

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Agroindustrial



Dissertação

**Atividade antimicrobiana e o efeito do 3-(*p*-clorofenil)tio citronelal em bactérias
patogênicas e deteriorantes com importância em alimentos**

Júlia Coswig Goldbeck

Pelotas, 2012



**Atividade antimicrobiana e o efeito do 3-(*p*-clorofenil)tio citronelal em bactérias patogênicas e deteriorantes:
importância em alimentos**

Júlia Coswig Goldbeck 2012

Júlia Coswig Goldbeck

Atividade antimicrobiana e o efeito do 3-(*p*-clorofenil)tio citronelal em bactérias patogênicas e deteriorantes com importância em alimentos

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Agroindustrial da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia Agroindustrial.

Comitê de Orientação:

Orientador: Prof. Dr. Eder João Lenardão

Co-orientador: Prof. Dr. Wladimir Padilha da Silva

Colaboradora: Prof^a. Dr^a. Amanda Motta

Pelotas, 2012

Catálogo na Publicação:
Maria Fernanda Monte Borges
CRB-10/1011

G618a Goldbeck, Júlia Coswig
Atividade antimicrobiana e o efeito do 3-(p-clorofenil) tio citronelal em
bactérias patogênicas e deteriorantes com importância em alimentos /
Júlia Coswig Goldbeck ; orientador Éder João Lenardão ; co-orientadores
Amanda Motta, Wladimir Padilha da Silva. – Pelotas, 2012.
67 f.

Dissertação (Mestrado em Ciências) – Programa de Pós-Graduação
em Ciência e Tecnologia Agroindustrial. Faculdade de Agronomia Eliseu
Maciel. Universidade Federal de Pelotas.

1. Bioatividade 2. Micro-organismos 3. Óleos essenciais 4. Bactérias
I. Lenardão, Éder João (orient.) II. Motta, Amanda (co-orient.) III. Silva,
Wladimir Padilha da IV. Título.

CDD 664.6
668.5

Banca examinadora:

PROF. DR. ÉDER JOÃO LENARDÃO – ORIENTADOR

PROF. DRA. RAQUEL JACOB – EXAMINADORA

PROF. DR. ELIESER GRANDRA – EXAMINADOR

“Imagine uma nova história para sua vida e acredite nela. Tudo o que um sonho precisa para ser realizado é alguém que acredite que ele possa ser realizado.”

Paulo Coelho

AGRADECIMENTOS

Aos meus amados pais, Carlos e Nair, que sempre me apoiaram, acreditaram em mim e me acolheram nos momentos difíceis da minha vida. Nenhuma vitória teria significância sem vocês do meu lado.

A minha querida irmã Cássia, que foi sempre minha amiga, obrigado pelo carinho, amizade e pelas horas de conversa, você me deu os melhores presentes da minha vida, meus sobrinhos Matheus e Millene. Ao meu cunhado Cláudio, que sempre me ajudou, és como um irmão que nunca tive.

A minha avó, que sempre se preocupou comigo.

Ao Jorel, amor da minha vida, meu ombro mais amigo de todas as horas, obrigado pela paciência e carinho.

Ao meu filho Pedro que está por vir, o qual mudou minha vida, me deu garra para superar todos os obstáculos e me fez crescer a cada dia.

Aos colegas de laboratório de Síntese de Orgânica Limpa, em especial a Lóren, Angelita e Débora, pela paciência e por terem me ajudado nas horas de dúvida.

A Francine, que foi essencial durante meu experimento.

A todos meus colegas do Laboratório de Microbiologia de Alimentos, minha segunda casa, onde encontro não só colegas mas amigos verdadeiros. Em especial as minhas grandes amigas Carol e Greici pelas horas de conversa e palavras de incentivo.

A prof. Amanda que muito me ajudou durante o experimento, foi prestativa e compreensiva, sempre me amparando nas horas de dúvida.

Ao meu orientador, prof. Éder, pelo incentivo e puxões de orelha quando foi preciso.

Ao meu querido orientador prof. Wladimir que me deu a oportunidade de crescer e acreditou em mim desde a época de estágio.

Resumo

GOLDBECK, JÚLIA COSWIG. **Atividade antimicrobiana e o efeito do 3-(*p*-clorofenil)tio citronelal em bactérias patogênicas e deteriorantes com importância em alimentos** 2012. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Agroindustrial. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

O objetivo do presente trabalho foi avaliar o potencial antimicrobiano do composto 3-(*p*-clorofenil)tio citronelal frente a bactérias com importância em alimentos. Com o intuito de observar o potencial antibacteriano do 3-(*p*-clorofenil)tio citronelal bem como verificar se a adição de tiol potencializa a bioatividade do citral, através de estudo qualitativo e quantitativo, comparou-se a atividade antibacteriana de citral, (*R*)-citraonal e 3-(*p*-clorofenil)tio citronelal. Foi realizada análise por microscopia eletrônica de varredura das células expostas aos compostos com o propósito de inferir o possível mecanismo de ação e observar o comportamento de bactérias Gram-positivas (*L. monocytogenes*) e Gram-negativas (*P. fluorescens*), além de verificar se há alteração no alvo celular quando citral foi modificado. A partir dos resultados dos testes qualitativos, todas as bactérias testadas mostraram-se potencialmente sensíveis aos compostos analisados, os quais possuem ação bactericida, no entanto, após análise quantitativa, observou-se que as Gram-positivas são mais sensíveis. A curva de cinética de ação demonstrou que a morte celular, tanto para *L. monocytogenes* como para *P. fluorescens*, ocorre significativamente mais rapidamente quando tratadas com o 3-(*p*-clorofenil)tio citronelal, não obstante, quando se compara o tempo de morte celular entre bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, *L. monocytogenes* mostrou-se mais sensível aos compostos. Além disso, a concentração inibitória mínima para que o 3-(*p*-clorofenil)tio citronelal exerça atividade antibacteriana foi cerca de 100 vezes menor quando comparada ao citral precursor. A microscopia eletrônica de varredura permitiu mostrar alterações morfológicas nas células tratadas com os compostos. Aparentemente, a adição de tiol na molécula de citral não muda seu alvo celular, todavia, possivelmente o alvo celular do citral, 3-(*p*-clorofenil)tio citronelal e (*R*)-citraonal seja diferente em bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Concluiu-se que a adição de tiol potencializa a bioatividade do citral frente a bactérias Gram-negativas e Gram-positivas funcionalizando esta molécula, tornando-a um potente composto com ação bactericida, de baixa toxicidade, passível de ser utilizado em alimentos.

Abstract

GOLDBECK, JÚLIA COSWIG. **Antimicrobial activity and the effect of 3-(*p*-chlorophenyl)thio citronellal on spoilage and pathogenic bacteria important in foods** 2012. Msc. Dissertation – Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Agroindustrial. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas-RS, Brazil.

The objective of this study was to evaluate the antimicrobial potential of the compound 3-(*p*-chlorophenyl)thio citronellal against bacteria of importance in foods. In order to observe the antimicrobial activity of 3-(*p*-chlorophenyl)thio citronellal and to verify that the addition of thiol enhances the bioactivity of citral, through qualitative and quantitative study, we compared the antibacterial activity of citral, (*R*)-citronellal and 3-(*p*-chlorophenyl)thio citronellal. Analysis was performed by scanning electron microscopy of cells exposed to the compounds in order to infer the possible mechanism of action and observe the behavior of Gram-positive bacteria (*L. monocytogenes*) and Gram-negative bacteria (*P. fluorescens*), and check if there are changes in the target cell when citral was modified. From the results of qualitative tests, all bacteria tested were potentially susceptible to the compounds tested, which have antibacterial action, however, quantitative analysis showed that the Gram-positive bacteria are most susceptible. The kinetic curve action cell death demonstrated that for both *L. monocytogenes* to as *P. fluorescens* occurs significantly faster when treated with 3-(*p*-chlorophenyl)thio citronellal, however, when comparing the time of cell death from Gram-positive and Gram-negative bacteria, *L. monocytogenes* was more sensitive to the compounds. Furthermore, the minimal inhibitory concentration for the 3-(*p*-chlorophenyl)thio citronellal carries antibacterial activity was 100 fold lower compared to the precursor citral. The scanning electron microscopy allowed to show morphological changes in cells treated with the compounds. Apparently, the addition of the thiol molecule citral does not change its cellular target, however, possibly the cellular target of citral, 3-(*p*-chlorophenyl)thio citronellal and (*R*)-citronellal is different in Gram-positive and Gram negative. It was concluded that the addition of thiol enhances the bioactivity of citral against Gram-negative and Gram-positive functionalizing this molecule, making a compound having potent bactericidal activity, low toxicity, which can be used in foods.

Lista de Figuras

Figura 1: Síntese do 3-(<i>p</i> -clorofenil)tio citronelal a partir do citral em meio livre de solvente utilizando KF/Al ₂ O ₃ como catalisador.....	15
Figura 2: Estrutura química dos compostos avaliados neste estudo.....	16
Figura 4: Possíveis alvos dos antimicrobianos nas células procarióticas.....	24
Figura 5: <i>Cymbopogon citratus</i>	25
Figura 6: Estrutura química do citral.....	25
Figura 7: <i>Cymbopogon nardus</i>	26
Figura 8: Estrutura química do (<i>R</i>)-citronelal.....	26
Figure 3: (artigo): Minimum Inhibitory concentration of compounds.....	41
Figure 4: (artigo): Inactivation kinetics of compounds on <i>Listeria monocytogenes</i>	43
Figure 5: (artigo): Inactivation kinetics of compounds on <i>P. fluorescens</i>	42
Figure 6: (artigo): Comparative study of the time needed to occur cell death of <i>P. fluorescens</i> and <i>L. monocytogenes</i> compared to the compounds.....	44
Figure 7: (artigo): Morphological analysis of <i>L. monocytogenes</i> by scanning electron microscopy.....	45
Figure 8: (artigo) Morphological analysis of <i>P. fluorescens</i> by scanning electron microscopy	46
Figure 9: (artigo): Effect of 3-(<i>p</i> -chlorophenyl)thio citronellal on the liver δ -Ala-D activity.....	48

Lista de Tabelas

Table 1 (artigo): Antimicrobial activity of compounds citral, (<i>R</i>)-citronellal and 3-(<i>p</i> -chlorophenyl)thio citronellal by the agar diffusion method	40
Table 2 (artigo): Minimum inhibitory concentration (MIC) (mM), Minimum bactericidal concentration MBC (mM) and Arbitrary units (AU) (AU.mL ⁻¹) of citral, (<i>R</i>)-citronelall and 3-(<i>p</i> -chlorophenyl)thio citronellal against of a screening standard strains bacteria.....	41

Lista de Abreviaturas

CDC – Center for Disease Control and Prevention

DTA – Doenças Transmitidas por Alimentos

SIH – Sistema de Informações Hospitalares

SVS/MS – Serviço de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde

FDA – Food and Drug Administration

ISO – International Standard Organization

NCCLS – National Committee for Clinical Laboratory Standards

MRSA - *Staphylococcus aureus* metilina resistente

OMS - Organização Mundial da Saúde

FoodNet - Foodborne Diseases Active Surveillance

IOC - Instituto Osvaldo Cruz

Eos - Óleos essenciais

MIC – Minimum Inhibitory Concentration

MBC – Minimum Bactericidal Concentration

AU – Arbitrary Units

UFC – Unidades Formadoras de Colônias

MHA – Muller Hinton Agar

OD – Optical Density

SD – Standard Deviation

NAM – N-acetyl muramic acid

Sumário

1. Introdução.....	13
2. Objetivos.....	16
3. Revisão bibliográfica.....	17
3.1 Micro-organismos com importância em alimentos.....	17
3.1.1 <i>Salmonella</i> spp.	18
3.1.2 <i>Listeria monocytogenes</i>	18
3.1.3 <i>Escherichia coli</i>	19
3.1.4 <i>Staphylococcus aureus</i>	19
3.1.5 <i>Shigella</i> spp.....	20
3.1.6 <i>Pseudomonas fluorescens</i>	21
3.2 Controle químico de micro-organismos: toxicidade e resistência microbiana.....	21
3.3 Atividade antimicrobiana de óleos essenciais e seus derivados.....	22
3.3.1 Óleo essencial de <i>Cymbopogon citratus</i>	24
3.3.2 Óleo essencial de <i>Cymbopogon nardus</i>	26
3.4 Compostos organocalcogênicos bioativos.....	26
3.5 Química Verde.....	28
4. Infra-estrutura utilizada	30
Capítulo 1.....	31
5. Considerações finais e perspectivas.....	54
6. Referências.....	55

1. Introdução

Os micro-organismos patogênicos e deteriorantes representam uma grande preocupação para a indústria de alimentos. Um dos principais problemas de contaminação dos alimentos ocorre em virtude da presença de micro-organismos deteriorantes. Esta contaminação provoca diferentes alterações sensoriais, diminuindo o tempo de vida útil dos produtos e tornando-os inaceitáveis sob o ponto de vista dos consumidores, podendo gerar perdas econômicas em larga escala.

Por outro lado, os micro-organismos patogênicos, além de causarem prejuízos para a indústria, também são alvo de preocupação para órgãos de saúde pública, uma vez que desencadeiam doenças transmitidas por alimentos (DTA). De acordo com o Centro de Prevenção e Controle de Doenças norte-americano (*Center for Disease Control and Prevention* – CDC), as doenças alimentares são responsáveis por, aproximadamente, 76 milhões de enfermos que resultam em 325.000 hospitalizações e 5.000 mortes nos EUA a cada ano (NOTERMANS & GEISSEN, 2003).

O perfil epidemiológico das doenças transmitidas por alimentos no Brasil ainda é pouco conhecido e somente alguns estados e/ou municípios dispõem de estatísticas e levantamentos mais confiáveis sobre os agentes etiológicos mais comuns, alimentos mais frequentemente envolvidos e fatores causais. Um dos fatores responsáveis por isso, é que as DTA nem sempre são oficialmente notificadas. Segundo dados do Sistema de Informações Hospitalares (SIH), do Ministério da Saúde, as DTA no Brasil alcançam, em média, 570 mil casos por ano, totalizando, aproximadamente, 6.320 óbitos. Entre os anos de 1999 a 2004 estimou-se um gasto de 280 milhões de reais com média de 46 milhões de reais por ano (CARMO *et al.*, 2005).

Nesse contexto, para aumentar a vida útil de muitos alimentos bem como assegurar a sua inocuidade, as indústrias utilizam conservantes sintéticos, os quais são substâncias que evitam ou retardam contaminações tanto de micro-organismos deteriorantes como patogênicos (GUILLARD *et al.*, 2009).

No entanto, estudos toxicológicos atuais apontam que em determinadas concentrações e com seu uso continuado, os conservantes sintéticos podem se tornar potencialmente tóxicos e ter efeitos carcinogênicos. Além disso, os micro-organismos podem adquirir resistência a estas substâncias (GUILLARD *et al.*, 2009). Consequentemente, muitas pesquisas vêm sendo dirigidas no sentido de

encontrar compostos naturais com atividade antimicrobiana, os quais poderiam ser novas alternativas para substituir os conservantes sintéticos.

Atualmente, o interesse pela utilização de óleos essenciais e seus derivados como antimicrobianos vem se tornando cada vez mais evidente (MPOUNTOUKAS *et al.*, 2008) e muitos óleos essenciais de plantas já possuem comprovada atividade antimicrobiana frente a uma gama de bactérias, tanto Gram-positivas quanto Gram-negativas, além da atividade frente a leveduras e fungos filamentosos (ARWEILER *et al.*, 2000; FINE *et al.*, 2000; PAN *et al.*, 2000; CLAFFEY, 2003; SEYMOUR, 2003; BENKEBLIA, 2004; ALMEIDA *et al.*, 2006; ARRUDA *et al.*, 2006; NUNES *et al.*, 2006; HAWSER *et al.*, 2011).

Todavia, a atividade antimicrobiana de um óleo essencial depende do tipo, composição e concentração do óleo, bem como da espécie microbiana em questão, além da composição do substrato, do processamento e das condições de armazenamento (ARRUDA *et al.*, 2006; TYAGI & MALIK, 2010). Além disso, devido ao fato de os óleos essenciais e seus derivados serem substâncias extremamente voláteis, muitas vezes torna-se difícil sua aplicação direta em alimentos. Sendo assim, com a finalidade de intensificar a atividade antimicrobiana dos óleos essenciais e de reduzir sua volatilidade, nosso grupo vem desenvolvendo estudos acerca da modificação química de alguns constituintes dos óleos, a partir da adição de organocalcogênicos, normalmente selênio e enxofre, obtendo então novas moléculas com potencial aplicação em alimentos.

A modificação química é o processo no qual se obtém compostos químicos a partir de precursores mais simples, tendo como objetivo produzir novas substâncias químicas bioativas (BRAGA *et al.* 1996). Além disso, com base nos princípios da Química Verde, os estudos do grupo objetivam o desenvolvimento de métodos mais econômicos e eficientes para sintetizar estas substâncias.

Nesta linha, recentemente foi preparado o 3-(*p*-clorofenil)tio citrônial **3**, uma molécula bioativa derivada do citrônial, preparada através da adição de Michael de *p*-clorobenzenotiol ao citral **1**, componente majoritário do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* (LENARDÃO, 2007) (Figura 1).

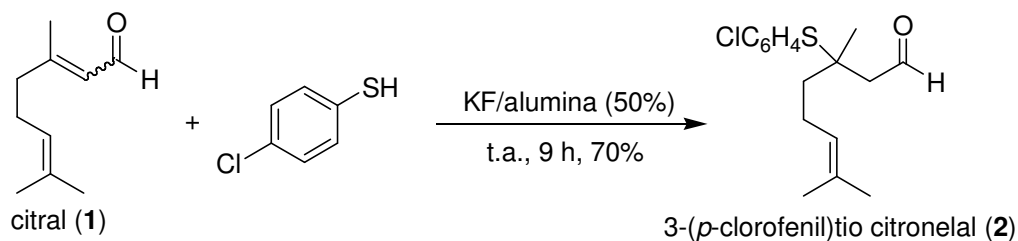


Figura 1: síntese do 3-(*p*-clorofenil)tio citronelal a partir do citral em meio livre de solvente utilizando KF/Al₂O₃ como catalisador.

Entretanto, após a síntese da molécula, poucos estudos foram realizados sobre a bioatividade do composto 3-(*p*-clorofenil)tio citronelal. Em um dos estudos, Lenardão *et al.* (2007), utilizando testes qualitativos, observaram que *Staphylococcus aureus*, um importante patógeno alimentar, é potencialmente sensível ao tiocomposto **3**. Não obstante, o mecanismo de ação do 3-(*p*-clorofenil)tio citronelal ainda não está esclarecido, fato comum em grande parte das pesquisas relacionadas com bioatividade de óleos essenciais, onde tem se encontrado a atividade, porém sem detalhes sobre o mecanismo de ação (LAMBERT *et al.*, 2001; SOUZA *et al.*, 2010).

2. Objetivos

Após observar o potencial de aplicação do 3-(*p*-clorofenil)tio citronelal, este trabalho teve como objetivo dar continuidade aos estudos relacionados à sua bioatividade. Com o intuito de verificar se a presença do grupo tiol potencializa a atividade antibacteriana do precursor citral e também do análogo citronelal, através de estudo qualitativo e quantitativo, será comparada a bioatividade do material de partida, citral **1**, com a do (*R*)-citraonal **3** (obtido do óleo essencial de *Cymbopogon nardus*) e do seu derivado sulfurado, 3-(*p*-clorofenil)tio citronelal **2** (Figura 2). Para isso, serão utilizados como parâmetros de avaliação os testes de difusão em ágar, concentração inibitória mínima (CIM), concentração bactericida mínima (CBM) e unidades arbitrárias (UA) frente a bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, patogênicas e deteriorantes, com importância em alimentos. Além disso, as células bacterianas tratadas com os compostos **1**, **2** e **3** serão analisadas por microscopia eletrônica de varredura com o propósito de inferir um possível mecanismo de ação, observando o comportamento de bactérias Gram-positivas (*L. monocytogenes*) e Gram-negativas (*P. fluorescens*), e se a presença do grupo tioorganoíla provoca alteração no alvo celular.

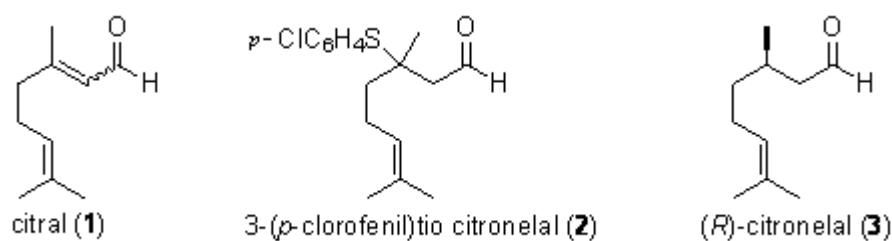


Figura 2: Estrutura química dos compostos avaliados neste estudo

3. Revisão Bibliográfica

3.1 Micro-organismos com importância em alimentos

É impossível determinar exatamente quando, na história da humanidade, o homem tomou conhecimento da existência de micro-organismos e da sua importância para os alimentos.

Após o período no qual o ser humano tinha a sua alimentação baseada apenas nos abundantes recursos da natureza, o homem passou a plantar, criar animais e a produzir o seu próprio alimento. Logo, com o surgimento de alimentos preparados, começaram a ocorrer os problemas relacionados com doenças transmitidas pelos alimentos (DTA) (FRANCO & LANDGRAF, 2006).

Várias patologias que afetam a saúde pública são de origem microbiana e, especialmente, bacteriana (MURRAY, 2000; TAUXE, 2002). Segundo Forsythe (2000) o número de casos notificados por DTA, representa apenas a ponta de um *iceberg*. Um estudo realizado na Inglaterra, em 1999, estimou a extensão de casos não notificados e constatou que, para cada caso notificado (detectado em laboratórios oficiais de vigilância), existem mais de 136 casos na comunidade.

A estimativa anual sobre gastroenterites na América Latina, África e Ásia, com exceção da China, é de que essas doenças atingiram um bilhão de crianças com idade inferior a cinco anos, resultando em mais de cinco milhões de óbitos, sendo a maioria causada pelo consumo de alimentos contaminados. Mesmo na Europa, a mortalidade causada por doenças veiculadas por alimentos é apenas superada pelas doenças respiratórias (NOTERMANS & GIESSEM, 2003).

3.1.1 *Salmonella* spp.

O gênero *Salmonella*, que pertence à família *Enterobacteriaceae*, possui uma classificação taxonômica complexa e, atualmente, diferentes sistemas podem ser empregados para o sua descrição. Baseado em estudos genômicos, o gênero é dividido em duas espécies: *S. enterica* e *S. bongori* (GRIMONT & WEILL, 2007), porém, em 2004 foi proposta a inclusão de uma terceira espécie, denominada *S. subterranea*, isolada em uma região aquífera dos Estados Unidos (SHELOBOLINA *et al.*, 2004; VAZ, 2007). Esta bactéria se caracteriza por possuir formato de bacilos, não formar

esporos, ser Gram-negativa, anaeróbia facultativa, geralmente móvel por flagelos peritríqueos e, frequentemente, possuir fímbrias.

Estima-se que bactérias do gênero *Salmonella* são as principais causas de DTA em todo o mundo. Normalmente a salmonelose é adquirida através da ingestão de alimentos contaminados, sendo os alimentos de origem animal, como ovos, carnes e leites seu principal veículo (WHO, 2011).

No Brasil, no período de 1999 a 2010, foram notificados ao Serviço Nacional de Saúde do Ministério da Saúde – SVS/MS, 6.971 surtos, com 1.804.932 pessoas expostas e registro de 88 óbitos. Do total de surtos, 46,6% tiveram agente etiológico definido pelo critério laboratorial ou clínico-epidemiológico, dentre eles, *Salmonella* spp. foi relacionada a 45,9% dos surtos (MS, 2011).

3.1.2 *Listeria monocytogenes*

Caracterizada como uma bactéria ubíqua, comumente encontrada no ar, no solo e na água (ALLERBERGER & WAGNER, 2010). *L. monocytogenes* é um bacilo Gram-positivo, não formador de esporos, anaeróbio facultativo e móvel devido à presença de flagelos peritríquios, apresentando movimento característico denominado tombamento, que auxilia na sua identificação (FRANCO & LANDGRAFF, 2006).

L. monocytogenes é um patógeno intracelular oportunista, que se tornou um importante causador de infecções alimentares em humanos. Causa a listeriose, uma doença que pode ser invasiva ou não-invasiva, apresentando alta letalidade (20-30%), especialmente em mulheres grávidas, recém-nascidos, idosos e pacientes imunocomprometidos (TRABULSI *et al.*, 2008). Devido a essa alta letalidade, a listeriose encontra-se em segundo lugar no *ranking* das causas mais frequentes de morte por consumo de alimentos contaminados (VAILLANT *et al.*, 2005). Além disso, é também uma grande preocupação para as indústrias de alimentos e para os órgãos reguladores da saúde pública.

Segundo dados disponíveis pelo CDC (2010), *L. monocytogenes* provoca, em média, 2.500 casos de listeriose por ano nos Estados Unidos (MEAD *et al.*, 1999; JIANG *et al.*, 2008). Essa bactéria foi isolada de uma grande variedade de produtos crus e processados, como leite e produtos lácteos, carne bovina, carne suína, linguiças fermentadas e produtos frescos, como vegetais e frutos do mar (MANTILLA *et al.*, 2007).

Todavia, no Brasil, ainda não existem relatos de surtos de listeriose humana associada ao consumo de alimentos contaminados (CRUZ *et al.*, 2008); no entanto, *L. monocytogenes* foi isolada de uma ampla variedade de alimentos (CHIARINI, 2007; NALÉRIO *et al.*, 2009). Segundo Germano

e Germano (2008), isso pode estar relacionado com a subnotificação de DTA ou à dificuldade encontrada no diagnóstico, decorrentes do extenso período de incubação da doença (até 90 dias).

3.1.3 *Escherichia coli*

O gênero *Escherichia* pertence à Família *Enterobacteriaceae* e é encontrado como parte da microbiota intestinal de animais de sangue quente. Compreende as espécies *E. coli*, *E. blattae*, *E. fergusonii*, *E. hermannii* e *E. vulneris* (HOLT *et al.*, 1994) sendo *E. coli*, a espécie de maior importância em microbiologia de alimentos (BOPP *et al.*, 2003).

E. coli são bacilos de 1,1 – 1,5 µm x 2,0 – 6,0 µm, anaeróbios facultativos, cuja temperatura ideal para desenvolvimento é de 37°C. Podem apresentar motilidade através de flagelos peritríquios, sendo capazes de metabolizar glicose e outros carboidratos com formação de ácido e gás, tanto em aerobiose como em anaerobiose; não produzindo oxidase, mas produzindo catalase (HOLT *et al.*, 1994).

Este patógeno é o mais importante componente da microbiota intestinal de humanos e outros mamíferos, exercendo papel importante na manutenção da sua fisiologia (BELL, 2005). Há uma grande diversidade de cepas de *E. coli* comensais, que são constantemente excretadas no ambiente, podendo contaminar alimentos de origem animal ou vegetal, assim como superfícies e águas de recreação, geralmente sem nenhum efeito adverso à saúde humana (KUHNERT *et al.*, 2000). Contudo, sua presença requer atenção especial, pois denota condições higiênico-sanitárias insatisfatórias (KUHNERT *et al.*, 2000).

3.1.4 *Staphylococcus aureus*

O gênero *Staphylococcus* pertence à família *Staphylococcaceae*, apresentando forma de cocos, tendendo a formar agrupamentos semelhantes a cachos de uva, possuindo diâmetro que varia entre 0,5 e 1,5µm. São Gram-positivos, anaeróbios facultativos, não formadores de esporos, imóveis e capazes de produzir catalase (BERDGOLL, 1990).

O gênero é composto por 45 espécies (EUZÉBY, 2009), sendo que *S. aureus*, descrita em 1880, é considerada a mais virulenta e o patógeno de maior impacto econômico, causando um amplo espectro de infecções em humanos e animais (SAKAI *et al.*, 2004; COUZINET *et al.*, 2005; DEURENBERG & STOBBERINGH, 2008). Segundo Tseng *et al.* (2004), *S. aureus* é um patógeno

oportunista em humanos, que causa um amplo espectro de enfermidades que incluem: infecções cutâneas, intoxicação alimentar, endocardites, pneumonia, osteomielite e artrite séptica. Além disso, a emergência de casos de *S. aureus* resistentes a meticilina (MRSA) associados com infecções nosocomiais e comunidade adquirida tem recebido a atenção de centros de controle de patógenos e dos pesquisadores em todo o mundo (KOREEN *et al.*, 2004; PO-REN HSUEH *et al.*, 2010).

A intoxicação alimentar estafilocócica, resultado da ingestão de enterotoxinas pré-formadas em alimentos contaminados com *S. aureus*, é considerada a terceira causa mais comum de doença alimentar no mundo (NEMA *et al.*, 2007).

3.1.5 *Shigella* spp.

As bactérias do gênero *Shigella* pertencem à família *Enterobacteriaceae*, e são bastonetes Gram-negativos, não formadores de esporos, imóveis, aeróbios facultativos, que fermentam glicose com produção de ácido (PENATTI *et al.*, 2007). O gênero *Shigella* inclui quatro espécies: *S. dysenteriae*, *S. flexneri*, *S. boydii*, e *S. sonnei* (FRANCO & LANDGRAF, 2006).

As espécies de *Shigella* apresentam características típicas de bactérias entéricas, se desenvolvendo em temperatura de 10 a 48°C, com pH ideal entre 6 a 8, embora o crescimento em pH 5 já tenha sido descrito (JAY, 2005).

A contaminação por esses micro-organismos geralmente ocorre através de manipuladores de alimentos infectados e com higiene pessoal inadequada, sendo frequentemente disseminados através de contato direto pessoa-pessoa, normalmente por transmissão fecal-oral. É tolerante a ambientes ácidos e com elevada osmolaridade podendo se desenvolver em frutas, vegetais, alimentos preparados e até mesmo em alimentos embalados a vácuo (PENATTI, 2007).

Shigella é reconhecida pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como um dos principais problemas mundiais de saúde. Mead *et al.* (1999) estimaram que este patógeno foi responsável por aproximadamente 50.000 casos de DTA, causando cerca de 6.231 hospitalizações e 70 mortes nos EUA anualmente. Em 2004, segundo o *Foodborne Diseases Active Surveillance (FoodNet)* do *Centers for Disease Control and Prevention*, *Shigella* foi o terceiro agente etiológico mais envolvido em casos de DTA (CDC 2005).

3.1.6 *Pseudomonas fluorescens*

São bactérias Gram-negativas, de forma cilíndrica, pertencentes ao gênero *Pseudomonas*. Possuem múltiplos flagelos, tendo um metabolismo extremamente versátil, podendo ser encontradas no solo e na água. São aeróbias obrigatórias, entretanto, algumas cepas são capazes de utilizar nitrato em vez de oxigênio como aceptor final de elétrons durante a respiração celular (PALLERONI, 1984). As temperaturas ótimas para o seu crescimento são 25-30°C, sendo oxidase negativas (RAY, 1996).

Dentre o gênero *Pseudomonas*, *P. fluorescens* são uma grande preocupação em alimentos por serem bactérias deteriorantes, causando uma série de alterações sensoriais, principalmente sabor e odor desagradável, gerando perdas econômicas em larga escala, podendo contaminar ovos, peixes, carnes e leites, capazes de produzir lipases e proteases termoestáveis, estas enzimas podem causar danos físico-químicos no leite, por exemplo, uma vez que provocam a coagulação das proteínas, deixando um aspecto gelatinizado (RAY, 1996).

Além disso, as contaminações dos alimentos com microrganismos psicrotróficos são de especial preocupação para a indústria, em especial a de laticínios, uma vez que os produtos lácteos são distribuídos em temperaturas favoráveis para seu crescimento (DOGAN & BOOR, 2003).

3.2 Controle químico de micro-organismos: toxicidade e resistência microbiana

Os conservantes químicos, definidos como qualquer substância química ou mistura de substâncias, adicionadas ao alimento em concentrações controladas, são utilizados com o objetivo de prolongar sua vida útil, bem como garantir a segurança alimentar (MPOUNTOUKAS *et al.*, 2008).

Porém, apesar de um grande número de compostos químicos terem sido descritos como conservantes potenciais em alimentos, apenas uma parte relativamente pequena deles é permitida em produtos alimentícios, sobretudo devido às regras de segurança do *Food and Drug Administration* (FDA) e também devido ao fato de que nem todos os compostos que apresentam atividade antimicrobiana *in vitro* conservam-na quando adicionados aos alimentos.

Recentemente, estudos toxicológicos demonstraram que a utilização de determinadas concentrações de conservantes sintéticos e seu uso continuado, podem levar estas substâncias a tornarem-se potencialmente tóxicas e ter efeitos carcinogênicos. Desse modo, muitas pesquisas vêm sendo dirigidas no sentido de encontrar compostos naturais com atividade antimicrobiana, que poderiam ser novas alternativas para substituir os conservantes sintéticos comumente utilizados ou

também fazer associações entre eles, diminuindo sua quantidade em alimentos (RAMALHO & JORGE, 2006; SOUZA *et al.*, 2010).

Além disso, os conservantes químicos possuem baixo espectro de ação, sendo difícil prever qual micro-organismo será inibido e muitos agem em apenas uma espécie bacteriana (DE-SOUZA *et al.*, 2006).

É importante ressaltar que na última década, o número de micro-organismos isolados de alimentos que são resistentes a antimicrobianos aumentou consideravelmente. O uso desenfreado de antibióticos em animais e em rações provocou aumento do número de patógenos transmitidos por alimentos que apresentam resistência a substâncias antimicrobianas e a sua transmissão subsequente através de alimentos contaminados. Além disso, mutações espontâneas e falta de pressão seletiva podem ter contribuído para o surgimento de bactérias resistentes em alimentos (FRYMOYER *et al.*, 2010).

A resistência a antimicrobianos pode ser considerada um fenômeno ecológico que ocorre como resposta da bactéria frente ao amplo uso de conservantes e sua presença no meio ambiente. As bactérias multiplicam-se rapidamente sofrendo mutação, podendo trocar material genético entre linhagens de mesma espécie ou de espécies diferentes. São considerados micro-organismos de alta capacidade de adaptação a diversos fatores, como a exposição a agentes químicos potentes (COSTA *et al.*, 2004). Algumas estratégias podem ser adotadas para evitar o desenvolvimento de resistência bacteriana, dentre as quais, estão à descoberta e o desenvolvimento de novos compostos bioativos com potencial aplicação em alimentos (HALCON & MILKUS, 2004).

Desse modo, esses dados entre tantos outros, ratificam a necessidade premente, já reconhecida pela Organização Mundial da Saúde (OMS), da descoberta e/ou síntese de novas substâncias antimicrobianas (FRYMOYER *et al.*, 2010).

3.3 Atividade antimicrobiana de óleos essenciais e seus componentes

De acordo com a ISO (*International Standard Organization*), os óleos essenciais são produtos obtidos de partes de plantas por meio da destilação por arraste de vapor d'água, bem como os produtos obtidos por prensagem dos pericarpos de frutos cítricos. De forma geral, são misturas complexas de substâncias voláteis, lipofílicas, geralmente odoríferas e líquidas (SIMÕES & SPITZER, 2004).

Desse modo, os óleos essenciais são formados por misturas complexas de compostos orgânicos voláteis, que incluem hidrocarbonetos, álcoois, aldeídos, cetonas, ácidos e ésteres. Os constituintes químicos mais comuns nos óleos essenciais são misturas de terpenos, geralmente monoterpenos, sesquiterpenos e arilpropanóides que podem apresentar uma variedade de funcionalizações e, devido às diferentes funcionalizações podem ser utilizados como intermediários de reações em síntese orgânica (BOLAND *et al.*, 1991; CASTRO & MACHADO, 2006).

A atividade de um óleo essencial pode ser atribuída à relação da configuração química dos seus componentes, à proporção em que estão presentes e à interação entre eles. Em geral, os componentes dos óleos essenciais apresentam-se em diferentes concentrações, sendo que normalmente, um deles é o composto majoritário, existindo outros em menores teores. Alguns ocorrem em quantidades traço, sendo comum que o composto majoritário seja o responsável pela bioatividade do óleo, porém pode haver sinergismo entre os componentes (BURT, 2004; LUPE, 2007; HAWSER *et al.*, 2011).

Gil *et al.* (2002) relatam que muitos estudos foram feitos com óleos essenciais de diferentes plantas, tendo revelado vários compostos com atividade antimicrobiana comprovada experimentalmente. No entanto, grande parte dos trabalhos tem apenas feito sugestões acerca do mecanismo de ação destes compostos.

Segundo estudos, os possíveis mecanismos de ação dos óleos essenciais e seus componentes sobre os micro-organismos estão listados a seguir e a Figura 3, ilustra os possíveis alvos dos antimicrobianos na célula bacteriana (SKANDAMIS *et al.*, 2001; CARSON *et al.*, 2002).:

- a. Degradação da parede celular;
- b. Danos na membrana citoplasmática;
- c. Danos às proteínas de membrana;
- d. Vazamento do conteúdo intracelular;
- e. Coagulação do citoplasma;
- f. Depleção da força motriz de prótons.

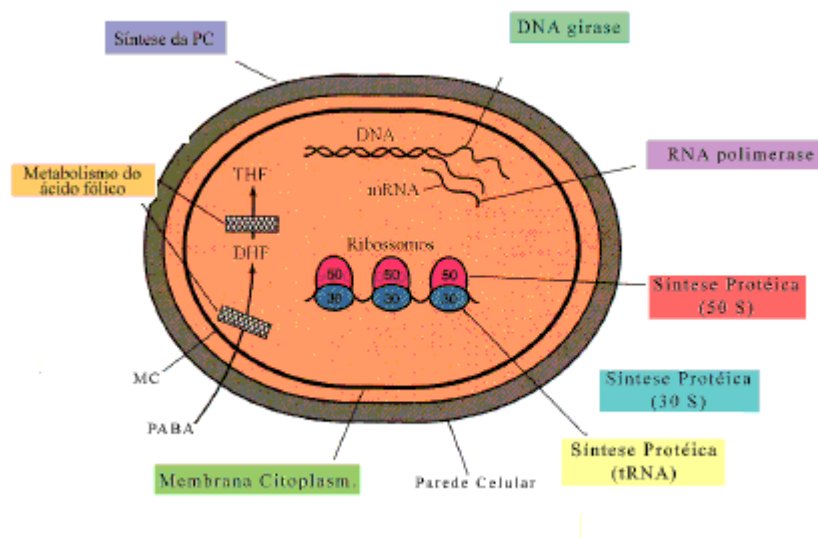


Figura 3: Possíveis alvos dos antimicrobianos em células procarióticas

Fonte: Cox *et al.*, 2000 (adaptado).

Uma característica importante dos óleos essenciais e seus componentes é a sua hidrofobicidade, que permite a partição nos lipídios da membrana celular bacteriana e mitocôndrias, desestruturando-a e tornando-a mais permeável. É comum entre os trabalhos relacionados com a bioatividade destes compostos se observar comportamentos diferentes entre bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, sendo as primeiras mais sensíveis do que as últimas (KNOBLOCH *et al.*, 1986.; OOSTERHAVEN *et al.*, 1995.; GUSTAFSON *et al.*, 1998.; HELANDER *et al.*, 1998.; COX *et al.*, 2000.; LAMBERT *et al.*, 2001.; SKANDAMIS *et al.*, 2001).

3.3.1 Óleo essencial de *Cymbopogon citratus*

Cymbopogon citratus (Figura 4) é uma erva nativa da Índia, pertencente à família *Gramineae* (CARLINI, CONTAR & SALVAR-FILHO, 1986; NGUEFACK *et al.*, 2007), conhecida em todo mundo como capim-cidreira, cultivada em países tropicais e subtropicais. A medicina popular utiliza o chá preparado com suas folhas como calmante, analgésico, antifebril, anti-reumático, diurético e em distúrbios digestivos (FERREIRA & FONTELLES, 1989). Por ser uma erva perene, de fácil cultivo e amplamente distribuída no Rio Grande do Sul, é uma planta de fácil obtenção.

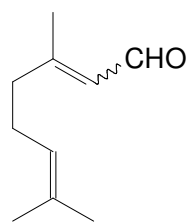


Figura 4: *Cymbopogon citratus*

O óleo de *C. citratus* é quimicamente reativo, sendo que a mistura de terpenos sofre uma série de reações quando exposta ao ar ou à luz solar. É lentamente convertida em uma substância de cor escura, viscosa e resinosa (SADDIQ & KHAYYAT, 2010).

O óleo essencial obtido das folhas frescas desta planta é amplamente utilizado nas indústrias de perfumes e de cosméticos. A literatura aponta que as propriedades bioativas do óleo essencial de *C. citratus* são principalmente devidas ao seu componente principal, o citral (Figura 5), nome dado para a mistura de aldeídos acíclicos geranial (*trans*-citral) e neral (*cis*-citral) (BONADA *et al.*, 2008; KHUNKITTI, 2010; AIENNSAARD *et al.*, 2011). Além do citral, o óleo essencial de *C. citratus* contém pequenas quantidades de geraniol, citronelal e mirceno (CARLINI, CONTAR & SALVAR-FILHO, 1986; AIENNSAARD *et al.*, 2011)

Aiennsaard *et al.* (2011) caracterizaram o óleo essencial de *C. citratus* com um conteúdo maior que 70% de citral, comprovando ser o composto majoritário do óleo.



CITRAL

Figura 5: Estrutura química do Citral

Devido ao aroma característico de limão, o citral possui importância considerável na indústria de alimentos como aditivo para conferir sabor e aroma, além de ser uma matéria-prima importante para a indústria farmacêutica, de perfumaria e cosméticos, especialmente para a síntese de vitamina A e iononas (SADDIQ & KHAYYAT, 2010).

Bassolé *et al.* (2011) estudaram a atividade antimicrobiana do óleo essencial bruto de *C. citraus* frente a bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, comprovando a atividade bactericida do óleo. Nesta mesma pesquisa, o óleo de *C. citratus*, quando comparado com óleos extraídos de outras plantas, foi o que apresentou melhores resultados. Naik *et al.* (2010) também estudaram a atividade antimicrobiana do óleo essencial bruto dessa planta frente a uma gama de bactérias com importância em alimentos e observaram que *Pseudomonas aeruginosa*, uma bactéria Gram-negativa, mostrou-se potencialmente resistente ao óleo.

3.3.2 Óleo essencial de *Cymbopogon nardus*

O óleo essencial obtido de suas folhas (Figura 6) é conhecido como óleo de citronela e é utilizado como planta aromática para fins de perfumaria, para afugentar insetos domésticos e de grãos armazenados, como desinfetante doméstico, bactericida laboratorial e como matéria-prima para a síntese de outros aromas (CASTRO & RAMOS).



Figura 6: *Cymbopogon nardus*

O óleo essencial de citronela tem como principal constituinte o citronelal (3,7-dimetil-6-octenal) (Figura 7), que é predominantemente formado pelo metabolismo secundário das plantas. É tipicamente isolado como uma mistura não-racêmica de dois enantiômeros, *R* e *S*, por destilação ou extração com solventes (CASTRO & RAMOS, 2003).

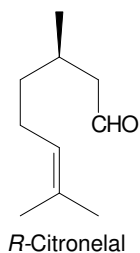


Figura 7: (*R*)-citronelal

3.4 Compostos Organocalcogênicos Bioativos

Embora alguns óleos essenciais apresentem propriedades biológicas reconhecidas, a variação em seus constituintes devido a fatores ambientais e até mesmo a forma de extração, além de características como a volatilidade e instabilidade a fatores que induzem a oxidação, como luz, temperatura, e presença de oxigênio durante seu armazenamento, limitam a estabilidade e integridade de seus componentes. Além disso, características sensorialmente detectáveis, como odor e aroma, mesmo utilizando componentes isolados, limitam sua aplicabilidade em alimentos, dependendo da concentração utilizada (BURT, 2004).

Nesse contexto, a aplicabilidade de óleos essenciais ou de seus componentes isolados, pode ser mais eficaz pela adição de organocalcogênicos, como selênio e enxofre, uma vez que há o aumento de grupos funcionais nas moléculas e, conseqüentemente, tem-se um aumento no peso molecular e diminuição da volatilidade (NOGUEIRA *et al.*, 2004).

Desde a década de 1930, os compostos organocalcogênicos têm sido alvo de interesse para a química devido à descoberta de suas aplicações sintéticas (PAULMIER, 1986; BRAGA *et al.*, 1996). Por definição, são compostos orgânicos que em sua estrutura apresentam selênio, telúrio, enxofre, polônio ou oxigênio (NOGUEIRA, 2004).

A síntese de compostos contendo átomos de enxofre segue em destaque no ramo da química orgânica, tanto pelo seu uso como intermediário sintético quanto pelo seu potencial biológico. Como exemplos de aplicações farmacológicas, vários compostos têm sido usados como agentes antibacterianos, anti-HIV, no combate ao câncer de fígado, entre outras doenças (KONALIEVA & PLOTKIN, 2006).

O enxofre é um elemento essencial em funções fisiológicas normais e está presente em aminoácidos, proteínas, enzimas e micronutrientes. O suprimento das necessidades nutricionais desse elemento na dieta humana é dado pelo consumo de alimentos, como vegetais, frutas e laticínios (NOGUEIRA, 2004).

Há diversas reações que podem ser realizadas *in vitro* que imitam as reações que ocorrem no metabolismo *in vivo* e uma destas reações, imitando sistemas biológicos, é realizada com compostos contendo grupamento SH. Não obstante, existem diferentes tipos de reações que podem ocorrer com estes compostos e, dentre elas, está a reação de adição 1,4 de tióis a compostos carbonílicos α,β -insaturados (SHONO *et al.*, 1978).

Estas reações são também importantes em sistemas biológicos, pois nos organismos vivos se encontram vários compostos carbonílicos α,β -insaturados, que podem atuar como aceptores de Michel. Além disso, reações de adição são consideradas verdes, pois possuem elevada eficiência atômica, i.e., alta incorporação dos átomos dos reagentes no produto final (LENARDÃO *et al.*, 2003).

Todavia, alguns aspectos devem ser levados em consideração para se obter uma “síntese ideal”. Abaixo estão apresentados alguns pontos que podem ser considerados fundamentais.

1. Ter rendimento total elevado;
2. Utilizar material de partida de baixo custo e disponível em grandes quantidades (carboidratos, terpenos, aminoácidos, intermediários abundantes oriundos das indústrias de química fina, etc);
3. Ser operacionalmente simples;
4. Ter etapas envolvendo multicomponentes;
5. Ser segura e sem subprodutos agressivos ao meio ambiente.

A eficiência em uma síntese está baseada na importância de se formarem ligações C-C ou na possibilidade de formarem anéis, e envolve os seguintes aspectos: número de reações/etapas, rendimento global, reagentes, rendimentos individuais, matérias-primas e condições experimentais (CORREIA *et al.*, 2002).

3.5 Química Verde

A Química Verde pode ser definida como o desenho, desenvolvimento e implementação de produtos químicos e processos para reduzir ou eliminar o uso ou geração de substâncias nocivas à saúde humana e ao ambiente (ANASTAS *et al.*, 1996; LENARDÃO *et al.*, 2003). Este conceito, que pode também ser atribuído à “tecnologia limpa”, já é relativamente comum em aplicações industriais, especialmente em países com indústria química bastante desenvolvida e que apresentam controle rigoroso na emissão de poluentes. O conceito de Química Verde vem, gradativamente, sendo incorporado ao meio acadêmico, no ensino e pesquisa.

A partir da década de 90, surgiram novas metodologias com enfoque na Química Verde, que eliminam ou diminuem a utilização de substâncias que são nocivas à saúde humana e ao meio

ambiente (ANASTAS *et al.*, 1994). Nesta linha, novos estudos estão sendo realizados buscando contemplar alguns princípios da Química Verde, como por exemplo: reações em meio livre de solvente (TANAKA *et al.*, 2000); utilização de solventes alternativos e sistemas catalíticos bifásicos; uso de fluidos supercríticos (JESSOP *et al.*, 1999); utilização de matérias-primas supercríticas (LIU *et al.*, 2006), como por exemplo, a utilização de citronelal (JACOB *et al.*, 2003) e; o uso de líquidos iônicos (WELTON *et al.*, 1999).

Alguns autores procuraram definir os principais pontos ou os princípios elementares da Química verde. Basicamente, há doze tópicos que precisam ser buscados quando se pretende implementar a Química Verde, os quais são citados a seguir (ANASTAS & WARNER, 1998):

1. Prevenção;
2. Economia de átomos;
3. Síntese de produtos menos tóxicos;
4. Síntese mais segura;
5. Solventes e auxiliares mais seguros;
6. Desenho para eficiência de energia;
7. Uso de fontes renováveis de matéria-prima;
8. Redução de derivados;
9. Incentivo à utilização de catalisadores;
10. Desenho de produtos degradáveis;
11. Análise do processo em tempo real;
12. Prevenção de acidentes.

No presente trabalho, buscou-se a utilização de matéria-prima de fonte renovável para a preparação de um novo agente antimicrobiano, preparado através de uma reação de adição de Michael. Neste sentido, com base nos princípios da Química Verde mencionados há pouco, a síntese do 3-(*p*-clorofenil)tio citronelal contempla os princípios #2 e #7, que tratam, respectivamente da eficiência atômica e do uso de biomassa como matéria-prima.

4. Infra-estrutura utilizada

O trabalho foi realizado no Laboratório de Síntese Orgânica Limpa, do Instituto de Química e Geociências, e no Laboratório de Microbiologia de Alimentos, do Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial/FAEM, ambos da Universidade Federal de Pelotas/RS.

A metodologia utilizada bem como os resultados desta pesquisa encontram-se descritos no Capítulo 1.

Capítulo 1

Antimicrobial activity of 3-(*p*-chlorophenyl)thio citronellal against food spoilage and pathogenic bacteria

Júlia C. Goldbeck^a, Francine N. Victoria^a, Lucielli Savegnago^d, Amanda S. Motta^c, Wladimir P. Silva^{a*}, Eder J. Lenardão^{b*}

^aFaculdade de Agronomia Eliseu Maciel, DCTA, Universidade Federal de Pelotas, UFPel, 96010-900 Pelotas, RS, Brazil.

^bCentro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos, Laboratório de Síntese Orgânica Limpa – LASOL – CCQFA, Universidade Federal de Pelotas, UFPel, 96010-900 Pelotas, RS, Brazil.

^cUniversidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da Saúde Departamento de Microbiologia. Rua Sarmento Leite n 500 Sala 158 Centro 90050-170 - Porto Alegre, RS - Brasil

^dCentro de Desenvolvimento Tecnológico, Unidade Biotecnologia, Universidade Federal de Pelotas, UFPel 96010-900, Brazil.

* Corresponding authors: Tel./fax: +55-53-3275-7533; e-mail: lenardao@ufpel.edu.br
20 (E. J. Lenardão) and wladimir.padilha2011@gmail.com (W. P. Silva)

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the antimicrobial potential of the compound 3-(*p*-chlorophenyl)thio citronellal against bacteria of importance in foods. In order to observe the antimicrobial activity of 3-(*p*-chlorophenyl)thio citronellal and to verify that the addition of thiol enhances the bioactivity of citral, through qualitative and quantitative study, we compared the antibacterial activity of citral, (*R*)-citronellal and 3-(*p*-chlorophenyl)thio citronellal. Analysis was performed by scanning electron microscopy of cells exposed to the compounds in order to infer the possible mechanism of action and observe the behavior of Gram-positive bacteria (*L. monocytogenes*) and Gram-negative bacteria (*P. fluorescens*), and check if there are changes in the target cell when citral was modified. From the results of qualitative tests, all bacteria tested were potentially susceptible to the compounds tested, which have antibacterial action, however, quantitative analysis showed that the Gram-positive bacteria are most susceptible. The kinetic curve action cell death demonstrated that for both *L. monocytogenes* to as *P. fluorescens* occurs significantly faster when treated with 3-(*p*-chlorophenyl)thio citronellal, however, when comparing the time of cell death from Gram-positive and Gram-negative bacteria, *L. monocytogenes* was more sensitive to the compounds. Furthermore, the minimal inhibitory concentration for the 3-(*p*-chlorophenyl)thio citronellal carries antibacterial activity was 100 fold lower compared to the precursor citral. The scanning electron microscopy allowed to show morphological changes in cells treated with the compounds. Apparently, the addition of the thiol molecule citral does not change its cellular target, however, possibly the cellular target of citral, 3-(*p*-chlorophenyl)thio citronellal and (*R*)-citronellal is different in Gram-positive and Gram negative. It was concluded that the addition of thiol enhances the bioactivity of citral against Gram-negative and Gram-positive functionalizing this molecule, making a compound having potent bactericidal activity, low toxicity, which can be used in foods.

1. Introduction

Toxicological studies suggest that determined concentrations of synthetic preservatives and their continued use, can be potentially toxic and have carcinogenic effects, in addition, the microorganisms can acquire resistance to these drugs (MPOUNTOUKAS *et al.*, 2008). Consequently,

many studies have been directed in order to find natural compounds with antimicrobial activity, to replace the synthetic preservatives.

In recent decades, the exploring about the possible applications of organochalcogens compounds in the area of food science and technology, has become to prominence, since these compounds are very attractive compounds because the large spectrum of biological activity including antioxidant, anticancer, antimicrobial, antiviral, antidepressant-like, anti-ulcer, neuroprotector, antinociceptive and antiinflammatory properties (MPOUNTOUKAS *et al.*, 2008), a lot essential oils derived from plants have already proven antimicrobial activity against many bacteria, yeasts and filamentous fungi (ARWEILER *et al.*, 2000; FINE *et al.*, 2000; PAN *et al.*, 2000; CLAFFEY, 2003; SEYMOUR, 2003; BENKEBLIA, 2004; ALMEIDA *et al.*, 2006; ARRUDA *et al.*, 2006; NUNES *et al.*, 2006; HAWSER *et al.*, 2011).

However, due to the fact that essential oils and their derivatives are very volatile substances, it is difficult to direct their application in foods, since it interferes with the sensory characteristics of food. Therefore, in order to enhance the antimicrobial activity of these compounds and reduce its volatility, our research group has been developing studies about the chemical modification of some constituents of these oils, by the addition of organochalcogens, usually selenium and sulfur, obtaining novel molecules with potential application in foods. In addition, based on the principles of green chemistry, our work aimed to develop more economical and efficient methods to synthesize these substances.

Recently, in a work developed by our research group, Lenardão *et al.* (2007) studied the synthesis of thioorganyl aldehydes, among them the aldehyde citral, major component of the essential oil of *Cymbopogon citratus*. One of the synthesized product obtained was the 3-(*p*-chlorophenyl)thio citronellal, obtained by a Michaels addition reaction (Figure 1)) (LENARDÃO *et al.*, 2007).

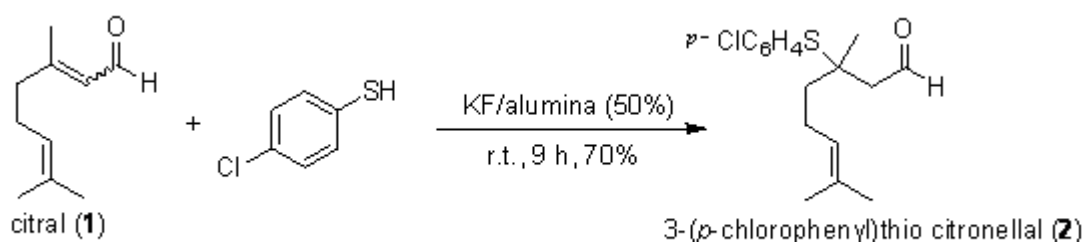


Figure 1: Synthesis of 3-(*p*-chlorophenyl)thio citronellal

Lenardão *et al.* (2007) after qualitative tests, observed that *Staphylococcus aureus*, an important foodborne pathogen, is potentially sensitive to 3-(*p*-chlorophenyl)thio citronellal. However, few studies have been conducted about the bioactivity of this compound. Moreover, its mechanism of

action is not well comprehended, fact common in most of the research related to bioactivity of essential oils (LAMBERT *et al.*, 2001; SOUZA *et al.*, 2010).

After observing the potential application of 3-(*p*-chlorophenyl)thio citronellal, this study had as objective to continue the studies about the bioactivity of this compound. In order to verify if the addition of thiol enhances the antibacterial activity of citral, through qualitative and quantitative study will be compared the bioactivity of citral, 3-(*p*-chlorophenyl)thio citronellal and (*R*)-citronellal (a structure analogous to the compound modified) (Figure 2). For this purpose, we used as evaluation parameters the agar diffusion test, minimum inhibitory concentration (MIC), minimum bactericidal concentration (MBC) and arbitrary units (AU) against Gram-positive and Gram-negative pathogenic and spoilage bacteria of importance in foods. Moreover, bacterial cells treated with the compounds were analyzed by scanning electron microscopy in order to infer a possible mechanism of action and observe the behavior of Gram-positive and Gram-negative against these compounds, also to checking for a change in cellular target when citral is modified, were then used as pattern cells *L. monocytogenes*, a Gram-positive pathogenic bacteria in food, and *P. fluorescens*, a Gram-negative food spoilage bacteria.

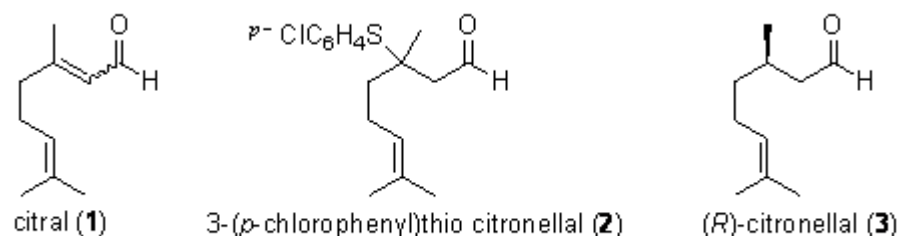


Figure 2: Chemical structure of the tested compounds.

2. Material and methods

In this study we used citral obtained commercially and (*R*)-citronellal extracted essential oil *Cymbopogon nardus*.

2.1 Synthesis of 3-(*p*-chlorophenyl)thio citronellal

The synthesis of 3-(*p*-chlorophenyl)thio citronellal was performed according to the methodology developed by our research group (LENARDÃO *et al.*, 2007). $\text{KF/Al}_2\text{O}_3$ 50% was added at room temperature to a mixture of citral (1 mmol) and *p*-chlorothiophenol (1.2 mmol), the whole mixture was stirred for 1 min and then irradiated with microwaves for 6 min. The product was purified by column chromatography over silica gel eluting with hexane/acetate (97:3)

2.2 Bioassay

2.2.1 Antimicrobial activity assay using the agar diffusion method

As a qualitative test to evaluate the antimicrobial activity of the compounds, the agar diffusion method by *Clinical and Laboratory Standards Institute - NCCLS* (2005) was employed with some modifications and was prepared discs of paper filter of 6mm diameter containing 20 μL of compound to be tested. The antimicrobial activity of citral, 3-(*p*-chlorophenyl)thio citronellal and (*R*)-citronellal was tested in triplicate against the pathogenic bacteria, *Listeria monocytogenes* (ATCC 7644), *Shigella dysenteriae* (ATCC 4002), *Escherichia coli* (ATCC 11775), *Salmonella* Typhimurium (ATCC 1408) and *Staphylococcus aureus* (FRI 326) and spoilage bacteria, *Pseudomonas fluorescens* (INCQS 00077) provided from bank strains of Foundation Oswaldo Cruz. This stage was performed in the Laboratory of Food Microbiology, on Department of Science and Agro-Technology of Federal University of Pelotas/RS, Brazil.

The cellular concentrations of bacterial cultures were standardized to a cell density of 1.5×10^8 CFU.mL⁻¹ (0.5 McFarland).

2.2.2 Measurement of arbitrary units of antimicrobial activity

Antimicrobial activity of the compounds was determined as described elsewhere (MOTTA & BRANDELLI, 2002). An aliquot of 20 μL was applied to discs (6mm) on Muller Hinton agar plates previously inoculated with a swab submerged in corresponding to a 0.5 McFarland turbidity standard solution, using the same cultures cited above. Plates were incubated at the optimal temperature for the test organism. The antimicrobial activity titer was determined by the serial twofold dilution method previously described by Mayr-Harting (1972). Activity was defined as the reciprocal of the

dilution after the last serial dilution that resulted in an inhibition zone and expressed as arbitrary units (AU) per milliliter. The AU.mL^{-1} in each experiment was determined against the respective indicator strain. Was used a start concentration of 13mM of citral, 13mM to (*R*)-citronellal and 7mM to 3-(*p*-chlorophenyl)thio citronellal.

2.2.3 Minimum inhibitory concentration assay

The minimum inhibitory concentration was determined using the broth microdilution method, according to NCCLS (2005), with a slight modification. A series of two-fold dilutions of each compound, ranging from 13mM of citral, 13mM of (*R*)-citronellal and 7mM of 3-(*p*-chlorophenyl)thio citronellal, were added in tryptic soy broth supplemented with 0.6% of yeast extract (TSB-YE). The culture concentrations were adjusted to 1.5×10^8 CFU.mL⁻¹ (0.5 McFarland). In a microdilution plate was added 100μL of inoculum with 100μL of dilution of each compound to be tested and incubated at 37 °C for 24h. After incubation, 10μL of 3% of resazurin solution was added in each dilution, and the microdilution plate were incubated against at 37 °C/30min. Resazurin is an oxidation-reduction indicator and has been used to assess viability and bacterial contamination, as well as to test antimicrobial activity (SMITH & TOWNSEND, 1999). It was used as positive control only the inoculum and inoculation with the solvent dimethylsulfoxide (DMSO) and used as negative controls only TSB-YE and TSB-YE with DMSO. The minimum inhibitory concentration (MIC) of an antimicrobial agent is defined as the lowest concentration of the compound resulting in no visible growth after 24h of incubation.

2.2.4 Minimum bactericidal concentration

The determination of minimum bactericidal concentration was performed by sowing a rate of 100μL of each well that did not present visible growth in another microplate containing 100μL of TSB-YE sterile. Were used as positive control inoculum and inoculum only with dimethyl sulfoxide (solvent of the compound) and were used as negative control only TSB-YE and TSB-YE with dimethylsulfoxide. The microplate was incubated at 37 °C during 24h. The lowest dilution where didn't growth was considered as the minimum bactericidal concentration. It was used start concentrations of 13mM of citral, 13mM of (*R*)-citronellal and 7mM of 3-(*p*-chlorophenyl)thio citronellal.

2.2.5 Kinetic action of the compounds against *L. monocytogenes* and *P. fluorescens*

To evaluate the kinetics of action of the compounds against Gram-positive and Gram-negative bacteria in a test tube was added 2 mL of inoculum at a concentration of 10^8 CFU.mL⁻¹ with 100μL of antimicrobial solution in a concentration of 0,21mM of 3-(*p*-chlorophenyl)thio citronellal against *L. monocytogenes*, 0,42mM of 3-(*p*-chlorophenyl)thio citronellal against *P. fluorescens* and 1,6mM of citral and (*R*)-citronellal against both bacteria (the used concentrations were the value of MIC); the CFU.mL⁻¹ was determined after 0, 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 80, 90, 100 and 120 minutes of incubation at 37 °C. At each time the CFU.mL⁻¹ was made in triplicate and decimal dilutions were performed until 10^{-6} CFU.mL⁻¹. The CFU.mL⁻¹ was made by adding 20μL of each dilution on plates of Trypticase Soy agar (TSA), incubated at 37 °C during 24h and after this time the colonies were counted.

2.2.6 Scanning electron microscopy (SEM)

To evaluate the possible mechanism of action of the compounds against Gram-positive and Gram-negative bacteria, was used planktonics cells of *L. monocytogenes* and *P. fluorescens* treated with citral, 3-(*p*-chlorophenyl)thio citronellal and (*R*)-citronellal a control treated with vehicle of the compounds (DMSO). An aliquot of 2mL of inoculum was standardized to a 0.5 McFarland scale. After that, was added to inoculum 13mM of citral, 13mM to R-citronelal and 7mM to 3-(*p*-chlorophenyl)thio citronellal against *L. monocytogenes* and *P. fluorescens*, the tubes were incubated at 37°C for one hour (time and temperature required for cell death occurs after construction pre-defined kinetic curve of action of compounds). The suspension was centrifuged (3000xg, 15min) and to scanning electron microscopy the cell suspensions quire fixed with 2% glutaraldehyde in NA-cacodylate buffer (100mM pH 7.1). The cells were pelleted, washed to remove glutaraldehyde and suspended in the same buffer. A drop from each suspension was transferred to a poly-L-lysine-treated silicon wafer chips, which were kept for 30min in a hydrated chamber for the cells to adhere. The attached cells were post fixed by immersing the chips in 1% osmium tetroxid (OsO₄) in cacodylate buffer for 30min, rinsed in the same buffer and dehydrated in ethanol in ascending concentrations (%) of 50, 70, 95 (2x) and 100 (2x), for 10min each. The chips were mounted on aluminum stubs and coated with gold in a sutter coater (Emitech K5550, Ashford, Kend, england). The chips were viewed

at 15 kV accelerating voltage in a scanning electron microscope (Jeol® JSM-6060) (KALCHAYANAND *et al.*, 2004).

2.2.7 Toxicity *in vitro*

Hepatic δ -Ala-D activities were used to evaluate the hepatotoxicity of 3-(*p*-chlorophenyl)thio citronellal; this was assayed according to the method of Sassa (1982) by measuring the rate of product (porphobilinogen) formation, except that 84 mM PBS (pH 6.4) and 2.5 mM aminolevulinic acid were used. δ -Ala-D is a sulfhydryl-containing enzyme and numerous metals and other compounds that oxidized sulfhydryl groups modified its activity. This way, this reaction is linked to situations associated with oxidative stress. All experiments were conducted after 10min of pre-incubation, i.e., the reaction was started 10min after the addition of the enzyme preparation by adding the substrate. The samples were incubated for 30min at 37°C. The reaction product was determined using modified Ehrlich's reagent at 555nm, with a molar absorption coefficient of $6.1 \times 10^4 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$ for the Ehrlich-porphobilinogen salt.

2.2.8 Evaluation of changes in Optical Density (OD)

To measure the rate of biomass of *L. monocytogenes* and *P. fluorescens* as time exposure front of citral, (*R*)-citronellal and 3-(*p*-chlorophenyl)thio citronellal, an overnight culture was obtained in TSB-YE medium at 37°C for 18h. A dose-response curve was determined using 13mM de citral, 13mM to (*R*)-citronellal and 7mM to 3-(*p*-chlorophenyl)thio citronellal and an initial inoculum of $10^8 \text{ CFU. mL}^{-1}$. The viable cell counts and OD at 600 nm were determined after 0, 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 80, 100 and 120min of incubation at 37°C. Each experiment was performed in triplicate, and as positive control inoculum was used without addition of the antimicrobial compound.

2.3 Statistical Analysis

Experimental results were given as mean $\pm$ standard deviation (SD) and were analyzed by one-way ANOVA, followed by the Newman-Keuls multiple comparison test when appropriate. Differences between groups were considered significant when $p < 0.05$. All tests were performed at least three times in duplicate.

3. Results and discussion

3.1 Susceptibility of microorganisms to the compounds evaluated

The bioactivity *in vitro* of citral, (*R*)-citronellal and 3-(*p*-chlorophenyl)thio citronellal against bacteria with importance in foods, was evaluated qualitatively and quantitatively from the presence or absence of inhibition zones (Table 1), Minimum Inhibitory Concentration assay (MIC), Minimum Bactericidal Concentration assay (MBC) and determination of Arbitrary Units (AU) (Table 2).

The agar diffusion method, used to determine whether the compounds had antibacterial activity, showed that all microbial species studied shown to be potentially sensitive to the compounds evaluated, with the average of inhibition diameters remained between 14.7 ± 1.2 mm and 39.33 ± 0.67 mm in diameter (Table 1). The compounds were tested in the initial concentration of 2 mg.mL^{-1} in triplicate.

Table 1. Antimicrobial activity of citral, (*R*)-citronellal and 3-(*p*-chlorophenyl)thio citronellal by the agar diffusion method

	<i>Inhibition zone (mm)</i>					
	<i>S. Typhimurium</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. dysenteriae</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. fluorescens</i>
1*	34.7 ± 1.2	34.7 ± 0.67	35.3 ± 0.34	34.3 ± 0.9	33.7 ± 1.3	25.3 ± 0.7
2**	19.0 ± 0.6	18.7 ± 0.7	20.3 ± 1.5	20.3 ± 0.9	24.7 ± 0.7	14.7 ± 1.2
3***	35.7 ± 0.6	40 ± 0.0	39 ± 0.6	39.0 ± 0.5	39.3 ± 0.7	31.0 ± 1.0

1*:citral 2*: (*R*)-citronellal 3***: 3-(*p*-chlorophenyl)thio citronellal

Each value is expressed as mean $\pm$ SEM(n = 3).

In the Table 1 it is observed that citral, (*R*)-citronellal and 3-(*p*-chlorophenyl)thio citronellal were effective against a wide range of bacteria, inhibiting Gram-positive and Gram-negative bacteria. These results are consistent with other studies made by our research group, proving that compounds derived from the chemical modification of components of essential oils of plant and its

organochalcogens derivatives have potential for use as preservatives in foods and could be an alternative to replace chemical preservatives, which are often effective against only some species and therefore have low action spectrum (VICTORIA *et al*, 2009).

After comparison from the measurement of the inhibition zones of the sensitivity of bacteria when treated compared to citral and (*R*)-citronellal, it is observed that the average size of the halos were significantly higher compared to the citral. This result by der explained by the presence of a double bond in the chemical structure of citral, causing possibly citral is more reactive.

The MIC values demonstrate that the Gram-positive bacteria (*L. monocytogenes* and *S. aureus*) are more susceptible to inhibition by the compounds analyzed, than Gram-negative bacteria (*S. typhimurium*, *S. dysenteriae*, *E. coli* and *P. fluorescens*). The MIC to 3-(*p*-chlorophenyl)thio citronellal against Gram-positive bacteria was 2,1mM while for Gram-negative was 4,2mM. Moreover, the MIC of the 3-(*p*-chlorophenyl)thio citronellal against *L. monocytogenes* and *P. fluorescens* was almost 100 times lower than the MIC of citral and (*R*)-citronellal against both bacteria.

Table 2. Minimum inhibitory concentration (MIC) (mM), Minimum bactericidal concentration MBC (mM) and Arbitrary units (AU) (AU.mL⁻¹) of citral, (*R*)-citronellal and 3-(*p*-chlorophenyl)thio citronellal against bacteria of importance in food

	<i>S. Typhimurium</i>			<i>S. aureus</i>			<i>S. dysenteriae</i>			<i>L. monocytogenes</i>			<i>E. coli</i>			<i>P. fluorescens</i>		
	MIC	MBC	AU	MIC	MBC	AU	MIC	MBC	AU	MIC	MBC	AU	MIC	MBC	AU	MIC	MBC	AU
1*	16	4.2	20480	16	4.2	20480	16	16	1280	16	3.3	20480	16	16	1280	16	3.3	20480
2**	16	4.2	20480	16	4.2	20480	16	16	1280	16	3.3	20480	16	16	1280	16	3.3	20480
3**	4.2	2.1	5120	2.1	2.1	5120	4.2	4.2	2560	2.1	2.1	5120	4.2	4.2	2560	4.2	4.2	5120

1*:citral

2:** (*R*)-citronellal

3*:** 3-(*p*-chlorophenyl) thio citronellal

The MBC results of the compounds in the bacteria tested revealed that these substances have a bactericidal effect.

The minimum inhibitory concentration, showed that the addition of thiol in the molecule of citral, potentiates its inhibitory activity against Gram-positive and Gram-negative bacteria (Figure 3), since there is a statistically significant difference in MIC values between the 3-(*p*-chlorophenyl)thio citronellal and unsubstituted aldehydes. There was also no significant difference in MICs of citral and (*R*)-citronellal.

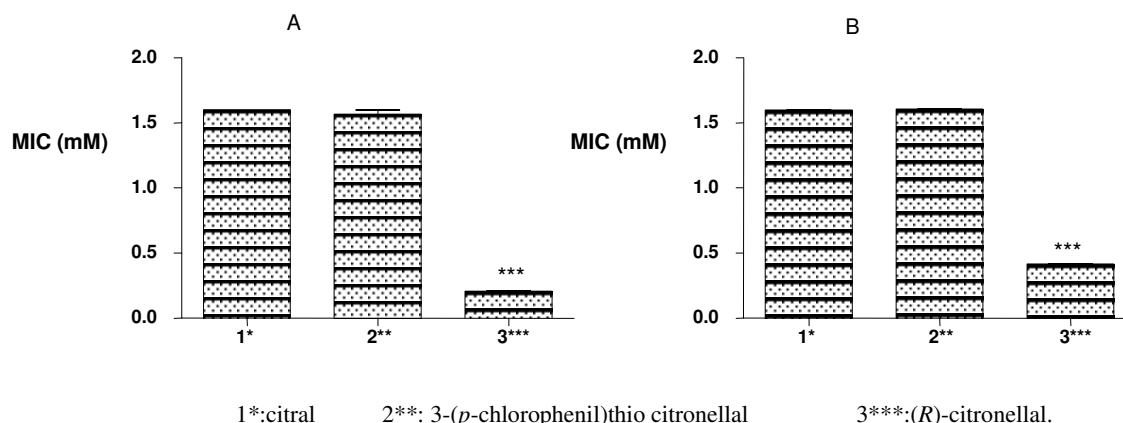


Figure 3: Minimum Inhibitory concentration of compounds on (A) *Listeria monocytogenes* and (B) *Pseudomonas fluorescens*. Each value is expressed as mean $\pm$ SEM ($n = 3$). Asterisks represent significant effect (***) $p < 0.05$ between the tested compounds.

Additionally to mechanism of action of aldehydes, which is the formation of hydroxymethyl derived, the increasing on the bioactivity of aldehyde citral after addition of sulfur in the molecule, can be explained by the interaction of sulfur and sulfur amino acids that compose the bacterial cell wall or membrane forming disulfide bonds: possibly the 3-(*p*-chlorophenyl)thio citronellal can destabilize the bacterial membrane or wall more easily than the unsubstituted citral (SHAPIRO, 1996).

3.2 Kinetics action of compounds derived from essential oil of *Cymbopogon citratus*

The kinetics action of citral, (*R*)-citronellal and 3-(*p*-chlorophenyl)thio citronellal, was evaluated against *L. monocytogenes* and *P. fluorescens*. The Figures 4 and 5 demonstrates graphically the number of CFU.mL⁻¹ as the exposure time of *L. monocytogenes* and *P. fluorescens*, respectively, when in contact with the antimicrobial compounds.

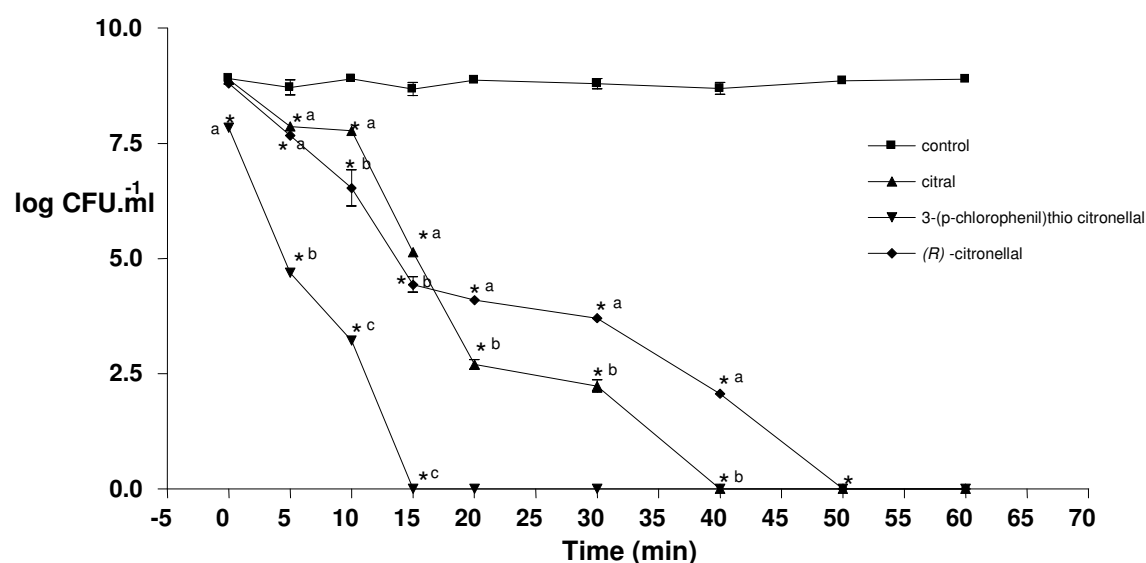


Figure 4: Inactivation kinetics of compounds on *Listeria monocytogenes*. Each value is expressed as mean $\pm$ SEM ($n = 3$). Asterisks represent significant effect ($*p < 0.05$) as compared with the respective control (C) without compound. Small letters (a) represent significant effect ($p < 0.05$) as compared with 3-(*p*-chlorophenyl)thio citronellal and (b) represent significant effect (*R*)-citronellal ($p < 0.05$) as compared with by Newman-Keuls multiple range test's.

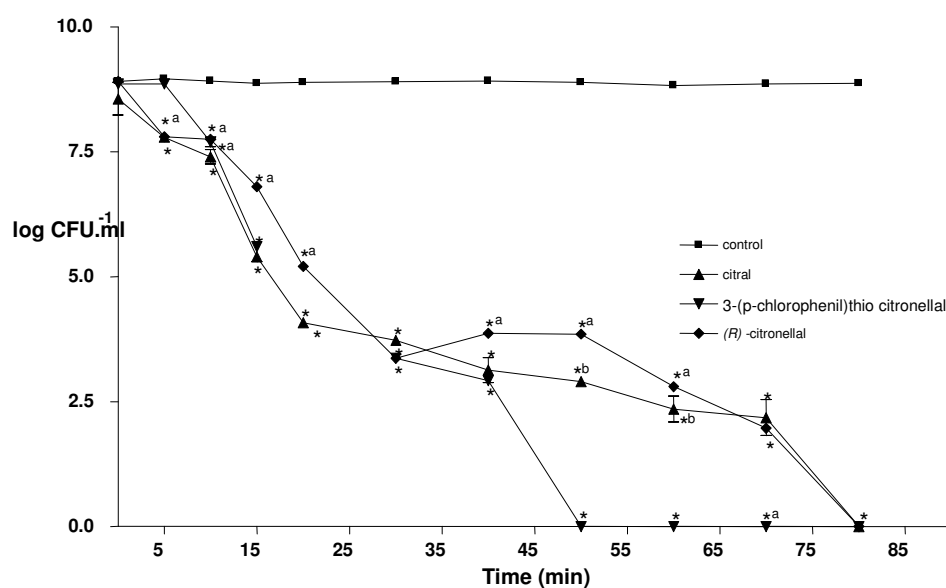


Figure 5: Inactivation kinetics of compounds on *P. fluorescens*. Each value is expressed as mean $\pm$ SEM ($n = 3$). Asterisks represent significant effect ($*p < 0.05$) as compared with the respective control (C) without compound. Small letters represent significant effect ($p < 0.05$) as compared with 3-(*p*-chlorophenyl)thio citronellal and represent significant as compared with by Newman-Keuls multiple range test's.

Based on Figure 4, it is possible observe that the number of viable cells decreased proportionally with the exposition time to drugs. In the first 5min that bacterial cells come into contact with the compounds, there was significant reduction in the number of CFU.mL⁻¹, reducing a log cycle. However, the time required for total death of microbial cells was statistically different among the compounds evaluated in time.

For the kinetic action of the compounds against *L. monocytogenes*, it was observed that cell death occurred more rapidly when cells were treated with the 3-(*p*-chlorophenyl)thio citronellal, where after 15min of contact with the antimicrobial suspension there is not cell count. When the cells were treated with citral and (*R*)-citronellal, it was necessary 40 and 50min respectively, for cell death occur. In addition all the tested compounds presented significant effect on decreased the number of viable cells since the compounds were statistically different from control. For *P. fluorescens* (Figure 5) the cell death also, occurred more quickly when treated with the 3-(*p*-chlorophenyl)thio citronellal, where after 50min of contact with the antimicrobial suspension there is no cell count. Already when the cells were treated with citral and (*R*)-citronellal, was necessary 80min for the cell death. The compounds were also statistically different from control.

These results shows that citral, (*R*)-citronellal and 3-(*p*-chlorophenyl)thio citronellal have potential antibacterial action and that the addition of thiol potentiated the antimicrobial activity of citral against *L. monocytogenes* and *P. fluorescens*.

We evaluated the optical density of samples after time of exposure to compounds derived from essential oils and there were no significant changes in optical density values as logarithmic reduction in the number of CFU.mL⁻¹ of both bacteria.

However, after comparing the time required to the cell death between *L. monocytogenes* and *P. fluorescens*, it is observed that in all treatments, cell death occurred faster in *L. monocytogenes* (Figure 6).

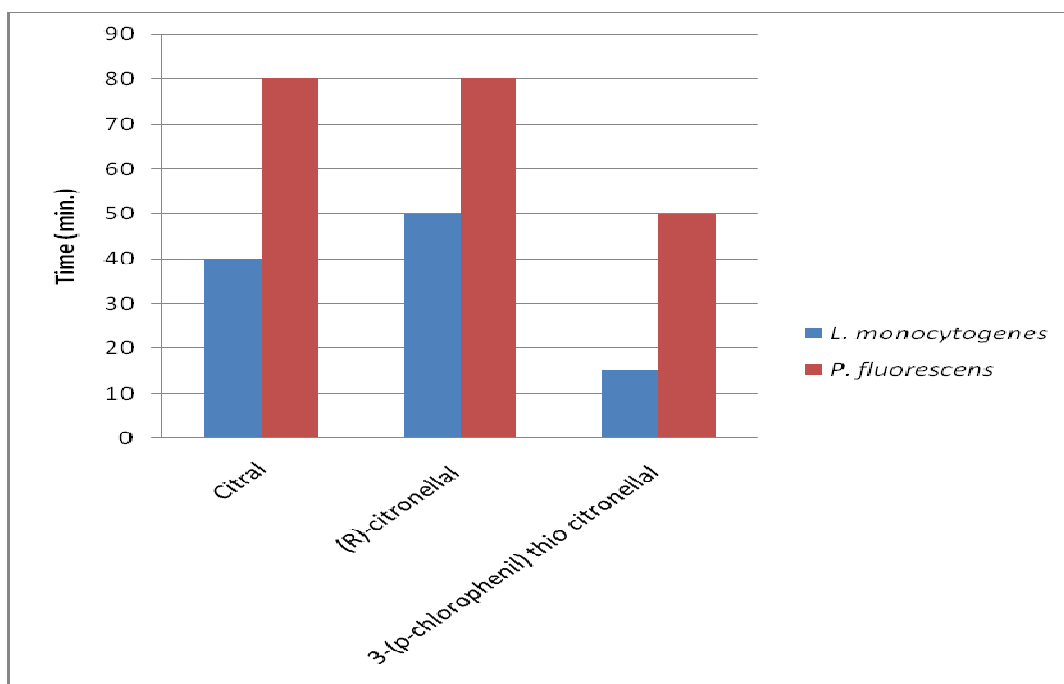


Figure 6: Time to cell death of *P. fluorescens* and *L. monocytogenes* after exposition to citral, (*R*)-citronellal and 3-(*p*-chlorophenyl)thio citronellal

Bassolé *et al.* (2011) and Naik *et al.* (2010) studied the antimicrobial activity of essential oil of *C. citratus* against a range of bacteria important in foods and both studies found that *P. aeruginosa*, a Gram-negative bacteria, was potentially oil-resistant. This result may be related to the presence of the outer membrane of Gram-negative, since the compounds derived from essential oil of *C. citratus* are hydrophobic, having affinity for the bacterial cell wall lipids. The presence of outer membrane makes the structure of these micro-organisms less permeable and therefore more resistant to physical and chemical agents (SMITH-PALMER, STEWART & FYFE, 1998; KNOBLOCH *et al.*, 1986.; OOSTERHAVEN *et al.*, 1995.; GUSTAFSON *et al.*, 1998.; HELANDER *et al.*, 1998.; COX *et al.*, 2000.; LAMBERT *et al.*, 2001.; SKANDAMIS *et al.*, 2001).

Our results are in agreement with other studies, which show that Gram-positive bacteria are more sensitive to essential oils when compared to Gram-negative (FARAG *et al.*, 1989; THOROSKI *et al.*, 1989; COSENTINO *et al.*, 1999; DORMAN & DEANS, 2000; JULIANO *et al.*, 2000; LAMBERT *et al.*, 2001).

3.3 Morphology of *L. monocytogenes* and *P. fluorescens* cells after exposure to compounds

Based on the reduction observed in the number of viable cells of *L. monocytogenes* and *P. fluorescens* after addition of antimicrobial compounds, through analysis of scanning electron microscopy (SEM), we compared the morphology of cells treated with citral, (*R*)-citronellal and 3-(*p*-chlorophenyl)thio citronellal, utilizing as control, cells not treated with the compounds (Figures 7 and 8).

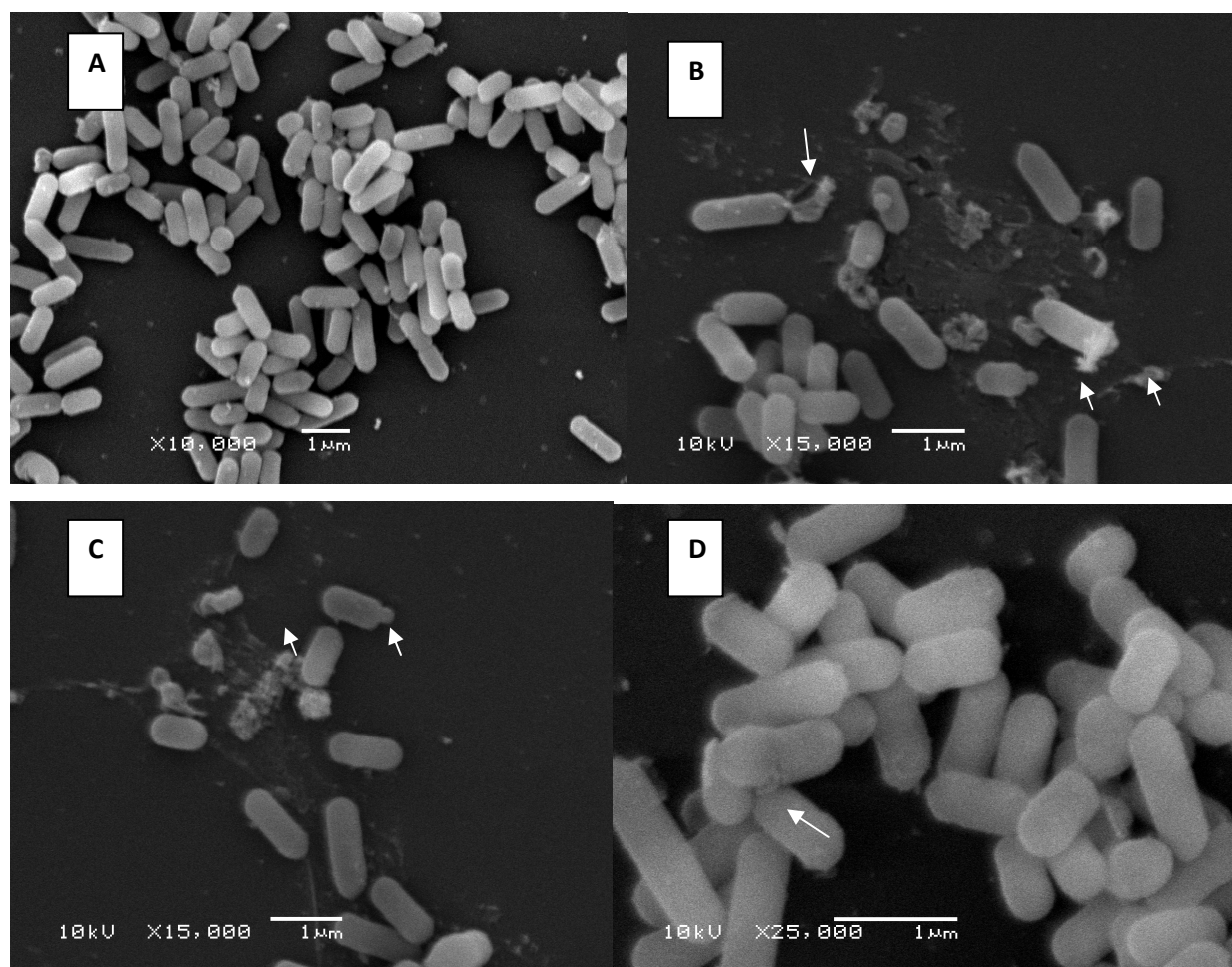


Figure 7: Morphological analysis of *L. monocytogenes* by scanning electron microscopy (A) Morphology of *L. monocytogenes* cells not treated with the compounds. (B) *L. monocytogenes* cells treated with citral. (C) *L. monocytogenes* cells treated with (*R*)-citronellal. (D) *L. monocytogenes* cells treated 3-(*p*-chlorophenyl)thio citronellal.

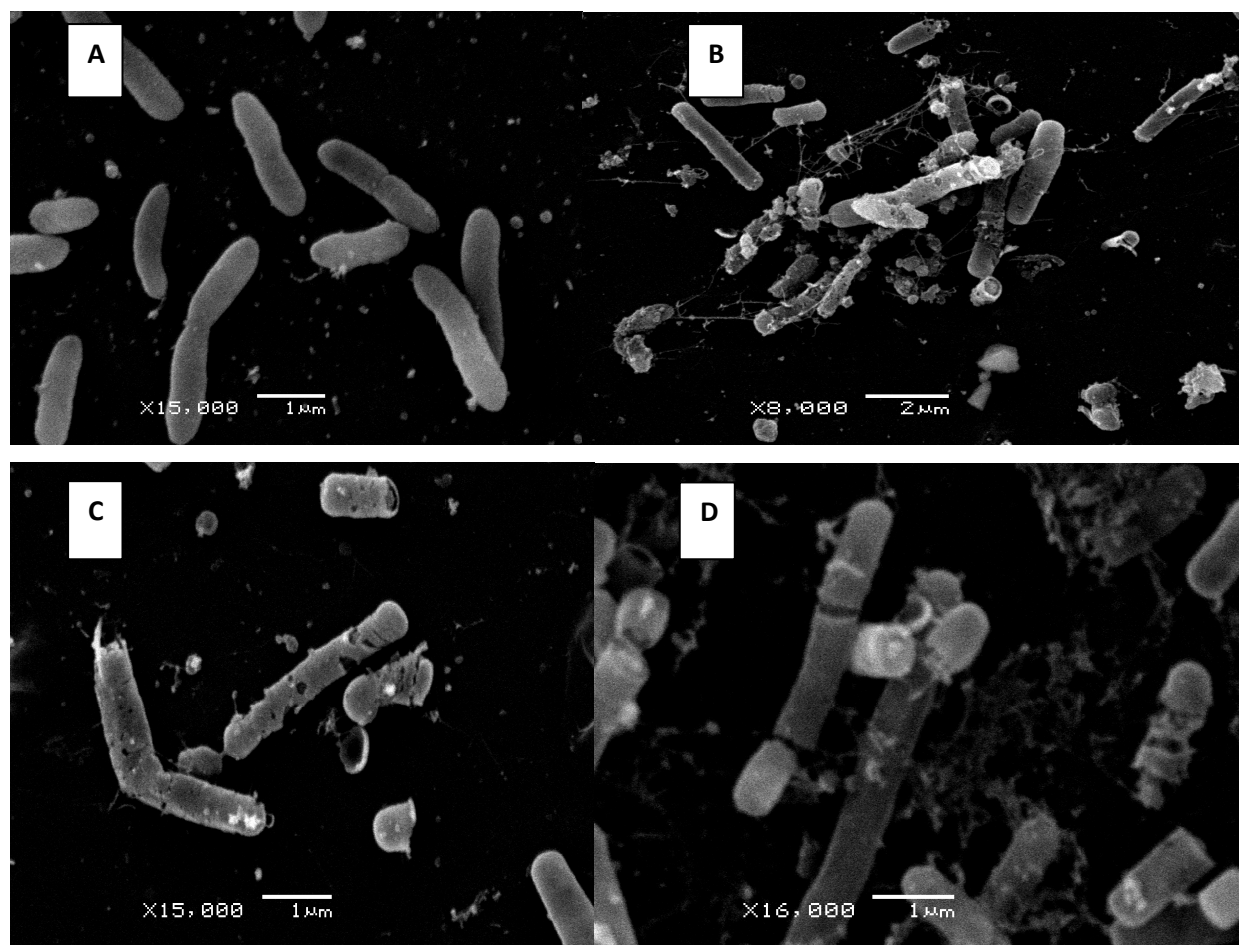


Figure 8: Morphological analysis of *P. fluorescens* by scanning electron microscopy (A) Morphology of *P. fluorescens* cells not treated with the compounds. (B) *P. fluorescens* cells treated with citral. (C) *P. fluorescens* cells treated with (*R*)-citronellal. (D) *P. fluorescens* cells treated 3-(*p*-chlorophenyl)thio citronellal.

After comparing the morphology of the *P. fluorescens* cells not treated with those treated with the compounds, in all treatments were observed evident cellular changes, occurring cell lysis and pore formation in the wall of the bacterium, with total cell destruction. Tyagi and Malik (2010) studied the morphological changes of *P. fluorescens* when treated with the essential oil of *C. citratus* and also observed complete deformation of cells and loss of intracellular material.

From the results found in the SEM analysis in our study, based on the changes in the wall of the bacteria, it is believed that these compounds may act in preventing the binding of the portion of the tetrapeptide N-acetyl muramic acid (NAM), so with the biosynthesis blocked, the result is the formation of a defective wall.

In contrast to the morphological changes caused by the action of the compounds in *P. fluorescens* cells, were observed small apparent morphological changes in *L. monocytogenes*. In just a few points there was formation of pores in the cell wall of the pathogen and apparently there may be loss of intracellular material or some kind of secretion from cells. Rasooli *et al.* (2006) analyzed by transmission electron microscopy the morphological changes in *L. monocytogenes* cells treated with essential oil of thyme, and observed that the cells had reduced size being closer to each other also had small buds on the cell wall, similar was found in our study.

Our results concerning the kinetics of action of compounds against *L. monocytogenes* (Fig. 4), demonstrated that in few minutes of contact with the antimicrobial solution occurs the cell death, however, is not possible to predict the mechanism of action of these compounds by SEM. Possibly the mechanism of action against *L. monocytogenes*, is not related to cell wall biosynthesis.

In our study we observed that although the morphological changes are most apparent in cells of *P. fluorescens*, cell death occurs more rapidly when the compounds are treated against *L. monocytogenes*. So, despite the compounds having antimicrobial activity against *P. fluorescens* and *L. monocytogenes*, possibly the cellular target is different in gram positive and gram negative. Other studies will be conducted to better understand these results.

Studies report that the possible mechanisms of action of essential oils and their components are degradation of the cell wall, cytoplasmic membrane damage, damage to membrane proteins, leakage of intracellular content, coagulation of the cytoplasm and/or depletion of proton motive force (SKANDAMIS *et al.*, 2001; CARSON *et al.*, 2002).

No significant differences were observed between cells treated with the organo-sulfur 3-(*p*-chlorophenyl)thio citronellal and their precursors, citral and (*R*)-citronellal., which suggests that the mechanism of action is very similar.

Based on the antimicrobial activity presented by the 3-(*p*-chlorophenyl)thio citronellal we have studied the hepatotoxic effects of this compound thinking in a future application on food. The results of this assay are presented in Figure 9.

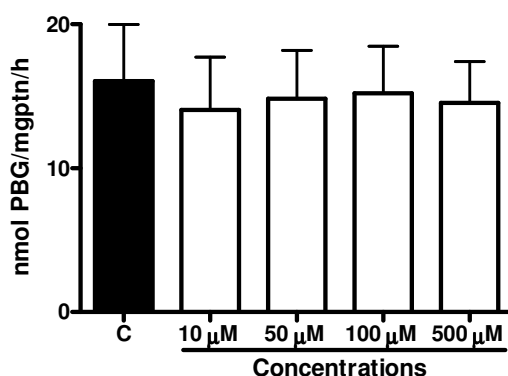


Figure 9: Effect of 3-(*p*-chlorophenyl)thio citronellal on the liver δ -Ala-D activity.

Analyzing to Figure 9, it can be seen that there is no activity hepatoenzyme δ -Ala-D activity at concentrations of 10, 50, 100 and 500 μ M of 3-(*p*-chlorophenyl)thio citronellal, therefore, this compound in the tested concentrations did not exert any toxic effects.

4. Conclusion

It can be concluded that citral, (*R*)-citronellal and 3-(*p*-chlorophenyl)thio citronellal, even at low concentrations, have bactericidal effect, causing different morphological changes in Gram-positive and Gram-negative bacteria, therefore, are potential antimicrobial agents against some bacteria important in foods. We also conclude, after qualitative and quantitative analysis on the bioactivity of these compounds, that the addition of the thiol molecule to citral has potentialized its antimicrobial activity.

This way, our results contribute significantly to advances in the knowledge about the bioactivity of essential oils and chemical modification products for use as antibacterial.

Continuing our studies, other research are being conducted to understand, through analysis of genomics and proteomics, how changes are caused in bacterial cells when exposed to these molecules, so showing the main cellular targets of these new antimicrobial agents.

Acknowledgments

This work was supported by CAPES. The authors thank Moema Queiroz from the Centro of Microscopia Eletrônica (CME, UFRGS) and Lucielli Savegnago from Technology Development Center, Biotechnology Unit (UFPel) for her technical assistance.

5. References

ALMEIDA, J.R.G.A.; SILVA-FILHO, R.N.; NUNES, X.P.; DIAS, C.S.; PEREIRA, F.O.; LIMA, E.O. Antimicrobial activity of the essential oil of *Bowdichia virgilioides* Kunt. **Rev. Bras. Farmacogn**, v.16, p.638-641, 2006.

ARRUDA, T.A.; ANTUNES, R.M.P.; CATÃO, R.M.R.; LIMA, E.O.; SOUSA, D.P.; NUNES, X.P.; PEREIRA, M.S.V.; BARBOSA-FILHO, J.M.; CUNHA, E.V.L. Preliminary study of the antimicrobial activity of *Mentha x villosa* Hudson essential oil, rotundifolone and its analogues. **Rev Bras Farmacogn**, v.16, p.307-311, 2006.

ARWEILER, N.B.; DONOS, N.; NETUSCHIL, L.; REICH, E.; SCULEAN, A. Clinical and antibacterial effect of *tea tree* oil - a pilot study. **Clin Oral Investig**, v.4, p.70-73, 2000.

BENKEBLIA, N. Antimicrobial activity of essential oil extracts of various onions (*Allium cepa*) and garlic (*Allium sativum*). **Lebensm-Wiss Technol**, v.37, p.263-268, 2004.

BASSOLÉ, I.H.N.; LAMIEN-MEDA, A.; BAYALA, B.; OBAME, L.C.; ILBOUDOA, A.J.; FRANZ, C.; NOVAK, J.; NEBIÉ, R.C.; DICKO, M.H.. Chemical composition and antimicrobial activity of *Cymbopogon citratus* and *Cymbopogon giganteus* essential oils alone and in combination. **Phytomedicine**, v.9, p.1070-1074, 2011.

CARSON, C.F.; HAMMER, K.A.; RILEY, T.V. Broth micro-dilution method for determining the susceptibility of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* to the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). **Microbios**, v.82, p.181-185, 1995.

CLAFFEY, N. Essential oil mouthwashes: a key component in oral health management. **J Clin Periodontol**, v.30, p.22-24, 2003.

COSENTINO, S.; TUBEROSO, C.I.G.; PISANO, B.; SATTA, M.; MASCIA, V.; ARZEDI E.; PALMAS, F. In vitro antimicrobial activity and chemical composition of *Sardinian Thymus* essential oils. **Letters in Applied Microbiology**, v.29, p.130-135, 1999.

Clinical and Laboratory Standards Institute/NCCLS. **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing**; Fifteenth Informational Supplement. CLSI/NCCLS document M100-S15 [ISBN 1-56238-556-9]. Clinical and Laboratory Standards Institute, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2005.

COX, S.D.; MANN, C.M.; MARHAM, J.L. The mode of antibacterial action of the essential oil of *Melaleuca alternifolia*. **J. Appl Microbiol**, v.88, p.170-175, 2000.

DORMAN, H.J.D.; DEANS S.G. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. **Journal of Applied Microbiology**, v.88, p.308-316, 2000.

FARAG, R.S.; DAW, Z.Y.; HEWEDI, F.M.; EL-BAROTY, G.S.A.. Antimicrobial activity of some Egyptian spice essential oils. **Journal of Food Protection**, v. 9, p. 665-667, 1989.

FINE, D.H.; FURGANG, D.; BARNETT, M.L.; DREW, C.; STEINBERG, L.; CHARLES, C.H.; VINCENT, J.W. Effect of an essential oil-containing antiseptic mouthrinse on plaque and salivary *Streptococcus mutans* levels. **J Clin Periodontol**, v.27, p.157-161, 2000.

GUSTAFSON, J.E.; LIEW, Y.C.; CHEW, S.; MARKHAM, J.L.; BELL, H.C; S.G. WYLLIE. Effects of tea tree oil on *Escherichia coli*. **Letters in Applied Microbiology**. v.26, p.194-198, 1998.

HAWSER, S. P.; BOUCHILLON, S. K.; HOBAN, D. J.; DOWZICKY, M.; BABINCHAK, T. Rising incidence of *Staphylococcus aureus* with reduced susceptibility to vancomycin and susceptibility to antibiotics: a global analysis 2004–2009. **International Journal of Antimicrobial Agents**.v.37, p.219-224, 2011.

HELANDER, I. M.; HANNA-LEENA, A.; KYÖSTI, L.; TIINA, M.; IRENE, P.; EDDY, J. S.; LEON, G. M. G.; ATTE, V. W. Characterization of the Action of Selected Essential Oil Components on Gram-Negative Bacteria. **J. Agric. Food Chem**. v. 46, p.3590-3595, 1998.

RASOOLI, I.; MOHAMMAD, B. R.; ABDOLAMIR, A. Ultrastructural studies on antimicrobial efficacy of thyme essential oils on *Listeria monocytogenes*. **International Journal of Infectious Diseases**, v.10, p.236-24, 2010.

JULIANO A. M. Composition and in vitro antimicrobial activity of the essential oil of *Thymus herba-barona* Loisel growing wild in Sardinia. **Journal of Essential Oil Research**, v. 12. p.516-522, 2000.

KALCHAYANAND, N. P.; DUNNE, A. S.; RAY, B.. Viability loss and morphology change of foodborne pathogens following exposure to hydrostatic pressures in the presence and absence of bacteriocins. **International Journal of Food Microbiology**, v.91, p.91-98, 2004.

KNOBLOCH, K.; WEIGAND, H.; WEIS, N.; SCHWARM, H.; VIGENSCHOW, H.. Action of terpenoids on energy metabolism, E.J Brunke, Editor, **Progress in Essential Oil Research**. 16th International Symposium on Essential Oils, De Gruyter, Berlin, v.9, p.429-445, 1986.

LAMBERT, R. J. W. et al. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. **Journal of Applied Microbiology**, v. 91, n.3, p.453-462, 2001.

LENARDÃO, EDER J.; FERREIRA, PATRÍCIA C.; JACOB, RAQUEL G.; PERIN, GELSON; LEITE, FÁBIO P. L. Solvent-free conjugated addition of thiols to citral using KF/alumina: preparation of 3-thioorganylcitronellals, potential antimicrobial agents. **Tetrahedron Letters**. v.48, p.6763–6766, 2007.

LEONARD, C.M.; VIRIJEVIC, S.; REGNIER, T.; COMBRINCK, S. Bioactivity of selected essential oils and some components on *Listeria monocytogenes* biofilms. **South African Journal of Botany**, v.76, p.676–680, 2010.

MAYR-HARTING, A.; HEDJES, A.J.; BERKELEY, C.W. methods for studying bacteriocins. In: norris, j.r.; ribbons, d.w. (eds.). **Methods in microbiology**. New york: academic press, v.7, 115p, 1972.

MOTTA, A.S.; BRANDELLI, A. Characterization of an antibacterial peptide produced by *Brevibacterium linens*. **J. Appl Microbiol**, v.92, p.63-71, 2002.

MPOUNTOUKAS, P.; VANTARAKIS, A.; SIVRIDIS, E.; LIALIARIS, T. Cytogenetic study in cultured human lymphocytes treated with three commonly used preservatives. **Food Chem Toxicol**, v.46, p.2390–2393, 2008.

NAIK, M. I.; BASHIR, A. F.; EBENEZAR, J.; JAVID, A. B. Antibacterial activity of lemongrass (*Cymbopogon citratus*) oil against some selected pathogenic bacterias. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v.8, p.535-538, 2010.

NUNES, X.P.; MAIA, G.L.A.; ALMEIDA, J.R.G.S.; PEREIRA, F.O.; LIMA, E.O. Antimicrobial activity of the essential oil of *Sida cordifolia* L. **Rev Bras Farmacogn**, v.16, p. 642-644, 2006.

OOSTERHAVEN, K.; POOLMAN, B.; SMID, E.J. S-carvone as a natural potato sprout inhibiting, fungistatic and bacteristatic compound. **Industrial Crops and Products**, v. 4, p.23-31, 2005.

PAN, P.; BARNETT, M.L.; COELHO, J.; BROGDON, C.; FINNEGAN, M.B. Determination of the in situ bactericidal activity of an essential oil mouthrinse using a vital stain method. **J Clin Periodontol**, v.27, p.256-261, 2000.

SHAPIRO, S. **The inhibitory action of fatty acids on oral bacteria**. Oral Microbiol. Immunol. v.5, p.350-5, 1996.

SMITH-PALMER, A.; STEWART, J.; FYFE, L. Antimicrobial properties of plant essential oils and essences against five important food-borne pathogens. **Lett Appl Microbiol**, v.26, p.118-124, 1998.

SMITH, C. F.; TOWNSEND, D. E. A new medium for determining the total plate count in food. **J Food Protect**, v.62, p.1404-1410, 1999.

SKANDAMIS P.; KOUTSOUMANIS K.; FASSEAS K.; NYCHAS G.J.E.. Inhibition of oregano essential oil and EDTA on *Escherichia coli* O157:H7. **Italian Journal of Food Science**. v.1, p. 65-75, 2001.

SOUZA, E. L. de; BARROS, J. C. de; OLIVEIRA, C. E. V. de; CONCEIÇÃO, M. L. da. Influence of *Origanum vulgare* L. essential oil on enterotoxin production, membrane permeability and surface characteristics of *Staphylococcus aureus*. **International Journal of Food Microbiology**. v.137,p.308–311, 2010.

THOROSKI, J.; BLANK, G.; BILIADERIS, C.. Eugenol induced inhibition of extracellular enzyme production by *Bacillus cereus*. **Journal of Food Protection**. v. 6, p.399-403, 1989.

TYAGI, A.K.; MALIK, A.. Antimicrobial action of essential oil vapours and negative air ions against *Pseudomonas fluorescens*. **International Journal of Food Microbiology**. v.143, p.205-210, 2010.

VICTORIA, F. N.; RADATZ, C.; SACHINI, M.; JACOB, R. G.; PERIN, G.; SILVA, W. P.; LENARDÃO, E. J. KF/Al₂O₃ and PEG-400 as a recyclable medium for the selective α -selenation of aldehydes and ketones. Preparation of potential antimicrobial agents, **Tetrahedron Lett.**, v.50, p.6761-6763, 2009.

5. Considerações finais e perspectivas

Com os resultados deste estudo, pode-se contribuir para os avanços na área de modificação química de óleos essenciais para uso como antibacterianos, auxiliando na compreensão do mecanismo de ação destes novos agentes, uma vez que apenas sugestões acerca do seu modo de ação têm sido propostas.

A interação atual entre o Laboratório de Microbiologia de Alimentos e o Laboratório de Síntese de Orgânica Limpa, é de grande importância, pois ambas as partes têm interesses mútuos em desenvolver novos compostos bioativos com potencial uso em alimentos, uma vez que as doenças transmitidas por alimentos são um problema de saúde pública. O desenvolvimento deste trabalho contribuiu para a consolidação da linha de pesquisa em modificação química de óleos essenciais para uso em alimentos.

Concluiu-se nessa pesquisa que citral, (*R*)-citronelal e 3-(*p*-clorofenil)tio citronelal, mesmo em pequenas concentrações, são potenciais antimicrobianos com efeito bactericida frente a bactérias Gram-positivas e Gram-negativas patogênicas e deteriorantes com importância em alimentos. Além disso, nossos resultados comprovaram que a adição de tiol na molécula de citral potencializa sua bioatividade, funcionalizando esta molécula, sendo necessária uma concentração quase 100 vezes menor para exercer seu efeito bactericida quando comparado ao citral precursor.

Dando continuidade aos nossos estudos, outros trabalhos serão realizados a fim de melhor compreender, através de análise genômica e proteômica, quais alterações são causadas nas células bacterianas quando em contato com estas moléculas, evidenciando os principais alvos celulares destes novos agentes antimicrobianos.

6. Referências

ALLERBERGER, F., WAGNER, M. Listeriosis: a resurgent foodborne infection. **Clinical Microbiology Infection**, v.16, p.16-23, 2010.

ALMEIDA, J.R.G.A.; SILVA-FILHO, R.N.; NUNES, X.P.; DIAS, C.S.; PEREIRA, F.O.; LIMA, E.O. Antimicrobial activity of the essential oil of *Bowdichia virgilioides* Kunt. **Rev. Bras. Farmacogn**, v.16, p.638-641, 2006.

AIEMSAARD, J.; AIUMLAMAI S.; CHANTANA; AROMDEE SUWIMOL TAWEE CHAISUPAPONG; WATCHAREE KHUNKITTI. The effect of lemongrass oil and its major components on clinical isolate mastitis pathogens and their mechanisms of action on *Staphylococcus aureus* DMST 4745. **Research in Veterinary Science**, v. 91, p.31–37, 2011.

ANASTAS, P. T.; FARRIS, C. Bening by Design: alternative Synthetic design for pollution prevention. **American Chemical Society**, Washington, DC, 1994.

ANASTAS, P. T.; WILLIAMSON, T. C. Green Chemistry: Designing chemistry for environment. **American Chemical Society**, Washington: Eds. ACS Symp., 1996.

ANASTAS, P. T.; WARNER, J. **Green Chemistry**: Theory and Practice; Oxford University Press: Oxford, 1998.

ANWAR, F.; HUSSAIN, A. I.; PRZYBYLSKI, R.; SHERAZI, S. T. H.. Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities os basil (*Ocimum basilicum*) essential oils depends on seasonal variations. **Food Chemistry**, v.108, p. 968-995, 2008.

ARRUDA, T.A.; ANTUNES, R.M.P.; CATÃO, R.M.R.; LIMA, E.O.; SOUSA, D.P.; NUNES, X.P.; PEREIRA, M.S.V.; BARBOSA-FILHO, J.M.; CUNHA, E.V.L. Preliminary study of the

antimicrobial activity of *Mentha x villosa* Hudson essential oil, rotundifolone and its analogues. **Rev Bras Farmacogn**, v.16, p.307-311, 2006.

ARWEILER, N.B.; DONOS, N.; NETUSCHIL, L.; REICH, E.; SCULEAN, A. Clinical and antibacterial effect of *tea tree* oil - a pilot study. **Clin Oral Investig**, v.4, p.70-73, 2000.

ASEKUN, O.T.; GRIERSON, D.S.; AFOLAYAN, A.J. Effects of drying methods on the quality and quantity of the essential oil of *Mentha longifolia* L. subsp. *capensis*. **Food Chem**, v.101, p.995-998, 2006.

BASSOLÉ, I.H.N.; LAMIEN-MEDA, A., BAYALA, B.; OBAME, L.C.; ILBOUDOA, A.J.; FRANZ, C.; NOVAK, J.; NEBIÉ, R.C.; DICKO, M.H.. Chemical composition and antimicrobial activity of *Cymbopogon citratus* and *Cymbopogon giganteus* essential oils alone and in combination. **Phytomedicine**, v. 9, p.1070– 1074, 2011.

BAYDAR, H.; ÖZKAN, G., KARADOĞAN, T. Antibacterial activity and composition of essential oils from *Origanum*, *Thymbra* and *Satureja* species with commercial importance in Turkey. **Food Contro**, v.15, p.169-172, 2004.

BELL, C.; KYRIAKIDES, A. **Listeria**: a practical approach to the organism and its control, 2^a ed., Blackwell Publishing Ltd, Oxford, 288 p., 2005.

BENKEBLIA, N. Antimicrobial activity of essential oil extracts of various onions (*Allium cepa*) and garlic (*Allium sativum*). **Lebensm-Wiss Technol**, v.37, p.263-268, 2004.

BERGDOLL, M. S. Analytical methods for *Staphylococcus aureus*. **International Journal of Food Microbiology**, v.10, p. 91-100, 1990.

BHATTCHARYA, J.; GOLDMAN, D.; McCAFFEREY, D.; Estimating probit models with self-selected treatments. **Statisc in Medicine**, v. 25, p.389-413, 2005.

BOLAND, D.J.; BROPHY, J.J.; HOUSE, A. P. N.. ***Eucalyptus* leaf oils: use, chemistry, distillation and marketing.** Inkata Press, Sydney, p.73-87, 1991.

BONADA DE SILVA, C.; GUTERRES, S.S.; WEISHEIMER, V.; SCHAPOVAL, E.E.S. Antifungal activity of the lemongrass oil and citral against *Candida* species. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v.12, p.63–66, 2008.

BOPP, C. A; BRENNER, F. W; WELLS, J. G; STROCKBINE, N. *Escherchia coli*, *Shigella* and *Salmonella*. In: MURRAY, P.R.; BARON, E.J.; PFALLER, M.A.; TENOVER, F.C.; YOLKEN, R.H. **Manual of Clinical Microbiology**. 9ª ed. Washington: American Society for Microbiology. Cap. 28, p.459-474, 2003.

BRAGA, A. L., SILVEIRA, C.C., ZENI, G., SEVERO, W. A., STEFANI, H. A. Synthesis of selenocetals from anol ethers. **J. Chem. Res.**, v.5, p.206-207, 1996.

BURT, S. Essential oils their antibacterial properties and potential applications in foods - a review. **International Journal of Food Microbiology**, n. 94, p.223-253, 2004.

CARLINI, E.A.; CONTAR, J.D.P.; SILVA-FILHO, A.R. Pharmacology of lemongrass (*Cymbopogon citratus* Stapf) I. Effects of teas prepared from the leaves on laboratory animals, **J. Ethnopharmacol**, v.17, p.37–64, 1986.

CARMO, G. M. I., OLIVEIRA, A. A., DIMECH, C. P., SANTOS, D. A., ALMEIDA, M. G., BERTO, L. H., Alves, R. M. S. & Carmo, E. H. Vigilância epidemiológica das doenças transmitidas por alimentos no Brasil. **Boletim Eletrônico Epidemiológico**, 2005.

CARSON, C.F.; HAMMER; K.A; RILEY, T.V. Broth micro-dilution method for determining the susceptibility of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* to the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). **Microbios**, v.82, p.181–185, 1995.

CASTRO, M.M.; MACHADO, S.R. Células e tecidos secretores. In: APPEZZATO-DAGLÓRIA,B.; CARMELLO-GUERREIRO, S. M. **Anatomia vegetal**. Viçosa: Ed. UFV, 2 ed., p. 179-204, 2006.

CASTRO, L.O.; RAMOS, R.L.D.; Principais Gramíneas Produtoras de Óleos Essenciais, **Boletim FEPAGRO**, p.11, 2003.

CENTER OF DISEASE CONTROL AND PREVENTION-CDC. **Investigation update:** multistate outbreak of human salmonella montevideo infections. Disponível em <<http://www.cdc.gov/salmonella/montevideo/index.html>> acesso em outubro de 2010.

CENTER OF DISEASE CONTROL AND PREVENTION-CDC. **Shigella surveillance: annual summary, 2005.** Atlanta Georgia: US Department of health and human service. Disponível em <<http://www.cdc.gov/ncidod/DBMD/phlistdata/shigtab/2005/shigellaintroduction>> acesso em janeiro de 2012.

CHIARINI, E. *Listeria monocytogenes* em matadouros de aves: marcadores sorológicos e genéticos no monitoramento de sua disseminação. 2007. 149f. Tese (Doutor em Ciências) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo. São Paulo.

CLAFFEY, N. Essential oil mouthwashes: a key component in oral health management. **J Clin Periodontol**, v.30, p.22-24, 2003.

CRUZ, C. D.; MARTINEZ, M. B.; DESTRO, M. T. *Listeria monocytogenes*: an infectious agent scarcely known in Brazil. **Alimentos e Nutrição Araraquara**, v.19, n.2, p.195-206, 2008.

CORREIA, C.R D.; COSTA, P.R.R.; FERREIRA, V. F.; **Quím. Nova**, v.25, p.74-81, 2002.

COSTA JGM, RODRIGUES FFG, ANGÉLICO EC, SILVA MR, MOTA ML, SANTOS NKA, CARDOSO ALH, LEMOS TLG. Estudo químico-biológico dos óleos essenciais de *Hyptis martiusii*, *Lippia sidoides* e *Syzigium aromaticum* frente às larvas do *Aedes aegypti*. **Rev Bras Farmacogn**, v.15, p.304-309, 2005.

COUZINET, S.; JAY, C.; BARRAS, C.; VACHON R.; VERNET, G.; NINET B.; JAN I.; MINAZIO M.; FRANCOIS P.; LEW D.; TROESCH, A.; SCHRENZEL, J. High-density DNA probe arrays for

identification of staphylococci to the species level. **Journal of Microbiological Methods**, n.6, p.201– 208, 2005.

COX, S.D.; MANN, C.M.; MARHAM, J.L. The mode of antibacterial action of the essential oil of *Melaleuca alternifolia*. **J Appl Microbiol**, v.88, p.170-175, 2000.

DE-SOUZA, M.M.; GARBELOTO, M.; DENEZ, K.; EGER-MANGRICH, I. Avaliação dos efeitos centrais dos florais de Bach em camundongos através de modelos farmacológicos específicos. **Rev Bras Farmacogn**, v.16, p.365-371, 2006.

DEURENBERG, R.; STOBBERINGH, E. The evolution of *Staphylococcus aureus*. **Infection Genetics and Evolution**, v. 8, p.747-763, 2008.

DOGAN, B.; BOOR, K.J. Genetic diversity and spoilage potentials among *Pseudomonas* spp. isolated from fluid milk products and dairy processing plants. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.69, p.130-138, 2003.

EUZÉBY, J. P. **List of Bacterial names with Standing in Nomenclature**. Disponível em: <<http://www.bacterio.cict.fr/s/staphylococcus.html>>. Acesso em: 19 de outubro de 2010

FERREIRA, M.S.C.; FONTELES, M.C.. Aspectos etnobotanicos e farmacologicos do *Cymbopogon citratus* Stapf (capim limao). **Revista Brasil. Farmacia**. v.70, p.94–97, 1989.

FINE, D.H.; FURGANG, D.; BARNETT, M.L.; DREW, C.; STEINBERG, L.; CHARLES, C.H.; VINCENT, J.W. Effect of an essential oil-containing antiseptic mouthrinse on plaque and salivary *Streptococcus mutans* levels. **J Clin Periodontol.**, v.27, p.157-161, 2000.

FRANCO, B.D.G.; LANDGRAF, M.; Microbiologia de Alimentos, Ed: Atheneu. Liu, D.; **Journal of Medical Microbiology**, p.55 - 645, 2006.

FRYMOYER, A.; HERSH, A. L.; ZLATAN, C.; BENET, L. Z.; GUGLIELMO, J. Prediction of Vancomycin Pharmacodynamics in Children With Invasive Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Infections: A Monte Carlo Simulation. **Clinical Therapeutics**, v. 32, n° 3, p.309-405, 2010.

FORSYTHE, S. J. **Microbiologia da segurança alimentar**. 1º edição. Porto alegre: Artmed, 424p, 2000.

GERMANO, P. M. L.; GERMANO, M. I. S. **Hygiene and sanitary surveillance of food**. 3.ed. Barueri, São Paulo: Manole. 2008.

GILL, A.O.; DELAQUIS, P.; RUSSO, P.; HOLLEY, R.A.. Evaluation of antilisterial action of cilantro oil on vacuum packed ham. **International Journal of Food Microbiology**, v.73, p.83–92, 2002.

GRIMONT, P. A.; WEILL, F. X. **Antigenic formulae of the salmonella serovars**. 9th Ed. World health organization collaborating centre for reference and research on salmonella. Paris, France, Pasterus Institute, 2007.

GUILLARD, V.; ISSOUPOV, V.; REDL, A.; GONTARD, N.; **Food preservative content reduction by controlling sorbic acid release from a superficil coating**: Innovative food science and emerging tchechnologies, v.10, p.108-115, 2009.

GUSTAFSON, J.E.; LIEW, Y.C.; CHEW, S.; MARKHAM, J.L.; BELL, H.C; S.G. WYLLIE. Effects of tea tree oil on *Escherichia coli*. **Letters in Applied Microbiology**, v.26, p.194–198, 1998.

HALCON, L.; MILKUS, K. *Staphylococcus aureus* and wounds: a review of tea tree oil as a promising antimicrobial. **Am J Infect Control**, v.32, p.402-408, 2004.

HAWSER, S. P.; BOUCHILLON, S. K.; HOBAN, D. J.; DOWZICKY, M.; BABINCHAK,T. Rising incidence of *Staphylococcus aureus* with reduced susceptibility to vancomycin and susceptibility to antibiotics: a global analysis 2004–2009. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.37, p.219–224, 2011.

HELANDER, I. M.; HANNA-LEENA, A.; KYÖSTI, L.; TIINA, M.; SMID, J. E.. Characterization of the Action of Selected Essential Oil Components on Gram-Negative Bacteria. **J. Agric. Food Chem**, v.46, p.3590–3595, 1998.

HOLT, J.; KRIEG, N. R.; SNEATH, P. H. A.; STALEY, J. T.; WILLIAMS, S. T. **Bergey's manual of determinative bacteriology**. 9 Ed. Baltimore: The Willians e Wilkins Co, 751p, 1994.

JACOB, R. G.; PERIN, G.; LOI, L. N.; PINNO, C. S.; LENARDAO, E. J. **Tetrahedron Lett**, v.44, p.3605, 2003.

JAY, J. M.; LOESSNER, M. J.; GOLDEN, D. A. **Modern food microbiology**, New York, NY: Springer, v.8, p.545 – 634, 2005.

JESSOP, P.; LEITNER, W. **Chemical Syntesis Using Supercritical Fluids**. Weinheim: Wiley-VCH, 1999.

JIANG, L.; CHEN, J.; XU, J.; ZHANG, X.; WANG, S.; ZHAO, H.; VONGXAY, K.; FANG, W. Virulence characterization and genotypic analyses of *Listeria monocytogenes* isolates from food and processing environments in eastern China. **International Journal of Food Microbiology**, v.121, p.53–59, 2008.

KONAKLIEVA, M. I.; PLOTKIN, B. J.; **Recent pat. Antiinfect. Drug discov**, v.4, p.1- 177, 2006.

KOREEN, L.; RAMASWAMY S. V.; GRAVISS, E. A.; NAIDICH, S.; MUSSER, J. M.; KREISWIRTH, B. N. *spa* Typing Method for Discriminating among *Staphylococcus aureus* Isolates: Implications for Use of a Single Marker To Detect Genetic Micro- and Macrovariation. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 2, p.792–799, 2004.

KHUNKITTI, W. **In vitro antimicrobial and antioxidant activities of some *Cymbopogon* species**. In: Akhila, A. (Ed.), *Essential Oil-Bearing Grasses*. CRC Press, London, p. 167–183, 2010.

KNOBLOCH, K.; WEIGAND, H.; WEIS, N.; SCHWARM, H.; VIGENSCHOW, H.. Action of terpenoids on energy metabolism, E.J Brunke, Editor, **Progress in Essential Oil Research**: 16th International Symposium on Essential Oils, De Gruyter, Berlin, p.429–445, 1986.

KUHNERT, P.; BOERLIN, P.; FREY, J. Target genes for virulence assessment of *Escherichia coli* isolates from water, food and the environment. **FEMS Microbiological Reviews**, v. 24, p.107-117, 2000.

LAMBERT, R. J. W.; SKANDAMIS, P.N.; COOTE, P.J., NYCHAS, G.J. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. **Journal of Applied Microbiology**, v.91, n.3, p.453-462, 2001.

LENARDAO, E. J.; FREITAS, G. R. A.; DABDOUB, M. J.; BATISTA, A. C.; SILVEIRA, C. C."Green Chemistry" – os 12 princípios da química verde e sua inserção nas atividades de ensino e pesquisa. **Quim. Nova**, v.26, 123p., 2003.

LENARDÃO, E. J.; FERREIRA, P. C.; JACOB, R. G.; PERIN, G.; LEITE, F. P. L. Solvent-free conjugated addition of thiols to citral using KF/alumina: preparation of 3-trioorganylcitronellals, potential antimicrobial agents. **Tetrahedron Lett**, v. 48, p.6763-6766, 2007.

LINDBERG, T.; *Strategies and Tactics in organic synthesis*; Editor. Academic Press, Orlando, 1975.

LIU, Z.; ERHAN, S. Z.; AKIN, D. E.; BARTON, F. E. "Green" composites from renewable resources: preparation of epoxidized soybean oil and flax composites. **J. Agric. Food Chem.**, v.54, p.2134-2137, 2006.

LUPE, F. A. **Estudo da composição química de óleos essenciais de plantas aromáticas da Amazônia** (Mestrado em Química - Química Orgânica). Universidade Federal de Campinas, Campinas, 120f, 2007.

MANTILLA, S. P. S.; FRANCO, R. M.; OLIVEIRA, L. A. T.; SANTOS, E. B.; GOUVÊA, R. Importância da *Listeria monocytogenes* em Alimentos de Origem Animal. **Revista da FZVA**, v.14, n.1, p.180-192, 2007.

MEAD, P. S.; SLUTSKER, DIETZ, V.; MCCAIG, L. F.; BRESEE, J. S.; SHAPIRO, C.; GRIFFIN, P. M.; TAUXE, R. V. Food-related illness and death in the United States. **Emerging infections diseases**, v. 5, p.607-625, 1999.

MINISTÉRIO DA SAÚDE – MS – BRASIL. Informações técnicas. Disponível em <http://portal.saude.gov.br/portal/profissional/visualizar_texto.cfm?idtxt=31758> Acesso em outubro de 2011.

MPOUNTOUKAS, P.; VANTARAKIS, A.; SIVRIDIS, E.; LIALIARIS, T. Cytogenetic study in cultured human lymphocytes treated with three commonly used preservatives. **Food Chem Toxicol**, v.46, p.2390–2393, 2008.

MURRAY, P.R. **Microbiologia médica**, 3.ed. São Paulo: Guanabara Koogan. 726p, 2000.

NALÉRIO, É. S.; ARAÚJO, M. R.; MENDONÇA, K. S.; BASSANI, M. T.; SILVA, W. P. *Listeria monocytogenes*: monitoramento desse perigo biológico na cadeia produtiva de frangos do sul do Rio Grande do Sul. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.29, n.3, 2009.

NAIK, M. I.; BASHIR, A. F.; EBENEZAR, J.; JAVID, A. B.. Antibacterial activity of lemongrass (*Cymbopogon citratus*) oil against some selected pathogenic bacterias. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v.9, p.535-538, 2010.

NEMA, V.; AGRAWAL, R.; KAMBOJ, D. V.; GOEL, A. K.; SINGH L. Isolation and characterization of heat resistant enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* from a food poisoning outbreak in Indian subcontinent. **International Journal of Food Microbiology**, v.117, p.29–35, 2007.

NGUEFACK, J.; NGUIKWIE, S. K.; FOTIO, D.; DONGMO, B.; LETH, V.; NKENGFACK, A. E. Fungicidal potential of essential oils and fractions from *Cymbopogon citratus*, *Ocimum gratissimum*

and *Thymus vulgaris* to control *Alternaria padwickii* and *Bipolaris oryzae*, two seed-borne fungi of rice (*Oryza sativa* L.). **Journal of Essential Oil Research**, v.19, p.581-587, 2007.

NOGUEIRA, C. W.; ZENI, G.; ROCHA J. B. Organoselenium and organotellurium compounds: toxicology and pharmacology. **Chem. Rev.**, v.104, p.6255-6285, 2004.

NOTERMANS, S.; GEISSEN A. Foodborne disease in the 1980s and 1990s, the Dutch experience. **Food Cont.**, v. 4, p.122-124, 2003.

NUNES, XP.; MAIA, GLA.; ALMEIDA, JRGS.; PEREIRA, FO.; LIMA, EO. Antimicrobial activity of the essential oil of *Sida cordifolia* L. **Rev Bras Farmacogn**, v.16, p.642-644, 2006.

OOSTERHAVEN, K.; POOLMAN, B.; SMID, E.J. S-carvone as a natural potato sprout inhibiting, fungistatic and bacteristatic compound. **Industrial Crops and Products**, v.4, p.23–31, 2005.

PALLERONI, N.J. Pseudomonadaceae. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. Krieg, N. R. and Holt J. G. (editors) Baltimore: The Williams and Wilkins Co., p.141 – 199, 1984.

PAN, P.; BARNETT, M.L.; COELHO, J.; BROGDON, C.; FINNEGAN, M.B. Determination of the in situ bactericidal activity of an essential oil mouthrinse using a vital stain method. **J Clin Periodontol**, v.27, p.256-261, 2000.

PAULMIER, C. **Selenium Reagents and Intermediates in Organic Synthesis**; Oxford, UK: Pergamon Press, 1986.

PEIRANO, G.; SOUZA, F. S.; RODRIGUES, D. P. **Frequency of sorovars and antimicrobial resistance in *Shigella* spp.** Form Brazil. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. v.101, p.245-250, 2006.

PENATTI, M. P. A.; HOLLANDA, L. M.; NAKAZATO, G.; CAMPOS, T. A.; LANCELOTTI, M.; ANGELINI, M.; BROCCHI, M.; ROCHA, M.M.M.; SILVEIRA, W. D. da. Epidemiological characterization of resistance and PCR typing of *Shigella flexneri* and *Shigella sonnei* strains isolated from bacillary dysentery cases in southeast Brazil. **Braz. J. med. Biol. Res.**, 2006.

PO-REN, H.; SHIH-YI, L.; CHERNG-LIH, P.C.; TEIN-YAO, C.; JANG-JIH, L.. Clonal dissemination of meticillin-resistant and vancomycin intermediate *Staphylococcus aureus* in a Taiwanese hospital. **International Journal of Antimicrobial Agents**. v.36, p.307–312, 2010.

RAMALHO, V.; JORGE, N. Antioxidants utilizados em oleos, gorduras e alimentos gordurosos. **Química nova**, São Paulo, v.29, p.51-55, 2006.

RAY, B. **Spoilage of Specific food groups**. In: Fundamental Food Microbiology, CRC Press, Boca Raton FL, p.220, 1996.

SADDIQ, A.M.N.A.A.; KHAYYAT, S. A. Chemical and antimicrobial studies of monoterpene: Citral. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v.98, p.89–93, 2010.

SHELOBOLINA, E. S.; SULLIVAN, S. A.; ONEIL, K. R.; KEVIN, K. P.; LOVLEY, D. R. isolation, carachterization and U (VI) reducingpotential of a facultatively anaerobic, acid-resistant bacterium from low-pH nitrate and U (VI)-contaminated subsurface sediment and description of *Salmonella subterranea* sp. **Applied and environmental microbiology**. v.70, n 5, p.2950-2965, 2004.

SHONO, T.; MATSUMURA, Y.; KASHIMURA, S.; KYUTOKU, H.; **Tetrahedron Lett**. v.24, 1205p., 1978.

SKANDAMIS, P.; KOUTSOUMANIS, K.; FASSEAS, K.; NYCHAS, G.J.E.. Inhibition of oregano essential oil and EDTA on *Escherichia coli* O157:H7. **Italian Journal of Food Science**. v.1, p.65–75, 2001.

SAKAI, H.; PROCOP, G. W.; KOBAYASHI, N.; TOGAWA, D.; WILSON, A.; BORDEN, L.; KREBS, V.; BAUEN, T. W. Simultaneous Detection of *Staphylococcus aureus* and Coagulase-Negative Staphylococci in Positive Blood Cultures by Real-Time PCR with Two Fluorescence Resonance Energy Transfer Probe Sets. **Journal of Clinical Microbiology**, v.42, n. 2, p.5739–5744, 2004.

SEYMOUR, R. Additional properties and uses of essential oils. **J Clin Periodontol.** v.30, p.19-21, 2003.

SIMÕES, C.M.O.; SPITZER, V. Óleos voláteis. In: **Farmacognosia: da planta ao medicamento.** 5º ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/ Editora da UFSC, v.9, p. 467-496, 2004.

SOUZA, E. L. de; BARROS, J. C. de; OLIVEIRA, C. E. V. de; CONCEIÇÃO, M. L. da. Influence of *Origanum vulgare* L. essential oil on enterotoxin production, membrane permeability and surface characteristics of *Staphylococcus aureus*. **International Journal of Food Microbiology.** v.137,p.308–311, 2010.

TANAKA, K; TODA, F. Solvent-free organic synthesis. **Chem. Rev.,** v. 100, p.1025-1074, 2000.

TRABULSI, L. R.; ALTHERTHUM, F. **Microbiologia**, 5º edição. São Paulo: Ed. Atheneu, 2008.

TSENG, C. W.; ZHANG, S.; STEWART, G. Accessory Gene Regulator Control of Staphylococcal Enterotoxin D Gene Expression. **Journal of Bacteriology.** v.186, n.6, p.1793-1801, 2004.

TAUXE, R.V. Emerging foodborne pathogens. **International Journal of Food Microbiology**, v.78, p.31- 41, 2002.

TYAGI, A.K.; MALIK, A.. Antimicrobial action of essential oil vapours and negative air ions against *Pseudomonas fluorescens*. **International Journal of Food Microbiology.** v.143, p.205–210, 2010.

VAILLANT, V.; DE VALK, H.; BARON, E.; ANCELLE, T.; COLIN, P.; DELMAS, M. C.; DUFOUR, B.; POUILLOT, R.; LE STRAT, Y.; WEINBRECK, P.; JOUGLA, E.; DESENCLOS, J.C. Foodborne infections in France. **Foodborne Pathogens and Disease**, v.2, p.221-232, 2005.

VAZ, C. S. L. **Determinação da diversidade fenotípica e genotípica de *Salmonella enterica* subsp. enterica sorovar Enteritidis no Rio Grande do Sul.** 2007. 137f. Tese (doutorado em

ciências veterinárias) – Faculdade de veterinária , Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

WELTON, T. Room-Temperature Ionic liquids. **Solvents for Synthesis and catalysis. Chem.** v.99, p.2071-2083, 1999.

WORD HEALTH ORGANIZATION – WHO. **Salmonella health topic.** Disponível em <<http://www.who.int/topics/salmonella/en/>> Acesso em outubro de 2010.