

Avaliação do mecanismo de ação do isotiocianato de alila contra *Escherichia coli*

Screening of allyl isothiocyanate's mechanism of action against Escherichia coli

Rebeca Milano Hella^[a], Renata Ernlund Macedo^[b], Fernando Bittencourt Luciano^[c]

^[a] Farmacêutica, mestranda em Ciência Animal na Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUCPR), São José dos Pinhais, PR - Brasil, e-mail: rebeca_milanoHELLA@yahoo.com.br

^[b] Médica-veterinária, doutora em Tecnologia de Alimentos pela Universidade Federal do Paraná (UFPR), professora do Mestrado em Ciência Animal da Escola de Ciências Agrárias e Medicina Veterinária, Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUCPR), São José dos Pinhais, PR - Brasil, e-mail: renata.macedo@pucpr.br

^[c] Farmacêutico, doutor em Ciência dos Alimentos pela University of Manitoba, professor do Mestrado em Ciência Animal da Escola de Ciências Agrárias e Medicina Veterinária, Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUCPR), São José dos Pinhais, PR - Brasil, e-mail: fernando.luciano@pucpr.br

Resumo

A seleção de moléculas naturais com ação inibitória sobre patógenos é uma das formas de reduzir os problemas causados pela resistência antimicrobiana. O isotiocianato de alila (ITA), extraído de plantas, possui comprovada atividade antimicrobiana contra cepas de *Escherichia coli*. No entanto, seu mecanismo de ação sobre esses micro-organismos ainda é desconhecido. Este trabalho teve como objetivo identificar o mecanismo de ação do isotiocianato de alila contra a *E. coli* utilizando método rápido baseado na resposta ao estresse de cepas mutantes contendo gene indicador lacZ (produtor de β -galactosidase). Foram utilizadas cinco cepas de *E. coli*, sendo uma controle (selvagem) e quatro modificadas por fusões entre o gene lacZ e as regiões promotoras de danos: da proteína induzida pelo choque ao frio, cspA::lacZ (ação de referência associada ao cloranfenicol); das enzimas citoplasmáticas induzidas pelo calor, ibp::lacZ (ação associada à estreptomicina), do promotor P3 do gene rpoH, ativado pelo desdobramento de proteínas no periplasma, P3rpoH::lacZ (polimixina B); do promotor sulA, induzido pela inibição da replicação do DNA, sulA::lacZ (ácido nalidíxico). A ação de ITA sobre as cepas de *E. coli* foi comparada a um controle negativo (sem tratamento) e a controles positivos dos antibióticos referência para cada mecanismo de ação. O ITA não resultou em maior expressão da enzima β -galactosidase em nenhuma das cepas geneticamente modificadas. Contudo, mediante algum mecanismo ainda desconhecido, o ITA foi provavelmente capaz de inibir seletivamente a produção de pelo menos algumas proteínas de reparo, sem afetar a transcrição e a tradução de proteínas presentes no *operon lac* ou inibir a atividade enzimática da β -galactosidase.

Palavras-chave: Isotiocianato de alila. Mecanismo de ação. Antimicrobiano. *Escherichia coli* geneticamente modificadas.



Abstract

The selection of natural molecules with inhibitory activity upon microbial pathogens may be a solution to minimize the current issues generated by microbial resistance to the classic antimicrobials. Allyl isothiocyanate (AIT), which is derived from plants, has a strong antimicrobial activity towards Escherichia coli strains. However, its mechanism of action against this microorganism is still largely unknown. The objective of the present work was to identify AIT's mode of action against E. coli using a fast screening method based on the stress response of mutant strains containing the indicator gene lacZ (β -galactosidase encoder). Five strains of E. coli were used, where one was used as a control (wild-type) and four were genetically modified by fusions between the lacZ gene and genes associated with bacterial damage response: gene that codifies proteins induced by cold shock, cspA::lacZ; that encodes cytoplasmic enzymes induced by heat shock, ibp::lacZ; the P3 promoter of rpoH gene, which is activated by the denaturation of periplasmic enzymes, P3rpoH::lacZ; and of the sulA promoter, which is induced by the inhibition of DNA replication. AIT activity on E. coli strains was compared to a negative control (no treatment) and with positive controls that specifically triggers each one of the stress response genes. The treatment with AIT did not result in greater translation of β -galactosidase in all strains tested. On the other hand, AIT lowered the basal levels of β -galactosidase activity when compared to the negative control through an unknown mechanism, which is not related with the transcription or translation of the proteins present in the lac operon or by inhibiting β -galactosidase enzymatic activity.

Keywords: Allyl isothiocyanate. Mechanism of action. Antimicrobial. Genetically modified Escherichia coli.

Introdução

O surgimento de cepas bacterianas resistentes a antibióticos tem se tornado uma das maiores preocupações da medicina humana na atualidade. A adoção de práticas que reduzam a prescrição indiscriminada de antibióticos na terapêutica humana e animal, e de seu uso massivo na produção animal pode atenuar esse problema. Contudo, ainda que se diminua o uso das drogas antibióticas conhecidas, o controle do crescimento bacteriano por agentes antimicrobianos continuará sendo necessário (FERBER, 1998).

Nesse sentido, a seleção de produtos naturais e mais recentemente, de moléculas isoladas, com ação inibitória do crescimento microbiano constitui uma forma de desenvolver novos compostos, para os quais a resistência não foi desenvolvida. Os métodos tradicionais de seleção de compostos antimicrobianos baseiam-se na detecção da inibição microbiana e geralmente requerem altas concentrações dos compostos testados e longos períodos de incubação (FORSYTH et al., 2002; LOMOVSKAYA et al., 2001; TRIAS; YUAN, 1999). Além disso, esses métodos não permitem identificar o mecanismo de ação do agente na célula microbiana, que é indispensável

quando se pretende desenvolver produtos antimicrobianos para uso comercial.

Ao longo do tempo, as bactérias têm criado diversos mecanismos de manutenção de homeostase quando em condições adversas de crescimento. Para *Escherichia coli* foram descritos mecanismos de resposta ao estresse associados aos efeitos de choque por alta temperatura e choque por baixa temperatura, que induzem à síntese de proteínas específicas, e ainda a danos na membrana celular e no DNA.

Baseados nesses mecanismos de resposta, Bianchi e Baneyx (1999) desenvolveram um método rápido para a detecção do mecanismo de ação de agentes antimicrobianos contra *E. coli*. O método descrito propõe a fusão genética de genes transcritos durante a resposta a diferentes tipos de estresse com um gene indicador, nesse caso, o lacZ, que ao ser transcrito e traduzido, leva à formação da enzima β -galactosidase. Dessa maneira, pode-se identificar indiretamente qual o tipo de estresse gerado por um antimicrobiano ao avaliar-se a atividade da enzima β -galactosidase. Shapiro e Baneyx (2002) otimizaram esse método com modificações que possibilitaram a detecção específica de ação

do agente antimicrobiano teste sobre a replicação do DNA bacteriano, o aumento da sensibilidade do sistema diante de compostos hidrofóbicos e a validação do método para ensaio em microplacas.

Entre os compostos antimicrobianos de origem natural com potencial para utilização comercial estão os glucosinolatos, encontrados em plantas pertencentes à família Brassicaceae (NIELSEN; RIOS, 2000). Os compostos encontram-se dentro dos vacúolos e são liberados quando a planta sofre danos mecânicos. Uma vez dentro do citoplasma da célula vegetal, eles são hidrolisados, resultando na formação de três principais grupos de substâncias: nitrilas, tiocianatos e isotiocianatos (DELAQUIS; MAZZA, 1995). O último grupo contém compostos com reconhecida atividade antimicrobiana como o isotiocianato de alila (ITA) e, por isso, tem sido utilizado em produtos alimentícios (LIN et al., 2000; NIELSEN; RIOS, 2000; OBAIDAT; FRANK, 2009). A atividade antimicrobiana de ITA foi comprovada sobre cepas de *E. coli*, incluindo as do sorotipo O157:H7 em carne e seus derivados (CHACON et al., 2006 a, b; LUCIANO et al., 2011; MUTHUKUMARASSAMY et al., 2003; NADARAJAH et al., 2005). Por apresentar propriedade eletrofílica, o ITA pode reagir com uma grande variedade de nucleófilos, tais como aminas, tióis, hidroxilas e sulfitos (CEJPEK et al., 2000; JIAO et al., 1996; KAWAKISHI; KANEKO, 1985; VERMA, 2003). Sugere-se ainda que pode inibir enzimas e romper a membrana celular microbiana, levando à morte bacteriana (KOJIMA; OGAWA, 1971; LIN et al., 2000). No entanto, ainda são poucos os estudos que buscam compreender os mecanismos de ação do ITA sobre a célula bacteriana.

O objetivo do presente trabalho foi identificar, ao menos parcialmente, o mecanismo de ação do isotiocianato de alila contra a *E. coli* utilizando método rápido de *screening* baseado na resposta ao estresse de cepas mutantes adicionadas do gene indicador *lacZ*.

Materiais e métodos

Cepas bacterianas

As bactérias utilizadas neste estudo foram fornecidas pelo Prof. Dr. François Baneyx, Departamento de Engenharia Química, Universidade de Washington, Seattle - EUA. Foram utilizadas quatro cepas de *E. coli* que possuem modificações genéticas para apresen-

tação de diferentes tipos de danos causados por antimicrobianos (Tabela 1) a partir de fusões entre o gene reportador *lacZ* e as regiões promotoras: 1) da proteína induzida pelo choque ao frio *CspA* (GOLDSTEIN et al., 1990); 2) das enzimas citoplasmáticas induzidas pelo calor *IbpA* e *IbpB* (CHUANG et al., 1993); 3) do promotor P3 do gene *rpoH*, que é transcrito quando há desdobramento de proteínas no periplasma (MISSIAKAS; RAINA, 1998); e 4) do promotor *sulA*, parte do sistema SOS, que é induzido quando há inibição da replicação do DNA (SHAPIRO; BANEYX, 2002). Nomes específicos foram designados para cada uma das cepas. A fusão *cspA::lacZ* é induzida por inibidores de tradução ribossomal do grupo C (ex. cloranfenicol), que geram uma resposta de choque ao frio. Já os antibióticos do grupo H, como a estreptomicina, ativam uma resposta citoplasmática de choque ao calor e consequentemente induzem a fusão *ibp::lacZ*. Compostos que causam danos à membrana externa (ex. polimixina B) ou interferem com a síntese de peptídeoglicanos (ex. penicilina) ativam seletivamente o promotor P3*rpoH*, e consequentemente ativam o gene *lacZ* no mutante P3*rpoH::lacZ*. O mesmo ocorre com o mutante *sulA::lacZ* quando acometido por um dano na replicação do DNA.

Essas cepas mutantes são derivadas de uma cepa de *E. coli* K-12 (AB734), que possui deleção do gene *lacZ* e não apresenta resistência à antibióticos. Para a indução do *operon lac* utilizou-se a cepa de *E. coli* O157:H7 02-0627 proveniente do National Microbiology Laboratory, Public Health Agency, Canadian Centre for Human and Animal Health, Winnipeg, MB - Canadá.

Preparação das culturas e determinação da dose subletal do ITA

Culturas congeladas de *E. coli* K12 AB734 foram colocadas em temperatura ambiente até descongelamento e inoculadas em frascos de 125 mL, contendo 25 mL de caldo *Luria-Bertani* (LB). Esses frascos foram incubados por 16h a 30 °C. Então, 0,2 mL de inóculo foi transferido dos frascos para tubos contendo 9,8 mL de caldo LB. Quando a densidade óptica a 600 nm (DO600) alcançou 0,4, diferentes alíquotas de ITA foram adicionadas, resultando em soluções contendo de 1 a 1000 µM. O crescimento microbiano foi monitorado a cada 15 min por meio da

densidade óptica para avaliação do crescimento e determinação da dose subletal. A dose de 100 μM foi capaz de reduzir a taxa de crescimento microbiano, porém não a inibiu completamente, sendo considerada então uma dose subletal. A dose foi utilizada para experimentos posteriores.

Tabela 1 - Cepas de *E. coli* utilizadas para verificação do mecanismo de ação de antimicrobianos

Cepa	Genótipo
AB734	Selvagem
ADA110	$\lambda\phi$ (ibp::lacZ)
ADA310	$\lambda\phi$ (cspA::lacZ)
ADA410	$\lambda\phi$ (P3rpoH::lacZ)
ADA520	$\lambda\phi$ (sulA::lacZ) tolC::Tn10

Fonte: Dados da pesquisa.

Condições de crescimento e indução de danos às bactérias

Frascos (500 mL) contendo 100 mL de caldo LB foram inoculados com 2 mL de uma cultura que cresceu por 16h a 30 °C (cepas *ibp::lacZ*, *P3rpoH::lacZ* e *sulA::lacZ*) ou 37 °C (cepa *cspA::lacZ*). Quando a OD600 do caldo atingiu o valor de 0,4, transferiram-se alíquotas de 25 mL do caldo ativado para frascos de 125 mL contendo caldo LB. Os frascos foram subsequentemente tratados com os antimicrobianos e doses descritas na Tabela 2. O tratamento com ITA foi comparado com um frasco controle (sem tratamento) e um controle positivo (antibióticos) que era dependente do tipo de cepa testada.

Tabela 2 - Tratamentos utilizados com as diferentes cepas de *E. coli*

Cepa	Antimicrobiano/ Dose
ADA110	ITA/ 100 μM ou Estreptomicina/ 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$
ADA310	ITA/ 100 μM ou Cloranfenicol/ 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$
ADA410	ITA/ 100 μM ou Polimixina B/ 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$
ADA520	ITA/ 100 μM ou Ácido Nalidíxico/ 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$

Fonte: Dados da pesquisa.

Os compostos sulfato de estreptomicina, sulfato de polimixina B e ácido nalidíxico foram dissolvidos

em água deionizada estéril. ITA e cloranfenicol foram dissolvidos em etanol 95%. Frascos controle receberam quantidades equivalentes de etanol utilizadas nos outros tratamentos (máximo de 2%). O etanol nessa concentração não foi capaz de causar danos significativos ou inibição do crescimento microbiano. Os frascos foram incubados por 2h até a amostragem para o ensaio de β -galactosidase. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

Indução da β -galactosidase em *E. coli* O157:H7

O operon *lac* foi induzido ao introduzir-se 3% de lactose ao caldo LB. Primeiramente, a cepa *lac+* de *E. coli* O157:H7 02-0627 (não produtora de shiga-toxina) foi inoculada por 16h em caldo LB. Então, utilizou-se 50 μL dessa cultura como inóculo em um tubo contendo 9,95 mL de caldo LB. Aguardou-se até DO600 = 0,6 (fase exponencial) e novamente foram coletados 50 μL de inóculo para adicionar-se em caldo lactosado fresco. No mesmo instante, foram adicionados 100 μM de ITA ao grupo tratado. Amostras foram coletadas no tempo 0, 1 e 2h, e a atividade da β -galactosidase foi medida como descrita anteriormente.

Determinação de β -galactosidase

Alíquotas de 80 μL de uma solução de permeabilização foram colocadas em um microtubo de 1,5 mL (100 mM Na₂HPO₄; 20 mM KCl; 2mM MgSO₄; 0,8 mg/mL de brometo de hexadeciltrimetilamônio; 0,4 mg/mL de desoxicolato de sódio; 5,4 $\mu\text{L}/\text{mL}$ de β -mercaptoetanol). Então, a densidade óptica a 600 nm (DO600) das culturas bacterianas foi verificada e amostras de 20 μL das culturas foram adicionadas sobre a solução de permeabilização. Essa mistura foi incubada 30min a 30 °C. Adicionou-se a ela 600 μL de uma solução substrato (60 mM Na₂HPO₄; 40 mM NaH₂PO₄; 1 mg/mL o-nitrofenil- β -D- galactopiranosídeo - ONPG; 2,7 $\mu\text{L}/\text{mL}$ β -mercaptoetanol) pré-aquecida a 30 °C. Aguardou-se tempo suficiente para a produção de β -galactosidase pelas cepas verificada pelo desenvolvimento visível da cor amarela, pela degradação do ONPG, e a reação foi cessada com a adição de 700 μL de uma solução "stop" (Na₂CO₃ 1M). O tempo necessário para o desenvolvimento da coloração foi anotado para utilizado na equação de unidade Miller. Então, os microtubos foram

centrifugados a 10.000 g por 10 min. O sobrenadante foi cuidadosamente retirado de cada tubo e a absorbância a 420 nm foi verificada.

Cálculo das Unidades Miller:

$$UM = 1000 * \frac{(Abs_{420})}{[(DO_{600} \text{ da cultura}) * (\text{volume } 0,02 \text{ mL}) * (\text{tempo de reação})]}$$

Análise estatística

Os dados reportados neste trabalho são relativos à média de pelo menos três experimentos e

representados pela média \pm erro padrão da média. Diferenças entre tratamentos e o grupo controle foram examinadas pelo teste de Tukey. Valores de $p \leq 0,05$ foram considerados significantes.

Resultados e discussão

O Gráfico 1 demonstra que o tratamento com isotiocianato não resultou em maior expressão da enzima β -galactosidase em nenhuma das cepas geneticamente modificadas. Pelo contrário, a atividade enzimática estava significativamente mais baixa do que o grupo controle, com exceção do tratamento contra a

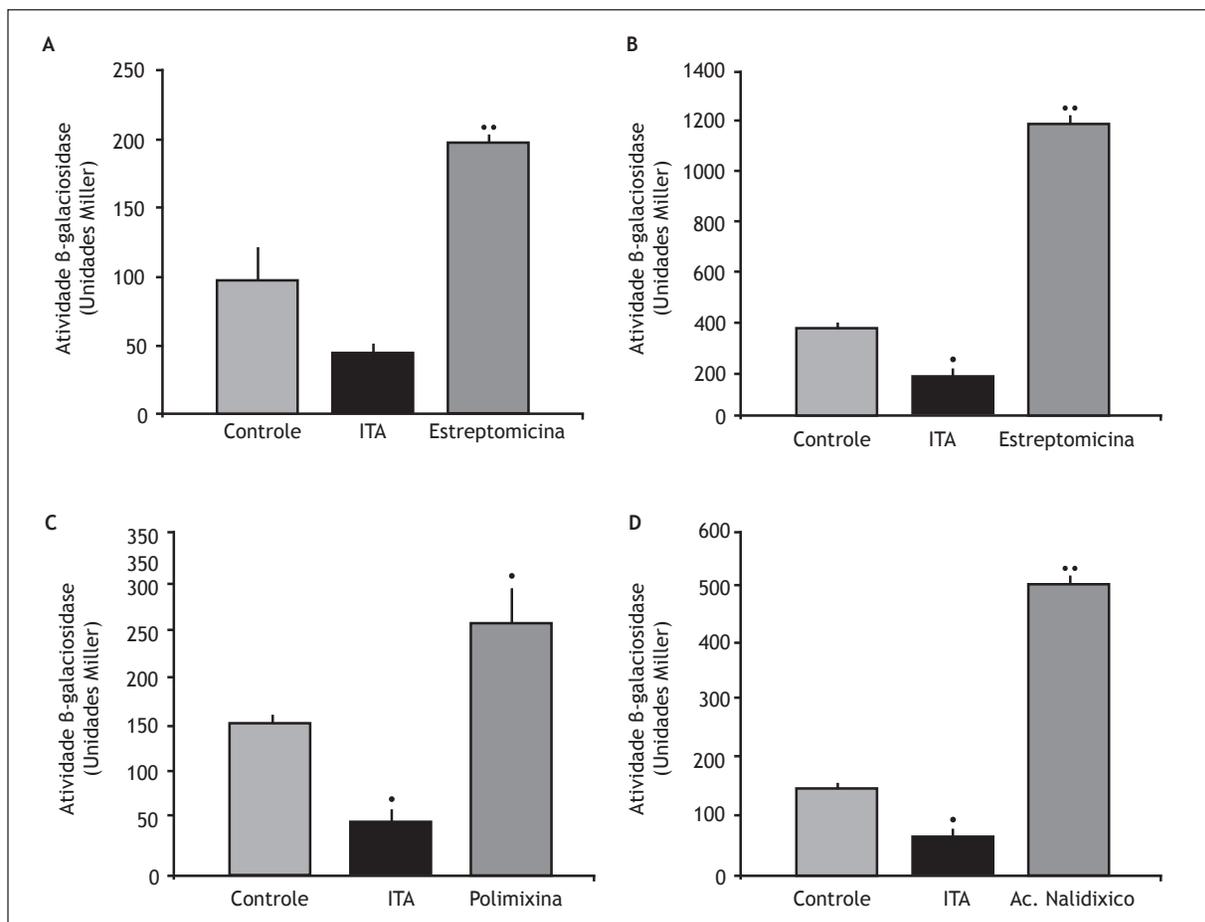


Gráfico 1 - Culturas bacterianas mutantes contendo as fusões *ibp::lacZ* (A), *cspA::lacZ* (B), *P3rpoH::lacZ* (C) e *sulA::lacZ* (D) cresceram por 2 h na presença de doses subletais de antimicrobianos. A medida da atividade de β -galactosidase indica se o dano causado pelo composto antimicrobiano causa a tradução de genes de proteínas em resposta ao choque por calor (*ibp*), ao choque pelo frio (*cspA*), de reparo a danos na parede celular ou membrana externa (*P3rpoH*), ou a transcrição do DNA (*sulA*). Experimentos foram feitos em triplicata

Legenda: * = $p \leq 0,05$; ** = $p \leq 0,01$.

Fonte: Dados da pesquisa.

cepa contendo a fusão *ibp::lacZ*, em que a atividade da β -galactosidase não foi diferente do grupo controle. Como os tratamentos com os demais antibióticos, usados como padrão de cada tipo de mecanismo de ação, foram capazes de elevar significativamente a atividade da β -galactosidase nas cepas, foi considerado que o método funcionou de maneira correta.

Alguns autores propuseram diferentes mecanismos de ação dos isotiocianatos contra micro-organismos. Zsolnai (1966) foi o primeiro pesquisador a especular sobre o mecanismo de ação dos isotiocianatos, e relacionou a ação bactericida desses compostos com a inativação intracelular de enzimas contendo grupos sulfidrílica em sua estrutura. Essa hipótese foi gerada pela observação que compostos sulfurosos (ex. cisteína, tioglicolato) eram capazes de reduzir a atividade antimicrobiana de vários isotiocianatos. Outros autores também demonstraram que os isotiocianatos podem reagir com aminoácidos e proteínas (CEJPEK et al., 2000; KAWAKISHI; KANEKO, 1985, 1987; LUCIANO et al., 2008; VERMA, 2003). Kojima e Ogawa (1971) foram os primeiros autores a demonstrar a inibição de uma via metabólica por isotiocianatos, em que ITA foi capaz de suprimir a internalização de oxigênio em leveduras. Mais recentemente, foi demonstrado que o ITA é capaz de inibir a atividade das enzimas tiorredoxina redutase e acetato quinase (LUCIANO; HOLLEY, 2009). Portanto, os resultados observados no presente estudo poderiam ser derivados de uma inibição direta da β -galactosidase. Para solucionar essa hipótese, a ação direta do ITA sobre a capacidade de degradação do ONPG pela β -galactosidase foi testada. A enzima purificada (0,2 U/teste, Sigma-Aldrich) foi colocada na presença de 100 μ M de ITA por 5 minutos em um microtubo e sua atividade foi avaliada conforme método descrito anteriormente. Contudo, o isotiocianato de alila não foi capaz de inibir a atividade da β -galactosidase (resultados não mostrados neste artigo).

Lin et al. (2000) demonstraram que o ITA causa danos na membrana celular de *E. coli* K-12, levando ao extravasamento citoplasmático de metabólitos vitais. Se esse tipo de dano houvesse ocorrido no presente estudo, seria esperado que a cepa ADA 410 apresentasse atividade de β -galactosidase mais elevada na presença do isotiocianato de alila, porém o contrário foi observado. Já Ahn et al. (2001) não encontraram qualquer extravasamento de ATP ou dano na parede celular quando testaram o ITA contra *Listeria monocytogenes*, mas os níveis de ATP intracelulares estavam reduzidos.

A capacidade do isotiocianato de alila em causar danos ao DNA de células eucarióticas (MURATA et al., 2000) e procarióticas (KASSIE; KASSMÜLLER, 2000) também já foi documentada. Porém, o presente estudo revela que as proteínas SOS de reparo ao DNA não são induzidas por doses subletais do isotiocianato de alila. Outra hipótese para explicar o ocorrido seria que a dose de 100 μ M do isotiocianato de alila poderia estar inibindo parte do maquinário de transcrição do DNA, o que levaria a uma menor concentração de β -galactosidase do que os níveis basais encontrados nos grupos controle. Para testar tal hipótese, colocou-se uma cepa de *E. coli* O157:H7 lac⁺ em caldo LB contendo 3% de lactose. Dessa maneira, em apenas 1 hora foi observado um aumento significativo na atividade de degradação do ONPG graças à indução da enzima β -galactosidase. Esse mesmo aumento de atividade enzimática foi observado quando o meio continha 100 μ M de ITA, demonstrando que o óleo essencial não é capaz de inibir a transcrição dos genes presentes no *operon lac* (Gráfico 2). Assim, por meio de algum mecanismo ainda desconhecido, o isotiocianato de alila foi provavelmente capaz de inibir seletivamente a produção de pelo menos algumas proteínas reparo, sem afetar a transcrição e tradução de proteínas presentes no *operon lac* ou inibir a atividade enzimática da β -galactosidase.

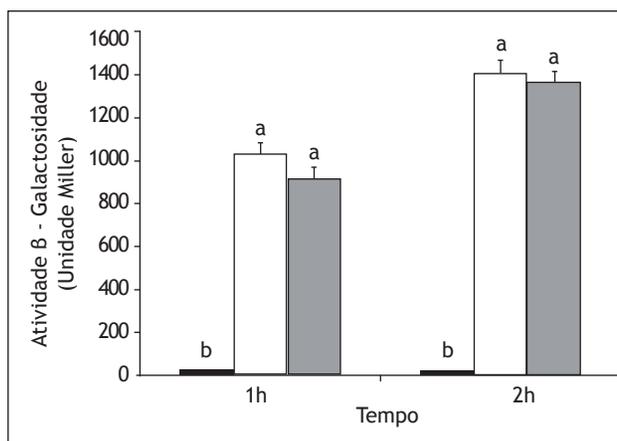


Gráfico 2 - Medida da atividade de β - galactosidase na *E. coli* O157:H7 após 1 e 2 horas de crescimento em caldo LB sem lactose (coluna preta); com 3% de lactose (branca); ou com 3% de lactose e 100 μ M de ITA (cinza)

Fonte: Dados da pesquisa.

Nota: Letras distintas denotam diferença significativa ($p < 0.05$) entre os valores representados pelas colunas.

Conclusão

Aparentemente, o mecanismo de ação do isotiocianato de alila contra a *E. coli* não envolve a produção de proteínas de choque ao frio ou calor, danos de membrana que envolvam a tradução do gene *rpoH*, ou danos de DNA que envolvam o gene *sulA*. Por outro lado, a dose subletal do óleo essencial utilizada neste estudo, de alguma maneira ainda desconhecida, reduziu a atividade da enzima β -galactosidase que era produzida como indicadora dos danos celulares descritos anteriormente. Tal inibição não está relacionada com a inibição direta da enzima ou com a inibição do maquinário de transcrição e tradução de *operon lacZ*. Estudos futuros são necessários para entender por que o ITA inibiu significativamente o processo de transcrição ou tradução das proteínas relacionadas com o estresse ao frio, aos danos de membrana plasmática e ao DNA.

Referências

- AHN, E. S. et al. Observation of bactericidal effect of allyl isothiocyanate on *Listeria monocytogenes*. **Food Science and Biotechnology**, v. 10, p. 31-35, 2001.
- BIANCHI, A. A.; BANEX, F. Stress responses as a tool to detect and characterize the mode of action of antibacterial agents. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, p. 5023-5027, 1999.
- CEJPEK, K. et al. Reactions of allyl isothiocyanate with alanine, glycine, and several peptides in model systems. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, p. 3560-3565, 2000.
- CHUANG, S. E. et al. Sequence analysis of four new heat-shock genes constituting the *hslUV/ibpAB* and *hslVU* operons in *Escherichia coli*. **Gene**, v. 134, p. 1-6, 1993.
- CHACON, P. A. et al. Inhibitory effects of microencapsulated allyl isothiocyanate (AIT) against *Escherichia coli* O157:H7 in refrigerated, nitrogen packed, finely chopped beef. **International Journal of Food Microbiology**, v. 107, p. 231-237, 2006a.
- CHACON, P. A. et al. Elimination of *Escherichia coli* O157:H7 from fermented dry sausages at an organoleptically acceptable level of microencapsulated allyl isothiocyanate. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, p. 3096-3102, 2006 b.
- DELAQUIS, P. J.; MAZZA, G. Antimicrobial properties of isothiocyanates in food preservation. **Food Technology**, v. 49, p. 73-84, 1995.
- FERBER, D. New hunt for roots of resistance. **Science**, v. 280, p. 27, 1998.
- FORSYTH, R. A. et al. A genome-wide strategy for the identification of essential genes in *Staphylococcus aureus*. **Molecular Microbiology**, v. 43, p. 1387-1400, 2002.
- GOLDSTEIN, J. et al. Major cold shock protein of *Escherichia coli*. **Proceedings of the National Academy of Science**, v. 87, p. 283-287, 1990.
- JIAO, D. et al. Inhibition of N-nitrosodimethylamine demethylase in rat and human liver microsomes by isothiocyanates and their glutathione, L-cysteine, and N-acetyl-L-cysteine conjugates. **Chemical Research in Toxicology**, v. 9, p. 932-938, 1996.
- KASSIE, F.; KNASMÜLLER, S. Genotoxic effects of allyl isothiocyanate (AITC) and phenethyl isothiocyanate (PEITC). **Chemico-Biological Interactions**, v. 127, p. 163-180, 2000.
- KAWAKISHI, S.; KANEKO, T. Interaction of oxidized glutathione with allyl isothiocyanate. **Phytochemistry**, v. 24, p. 715-718, 1985.
- KAWAKISHI, S.; KANEKO, T. Interaction of proteins with allyl isothiocyanate. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 35, p. 85-88, 1987.
- KOJIMA, M.; OGAWA, K. Studies on the effects of isothiocyanates and their analogues on microorganisms. I. Effect of isothiocyanates on the oxygen uptake of yeasts. **Journal of Fermentation Technology**, v. 49, p. 740-746, 1971.
- LIN, C. M. et al. Antibacterial mechanism of allyl isothiocyanate. **Journal of Food Protection**, v. 63, p. 727-734, 2000.
- LOMOVSKAYA, O. et al. Identification and characterization of inhibitors of multidrug resistance efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa*: novel agents for combination therapy. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 45, p. 105-116, 2001.
- LUCIANO, F. B. et al. Effect of free-SH containing compounds on allyl isothiocyanate antimicrobial activity against *Escherichia coli* O157:H7. **Journal of Food Science**, v. 73, p. M214-220, 2008.

- LUCIANO, F. B.; HOLLEY, R. A. Enzymatic inhibition by allyl isothiocyanate and factors affecting its antimicrobial action against *Escherichia coli* O157:H7. **International Journal of Food Microbiology**, v. 131, p. 240-245, 2009.
- LUCIANO, F. B. et al. Microbial and chemical origins of the bactericidal activity of yellow mustard powder toward *Escherichia coli* O157:H7 during dry sausage ripening. **International Journal of Food Microbiology**, v. 145, p. 169-174, 2011.
- MISSIAKAS, D.; RAINA, S. The extracytoplasmic function sigma factors: role and regulation. **Molecular Microbiology**, v. 28, p. 1059-1066, 1998.
- MURATA, M. Mechanism of oxidative DNA damage induced by carcinogenic allyl isothiocyanate. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 28, p. 797-805, 2000.
- MUTHUKUMARASAMY, P. et al. Bactericidal effects of *Lactobacillus reuteri* and allyl isothiocyanate on *Escherichia coli* O157:H7 in refrigerated ground beef. **Journal of Food Protection**, v. 66, p. 2038-2044, 2003.
- NADARAJAH, D. et al. Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 in packaged ground beef by allyl isothiocyanate. **International Journal of Food Microbiology**, v. 99, p. 269-279, 2005.
- NIELSEN, P. V.; RIOS, R. Inhibition of fungal growth on bread by volatile components from spices and herbs, and the possible application in active packaging, with special emphasis on mustard essential oil. **International Journal of Food Microbiology**, v. 60, p. 219-229, 2000.
- OBAIDAT, M. M.; FRANK, J. F. Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 on the intact and damaged portions of lettuce and spinach leaves by using allyl isothiocyanate, carvacrol, and cinnamaldehyde in vapor phase. **Journal of Food Protection**, v. 72, p. 2046-2055, 2009.
- SHAPIRO, E.; BANEYX, F. Stress-Based Identification and Classification of Antibacterial Agents: Second-Generation *Escherichia coli* Reporter Strains and Optimization of Detection. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 46, p. 2490-2497, 2002.
- TRIAS, J.; YUAN, Z. Mining bacterial cell wall biosynthesis with new tools: multitarget screens. **Drug Resistance Update**, v. 2, p. 358-362, 1999.
- VERMA, R. P. Synthesis and reactions of 3-oxobutyl isothiocyanate (OB ITC). **European Journal of Organic Chemistry**, v. 3, p. 415-420, 2003.
- ZSOLNAI, T. Die antimikrobielle Wirkung von Thiocyanaten und Isothiocyanaten. **Arzneimittel-Forschung**, v. 16, p. 870-876, 1966.

Recebido: 02/11/2012
Received: 11/02/2012

Aprovado: 30/11/2012
Approved: 11/30/2012