Artigo

Estudo da Propriedade Antimicrobiana de Especiarias em Filmes de Amido: Uma Proposta Experimental

Maciel, C. C.; Rodrigues, J. S.; de Freitas, A. S. M.; Ferreira, M.*

Rev. Virtual Quim., 2020, 12 (5), 1236-1243. Data de publicação na Web: 7 de Agosto de 2020

<http://rvq.sbq.org.br>

Study of Antimicrobial Property of Spices in Starch Films: An Experimental Proposal

Abstract: The proposed experiment studies the antimicrobial properties of spices, cloves and cinnamon. Materials of easy access and low cost were used, aiming that the experimental procedure can be applied in laboratory classes of undergraduate courses. In this context, corn starch films were produced with infusions of spices. To facilitate the handling of the film, a plasticizer, glycerol, was added. The films were prepared from solutions and dried at room temperature. The visual analysis, documented by photos, was performed daily for 7 days. The visual comparison of the films was performed with the control (without spices), cloves and cinnamon within the expiration date, and with the same expired spices. The total duration of the experiment was one week, with the preparation of the films made in the first class, followed by the daily monitoring of the samples and the closing of the experiment in the next week's class. It was possible to observe the gradual growth of microorganisms in the control films and those prepared with extracts of cloves and cinnamon out of date. While for films prepared with cloves and cinnamon within the current validity period, microbial formations were not observed.

Keywords: Clove; cinnamon; starch thermoplastic; antimicrobial properties; teaching experiment.

Resumo

O experimento proposto estuda a propriedade antimicrobiana das especiarias, cravo e canela. Foram utilizados materiais de fácil acesso e baixo custo, visando que o procedimento experimental possa ser aplicado em aulas de laboratório de cursos de graduação. Nesse contexto, filmes de amido de milho foram produzidos com infusões de especiarias. Para facilitar o manuseio do filme foi adicionado um agente plastificante, o glicerol. Os filmes foram preparados a partir de soluções e secos à temperatura ambiente. A análise visual, documentada por fotos, foi realizada diariamente por 7 dias. A comparação visual dos filmes foi realizada com o controle (sem especiarias), o cravo e a canela dentro do prazo de validade, e com as mesmas especiarias vencidas. A duração total do experimento foi de uma semana, com a preparação dos filmes feitos na primeira aula, seguida pelo monitoramento diário das amostras e o fechamento do experimento na aula da semana seguinte. Foi possível observar o crescimento gradual de microrganismos nos filmes de controle e nos preparados com extratos de cravo e canela fora do prazo de validade. Enquanto para os filmes preparados com cravo e canela no prazo de validade vigente não foram observadas formações microbianas.

Palavras-chave: Cravo; canela; amido termoplástico; propriedades antimicrobianas; experimento de ensino.

* Universidade Federal de São Carlos, Rodovia João Leme dos Santos Km 110, Sorocaba, CEP 18052-780, São Paulo-SP, Brasil.

Estudo da Propriedade Antimicrobiana de Especiarias em Filmes de Amido: Uma Proposta Experimental

Cristiane C. Maciel,^{a,b} Jéssica S. Rodrigues,^b Amanda S. M. de Freitas,^{b,c}
Marystela Ferreira^{b*}

^a Universidade Estadual Paulista, campus Sorocaba, Avenida Três de Março 511, Aparecidinha, CEP 18087-180, Sorocaba - SP, Brasil.

^b Universidade Federal de São Carlos, CCTS, Rodovia João Leme dos Santos (SP-264) Km 110, s/n, Itinga, CEP 18052-780, Sorocaba - SP, Brasil.

^c Universidade Federal de São Paulo, campus São José dos Campos, Rua Talim 330, Vila Nair, CEP 12231-280, São José dos Campos - SP, Brasil.

*marystela@ufscar.br

Recebido em 8 de Janeiro de 2020. Aceito para publicação em 21 de Julho de 2020.

1. Introdução

2. Materiais e Métodos

2.1. Infusão das especiarias

2.2. Preparo dos filmes

3. Resultados e Discussões

4. Conclusão

1. Introdução

O desenvolvimento de materiais provenientes de recursos renováveis para diversas aplicações cresce gradualmente. Isso ocorre pela busca por produzir materiais com baixo custo, resistentes e biodegradáveis.^{1,2} Os filmes biodegradáveis são formados a partir de biopolímeros, como proteínas (caseína, zeína, glúten e colágeno), polissacarídeos e seus derivados (amido, celulose, quitosana, alginatos, pectinas e gomas).³⁻⁵

Dentre a grande variedade de biopolímeros existentes, o escolhido foi o amido de milho, por ser um polissacarídeo de fácil obtenção e baixo custo.² O amido de milho é armazenado sob a forma de grânulos que apresentam adequado grau de organização molecular, o que confere ao material um caráter parcialmente cristalino, com um grau de cristalinidade variando de 20

a 45%. Formado por dois tipos de polímeros de glicose: (i) amilose, que é um polímero linear composto por unidades de D-glicose ligadas por ligações α -(1 $\rightarrow$ 4), com grau de polimerização de 200 a 3000, dependendo da fonte do amido; (ii) amilopectina, que é um polímero altamente ramificado, com unidades de D-glicose ligadas através de ligações α -(1 $\rightarrow$ 4) e ramificações em α -(1 $\rightarrow$ 6).^{2,6}

O emprego do amido, como material bioplástico, somente teve início nas últimas décadas do século XX. Isso se deve ao fato de que em sua forma natural, não é um material termoplástico, ou seja, a uma dada temperatura, apresenta alta viscosidade podendo ser conformado e moldado o estado fundido. Sua estrutura granular e cristalinidade de difícil destruição, em função das fortes interações de hidrogênio, faz com que sua temperatura de fusão seja maior que sua temperatura de degradação.^{7,8}

A formação do amido termoplástico conhecido como TPS, do inglês *Thermoplastic Starch*, ocorre durante a desestruturação do grânulo do amido com a perda da estrutura cristalina, devido à ação de um agente plastificante. Comumente os polióis, como o glicerol, são mais utilizados, pois atuam reduzindo as forças intermoleculares e aumentando a mobilidade das cadeias, com a diminuição de zonas quebradiças, resultando em materiais com temperatura de transição vítrea (Tg).⁹ O processo ao qual o amido é submetido para a formação do TPS é denominado plastificação e pode ser dividido em três estágios: (i) os grânulos do amido absorvem o plastificante; (ii) os grânulos absorvem energia e suas estruturas cristalinas fundem, o que facilita a formação de novas ligações entre o amido e o plastificante; (iii) o termoplástico é formado com o resfriamento do material abaixo da temperatura de fusão.^{1,9} A técnica utilizada para a produção dos filmes bioplástico foi o *Casting*. Esse método consiste na solubilização do material em um solvente, aplicação desta solução sobre um suporte e a posterior evaporação do solvente na temperatura ambiente.¹⁰

Os filmes bioplásticos podem ser aditivados com o intuito de se obter diversas propriedades, dentre elas a antimicrobiana, sendo divididas em dois grupos: i) que não mata e outro ii) que atua matando os microrganismos. No primeiro grupo, estão os agentes bacteriostáticos que impedem a multiplicação das bactérias. Já o segundo grupo é dividido em agente bactericida e agente bacteriolítico. Os bactericidas agem matando de forma direta os microrganismos, mas não necessariamente destroem as bactérias. Os bacteriolíticos, além de matar as bactérias destroem sua parede celular.^{11,12}

As especiarias vêm sendo estudadas devido as suas propriedades antimicrobianas e, também, pela sua capacidade aromatizante e baixo custo.^{13,14} Na literatura, estudos apontam que o uso de especiarias como o cravo e a canela podem conferir esse tipo de propriedade a alimentos,

medicamentos, entre outros. Sendo o eugenol no cravo e o cinamaldeído na canela, os principais componentes a que se atribuem a propriedade antimicrobiana dos óleos essenciais dessas especiarias, Figura 1.¹⁵

O eugenol é um composto fenólico, que vem sendo amplamente utilizado devido à sua propriedade antimicrobiana, baixa toxicidade e alta lipossolubilidade o que possibilita uma fácil absorção através das membranas lipídicas e rápido acesso ao local de ação, podendo atingir alvos intracelulares. A lipossolubilidade é atribuída a inibição da proliferação, que se dá pela ruptura da membrana citoplasmática bacteriana, atuando como um agente bacteriolítico.^{16,17}

Já o cinamaldeído é um aldeído fenilpropanoide, que apresenta caráter hidrofóbico. Alguns estudos demonstram que o efeito bactericida do cinamaldeído deve-se à inibição da captação de glicose pela bactéria, interferindo assim no metabolismo energético do microrganismo.¹⁸

O experimento proposto nesse artigo utiliza materiais de fácil acesso e baixo custo como o amido de milho e a glicerina, ambos de uso doméstico, a fim de produzir filmes termoplásticos. Através da incorporação dos extratos aquosos de especiarias alimentícias no preparo dos filmes, foi possível identificar a ação antimicrobiana do cravo e da canela de forma comparativa e visual. Além do arranjo experimental simples, os resultados obtidos são facilmente apresentados por análise visual e o procedimento pode ser aplicado em aulas de laboratório de ciências, química ou disciplinas correlatas.

2. Materiais e Métodos

Para o experimento, foram utilizados materiais acessíveis de custo reduzido e baixa periculosidade, como amido de milho comercial, botões de cravo e canela em pó (todos adquiridos em supermercado) e glicerina (encontrada em farmácia).

Figura 1. Estruturas químicas do eugenol e cinamaldeído

2.1. Infusão das especiarias

Na primeira etapa do procedimento, foram realizadas infusões das especiarias¹⁹ para extrair seus princípios ativos. As soluções obtidas foram empregadas como agentes antimicrobianos no preparo dos filmes. As especiarias estudadas foram: cravo e canela dentro do prazo de validade vigente, e as mesmas especiarias vencidas (Figura 2).

Um béquer com 120 mL de água destilada foi acondicionado em uma placa aquecedora, sob agitação, até a temperatura de ebulição da água (~100°C). Depois de atingida a temperatura de ebulição, o aquecimento e a agitação foram desligados e 12 g de canela vencida foram adicionados ao béquer, coberto com um vidro relógio e mantido em repouso por 5 minutos. Em seguida, a mistura foi filtrada através de uma filtração simples, o filtrado foi mantido em dessecador, até atingir a temperatura ambiente (~25°C) e o sólido foi desprezado. O mesmo procedimento foi realizado para as demais especiarias individualmente.

2.2. Preparo dos filmes

Para a avaliação da propriedade antimicrobiana das especiarias foram preparados cinco tipos diferentes de filmes: i) filme de amido controle (sem especiarias); ii) filme de amido com infusão de cravo; iii) filme de amido com infusão de canela e outros dois filmes de amido com infusões de especiarias vencidas iv) canela e v) cravo. Tais filmes foram obtidos utilizando 10 g de amido de

milho, 5 g de glicerol e 85 mL de água destilada (Controle) e para os filmes com especiarias, a água destilada foi substituída pela infusão de cada especiaria. Posteriormente, o béquer com os constituintes de cada filme foi acondicionado em prancha aquecedora, sob agitação, até atingir a temperatura de aproximadamente 80°C e mantido nessa temperatura por 5 minutos, conforme mostra a Figura 3.

Após esse período, a mistura apresentou um aspecto viscoso, sendo vertida, em seguida, em placa de Petri, Figura 4, para a secagem em temperatura ambiente (~25°C) e formação dos filmes. As placas permaneceram abertas e foram mantidas na capela, no laboratório, durante o período total de 7 dias.

3. Resultados e Discussões

O processo de extração dos princípios ativos do cravo e da canela permite ao docente explorar o conceito de extração, enfatizando a importância da temperatura e do tempo de extração no resultado final. Podendo ser feito, também, um paralelo com os conhecimentos prévios dos discentes no preparo de chás por infusão. O posterior preparo dos filmes, a partir dos extratos, abrange uma técnica importante nas aulas de química: o preparo de soluções. Nessa parte do experimento, é possível abordar a estequiometria da reação, com as quantidades dos componentes da solução e o processo de plastificação do amido, por meio da presença de calor e a evaporação em

Figura 2. Especiarias utilizadas nos filmes de amido: canela (A), canela vencida (B), cravo (C) e cravo vencido (D)

Figura 3. Sistema para produção dos filmes com aquecimento e agitação

Figura 4. Filmes recém-preparadas, vertidos em placas de Petri, controle (esquerda) e cravo (direita).

temperatura ambiente. É importante lembrar que, devem ser tomados os devidos cuidados para manipulação de líquidos e superfícies quentes.

Com base na análise visual dos filmes obtidos no experimento, foi possível observar a perda de água gradativa sofrida pelas amostras, que foram se tornando cada dia mais secas e se fracionaram em pedaços menores. Após decorridos os 7 dias de experimento, foi possível remover os pedaços dos filmes das placas, que apresentaram aspecto plastificado (Figura 5).

Mesmo possuindo materiais de baixíssima periculosidade em sua composição, os filmes devem ser manipulados com luvas e a inalação, também, deve ser evitada, uma vez que os microrganismos presentes, mesmo sendo ambientais, podem ser oportunistas e capazes de manifestar sua patogenicidade em determinados indivíduos, se os devidos cuidados não forem tomados.

Com relação à presença de microrganismos, a análise diária dos filmes foi registrada através de fotografias, conforme Figura 6. A análise das imagens fotográficas revelou que na amostra

controle (sem especiarias), o crescimento dos microrganismos foi gradativo. A partir do quarto dia, o grau de desidratação dos filmes foi tamanho que inviabilizou o crescimento da grande maioria dos microrganismos, que se manteve praticamente estagnado até o sétimo dia de acompanhamento, o mesmo comportamento foi observado para amostras fora do prazo de validade.

Para as amostras com extrato de cravo e canela dentro do prazo vigente, não houve crescimento de microrganismos para as mesmas condições experimentais, mostrando a ação antimicrobiana provocada pela adição dos extratos aquosos das especiarias empregadas. A barreira ao crescimento aparente de microrganismos pode ser atribuída ao eugenol (cravo) e cinamaldeído (canela), conforme descrito na literatura,¹⁵⁻¹⁸ presentes nos óleos essenciais das especiarias adicionadas aos filmes, corroborando como os resultados obtidos neste trabalho. O mecanismo de inibição do eugenol acontece a partir da inativação do crescimento microbiano, já para o cinamaldeído, ocorre através da inibição da captação de glicose.¹⁶⁻¹⁸

Figura 5. Pedaço do filme removido da placa após uma semana de secagem

Figura 6. Acompanhamento dos resultados obtidos no período de 7 dias, com intervalos de 0, 48, 96 e 168 horas (vertical) e controle, canela, canela vencida, cravo e cravo vencido (horizontal), respectivamente

Já nos filmes com infusão de especiarias vencidas, o crescimento foi aparentemente mais rápido e volumoso, quando comparado ao controle, comprovando que o prazo de validade deve ser respeitado para obter as propriedades desejadas. Uma provável explicação para que não tenha ocorrido a inibição de crescimento de microrganismos, é a degradação dos óleos essenciais presentes na canela e no cravo, levando ao comprometimento de seus princípios ativos como o cinamaldeído e o eugenol. Há três tipos de degradações mais comuns nos óleos, que são a degradação pela exposição à luz, a oxidação do material pelo contato com oxigênio, que pode ser oriundo do ar ou da umidade, e o calor. Assim, os cuidados com o armazenamento, a boa qualidade dos materiais e o respeito da validade

devem ser observados antes da execução dos experimentos.²⁰⁻²³

4. Conclusão

Com base nos experimentos, foi possível realizar um comparativo visual, entre a proliferação dos microrganismos nas amostras com e sem especiarias, comprovando assim, que elas agem retardando o crescimento de microrganismos. Diferentemente das demais amostras produzidas com a presença de especiarias dentro do prazo de validade, os filmes formulados com canela e cravo vencidos apresentaram formação de microrganismo, demonstrando a importância de

que as especiarias sejam utilizadas dentro do prazo de validade. O procedimento desenvolvido apresentou resultados passíveis de serem interpretados de forma visual e intuitiva, por meio da comparação entre os tipos de filmes e a evolução diária das amostras. Além de poder ser reproduzido de forma simples e praticamente sem riscos, se tomados os devidos cuidados de manipulação sugeridos. Assim, o experimento se mostrou aplicável em aulas de laboratório para o Ensino Médio e Superior, abordando de forma interdisciplinar os conceitos envolvidos.

Agradecimentos

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001. Número do Processo: 1823185 (ASMF), 1838554 (JSR) e 88887.497915/2020-00 (CCM).

Referências Bibliográficas

- ¹ Santos, R. A. L.; Muller, C. M. O.; Grossmann, M. V. E.; Mali, S.; Yamashita, F. Starch/poly (butylene adipate-co-terephthalate)/montmorillonite films produced by blow extrusion. *Q uimica Nova* **2014**, *37*, 937. [CrossRef]
- ² Luchese, C. L.; Benelli, P.; Spada, J. C.; Tessaro, I. C. Impact of the starch source on the physicochemical properties and biodegradability of different starch-based films. *Journal of Applied Polymer Science* **2018**, *135*, 46564. [CrossRef]
- ³ Gupta, H.; Kumar, H.; Kumar, M.; Gehlaut, A. K.; Gaur, A.; Sachan, S.; Park, J.-W. Synthesis of biodegradable films obtained from rice husk and sugarcane bagasse to be used as food packaging material. *Environmental Engineering Research* **2020**, *25*, 506. [CrossRef]
- ⁴ Zhang, J.; Xu, W.-R.; Zhang, Y.-C.; Han, X.-D.; Chen, C.; Chen, A. In situ generated silica reinforced polyvinyl alcohol/liquefied chitin biodegradable films for food packaging. *Carbohydrate Polymers* **2020**, *238*, 116182. [CrossRef] [PubMed]
- ⁵ Yang, Y.; Li, P.; Jiao, J.; Yang, Z.; Lv, M.; Li, Y.; Zhou, C.; Wang, C.; He, Z.; Liu, Y.; Song, S. Renewable sourced biodegradable mulches and their environment impact. *Scientia Horticulturae* **2020**, *268*, 109375. [CrossRef]
- ⁶ Avérous, L.; Pollet, E. Em *Environmental Silicate Nano-Biocomposites*. Avérous, L.; Pollet, E., eds; Springer: London, 2012, p.219-235 [CrossRef]
- ⁷ Fan, Y.; Picchioni, F. Modification of starch: a review on the application of “green” solvents and controlled functionalization. *Carbohydrate Polymers* **2020**, *241*, 116350. [CrossRef]
- ⁸ Liu, P.; Yu, L.; Liu, H.; Chen, L.; Li, L. Glass transition temperature of starch studied by a high-speed DSC. *Carbohydrate Polymers* **2009**, *77*, 250. [CrossRef]
- ⁹ Nunes, M. A. B. S.; Marinho, V. A. D.; Falcão, G. A. M.; Canedo, E. L.; Bardi, M. A. G.; Carvalho, L. H. Rheological, mechanical and morphological properties of poly(butylene adipate-co-terephthalate)/thermoplastic starch blends and its biocomposite with babassu mesocarp. *Polymer Testing* **2018**, *70*, 281. [CrossRef]
- ¹⁰ Oksman, K.; Aitomäki, Y.; Mathew, A. P.; Siqueira, G.; Zhou, Q.; Butylina, S.; Tanpichai, S.; Zhou, X.; Hooshmand, S. Review of the recent developments in cellulose nanocomposite processing. *Composites Part A: Applied Science and Manufacturing* **2016**, *83*, 2. [CrossRef]
- ¹¹ Rahal Jr., J. J.; Simberkoff, M. S. Bactericidal and bacteriostatic action of chloramphenicol against meningeal pathogens. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **1979**, *16*, 13. [CrossRef] [PubMed]
- ¹² Almeshdar, H. A.; El-Baky, N. A.; Alhaider, A. A.; Almuhaideb, S. A.; Alhaider, A. A.; Albiheyri, R. S.; Uversky, V. N.; Redwan, E. M. Bacteriostatic and Bactericidal Activities of Camel Lactoferrins Against *Salmonella enterica* Serovar Typhi. *Probiotics and Antimicrobial Proteins* **2020**, *12*, 18. [CrossRef] [PubMed]
- ¹³ Beraldo, C.; Daneluzzi, N. S.; Scanavacca, J.; Doyama, J. T.; Fernandes Júnior, A.; Moritz, C. M. F. Eficiência de óleos essenciais de canela e cravo-da-índia como sanitizantes na indústria de alimentos. *Pesquisa Agropecuária Tropical* **2013**, *43*, 436. [CrossRef]
- ¹⁴ Dhara, L.; Tripathi, A. Sub-acute toxicological and behavioural effects of two candidate therapeutics, cinnamaldehyde and eugenol, for treatment of ESBL producing-quinolone resistant pathogenic *Enterobacteriaceae*. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* **2020**, *47*, 977. [CrossRef] [PubMed]
- ¹⁵ Sousa, A. M.; Waldman, W. R. Antimicrobial properties of spices: An activity for high school or introductory chemistry or biology. *Journal of Chemical Education* **2014**, *91*, 103. [CrossRef]

- ¹⁶ Usta, J.; Kreydiyyeh, S.; Bajakian, K.; Nakkash-Chmaissee, H. In vitro effect of eugenol and cinnamaldehyde on membrane potential and respiratory chain complexes in isolated rat liver mitochondria. *Food and Chemical Toxicology* **2002**, *40*, 935. [CrossRef]
- ¹⁷ Jia, C.; Cao, D.; Ji, S.; Zhang, X.; Muhoza, B. Tannic acid-assisted cross-linked nanoparticles as a delivery system of eugenol: The characterization, thermal degradation and antioxidant properties. *Food Hydrocolloids* **2020**, *104*, 105717. [CrossRef]
- ¹⁸ Figueiredo, C. S. S.; de Oliveira, P. V.; Saminez, W. F. S.; Diniz, R. M.; Rodrigues, J. F. S.; da Silva, M. S. M.; da Silva, L. C. N.; Grisotto, M. A. G. Óleo essencial da Canela (Cinamaldeído) e suas aplicações biológicas. *Revista de Investigação Biomédica* **2017**, *9*, 192. [CrossRef]
- ¹⁹ Querubina, A. S.; Coser, M. A.; Waldman, W. R. Máquina de café expresso para extração de óleos essenciais: uma proposta experimental. *Química Nova na Escola* **2016**, *38*, 269. [CrossRef]
- ²⁰ Kharat, M.; Skrzynski, M.; Decker, E. A.; McClements, D. J. Enhancement of chemical stability of curcumin-enriched oil-in-water emulsions: Impact of antioxidant type and concentration. *Food Chemistry* **2020**, *320*, 126653. [CrossRef] [PubMed]
- ²¹ Sajib, M.; Undeland, I. Towards valorization of herring filleting by-products to silage 2.0: Effect of temperature and time on lipid oxidation and non-enzymatic browning reactions. *LWT* **2020**, *127*, 109441. [CrossRef]
- ²² Khammar, S.; Bahramifar, N.; Younesi, H. Preparation and surface engineering of CM-β-CD functionalized Fe₃O₄@TiO₂ nanoparticles for photocatalytic degradation of polychlorinated biphenyls (PCBs) from transformer oil. *Journal of Hazardous Materials* **2020**, *394*, 122422. [CrossRef] [PubMed]
- ²³ Zhang, Z.; Wan, C.; Song, P.; Xie, Y.; Zhang, Y.; Wang, S. Soybean oil induced efficient thermal-oxidative degradation of covalently crosslinked styrene butadiene rubber. *Journal of Applied Polymer Science* **2020**, *137*, 48935. [CrossRef]