcula-se a pressão parcial corrigida (pressão parcial de vapor à superfície interna do filme) segundo a equação (2) [87].

$$WVTR = \frac{P \times D \times \ln \left[ \frac{P - p_2}{P - p_1} \right]}{R \times T \times \Delta z} \Leftrightarrow p_2 = P - (P - p_1) \times e^{\left[ \frac{WVTR \times R \times T \times \Delta z}{P \times D} \right]} \quad (2)$$

Sendo:

P: Pressão total, atmosférica (100000 Pa);

D: Difusividade do vapor de água no ar (em m<sup>2</sup>/s), dependente da pressão e T. Na pressão atmosférica é calculada pela fórmula [88]:

$$D = k_1 \times T^{k_2}$$

$$k_1 = 0,187 \times 10^{-9} \text{ m}^2/\text{s} \cdot \text{K}$$

$$k_2 = 2,072;$$

R: Constante dos gases ideais (8,314 J/K.mol);

T: Média da T absoluta medida experimentalmente (em K);

$\Delta z$ : Média da altura da camada de ar estagnado, que no presente ensaio se considerou constante;

$p_1$ : Pressão de vapor parcial à superfície da solução salina (em Pa):

$$p_1 = a_w \times P_w$$

$a_w$ : Atividade da água de uma solução saturada de NaCl (0,7531)

$P_w$ : Pressão de vapor da água pura (em Pa):

$$P_w = e^{\left[ 23,2 - \frac{3816,4}{T - 46,1} \right]}$$

A permeância ao vapor de água (em g/Pa.s.m<sup>2</sup>), cujo cálculo se encontra representado na equação (3), é uma medida de performance e representa a velocidade temporal (taxa) da transferência de vapor de água através da unidade de área do material plano, induzida por uma diferença de pressão de vapor unitária entre duas superfícies específicas sob condições de HR e T específicas, sendo portanto dependente da espessura e não representando uma propriedade intrínseca dos materiais [86]. A multiplicação da permeância pela espessura do material resulta na WVP (em g/Pa.s.m) que já é uma propriedade intrínseca dos materiais, representando a taxa de transferência de vapor de água através da unidade de área do material plano e por unidade de espessura, sendo calculada através da aplicação da equação (4) [86].

$$\text{permeância (g/Pa.s.m}^2) = \frac{WVTR \text{ (g/s.m}^2)}{p_2 \text{ (Pa)} - p_3 \text{ (Pa)}} \quad (3)$$

$p_3$ : Pressão parcial de vapor de água (em Pa) na superfície exterior do filme, isto é, no exsiccador uma vez existindo uma convecção adequada. Calculada por.

$$HR = \frac{p_3}{P_w} \times 100 \Leftrightarrow p_3 = \frac{HR \times P_w}{100}$$

Em que HR (em %) é medida experimentalmente.

$$WVP \text{ (g/Pa.s.m)} =$$

$$= \text{permeância (g/Pa.s.m}^2) \times \text{espessura média (m)} \quad (4)$$

Embora a WVP seja uma propriedade intrínseca de materiais ideais, o mesmo não é verdade para materiais muito hidrofílicos, como polissacarídeos e proteínas, com grandes permeabilidades, isto porque o aumento da espessura dos filmes compostas

por estes materiais resulta num aumento da resistência à transferência de massa através deles e conseqüentemente, a pressão parcial de vapor de água na superfície interna do filme no equilíbrio (estado estacionário) também aumenta, o que faz com que aumente a força motriz para a transferência de vapor de água através do filme [87]. Em termos gráficos, a permeabilidade varia linear e positivamente com a espessura do filme e exponencial e positivamente com a humidade relativa na superfície interior do filme [87]. Assim, para comparar valores de WVP obtidos pelo mesmo método, os filmes necessitam de ter espessuras semelhantes, caso contrário, unicamente se podem comparar valores de performance de filmes específicos e não do material de que são feitos.

### 2.4.3 Propriedades antimicrobianas

Os métodos que têm vindo a ser mais usados para avaliação da atividade antimicrobiana *in vitro* de filmes são os testes: de difusão em agar com discos dos filmes, de contagem da população microbiana de placas de meio cultura sólido inoculadas e em contacto com os filmes e de inoculação na superfície dos filmes [89].

Os testes de difusão em agar consistem em aplicar um disco de filme antimicrobiano num meio sólido inoculado e medir o diâmetro da zona circular onde não ocorre crescimento (zona de inibição) depois de incubação da placa num determinado tempo e em determinadas condições [89]. Este teste é usado para avaliar a disponibilidade do composto ativo de se difundir para o meio de cultura e exercer atividade antimicrobiana [89]. As desvantagens do teste são que só demonstra a atividade antimicrobiana do filme para um tempo pré-determinado [89] e que não é adequado para a avaliação de filmes antimicrobianos de contacto, ou seja, em que o composto antimicrobiano está imobilizado na matriz filmogénica ou em que o filme é constituído por moléculas estruturais inerentemente antimicrobianas. Nestes testes é necessário ter em conta que a difusão do composto ativo para e no meio de cultura é influenciada pelas características químicas e físicas do composto e do filme [89], isto é, dos componentes da matriz filmogénica.

A contagem da população microbiana numa placa de meio de cultura sólido inoculado e coberto com o filme é um teste útil para simular o revestimento de alimentos sugerindo o que pode acontecer quando o filme entra em contacto com uma superfície contaminada, permitindo a contagem da população microbiana em vários tempos de incubação [89]. No entanto, este teste parece não ser adequado para diferenciar a atividade antimicrobiana de filmes de ação por contacto ou por migração de compostos.

O teste de inoculação da superfície de um filme consiste na contagem da população microbiana inoculada na superfície do filme em contacto com um meio de cultura sólido [89]. Este teste é útil para prever o que acontece quando ocorrem contaminações microbianas na superfície de filmes em contacto com alimentos permitindo dar uma ideia da capacidade de barreira dos filmes para prevenir contaminações externas [89].

Em testes *in vivo*, nos quais os filmes são aplicados nos alimentos, a avaliação da sua atividade antimicrobiana é feita por contagem da população microbiana endógena e/ou inoculada durante o armazenamento [89].

### 3. Materiais e métodos

#### 3.1. Preparação do complexo de inclusão

##### 3.1.1 Soluções de trabalho

Com base no método descrito por Silva *et al.* [21], para a preparação de aproximadamente 5mL de solução de CI, pesou-se 125mg de RV (*trans*-RV, TCI Europe) para um tubo de 10mL e adicionou-se 5mL de solução aquosa de HP- $\gamma$ -CD ( $M_w=1580\text{g/mol}$ , Sigma-Aldrich) a 0,3M, misturando os componentes no vortex. O tubo foi colocado a sonicar durante 1h a 20°C e, posteriormente, num agitador orbital a 25°C e 250rpm durante 24h, tapando o orbital com proteção preta. A solução resultante foi filtrada com seringa e um filtro de 0,22 $\mu\text{m}$  para remoção de RV não complexado e, portanto, insolúvel, servindo também para esterilizar a solução. Usando as mesmas condições mas mudando as quantidades de reagentes também foram preparados volumes de 10 e 25mL.

##### 3.1.2 Estabilidade do complexo de inclusão em pH ácido

Para avaliar a estabilidade do CI em pH ácido, diluiu-se uma solução de CI (23,5mg RV/mL) em água destilada (6 > pH < 7, a mesma usada para preparar a solução de CI, funcionando como controlo) e em duas soluções de ácido acético com pH=2 e pH=3 de modo a obter-se uma concentração de aproximadamente 1mg RV/mL. Assim, a 2mL de diluente adicionou-se 88 $\mu\text{L}$  da solução de CI. A solução resultante foi deixada no frio durante um dia e depois foi filtrada (ver 3.1.1) antes da quantificação.

##### 3.1.3 Quantificação do resveratrol complexado

A quantificação foi feita, como descrito por Silva *et al.* [21], por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) (Agilent 1290 Infinity LC) com um detetor de fotodíodos (G4212A DAD, Agilent 1290 Infinity) e uma coluna analítica de fase reversa (Zorbax 300 SB-C<sub>18</sub>, 5 $\mu\text{m}$ , 4,6 x 150mm, Soquímica), com as condições da tabela 1.

**Tabela 1:** Condições cromatográficas do método HPLC-DAD, para quantificação de *trans*-RV.

<b>Caudal</b>	<b>1mL/min</b>
<b>Fase móvel (mistura v/v)</b>	48% Acetonitrilo / 52% Solução aquosa de ácido fórmico a 0,1% v/v
<b>T da coluna</b>	25°C
<b>T de injeção</b>	4°C
<b>Volume de injeção</b>	10 $\mu\text{L}$
<b>Comprimento de onda monitorizado</b>	306nm
<b>Tempo de retenção do RV</b>	Aproximadamente 1,8min
<b>Tempo de corrida</b>	3min

As soluções-padrão, usadas para a construção da reta de calibração foram preparadas de acordo com a tabela 2, para um volume final de 500µL, a partir de duas soluções de trabalho, uma de 100µg RV/mL em metanol absoluto (Solução 1) e de 10µg RV/mL em metanol absoluto (Solução 2), ambas preparadas a partir de uma solução *stock* de 1mg RV/mL em metanol absoluto.

**Tabela 2:** Preparação das soluções-padrão, usadas na construção da reta de calibração, a partir das soluções de trabalho 1 (100µg RV/mL) e 2 (10µg RV/mL), com diluição em fase móvel (48% Acetonitrilo / 52% Solução aquosa de ácido fórmico a 0,1% v/v).

<b>Padrões (concentração de RV, µg/mL)</b>	<b>V<sub>solução 1</sub> (µL)</b>	<b>V<sub>solução 2</sub> (µL)</b>	<b>V<sub>fase móvel</sub> (µL)</b>
1	-	50	450
2,5	-	125	375
5	-	250	250
10	-	500	0
25	125	-	375
50	250	-	250
70	350	-	150
100	500	-	0

A reta de calibração foi construída fazendo um gráfico da área do pico obtido pelo leitor UV a aproximadamente 1,8 min de cada padrão com a concentração de RV correspondente. A reta de calibração, segundo os autores, assume uma regressão linear com um fator de peso  $1/x^2$ , ou seja, adota a forma de  $y = m \frac{1}{x^2} + b$ , em que x é a variável dependente e corresponde à área do pico obtido pelo leitor UV [21].

Para quantificar o RV complexado em cada uma das soluções de CI preparadas, foram retiradas duas alíquotas e realizada uma diluição de 1:500 em fase móvel e para os testes de estabilidade em pH ácido foi realizada uma diluição de 1:20, de modo que as concentrações estivessem dentro do intervalo de valores da curva de calibração. Nos resultados obtidos contabilizaram-se os fatores de diluição (1:500 e 1:20) de modo a obter a concentração real de RV complexado.

### 3.2 Preparação dos filmes

As soluções filmogénicas de Ch (peso molecular médio e 75-85% desacetilação, *Sigma-Aldrich*) e MC (viscosidade de 4000cP, *Sigma-Aldrich*) foram preparadas, em separado, a 1% m/m com uma solução aquosa de ácido acético de 0,25% v/v previamente preparada. As soluções foram homogeneizadas por agitação magnética durante, pelo menos, 1h até se notar uma dispersão completa. As soluções de Ch foram, ainda, a agitar, durante 24h, num banho termostaticado (*Grant OLS200*) a 30°C e 60shaking/min para promover ainda mais a solubilização e depois filtrada, com aplicação de vácuo, com um filtro de vidro de granulidade G2 para remover impurezas. Depois de preparadas, as soluções foram colocadas no frigorífico (4-10°C) até uso.

Os filmes simples de Ch e MC foram preparados, vertendo 33g de solução filmogénica de polímero (ou mistura de polímeros) para placas de Petri de poliestireno (*Glosselin*) niveladas com 8,7cm de diâmetro, de modo a obter uma densidade de polímero de 56g/m<sup>2</sup> [20]. Os filmes de mistura física de 50% m/m dos dois polímeros (Ch/MC) e/ou com CI (RV + HP- $\gamma$ -CD) ou só com HP- $\gamma$ -CD foram preparadas de acordo com a tabela 3, pesando para um tubo de Falcon 33g totais de solução filmogénica (no caso de Ch/MC, 16,5g de cada uma das soluções filmogénicas), adicionando os aditivos necessários, agitando os tubos fortemente com a mão e, depois, vertendo a mistura filmogénica para as placas de Petri. Todas as placas foram deixadas um dia no frigorífico (4-10°C) para facilitar a remoção das bolhas de ar. Finalmente, as placas foram colocadas abertas numa câmara fechada (escura) com ventilação forçada a 25-30°C para secagem dos filmes.

**Tabela 3:** Composição das soluções filmogénicas de matriz Ch e Ch/MC usadas para a preparação dos filmes correspondentes.

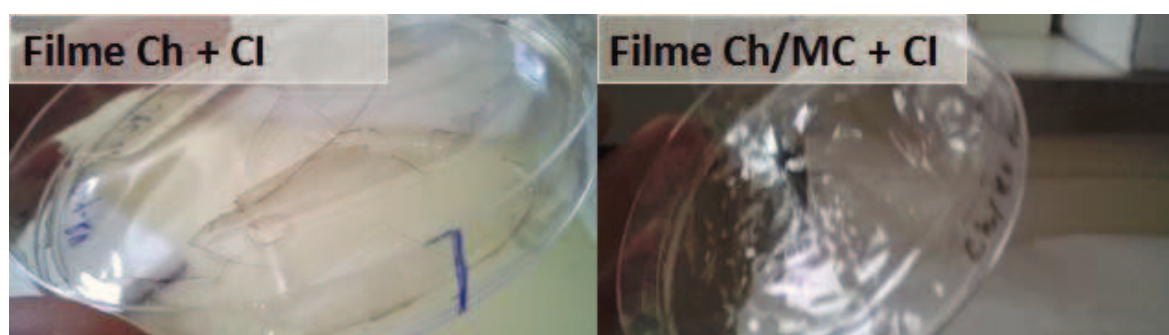
Matriz	Filme	Solução de Ch (g)	Solução de MC (g)	Solução de CI ou de CD (mL)	Glicerol (mL)
Ch	Simples	33	-	-	-
	2,5mL CI	33	-	2,5	0,25
	4,5mL CI	33	-	4,5	0,45
	2,5mL CD	33	-	2,5	0,25
	4,5mL CD	33	-	4,5	0,45
Ch/MC	Simples	16,5	16,5	-	-
	2,5mL CI	16,5	16,5	2,5	0,25
	4,5mL CI	16,5	16,5	4,5	0,45
	4,5mL CD	16,5	16,5	4,5	0,45

### 3.2.1 Quantidade de componente ativo

Duarte *et al.* [10] avaliaram a atividade antimicrobiana do CI de RV com HP- $\gamma$ -CD em dois isolados de *Campylobacter* spp. e dois isolados de *A. butzleri*, obtendo o MIC, pelo método de microdiluição, mais elevado de 256 $\mu$ g/mL para um dos isolados dos dois géneros. Considerando a incorporação de 250 $\mu$ g de CI num disco de filme de 6mm, ou seja, uma área de filme de 0,28cm<sup>2</sup>, num filme preparado numa placa de Petri de 8,7cm de diâmetro, ou seja, com uma área de 59,45cm<sup>2</sup>, terão de ser incorporados 53,229mg de CI. Considerando a concentração das soluções de CI de 23,21mg/mL, o volume de solução de CI necessário de incorporar na solução filmogénica é 2,29mL, tendo sido aproximado a 2,5mL. Um volume de 4,5mL também foi incorporado nas formulações filmogénicas com o objetivo de observar o efeito de uma maior quantidade de CI nos discos de filme.

### 3.2.2 Adição de glicerol

Em ensaios prévios observou-se que a adição de solução de CI ou HP- $\gamma$ -CD às soluções filmogénicas resultava em filmes muito duros e quebradiços (Fig. 6), pelo que se testou três quantidades de glicerol (5, 10 e 15% relativamente ao volume adicionado de solução de CI adicionada). A adição de glicerol a filmes de Ch com HP- $\beta$ -CD é descrita por Higuera *et al.* [85]. Como a HP- $\gamma$ -CD e, possivelmente, o CI são os responsáveis pela propriedade, a quantidade de glicerol adicionado à mistura filmogénica é ajustada à quantidade de solução de CI ou de HP- $\gamma$ -CD adicionada. De entre os três, os filmes com 5% de glicerol ainda se encontravam quebradiços e os que tinham 15% apresentavam-se demasiado maleáveis e até pegajosos, pelo que foi escolhida a quantidade de glicerol a 10% em relação ao volume adicionado de solução de CI. O facto de o glicerol ser aceite pela UE como aditivo de materiais e objetos de matéria plástica destinados a entrar em contacto com os alimentos (MCA nº103) [81], viabiliza o seu uso em filmes ativos destinados a entrar em contacto com os alimentos.



**Figura 6:** Filmes quebradiços de Ch e Ch/MC com 2,5mL de solução de CI adicionados às soluções filmogénicas, obtidos em ensaios preliminares (filmes com solução de HP- $\gamma$ -CD apresentaram-se muito semelhantes).

## 3.3 Avaliação das propriedades dos filmes

### 3.3.1 Propriedades antimicrobianas

#### 3.3.1.1 Estirpes bacterianas

As estirpes *Campylobacter jejuni* ATCC 33560, *Campylobacter coli* ATCC 33559, *Arcobacter butzleri* LMG 10828 e *Arcobacter butzleri* LMG 6620 foram conservadas a  $-80^{\circ}\text{C}$  em Tryptic Soy Broth (*Merk KGaA*) com 15% v/v de glicerol (*VWR chemicals*). Tendo por base o método descrito por Duarte *et al.* [10] e Ferreira *et al.* [9], as culturas de trabalho foram preparadas por inoculação das estirpes em Columbia Agar Base (*Oxoid*) com 5% v/v de sangue de cavalo desfibrinado (*Oxoid*) e colocadas a incubar a  $37^{\circ}\text{C}$  por dois dias em microaerofilia, colocando-as numa jarra (6 placas por jarra) com um gerador de microaerofilia *CampyGen<sup>TM</sup>2,5L* (*Thermo Scientific*).

### 3.3.1.2 Teste de difusão em agar

Tal como descrito por Pintado *et al.* [90], [91] foram cortados discos de 6mm dos filme de Ch e Ch/MC simples, com 2,5 ou 4,5mL de CI ou com 4,5mL de CD para testar, em placa, a sua atividade antimicrobiana. Os filmes simples e com HP- $\gamma$ -CD foram usados como controlo. Para isso fez-se um molde, em papel, para colocar as placas de Petri e com os discos de 6mm desenhados. Como a placa e os filmes são transparentes, conseguindo-se ver as marcas no papel, recortou-se o filme pelas marcas dos discos com um bisturi esterilizado. Os discos foram guardados numa placa de Petri esterilizada e colocados no congelador até uso, de modo a conservar o CI e a facilitar a maneabilidade. O trabalho de corte foi todo realizado numa câmara de fluxo laminar.

Para cada uma das culturas de trabalho, foram preparadas suspensões diretas em soro fisiológico (solução aquosa de NaCl a 0,85% m/v), acertadas a uma turbidez de 0,5 da escala de McFarland (*bioMérieux*), aproximadamente  $1,5 \times 10^8$ UFC/mL. A inoculação, realizada pelo método descrito na norma CLSI-M02-A11 [92], foi feita em meio Muller-Hinton Agar (*Merck KGaA*) suplementado com 5% v/v de sangue de cavalo desfibrinado (*Oxoid*) [93]. Os discos de filme, testados em triplicado para cada estirpe, foram colocados sobre as placas inoculadas. Os oito discos de filme diferentes foram colocados numa mesma placa inoculada, intercalando os discos de filme com CI. As placas inoculadas e com os discos de filme foram colocadas a incubar a 37°C, por dois dias e em condições de microaerofilia. Ao final dos dois dias de incubação foram medidos os diâmetros das zonas de inibição.

Usando o mesmo método, foram colocados, sobre o meio inoculado com *C. jejuni* ATCC 33560, discos de papel impregnados com 12 $\mu$ L de duas soluções de CI com concentrações de, respetivamente, 21,08mg/mL e 27,97mg/mL e de uma solução de HP- $\gamma$ -CD a 0,3M (a mesma usada na preparação do CI), em duplicado.

### 3.3.2 Propriedades mecânicas

Foram avaliadas as propriedades de tração de filmes de Ch e Ch/MC simples (controlo) ou com 2,5mL de CI, de glicerol de acordo com a norma ASTM D882-02 [83] mas com algumas modificações.

Tiras de 1cm de largura e 6cm de comprimento foram cortadas do mesmo modo que os discos para os ensaios antimicrobianos, mudando apenas as marcas no molde, e colocadas numa placa de Petri vazia. De seguida, essas placas foram colocadas abertas durante, pelo menos, dois dias num exsiccador, devidamente selado com vaselina, com uma solução saturada de nitrato de magnésio hexahidratado (*Applichem*  $\boxtimes$  *Panreac*) no fundo, permitindo criar uma atmosfera com HR de 50 $\pm$ 5% e T de 25°C. O exsiccador foi colocado numa sala com temperatura de 25 $\pm$ 2°C. Antes dos testes mecânicos a espessura das tiras foi medida em três posições diferentes usando um micrómetro digital (*0-200mm Digital Caliper*). No total foram analisadas 10 tiras (amostras) de cada formulação filmogénica.

Para a avaliação das propriedades mecânicas foi usada uma máquina de teste *TA-XTplus (Stable Micro Systems)* equipada com agarradores de tração (modelo A/TG). As tiras de filme foram montadas nos agarradores com uma separação inicial entre eles de 3cm e o teste foi feito por separação dos agarradores a uma velocidade de 50mm/min até à rutura das tiras. Ao longo do teste, o software *Texture Exponent 32* conectado com a máquina de teste foi construindo um gráfico de força de tração aplicada pela máquina *versus* distância de separação dos agarradores (em mm). Para cada tira obteve-se um gráfico do qual foram obtidos os valores necessários para calcular os parâmetros TS, E% e EM.

O gráfico de cada amostra dá a informação da força máxima de tração aplicada. A tensão é uma pressão e, como tal, corresponde à aplicação de uma força por unidade de área. Sabendo a espessura das tiras e a sua largura, calcula-se a área da secção transversal e sendo essa secção a superfície em que é aplicada a força de tração, para calcular a TS basta dividir a força máxima por essa área. A equação (5) representa a fórmula para o cálculo da TS (em MPa), sendo F a força máxima de tração (em N), h a espessura da tira (em mm) e L a largura da tira (em mm):

$$TS = \frac{F}{h \times L} \quad (5)$$

A E% é calculada em relação ao comprimento inicial da amostra. De acordo com a equação (6), as variáveis  $C_f$  e  $C_i$  são, respetivamente, a distância entre os agarradores aquando a rutura e o comprimento inicial da tira.

$$E\% = \frac{C_f - C_i}{C_i} \times 100 \quad (6)$$

Do gráfico força (em N) vs distância entre os agarradores (em mm) obtido para cada amostra, obtém-se o declive da região linear em N/mm. Primeiro transforma-se a força (F) em tensão ( $\sigma$ ) pela mesma forma que na equação (5). De seguida transforma-se a distância percorrida pelos agarradores com a aplicação dessa tensão, 1 mm, em deformação (d), que representa a mudança de comprimento, por unidade de comprimento inicial ( $C_i$ ), pela equação (7).

$$d = \frac{(C_i + 1 \text{ mm}) - C_i}{C_i} \quad (7)$$

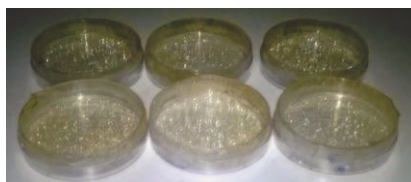
Em que  $(C_i+1)$  corresponde ao  $C_f$  da fórmula apresentada anteriormente para o alongamento na rutura. Assim, calcula-se o EM (em MPa) dividindo a tensão ( $\sigma$ , em MPa) pela deformação (d) através da equação (8).

$$EM = \frac{\sigma}{d} \quad (8)$$

### 3.3.3 Permeabilidade ao vapor de água

Foram avaliadas as propriedades de permeabilidade ao vapor de água de filmes de Ch e Ch/MC com 2,5mL de CI de acordo com a norma ASTM E96-95 [86].

De cada formulação, três filmes circulares e com 7cm de diâmetro foram cortados, com um bisturi, medidos quanto à espessura em três locais aleatórios e colocados por cima de uma placa de Petri pequena (5,3cm diâmetro interior) com 9mL de solução saturada de NaCl no fundo (8,5mm de altura da camada de ar estagnado). O filme sobrando foi colado às paredes exteriores da placa e, nessa parte, foi coberto com vaselina e parafilme (Fig. 7). No final de cada prato de teste estar montado, foram pesados numa balança analítica e colocados dentro de um exsicador com uma solução de nitrato de magnésio hexahidratado no fundo e com uma ventoinha pendurada pela tampa (Fig. 8). Depois de estarem os seis pratos de teste dentro do exsicador, o mesmo foi fechado com um medidor de HR e T no interior e quando ligada a ventoinha começou-se a contar o tempo. Os pratos de teste foram pesados em intervalos de 90min durante 10h e 30min de teste. O tempo foi parado quando se desligou a ventoinha, para retirar os pratos de teste do exsicador e pesá-los, e recomeçado quando se voltou a ligar a ventoinha. A T e HR foram registadas antes de se desligar a ventoinha em cada pesagem.



**Figura 7:** Pratos de teste para avaliação da transferência ao vapor de água: filmes montados nas placas de Petri de 5,3cm de diâmetro com uma solução saturada de NaCl no fundo.



**Figura 8:** Exsicador fechado (1) com solução de nitrato de magnésio hexahidratado no fundo (2), pratos de teste (3) e medidor de T e HR (4) no tabuleiro e ventoinha (5) no topo, presa na tampa.

### 3.3.4 Teor de humidade

Três pedaços de filmes de Ch e Ch/MC com 2,5mL de CI foram cortados, com um bisturi, e colocados dentro de um exsiccador com uma solução de nitrato de magnésio hexahidratado no fundo ( $50 \pm 5\%$  RH) a  $25^\circ\text{C}$  durante um dia (24h). Posteriormente foram colocados e pesados numa balança analítica em cadinhos cerâmicos, previamente secos e pesados, e postos a  $115^\circ\text{C}$  durante dois dias. Ao final desse tempo pesou-se o conjunto cadinho + filme. Filmes simples de Ch, Ch/MC e MC foram testados como controlo.

A secagem a  $115^\circ\text{C}$  retira toda a água presente nos filmes, pelo que a redução de peso do filme indicará o seu conteúdo em água, isto é, o seu teor de humidade, como indica a equação (9).

$$\% \text{humidade} = \frac{m_{\text{película inicial}} - (m_{(\text{cadinho} + \text{película})\text{final}} - m_{\text{cadinho inicial}})}{m_{\text{película inicial}}} \times 100 \quad (9)$$

### 3.3.5 Ensaio antimicrobianos em carne de frango

#### 3.3.5.1 Preparação da carne

Num supermercado local, foram comprados peitos de frango acondicionados em atmosfera protetora (*Kilom, S.A., Portugal*). Os peitos de frango foram imersos, por 10 min, numa solução aquosa de 2% v/v de hipoclorito de sódio (lixívia comercial, *Javisol, Portugal*), lavados três vezes em água destilada por imersão e colocados a secar dentro de uma câmara de fluxo laminar durante cerca de 30min (até se observar que estava seca). Posteriormente, trabalhando à chama do bico de Bunsen, foram cortados 63 pedaços quadrados, com cerca de 1,5cm de espessura, com 5g de peso. Esses pedaços foram colocados em tabuleiros esterilizados fechados e colocados no frigorífico durante o tempo de espera para utilização.

#### 3.3.5.2 Inoculação da carne

Vinte e uma amostras foram deixadas não inoculadas, 21 foram inoculadas com *C. jejuni* ATCC 33560 e outras 21 foram inoculadas com *A. butzleri* LMG 6620. De cada um dos conjuntos de 21 amostras, 3 foram imediatamente analisadas quanto à carga microbiana e as restantes imediatamente embaladas após inoculação. A partir de uma diluição de 1:10 de uma suspensão a 0,5 da escala de McFarland de cada uma das culturas de trabalho (ver 3.3.1.1), em soro fisiológico, foram inoculados 2µL na superfície de cada amostra (inóculo final adicionado de aproximadamente  $6,0 \times 10^3 \text{ UFC/g}$ ).

#### 3.3.5.3 Embalamento da carne

De cada um dos conjuntos de 21 amostras de carne, 6 amostras foram embaladas com filme de Ch com 2,5mL de solução de CI e glicerol, 6 amostras com filme de HP-γ-

CD com 2,5mL de solução de HP- $\gamma$ -CD e glicerol e as outras 6 com sacos comerciais de embalagem PA/PE (poliamida/polietileno). Para o embalagem de cada amostra com filme usaram-se dois filmes de 8,7cm de diâmetro, colocando a amostra em cima de um deles e o outro filme por cima. Com os sacos, simplesmente colocou-se a carne no seu interior. A selagem foi feita em quadrado (quatro selagens) por calor de 3,5seg, com uma termoseladora (DG30 GAS, *Lavezzini*), aplicando na última selagem 60% vácuo dentro da embalagem, para permitir um embalagem justo à peça de carne. Os pedaços de carne embalados foram colocados num frigorífico fechado durante todo o tempo de teste a  $6\pm 2^{\circ}\text{C}$  e  $50\pm 5\%$  HR.

#### 3.3.5.4 Análise microbiológica da carne

Tendo por base a norma ISO 6887-2:2013 [94], a suspensão-mãe para a análise microbiológica foi preparada juntando cada amostra de 5g de carne a 45mL de *Tryptone salt Broth* (*Biokar*), num saco próprio, e levando a homogeneizar no Stomacker (*Stomacker 400 Circulator, Seward*), durante 90seg a 260rpm. Cerca de 0,1mL da suspensão-mãe e das diluições seguintes foi inoculado por espalhamento na superfície do meio *Brucella Medium Base* (*Oxoid*) com 5% v/v de sangue de cavalo desfibrinado (*Oxoid*). As placas inoculadas foram colocadas a incubar a  $37^{\circ}\text{C}$ , por dois dias, em microaerofilia.

Nove amostras de carne foram analisadas logo depois da inoculação ou preparação no caso de amostras não inoculadas. Das embaladas, metade foram analisadas passados cinco dias e a outra metade passados dez dias de teste.

#### 3.3.5.5 Avaliação do efeito da secagem da carne

Foi realizado um segundo teste, de cinco dias, com 12 pedaços de carne de peito de frango, todos inoculados com 2 $\mu\text{L}$  de uma suspensão de 0,5 da escala de McFarland de *C. jejuni* ATCC 33560 (inóculo final adicionado de aproximadamente  $6,0 \times 10^4 \text{UFC/g}$ ), seguindo os mesmos procedimentos. Três amostras foram imediatamente analisadas e as outras embaladas e colocadas no frigorífico por cinco dias. O embalagem foi realizado do mesmo modo, no entanto, os pedaços embalados com os filmes de Ch foram posteriormente embalados com os sacos PA/PE.

### 3.4 Análise estatística

A análise de variância dos resultados obtidos foi realizada através de testes t para amostras com variâncias iguais (*Microsoft Office Excel 2007*) e por ANOVA multi-factorial (*software R 3.0.3* para *Windows*) para os ensaios antimicrobianos em carne de frango, usando sempre um nível de significância ( $\alpha$ ) de 0,05 (*Outputs* nos Apêndices B-F).



## 4. Resultados e discussão

### 4.1 Concentração das soluções de trabalho

Ao longo do tempo foram preparadas e quantificadas várias soluções de CI, com uma concentração média de RV complexado de 23,21mg/mL e desvio-padrão de 1,96mg/mL (ver Apêndice A). Como a complexação entre a HP- $\gamma$ -CD e o RV ocorre na estequiometria de 1:1, resultando em 1mol de CI [21], a concentração de RV complexado é igual à concentração de CI formado na mesma solução em mol/mL, mas não em mg/mL. No entanto, no presente trabalho quando for referida concentração de CI, em mg/mL, é sempre correspondente à concentração de RV complexado.

Para a formação do CI são adicionados, por mililitro, 25mg de RV e, depois, a solução é filtrada para remover o RV insolúvel não complexado, pelo que será de esperar que a concentração do CI em todas as soluções preparadas seja, no máximo, próxima de 25mg/mL. De facto, todas as soluções preparadas tiveram uma concentração inferior a 25mg/mL, exceto uma com 27,97mg/mL (08/04/2015) que só pode ser explicada pelo erro associado ao próprio método de quantificação. Silva *et al.* [21] obtiveram uma solubilização máxima do RV com a mesma ciclodextrina de  $22,76 \pm 0,64$ mg/mL, sendo concordante com os valores obtidos.

Em 1mL de solução de CI dissolveu-se 25mg de RV, ou seja,  $1,017 \times 10^{-4}$ mol de RV (Massa molar=228,23g/mol) com  $3 \times 10^{-4}$ mol de HP- $\gamma$ -CD (concentração=0,3M). Como a estequiometria de formação de CI é de 1:1, significa que a HP- $\gamma$ -CD está numa quantidade, no mínimo, três vezes superior à envolvida na complexação. Portanto, numa solução de CI existe HP- $\gamma$ -CD livre numa maior quantidade que a HP- $\gamma$ -CD envolvida na formação do CI.

### 4.2 Estabilidade do complexo de inclusão

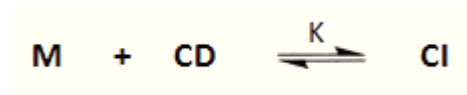
Sendo objetivo do trabalho incorporar o CI num filme de Ch e/ou de MC, uma maneira de o fazer é por incorporação direta nas soluções filmogénicas. No entanto as soluções filmogénicas de Ch e MC são preparadas com uma solução aquosa de ácido acético de 0,25% v/v e, portanto, são soluções ácidas e podem ter efeito na destabilização do CI ( $\text{pH}_{\text{Ch}}=5,2$ ;  $\text{pH}_{\text{Ch/MC}}=4,3$ ;  $\text{pH}_{\text{MC}}=2,8$ , pH das soluções de Ch, Ch/MC e MC a 1% m/m). Assim, adicionou-se 88 $\mu$ L de solução de CI (23,58mg/mL) a 2mL de soluções aquosas de ácido acético de pH=2 e pH=3 e de água destilada de modo a obter-se uma concentração de, aproximadamente, 1mg/mL, quantificando-se essas diluições. Os resultados obtidos encontram-se na tabela 4 e, embora não se tenha feito nenhum tratamento estatístico dos resultados por serem unicamente em duplicado, as concentrações quantificadas para as três situações parecem ser bastante similares e próximas do controlo (diluição em H<sub>2</sub>O, na qual se sabe previamente que o CI é estável) com um valor ligeiramente superior para a diluição preparada em solução de ácido acético de pH=3. Segundo Zupancic *et al.* [95] entre pH=1,2 e pH=6,8 a solubilidade do RV é a mesma e, para além disso, pHs ácidos

protegem o RV da degradação hidrolítica. A formação de CIs com ciclodextrinas é um processo em equilíbrio (Fig. 9) em que moléculas livres estão em equilíbrio com moléculas complexadas pelo que a mudança da solubilidade dessas moléculas pode perturbar esse equilíbrio e mudar a fração de moléculas complexadas [96]. Como a solubilidade do RV não é afetada entre pH neutro e ácido [95], tem sentido que a estabilidade do CI também, em princípio, não seja afetada nessa gama de pH.

**Tabela 4:** Concentração das diluições da solução de CI (23,58mg/mL) em água destilada e em soluções de ácido acético de pH=2 e pH=3 para uma concentração de aproximadamente 1mg/mL.

Diluyente	Concentração média (mg/mL)	Desvio-Padrão (mg/mL)	Coefficiente de Variação (%)
Água destilada	0,814	0,02	3,03
Ácido acético (pH=3)	0,955	0,02	2,48
Ácido acético (pH=2)	0,894	0,02	1,69

A formação de um CI em solução entre um composto e uma ciclodextrina é um processo em equilíbrio dinâmico entre a associação e dissociação do CI [97]. Esse equilíbrio está representado no esquema da figura 8 e por uma constante de associação (K) definida na equação (10). As reações direta e inversa ocorrem a velocidades muito rápidas tanto para CIs fracos como para fortes (respetivamente, baixo K ou alto K), sendo o tempo de vida da molécula hospedeira dentro da cavidade da ciclodextrina na ordem dos mili- ou micro-segundos [98].



**Figura 9:** Equilíbrio dinâmico da formação de um complexo de inclusão (CI) entre uma ciclodextrina (CD) e um composto (M), sendo K a constante de equilíbrio (constante de associação).

$$K = \frac{[CI]}{[M] \times [CD]} \quad (10)$$

Segundo Stella *et al.* [98], considerando o equilíbrio descrito pela equação (10), os balanços de massa da complexação e que as reações ocorrem instantaneamente (sem dependência do tempo), a diluição de uma solução de CI tem efeito na fração livre de molécula “hóspede” no sistema em equilíbrio, tanto para sistemas com K baixo ( $610M^{-1}$ ) como para sistemas com K elevado ( $10.000M^{-1}$ ). Os autores, hipoteticamente, consideraram uma concentração de 20mM e de 100mM para, respetivamente, o composto a complexar e ciclodextrina. Em termos molares, pela simulação matemática, os autores obtiveram complexação próxima de 100% para a situação sem diluição usando as duas constantes de associação, mas para uma diluição de 1:1000 obtiveram um valor de complexação de 5,7% e de 47,5% usando, respetivamente,  $K=610M^{-1}$  e  $K=10.000M^{-1}$ .

A constante de associação (K) obtida por Silva *et al.* [21] para o CI usado no presente trabalho foi de  $1634 M^{-1}$ . O complexo foi preparado tendo, em solução, 0,1M de RV e 0,3M de HP- $\gamma$ -CD. Como para o teste de estabilidade ao pH foi feita uma diluição em que se adicionou 88 $\mu$ L de solução de CI a 2mL de diluente aquoso (considerando um volume final de 2088 $\mu$ L), é sensato tentar perceber que efeito a diluição pode ter na fração de RV complexado e, portanto, na estabilidade do CI. Na tabela 5 está representado o balanço de massa da complexação entre o RV e a HP- $\gamma$ -CD que auxilia no cálculo da quantidade de RV complexado no equilíbrio para as situações com e sem diluição (Fig. 10).

**Tabela 5:** Balanço de massa da complexação entre o RV e a HP- $\gamma$ -CD com e sem diluição. A diluição feita por adição de 88 $\mu$ L de solução de CI a 2mL de diluente.

	RV	+	CD	$\rightleftharpoons$	CI
<b>Início</b>	0,1M		0,3M		0M
<b>Início (diluição)</b>	$4,21 \times 10^{-3}M$		$1,26 \times 10^{-2}M$		0M
<b>Variação</b>	-x		-x		+x
<b>Equilíbrio</b>	0,1-x		0,3-x		x
<b>Equilíbrio (diluição)</b>	$(4,21 \times 10^{-3})-x$		$(1,26 \times 10^{-2})-x$		x

Sem diluição:

$$K = \frac{[CI]}{[RV] \times [CD]} \Rightarrow 1634 M^{-1} = \frac{x}{(0,1 - x) M \times (0,3 - x) M} \Leftrightarrow$$

$$\Leftrightarrow x = 0,3M \vee x = 0,099M *$$

Com diluição:

$$K = \frac{[CI]}{[RV] \times [CD]} \Rightarrow 1634 M^{-1} = \frac{x}{(4,21 \times 10^{-3} - x) M \times (1,26 \times 10^{-2} - x) M} \Leftrightarrow$$

$$\Leftrightarrow x = 0,013M \vee x = 3,932 \times 10^{-3}M *$$

\*solução que tem sentido considerando que nunca pode ser superior à concentração inicial de RV.

**Figura 10:** Resolução matemática da quantidade (em M) de CI ou de RV complexado no equilíbrio para a situação sem diluição e para a situação com diluição.

Para a situação normal de preparação de CI (sem diluição), por simulação matemática, obtém-se uma complexação de cerca de 99% do RV, em termos molares, existente inicialmente, correspondendo a 22,59mg/mL de RV complexado, o que é concordante com a solubilidade máxima obtida experimentalmente por Silva *et al.* [21] de  $22,79 \pm 64$ mg/mL, o que tem sentido uma vez que a constante de associação usada (K) é a obtida pelos autores. No entanto, pela simulação matemática para o equilíbrio da diluição realizada obteve-se uma complexação de 93% do RV, em termos molares, existente nessa diluição, correspondendo a 0,897mg/mL que é bastante concordante com os valores obtidos experimentalmente (Tab. 4). Assim, demonstra-se que a diluição pode ter um papel importante na dissociação do CI, podendo explicar os valores de concentração obtidos experimentalmente para as diluições.

Na quantificação do CI, na qual é feita uma diluição total de 1:500 das soluções preparadas, essa diluição não afeta o resultado obtido porque a diluição é feita em fase móvel (Tab. 1) que é constituída por acetonitrilo, um solvente polar. Mesmo que ocorra dissociação do CI, o solvente polar consegue dissolver o RV livre pelo que é contabilizado pelo método de quantificação HPLC-DAD.

A incorporação do CI nos filmes é feita por incorporação direta em 33g de solução filmogénica e, portanto, é feita uma diluição que, como visto anteriormente, pode ter efeito na desestabilização do CI e causar dissociação de uma parte do RV complexado. Ao considerar-se um volume exagerado correspondente à solução filmogénica de 33g (40mL) e o menor volume adicionado de CI (2,5mL), consegue-se concluir que a diluição feita na incorporação do CI na matriz filmogénica é menor que a realizada nos ensaios de estabilidade ao pH e que, portanto, o efeito da incorporação na desestabilização do CI será pequeno. Esse efeito desestabilizador ainda pode ser mais atenuado pela presença de polímeros em solução, uma vez que está demonstrado que pequenas quantidades de polímeros em solução (por exemplo, a hidroxipropilmetilcelulose) conseguem aumentar significativamente a solubilidade de muitos compostos farmacêuticos através da formação de complexos solúveis em água [99] e também a eficiência de complexação desses compostos com ciclodextrinas, aumentando a constante de associação [100].

### 4.3 Caracterização dos filmes

Na preparação dos filmes de MC com CI ou com HP- $\gamma$ -CD verificou-se, em alguns casos, uma separação de fases (formação de uma “goma” insolúvel, algumas vezes reversível com diminuição da T), tanto na presença ou na ausência de glicerol, que possivelmente resulta da formação de um complexo insolúvel entre o polímero e a HP- $\gamma$ -CD livre. No entanto, não se consegue perceber qual interação pode ter com CI. Como não se conseguia formar um filme homogéneo devido à formação desse complexo insolúvel, a formulação filmogénica de 100% MC com CI foi excluída.

#### 4.3.1 Propriedades antimicrobianas

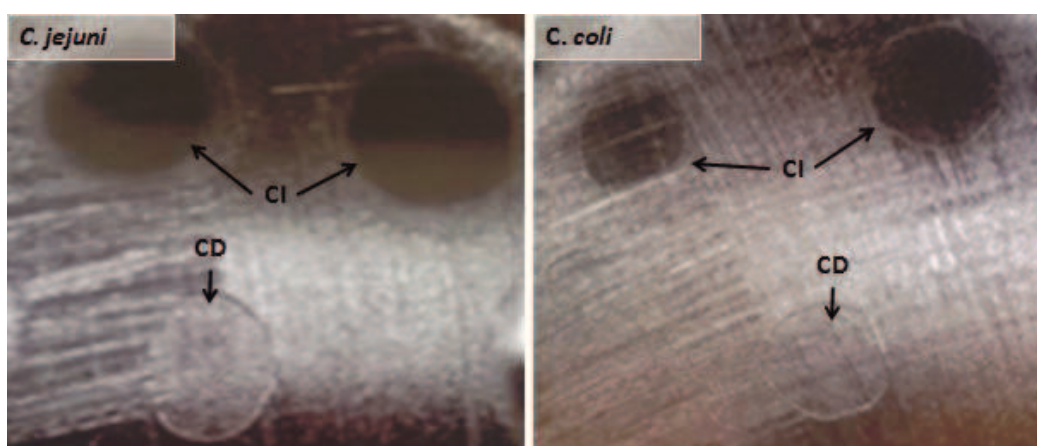
De modo a perceber que diferença, em termos de atividade antimicrobiana, podiam ter soluções de CI com diferentes concentrações, foram impregnados 12 $\mu$ L de duas soluções de CI de baixa (21,08mg/mL) e alta (27,97mg/mL) concentração em discos de papel sob uma cultura *C. jejuni* ATCC 33560 em crescimento confluyente e mediram-se os diâmetros das zonas de inibição. Os resultados encontram-se na tabela 6 e o facto de se terem obtido diâmetros de inibição iguais para a concentração mais alta e mais baixa de CI permite perceber que as diferentes concentrações podem não ser significativas para criar atividades antimicrobianas diferentes, embora não tenha sido feito nenhum tratamento estatístico pelo facto de os resultados serem só em duplicado. Também foi testado igual volume de uma solução de HP- $\gamma$ -CD a 0,3M (a mesma usada para preparação do CI) de modo a averiguar a sua atividade antimicrobiana. Como não foi observada nenhuma zona de inibição pode-se concluir

que para *C. jejuni* ATCC 33560 a HP- $\gamma$ -CD usada não tem efeito antimicrobiano e, em princípio, também não terá para as outras estirpes bacterianas, uma vez que a estirpe *C. jejuni* parece ser a estirpe mais suscetível em relação ao CI e, se realmente a HP- $\gamma$ -CD tivesse algum efeito antibacteriano dever-se-ia observar melhor para esta estirpe. Em ensaios preliminares (Fig. 11) também se observou que a HP- $\gamma$ -CD não tinha atividade antibacteriana contra *C. coli*.

**Tabela 6:** Diâmetro das zonas de inibição para *C. jejuni* ATCC 33560 com 12 $\mu$ L de duas soluções de CI com concentrações diferentes e uma solução de HP- $\gamma$ -CD 0,3M.

Tipo de solução	Concentração	Zonas de inibição (mm)	
CI 1	21,08mg/mL	14	15
CI 2	27,97mg/mL	14	15
HP- $\gamma$ -CD	0,3M	-*1	-

\*1Sem zona de inibição.



**Figura 11:** Zonas de inibição total (à esquerda) e de inibição parcial (à direita), obtidos em ensaios preliminares em que se colocou 12 $\mu$ L de solução de CI e de HP- $\gamma$ -CD diretamente na superfície de meio inoculado com *C. jejuni* ATCC 33559 e *C. coli* ATCC 33560.

Uma vez incorporado o CI nos filmes, realizaram-se ensaios antimicrobianos com os mesmos para averiguar a sua atividade antibacteriana. O efeito ativo dos filmes com CI (Tab. 7), resultados completos em Apêndice B) foi notório para *C. jejuni* ATCC 33560 e, embora em menos extensão, para *A. butzleri* LMG 6620, enquanto para *C. coli* ATCC 33559 criaram-se zonas de inibição parcial pequenas e para *A. butzleri* LMG 10828 não houve formação de zonas de inibição.

Com os filmes de Ch e Ch/MC simples ou com HP- $\gamma$ -CD não houve formação de zonas de inibição pelo que as zonas de inibição formadas com os filmes de Ch e Ch/MC com CI devem-se à atividade do RV. A formação de zonas de inibição significa que houve migração do RV da matriz polissacarídica dos filmes para o meio de cultura aquoso, possivelmente na forma de CI, tendo atividade antibacteriana. Pastor *et al.*[20] não conseguiram observar atividade antimicrobiana de filmes de MC e de Ch com RV o que, segundo os autores, possivelmente, se deve à não migração do RV resultante da sua baixa afinidade e solubilidade em meio aquoso. Nesses filmes, o RV encontrava-se livre enquanto nos filmes preparados neste trabalho encontra-se complexado numa ciclodextrina que promove um aumento da sua solubilidade e

afinidade com meio aquoso [21]. Assim o uso de ciclodextrinas possibilita a incorporação do RV, sob a forma de CIs, em sistemas de libertação controlada de compostos ativos como já era esperado por Silva *et al.* [21] e Duarte *et al.* [10], [11].

**Tabela 7:** Média dos diâmetros das zonas de inibição, resultantes da atividade dos filmes Ch e Ch/MC (0,33g polímero e 8,7cm diâmetro) sem CI, com duas quantidades (2,5mL e 4,5mL) de CI e com HP- $\gamma$ -CD (4,5mL).

Filme	Média dos diâmetros das zonas de inibição $\pm$ Desvio-Padrão (mm)			
	<i>C. jejuni</i> ATCC 33560	<i>A. butzleri</i> LMG 6620	<i>C. coli</i> ATCC 33559	<i>A. butzleri</i> LMG 10828
Ch	_*1	-	-	-
Ch + 4,5mL HP- $\gamma$ -CD	-	-	-	-
Ch + 2,5mL CI	21,7 $\pm$ 0,6 <sup>A;a;x</sup>	13,7 $\pm$ 0,1 <sup>A;a;y</sup>	IP*2	-
Ch + 4,5mL CI	23,9 $\pm$ 1,4 <sup>A;a;x</sup>	16,2 $\pm$ 0,2 <sup>B;a;y</sup>	IP	-
Ch/MC	-	-	-	-
Ch/MC + 4,5mL HP- $\gamma$ -CD	-	-	-	-
Ch/MC + 2,5mL CI	10,9 $\pm$ 0,7 <sup>A;b;x</sup>	10,4 $\pm$ 0,8 <sup>A;b;x</sup>	IP	-
Ch/MC + 4,5 mL CI	13,7 $\pm$ 0,9 <sup>A;b;x</sup>	12,7 $\pm$ 0,7 <sup>B;b;x</sup>	IP	-

\*1 Sem zona de inibição;

\*2 Pequena zona de inibição parcial;

A-B; a-b; x-y quando diferentes, significam que existe diferenças significativas entre os valores ( $\alpha=0,05$ , teste t para amostras com variância igual) em relação a, respetivamente, diferentes quantidades de IC (2,5 ml ou 4,5 ml); diferente matriz estrutural (Ch ou Ch/MC) e diferente estirpe bacteriana (*C. jejuni* ou *A. butzleri*) quando as outras variáveis são mantidas constantes.

Duarte *et al.* [11] já tinham mostrado uma grande suscetibilidade da mesma estirpe *C. jejuni* tanto ao RV (MIC=50 $\mu$ g/mL) como a um CI de RV com metil- $\beta$ -ciclodextrina (MIC=128 $\mu$ g/mL) e também a menor suscetibilidade da mesma estirpe *C. coli* ao RV, obtendo para o RV um MIC de 100 $\mu$ g/mL e nenhum MIC para o CI. Neste ensaio, o CI conseguiu pelo menos atrasar a velocidade de crescimento da estirpe *C. coli* (zonas de inibição parcial) o que é consistente e pode explicar o facto de Duarte *et al.* [11] não terem obtido nenhum MIC para o CI testado. Ferreira *et al.* [9] obtiveram, com a estirpe *A. butzleri* LMG 10828, um MIC para o RV de 100 $\mu$ g/mL, no entanto, no presente trabalho, não se conseguiram obter zonas de inibição usando o CI, o que leva a acreditar que a libertação do RV dos filmes e/ou do CI possa ser demasiado lenta para a inibição do crescimento desta estirpe. Isto porque, sabe-se que é necessário ocorrer a migração e dissociação de um composto puro de um CI para que o mesmo consiga exercer atividade antibacteriana dentro da célula bacteriana [101] e que a atividade antimicrobiana do RV possivelmente resulta de uma ação combinada em vários alvos celulares em vez de uma única perturbação direta nas membranas bacterianas [9]. Duarte *et al.* [10] testaram o mesmo CI contra *C. jejuni* 225421, *C. coli* 873, *A. butzleri* AB36/11 e *A. butzleri* INSA776, observando, para todas as estirpes, efeitos bacteriostáticos e bactericidas do CI e do RV, sendo que *C. coli* mostrou ser mais suscetível ao CI que *C. jejuni* e entre as duas estirpes de *A. butzleri* testadas houve diferenças na suscetibilidade. Assim, não se pode concluir um efeito maior ou menor do CI e do RV ao nível das espécies ou dos géneros testados. Facto este

também suportado pelo facto de se ter obtido zonas de inibição para *A. butzleri* LMG 2260.

O uso de filmes de 100% Ch resultou numa maior atividade antibacteriana para as estirpes *C. jejuni* e *A. butzleri* suscetíveis ( $\alpha=0,05$ ). A diminuição da atividade antimicrobiana pelo uso de filmes de Ch/MC é devida, em princípio, a uma menor migração do RV dessa matriz para o meio. Uma possível explicação para a menor migração do RV de filmes com MC é a formação de interações (por exemplo, hidrofóbicas) entre o polímero e a HP- $\gamma$ -CD e/ou o RV. De facto, a MC é um polímero com zonas bastante mais hidrofóbicas que o Ch e, sendo essa hidrofobicidade potenciada acima dos 30°C (T crítica de formação de um gel termoreversível de uma solução aquosa de MC) [19], os ensaios antimicrobianos realizados a 37°C podem ainda tornar essa interação mais forte. A menor migração do RV pode ser explicada por uma maior interação da HP- $\gamma$ -CD com a MC criando uma maior coesão da matriz e dificultando a migração do CI ou RV ou então uma interação direta com o CI ou com o RV diminuindo a velocidade da sua migração. O facto de na preparação da formulação de MC com CI ou HP- $\gamma$ -CD se ter criado um complexo insolúvel e nas outras não (Ch/MC e Ch), apoia a hipótese de uma interação entre a MC com a HP- $\gamma$ -CD livre da solução de CI mas também da não interação entre o Ch e HP- $\gamma$ -CD e que o Ch pode, de alguma forma, inibir a formação de complexos com a MC diminuindo a intensidade das interações. Por um lado, esta menor migração resulta numa menor atividade antibacteriana do RV mas por outro pode significar uma migração mais controlada e um efeito mais prolongado do RV.

Enquanto se pode concluir a não atividade antimicrobiana da HP- $\gamma$ -CD, devido ao facto de não se terem observado zonas de inibição com o uso de filmes de Ch e Ch/MC com um volume de 4,5mL de HP- $\gamma$ -CD, o mesmo não se pode deduzir para o efeito do Ch. O Ch é um polímero com atividade antimicrobiana bem conhecida e que pode ter efeito antimicrobiano por contacto [15], [16] e, portanto, é coerente não se observarem halos de inibição neste tipo de testes.

A incorporação da maior quantidade de CI (4,5mL) nas formulações dos filmes tinha o objetivo de potenciar a atividade antibacteriana do RV contra as bactérias mais resilientes mas, uma vez que só houve diferenças significativas para *A. butzleri* LMG 6620 ( $\alpha=0,05$ ) e de um ponto de vista de viabilidade económica, considerou-se 2,5mL a quantidade mais razoável de CI a incorporar nas formulações.

#### 4.3.2 Propriedades mecânicas

A incorporação da solução de CI ou de HP- $\gamma$ -CD nas soluções filmogénicas de Ch e Ch/MC tornava os filmes resultantes muito quebradiços e rígidos e, por isso, foi-lhes adicionado glicerol como agente plastificante num volume correspondente a 10% do volume adicionado de solução de CI, resultando filmes bastante mais flexíveis e manobráveis. Já Higuera *et al.*[85] tinham mostrado que a incorporação de HP- $\beta$ -CD num filme de Ch tinha uma E% muito baixa ( $\approx 5\%$ ) e uma TS grande ( $\approx 58$  MPa) quando comparado com filmes simples de Ch ou iguais mas com glicerol, o que,

segundo os autores, significa que a ciclodextrina usada atuava como enchimento da matriz, colocando-se nos espaços vazios, diminuindo a deformação em resposta a tensões. O mesmo se pode deduzir que aconteça com a HP- $\gamma$ -CD livre e o CI para as matrizes de Ch e de Ch/MC. O uso de glicerol permite reduzir as interações intercadeias e a coesão das matrizes e, portanto, reduzir a TS, ou seja, a sua resistência à tração e aumentar a E% [85], ou seja, a sua ductilidade.

Como se pode observar pela tabela 8 (resultados completos nos Apêndices C, D e E), os valores de TS e EM e os valores de E% obtidos para os filmes de Ch e Ch/MC com CI foram, no geral, respetivamente, bastante inferiores e superiores quando comparados com os valores obtidos com filmes de Ch e Ch/MC simples. Essa diferença é associada ao efeito plastificante do glicerol adicionado às formulações uma vez que, como observado em primeiro lugar, a adição de CI ou HP- $\gamma$ -CD às formulações resultava em filmes quebradiços e rígidos (E% baixa e TS elevado, efeito antiplastificante).

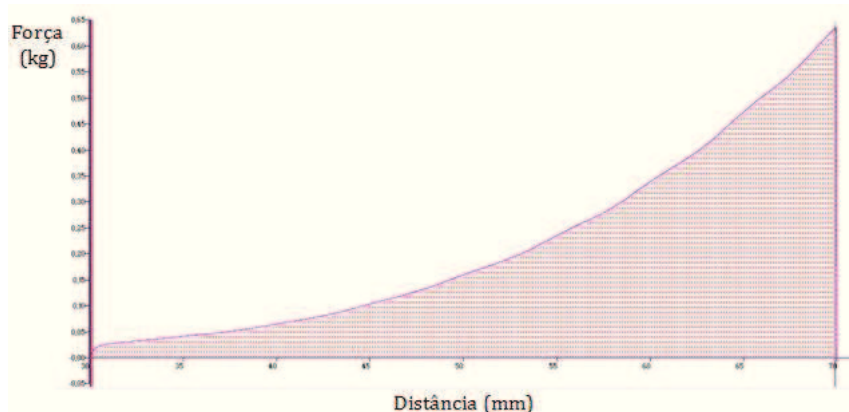
**Tabela 8:** Tensão máxima de tração (TS), percentagem de alongamento na rutura (E%), módulo de elasticidade (EM), permeabilidade ao vapor de água (WVP) e teor de humidade dos filmes de Ch e Ch/MC (0,33g polímero e 8,7cm diâmetro) com e sem 2,5mL de solução de CI e 10%, desse volume em glicerol. Os valores apresentados são a média  $\pm$  Desvio-Padrão de n (número) amostras.

Filme	Propriedades Mecânicas (n=10)			WVP (g/Pa.s.m) (n=3)	Teor de humidade (%) (n=3)
	TS (MPa)	E% (%)	EM (MPa)		
Ch + CI	2,77 $\pm$ 0,47 <sup>a</sup>	128,72 $\pm$ 8,61 <sup>a</sup>	16,98 $\pm$ 5,06 <sup>a</sup>	1,58 $\pm$ 0,08 $\times 10^{-9}$ <sup>a</sup>	15,77 $\pm$ 0,62 <sup>a</sup>
Ch/MC + CI	2,63 $\pm$ 0,29 <sup>a</sup>	58,63 $\pm$ 6,84 <sup>b</sup>	45,58 $\pm$ 8,64 <sup>b</sup>	1,54 $\pm$ 0,08 $\times 10^{-9}$ <sup>a</sup>	14,87 $\pm$ 0,31 <sup>a</sup>
Ch	45,82 $\pm$ 10,18 <sup>b</sup>	43,76 $\pm$ 6,67 <sup>c</sup>	1199,97 $\pm$ 255,69 <sup>c</sup>	-	15,15 $\pm$ 0,13 <sup>a</sup>
Ch/MC	42,15 $\pm$ 0,09 <sup>b</sup>	30,31 $\pm$ 6,82 <sup>d</sup>	1142,18 $\pm$ 203,32 <sup>c</sup>	-	11,48 $\pm$ 0,13 <sup>b</sup>

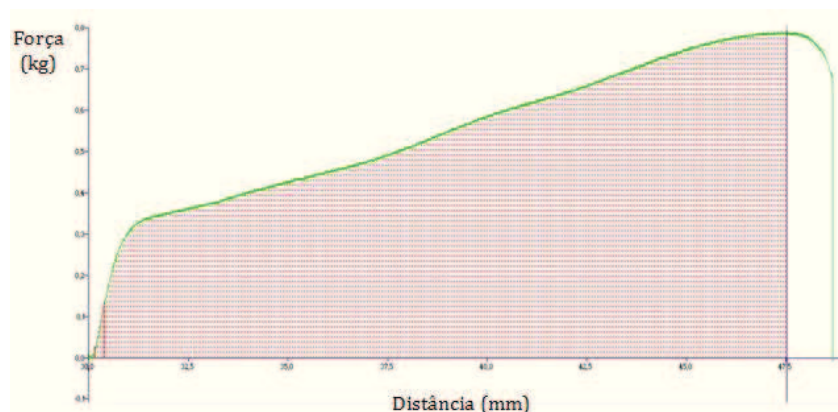
As letras a coeficiente, sendo iguais, indicam a semelhança estatística ( $\alpha=0,05$ ) dos valores, por coluna.

Os filmes de Ch e Ch/MC com CI e glicerol não tiveram diferenças significativas quanto à TS mas tiveram diferenças no EM e na E%, o que significa que o seu comportamento mecânico em resposta à tração difere. Como se pode observar pela figura 12, os filmes de Ch com CI quase só possuem uma região de deformação plástica (deformação permanente) enquanto os filmes de Ch/MC com CI possuem uma distinta região elástica (deformação não permanente) e uma região plástica (Fig. 13). Portanto, no que respeita aos filmes com CI, a matriz Ch/MC confere maior resistência à deformação elástica (maior EM) e para a mesma TS uma deformação menor (menor E%). Comparando com os filmes análogos mas sem CI observa-se um aumento de E% muito mais acentuado para a matriz de Ch ( $\approx 2x$ ) que para a matriz de Ch/MC ( $\approx 1x$ ) e uma diminuição de TS também mais acentuada para a matriz de Ch, o que significa que a presença de MC nestes filmes resulta num efeito plastificante menos acentuado do glicerol. Uma possível explicação é a ocorrência de uma maior

interação, em princípio do tipo hidrofóbica, da HP- $\gamma$ -CD livre (em excesso) e, possivelmente, do CI ou RV com a MC do que com o Ch levando a uma maior interação intercadeias, fazendo com que a TS e EM sejam superiores ao expectável e a E seja inferior à expectável. O facto de nos resultados antimicrobianos se terem obtido menores migrações do CI para os filmes de Ch/MC corrobora ainda mais essa hipótese. A interação hidrofóbica entre  $\beta$ -ciclodextrinas e a MC é relatada por Du *et al.*[102], mostrando o carácter lipofílico da MC, sendo capaz de interagir com a cavidade interior (hidrofóbica) das ciclodextrinas. Uma vez que o CI é uma HP- $\gamma$ -CD com a cavidade “ocupada”, a interação é mais provável que ocorra entre os polímeros de MC e a HP- $\gamma$ -CD livre em excesso.



**Figura 12:** Gráfico força de tração (em kgf) vs distância entre os agarradores de uma amostra de filme de Ch com CI e glicerol.



**Figura 13:** Gráfico força de tração (em kgf) vs distância entre os agarradores de uma amostra de filme de Ch/MC com CI e glicerol.

#### 4.3.3 Permeabilidade ao vapor de água e teor de humidade

Tanto os valores de WVP como o teor de humidade mostram não haver diferenças, em termos de hidroflicidade, entre os dois tipos de filme. No entanto, para os filmes simples existe diferença quanto ao teor de humidade entre as duas matrizes, sendo que a MC parece promover a diminuição da hidroflicidade. De facto, embora não seja mostrado na tabela 8, obteve-se um teor de humidade de 4% para filmes simples de MC, demonstrando maior hidrofobicidade do que os filmes de Ch. Em termos de teor

de humidade, o CI e glicerol adicionados não tiveram efeito para os filmes de Ch mas aumentaram para os filmes de Ch/MC, o que mais uma vez pode ser explicado pela interação das HP- $\gamma$ -CDs com as zonas hidrofóbicas da MC, “mascarando-as” hidrofílicamente. Outra possível explicação pode ser o efeito predominante do balanço (HP- $\gamma$ -CD e CI)/glicerol que, uma vez que estão em grande quantidade nas formulações, podem ter uma propriedade hidrofílica que se sobrepõe às propriedades dos polímeros Ch e Ch/MC. Os valores de WVP são bastante elevados, o que é muito característico de matrizes polisacarídicas (Ch, MC e ciclodextrinas), permitindo a transferência de uma grande quantidade de vapor de água. Neste caso, os valores de WVP podem ser comparados como propriedades dos materiais pois os filmes usados tinham espessuras semelhantes: 298 $\mu$ m para Ch e 278 $\mu$ m para Ch/MC.

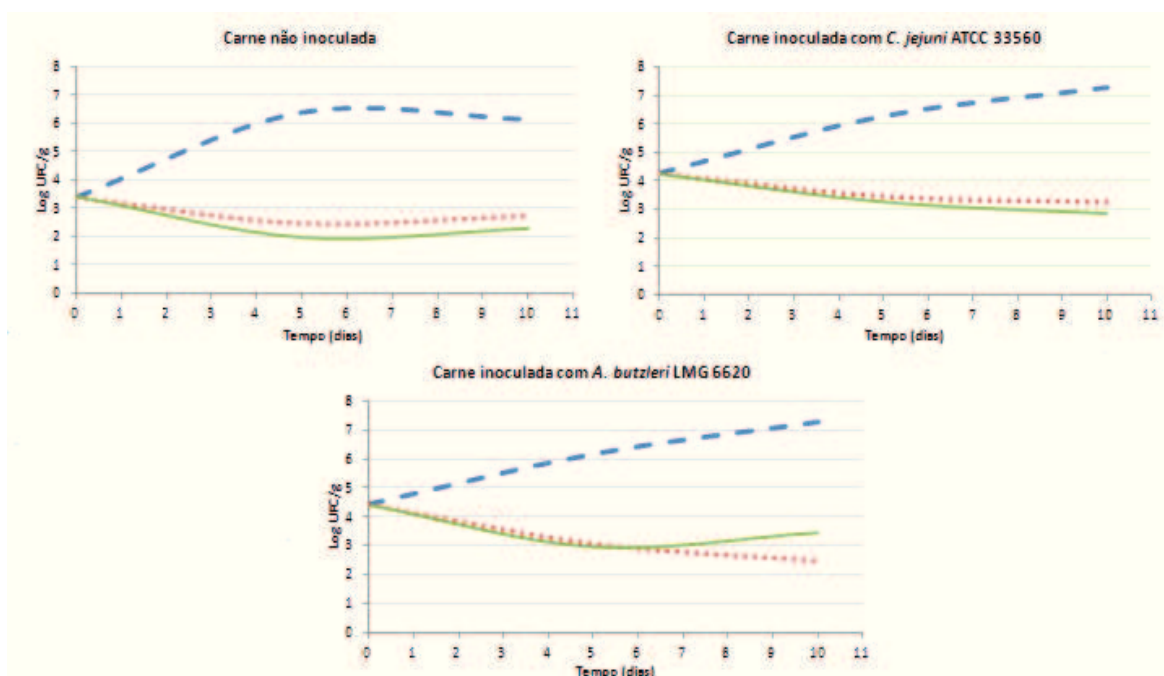
#### 4.4 Ensaio antimicrobiano em carne de frango

Nas figuras 14 e 15 encontram-se os gráficos relativos à evolução da carga microbiana microaerófila de amostras de carne de peito de frango com ou sem inoculação e com diferentes tipos de embalagem (fotografias das embalagens na figura 16). No teste correspondente à figura 14 foram comparadas amostras de carne não inoculadas com amostras inoculadas com *C. jejuni* ATCC 33560 ou *A. butzleri* LMG 6620 embaladas com sacos de PA/PE ou filmes de Ch com HP- $\gamma$ -CD como controlos ou filmes de Ch com CI, a 60% de vácuo e armazenadas em refrigeração. No teste correspondente ao gráfico da figura 15 foram testadas amostras de carne inoculadas com *C. jejuni* ATCC 33560 embaladas com sacos PA/PE ou filmes de Ch com HP- $\gamma$ -CD e saco de PA/PE como controlos ou filmes de Ch com CI e saco de PA/PE, com as mesmas condições de vácuo e de armazenamento do primeiro teste. As estirpes bacterianas e os filmes de Ch foram escolhidos pelo facto de, nos ensaios *in vitro* de difusão em agar, terem apresentado os melhores resultados de atividade antibacteriana.

Em termos de carga microbiana microaerófila inicial, no primeiro teste, as amostras inoculadas apresentaram uma carga maior que as não inoculadas. Essa adição de inóculo corresponde a uma concentração de  $6,0 \times 10^3$ UFC/g (considerando que 0,5 da escala de McFarland corresponde a  $1,5 \times 10^8$ UFC/mL, com a qual se fez uma diluição 1:10 e se inoculou 2 $\mu$ L em 5g de carne) que, ao somá-la à carga microbiana contabilizada nas amostras não inoculadas ( $2,6 \times 10^3$ UFC/g, ver Apêndice F) resulta em  $8,6 \times 10^3$ UFC/g (3,9log/g), valor bastante próximo dos obtidos para a carga microbiana inicial das amostras inoculadas com cada uma das estirpes. Em relação ao segundo teste, a carga microbiana é bastante superior quando comparada com as do primeiro ensaio, o que se deve tanto à quantidade maior de inóculo adicionado ( $6,0 \times 10^4$ UFC/g) mas também possivelmente a uma carga microbiana natural das amostras de carne ligeiramente superior.

No primeiro teste, para os três tipos de amostra (não inoculada ou inoculada com *C. jejuni* ou *A. butzleri*) observou-se um aumento da carga microbiana das amostras, ao longo do tempo, quando embaladas com sacos PA/PE e uma diminuição da carga

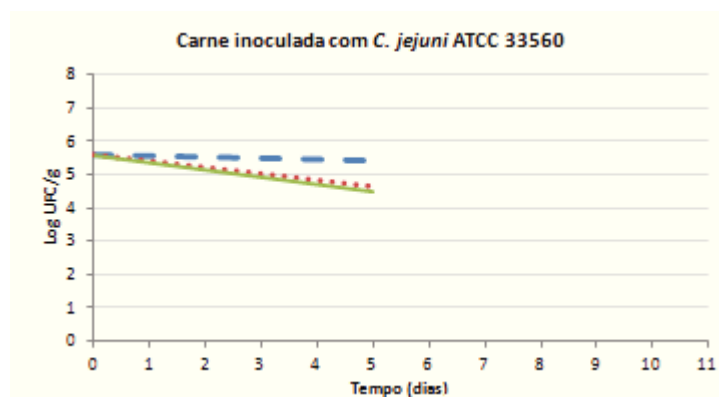
quando embaladas com os dois tipos de filme de Ch, sendo que entre os dois filmes de Ch não houve diferenças significativas. No aumento da carga microbiana (embalamento com sacos PA/PE) não se observaram diferenças significativas para os três tipos de amostra, significando que as bactérias inoculadas ou morreram, ou não cresceram ou cresceram muito pouco e, de facto, para a ordem de grandeza da carga microbiana obtida ao final de 5 e 10 dias ( $> 10^6$ UFC/g), qualquer uma das situações não criaria um efeito perceptível pois a ordem de grandeza de carga inoculada ( $< 10^4$ UFC/g) é muito inferior. No entanto, o efeito da inoculação já foi perceptível na redução da carga microbiana com os filmes de Ch, sendo a ordem de grandeza da carga microbiana final para as amostras não inoculadas de  $10^2$ UFC/g e para as amostras inoculadas de  $10^3$ UFC/g, o que significa que as estirpes *C. jejuni* e *A. butzleri* inoculadas nas amostras de carne persistiram de alguma forma e a sua carga foi reduzida possivelmente pelos filmes de Ch.



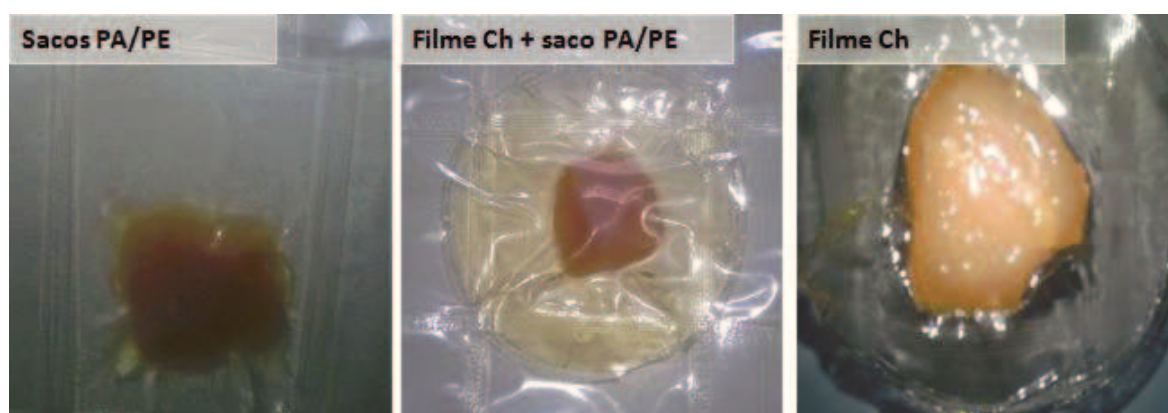
**Figura 14:** Evolução temporal (em dias) da carga microbiana microaerófila de amostras de carne de frango (UFC/g), com ou sem inoculação, embaladas a 60% de vácuo com sacos PA/PE (linha azul descontinua), filmes Ch com CI (linha verde contínua), filmes Ch com HP- $\gamma$ -CD (linha vermelha de pontos).

Embora a maioria dos estudos de pesquisa de *Campylobacter* spp. e *Arcobacter* spp. em carne de frango relatem a sobrevivência das bactérias dos dois géneros na pele das carcaças, Luber e Barlet [103] relatam a presença de *C. jejuni* e *C. coli* na superfície e no interior de peitos de frango (sem pele e osso) e Fallas-Padilla *et al.* [104] a presença de *A. butzleri* e *A. cryoaerophilus* na superfície de peitos de frango. Ambas as estirpes inoculadas são bastante fastidiosas e a flora natural, a refrigeração e/ou o vácuo podem ter efeito na inibição do seu crescimento e mesmo na redução da sua população. O facto de ambos os filmes de Ch (com HP- $\gamma$ -CD ou CI) não terem produzido diferenças significativas na redução da carga microbiana significa que

outro fator, para além do CI, causou essa redução. Ao desembalar as amostras para análise observou-se uma secagem considerável das amostras concordante com os valores elevados de WVP obtidos com os filmes de Ch com CI (Tab. 7) e que pode ter efeito na redução da carga microbiana. Outros fatores em comum dos dois tipos de filme é a presença de Ch e da HP- $\gamma$ -CD. O Ch é um polímero com propriedades antimicrobianas bastante conhecidas contra um amplo espectro de microrganismos, incluindo bactérias Gram-negativas [60] mesmo sob a forma de filmes, exercendo, neste caso, a sua atividade antimicrobiana principalmente por contacto [15], [16]. Ganan *et al.* [105] demonstraram a grande suscetibilidade de estirpes *C. jejuni* e *C. coli* ao Ch, até maior que para outros microrganismos (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Lactobacillus salivarius* e *Lactobacillus casei*), sugerindo que a atividade do Ch é essencialmente ao nível da integridade das membranas celulares. Como demonstrado nos ensaios anteriores (Tab. 5 e 6) a HP- $\gamma$ -CD não possui atividade antibacteriana para as estirpes inoculadas pelo que o Ch é o mais provável fator em comum entre os filmes que pode ter causado a redução da carga microbiana.



**Figura 15:** Evolução temporal (em dias) da carga microbiana microaerófila de amostras de carne de frango (UFC/g), inoculadas com *C. jejuni* ATCC 33560, embaladas a 60% de vácuo com sacos PA/PE (linha azul descontinua), filmes Ch com CI e sacos PA/PE (linha verde contínua) e filmes Ch com HP- $\gamma$ -CD e sacos PA/PE (linha vermelha de pontos).



**Figura 16:** Pedacinhos de carne de frango de 5g embalados, a 60% de vácuo, em saco de PA/PE (à esquerda), em filme de Ch com CI ou HP- $\gamma$ -CD e saco PA/PE exterior (ao centro) e em filme de Ch com CI ou HP- $\gamma$ -CD (à direita).

No segundo teste, amostras de carne inoculadas com *C. jejuni* foram embaladas com os filmes de Ch mas com um segundo embalamento com sacos PA/PE que permitiu inibir a transferência de água e, portanto, a secagem. O facto de para as amostras embaladas com PA/PE não ter havido evolução da carga microbiana com o tempo não é concordante com o ensaio anterior, no entanto um maior tempo de teste poderia ter permitido uma melhor observação da evolução da população microbiana. A introdução dos filmes de Ch dentro de um saco PA/PE permitiu uma redução da carga microbiana não influenciada pela secagem da carne. O uso de ambos os filmes resultou em reduções não significativamente diferentes, podendo-se concluir que a secagem da carne no primeiro ensaio não foi, pelo menos, o único fator, para além do CI, a favorecer a redução da carga microbiana. Assim, pode-se deduzir que o Ch tenha tido efeito na redução da carga microbiana e que esse efeito possa ter ultrapassado o do CI. Embora a atividade antibacteriana do Ch já tenha sido demonstrado contra *Campylobacter* spp. [105], não foram encontradas publicações que demonstrassem essa atividade contra *Arcobacter* spp. pelo que este trabalho pode ter demonstrado o potencial do Ch na inibição do crescimento de estirpes de *Arcobacter*.



## 5. Conclusões

No presente trabalho foi demonstrado que o uso de um CI com HP- $\gamma$ -CD é uma maneira eficaz de incorporar o RV, como composto ativo, em filmes antimicrobianos pois permite a sua migração da matriz dos filmes. Embora tenha sido possível preparar filmes de Ch e Ch/MC com o RV, o mesmo não aconteceu com filmes de MC devido à formação de um precipitado na solução filmogénica que não permitia a preparação de filmes homogéneos.

A atividade antimicrobiana dos filmes ativos de Ch e Ch/MC foi demonstrada para *C. jejuni* ATCC 33560, *C. coli* ATCC 33559 e *A. butzleri* LMG 6620 que, sendo bactérias patogénicas contaminantes de carne de aves importantes, mostra o potencial destes filmes com RV para controlar contaminações, por estes microrganismos, em carne de frango. Os filmes ativos apresentaram igual e elevada permeabilidade ao vapor de água, o que é característico de filmes constituídos por polissacarídeos. Em relação às propriedades mecânicas os dois tipos de filme apresentaram igual tensão máxima de rutura mas um comportamento mecânico à tração diferente. Os filmes ativos de Ch/MC apresentaram uma capacidade de deformação elástica (não permanente) maior que os de Ch e estes últimos apresentaram uma capacidade de alongamento antes da rutura cerca de 2 vezes superior.

A libertação de RV dos filmes deu-se, em princípio, na forma de CI uma vez que, como sugerido por Pastor *et al.* [20], o RV sozinho não conseguiria migrar nem exercer atividade antimicrobiana devido à sua baixa solubilidade e afinidade com água. Comparativamente com os filmes ativos de Ch, os de Ch/MC mostraram estar associados a uma menor migração do RV. Essa menor migração é, possivelmente, resultado de uma interação, em princípio do tipo hidrofóbica, da MC com um dos componentes das soluções de CI. Enquanto a interação com HP- $\gamma$ -CD livre é fortemente evidenciada, com o CI ou com o RV não pôde ser concluída. A comparação das propriedades mecânicas e do teor de humidade dos dois tipos de filmes ativos e com os filmes não ativos é coerente com a hipótese do estabelecimento de uma interação entre a MC com a HP- $\gamma$ -CD livre e com a possibilidade da interação se poder estabelecer também com o CI ou RV não complexado.

O embalamento de amostras de carne de frango com filmes de Ch com RV ou só com HP- $\gamma$ -CD permitiu reduzir, em 1 a 2 ciclos logarítmicos decimais, a carga microbiana microaerófila dessas amostras, demonstrando a atividade antimicrobiana dos filmes e o seu potencial para controlar ativamente a população microbiana em carne de frango. No entanto, essa atividade antimicrobiana possivelmente deveu-se a um efeito antimicrobiano do Ch que ultrapassou o do RV. As bactérias do género *Campylobacter* spp. são bastante suscetíveis ao efeito antimicrobiano do Ch e, como as amostras inoculadas com *C. jejuni* e *A. butzleri* tiveram uma evolução similar em todas as condições, com este trabalho demonstrou-se indícios da possível atividade antimicrobiana do Ch contra *Arcobacter* spp., facto este que, na extensa bibliografia consultada, não foi encontrado.



## 6. Referências bibliográficas

- [1] EFSA; ECDC - The European Union summary report on trends and sources of zoonoses , zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2013. **EFSA Journal**. ISSN 1831-4732. Vol.13 (2015).
- [2] Collado, L.; Figueras, M. J. - Taxonomy, epidemiology, and clinical relevance of the genus *Arcobacter*. **Clinical Microbiology Reviews**. ISSN 1098-6618. Vol.24 (2011) p. 174-192.
- [3] Humphrey, T.; O'Brien, S.; Madsen, M. - Campylobacters as zoonotic pathogens: a food production perspective. **International Journal of Food Microbiology**. ISSN 0168-1605. Vol. 117: nº3 (2007) p. 237-257.
- [4] Shan, B.; Cai, Y. Z.; Brooks, J. D.; Corke, H. - Antibacterial properties of *Polygonum cuspidatum* roots and their major bioactive constituents. **Food Chemistry**. ISSN 0308-8146. Vol. 109 (2008) p. 530-537.
- [5] Seow, Y. X.; Yeo, C. R.; Chung, H. L.; Yuk, H. G. - Plant essential oils as active antimicrobial agents. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**. ISSN 1040-8398. Vol. 54 (2014) p. 625-644.
- [6] Paulo, L.; Oleastro, M.; Gallardo, E.; Queiroz, J. A.; Domingues, F. - Antimicrobial properties of resveratrol: a review. In Mendez-Villas, A., ed. - **Science Against Microbial Pathogens: Communicating Current Research and Technological Advances**. Badajoz, Espanha: Formatex Research Centre, 2011. ISBN 978-84-939843-2-8. p. 1225-1235.
- [7] Sadruddin, S.; Arora, R. - Resveratrol: biologic and therapeutic implications. **Journal of the CardioMetabolic Syndrome**. ISSN 1559-4572 . Vol. 4 (2009) p. 102-106.
- [8] Das, S.; Lin, H. S. Ho, P. C.; Ng, K. Y. - The impact of aqueous solubility and dose on pharmacokinetic profiles of resveratrol. **Pharmaceutical Research**. ISSN 0724-8741. Vol. 25: nº11 (2008) p. 2593-2600.
- [9] Ferreira, S.; Silva, F.; Queiroz, J. A.; Oleastro, M.; Domingues, F. - Resveratrol against *Arcobacter butzleri* and *Arcobacter cryaerophilus*: activity and effect on cellular functions. **International Journal of Food Microbiology**. ISSN 0168-1605. Vol. 180 (2014) p. 62-68.
- [10] Duarte, A.; Alves, A.; Ferreira, S.; Silva, F.; Domingues, F. - Resveratrol inclusion complexes: antibacterial and anti-biofilm activity against *Campylobacter* spp. and *Arcobacter butzleri*. **Food Research International**. ISSN 0963-9969 . Vol. 77: nº2 (2015) p. 244-250.
- [11] Duarte, A.; Martinho, A.; Luís, A.; Figueiras, A.; Oleastro, M.; Domingues, F.; Silva, F. - Resveratrol encapsulation with methyl- $\beta$ -cyclodextrin for antibacterial and antioxidant delivery applications. **LWT - Food Science and Technology**. ISSN 0023-6438. Vol. 63: nº2 (2015) p. 1254-1260.
- [12] O'SULLIVAN, Maurice G.; KERRY, Joseph P. - Meat packaging. In Toldrá, Fidel, ed. - **Handbook of Meat Processing**. Iowa, USA: Blackwell Publishing, 2010. ISBN 978-0-8138-2182-5. p. 247-261.
- [13] BALDWIN, Elizabeth A. - Surface treatments and edible coatings in food preservation. In Rahman, M. Shafiur, ed. - **Handbook of Food Preservation**. 2ªed. Boca Raton, USA: CRC Press, 2007. ISBN 978-0-8138-2182-5. p. 477-507.
- [14] Falguera, V.; Quintero, J. P.; Jiménez, A.; Munoz, J. A.; Ibarz, A. - Edible films and coatings: structures, active functions and trends in their use. **Trends in Food Science and Technology**. ISSN 0924-2244. Vol. 22 (2011) p. 292-303.

- [15] Aider, M. - Chitosan application for active bio-based films production and potential in the food industry: review. **LWT - Food Science and Technology**. ISSN 0023-6438. Vol. 43 (2010) p. 837-842.
- [16] Dutta, P. K.; Tripathi, S.; Mehrotra, G. K.; Dutta, J. - Perspectives for chitosan based antimicrobial films in food applications. **Food Chemistry**. ISSN 0308-8146. Vol. 114 (2009) p. 1173-1182.
- [17] Sangsuwan, J.; Rattanapanone, N.; Rachtanapun, P. - Effect of chitosan/methylcellulose films on microbial and quality characteristics of fresh cut cantaloupe and pineapple. **Postharvest Biology and Technology**. ISSN 0925-5214. Vol. 49 (2008) p. 403-410.
- [18] Pinotti, A.; García, M. A.; Martino, M. N.; Zaritzky, N. E. - Study on microstructure and physical properties of composite films based on chitosan and methylcellulose. **Food Hydrocolloids**. ISSN 0268-005X. Vol. 21 (2007) p. 66-72.
- [19] Nasatto, P. L.; Pignon, F.; Silveira, J. L.; Duarte, M. E.; Nosedá, M.; Rinaudo, M. - Methylcellulose, a cellulose derivative with original physical properties and extended applications. **Polymers**. ISSN 2073-4360. Vol. 7 (2015) p. 777-803.
- [20] Pastor, C.; Sánchez-González, L.; Chiralt, A.; Cháfer, M.; González-Martínez, C. - Physical and antioxidant properties of chitosan and methylcellulose based films containing resveratrol. **Food Hydrocolloids**. ISSN 0268-005X. Vol. 30 (2013) p. 272-280.
- [21] Silva, F.; Figueiras, A.; Gallardo, E.; Nerín, C.; Domingues, F. - Strategies to improve the solubility and stability of stilbene antioxidants: a comparative study between cyclodextrins and bile acids. **Food Chemistry**. ISSN 0308-8146. Vol. 145 (2014) p. 115-125.
- [22] WHO - Global surveillance of foodborne disease: developing a strategy and its interaction with risk analysis. Geneva, Switzerland: World Health Organization, 2001.
- [23] Ho, H.; Lipman, L.; Gaastra, W. - *Arcobacter*, what is known and unknown about a potential foodborne zoonotic agent - a review. **Veterinary Microbiology**. ISSN 0378-1135. Vol. 115 (2006) p. 1-13.
- [24] Vandenberg, O.; Dediste, A.; Houf, K.; Ibekwem, S.; Souayah, H.; Cadranel, S.; Douat, N.; Zissis, G.; Butzler, J. - *Arcobacter* species in humans. **Emerging Infectious Diseases**. ISSN 1080-6059. Vol. 10: n°10 (2004) p. 1863-1867.
- [25] Silva, J.; Leite, D.; Fernandes, M.; Mena, C.; Gibbs, P. A.; Teixeira, P. - *Campylobacter* spp. as a foodborne pathogen: a review. **Frontiers in Microbiology**. ISSN 1664-302X. Vol. 2: n°200 (2011), p. 1-12.
- [26] Blackburn, C.; McClure, P., eds. - *Campylobacter* and *Arcobacter*. **Foodborne Pathogens: Hazards, Risk Analysis and Control**. 2<sup>o</sup> ed. Cambridge, UK: Woodhead Publishing Limited, 2009. ISBN 1-85573-454-0. p. 718-762.
- [27] Garrity, George - **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Volume Two: The Proteobacteria**. 2<sup>a</sup> ed. New York, USA: Springer Science+Business Media, 2005. ISBN 978-0-387-95040-2.
- [28] Fera, M. T.; Maugeri, T. L.; Gugliandolo, C.; La Camera, E.; Lentini, V.; Favaloro, A.; Bonanno, D.; Carbone, M. - Induction and resuscitation of viable nonculturable *Arcobacter butzleri* cells. **Applied and Environmental Microbiology**. ISSN 1098-5336. Vol. 74: n°10 (2008) p. 3266-3268.
- [29] Miller, W. G.; Parker, C. T.; Rubenfield, M.; Mend, G. L.; Wosten, M.; Ussery, D. W. - The complete genome sequence and analysis of the epsilonproteobacterium *Arcobacter butzleri*. **PLoS ONE**. Vol. 2: n°12 (2007) e1358.

- [30] Wesley, Irene V.; Miller, William G. - *Arcobacter*: an opportunistic human foodborne pathogen? In Scheld, W. Michael; Grayson, M. Lindsay; Hughes, James M., eds - **Emerging Infections 9**. Washington, DC: ASM Press, 2010. ISBN 978-1-55581-525-7. p. 185-211.
- [31] Houf, K.; De Zutter, L.; Van Hoof, J.; Vandamme, P. - Assessment of the genetic diversity among arcobacters isolated from poultry products by using two PCR-based typing methods. **Applied and Environmental Microbiology**. ISSN 1098-5336. Vol. 68 (2002) p. 2172-2178.
- [32] EFSA; ECDC - The European Union summary report on trends and sources of zoonoses , zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2011. **EFSA Journal**. ISSN 1831-4732. Vol. 11: n<sup>o</sup>4 (2013).
- [33] Son, I.; Englen, M. D.; Berrang, M. E.; Fedorka-Cray, P. J.; Harrison, M. A. - Prevalence of *Arcobacter* and *Campylobacter* on broiler carcasses during processing. **International Journal of Food Microbiology**. ISSN 0168-1605. Vol. 113 (2007) p. 16-22.
- [34] Duarte, A.; Santos, A.; Manageiro, V.; Martins, A.; Fraqueza, M. J.; Caniça, M.; Domingues, F. C.; Oleastro, M. - Human, food and animal *Campylobacter* spp. isolated in Portugal: high genetic diversity and antibiotic resistance rates. **International Journal of Antimicrobial Agents**. ISSN 0924-8579. Vol. 44 (2014), p. 306-313.
- [35] Berrang, M. E.; Buhr, R. J.; Cason, J. A.; Dickens, J. A. - Broiler carcass contamination with *Campylobacter* from feces during defeathering. **Journal of Food Protection**. ISSN 0362-028X. Vol. 12: n<sup>o</sup>4 (2001) p. 2063-2066.
- [36] Chantarapanont, W.; Berrang, M.; Frank, J. F. - Direct microscopic observation and viability determination of *Campylobacter jejuni* on chicken skin. **Journal of Food Protection**. ISSN 0362-028X. Vol. 12: n<sup>o</sup>9 (2003) p. 2222-2230.
- [37] Scherer, K.; Bartelta, E.; Sommerfeld, C.; Hildebrandt, G. - Comparison of different sampling techniques and enumeration methods for the isolation and quantification of *Campylobacter* spp. in raw retail chicken legs. **International journal of food microbiology**. ISSN 0168-1605. Vol. 108 (2006) p. 115-119.
- [38] Simmons, N. A.; Gibbs, F. J. - *Campylobacter* spp. in oven-ready poultry. **Journal of Infection**. ISSN 0163-4453. Vol. 1: n<sup>o</sup>2 (1979) p. 159-162.
- [39] Lehner, A.; Tasara, T.; Stephen, R. - Relevant aspects of *Arcobacter* spp. as potential foodborne pathogen. **International Journal of Food Microbiology**. ISSN 0168-1605. Vol. 102: n<sup>o</sup>2 (2005) p. 127-135.
- [40] Ferreira, S.; Fraqueza, M. J.; Queiroz, J. A.; Domingues, F. C.; Oleastro, M. - Genetic diversity, antibiotic resistance and biofilm-forming ability of *Arcobacter butzleri* isolated from poultry and environment from a portuguese slaughterhouse. **International Journal of Food Microbiology**. ISSN 0168-1605. Vol. 162 (2013) p. 82-88.
- [41] Hanning, I.; Jarquin, R.; Slavik, M. - *Campylobacter jejuni* as secondary colonizer of poultry biofilms. **Journal of Applied Microbiology**. ISSN 1365-2672. Vol. 105: n<sup>o</sup>4 (2008) p. 1199-1208.
- [42] Bronzwaer, S.; EFSA - Harmonised monitoring of antimicrobial resistance in *Salmonella* and *Campylobacter* isolates from food animals in the European Union. **Clinical Microbiology and Infection**. ISSN 1469-0691. Vol. 14: n<sup>o</sup>6 (2008) p. 522-533.
- [43] Nychas, G. J.; Skandamis, P.; Tassou, C.; Koutsoumanis, K. - Meat spoilage during distribution. **Meat Science**. ISSN 0309-1740. Vol. 78 (2008) p. 77-89.

- [44] Scott, Virginia N.; Chen, Yuhuan - Food safety management systems. In Juneja, Vijay K.; Sofos, John N., eds. - **Pathogens and Toxins in Foods: Challenges and Interventions**. Washington DC, USA: ASM Press, 2010. ISBN 978-1-55581-459-5. p. 478-492.
- [45] Quintavalla, S.; Vicini, L. - Antimicrobial food packaging in meat industry. **Meat Science**. ISSN 0309-1740. Vol. 62 (2002) p. 373-380.
- [46] Lund, M.; Wedderkopp, A.; Wainø, M.; Nordentoft, S.; Bang, D. D.; Pedersen, K.; Madsen, M. - Evaluation of PCR for detection of *Campylobacter* in a national broiler surveillance programme in Denmark. **Journal of Applied Microbiology**. ISSN 1365-2672. Vol. 94: n°5 (2003) p. 929-935.
- [47] Motargemi, Yasmine; Adams, Martin - **Emerging Foodborne Pathogens**. Cambridge, UK: Woodhead Publishing Limited, 2006. ISBN 978-185573-963-5.
- [48] Dave, D.; Ghaly, A. E. - Meat spoilage mechanisms and preservation techniques: a critical review. **American Journal of Agricultural and Biological Sciences**. ISSN 1557-4989. Vol. 6: n°4 (2011), p. 486-510.
- [49] Tokarsky, Oleksandr; Marshall, Douglas - Novel technologies for microbial spoilage prevention. In Toldrá, Fidel, ed. - **Handbook of Meat Processing**. Iowa, USA: Blackwell Publishing, 2010. ISBN 978-0-8138-2182-5. p. 263-286.
- [50] Davidson, P. Michael; Taylor, T. Matthew - Chemical preservatives and natural antimicrobial compounds. In Doyle, Michael P.; Beuchat, Larry R., eds. - **Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers**. 3<sup>a</sup> ed. Washington DC, USA: ASM Press, 2007. ISBN 978-1-55581-407-6. p. 713-745.
- [51] Church, I.J.; Parsons, A. L. - Modified atmosphere packaging technology: review. **Journal of the Science of Food and Agriculture**. ISSN 1097-0010. Vol. 67 (1995) p. 143-152.
- [52] Restuccia, D.; Spizzirri, U. G.; Parisi, O. I.; Cirillo, G.; Curcio, M.; Iemma, F.; Puoci, F.; Vinci, G.; Picci, N. - New EU regulation aspects and global market of active and intelligent packaging for food industry applications. **Food Control**. ISSN 0956-7135. Vol. 21 (2010) p. 1425-1435.
- [53] Comissão Europeia: Health and Consumers Directorate-General, Directorate E6: Safety of the Food chain: Innovation and sustainability - **EU guidance to the Commission regulation (EC) No 450/2009 of 29 May 2009 on active and intelligent materials and articles intended to come into contact with food**. Versão 1.0 (2011).
- [54] Rojas-Grau, M. A.; Soliva-Fortuny, R.; Martín-Belloso, O. - Edible coatings to incorporate active ingredients to freshcut fruits: a review. **Trends in Food Science and Technology**. ISSN 0924-2244. Vol. 20 (2009) p. 438-447..
- [55] Pavlath, Attila E.; Orts, William - Edible films and coatings: why, what, and how? In Embuscado, Milda E.; Hubber, Kerry C., eds. - **Edible Films and Coatings for Food Applications**. New York, USA: Springer Science+Business Media, 2009. ISBN 978-0-387-92823-4. p. 1-23.
- [56] Rinaudo, M. - Chitin and chitosan: properties and applications. **Progress in Polymer Science**. ISSN 0079-6700. Vol. 31 (2006) p. 603-632.
- [57] Kumar, M. - A review of chitin and chitosan applications. **Reactive and Functional Polymers**. ISSN 1381-5148. Vol. 46 (2000), p. 1-27.
- [58] Chen, X. G.; Zheng, L.; Wang, Z.; Lee, C. Y.; Park, H. J. - Molecular affinity and permeability of different molecular weight chitosan membranes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. ISSN 1520-5118. Vol. 50: n°21 (2002) p. 5915-5918.

- [59] Ouattara, B.; Simard, R. E.; Piette, G.; Begin, A.; Holley, R. A. - Diffusion of acetic and propionic acids from chitosan-based antimicrobial packaging films. **Journal of Food Science**. ISSN 1750-3841. Vol. 65: nº5 (2000) p. 768-773.
- [60] Goy, R. C.; de Britto, D.; Assis, O. B. G. - A review of the antimicrobial activity of chitosan. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**. ISSN 0104-1428. Vol. 19: nº3 (2009) p. 241-247.
- [61] Kong, M.; Chen, X. G.; Xing, K.; Park, H. J. - Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: a state of the art review. **International Journal of Food Microbiology**. ISSN 0168-1605. Vol. 144 (2010) p. 51-63.
- [62] Han, Jung H., ed. - Antimicrobial packaging systems. **Innovations in Food Packaging**. Londres, UK: Elsevier Academic Press, 2005. ISBN 978-0-12-311632-1. p. 80-107.
- [63] Nicholson, M. D. - The role of natural antimicrobials in food packaging biopreservation. **Journal of Plastic Film Sheeting**. ISSN 8756-0879. Vol. 143 (1998) p. 234-241.
- [64] Paulo, L.; Ferreira, S.; Gallardo, E.; Queiroz, J. A.; Domingues, F. - Antimicrobial activity and effects of resveratrol on human pathogenic bacteria. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**. ISSN 1573-0972. Vol. 26 (2010) p. 1533-1538.
- [65] Cottart, C.; Nivet-Antoine, V.; Laguillier-Morizot, C.; Beaudoux, J. - Resveratrol bioavailability and toxicity in humans. **Molecular Nutrition & Food Research**. ISSN 1613-4133. Vol. 54 (2010) p. 1-10.
- [66] Kasiotis, K. M.; Pratsinis, H.; Kletsas, D.; Haroutounian, S. A. - Resveratrol and related stilbenes: their anti-aging and anti-angiogenic properties. **Food Chemical Toxicology**. ISSN 0278-6915. Vol. 61 (2013) p. 112-120.
- [67] Riviere, C.; Pawlus, A. D.; Merillon, J. M. - Natural stilbenoids: distribution in the plant kingdom and chemotaxonomic interest in *Vitaceae*. **Natural Products Reports**. ISSN 0265-0568. Vol. 29: nº11 (2012) p. 1317-1333.
- [68] Jung, C. M.; Heinze, T. M.; Schnackenberg, L. K.; Mullis, L. B.; Elkins, S. A.; Elkins, C. A.; Steele, R. S.; Sutherland, J. B. - Interaction of dietary resveratrol with animal-associated bacteria. **FEMS Microbiology Letters**. ISSN 1574-6968. Vol. 297 (2009) p. 266-273.
- [69] Tegos, G.; Stermitz, F. R.; Lomovskaya, O.; Lewis, K. - Multidrug pump inhibitors uncover remarkable activity of plant antimicrobials. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. ISSN 1098-6596. Vol. 46 (2002) p. 3133-3141.
- [70] Lu, Z.; Cheng, B.; Hu, Y. L.; Zhang, Y. H.; Zou, G. L. - Complexation of resveratrol with cyclodextrins: solubility and antioxidant activity. **Food Chemistry**. ISSN 0308-8146. Vol. 113 (2009) p. 17-20.
- [71] Laza-Knoerr, A. L.; Gref, R.; Couvreur, P. - Cyclodextrins for drug delivery. **Journal of Drug Targeting**. ISSN 1029-2330. Vol. 18: nº9 (2010) p. 645-656.
- [72] Dahan, A.; Miller, J. M.; Hoffman, A.; Amidon, G. E.; Amidon, G. E. - The solubility-permeability interplay in using cyclodextrins as pharmaceutical solubilizers: mechanistic modeling and application to progesterone. **Journal of Pharmaceutical Science**. ISSN 1520-6071. Vol. 99: nº6 (2010) p. 2739-2749.
- [73] Singh, R.; Bahrti, N.; Madan, J.; Hiremath, S. N. - Characterization of cyclodextrin inclusion complexes - a review. **Journal of Pharmaceutical Science and Technology**. ISSN 1948-2124. Vol. 2: nº3 (2010) p. 171-183.

- [74] Higuera, L.; López-Carballo, G.; Hernández-Munoz, P.; Catalá, R.; Gavara, R. - Antimicrobial packaging of chicken fillets based on the release of carvacrol from chitosan/cyclodextrin films. **International Journal of Food Microbiology**. ISSN 0168-1605. Vol. 188 (2014) p. 53-59.
- [75] Stella, V. J.; He, Q. - Cyclodextrins. **Toxicologic Pathology**. Vol. 36 (2008) p. 30-42. [consult. 26 Nov. 2015]. Disponível em <http://tpx.sagepub.com/content/36/1/30.short>.
- [76] Zhaofeng, L.; Miao, W.; Feng, W.; Zhengbiao, G.; Guocheng, D.; Jing, W.; Jian, C. -  $\gamma$ -cyclodextrin: a review on enzymatic production and applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**. ISSN 1432-0614. Vol. 77: n°2 (2007) p. 245-255.
- [77] Dainelli, D.; Gontard, N.; Spyropoulos, D.; Zondervan-van den Beukend, E.; Tobback, P. - Active and intelligent food packaging: legal aspects and safety concerns. **Trends in Food Science & Technology**. ISSN 0924-2244. Vol. 19 (2008) pp. S103-S112.
- [78] Parlamento Europeu e Conselho da União Europeia - **Regulamento (CE) nº 1935/2004 do Parlamento Europeu e do Conselho, de 27 de Outubro de 2004, relativo aos materiais e objetos destinados a entrar em contacto com os alimentos e que revoga as Diretivas 80/590/CEE e 89/109/CEE**. Jornal Oficial da União Europeia L 338/4, 13 Nov.
- [79] Comissão das Comunidades Europeias - **Regulamento (CE) nº 450/2009 da Comissão de 29 de Maio de 2009 relativo aos materiais e objetos activos e inteligentes destinados a entrar em contacto com os alimentos**. Jornal Oficial da União Europeia L 135/3, 30 Mai.
- [80] Parlamento Europeu e Conselho da União Europeia - **Regulamento (CE) nº 1333/2008 do Parlamento Europeu e do Conselho de 16 de Dezembro de 2008 relativo aos aditivos alimentares**. Jornal Oficial da União Europeia L 354/16, 31 Dez.
- [81] Comissão Europeia - **Regulamento (EU) nº 10/2011 da Comissão, de 14 de Janeiro de 2011 relativo aos materiais e objetos de matéria plástica destinados a entrar em contacto com os alimentos**. Jornal Oficial da União Europeia L 12/1, 15 Jan.
- [82] Tinius Olsen - **An introduction to tensile testing of plastics**. Horsham, USA: Tinius Olsen. [consult. 05 Fev. 2016]. Disponível em: <http://www.tiniusolsen.com/schooloftesting/TensilePlasticsPrimer.pdf>.
- [83] ASTM D 882-02. 2002 - **Standard test method for tensile properties of thin plastic sheeting**. [USA]: ASTM International.
- [84] Davis, J. R. & Associates - **Tensile testing**. 2ª ed. Ohio, USA: ASM International, 2004. ISBN 0-87170-806-X.
- [85] Higuera, L.; Lopez-Carballo, G.; Cerisuelo, J.; Gavara, R.; Hernández-Munoz, P. - Preparation and characterization of chitosan/HP- $\beta$ -cyclodextrins composites with high sorption capacity for carvacrol. **Carbohydrate Polymers**. ISSN 0144-8617. Vol. 97: n°2 (2013) p. 262-268.
- [86] ASTM E96-95. 1995 - **Standard test method for water vapor transmission of materials**. [USA]: ASTM International.
- [87] McHugh, T. H.; Avena-Bustillos, R.; Krochta, J. M. - Hydrophilic edible films: modified procedure for water vapor permeability and explanation of thickness effects. **Journal of Food Science**. ISSN 1750-3841. Vol. 58: n°4 (1993) p. 899-903.
- [88] Denny, Mark W. - **Air and Water: The Biology and Physics of Life's media**. Chichester, West Sussex, UK: Princeton University Press, 1993. ISBN 978-0-691-02518-6.
- [89] Campos, C. A.; Gerschenson, L. N.; Flores, S. K. - Development of edible films and coatings with antimicrobial activity. **Food and Bioprocess Technology**. ISSN 1935-5149. Vol. 4: n°6 (2011) p. 849-875.

- [90] Pintado, C.; Ferreira, M.; Sousa, I. - Control of pathogenic and spoilage microorganisms from cheese surface by protein films containing malic acid, nisin and natamycin. **Food Control**. ISSN 0956-7135. Vol. 21 (2010) p. 240-246.
- [91] Pintado, C.; Ferreira, M.; Sousa, I. - Properties of whey protein-based films containing organic acids and nisin to control *Listeria monocytogenes*. **Journal of Food Protection**. ISSN 1944-9097. Vol. 72: nº9 (2009) p. 1891-1896.
- [92] CLSI M02-A11. 2012 - **Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests**. [Wayne, Pennsylvania, USA]: Clinical and Laboratory Standards Institute. 11<sup>a</sup> ed. ISBN 1-56238-986-6.
- [93] EUCAST. 2015 - **European Committee on antimicrobial susceptibility testing: recommendations 2015**. [Paris]: Comité de l'antibiogramme de la Société Française de Microbiologie / European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases.
- [94] ISO/DIS 6887-2. 2003 - **Microbiology of the food chain - Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination: Specific rules for the preparation of meat and meat products**. [Geneva]: ISO.
- [95] Zupancič, Š.; Lavrič, Z.; Kristl, J. - Stability and solubility of trans-resveratrol are strongly influenced by pH and temperature. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**. ISSN 0939-6411. Vol. 93 (2015) p. 196-204.
- [96] Loftsson, T.; Duchêne, D. - Cyclodextrins and their pharmaceutical applications. **International Journal of Pharmaceutics**. ISSN 0378-5173. Vol. 329 (2007) p. 1-11.
- [97] Astray, G.; Gonzalez-Barreiro, C.; Mejuto, J. C.; Rial-Otero, R.; Simal-Gándara, J. A. - Review on the use of cyclodextrins in foods. **Food Hydrocolloids**. ISSN 0268-005X. Vol. 23 (2009) p. 1631-1640.
- [98] Stella, V. J.; Rao, V. M.; Zannou, E. A.; Zia, V. - Mechanisms of drug release from cyclodextrin complexes. **Advanced Drug Delivery Reviews**. ISSN 0169-409X. Vol. 36 (1999) p. 3-16.
- [99] Loftsson, T.; Friðriksson, H.; Guðmundsson, T. K. - The effect of water-soluble polymers on aqueous solubility of drugs. **International Journal of Pharmaceutics**. ISSN 0378-5173. Vol. 127 (1996) p. 293-296.
- [100] Loftsson, T.; Friðriksson, H.; Sigurðsson, A. M.; Ueda, H. - The effect of water-soluble polymers on drug-cyclodextrin complexation. **International Journal of Pharmaceutics**. ISSN 0378-5173. Vol. 110 (1996) p. 169-177.
- [101] Lu, O.; Zhao, J.; Wang, M.; Wang, Z. - Electrochemical evaluation of the controlled release behaviours of the cyclodextrin inclusion complexes on the drug deliveries to microbial cell. **International Journal of Electrochemical Science**. ISSN 1452-3981. Vol. 6 (2011) p. 3868-3877.
- [102] Du, J.; Guo, X.; Tu, J.; Xiao, L.; Jia, X.; Liao, L.; Liu, L. - Biopolymer-based supramolecular micelles from  $\beta$ -cyclodextrin and methylcellulose. **Carbohydrate Polymers**. ISSN 0144-8617. Vol. 90 (2012) p. 569-574.
- [103] Lubber, P.; Bartelt, E. - Enumeration of *Campylobacter* spp. on the surface and within chicken breast fillets. **Journal of Applied Microbiology**. ISSN 1365-2672. Vol. 102 (2007) p. 313-318.
- [104] Fallas-Padilla, K.; Rodríguez-Rodríguez, C.; Jaramillo, H.; Echandi, M. - *Arcobacter*: comparison of isolation methods, diversity, and potential pathogenic factors in commercially retailed chicken breast meat from Costa Rica. **Journal of Food Protection**. ISSN 0362-028X. Vol. 77: nº6 (2014) p. 880-884.

- [105] Ganan, M.; Carrascosa, A. V.; Martínez-Rodríguez, A. J. - Antimicrobial activity of chitosan against *Campylobacter* spp. and other microorganisms and its mechanism of action. **Journal of Food Protection**. ISSN 0362-028X. Vol. 72: nº8 (2009) p. 1735–1738.

## Apêndice A: Concentração das soluções de Cl



**Tabela 1:** Concentração média das soluções de CI (n=2) preparadas ao longo do tempo.

<b>Data de preparação</b>	<b>Volume das soluções (mL)</b>	<b>Concentração média (mg/mL)</b>	<b>Desvio-Padrão (mg/mL)</b>	<b>Coefficiente de Variação (%)</b>
22/11/2014	10	21,26	0,30	1,43
27/03/2015	23	21,08	0,47	2,22
31/03/2015	23	23,58	0,85	3,62
08/04/2015	22	27,97	0,74	2,66
02/06/2015	23	22,33	0,81	3,62
05/06/2015	21	22,62	0,20	0,89
09/06/2015	23	23,26	0,63	2,70
10/06/2015	23	21,22	0,78	3,66
01/07/2015	48	24,22	0,50	2,06
02/07/2015	48	23,58	0,20	0,85
30/07/2015	160	24,23	0,74	3,05
<b>Média</b>		<b>23,21</b>		
<b>Desvio-Padrão</b>		<b>1,96</b>		



## Apêndice B: Teste de difusão em agar dos filmes



**Tabela 1:** Diâmetro das zonas de inibição resultantes da aplicação de discos de 6mm de diâmetro de filmes de Ch e de Ch/MC (0,33g polímero e 8,7cm diâmetro) sem CI, com duas quantidades (2,5mL e 4,5mL) de CI e com HP- $\gamma$ -CD (4,5mL).

<i>C. jejuni</i> ATCC 33560			
Filme	Diâmetro das zonas de inibição (mm)		
Ch	-*1	-	-
Ch + 4,5mL HP- $\gamma$ -CD	-	-	-
Ch + 2,5mL CI	21,87	23,13	20,25
Ch + 4,5mL CI	23,19	24,23	24,23
Ch/MC	-	-	-
Ch/MC + 4,5mL HP- $\gamma$ -CD	-	-	-
Ch/MC + 2,5mL CI	10,00	11,73	10,58
Ch/MC + 4,5mL CI	13,06	14,42	14,17
<i>C. coli</i> ATCC 33559			
Filme	Diâmetro das zonas de inibição (mm)		
Ch	-	-	-
Ch + 4,5mL HP- $\gamma$ -CD	-	-	-
Ch + 2,5mL CI	IP*2	IP	IP
Ch + 4,5mL CI	IP	IP	IP
Ch/MC	-	-	-
Ch/MC + 4,5mL HP- $\gamma$ -CD	-	-	-
Ch/MC + 2,5mL CI	IP	IP	-
Ch/MC + 4,5mL CI	IP	IP	IP
<i>A. butzleri</i> LMG 10828			
Filme	Diâmetro das zonas de inibição (mm)		
Ch	-	-	-
Ch + 4,5mL HP- $\gamma$ -CD	-	-	-
Ch + 2,5mL CI	-	-	-
Ch + 4,5mL CI	-	-	-
Ch/MC	-	-	-
Ch/MC + 4,5mL HP- $\gamma$ -CD	-	-	-
Ch/MC + 2,5mL CI	-	-	-
Ch/MC + 4,5mL CI	-	-	-
<i>A. butzleri</i> LMG 6620			
Filme	Diâmetro das zonas de inibição (mm)		
Ch	-	-	-
Ch + 4,5mL HP- $\gamma$ -CD	-	-	-
Ch + 2,5mL CI	13,50	13,82	13,93
Ch + 4,5mL CI	15,95	16,04	16,7
Ch/MC	-	-	-
Ch/MC + 4,5mL HP- $\gamma$ -CD	-	-	-
Ch/MC + 2,5mL CI	10,92	9,64	10,59
Ch/MC + 4,5mL CI	13,59	12,49	12,03

\*1 Ausência de zona de inibição

\*2 Zonas de inibição parcial (crescimento mais tênue num determinado raio à volta do filme).

Análise de Estatística:

Usando o *Microsoft Office Excel 2007* foram feitos testes t-student ( $\alpha=0,05$ ) para comparar dois conjuntos de resultados, considerando variâncias iguais entre as amostras.

**Tabela 2:** Dados agrupados para o tratamento estatístico, obtidos para *C. jejuni* ATCC 33560 e *A. butzleri* LMG 6620, as estirpes para as quais se obteve zonas de inibição completa. Quantidade “Alta” e “Baixa” de CI corresponde à incorporação, nos filmes, de, respetivamente, 4,5mL e 2,5mL de CI.

Microrganismo	<i>C. jejuni</i>				<i>A. butzleri</i>			
	Matriz filmogénica		Ch/MC		Ch		Ch/MC	
Quantidade de CI	Alta	Baixa	Alta	Baixa	Alta	Baixa	Alta	Baixa
Diâmetro das zonas de inibição (mm)	21,87	23,19	10	13,06	13,5	15,95	10,92	13,59
	23,13	24,23	11,73	14,42	13,82	16,04	9,64	12,49
	20,25	24,23	10,58	14,17	13,93	16,07	10,59	12,03
média (mm)	21,75	23,883 33	10,77	13,883 33	13,75	16,02	10,383 33	12,703 33
Desvio-Padrão (mm)	1,4437 45	0,6004 44	0,8805 11	0,7239 01	0,2233 83	0,0624 5	0,6645 55	0,8015 82

## Testes para a variável quantidade de CI:

Teste T: <i>C. jejuni</i> e Ch			Teste T: <i>C. jejuni</i> e Ch/MC		
	<i>Alta</i>	<i>Baixa</i>		<i>Alta</i>	<i>Baixa</i>
Média	21,75	23,8833 3	Média	10,865	13,74
Variância	2,0844	0,36053 3	Variância	1,49645	0,9248
Observações	3	3	Observações	2	2
Variância agrupada	1,222467		Variância agrupada	1,210625	
Hipótese de diferença de média	0		Hipótese de diferença de média	0	
gl	4		gl	2	
Stat t	-2,36312		Stat t	-2,61296	
P(T<=t) uni-caudal	0,0387		P(T<=t) uni-caudal	0,060274	
t crítico uni-caudal	2,131847		t crítico uni-caudal	2,919986	
P(T<=t) bi-caudal	0,077399		P(T<=t) bi-caudal	0,120547	
t crítico bi-caudal	2,776445		t crítico bi-caudal	4,302653	
Teste T: <i>A. butzleri</i> e Ch			Teste T: <i>A. butzleri</i> e Ch/MC		
	<i>Alta</i>	<i>Baixa</i>		<i>Alta</i>	<i>Baixa</i>
Média	13,75	16,02	Média	10,38333	12,70333
Variância	0,0499	0,0039	Variância	0,441633	0,642533
Observações	3	3	Observações	3	3
Variância agrupada	0,0269		Variância agrupada	0,542083	
Hipótese de diferença de média	0		Hipótese de diferença de média	0	
gl	4		gl	4	
Stat t	-16,951		Stat t	-3,85923	
P(T<=t) uni-caudal	3,55E-05		P(T<=t) uni-caudal	0,00908	
t crítico uni-caudal	2,131847		t crítico uni-caudal	2,131847	
P(T<=t) bi-caudal	7,1E-05		P(T<=t) bi-caudal	0,018159	

t crítico bi-caudal	2,776445	t crítico bi-caudal	2,776445
---------------------	----------	---------------------	----------

## Testes para a variável matriz filmogénica:

Teste T: C. jejuni e alta			Teste T: C. jejuni e baixa		
	<i>Ch</i>	<i>Ch/MC</i>		<i>Ch</i>	<i>Ch/MC</i>
Média	21,75	10,77	Média	23,88333	13,88333
Variância	2,0844	0,7753	Variância	0,360533	0,524033
Observações	3	3	Observações	3	3
Variância agrupada	1,42985		Variância agrupada	0,442283	
Hipótese de diferença de média	0		Hipótese de diferença de média	0	
gl	4		gl	4	
Stat t	11,24612		Stat t	18,416	
P(T<=t) uni-caudal	0,000178		P(T<=t) uni-caudal	2,56E-05	
t crítico uni-caudal	2,131847		t crítico uni-caudal	2,131847	
P(T<=t) bi-caudal	0,000356		P(T<=t) bi-caudal	5,12E-05	
t crítico bi-caudal	2,776445		t crítico bi-caudal	2,776445	
Teste T: A. Butzleri e alta			Teste T: A. butzleri e baixa		
	<i>Ch</i>	<i>Ch/MC</i>		<i>Ch</i>	<i>Ch/MC</i>
Média	13,75	10,38333	Média	16,02	12,70333
Variância	0,0499	0,441633	Variância	0,0039	0,642533
Observações	3	3	Observações	3	3
Variância agrupada	0,245767		Variância agrupada	0,323217	
Hipótese de diferença de média	0		Hipótese de diferença de média	0	
gl	4		gl	4	
Stat t	8,317336		Stat t	7,144973	
P(T<=t) uni-caudal	0,000571		P(T<=t) uni-caudal	0,001015	
t crítico uni-caudal	2,131847		t crítico uni-caudal	2,131847	
P(T<=t) bi-caudal	0,001142		P(T<=t) bi-caudal	0,00203	
t crítico bi-caudal	2,776445		t crítico bi-caudal	2,776445	

## Testes para a variável microrganismos:

Teste T: Ch e alta			Teste T: Ch e baixa		
	<i>Variável 1</i>	<i>Variável 2</i>		<i>Variável 1</i>	<i>Variável 2</i>
Média	21,75	13,75	Média	23,88333	16,02
Variância	2,0844	0,0499	Variância	0,360533	0,0039
Observações	3	3	Observações	3	3
Variância agrupada	1,06715		Variância agrupada	0,182217	
Hipótese de diferença de média	0		Hipótese de diferença de média	0	
gl	4		gl	4	
Stat t	9,484684		Stat t	22,561	
P(T<=t) uni-caudal	0,000345		P(T<=t) uni-caudal	1,14E-05	
t crítico uni-caudal	2,131847		t crítico uni-caudal	2,131847	
P(T<=t) bi-caudal	0,00069		P(T<=t) bi-caudal	2,29E-05	
t crítico bi-caudal	2,776445		t crítico bi-caudal	2,776445	

Teste T: Ch/MC e alta			Teste T: Ch/MC e baixa		
	<i>Variável 1</i>	<i>Variável 2</i>		<i>Variável 1</i>	<i>Variável 2</i>
Média	10,77	10,38333	Média	13,88333	12,70333
Variância	0,7753	0,441633	Variância	0,524033	0,642533
Observações	3	3	Observações	3	3
Variância agrupada	0,608467		Variância agrupada	0,583283	
Hipótese de diferença de média	0		Hipótese de diferença de média	0	
gl	4		gl	4	
Stat t	0,607105		Stat t	1,892291	
P(T<=t) uni-caudal	0,288278		P(T<=t) uni-caudal	0,065701	
t crítico uni-caudal	2,131847		t crítico uni-caudal	2,131847	
P(T<=t) bi-caudal	0,576556		P(T<=t) bi-caudal	0,131403	
t crítico bi-caudal	2,776445		t crítico bi-caudal	2,776445	

## Apêndice C: Propriedades mecânicas dos filmes



**Tabela 1:** Resultados dos ensaios mecânicos para cada amostra de filmes de Ch e Ch/MC com e sem 2,5mL de CI.

Filme	Amostra	Espessura média (mm) (n=3)	Força máxima de tração (N)	TS (MPa)	E% (%)	EM (MPa)
Ch	1	0,063	24,073	38,010	46,014	933,220
	2	0,050	21,626	43,253	39,335	1180,759
	3	0,063	27,398	43,260	53,324	1030,899
	4	0,043	22,776	52,560	44,070	1223,961
	5	0,067	18,785	28,178	30,949	915,626
	6	0,050	24,467	48,934	51,879	1219,070
	7	0,047	25,045	53,668	48,420	1327,027
	8	0,053	22,675	42,516	40,176	1115,682
	9	0,043	20,319	46,889	44,150	1235,448
	10	0,033	20,322	60,965	39,306	1818,037
Ch/MC	1	0,040	16,525	41,313	24,409	1246,110
	2	0,047	15,172	32,511	23,499	1055,119
	3	0,047	22,663	48,563	33,713	1182,439
	4	0,050	20,639	41,278	33,823	1020,414
	5	0,050	17,187	34,374	23,406	1036,273
	6	0,060	19,481	32,469	23,296	966,927
	7	0,063	24,657	38,931	35,993	938,926
	8	0,030	20,034	66,781	38,452	1547,077
	9	0,043	16,949	39,113	40,362	1014,747
	10	0,037	16,939	46,198	26,144	1413,811
Ch + CI	1	0,220	6,862	3,119	135,591	19,998
	2	0,223	4,464	1,999	109,723	24,231
	3	0,220	5,298	2,408	124,094	14,507
	4	0,230	6,807	2,960	127,423	21,616
	5	0,227	8,583	3,787	142,196	20,133
	6	0,233	6,227	2,669	132,431	11,429
	7	0,223	6,101	2,732	132,045	8,938
	8	0,227	6,148	2,712	123,682	21,065
	9	0,227	5,728	2,527	129,679	13,609
	10	0,227	6,339	2,797	130,344	14,231
Ch/MC + CI	1	0,320	8,021	2,507	51,786	49,431
	2	0,323	9,842	3,044	65,871	45,775
	3	0,307	7,179	2,341	58,980	52,022
	4	0,303	7,772	2,562	57,937	49,150
	5	0,323	7,790	2,409	51,294	57,390
	6	0,313	7,858	2,508	52,733	48,009
	7	0,307	9,567	3,120	65,738	32,750
	8	0,320	7,400	2,313	50,699	34,085
	9	0,307	7,897	2,575	62,353	52,316
	10	0,310	9,147	2,951	68,885	34,859

**Análise estatística:**

Usando o *Microsoft Office Excel 2007* foram feitos testes t-student ( $\alpha=0,05$ ) para comparar dois conjuntos de resultados, considerando variâncias iguais entre as amostras.

**Tensão máxima de tração (TS):**

Teste T: duas amostras com variâncias iguais			Teste T: duas amostras com variâncias iguais		
	<i>Ch+CI</i>	<i>Ch/MC+CI</i>		<i>Ch</i>	<i>Ch/MC</i>
Média	2,770928	2,632875	Média	45,82324	42,15306
Variância	0,221354	0,087187	Variância	82,6168	103,5924
Observações	10	10	Observações	10	10
Variância agrupada	0,154271		Variância agrupada	93,10461	
Hipótese de diferença de média	0		Hipótese de diferença de média	0	
gl	18		gl	18	
Stat t	0,78594		Stat t	0,850525	
P(T<=t) uni-caudal	0,221063		P(T<=t) uni-caudal	0,203103	
t crítico uni-caudal	1,734064		t crítico uni-caudal	1,734064	
P(T<=t) bi-caudal	0,442127		P(T<=t) bi-caudal	0,406206	
t crítico bi-caudal	2,100922		t crítico bi-caudal	2,100922	

**Percentagem de alongamento na rutura (E%):**

Teste T: duas amostras com variâncias iguais			Teste T: duas amostras com variâncias iguais		
	<i>Ch+CI</i>	<i>Ch/MC+CI</i>		<i>Ch+CI</i>	<i>Ch</i>
Média	128,7207	58,62768	Média	128,7207	43,76242
Variância	74,06377	46,7689	Variância	74,06377	44,53753
Observações	10	10	Observações	10	10
Variância agrupada	60,41633		Variância agrupada	59,30065	
Hipótese de diferença de média	0		Hipótese de diferença de média	0	
gl	18		gl	18	
Stat t	20,16428		Stat t	24,66954	
P(T<=t) uni-caudal	4,18E-14		P(T<=t) uni-caudal	1,25E-15	
t crítico uni-caudal	1,734064		t crítico uni-caudal	1,734064	
P(T<=t) bi-caudal	8,36E-14		P(T<=t) bi-caudal	2,5E-15	
t crítico bi-caudal	2,100922		t crítico bi-caudal	2,100922	
Teste T: duas amostras com variâncias iguais			Teste T: duas amostras com variâncias iguais		
	<i>Ch+CI</i>	<i>Ch/MC</i>		<i>Ch/MC+CI</i>	<i>Ch</i>
Média	128,7207	30,30969	Média	58,62768	43,76242
Variância	74,06377	46,55241	Variância	46,7689	44,53753
Observações	10	10	Observações	10	10
Variância agrupada	60,30809		Variância agrupada	45,65322	
Hipótese de diferença de média	0		Hipótese de diferença de média	0	
gl	18		gl	18	
Stat t	28,33616		Stat t	4,91951	
P(T<=t) uni-caudal	1,1E-16		P(T<=t) uni-caudal	5,53E-05	
t crítico uni-caudal	1,734064		t crítico uni-caudal	1,734064	
P(T<=t) bi-caudal	2,19E-16		P(T<=t) bi-caudal	0,000111	
t crítico bi-caudal	2,100922		t crítico bi-caudal	2,100922	

Teste T: duas amostras com variâncias iguais			Teste T: duas amostras com variâncias iguais		
	<i>Ch/MC+CI</i>	<i>Ch/MC</i>	<i>Ch</i>	<i>Ch/MC</i>	
Média	58,62768	30,30969	Média	43,76242	30,30969
Variância	46,7689	46,55241	Variância	44,53753	46,55241
Observações	10	10	Observações	10	10
Variância agrupada	46,66066		Variância agrupada	45,54497	
Hipótese de diferença de média	0		Hipótese de diferença de média	0	
gl	18		gl	18	
Stat t	9,269836		Stat t	4,457335	
P(T<=t) uni-caudal	1,42E-08		P(T<=t) uni-caudal	0,000152	
t crítico uni-caudal	1,734064		t crítico uni-caudal	1,734064	
P(T<=t) bi-caudal	2,83E-08		P(T<=t) bi-caudal	0,000304	
t crítico bi-caudal	2,100922		t crítico bi-caudal	2,100922	

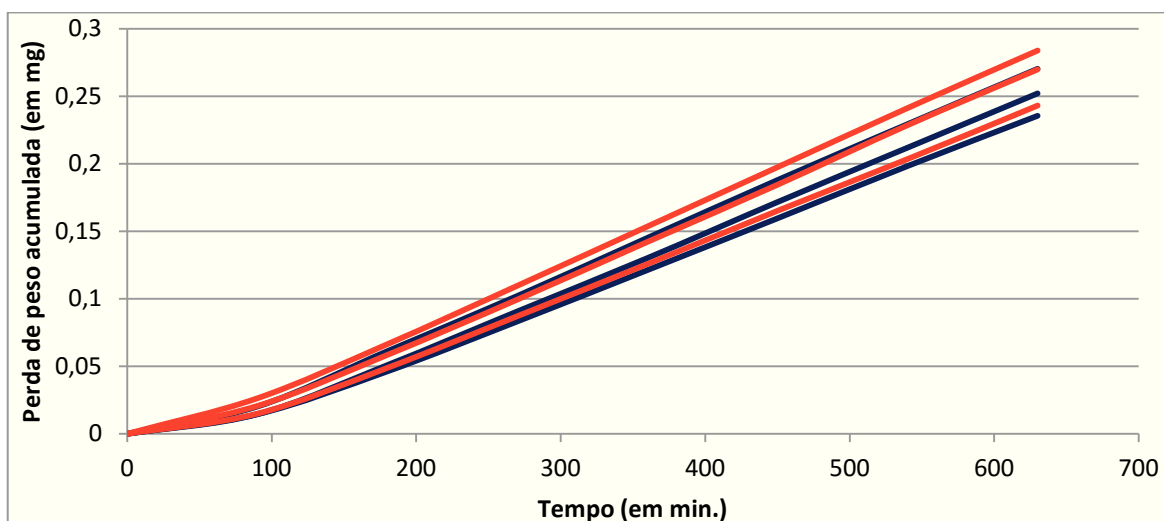
## Módulo de elasticidade (EM):

Teste T: duas amostras com variâncias iguais			Teste T: duas amostras com variâncias iguais		
	<i>Ch+CI</i>	<i>Ch/MC+CI</i>	<i>Ch</i>	<i>Ch/MC</i>	
Média	16,97564	45,57866	Média	1199,973	1142,184
Variância	25,59286	74,61576	Variância	65379,43	41337,25
Observações	10	10	Observações	10	10
Variância agrupada	50,10431		Variância agrupada	53358,34	
Hipótese de diferença de média	0		Hipótese de diferença de média	0	
gl	18		gl	18	
Stat t	-9,03565		Stat t	0,559404	
P(T<=t) uni-caudal	2,08E-08		P(T<=t) uni-caudal	0,29139	
t crítico uni-caudal	1,734064		t crítico uni-caudal	1,734064	
P(T<=t) bi-caudal	4,15E-08		P(T<=t) bi-caudal	0,58278	
t crítico bi-caudal	2,100922		t crítico bi-caudal	2,100922	



## Apêndice D: Permeabilidade ao vapor de água dos filmes





**Gráfico 1:** Velocidade de transferência de vapor de água para filmes de Ch (azul) e de Ch/MC (vermelho) com 2,5mL de CI, em triplicado, tendo o estado estacionário sido atingido aos 100min.

**Tabela 1:** Resultados obtidos para os triplicados de cada um dos filmes Ch e Ch/MC com 2,5mL de CI .

Filme	WVTR (mol/s.m <sup>2</sup> )	P2 (Pa)	Permeância (g/Pa.s.m <sup>2</sup> )	espessura média (mm)	WVP (g/Pa.s.m)
Ch 1	0,0001944	2439,070	5,772E-06	0,290	1,674E-09
Ch 2	0,0001832	2448,175	5,361E-06	0,280	1,501E-09
Ch 3	0,0001696	2459,263	4,875E-06	0,323	1,576E-09
Ch/MC 1	0,0001753	2454,677	5,074E-06	0,320	1,624E-09
Ch/MC 2	0,0001920	2440,987	5,685E-06	0,260	1,478E-09
Ch/MC 3	0,0001994	2434,963	5,962E-06	0,253	1,510E-09

**Tabela 2:** Condições de T e HR medidas ao longo do ensaio.

tempo (min)	HR (%)	T (°C)
0	51	26,1
90	52	26,1
180	53	26,4
270	53	26,3
360	54	26,5
450	54	26,6
540	54	26,8
630	54	26,9
<b>média</b>	<b>53,125</b>	<b>26,4625</b>

Análise estatística:

Usando o *Microsoft Office Excel 2007* foram feitos testes t-student ( $\alpha=0,05$ ) para comparar dois conjuntos de resultados, considerando variâncias iguais entre as amostras.

Teste T: duas amostras com variâncias iguais		
	<i>Ch-Comp</i>	<i>Ch/MC-Comp</i>
Média	5,33603E-06	5,57351E-06
Variância	2,01623E-13	2,06491E-13
Observações	3	3
Variância agrupada	2,04057E-13	
Hipótese de diferença de média	0	
gl	4	
Stat t	-0,643876984	
P(T<=t) uni-caudal	0,277357927	
t crítico uni-caudal	2,131846782	
P(T<=t) bi-caudal	0,554715853	
t crítico bi-caudal	2,776445105	

## Apêndice E: Teor de humidade dos filmes



**Tabela 1:** Resultados obtidos, em triplicados, para os filmes de Ch e Ch/MC com e sem 2,5 ml de CI

Conteúdo em água (%)			
Ch	Ch/MC	Ch + CI	Ch/MC +CI
15,00514	11,417	15,4820	14,6670
15,20701	11,63683	15,3463	14,7255
15,243	11,39576	16,4855	15,2343

Análise estatística:

Usando o *Microsoft Office Excel 2007* foram feitos testes t-student ( $\alpha=0,05$ ) para comparar dois conjuntos de resultados, considerando variâncias iguais entre as amostras.

Teste T: duas amostras com variâncias iguais			Teste T: duas amostras com variâncias iguais		
	Ch	Ch/MC		Ch	Ch + CI
Média	15,15172	11,4832	Média	15,15172	15,77124
Variância	0,016438	0,017815	Variância	0,016438	0,387178
Observações	3	3	Observações	3	3
Variância agrupada	0,017126		Variância agrupada	0,201808	
Hipótese de diferença de média	0		Hipótese de diferença de média	0	
gl	4		gl	4	
Stat t	34,3325		Stat t	-1,68902	
P(T<=t) uni-caudal	2,15E-06		P(T<=t) uni-caudal	0,083242	
t crítico uni-caudal	2,131847		t crítico uni-caudal	2,131847	
P(T<=t) bi-caudal	4,29E-06		P(T<=t) bi-caudal	0,166484	
t crítico bi-caudal	2,776445		t crítico bi-caudal	2,776445	

Teste T: duas amostras com variâncias iguais			Teste T: duas amostras com variâncias iguais		
	Ch	Ch/MC +CI		Ch/MC	Ch + CI
Média	15,15172	14,87559	Média	11,4832	15,77124
Variância	0,016438	0,097347	Variância	0,017815	0,387178
Observações	3	3	Observações	3	3
Variância agrupada	0,056892		Variância agrupada	0,202496	
Hipótese de diferença de média	0		Hipótese de diferença de média	0	
gl	4		gl	4	
Stat t	1,417842		Stat t	-11,6707	
P(T<=t) uni-caudal	0,114607		P(T<=t) uni-caudal	0,000154	
t crítico uni-caudal	2,131847		t crítico uni-caudal	2,131847	
P(T<=t) bi-caudal	0,229214		P(T<=t) bi-caudal	0,000308	
t crítico bi-caudal	2,776445		t crítico bi-caudal	2,776445	

Teste T: duas amostras com variâncias iguais			Teste T: duas amostras com variâncias iguais		
	<i>Ch/MC</i>	<i>Ch/MC +CI</i>		<i>Ch + CI</i>	<i>Ch/MC +CI</i>
Média	11,4832	14,87559	Média	15,77124	14,87559
Variância	0,017815	0,097347	Variância	0,387178	0,097347
Observações	3	3	Observações	3	3
Variância agrupada	0,057581		Variância agrupada	0,242262	
Hipótese de diferença de média	0		Hipótese de diferença de média	0	
gl	4		gl	4	
Stat t	-17,3146		Stat t	2,228647	
P(T<=t) uni-caudal	3,26E-05		P(T<=t) uni-caudal	0,044873	
t crítico uni-caudal	2,131847		t crítico uni-caudal	2,131847	
P(T<=t) bi-caudal	6,53E-05		P(T<=t) bi-caudal	0,089746	
t crítico bi-caudal	2,776445		t crítico bi-caudal	2,776445	

## Apêndice F: Ensaio antimicrobianos em carne de frango



**Tabela 1:** Carga microbiana (contagem em UFC/g ou logUFC/g) das amostras de carne de 5g nos ensaios antimicrobianos em carne de frango.

Ensaio	tempo (dias)	Inoculação	Embalagem	Contagem (UFC/g)	média (UFC/g)	média (log UFC/g)
1º	0	sem		6,80E+03 9,00E+02 1,00E+02	2,60E+03	3,414973348
	0	<i>C. jejuni</i> ATCC 33560	-	1,40E+04 2,40E+04 1,50E+04	1,77E+04	4,247154615
	0	<i>A. butzleri</i> LMG 6620		1,10E+04 3,50E+04 3,30E+04	2,63E+04	4,420505837
	5		Saco PA/PE	2,70E+06 1,50E+06 3,20E+06	2,47E+06	6,392110465
	5	sem	Ch+HP-γ-CD	1,00E+02 7,00E+02 1,00E+02	3,00E+02	2,477121255
	5		Ch+CI	1,00E+02 1,00E+02	1,00E+02	2
	5		Saco PA/PE	3,20E+06 1,80E+06 5,30E+05	1,84E+06	6,265603877
	5	<i>C. jejuni</i> ATCC 33560	Ch+HP-γ-CD	3,10E+03 1,50E+03 3,90E+03	2,83E+03	3,452297671
	5		Ch+CI	4,60E+03 4,00E+02 7,00E+02	1,90E+03	3,278753601
	5		Saco PA/PE	1,20E+06 1,80E+06 1,50E+06	1,50E+06	6,176091259
	5	<i>A. butzleri</i> LMG 6620	Ch+HP-γ-CD	6,00E+02 4,00E+02 2,50E+03	1,17E+03	3,06694679
	5		Ch+CI	2,00E+03 4,00E+02 4,00E+02	9,33E+02	2,970036777
	10		Saco PA/PE	1,50E+06 1,20E+06 3,00E+02	1,40E+06	6,146128036
	10	sem		6,00E+02 7,80E+02 6,00E+02	5,60E+02	2,748188027

			3,20E+02		
10		Ch+CI	1,40E+02	2,03E+02	2,30820858
			1,50E+02		
			4,00E+07		
10		Saco PA/PE	7,20E+06	1,89E+07	7,277227081
			9,60E+06		
			7,00E+02		
10	<i>C. jejuni</i> ATCC 33561	Ch+HP-γ-CD	1,10E+03	1,77E+03	3,247154615
			3,50E+03		
			7,00E+02		
10		Ch+CI	8,00E+02	7,50E+02	2,875061263
			-		
			1,60E+07		
10		Saco PA/PE	3,00E+07	1,97E+07	7,293730757
			1,30E+07		
			5,20E+02		
10	<i>A. butzleri</i> LMG 6621	Ch+HP-γ-CD	2,30E+02	3,10E+02	2,491361694
			1,80E+02		
			7,40E+03		
10		Ch+CI	5,00E+01	2,92E+03	3,464886798
			1,30E+03		
			2,60E+05		
0		-	4,20E+05	3,87E+05	5,587336735
			4,80E+05		
			3,10E+05		
5		Saco PA/PE	1,90E+05	2,47E+05	5,392110465
			2,40E+05		
2º	<i>C. jejuni</i> ATCC 33560	Ch+HP-γ-CD	2,00E+04		
5		+ sacco PA/PE	1,00E+05	4,47E+04	4,649983544
			1,40E+04		
			2,10E+04		
5		Ch+CI + sacco PA/PE	5,10E+04	3,10E+04	4,491361694
			2,10E+04		

1,00E+02: valor inferior ao referido

1,50E+06: valor superior ao referido

Análise estatística: 1º ensaio (R software 3.0.3):

## ANOVA todos os fatores:

```

Response: UFC.g

              Sum Sq Df F value    Pr(>F)
embalagem    4.4604e+14  2 14.0951 1.234e-05 ***
inoculação   6.5964e+13  2  2.0845 0.1344459
tempo..dias. 3.1880e+14  2 10.0743 0.0001958 ***
embalagem:inoculação 1.2783e+14  4  2.0197 0.1049319
embalagem:tempo..dias. 6.0516e+14  4  9.5617 6.770e-06 ***
inoculação:tempo..dias. 1.5094e+14  4  2.3849 0.0627842 .
embalagem:inoculação:tempo..dias. 2.9656e+14  8  2.3428 0.0309516 *
Residuals    8.3859e+14 53
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

```

## ANOVA todos os fatores (sem os sacos PA/PE)

```

Response: UFC.g

              Sum Sq Df F value    Pr(>F)
embalagem          835  1  0.0000  0.9956
inoculação       705551288  2 13.1555 5.486e-05 ***
tempo..dias.    2445215873  2 45.5927 1.793e-10 ***
embalagem:inoculação 4426352  2  0.0825  0.9210
embalagem:tempo..dias. 1860286  2  0.0347  0.9659
inoculação:tempo..dias. 1045275171  4  9.7449 2.095e-05 ***
embalagem:inoculação:tempo..dias. 6605589  4  0.0616  0.9927
Residuals       938555467 35
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

```

## ANOVA todos os fatores (sem os sacos PA/PE e sem as amostras não inoculadas)

```

Response: UFC.g

              Sum Sq Df F value    Pr(>F)
embalagem       101563  1  0.0026  0.9595
inoculação     58008761  1  1.5082  0.2318
tempo..dias.   3299066270  2 42.8878 1.737e-08 ***
embalagem:inoculação 3990862  1  0.1038  0.7503
embalagem:tempo..dias. 3240996  2  0.0421  0.9588
inoculação:tempo..dias. 171552519  2  2.2302  0.1302
embalagem:inoculação:tempo..dias. 5129001  2  0.0667  0.9357
Residuals     884617400 23
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

```

## ANOVA fator inoculação e tempo (sacos PA/PE)

```

Response: UFC.g

              Sum Sq Df F value    Pr(>F)
inoculação     1.9558e+14  2  2.0990 0.151577
tempo..dias.   9.3282e+14  2 10.0113 0.001194 **
inoculação:tempo..dias. 4.4749e+14  4  2.4013 0.088032 .
Residuals     8.3859e+14 18
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

```

### Análise estatística: 2º ensaio (*R software 3.0.3*)

ANOVA todos os fatores:

```
Response: UFC.g
          Sum Sq Df F value    Pr(>F)
embalagem 4.3751e+10 2  2.9143  0.09298 .
tempo..dias. 3.5084e+11 1 46.7389 1.806e-05 ***
embalagem:tempo..dias. 4.3751e+10 2  2.9143  0.09298 .
Residuals  9.0077e+10 12
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
```

ANOVA (sem t=0), 1 fator (embalagem):

```
Response: UFC.g
          Sum Sq Df F value    Pr(>F)
embalagem 8.7503e+10 2  21.039 0.001944 **
Residuals 1.2477e+10  6
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
```

ANOVA todos os fatores (sem sacos PA/PE):

```
Response: UFC.g
          Sum Sq Df F value    Pr(>F)
embalagem 1.4008e+08 1  0.0197  0.8919
tempo..dias. 3.6505e+11 1 51.2860 9.601e-05 ***
embalagem:tempo..dias. 1.4008e+08 1  0.0197  0.8919
Residuals  5.6944e+10  8
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
```

Teste t (variâncias iguais) para os valores de t=0d e t=5d com sacos PA/PE:

Teste T: duas amostras com variâncias iguais		
	0 dias	5 dias
Média	3,87E+05	2,47E+05
Variância	1,29E+10	3,63E+09
Observações	3	3
Variância agrupada	8283333333	
Hipótese de diferença de média	0	
gl	4	
Stat t	1,883957477	
P(T<=t) uni-caudal	0,066336586	
t crítico uni-caudal	2,131846782	
P(T<=t) bi-caudal	0,132673173	
t crítico bi-caudal	2,776445105	