

ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO 3-(ρ -clorofenil)tio citronelal CONTRA *Staphylococcus aureus* E SUA APLICAÇÃO EM FILMES BIODEGRADÁVEIS

JÚLIA COSWIG GOLDBECK¹, MARCELO MENDONÇA², SHANISE LISIE MELLO EL HALAL³,
ÁLVARO RENATO GUERRA DIAS⁴, EDER JOÃO LENARDÃO⁵, WLADIMIR PADILHA DA
SILVA⁶

1Universidade Federal de Pelotas - UFPel. juliaga86@yahoo.com.br

2Universidade Federal de Pelotas - UFPel. marcelomendoncavet@yahoo.com.br

3Universidade Federal de Pelotas - UFPel. shanisemell@hotmail.com

4Universidade Federal de Pelotas - UFPel. argd@zipmail.com.br

5Universidade Federal de Pelotas - UFPel. elenardao@uol.com.br

6Universidade Federal de Pelotas - UFPel. wladimir.padilha2011@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

Staphylococcus aureus é um patógeno oportunista que vem chamando atenção dos pesquisadores em todo o mundo. Em alimentos, essa bactéria apresenta grande importância por causar uma intoxicação alimentar, resultante da ingestão de enterotoxinas pré-formadas em alimentos (NEMA et al., 2007). Devido ao seu histórico de resistência a substâncias antimicrobianas, a Organização Mundial da Saúde ratificou a necessidade urgente de encontrar compostos com atividade antiestafilocócia (colocar a referência).

Uma alternativa ambientalmente benigna aos conservantes sintéticos utilizados no controle de *S. aureus* são os óleos essenciais de plantas (GOLDBECK et al., 2014). Contudo, os óleos essenciais e seus derivados, são substâncias extremamente voláteis e instáveis a fatores como luz e oxigênio, o que limita sua utilização direta nos alimentos, ocasionando possíveis alterações sensoriais nos produtos.

Em virtude disto, estudos tem sido conduzidos visando a modificação química de derivados de óleos essenciais através, a fim de diminuir a volatilidade e intensificar a atividade antimicrobiana desenvolvendo assim, um novo conservante de origem natural, sintetizado através de reações químicas envolvendo fontes renováveis com menos emissão de poluentes, preservando dessa forma não só a saúde dos consumidores como também o meio ambiente. Um dos tiocompostos sintetizados por nosso grupo é o 3-(ρ -clorofenil)tio citronelal, derivado do óleo essencial de *C. citratus* a partir da modificação química pela adição de enxofre na molécula de citral (componente majoritário do óleo).

Este trabalho objetivou avaliar a bioatividade do 3-(ρ -clorofenil)tio citronelal contra células planctônicas e contra biofilme de *S. aureus*, enfatizando o possível mecanismo de ação do composto. Além disso, com o intuito de uma futura aplicação tecnológica como bioconservante em alimentos, filmes biodegradáveis de amido incorporados com o tiocomposto foram elaborados.

2. METODOLOGIA

O 3-(ρ -clorofenil)tio citronelal foi sintetizado segundo protocolo desenvolvido por LENARDÃO et al. (2007) e sua bioatividade foi testada contra *S. aureus* FRI 326, através das técnicas de disco difusão (CLSI, 2012), concentração inibitória mínima (CLSI, 2012), cinética de ação (MOTTA;BRANDELLI 2002), atividade antibiofilme (PETERSON et al., 2004) e análise da morfologia das células através de microscopia eletrônica de varredura (KALCHAYANAND et al., 2004), após contato com o composto.

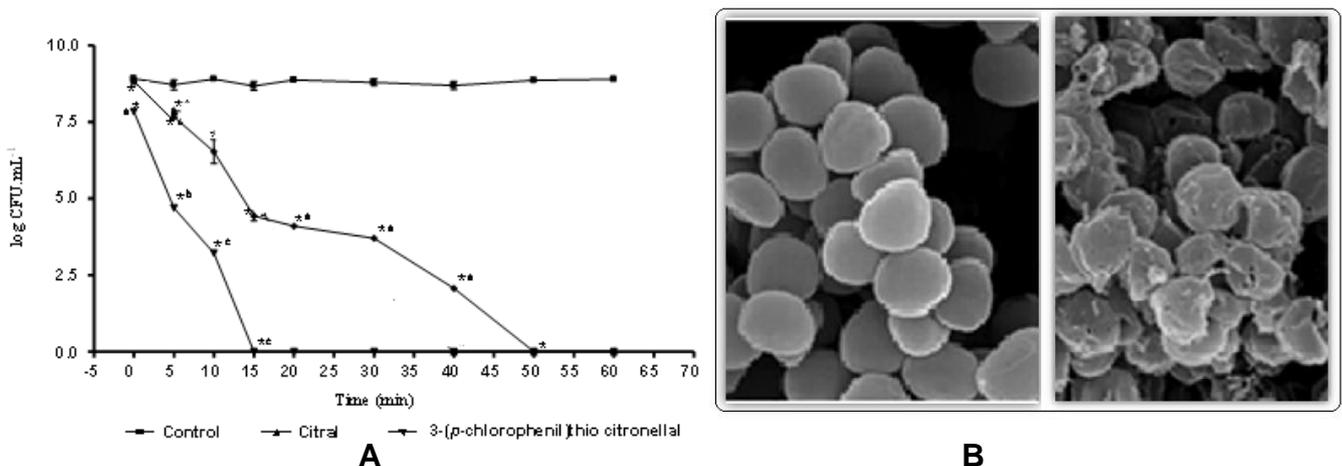
Para inferir o mecanismo de ação, inicialmente a cepa de *S. aureus* foi submetida a doses subletais do composto a fim de indução a resistência e posterior rastreamento através de técnicas de genômica e proteômica, observando-se que genes e proteínas foram alterados.

Os filmes biodegradáveis foram preparados conforme descrito por GHASEMLOU et al. (2013), utilizando-se concentração final de 62,5 µg do 3-(p-clorofenil)tio citronelal.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

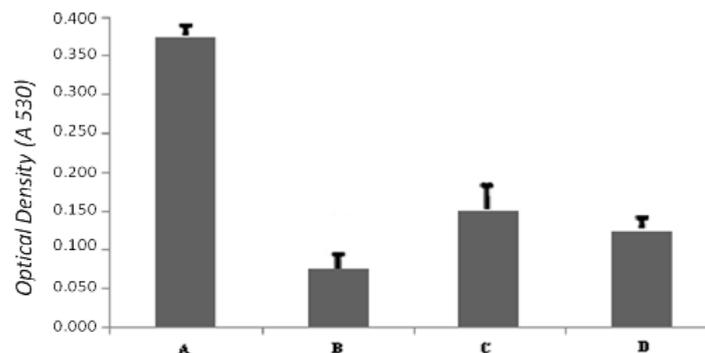
Através das técnicas de avaliação de atividade antimicrobiana, observou-se que o patógeno *S. aureus* é potencialmente sensível ao 3-(p-clorofenil)tio citronelal. Foram obtidos halos médios de inibição de 41± 0,6 mm de diâmetro, MIC de 62,5 µg, e atividade bactericida contra o patógeno. A potente atividade do composto foi evidenciada pela curva de cinética de ação, a qual demonstrou que em apenas 15 min de contato houve morte de todas as células do patógeno (Figura 1A) A ação do composto sobre as células pode ser visualizada na Figura 1B.

Figura 1. (A) cinética de ação do 3-(p-clorofenil)tio citronelal contra *S. aureus* em função do tempo de contato. (B) morfologia das células de *S. aureus* após 1 hora de contato com o composto a uma concentração de 62,5 µg, avaliada por Microscopia Eletrônica de Varredura.



Além de sua atividade contra células planctônicas, o composto também inibiu a formação de biofilme do patógeno (Figura 2), resultado de extrema relevância tendo em vista ser uma bactéria ubíqua, de difícil controle e fácil disseminação em plantas de processamento de alimentos.

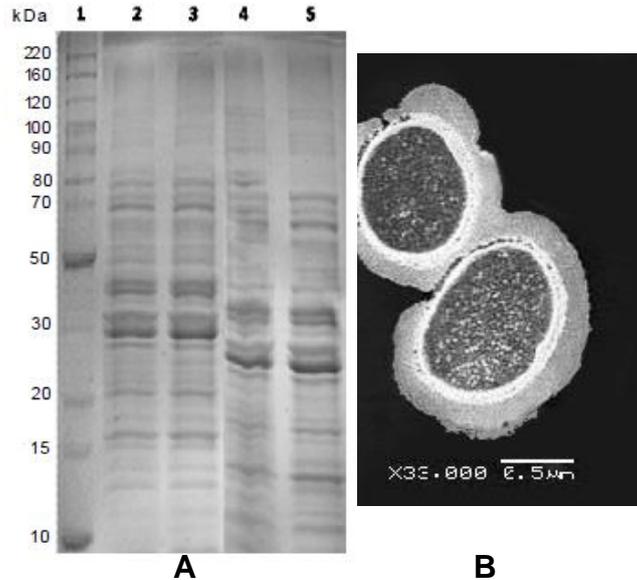
Figura 2. Efeito antibiofilme do composto (62,5 µg) após incubação por 48h a 37°C em microplacas de poliestireno. A: biofilme formado pelo patógeno (controle). B: ação antibiofilme do 3-(p-clorofenil)tio citronelal. C: ação antibiofilme de citral. D: ação antibiofilme do antibiótico vancomicina.



Após a cepa FRI 326 ter sido submetida a doses subletais, como uma forma de sobrevivência a um ambiente hostil esta tornou-se resistente ao composto. A partir desta resistência, ferramentas de análises genômicas e pós genômicas foram utilizadas para

evidenciar quais compartimentos celulares, genes e ou proteínas foram modificados e, desse forma, descobrir os possíveis alvos celulares do composto. Observou-se que houve espessamento na parede celular (Figura 4B) e que uma proteína de parede celular (80 kDa) foi expressa pela cepa resistente (Figura 4A).

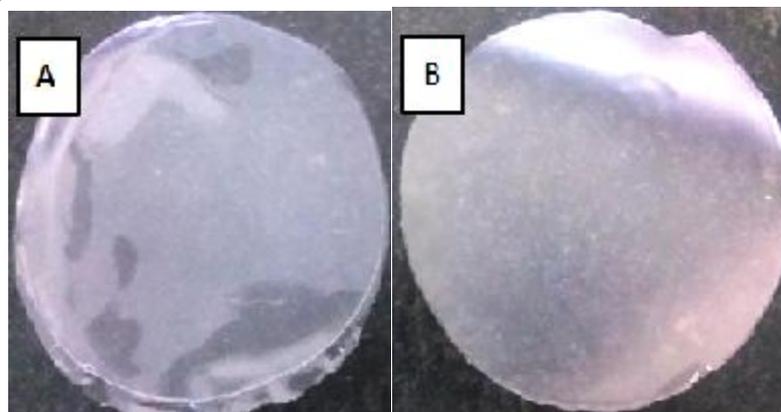
Figura 4. A: SDS-PAGE de proteínas expressas por *S. aureus* sensível e resistente ao 3-(p -clorofenil)tio citronelal. Coluna 1 peso molecular da proteína marcador (Genei™). Coluna 2 proteínas de membrana celular da cepa resistente ao 3-(p -clorofenil)tio citronelal. Coluna 3 proteínas de membrana celular da cepa padrão (sensível ao 3-(p -clorofenil)tio citronelal). Coluna 4 proteínas de parede celular da cepa resistente ao 3-(p -clorofenil)tio citronelal. Coluna 5 proteínas de parede celular da cepa padrão (sensível ao 3-(p -clorofenil)tio citronelal). B: Imagem das células de *S. aureus* resistente ao 3-(p -clorofenil)tio citronelal através de Microscopia Eletrônica de Transmissão.



Acredita-se que este resultado esteja relacionado a um aumento de monômeros de mureína na parede celular do patógeno sendo uma forma de evitar a passagem do composto para o interior da célula, tornando-a, assim, resistente ao 3-(p -clorofenil)tio citronela.

Foram obtidos filmes biodegradáveis com incorporação do 3-(p -clorofenil)tio citronelal (Figura 6) com boas características de solubilidade, resistência à tração, permeabilidade ao vapor de água e luminosidade (dados não mostrados).

Figura 5. **A:** filme biodegradável de amido (controle). **B:** filme biodegradável de amido e 3-(p -clorofenil)tio citronelal



O filme biodegradável de amido adicionado de 3-(*p*-clorofenil)tio citronelal apresentou bioatividade contra *S. aureus*, observando-se halos médios de inibição de 40mm de diâmetro, pela técnica de disco difusão.

4. CONCLUSÕES

O composto 3-(*p*-clorofenil)tio citronelal é um potente bactericida contra células planctônicas e biofilme de *S. aureus* necessitando baixa concentração e pouco tempo de contato para promover morte celular. Uma das alternativas de uso deste novo agente antibacteriano é através da sua incorporação em filmes bioativos aumentando, assim, a inocuidade e vida útil de alimentos.

Possivelmente, o mecanismo de ação deste composto esteja relacionado ao ataque à parede celular bacteriana; o entendimento de como a bactéria se comporta após exposição a estes novos agentes antimicrobianos, poderá auxiliar no desenvolvimento de novos compostos com ação específica em cada compartimento celular bacteriano, podendo ser utilizado também em conjunto com outros compostos, de forma a aumentar sua eficiência e diminuir as concentrações utilizadas, efeitos sensoriais em alimentos e, até mesmo, evitar que microorganismos adquiram resistência a estes agentes.

Agradecimento:

Este trabalho teve apoio financeiro de CAPES, FAPERGS/CNPq e PRONEM 11/2026-4.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CLSI. (2012) *Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved standard - Eleventh Edition*. CLSI document M02-A11. Wayne, PA: **Clinical and Laboratory Standards Institute**.
- GHASEMLOU, M., ALIHEIDARI, N., FAHMI, R., SHOJAEI-ALIABADI, S., KESHAVARZ, B., CRAN, M., & KHAKSAR, R. (2013). Physical, mechanical and barrier properties of corn starch films incorporated with plant essential oils. *Carbohydrate Polymers*, 98, 1117–1126.
- GOLDBECK, J. C. et al. (2014). Bioactivity and morphological changes of bacterial cells after exposure to 3-(*p*-chlorophenyl)thio citronellal. *LWT - Food Science and Technology*, 305–320.
- KALCHAYANAND, N.; DUNNE, P.; RAY, B. (2004) 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. 991-98.
- LENARDÃO, EDER J.; FERREIRA, PATRÍCIA C.; JACOB, RAQUEL G.; PERIN, GELSON; LEITE, FÁBIO P. L. (2007) Solvent-free conjugated addition of thiols to citral using KF/alumina: preparation of 3-thioorganylcitronellals, potential antimicrobial agents. **Tetrahedron Letters**. v. 48, pg. 6763–6766.
- MOTTA, A.S.; BRANDELLI, A. (2002) Characterization of an antibacterial peptide produced by *Brevibacterium linens*. **J. Appl Microbiol**, v.92, p.63-71.
- NEMA, V.; AGRAWAL, R.; KAMBOJ, D.V.; GOEL, A.K. L. (2007) Singh Isolation and characterization of heat resistant enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* from a food poisoning outbreak in Indian subcontinent Int. **J. Food Microbiol.**, v.117, pg. 29–35.
- PETERSON, F. C., PECHARKI, D.; SCHEIE, A. A. (2004) Biofilm mode of growth of *Streptococcus intermedius* favored by a competence stimulating signaling peptide. **J Bacteriol** v.186, pg.6327–6331.