

**FRANCINE NOVACK VICTORIA**

**Novos Compostos Organosselênio Bioativos: Estudo da Ação Antimicrobiana Frente à Patógenos de 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 Ciências (Ciência e Tecnologia Agroindustrial).

Comissão Orientadora: Prof. Dr. Eder João Lenardão

Prof. Dr. Wladimir Padilha da Silva

Pelotas, 2010.

## **Banca Examinadora**

---

Prof. Dr. Eder João Lenardão – ORIENTADOR (IQG/UFPeI)

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Raquel Guimarães Jacob – EXAMINADORA (IQG/UFPeI)

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Amanda de Souza da Motta – EXAMINADORA (DVP/UFPeI)

---

Prof. Dr. Eliezer Ávila Gandra – EXAMINADOR (DQA – UFPeI)

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, pela força, esperança e sabedoria para concluir meus objetivos;

Aos meus pais, Francisco e Margarida, pelo amor, carinho, amizade, paciência, incentivo, e confiança, nesse e em todos os momentos da minha vida;

Ao meu irmão e minha cunhada, João Luís e Simoni, pela amizade, incentivo, companheirismo, carinho e amor;

Ao meu namorado, Wagner, pelo amor, paciência, amizade, carinho, incentivo e momentos de descontração que me deram força para seguir;

Ao meu orientador, Prof. Dr. Eder João Lenardão, pela orientação, paciência, amizade e pelo conhecimento transmitido durante o trabalho, os quais contribuíram para minha formação profissional;

Ao meu co-orientador, Prof. Dr. Wladimir Padilha de Silva, pela amizade e conhecimento transmitido;

Aos colegas do Laboratório de Síntese Orgânica Limpa, Angelita, Samuel, Camilo e Gabriela e, em especial Lóren, Débora e Josiane, pela amizade;

As colegas do Laboratório de Aproveitamento de Recursos Renováveis e Síntese Orgânica Limpa e do Laboratório de Síntese Orgânica Limpa, em especial Cátia e Maraísa;

Aos colegas do Laboratório de Microbiologia de Alimentos, em especial Milena, Denise e Andréia, que me ampararam nas horas de dúvidas;

As minhas amigas, Déia, Daiane, Fernanda, Cândida, Marcela, Aline e Pâmela pelas longas conversas e desabafos nos momentos de dúvida;

Aos professores, Raquel Guimarães Jacob e Gelson Perin, pela valiosa ajuda, atenção e acessibilidade;

Aos professores do Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial, pelo conhecimento transmitido;

E a todos que direta ou indiretamente contribuíram de alguma forma para a realização do trabalho.

## Resumo

VICTORIA, FRANCINE NOVACK. **Novos Compostos Organosselênio Bioativos: Estudo da Ação Antimicrobiana Frente à Patógenos de Importância em Alimentos.** 2010. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Agroindustrial. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

O capim citronela (*Cymbopogon nardus*(L) Rendle) pertence ao gênero *Cymbopogon*, o óleo essencial extraído da planta tem como principal constituinte o (+)-*R*-citronelal (3,7-dimetil-oct-6-enal), predominantemente formado pelo metabolismo secundário das plantas. Os óleos essenciais e os extratos das plantas possuem um interesse crescente para a indústria e para a pesquisa científica devido a sua atividade antimicrobiana, assim como os compostos organosselênicos que são de grande interesse para a pesquisa científica devido ao seu grande espectro de atividade biológica. Desta forma, foi realizado um estudo da  $\alpha$ -selenização de aldeídos e cetonas, incluindo o (+)-(*R*)-citronelal, principal componente do óleo essencial de citronela, utilizando PEG/KF/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, como meio reciclável. Os derivados do (+)-(*R*)-citronelal contendo organosselênio foram avaliados em relação aos seus potenciais antimicrobianos, determinados pelas técnicas de difusão do disco e concentração inibitória mínima. Os produtos 2-fenilselenocitronelal e 2-fenilselencitronelol apresentaram rendimentos de 71 e 73%, respectivamente. Nos ensaios de atividade antimicrobiana o produto 2-fenilselenocitronelal apresentou os melhores resultados, inclusive melhores que o (+)-*R*-citronelal. Logo, a adição de um grupamento de selênio ao composto (+)-*R*-citronelal aumentou sua atividade antimicrobiana contra *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* e *Salmonella Typhimurium*.

Palavras-chave: óleo essencial de citronela, citronelal, organosselênicos e atividade antimicrobiana.

### Abstract

VICTORIA, FRANCINE NOVACK. **Novos Compostos Organoselênio Bioativos: Estudo da Ação Antimicrobiana Frente à Patógenos de Importância em Alimentos.** 2010. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Agroindustrial. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

Java citronella (*Cymbopogon nardus* (L) Rendle) belongs to the genus *Cymbopogon* and the essential oil extracted from the plant is constituted mainly by the (+)-R-citronellal (3,7-dimethyl-6-octenal), formed by the secondary metabolism plants. Essential oils and plant extracts have a growing interest to industry and scientific research due to its antimicrobial activity, and as well as compounds organoselênios that are of great interest for scientific research because of its wide spectrum of biological activity. Thus, we performed a study of  $\alpha$ -selenation of aldehydes and ketones, including the (+)-(R)-citronellal, as a major component of essential oil of citronella, using PEG/KF/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, as a recyclable medium. Derivatives of (+)-(R)-citronellal containing organoselenium were assessed for their potential antimicrobial, the antimicrobial activity was determined by the techniques of disk diffusion and minimum inhibitory concentration. The 2-phenylseleno citronellal and 2-phenylseleno citronellol provided yields of 71 and 73% respectively. The antimicrobial activity of 2-phenylseleno citronellal showed the best results, soon the addition of a organoselenium to (+)-R-citronellal increased the antimicrobial activity of (+)-R-citronellal against foodborne pathogenic bacteria *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* and *Salmonella Typhimurium*.

Keywords: essential oil of citronella, (+)-R-citronellal, organoselenium compounds and antimicrobial activity.

## Lista de Figuras

Figura 1: Pirâmide que expressa a relação entre casos notificados e não notificados de doenças transmitidas por alimentos (DTAs).....	15
Figura 2: Coloração Gram, aspecto morfológico e movimento de tombamento de <i>Listeria monocytogenes</i> .....	17
Figura 3: Coloração de Gram e análise microscópica de <i>Staphylococcus aureus</i> .....	18
Figura 4: Coloração de Gram e análise microscópica de <i>Salmonella typhimurium</i> .....	19
Figura 5: Curva típica de crescimento bacteriano .....	24
Figura 6: Estrutura química de alguns componentes de óleos essenciais .....	29
Figura 7: <i>Cymbopogon nardus</i> (L) Rendle .....	31
Figura 8: Estrutura química do ( <i>R</i> )-citronelal <b>10</b> e ( <i>S</i> )- citronelal <b>11</b> .....	32
Figura 9: Estrutura química dos isômeros da vitamina K .....	36
Figura 10: Estrutura química do disseleneto de difenila (PhSe) <sub>2</sub> .....	42
Figura 11: Estrutura Química do ebselen .....	42
Figura 12: Estrutura química da seleno-imidazolina e seleno-tiazolidina .....	43
Figura1 (artigo 2): Typical gas chromatograms of citronella oil .....	61
Figura 2 (artigo 2): Chemical structure of 2-phenylseleno citronellal <b>1</b> , (+)- <i>R</i> -citronellal <b>2</b> , 2-phenylseleno citronellol <b>4</b> and (+)- <i>R</i> -citronellol <b>5</b> .....	63
Figura 13: Halos de inibição do produto 2-fenilselenocitronelal contra as bactérias: (a) <i>Listeria monocytogenes</i> , (b) <i>S. aureus</i> e (c) <i>S. Typhimurium</i> .....	84
Figura 14: Ensaio de determinação da Concentração Inibitória Mínima .....	85

## Lista de Tabelas

Tabela 1: Resumo de alguns conservantes de alimentos reconhecidos como seguros .....	21
Tabela 1 (artigo 1): Optimization of the synthesis of $\alpha$ -phenylseleno pentanal <b>2a</b> .....	49
Tabela 2 (artigo 1): Synthesis of $\alpha$ -phenylseleno aldehydes and ketones <b>2a-h</b> .....	50
Tabela 1 (artigo 2): Antimicrobial activity of 2-phenylseleno citronellal <b>1</b> , 2-phenylseleno citronellol <b>4</b> , (+)- <i>R</i> -citronellal <b>2</b> and (+)- <i>R</i> -citronellol <b>5</b> .....	62
Table 2 (artigo 2): Minimum inhibitory concentration (MIC) of 2-phenylseleno citronellal <b>1</b> , 2-phenylseleno citronellol <b>4</b> , (+)- <i>R</i> -citronellal <b>2</b> and (+)- <i>R</i> -citronellol <b>5</b> .....	63

## Lista de Esquemas

Esquema 1: Síntese do composto 3-tioorganoilcitronelal a partir do aldeído citral .....	26
Esquema 2: Síntese do selenogeraniol e selenolinalol .....	27
Esquema 3: Síntese de líquidos iônicos a partir dos compostos quirais ( <i>R</i> )-citronelal e ( <i>S</i> )-citronelal .....	33
Esquema 4: Modificação do Citronelal tiosemicarbazonato com cobre e níquel.....	34
Esquema 5: <i>Ene</i> -ciclização do ( <i>R</i> )-citronelal .....	34
Esquema 6: Síntese do isopulegol e seus isômeros a partir do ( <i>R</i> )-citronelal .....	35
Esquema 7: Síntese da vitamina K a partir do ( <i>S</i> )-citronelal.....	36
Esquema 8: Síntese do $\alpha$ -tocoferol (vit. E) a partir do ( <i>R</i> )-citronelal.....	37
Esquema 9: Síntese das octahidrocridinas a partir do ( <i>R</i> )-citronelal.....	38
Esquema 10: Síntese das octahidrocridinas, a partir do ( <i>R</i> )-citronelal, utilizando líquido iônico de selênio .....	39
Esquema 11: Estado de oxidação do selênio .....	40
Esquema 12: Síntese do compostos $\alpha$ -fenilselenohexanal .....	43
Esquema 13: Síntese dos compostos $\alpha$ -fenilselenoaldeídos e $\alpha$ -fenilselenocetonas .....	44
Esquema 14: Síntese do composto $\alpha$ -fenilseleno álcool .....	45
Esquema 1 (artigo 1): Synthesis of 2-phenylseleno compound .....	48
Esquema 2 (artigo 1): Synthesis of 2-phenylseleno citronellol .....	51
Esquema 1 (artigo 1): Synthesis of 2-phenylseleno citronella 1.....	59
Esquema 2 (artigo 1): Synthesis of 2-phenylseleno citronello 4 .....	59

## **Lista de Abreviaturas**

DMF – Dimetilformamida

DTAs – Doenças Transmitidas por Alimentos

FDA – Food and Drug Administration

GC – Cromatografia Gasosa

GC/MS – Cromatografia Gasosa com espectro de massa

GRAS – Generally Recognized as Safe

ISO – International Standard Organization

MO – Micro-ondas

OHA – Octaidroacridinas

(PhSe)<sub>2</sub> – Disseleneto de Difenila

PEG – Polietilenoglicol

RMN H<sup>+</sup> - Ressonância Magnética Nuclear

TLC – Thin Layer Chromatography (Cromatografia em camada delgada)

## Sumário

1. Introdução .....	12
2. Revisão Bibliográfica .....	14
2.1 Microrganismos Patogênicos em Alimentos .....	14
2.1.1 <i>Listeria monocytogenes</i> .....	16
2.1.2 <i>Staphylococcus aureus</i> .....	17
2.1.3 <i>Salmonella Typhimurium</i> .....	18
2.2 Controle Químico de microrganismos .....	19
2.2.1 Conservantes utilizados na indústria de alimentos .....	19
2.3 Atividade antimicrobiana de produtos naturais ou semi-sintéticos .....	23
2.4 Óleos essenciais .....	25
2.4.1 Óleo essencial de <i>Cymbopogon nardus</i> (L) Rendle e (+)- <i>R</i> -Citronelal .....	30
2.5 Química Verde .....	39
2.6 Síntese de organosselênios .....	40
3. Artigo 1 (KF/Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> and PEG-400 as a recyclable medium for the selective $\alpha$ -selenation of aldehydes and ketones. Preparation of potential antimicrobial agents) .....	46
Abstract .....	47
Acknowledgements .....	51
References .....	51
4. Artigo 2 (Antimicrobial activity of 2-phenylseleno citronellal and 2-phenylseleno citronellool against foodborne pathogenic bacteria) .....	54
Abstract .....	55
4.1 Introduction .....	56
4.2 Material and Methods .....	58

4.2.1 Oil material and their constituents .....	58
4.2.2 Essential oil analysis .....	58
4.2.2.1 Gas Chromatography with mass specter (GC/MS) Analysis .....	58
4.2.2.2 Gas Chromatography (GC).....	58
4.2.3 Synthesis of 2- phenylseleno citronellal and 2- phenylseleno citronellool .....	59
4.2.4 Bacterial strains .....	59
4.2.5 Antimicrobial assay using a disc difusion method .....	60
4.2.6 Minimum inhibitory concentration assay .....	60
4.2.7 Statistical Analysis .....	61
4.3 Results and Discussion .....	61
4.3.1 Chemical Analysis of the essential oil of citronella .....	61
4.3.2 Antimicrobial activity .....	61
4.4 Acknowledgements .....	65
4.5 References .....	65
5. Conclusões Gerais .....	69
6. Referências .....	70
7. Apêndices .....	84

## 1. Introdução e Objetivos

A atividade microbiana é uma das principais causas de deterioração em alimentos e é muitas vezes associada à perda de qualidade e segurança. A preocupação com relação a bactérias e fungos patogênicos em alimentos vem crescendo devido ao aumento de surtos de doenças transmitidas por alimentos. Com o aumento do número de bactérias resistentes aos antibióticos existe um considerável interesse na investigação dos efeitos antimicrobianos de óleos essenciais e de diferentes extratos de plantas, contra uma gama de bactérias, que poderão ser utilizados como agentes antimicrobianos naturais, na preservação de alimentos e controle de infecções. De acordo com Rahman & Kang (2009) os óleos essenciais e os extratos de plantas são agentes antimicrobianos naturais que podem ser aplicados nas indústrias de alimentos e farmacêutica, para o controle de bactérias e fungos patogênicos.

Doenças causadas devido ao consumo de alimentos contaminados têm um grande impacto na saúde pública e na economia. Microorganismos patogênicos representam uma grande preocupação para a indústria de alimentos e para os órgãos de saúde pública, visto que provocam intoxicações e infecções alimentares na população e representam prejuízo para as indústrias de alimentos.

Os óleos essenciais, também conhecidos como óleos voláteis e óleos etéreos, são definidos como produtos obtidos de partes de plantas, através da destilação por arraste a vapor. São misturas complexas de substâncias voláteis e lipofílicas, cujos componentes incluem hidrocarbonetos terpênicos, álcoois simples, aldeídos, cetonas, fenóis, ésteres, ácidos orgânicos, entre outros, em diferentes concentrações, nos quais, um composto farmacologicamente ativo é majoritário (SIMÕES & SPITZER, 1999). Os óleos essenciais e os extratos das plantas possuem um interesse crescente para a indústria e para a pesquisa científica devido às atividades antimicrobiana, antioxidante, antifúngica, antiviral e antiparasitária, o que os torna úteis como um aditivo natural para as indústrias de alimentos,

de fármacos e de cosméticos (BAKKALI et al., 2008; KAMEL et al., 2007; MABBERLEY et al., 1997).

Os compostos de organoselênio são atualmente de interesse em pesquisas científicas devido ao seu grande espectro de atividade biológica e de aplicações em perspectiva como inibidores de enzimas, agente anti-inflamatório e antitumoral (MLOCHOWSKI et al., 2008). Além disso, esses compostos são menos tóxicos que o selênio, com isso o interesse pela síntese de compostos em enzimologia e química orgânica aumentou (BHATTACHARYA et al., 2005).

Outro aspecto importante na síntese de organoselênios é a possibilidade de uso em diversas reações, incluindo a formação de ligações C-C, sob condições reacionais brandas. A maioria das metodologias sintéticas envolvendo organoselênios ocorre de maneira estéreo e regioseletiva com excelentes rendimentos (NOGUEIRA et al., 2003).

Este trabalho teve como objetivo realizar a síntese de selenocompostos, a partir do aldeído (+)-(R)-citronelal, presente no óleo essencial de *Cymbopogon nardus* (L) Rendle e, avaliar a atividade antimicrobiana do aldeído e dos compostos sintetizados, frente à patógenos importantes em alimentos, como *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* e *Salmonella Typhimurium*.

## 2. Revisão Bibliográfica

### 2.1 Microrganismos patogênicos em alimentos

No período de transição entre os séculos XX e XXI, a economia se globalizou, acarretando em um rápido movimento de pessoas e na incorporação de novos valores aos hábitos alimentares. Da mesma forma, houve um aumento significativo na contaminação dos alimentos, tanto de ordem química quanto bacteriana. As contaminações têm extrapolado fronteiras transnacionais na ocorrência de doenças transmitidas por alimentos (DTAs). Entre essas doenças se destacam as gastroenterites agudas de ocorrências isoladas ou em surtos epidêmicos (ABRAHÃO, 2005).

A estimativa anual sobre gastroenterites na América Latina, África e Ásia, com exceção da China, atingiu 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 (BECKERS et al., 1998). Mesmo na Europa, a mortalidade causada por doenças veiculadas por alimentos é apenas superada pelas doenças respiratórias. Anualmente, ocorrem 50 mil casos de gastroenterite aguda, por milhão de habitantes. A cada ano, os Estados Unidos da América experimentam várias DTAs, mas somente uma pequena fração delas (menos de 10%) é registrada ou reconhecida. Desde 1980, inúmeros estudos têm mostrado que em torno de 6 a 80 milhões de casos ocorreram anualmente em todo o país, evidenciando-se 10.000 óbitos. O custo envolvido nesse processo é de cinco bilhões de dólares (NOTERMANS & GIESSEN VAN DER, 2003).

As doenças de origem alimentar podem ser subdivididas em duas categorias:

1- Intoxicações alimentares: Causadas pela ingestão de alimentos contendo a toxina pré-formada ou o agente produtor da toxina; essas toxinas são produzidas durante a intensa proliferação do microrganismo patogênico no alimento. Neste grupo estão *Clostridium*

*botulinum*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* forma emética e os fungos produtores de micotoxinas.

2- Infecções alimentares: Causadas pela ingestão de alimentos contendo células viáveis de microrganismos patogênicos. Estes microrganismos aderem à mucosa intestinal e proliferam, colonizando o intestino. Em seguida, pode ocorrer a invasão da mucosa e penetração nos tecidos, ou ainda, a produção de toxinas que alteram o funcionamento das células do trato gastrointestinal. Entre as bactérias invasivas, destacam-se *Salmonella*, *Shigella*, *Escherichia coli* enteroinvasora, *Yersinia enterocolítica*, entre outras. Entre as toxigênicas, incluem-se *Vibrio cholerae*, *Escherichia coli* enterotoxigênica, *Campylobacter jejuni* (FRANCO & LANDGRAF, 1996).

De acordo com Forsythe et al. (2000) o número de casos notificados de doenças transmitidas por alimentos (DTAs) 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 136 casos na comunidade, como mostra a Figura 1 (WHEELER et al., 1999, citados por FORSYTHE, 2000).



Fonte: Wheeler et al., citados por Forsythe (2000).

Figura 1: Pirâmide que expressa a relação entre casos notificados e não-notificados de doenças transmitidas por alimentos (DTAs)

A preocupação com relação a bactérias e fungos patogênicos em alimentos vem crescendo devido ao aumento de surtos de doenças transmitidas por alimentos, como citado anteriormente. Devido a esse aumento no número de surtos de DTAs, causadas por bactérias patogênicas e ao aumento do número de bactérias resistentes aos antibióticos existe um

considerável interesse na investigação dos efeitos antimicrobianos de óleos essenciais e de diferentes extratos, contra uma gama de bactérias, para o desenvolvimento de agentes antimicrobianos naturais, para a preservação de alimentos e controle de infecções. Assim, os óleos essenciais e os extratos de plantas são agentes antimicrobianos naturais com aplicações nas indústrias de alimentos e farmacêutica, para o controle de bactérias e fungos patogênicos (RAHMAN & KANG; 2009).

### 2.1.1 *Listeria monocytogenes*

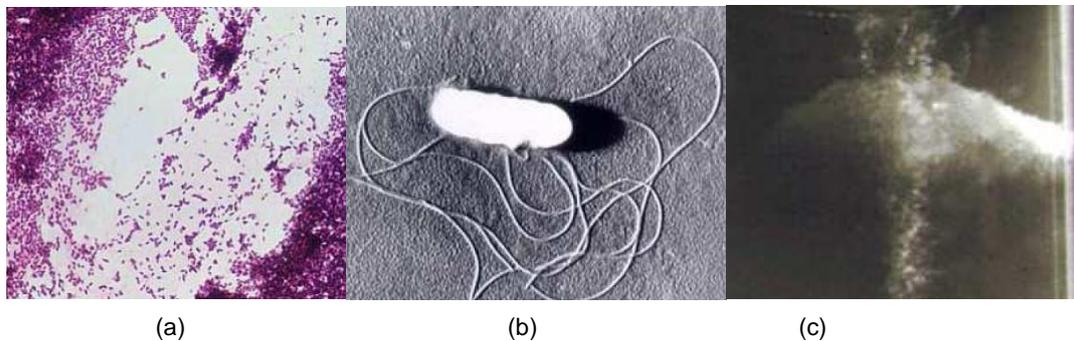
*L. monocytogenes* é um bacilo Gram positivo, psicrotrófico, não formador de esporos, microaerófilo, móvel devido à presença de flagelos peritríquios e apresenta movimento característico denominado tombamento (FRANCO & LANDGRAFF, 1996).

É um patógeno intracelular facultativo, capaz de sobreviver e proliferar em macrófagos, enterócitos e outras células, diferente da maioria das bactérias patogênicas de alimentos. No entanto as linhagens virulentas produzem uma substância exocelular, formadora de poros e ativada por grupamentos tióis, conhecida como listeriolisina (LLO) (JAY et al., 2005).

As infecções geralmente ocorrem após a ingestão de alimentos contaminados, sendo o trato intestinal o sítio principal de entrada no hospedeiro. No intestino, a bactéria adere à mucosa intestinal e promove uma fagocitose induzida, podendo utilizar as células M ou as criptas das células intestinais como porta de entrada. Uma vez no interior do fagossomo, o microrganismo rompe a membrana e escapa para o citoplasma da célula hospedeira, onde pode se dividir e invadir os enterócitos vizinhos. Através da formação de uma cauda polar de actina, a bactéria se move em direção à membrana plasmática da célula infectada, formando, então, projeções na forma de pseudópodos, que são fagocitadas pela célula hospedeira vizinha; a bactéria fica envolvida em uma dupla membrana. Em seguida, a dupla membrana é dissolvida por enzimas bacterianas e a bactéria escapa outra vez para o citoplasma, reiniciando o ciclo (TRABULSI et al., 2008). O segmento da população considerado de maior risco de desenvolver listeriose de origem alimentar é constituído por crianças, mulheres grávidas imunodeprimidos e idosos. Existem ainda outros grupos de risco menores como indivíduos debilitados por outras doenças como cirrose, hepatite e câncer (OBLINGER et al., 1988). A susceptibilidade individual depende de vários fatores como imunodeficiência, estado

nutricional e fisiológico, infecções concorrentes ou recentes, da condição do trato gastrointestinal e da dose infectante (BAIRD – PARKER et al., 1994).

A importância da *Listeria monocytogenes* (Fig. 2) para a saúde pública está no fato dela causar uma severa infecção em humanos e nos animais caracterizada por meningite, septicemia ou aborto, vários surtos da enfermidade têm sido descritos pelo mundo. Na Europa e nos EUA diversos surtos de listeriose foram atribuídos ao consumo de leite pasteurizado e produtos lácteos (FARBER & PETERKIN, 1991), vegetais crus e queijos de alta umidade (TOBIA et al., 1997).



Fonte: (a) Kenneth Todar University of Wisconsin-Madison Department of Bacteriology (2004).  
 (b) University Of Wisconsin-Madison Dep. Bacteriology. Kenneth Todar(2005).  
 (c) Instituto Pasteur. 2004.

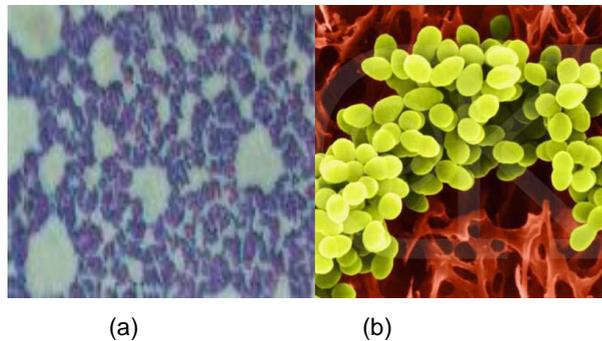
Figura 2: (a) Coloração Gram, (b) aspecto morfológico e (c) movimento de tombamento de *Listeria monocytogenes*

### 2.1.2 *Staphylococcus aureus*

*S. aureus* (Fig. 3) são cocos Gram positivos, mesófilos, produtores de enterotoxinas, anaeróbio facultativo, com melhor crescimento sob condições aeróbias, quando então produzem catalase. É um microrganismo causador de intoxicação alimentar, a intoxicação estafilocócica; os principais fatores de virulência dessa bactéria são os componentes de superfície celular e as toxinas e algumas evidências sugerem que determinadas enzimas também podem ser consideradas como fatores de virulência. Entre os componentes da superfície celular estão a cápsula, os peptídeoglicanos e ácidos teicóicos, a proteína A e as proteínas que se ligam à fibronectina, ao colágeno e ao fibrinogênio. As toxinas produzidas

por *S. aureus* podem ser citotoxinas, superantígenos ou toxinas que degradam moléculas de adesão das células epiteliais cutâneas (TRABULSI et al., 2008).

A intoxicação estafilocócica é uma das principais causas de gastroenterite ao redor do mundo, a qual é causada pela ingestão de alimentos que contêm a toxina pré-formada (JABLONSKI et al., 2001). Essa espécie é importante devido ao seu uso como indicador de higiene pessoal e é conhecida como produtora de enterotoxinas (EDWARDS et al., 2001). *S. aureus* é uma das bactérias mais freqüentemente isoladas de leite cru e de mastites bovinas, mãos humanas, equipamentos e ambiente da ordenha (LANGE et al., 1999).



Fonte: Infectious Disease Biomarker Database

([http://biomarker.korea.ac.kr/pathogen/pathogen\\_view\\_en.jsp?pdclass=1&id=81](http://biomarker.korea.ac.kr/pathogen/pathogen_view_en.jsp?pdclass=1&id=81))

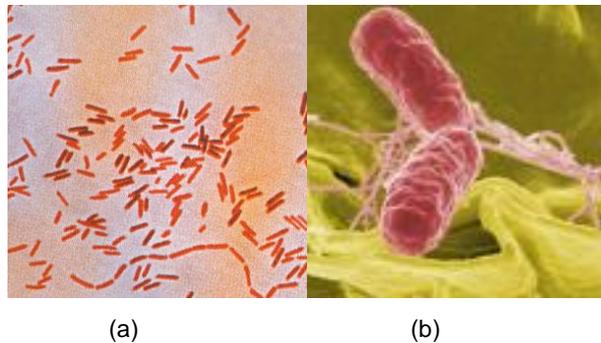
Figura 3: (a) Coloração de Gram e (b) análise microscópica de *Staphylococcus aureus*

### 2.1.3 *Salmonella* Typhimurium

*S. Typhimurium* (Fig. 4) são bacilos Gram negativos, não produtores de esporos, anaeróbios facultativos, não produtores de gás a partir de glicose, capazes de utilizar citrato como fonte de carbono, mesófilos, a maioria dos sorovares é móvel através de flagelos peritríquios e causadores de infecção alimentar. Os fatores de virulência do gênero *Salmonella* incluem as fímbrias, que podem estar associadas à adesão em diferentes células epiteliais e possivelmente à matriz extracelular; e as proteínas efetoras/secretadas que estão ligadas a translocação de proteínas bacterianas para o interior da célula eucariótica, onde elas desempenham diferentes funções (TRABULSI et al., 2008).

O hábitat natural de *Salmonella* é o trato intestinal de animais, com ciclos de infecção entre os animais, os seres humanos e o meio ambiente. As infecções causadas por

*Salmonella* spp. ocorrem, geralmente, devido ao consumo de alimentos ou água contaminados com células viáveis. As doenças causadas por *Salmonella* são subdivididas em febre tifóide, causada por *Salmonella* Typhi e Paratyphi, febres entéricas, causadas pela *Salmonella paratyphi* A, B e C e gastroenterites ou salmoneloses, causadas por *Salmonella* Typhimurium. Essas últimas têm sido relatadas como as mais freqüentes (FRANCO & LANDGRAF, 1996). Os principais alimentos responsáveis pela toxinfecção por *Salmonella* spp. são: carne de aves, saladas elaboradas com carne de aves, ovos e derivados, carne e produtos cárneos e outros alimentos protéicos. A transmissão pode ocorrer diretamente por via oral-fecal.



Fonte: Rocky Mountain Laboratories/NIAID/NIH (<http://www.sciencemuseum.org.uk/antenna/spacebacteria/>)

Figura 4: (a) Coloração de Gram e (b) análise microscópica de *Salmonella* Typhimurium

## 2.2 Controle Químico de Microrganismos

### 2.2.1 Conservantes utilizados na indústria de Alimentos

Os conservantes são substâncias que são utilizadas para prolongar a vida útil dos produtos alimentares protegendo-os da deterioração causada por microrganismos, evitando ou retardando a deterioração nos alimentos.

Conservantes alimentares são quaisquer substância ou misturas de substâncias, adicionada ao alimento com o objetivo de preservar este, em concentrações controladas, que não façam parte da composição do alimento. Os conservantes podem ser adicionados aos alimentos durante as etapas de produção, processamento, tratamento, embalagem, transporte e armazenamento (MPOUNTOUKAS et al., 2008).

Apesar de um grande número de compostos químicos ter sido descritos como conservantes potenciais de 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.

A Tabela 1 apresenta alguns conservantes de alimentos reconhecidos como seguros (GRAS – *generally recognize as safe*)

Tabela 1: Alguns conservantes de alimentos reconhecidos como seguros

Conservante	Concentração Máxima Permitida	Microrganismos Afetados	Alimentos
Ácido propiônico/propionatos	0,32%	Bolores e Leveduras	Pães, bolos, alguns queijos, inibidor de viscosidade em massa de pão
Ácido sórbico/sorbatos	0,2%	Bolores e Leveduras	Queijos duros, figos, xaropes, molhos para salada, geléias e bolos
Parabenos	0,1%**	Bolores e Leveduras	Produtos para panificação, refrigerantes, conservas e molho para salada
SO <sub>2</sub> /sulfitos	200-300ppm	Insetos e microrganismos	Melado, frutas secas, fabricação de vinho, suco de limão (não deve ser utilizado em carnes e outros alimentos reconhecidos como fonte de tiamina)
Etileno/óxido de propileno***	700ppm	Leveduras, bolores, insetos daninhos	Fumigante para temperos, nozes
Nisina	1%	Bactérias lácticas, clostrídios	Certos queijos pasteurizados
Ácido deidroacético	65ppm	Insetos	Pesticida em morangos, abóbora
Nitrato de sódio***	120ppm	Clostrídios	Preparação para carnes curadas
Ácido caprílico	-	Bolores	Embalagem de queijo

Fonte: Tortora et al., 2005.

Nota: GRAS (normalmente reconhecido como seguro) pela seção 201 (32) (s) do *U.S. Food, Drug, and Cosmetic Act*.

\*\*Heptil éster: 12ppm em cerveja, 20ppm em bebidas de frutas não-carbonatadas

\*\*\*Pode estar envolvido em mutagênese ou carcinogênese

O crescimento microbiano e as reações de oxidação que ocorrem nos alimentos são as duas principais causas de deterioração e perda de frescor em alimentos sólidos processados. Com o objetivo de estender a vida útil dos alimentos, os conservantes são muito usados em produtos como queijos e produtos cárneos, em quantidades requeridas para o controle da degradação, como controle da microbiota e da oxidação de vitaminas nativas e corantes, etc., em quantidades controladas pela legislação de aditivos de alimentos (GUILLARD et al., 2009).

Estudos toxicológicos atuais apontam que determinadas concentrações de conservantes sintéticos e seu uso continuado, podem ser potencialmente tóxicos e ter efeitos carcinogênicos. Muitas pesquisas estão sendo dirigidas no sentido de encontrar compostos naturais com atividade antimicrobiana e antioxidante, 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).

Nesse contexto, diversos estudos exploram a atividade antioxidante e antimicrobiana de extratos de frutas e ervas, além de outras propriedades biológicas como antimicrobiana e antitumoral, de fontes ricas em compostos fenólicos como ácidos fenólicos, flavonóides, tocoferóis entre outros (ANWAR, 2008).

Em 2008, Mpountoukas et al. estudou a atividade genotóxica, citoestática e o potencial citotóxico de três conservantes utilizados em alimentos, sorbato de potássio, benzoato de sódio e nitrato de potássio. De acordo com os resultados esses conservantes, quando utilizados em concentrações baixas, não apresentaram atividade genotóxica, porém em concentrações de 4 e 8 mM os conservantes sorbato de potássio e benzoato de sódio apresentaram atividade. Estes mesmos dois conservantes, em concentrações que variaram de 0,02 mM – 2 mM, não apresentaram atividade citoestática, mas em concentrações de 4 e 8 mM apresentaram fraca atividade. O nitrato de potássio não apresentou efeito nas concentrações utilizadas e, além disso, nenhum conservante testado apresentou atividade citotóxica.

Como mencionado anteriormente no item 2.1, os óleos essenciais e seus componentes são conhecidos por possuírem atividade antimicrobiana (AZZOUZ & BULLERMAN, 1982; DEANS & RITCHIE, 1987; AKGUL & KIVANC, 1989; HAMMER et al.,

1999) e, muitas aplicações para o controle do crescimento de bactérias patogênicas e deteriorantes de alimentos têm sido desenvolvidas usando óleos essenciais como conservantes naturais de alimentos (HAO et al., 1998). Alguns estudos reportam que a atividade antibacteriana dos óleos essenciais é derivada dos compostos terpenóides e fenólicos presentes nesses óleos. Em geral, maiores quantidades de óleos essenciais são necessárias em alimentos quando comparadas as quantidades utilizadas em meios de cultura em laboratório, portanto a aplicação prática dos óleos essenciais é restrita, já que a adição de altas concentrações de óleos essenciais gera mudanças indesejadas na parte sensorial dos alimentos (YAMAZAKI et al., 2004).

O controle químico é usado para o controle do crescimento microbiano em tecidos vivos e em objetos inanimados. Entre os agentes químicos mais utilizados para o controle microbiano estão os fenóis e os compostos fenólicos, bifenóis, biguanidas, halogênios, alcoóis, metais pesados e seus compostos, agentes de superfície (tensoativos ou surfactantes) (TORTORA et al., 2008).

Os alcoóis, utilizados como conservantes químicos eliminam efetivamente as bactérias e fungos, mas não os endósporos. O mecanismo de ação normalmente é a desnaturação das proteínas, mas o álcool também pode romper membranas e dissolver muitos lipídios. Os álcoois possuem a vantagem de agir e evaporar rapidamente, não deixando resíduos. Os aldeídos estão entre os antimicrobianos mais efetivos e dois exemplos que podem ser citados são o formaldeído e o glutaraldeído. Eles inativam proteínas formando ligações cruzadas covalentes com vários grupos funcionais orgânicos nas proteínas ( $-NH_2$ ,  $-OH$ ,  $-COOH$  e  $-SH$ ) (TORTORA et al., 2008).

### 2.3 Atividade Antimicrobiana de compostos naturais ou semi-sintéticos

Microrganismos, incluindo bactérias Gram negativas e positivas, além de fungos, são reconhecidos por serem causadores de diversas infecções e intoxicações em humanos. Apesar de a indústria farmacêutica produzir um expressivo e efetivo número de novos agentes antimicrobianos e antibióticos nos últimos anos, a resistência microbiana a essas drogas também aumentou (MATASYOH et al., 2009).

Em geral, as bactérias têm a habilidade genética de adquirir e de transmitir resistência às drogas utilizadas como agentes terapêuticos. Medidas para enfrentar o problema são necessárias, entre elas, o controle no uso de antibióticos, o desenvolvimento de pesquisas para uma melhor compreensão dos mecanismos genéticos de resistência microbiana e estudos acerca de novas substâncias antimicrobianas, sintéticas, semi-sintéticas ou naturais (LOGUERCIO et al., 2005).

Estudos têm demonstrado que as propriedades antimicrobianas dos óleos essenciais prolongam a fase lag (a) e reduzem a taxa de crescimento exponencial, assim como a população final das culturas (VALERO & GINGER, 2006). A Figura 5 mostra uma curva típica de crescimento bacteriano. A fase lag é o momento no qual está ocorrendo a síntese de enzimas; na fase log (b) as células já estão plenamente adaptadas e possuem uma alta velocidade de crescimento; na fase estacionária (c) tem início o acúmulo de metabólitos tóxicos e o término do substrato; a última fase é a declínio (d) onde ocorre a redução do crescimento celular e tem início a lise celular, consumo do material intracelular.

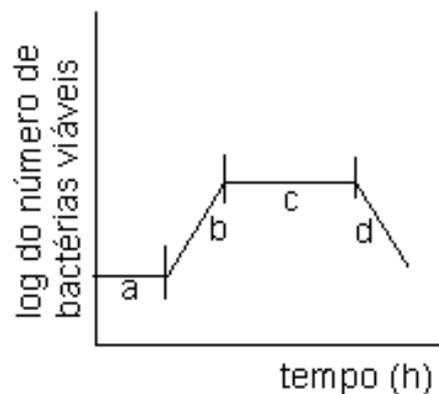


Figura 5: Curva típica de crescimento bacteriano

Os óleos essenciais e seus componentes foram previamente estudados em relação a suas habilidades de proteger os alimentos contra bactérias patogênicas em suco de maçã (FRIEDMAN et al., 2004) e em outros alimentos (BURT et al., 2004; SEYDIM & SARIKUS, 2006), mas não existem muitos estudos sobre a incorporação de óleos essenciais e seus componentes em filmes comestíveis. Filmes comestíveis podem melhorar a vida útil e a qualidade dos alimentos por servirem como uma barreira seletiva para transferência de umidade, trocas de oxigênio, oxidação lipídica e perdas de aroma e sabores voláteis.

Rojas Graü et al. (2007) publicaram o primeiro estudo sobre a atividade antimicrobiana de filmes comestíveis de purê de maçã adicionados de alginato e de óleos essenciais e seus componentes, contra *E.coli* O157: H7. Os autores utilizaram os óleos essenciais de orégano, capim-limão e canela, e os seus respectivos componentes majoritários, carvacrol, citral e cinamaldeído. Os resultados mostraram que os aditivos não tiveram efeito sobre o vapor de água e sobre a permeabilidade de oxigênio, no entanto as propriedades de tensão foram significativamente afetadas pela adição dos óleos essenciais e seus componentes. Entre os óleos essenciais e componentes utilizados o óleo essencial de orégano e o carvacrol foram os melhores agentes antimicrobianos utilizados.

Ohlan et al. (2008) estudaram a síntese e atividade antimicrobiana de complexos contendo uréia. Para avaliação da atividade antimicrobiana foram utilizadas cepas de *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* e *Escherichia coli*. Segundo o autor a maioria dos complexos sintetizados apresentaram moderada atividade contra essas bactérias, destacando os complexos de ácido cáprico, ácido pamóico e o ácido 3-hidroxibenzóico.

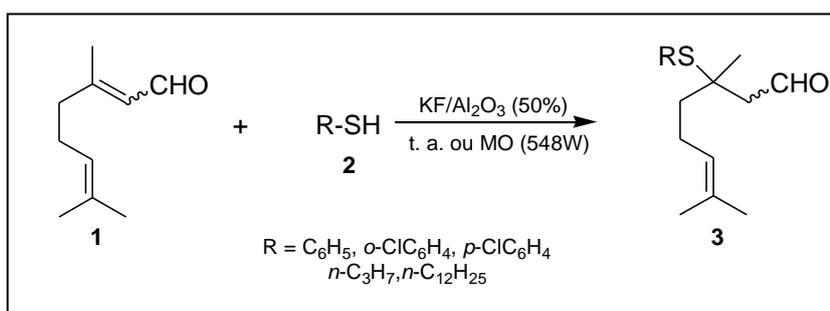
## 2.4 Óleos essenciais

As plantas contem uma variedade de substâncias chamadas de fitoquímicos, que são derivados de seus componentes naturais. A preparação de fitoquímicos com dupla funcionalidade, prevenção da lipoxidação e atividade antimicrobiana, possui um grande potencial para estender a vida útil de produtos alimentícios. No entanto, ainda não estão claros quais os componentes das plantas que são ativos. Os óleos essenciais e os compostos fenólicos recentemente vêm recebendo uma grande atenção, devido a novas descobertas sobre suas atividades biológicas e, também por serem amplamente distribuídos em plantas comestíveis (BAKKALI et al., 2008; KAMEL et al., 2007; ARCHANA et al., 2005).

O termo óleo essencial é utilizado para designar os líquidos oleosos voláteis dotados de forte aroma, extraídos principalmente de plantas, geralmente, por arraste a vapor, podendo também ser empregados na extração outros processos físicos. A *International Standard Organization* (ISO) define os óleos voláteis como produtos obtidos de partes de plantas através da destilação por arraste a vapor d'água, e também como os produtos obtidos pela expressão de pericarpos de frutos cítricos.

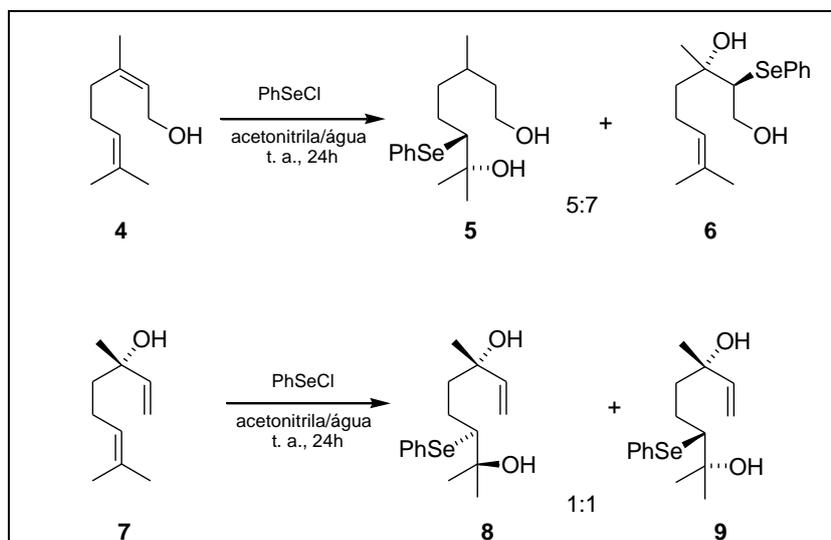
Os constituintes químicos mais comuns nos óleos essenciais são misturas de terpenos, geralmente monoterpenos, sesquiterpenos e arilpropanóides que podem apresentar uma variedade de funcionalizações e, devido às diferentes funcionalizações podem ser utilizados como intermediários de reações de síntese orgânica.

Lenardão et al. (2007) estudaram a síntese de organo enxofres a partir de aldeídos e tióis, entre os aldeídos testados estava o citral **1**, aldeído majoritário do óleo essencial de capim-limão. O catalisador utilizado na reação foi  $\text{KF}/\text{Al}_2\text{O}_3$  e esta foi realizada na ausência de solventes e com microondas (MO), sendo assim uma “reação verde”. O produto obtido a partir do citral foi o 3-tioorganoilcitronelal **3** (Esquema 1). Os produtos sintetizados apresentaram atividade antimicrobiana contra *Staphylococcus* spp.



Esquema 1: Síntese do composto 3- tioorganoilcitronelal a partir do aldeído citral

Ward & Cooper (2004) estudaram a hidrosselenação de álcoois alílicos e a sua conversão em  $\beta$ -hidroxi-epóxidos via substituição de um grupamento de selênio. O objetivo do estudo foi verificar se a posição do oxigênio do grupamento hidroxila facilita a entrada do átomo de selênio do reagente na dupla ligação. Foram utilizados os álcoois geraniol **4** e linalol **7**, provenientes dos óleos de gerânio e manjeriço, respectivamente. As reações foram realizadas utilizando cloretos de fenilselenenila em uma solução de acetonitrila/água (5:1) a temperatura ambiente por 24 horas. Nos dois casos estudados (geraniol e linalol) os autores não observaram seletividade da hidrosselenação na dupla ligação alílica em relação à dupla ligação isolada, e os produtos **5**, **6** e **8**, **9** foram formados a partir do geraniol e linalol, respectivamente (Esquema 2).



Esquema 2: Síntese do selenogeraniol e selenolinalol

Apesar das inúmeras pesquisas envolvendo o potencial biológico dos óleos essenciais, o seu potencial para o desenvolvimento de novas drogas tem sido pouco explorado. Os constituintes dos óleos essenciais e as suas concentrações relativas no óleo podem variar de um óleo para outro, e óleos essenciais de diferentes plantas apresentam atividade antimicrobiana variada. Nos últimos anos, devido a um aumento de infecções transmitidas por microrganismos resistentes aos antibióticos, a procura por novos protótipos de drogas para combater infecções é uma necessidade absoluta. O uso de óleos essenciais e extratos de plantas pode apresentar um grande potencial e boas perspectivas para pesquisas nesta área (NGUYEN et al., 2008).

A atividade antimicrobiana de óleos essenciais e de extratos de plantas possui muitas aplicações, sendo potenciais agentes para preservativos de alimentos, farmacêuticos, medicina alternativa e terapias naturais (COSENTINO et al., 1999; BAKKALI et al., 2008). Estudos prévios mostram que um grande número de espécies de plantas já foi testado em relação ao seu potencial biológico, terapêutico e farmacêutico (COSENTINO et al., 1999; ALCARADZ et al., 2000; ANTHONY et al., 2002; MAJHENIC et al., 2007; MATA et al., 2007; BAKKALI et al., 2008).

No sentido de desenvolver um novo agente antimicrobiano de fonte natural, os vegetais constituem uma enorme e importante fonte visto que possuem componentes

biologicamente ativos, sendo que muitos destes podem ser utilizados como modelos para a síntese de inúmeros fármacos (WALL et al., 1996). Outros estudos têm demonstrado que produtos naturais oriundos de plantas apresentam atividade antimicrobiana contra linhagens de patógenos resistentes aos antibióticos (VANACLOCHA & CANIGUERAL, 2003).

Sandri et al. (2007) estudaram a atividade antimicrobiana, utilizando as técnicas de difusão do disco e determinação da concentração inibitória mínima, dos óleos essenciais de sete espécies brasileiras do gênero *Cunila* contra cinco bactérias patogênicas e formadoras de esporos. Entre as cepas utilizadas nos ensaios estavam espécies de *Bacillus*, *Enterobacter*, *Enterococcus*, *Escherichia*, *Pseudomonas*, *Salmonella* e *Staphylococcus*. Os resultados das análises químicas mostraram que os óleos essenciais apresentaram diferenças qualitativas e quantitativas nos componentes e, entre as espécies analisadas, o óleo essencial da espécie *Cunila galioides*, com maior conteúdo de citral, foi a que apresentou melhor atividade antimicrobiana contra os patógenos testados.

Em 2004, Friedman et al. analisaram a atividade antibacteriana de óleos essenciais de plantas e seus componentes contra *Escherichia coli* O157: H7 e *Salmonella enterica* em suco de maçã. Os componentes dos óleos essenciais que apresentaram melhores resultados contra *E.coli* O157: H7 foram: carvacrol, óleo essencial de orégano (*Origanum vulgare*), geraniol, eugenol, óleo essencial da folha e da casca de canela (*Cinnamom zeylanicum*), citral e óleo essencial de capim-limão (*Cymbopogon citratus*). Para *S.enterica* os melhores resultados foram obtidos com: óleo essencial de melissa (*Melissa officinalis*), carvacrol, óleo essencial de orégano (*Origanum vulgare*), terpineol, geraniol, óleo de limão (*Citrus leom*), citral e linalol. Segundo os pesquisadores, a acidez do suco de maçã não alterou a atividade bacteriana dos extratos. Na Fig. 6 estão as estruturas de alguns componentes de óleos essenciais.

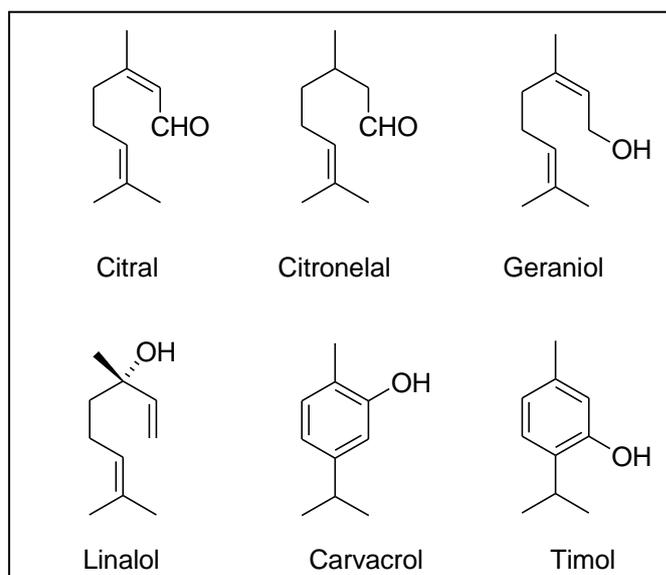


Figura 6: Estrutura química de alguns componentes de óleos essenciais

Muitos estudos avaliam a atividade antimicrobiana de diferentes óleos essenciais *in vitro* e isoladamente. Em 2008, Gutierrez et al. estudaram a atividade antimicrobiana de óleos essenciais derivados de ingredientes alimentícios, combinados e também as interações destes óleos essenciais com proteínas, carboidratos, lipídios e níveis de pH no alimento, a fim de otimizar a aplicação destes compostos em alimentos. Foram utilizados os óleos essenciais de manjeriço (*Ocimum basiculum L.*), manjerona (*Origanum majarona*), orégano (*Origanum vulgare*), alecrim (*Lippia sidoides*) e tomilho (*Thymus vulgaris*). De acordo com esse estudo a combinação de óleos essenciais pode reduzir as concentrações aplicadas e, conseqüentemente, minimizar qualquer efeito sensorial adverso no alimento. Os resultados também revelaram que os óleos essenciais podem ser mais eficientes contra bactérias patogênicas e formadoras de esporos, quando aplicados em alimentos com alto grau de proteína e pH ácido, assim como baixos níveis de lipídios e carboidratos.

Em um estudo realizado em 2006, Fisher et al. relataram que entre os óleos essenciais cítricos de limão (*Citrus lemon*), laranja doce (*Citrus sinensis*) e bergamota (*Citrus bergamia*) e seus componentes, o óleo essencial de bergamota e seu componente majoritário linalol, foram mais eficientes contra *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli* e *Campylobacter jejuni*. De acordo com os resultados entre a bactérias utilizadas, as bactérias Gram positivas foram mais susceptíveis à inibição do que

bactérias Gram negativas e, todas as bactérias testadas foram menos susceptíveis a inibição em sistemas alimentares do que *in vitro*.

Os óleos essenciais, nos últimos anos, têm atraído a atenção de indústrias e pesquisas científicas, devido a sua potencial utilização como conservante natural, já que estes são normalmente reconhecidos como seguros (GRAS – Generally Recognized as Safe) e muitos deles possuem um grande espectro como agente antimicrobiano, com potencial para o controle de bactérias patogênicas e deteriorantes em alimentos (GUTIERREZ et al., 2008). No entanto, os óleos essenciais possuem impacto sobre as características sensoriais dos alimentos como sabor, odor e, estes podem também exceder o limiar de aroma aceitável em cada alimento (HSIESH et al., 2001; NAZER et al., 2005).

Uma alternativa para minimizar os efeitos sensoriais negativos dos óleos essenciais e seus componentes nos alimentos é a utilização da química combinatória. A idéia central da química combinatória é a síntese de uma gama de compostos a partir de uma molécula de interesse e a avaliação da atividade biológica dos compostos sintetizados. Esta estratégia combinatória pode ser aplicada como pesquisas nas áreas de agricultura e alimentos, incluindo segurança alimentar, nutrição, desenvolvimento de novos ingredientes, processamento e conversão de produtos naturais (WONG & ROBERTSON 1999). A modificação da molécula por inserção de novos substituintes ou pela transformação de grupos funcionais, conseqüentemente, irá modificar as características dos compostos, podendo assim diminuir o odor e sabor acentuado. Assim, é possível evitar a alteração drástica nas características sensoriais do alimento.

#### 2.4.1 Óleo essencial de *Cymbopogon nardus* (L) Rendle e (+)-*R*-Citronelal

O capim citronela (*Cymbopogon nardus*), planta originada do Sri Lanka (antigo Ceilão) e da Índia, é utilizada na Indonésia, como chá calmante e digestivo. O gênero *Cymbopogon* pertence à família *Poaceae*, subfamília *Panicoideae*. Este gênero é constituído de oitenta e cinco espécies (CRAVEIRO, 1981). O óleo essencial extraído da planta tem como principal constituinte o citronelal (3,7-dimetil-oct-6-enal), predominantemente formado pelo metabolismo secundário das plantas.

O gênero *Cymbopogon* representa uma ampla variedade de relações filogenéticas e, portanto as variações quimiotípicas nos óleos essenciais de suas espécies são geneticamente rastreáveis. O óleo extraído das folhas de *Cymbopogon nardus* (Fig. 7) é usado como repelente de insetos, na perfumaria, como bactericida laboratorial, desinfetante doméstico e, como matéria prima para a síntese de outros aromas (SHASANY, 2000; CASTRO & RAMOS, 2003). Essas propriedades são atribuídas à presença de substâncias voláteis em suas folhas, como citrionelal, eugenol, geraniol, limoneno, entre outros, denominados de monoterpenos (SHASANY, 2000). Mahalwal & Ali (2002) identificaram os constituintes do óleo essencial do *Cymbopogon nardus* por cromatografia gasosa com espectro de massa (CG/EM), encontrando dezesseis compostos monoterpênicos (79,8%) e nove compostos sesquiterpênicos (11,5%). Os compostos monoterpênicos majoritários foram o citrionelal (29,7%) e o geraniol (24,2%) e os compostos sesquiterpênicos majoritários foram o (*E*)-nerolidol (4,8%) e o  $\beta$ -cariofileno (2,2%).



Figura 7: *Cymbopogon nardus* (L) Rendle

O óleo essencial de *C. nardus* juntamente com os óleos essenciais de *Cymbopogon citratus* e *Cinnamomum zeylanicum* induzem 100% de mortalidade e causam significativa redução na produção da peste do arroz *Sitophilus orizae* e da traça de grãos *Sitotroga cerealella*, segundo Paranagama et al. (2001, 2002).

O citrionelal (3,7-dimetil-oct-6-enal) (Fig. 8) é um monoterpeno, predominantemente formado pelo metabolismo secundário de plantas. É tipicamente isolado como uma mistura não-racêmica dos enantiômeros *R* e *S* por destilação com arraste de vapor ou extração por solventes dos óleos de *Corymbia citriodora* (Hill e Johnson) e *Java citronella*, no óleo essencial de *Cymbopogon nardus* existe apenas o isômero (+)-(*R*)-citrionelal. Alternativamente

é também encontrado em outros 50 óleos essenciais; juntamente com citral, geranial, linalol e citronelol, o citronelal é um dos mais importantes monoterpenos (PYBUS & SELL, 1999).

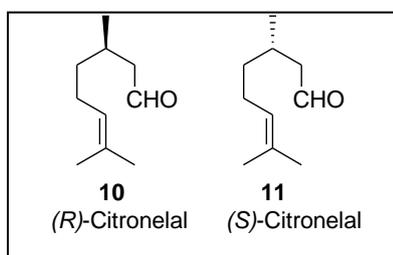


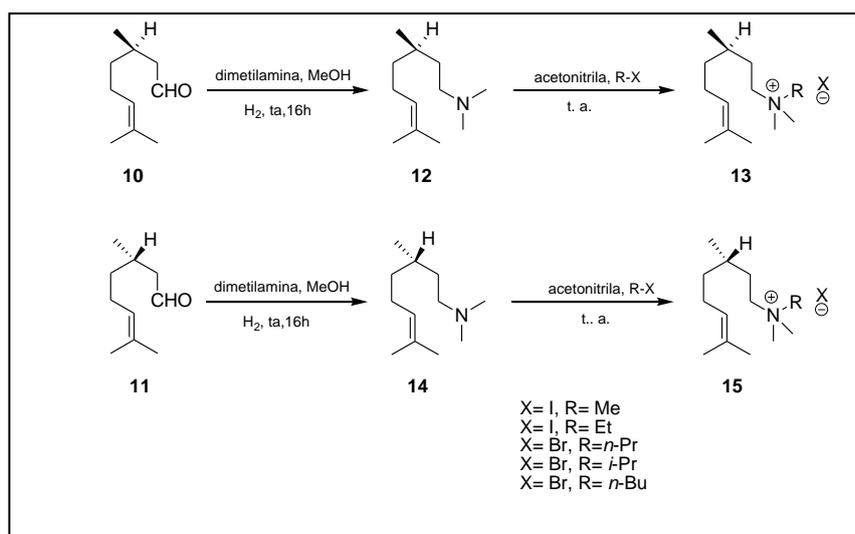
Figura 8: Estruturas químicas do *(R)*-citronelal **10** e do *(S)*-citronelal **11**

O citronelal é um material de partida quiral de fácil acesso e barato, possui um grupo funcional aldeído, o qual pode ser convenientemente usado em muitas transformações químicas para o desenvolvimento da estrutura de carbonos desejados. É extensivamente utilizado no campo da síntese orgânica e é um importante precursor quiral na síntese de vários produtos naturais (LENARDÃO et al., 2007). A maior vantagem do citronelal como um precursor quiral é a acessibilidade comercial de ambas as formas quirais (NAGESHWAR et al., 2009).

Diversos artigos descrevem as biotransformações do citronelal na formação de compostos industrialmente aplicáveis (JOGLEKAR & DAVLIKAR, 1969; BANTHORPE et al., 1972; NOMA et al., 1991; NOMA et al., 1992; VANEK et al., 2003; VELANKAR & HEBLE, 2003), assim como o seu metabolismo em organismos vivos (GBOLADE & LOCKWOOD, 1990; ODA et al., 1996). Entretanto, além das aplicações destas substâncias, principalmente nas indústrias de fragrâncias, o citronelal e o citronelol são empregados como intermediários em sínteses de diversos terpenos naturais como o 1-mentol,  $\alpha$ -tocoferol e ironas (SELL, 2003).

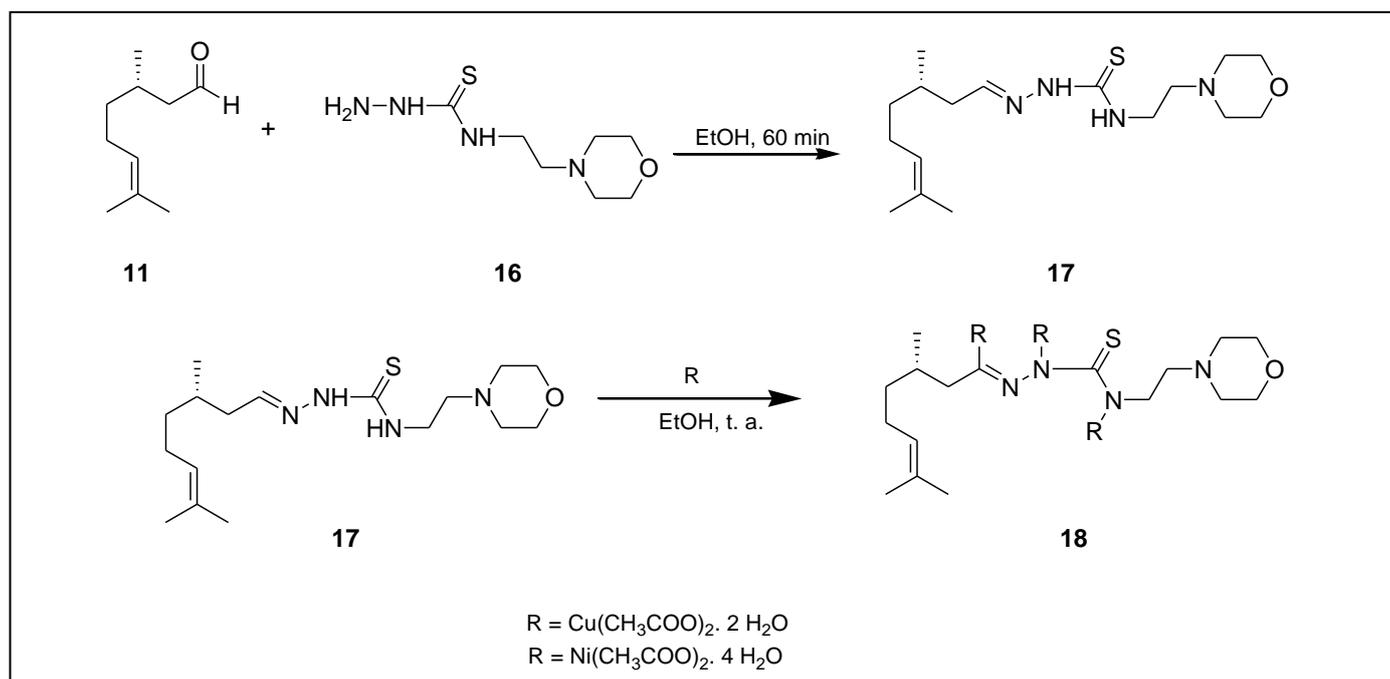
Nageshwar et al. (2009) sintetizaram líquidos iônicos a partir de compostos quirais, no caso *(R)*-citronelal **10** e *(S)*-citronelal **11**. Para a síntese dos líquidos iônicos o grupamento aldeído do citronelal foi convertido em uma base de Schiff usando uma amina (dimetilamina ou dietilamina). Após foi realizado um tratamento com um haleto de alquila (iodeto de metila, iodeto de etila, brometo *n*-propila, brometo *i*-propila e brometo *n*-butila), gerando o

correspondente líquido iônico (Esquema 3). De acordo com os autores, vários líquidos iônicos quirais podem ser sintetizados a partir dos isômeros do citronelal (*R* e *S*) obtendo bons rendimentos; a metodologia pode ser generalizada com outras dialquilaminas para desenvolver líquidos iônicos quirais para qualquer uso específico.



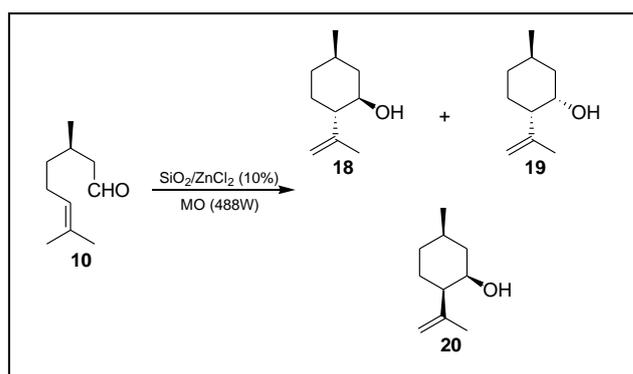
Esquema 3: Síntese de líquidos iônicos a partir dos compostos quirais (*R*) e (*S*) – citronelal

Em 2010, Belichi-Ferrari et al. publicaram um trabalho sobre a modificação do citronelal tiossemicarbazona com cobre e níquel e o estudo sobre a atividade antiproliferativa e tóxica dos compostos sintetizados. A primeira etapa teve início com a reação do (*S*)-citronelal **11** e o composto etilmorfolina tiossemicarbazida **16**. Após esta etapa o produto **17** reagiu com acetato de cobre (II) ou níquel (II) gerando o produto **18** (Esquema 4). A adição dos novos grupamentos ao composto aumentou a solubilidade dos compostos e os ensaios biológicos realizados revelaram que a atividade biológica dos produtos contendo cobre e níquel foi superior à atividade biológica do produto sem o fragmento morfolina, e que este pode ser estudado como um potencial agente antitumoral.



Esquema 4: Modificação do Citronelal tiosemicarbazonato com cobre e níquel

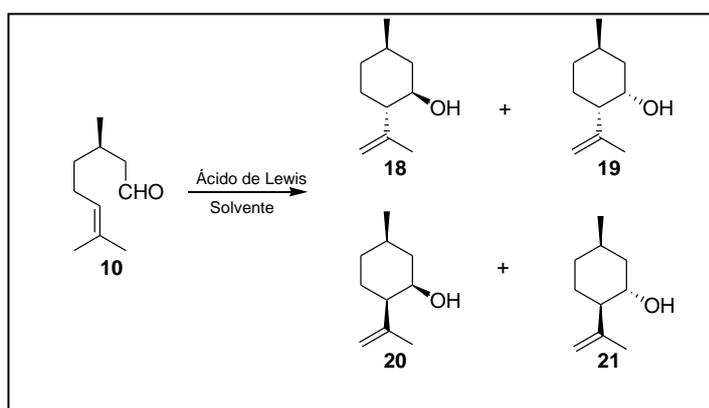
Jacob et al. (2003) propuseram a síntese do isopulegol a partir do (*R*)- citronelal **10**. A metodologia proposta para a síntese incluía princípios da química verde, como ausência de solventes e utilização de irradiação em micro-ondas, o catalisador utilizado na reação foi  $\text{SiO}_2/\text{ZnCl}_2$  (Esquema 5). A reação de *ene*-ciclização do (*R*)-citronelal **10** levou a formação de três isômeros: isopulegol **18** (75%), *neoiso*-isopulegol **19** (15%) e *neoisopulegol* **20** (10%).



Esquema 5: *Ene*-Ciclização do (*R*)-citronelal

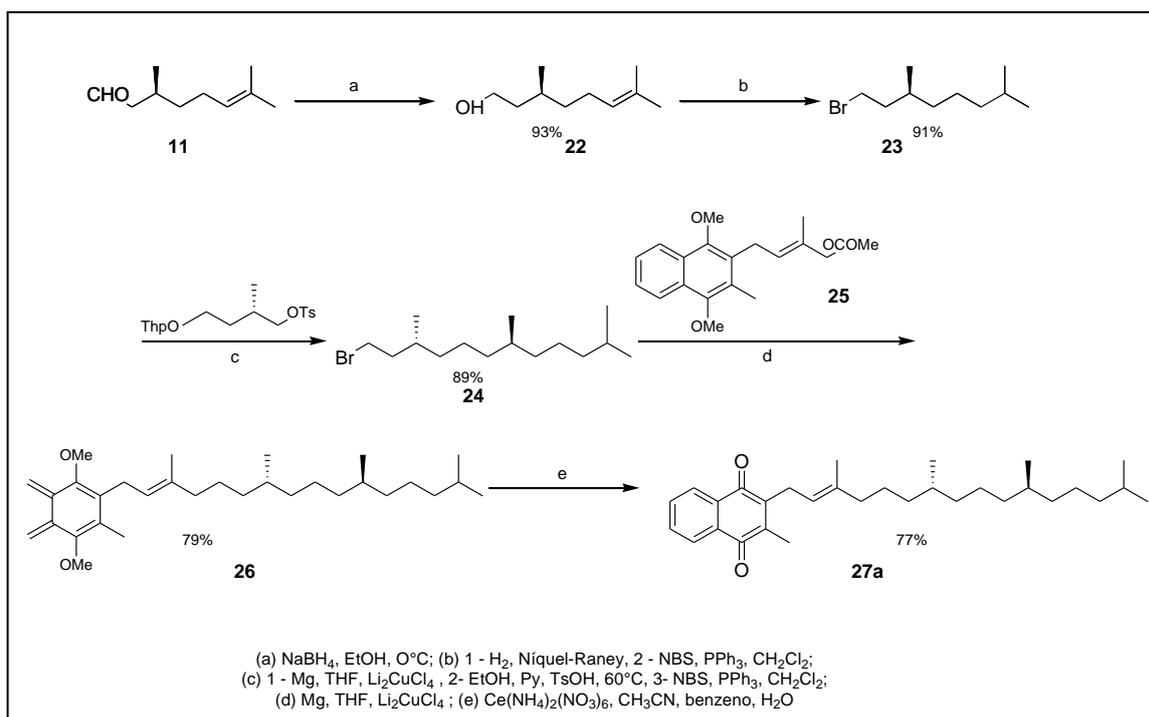
Fatimah (2009) também estudou a ciclização do citronelal, mas para isso utilizou catálise heterogênea e solventes para a conversão de (*R*)-citronelal **10** em isopulegol **18**. O sistema catalítico utilizado foi dióxido de zircônio disperso em  $\text{SiO}_2$  - montmorilonita, e a

reação formou quatro isômeros: isopulegol **18**, *neo*-isopulegol **19**, *neo*-isopulegol **20** e *iso*-isopulegol **21** (Esquema 6). Os resultados sugeriram que a dispersão de ZrO<sub>2</sub> em SiO<sub>2</sub>-montmorilonita aprimorou a atividade catalítica e promoveu uma maior seletividade da reação para obtenção do isopulegol, 94,6%.



Esquema 6: Síntese do isopulegol e seus isômeros a partir do (*R*)-citronelal

Os isômeros *R* e *S* citronelal podem ser utilizados na síntese enantiosseletiva de três isômeros da vitamina K (SCHIMIDA et al., 1990), enquanto o (*R*)-citronelal pode ser utilizado na síntese do  $\alpha$ -tocoferol (vitamina E). Tanto a vitamina K quanto a vitamina E possuem um anel polimetilado com múltiplos centros quirais. O passo chave para a síntese dos isômeros da vitamina K (Esquema 7) é o acoplamento do tipo Schlosser entre o reagente de Grignard **24** e um benzoato alílico **25**, gerando a vitamina K di-hidratada **26**. A reação com Ce(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>(NO<sub>3</sub>)<sub>6</sub> converte o produto intermediário **26** ao isômero **27a** da vitamina K, com 77% de rendimento (SCHIMIDA et al., 1990). Essa metodologia pode ser utilizada para sintetizar três isômeros da vitamina K (**27a**, **27b**, **27c**), o quarto isômero de ocorrência natural **27d** pode ser obtido através de outras reações que possuem o fitol como material de partida. Na Figura 9 estão os quatro isômeros da vitamina K.



Esquema 7: Síntese da vitamina K a partir do (S)-citronelal

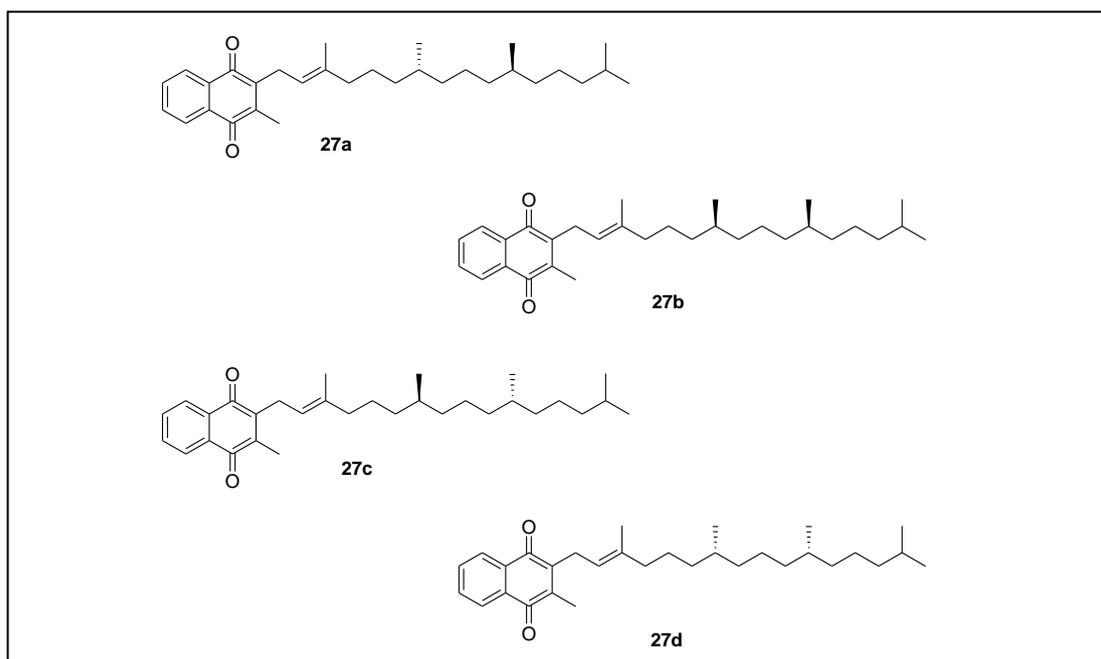
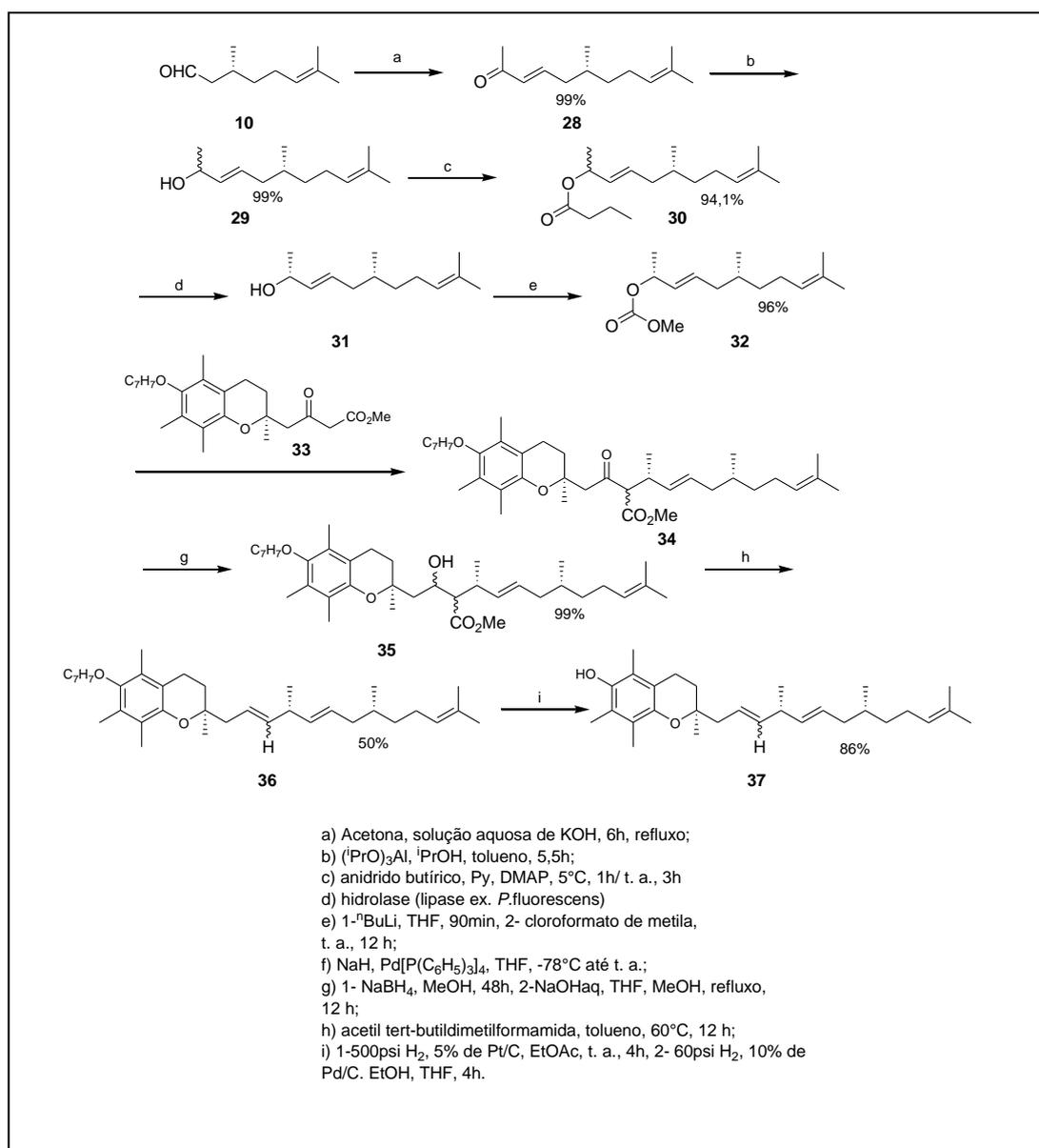


Figura 9: Estrutura química dos isômeros da vitamina K

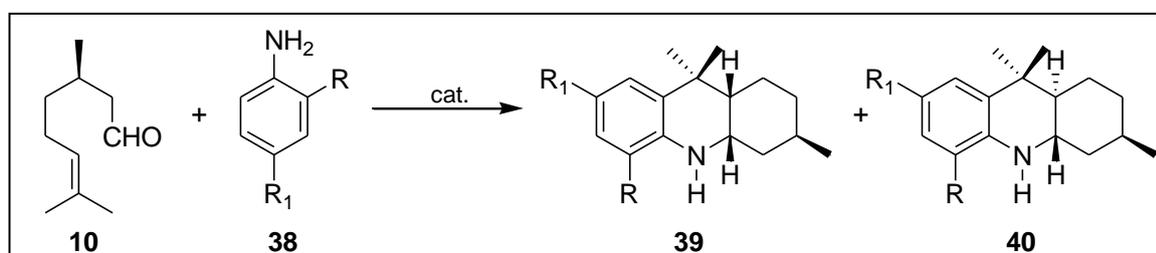
O (*R*)-citronelal **10** é utilizado na síntese convergente da vitamina E (tocoferol) natural **37**, pela reação com acetato de metil (*S*)-(6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-ila) **33**. Durante

a síntese é importante a resolução da atividade catalítica da lipase no controle do novo centro quiral em **32**. O  $\alpha$ -tocoferol é o principal e mais estudado componente da vitamina E; muitos estudos evidenciam sua atividade antioxidante *in vitro* e resultados epidemiológicos indicam que o uso do  $\alpha$ -tocoferol como substância medicinal e profilática diminui substancialmente o risco do desenvolvimento de muitos processos patológicos (MARTINEZ-FLORES et al., 2002).



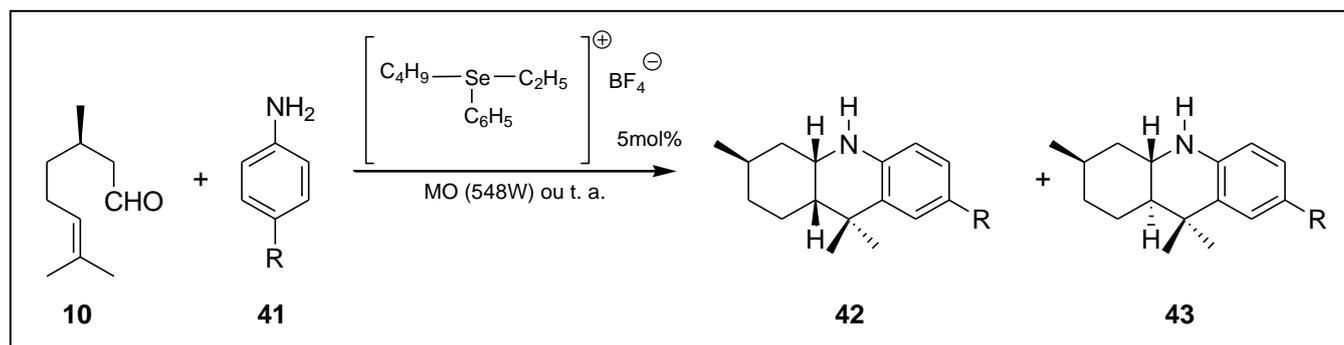
Esquema 8: Síntese do  $\alpha$ -tocoferol (vit. E) a partir do (R)-citronelal

O (*R*)-citronelal **10** é também utilizado na síntese de octaidroacridinas (OHA), uma classe de compostos farmacologicamente interessantes. A síntese das OHAs tem início com a reação entre **10** e *N*-arilaminas **38** (Esquema 9). A reação imino-Diels-Alder catalisada por ácido de Lewis é o método mais atômicamente eficiente para obter OHAs **39** e **40**, com altos rendimentos e, em alguns casos com 100% de estereosseletividade. A reação pode ser catalisada por SnCl<sub>4</sub> (LASCHAT & LAUTERWEIN, 1993), Cr(CO)<sub>3</sub> (LASCHAT & LAUTERWEIN, 1993) ou TiCl<sub>3</sub> (MAYECAR et al., 2004). No entanto, o uso de trifluoretanol (MAYECAR et al., 2004) ou líquido iônico (YADAV et al., 2005) como solvente, eliminam a necessidade do ácido de Lewis.



Esquema 9: Síntese de octaidroacridinas a partir do (*R*)-citronelal

Lenardão et al. (2006) utilizaram o líquido iônico de selenênio como catalisador para a reação de síntese das octaidroacridinas (OHAs). Como materiais de partida foram utilizados o (*R*)-citronelal **10** e anilina **41** e a reação foi realizada utilizando temperatura ambiente ou micro-ondas e o líquido iônico de selênio, tetrafluoroborato de butiletilfenilselenênio, como catalisador, formando os produtos **42** e **43**. De acordo com os resultados pode-se observar que a utilização de micro-ondas melhorou o rendimento da reação. Além disso, o método é considerado verde, pois não utiliza solvente, utiliza matéria-prima derivada de uma fonte renovável ((*R*)-citronelal **10**), líquido iônico como catalisador e é atômicamente eficiente. O Esquema 10 mostra a síntese das OHAs utilizando o líquido iônico de selenênio como catalisador.



Esquema 10: Síntese das octaidroacridinas, a partir do (*R*)-citronelal, utilizando líquido iônico selenônio

## 2.5 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 & WILLIAMSON, 1996; DEVITO & GARRET, 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 tóxicas, que são nocivas à saúde humana e ao meio-ambiente (ANASTAS & FARRIS, 1994). Nesta linha, novos estudos estão sendo realizados buscando contemplar alguns dos princípios da Química Verde, como por exemplo: reações em meio livre de solvente (TANAKA & TODA, 2000), utilização de solventes alternativos e sistemas catalíticos bifásicos (LI, 1993; HORVÁTH & JOÓ, 1995), uso de fluidos supercríticos (JESSOP & LEITNER, 1999), utilização de matérias-primas de fonte renovável (LIU et al., 2006), como por exemplo, a utilização de citronelal (JACOB et al., 2003) e uso de líquidos iônicos (WELTON, 1999).

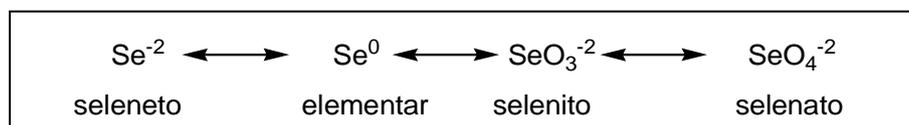
Alguns autores procuraram, em seus trabalhos, definir os principais pontos ou os princípios elementares da química verde. Basicamente, há doze tópicos que precisam ser

almeçados quando se pretende implementar a química verde: prevenção, economia de átomos, síntese de produtos menos perigosos, desenho de produtos seguros, solventes e auxiliares mais seguros, busca pela eficiência de energia, uso de fontes renováveis de matéria-prima, evitar a formação de derivados, catálise, desenho para a degradação, análise em tempo real para a prevenção da poluição e química intrinsecamente segura para a prevenção de acidentes (ANASTAS & WARNER, 1998).

## 2.6 Síntese de Organosselênios

Desde a década de 30, os compostos organocalcogênicos têm sido alvo de interesse para a química devido à descoberta de suas aplicações sintéticas (COMASSETO, 1983), como importantes intermediários e reagentes muito utilizados em síntese (PAULMIER, 1986; BRAGA et al., 1996).

O elemento químico selênio foi descoberto em 1817 pelo sueco Jons. J. Berzelius, pertence ao grupo 16 da tabela periódica, pode apresentar-se sob quatro estados de oxidação:  $-2$  (seleneto),  $0$  (Se elementar),  $+4$  (selenito), e  $+6$  (selenato) (Esquema 11). (CHASTEEN & BENTLEY, 2003).



Esquema 11: Estado de oxidação do selênio (Se)

Selênio (Se) é um micronutriente essencial necessário em pequenas quantidades para o funcionamento normal das funções biológicas, mas é tóxico para os vertebrados em quantidades levemente acima dos níveis requisitados, no entanto o nível tóxico do selênio varia com as espécies (HEINZ et al., 1989; SPALLHOLZ & HOFFMAN, 2002; OHLENDORF, 1996). Os níveis diários recomendados de selênio são de  $70 \mu\text{g Se/dia}$  para homens e  $55 \mu\text{g Se/dia}$  para mulheres, além disso, estudos demonstraram que quantidades de aproximadamente  $200 \mu\text{g Se/ dia}$  não provocam efeitos adversos nos humanos (FOOD AND NUTRITION BOARD, 1989).

As crescentes atividades antropogênicas têm aumentado a liberação e o emprego do selênio de suas fontes naturais (rochas e solos), tornando-o disponível principalmente para o

meio ambiente aquático e conseqüentemente para o homem. A principal via de exposição tanto do homem quanto dos organismos aquáticos ao selênio é através da dieta alimentar. Nos alimentos o selênio está presente em carnes, ovos, peixes, grãos e cereais (SEIXAS & KEHRIG; 2007). Algumas pesquisas mostraram que leveduras enriquecidas com Se e algumas plantas como cebola, alho e chás podem atuar como suplementos orgânicos de Se (IP et al., 1992, WHANGER et al., 2000, DUMONT et al., 2006).

Nas plantas, o Se é incorporado aleatoriamente na sua forma orgânica e encontra-se como análogo de aminoácidos sulfurados, ou seja, selenometionina e selenocisteína. Atualmente 30 selenoproteínas já foram identificadas, das quais 15 foram purificadas a fim de permitir caracterização de sua função biológica (STEEN et al., 2008).

As propriedades farmacológicas do selênio foram evidenciadas a partir da descoberta da presença do elemento selênio, como selenocisteína, no centro ativo de enzimas antioxidantes como a glutathione peroxidase de hidroperóxidos lipídicos (ROTRUCK et al., 1973; NOGUEIRA et al., 2004), a tioredoxina redutase (HOLMGREN, 1985) e a selenoproteína P (URSINI et al., 1990).

O papel biológico do selênio tem recebido considerável atenção há muitos anos e suas funções biológicas estão associadas com a sua atividade antioxidante (BARCELOUX, 1999; BRENNEISEN et al., 2005).

O selênio age como cofator das enzimas da classe da glutathione peroxidase, que são enzimas que agem contra o estresse oxidativo, especificamente a enzima glutathione peroxidase ligada ao átomo de selênio reduz a peroxidação lipídica pela catálise da reação de redução dos peróxidos. Em geral, todas essas enzimas no seu estado reduzido catalisam a quebra de hidroperóxidos e do peróxido de hidrogênio em células humanas (NAVARRO-ALCARON & LOPES-MARTINEZ, 2000; VAN-CAUWENBERG et al., 2004; HARTIKAINEN, 2005; NAVARRO-ALCARON et al., 2005). A glutathione peroxidase e a selenoproteína P também atuam na regulação da resposta inflamatória (VAN CAUWENBERG et al., 2004).

Dentre os compostos orgânicos mais estudados atualmente destacam-se o ebselen e o disseleneto de difenila (PhSe)<sub>2</sub>. O disseleneto de difenila (PhSe)<sub>2</sub> (Fig. 10) é um composto orgânico de selênio que apresenta efeitos antiúlcera (SAVEGNAGO et al., 2006), antiinflamatório, antinociceptivo (NOGUEIRA et al., 2003), hepato-protetor (BORGES et al.,

2006) e antioxidante em alguns modelos experimentais para a avaliação de estresse oxidativo (NOGUEIRA et al., 2004; SANTOS et al., 2005; BORGES et al., 2006; LUCHESE et al., 2007).

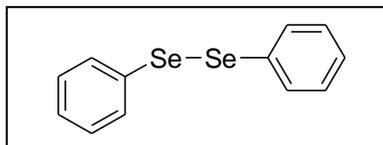


Figura 10: Estrutura química do disseleneto de difenila (PhSe)<sub>2</sub>

O ebselen (2-fenil-1,2-benzisoselenazol-3[2H]-ona) (Fig. 11) é um composto orgânico de selênio que tem sido extensivamente estudado na última década, que possui como interesse principal sua atividade mimética (NOGUEIRA et al., 2002; KLOTZ & SIES, 2003). Este composto reage com grupos tióis, como a glutatona (ULLRICH et al., 1996) e apresenta uma série de propriedades farmacológicas, tal como inibição da peroxidação lipídica e da atividade de lipoxigenase (PARNHAN & GRAF, 1987), bloqueia a produção do ânion superóxido e desempenha um papel protetor contra o peroxinitrito (MASUMOTO & SIES, 1996). Além da atividade antioxidante, o ebselen apresenta propriedades antiinflamatórias, antinociceptiva, neuroprotetora e antiúlcera em vários modelos experimentais *ex vivo* (MAIORINO et al., 1992; NOGUEIRA et al., 2004).

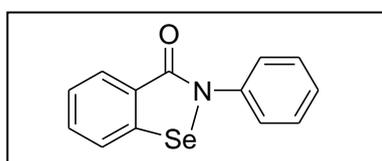


Figura 11: Estrutura química do ebselen

Deidda et al. (1997) estudaram as atividades antibacteriana e antifúngica de novos compostos contendo selênio e enxofre, seleno-azóis e selenotiazóis. Para avaliar a atividade antibacteriana foram utilizadas cepas de duas bactérias: *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*; a atividade antifúngica foi avaliada contra fungo *Candida albicans*. A atividade bacteriana e antifúngica dos compostos contendo selênio foi detectada em alguns casos apenas em concentrações próximas das concentrações consideradas tóxicas para humanos. A Figura 12 mostra a estrutura química dos compostos contendo selênio e enxofre utilizados para as avaliações biológicas.

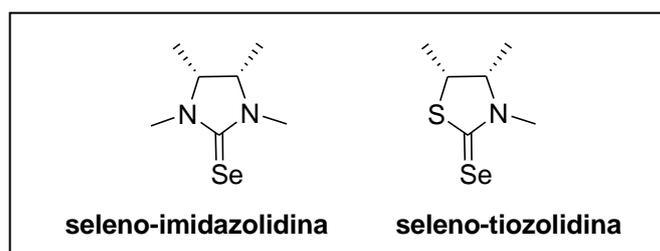
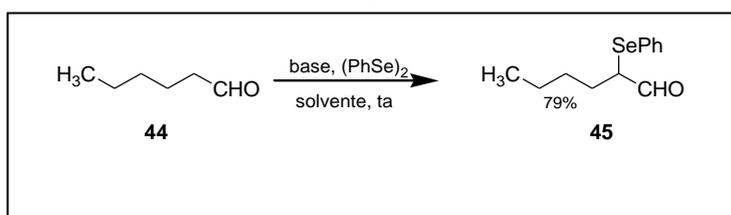


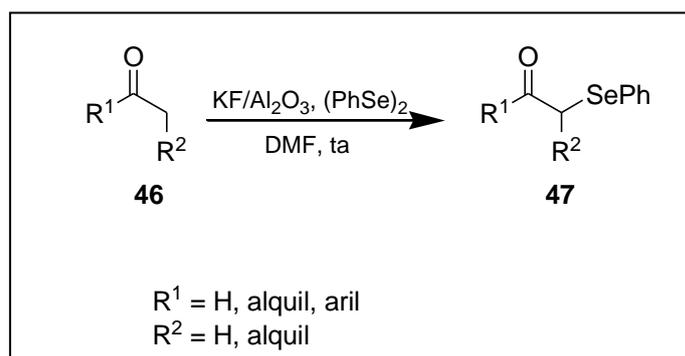
Figura 12: Estrutura química da seleno-imidazolidina e seleno-tiozolidina

O impacto da química dos organosselênios na química orgânica moderna é evidente (BACK, 1999; LIOTTA, 1987). Uma vez que um átomo de selênio é incorporado a um substrato este pode ser removido facilmente via eliminação “syn” do selenóxido ou um rearranjo sigmatrópico do tipo [2,3]. Além disso, a ligação carbono-selênio pode ser substituída por ligações carbono-hidrogênio, carbono-halogênio, carbono-lítio e carbono-carbono. Assim, em geral espécies de organosselênios podem ser introduzidas eficientemente, manipuladas e removidas de várias formas sob condições reacionais amenas (NAZARI & MOVASSAGH, 2009). Além disso, vários estudos relatam o importante papel biológico dos organosselênios em diferentes processos bioquímicos como agente antioxidante, anticancerígeno e antiviral (MUGESH et al., 2001; MALMSTRON et al., 2001; NOGUEIRA et al., 2004).

Nazari & Movassagh (2009) reportaram seus resultados sobre a síntese de  $\alpha$ -fenilselenoaldeídos e  $\alpha$ -fenilselenocetonas catalisada por  $\text{KF}/\text{Al}_2\text{O}_3$ . O aldeído hexanal **44** foi utilizado para otimizar as condições reacionais, como solvente, tempo e temperatura. O Esquema 12 apresenta a reação básica envolvida na síntese, entre o aldeído hexanal **44** e o  $(\text{PhSe})_2$  na presença de uma base e solvente, levando a formação do composto  $\alpha$ -fenilselenohexanal **45**. A melhor condição reacional foi na presença de  $\text{KF}/\text{Al}_2\text{O}_3$  (38% m/m) como base, temperatura ambiente e dimetilformamida (DMF) como solvente. O Esquema 13 apresenta a reação realizada na melhor condição reacional para aldeídos e cetonas.



Esquema 12: Síntese do composto  $\alpha$ -fenilselenohexanal

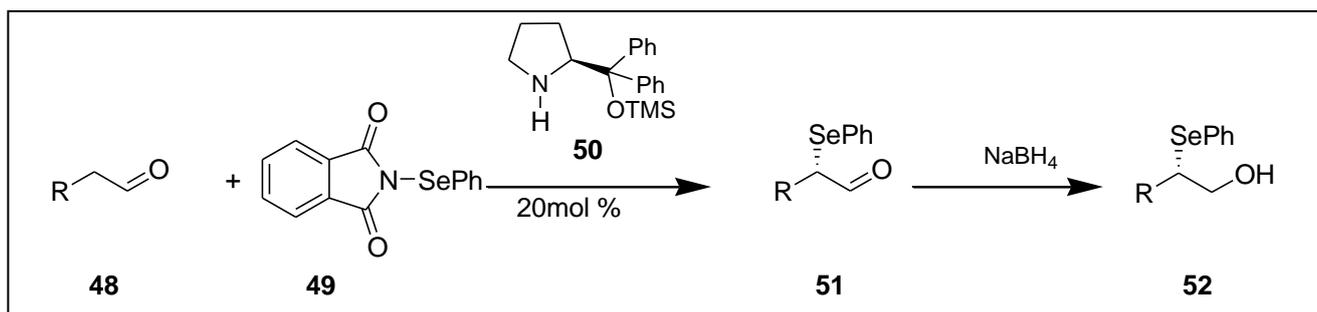


Esquema 13: Síntese dos compostos  $\alpha$ -fenilselenoaldeídos e  $\alpha$ -fenilselenocetonas

$\alpha$ -Fenilselenoaldeídos e cetonas são importantes intermediários na síntese orgânica (LIOTTA, 1987; BACK, 1999), os quais podem ser convertidos nos correspondentes aldeídos ou cetonas  $\alpha,\beta$ -insaturados, através de uma reação de eliminação do ânion selenóxido (SHARPLESS & YOUNG, 1975), formando compostos muito úteis para a química sintética. Além disso, esses compostos podem sofrer uma oxidação e formar álcoois alílicos (LEROUGE & PAULMIER, 1984) e aminas (FITZNER et al., 1985).

Compostos carbonílicos  $\alpha$ -selenilados (REICH, 1979; PAULMIER, 1986; BACK, 1999) possuem uma significativa importância na síntese orgânica devido à facilidade com a qual são convertidos em compostos sinteticamente valiosos como compostos carbonílicos  $\alpha,\beta$ -insaturados (REICH et al., 1973; REICH et al., 1975), arizidinas terminais (BOVIN et al., 2000), éster-  $\alpha$ -hidróxilado (LEROUGE & PAULMIER, 1984), aminas alílicas (SHEA et al., 1986) e  $\alpha$ -aminoácidos (FITZNER et al., 1985).

Sundén et al. (2007) relatou a primeira síntese altamente enantiosseletiva de aldeídos, formando produtos com 63-93% de rendimento com 99% de estereosseletividade. O Esquema 14 apresenta a reação da síntese geral, onde o aldeído **48** e *N*-fenilselenoftalimida **49** foram misturados a 0 °C na presença do catalisador protegido TMS  $\alpha,\alpha$ -difeníl-2-pirrolidinometanol (TMS-DPP) **50**. Após a formação do aldeído **51**, este foi reduzido ao correspondente álcool com NaBH<sub>4</sub>, formando o produto **52**, com 40% de estereosseletividade.

Esquema 14: Síntese do composto  $\alpha$ -fenilselenoálcool

### 3. ARTIGO 1

*KF/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> and PEG-400 as a recyclable medium for the selective  $\alpha$ -selenation of aldehydes and ketones. Preparation of potential antimicrobial agents*

*Tetrahedron Letters*, 2009, v.50, p. 6761-6763

DOI: [10.1016/j.tetlet.2009.09.093](https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2009.09.093)

ISSN: 0040-4039



Pergamon

TETRAHEDRON  
LETTERS

---

---

**KF/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> and PEG-400 as a recyclable medium for the selective  $\alpha$ -selenation of aldehydes and ketones. Preparation of potential antimicrobial agents**

---

---

Francine Novack Victoria, Cátia S. Radatz, Maraisa Sachini, Raquel G. Jacob, Gelson Perin, Wladimir P. da Silva and Eder J. Lenardão\*

*Instituto de Química e Geociências, LASOL, Universidade Federal de Pelotas, UFPel, P.O. Box 354, 96010-900 Pelotas, RS, Brazil*

---

**Abstract**— 2-Phenylseleno aldehydes and ketones were selectively obtained using solid supported catalyst (KF/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) and PEG-400 as clean, recyclable medium in good to excellent yields. The method was applied in the preparation of highly functionalized 2-phenylseleno citronellal and citronellol, potential bactericide agents. The catalytic system KF/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> and PEG-400 can be re-used up 4 times without previous treatment. © 2010 Elsevier Science. All rights reserved

---

<sup>1</sup>The synthesis of  $\alpha$ -phenylseleno aldehydes and ketones has attracted the attention of synthetic organic chemists because they can be converted to very useful compounds, such as  $\alpha$ ,  $\beta$ -unsaturated carbonyl,<sup>1</sup>  $\alpha$ -amino acids,<sup>2</sup>  $\alpha$ -hydroxy esters<sup>3</sup> and allylic amines,<sup>4</sup> aziridines<sup>5</sup> and alcohols.<sup>6</sup> In a general way, the methods to access  $\alpha$ -phenylseleno carbonyl compounds consists in the reaction of an enolate with an electrophilic

organoselenium species or by substitution reactions involving nucleophilic organoselenium.<sup>1</sup> Most of the employed methods use strong bases, such as LDA at -78 °C,<sup>1a,b</sup> or moisture sensitive zirconium, aluminum<sup>7</sup> and selenium-containing tributylstannyl reagents.<sup>8</sup> More recently, the use of secondary amines as organocatalysts for the  $\alpha$ -selenylation was described.<sup>9</sup> In recent years, the use of green recyclable systems in organic syntheses, such as solid-supported catalysts and non-volatile solvents has been growing.<sup>10</sup> In this line, the use of

---

*Keywords:*  $\alpha$ -selenylation; green chemistry; KF/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>; PEG-400; citronellal; citronellol

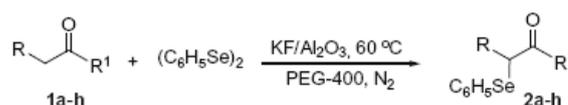
\*Corresponding author: Tel./fax: +55-53-3275-7533; e-mail: lenardao@ufpel.edu.br

potassium fluoride supported on alumina (KF/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) as a green catalytic system for a number of transformations has been increased.<sup>11</sup> By using KF/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, the products can be easily isolated by filtration and the generation of large amounts of salts at the end of the synthesis, as well as the use of stoichiometric strong bases, can be avoided. On the other hand, polyethylene glycol (PEG-400) is a non-toxic, non-volatile and recyclable solvent whose use in organic synthesis have been raised in recent years.<sup>10b</sup> Our major research goal has been the development of new and cleaner protocols for the preparation and synthetic applications of organochalcogenium compounds.<sup>12,13</sup> More recently, we have described several efficient approaches using KF/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> and recyclable solvents.<sup>13</sup>

In continuation to these studies, here we describe the results on the synthesis of  $\alpha$ -phenylseleno aldehydes and ketones, using KF/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> and PEG-400 (Scheme 1, Table 1).<sup>14,15</sup>

Initially, we chose pentanal (**1a**) and diphenyl diselenide as standard starting materials to perform the optimization studies (Table 1). We examined the temperature, amounts of KF/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (40%)

and solvent and the use of N<sub>2</sub> atmosphere. When a mixture of **1a** (1.0 mmol) and (C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>Se)<sub>2</sub> (1.0 mmol) was stirred in presence of 0.32g of KF/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (40%) and PEG-400 (1.0 g) at room temperature under N<sub>2</sub> atmosphere, no product of  $\alpha$ -selenylation was observed after 24 hours (Table 1, entry 1). However, when the same mixture was heated at 60 °C, 2-phenylseleno pentanal **2a** was obtained in 97% yield after stirring for 3 hours (Table 1, entry 2). The atomic efficiency of the reaction was improved using 0.5 mmol of (C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>Se)<sub>2</sub>, giving similar yield of **2a** (Table 1, entry 3). Smaller amounts of the solid supported catalyst give poor yields of **2a** even after longer reaction times (Table 1, entry 4).



### Scheme 1.

Recently, we described the use of glycerin as an efficient recyclable solvent in KF/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> promoted reactions.<sup>12b</sup> Thus, we decide to evaluate this renewable feed-stock as a possible solvent in the  $\alpha$ -selenylation of pentanal. Unfortunately, no reaction took place at room temperature and low yield of **2a** was obtained after long

reaction time at 60 °C (Table 1, entries 5 and 6).

**Table 1.** Optimization of the synthesis of  $\alpha$ -phenylseleno pentanal **2a** according to Scheme 1.<sup>a</sup>

Entry	(C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> Se) <sub>2</sub> (equiv)	KF/Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> 40% (g)	Temp. (°C)	Time (h)	Yield <sup>p</sup> (%)
1	1.0	0.32	r.t.	24	NR <sup>c</sup>
2	1.0	0.32	60	3	97
3	0.5	0.32	60	3	95
4	0.5	0.10	60	3	60
5	0.5	0.32	r.t.	24	NR <sup>c,d</sup>
6	0.5	0.32	60	48	10 <sup>d</sup>

<sup>a</sup> Reaction conditions: pentanal (**1a**, 1.0 mmol); PEG-400 (1.0 g); N<sub>2</sub> atmosphere. <sup>b</sup> The reaction was followed by TLC and GC until complete consume of **1a**. <sup>c</sup> No product was detected by GC. <sup>d</sup> Glycerin (1.0 mL) was used as solvent instead PEG-400.

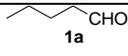
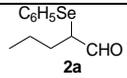
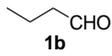
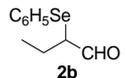
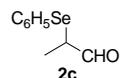
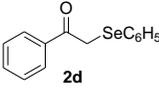
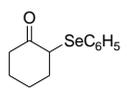
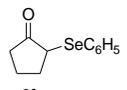
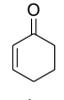
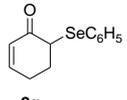
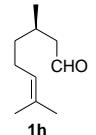
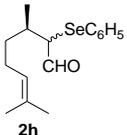
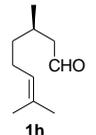
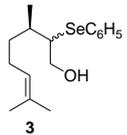
It was also observed that the catalytic system can be re-used for additional 4 cycles, just by washing it with hexanes and drying under vacuum. The product **2a** was obtained in 95, 86, 66, 62 and 59% yields after successive cycles.

Using the optimized conditions, the protocol was extended with good results to other aldehydes and ketones (Table 2, entries 2-8). It was observed that the reaction yields was slightly lower when aliphatic butanal **1b** and propanal **1c** were used as aldehydes, probably due their fast auto-condensation under the reaction conditions (Table 2, entries 2 and 3). We also noted that ketones **1d-g** require a longer reaction time to afford the respective 2-phenylseleno derivatives **2d-g** (Table 2, entries 4-7). Because our interest in the development of new, cleaner synthetic methods using renewable, easily available polyfunctionalized starting materials, we use this new protocol in the  $\alpha$ -selenylation of (*R*)-citronellal **1h**, a chiral natural terpene isolated from citronella oil.<sup>16</sup> In this case, a 1:1 mixture of *syn* and *anti* 2-phenylseleno citronellal **2h** was obtained in 80% yield (Table 2, entry 8).

The method described in Scheme 1 was successfully used in the direct preparation of **2h** starting from the essential oil of citronella (*Cymbopogon nardus* (L) Rendle). The major component of the essential oil of citronella, extracted from the plant grew in southern Brazil (Três Passos-RS), was found to be (+)-*R*-citronellal **1h** (40-51%).<sup>17</sup> 2-Phenylseleno citronellal **2h** was obtained

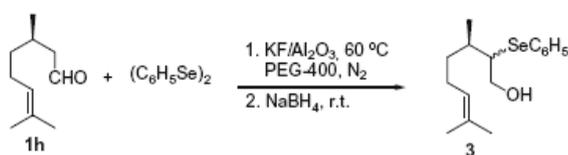
in 71% yield and unreacted geraniol, citronellol, geranyl acetate and others minor constituents of the starting oil were recovered. The protocol was applied in the one pot preparation of 2-phenylseleno citronellol **3** (Scheme 2). Thus, after formation of **2h**, was added 2 equivalents of NaBH<sub>4</sub> and the mixture was stirred at room temperature for additional 2.5 h, affording the alcohol **3** in 73% overall yield (Table 2, entry 9).

**Table 2.** Synthesis of  $\alpha$ -phenylseleno aldehydes and ketones **2a-h**.

Entry	Aldehydes or ketones <b>1</b>	Product <b>2</b>	Time (h)	Yield <sup>a</sup> (%)
1			3	95
2			3	67
3			3	70
4			21	96
5			21	70
6			6	69
7			14.5	81
8			3	80
9			5.5	73

<sup>a</sup> Yields of pure products isolated by column chromatography (hexanes/AcOEt) and

identified by mass spectrometry,  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR.<sup>1,8,9,11b</sup>



### Scheme 2.

2-Phenylseleno citronellal **2h** and 2-phenylseleno citronellol **3** were screened for their antibacterial activity and preliminary studies showed activity against *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* and *Salmonella enteridis*. 2-Phenylseleno citronellal **2h** was the more active against the three tested microorganisms, even compared with the parent citronellal **1h**. The antimicrobial activity presented by **2h** was *L. monocytogenes* > *S. enteridis* > *S. aureus* and for **3** it was *S. aureus* > *S. enteridis* > *L. monocytogenes*.

In conclusion, several 2-phenylseleno aldehydes and ketones, could be prepared using the reusable catalytic system KF/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> and PEG-400. This eco-friendly protocol can be successfully applied to the direct synthesis of bactericide agent 2-phenylseleno citronellal **2h** from crude citronella oil.

### Acknowledgments

This project is funded by CNPq, CAPES and FAPERGS.

### References

- For examples of the synthetic utility of  $\alpha$ -organoselenium carbonyl compounds, see: (a) Reich, H. J.; Reich, I. L.; Renga, J. M. *J. Am. Chem. Soc.* **1973**, *95*, 5813; (b) Sharpless, K. B.; Lauer, R. F.; Teranishi, A. Y. *J. Am. Chem. Soc.* **1973**, *95*, 6137; (c) Wirth, T. (ed.) *Organoselenium Chemistry - Modern Developments in Organic Synthesis*; Topics in Current Chemistry 208, Springer-Verlag: Heidelberg, 2000; (d) Back, T. G. (ed.) *Organoselenium Chemistry: A Practical Approach*; Oxford University Press: New York, 1999; (e) Paulmier, C. *Selenium Reagents and Intermediates in Organic Synthesis*; Pergamon Press: Oxford, 1986; (f) Nicolaou, K. C.; Lister, T.; Denton, R. M.; Montero, A.; Edmonds, D. J. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 4712; (g) Jansen, B. J. M.; Sengers, H. H. W. J. M.; Bos, H. J. T.; de Groot, A. *J. Org. Chem.* **1988**, *53*, 855.
- Fitzner, J. N.; Shea, R. G.; Fankhauser, J. E. Hopkins, P. B. *J. Org. Chem.* **1985**, *50*, 417.

3. Lerough, P.; Paulmier, C. *Tetrahedron Lett.* **1984**, *25*, 1983.
4. Shea, R. G.; Fitzner, J. N.; Fankhauser, J. E.; Spaltenstein, A.; Carpino, P. A.; Peevey, R. M.; Pratt, D. V.; Tenge, B. J.; Hopkins, P. B. *J. Org. Chem.* **1986**, *51*, 5243.
5. Miniejew, C.; Outurquin, F.; Pannecoucke, X. *Tetrahedron* **2005**, *61*, 447.
6. (a) Lerouge, P.; Paulmier, C. *Tetrahedron Lett.* **1984**, *25*, 1983; (b) Lerouge, P.; Paulmier, C. *Tetrahedron Lett.* **1987**, *25*, 1987.
7. Schwartz, J.; Hayasi, Y. *Tetrahedron Lett.* **1980**, *21*, 1497.
8. Nishiyama, Y.; Kawamatsu, H.; Funato, S.; Tokunaga, K.; Sonoda, N. *J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 3599.
9. Wang, J.; Li, H.; Mei, Y.; Lou, B.; Xu, D.; Xie, D.; Guo, H.; Wang, W. *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 5678.
10. (a) Tundo, P.; Perosa, A.; Zecchini, F. (eds.) *Methods and Reagents for Green Chemistry*; John Wiley & Sons: Hoboken, 2007; (b) Nelson, W. M. *Green Solvents for Chemistry – perspectives and practice*; Oxford University Press: New York, 2003.
11. (a) For a review on  $\text{KF}/\text{Al}_2\text{O}_3$  in organic synthesis, see: Blass, B. E. *Tetrahedron* **2002**, *58*, 9301; (b) While this paper was in elaboration, Nazari and Movassagh described the use of  $(\text{C}_6\text{H}_5\text{Se})_2$  (1.0 equiv), DMF as solvent and a larger amount of  $\text{KF}/\text{Al}_2\text{O}_3$  to perform the  $\alpha$ -phenylselenation of aldehydes and ketones: Nazari, M.; Movassagh, B. *Tetrahedron Lett.* **2009**, *50*, 1453.
12. (a) Perin, G.; Lenardão, E. J.; Jacob, R. G.; Panatieri, R. B. *Chem. Rev.* **2009**, *109*, 1277; (b) Lenardão, E. J.; Mendes, S. R.; Ferreira, P. C.; Perin, G.; Silveira, C. C.; Jacob, R. G. *Tetrahedron Lett.* **2006**, *47*, 7439; (c) Perin, G.; Jacob, R. G.; Dutra, L. G.; Azambuja, F.; Santos, G. F. F.; Lenardão, E. J. *Tetrahedron Lett.* **2006**, *47*, 935; (d) Perin, G.; Mendes, S. R.; Silva, M. S.; Lenardão, E. J.; Jacob, R. G.; Santos, P. C. *Synth. Commun.* **2006**, *36*, 2587; (e) Perin, G.; Jacob, R. G.; Azambuja, F.; Botteselle, G. V.; Siqueira, G. M.; Freitag, R. A.; Lenardão, E. J. *Tetrahedron Lett.* **2005**, *46*, 1679.
13. (a) Lenardão, E. J.; Trecha, D. O.; Ferreira, P. C.; Jacob, R. G.; Perin, G. *J. Braz. Chem. Soc.* **2009**, *20*, 93; (b) Lenardão, E. J.; Silva, M. S.; Sachini, M.;

Lara, R. G.; Jacob, R. G.; Perin, G. *ARKIVOC* **2009**, xi, 221; (c) Silveira, C. C.; Mendes, S. R.; Líbero, F. M.; Lenardão, E. J.; Perin, G. *Tetrahedron Lett.* **2009**, 50, 6060.

**14. Preparation of alumina supported potassium fluoride:**<sup>18</sup>

Alumina (6.0g of Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 90, 0.063-0.200 mm, Merck), KF.2H<sub>2</sub>O (5.2g) and water (10 mL) were mixed in a 50 mL beaker and the suspension stirred at 65 °C for 1 h. The resulting solid was dried at 80 °C for 1 h and subsequently 4 h at 300 °C in an oven and finally cooled to room temperature in a desiccator. The content of KF is about 40% (m/m).

**15. General procedure for the synthesis of 2-phenylseleno aldehydes and ketones:**

To a mixture of (*R*)-citronellal (**1h**; 0.154 g; 1.0 mmol), diphenyl diselenide (0.156g; 0.5 mmol) and PEG-400 (1.0 g) under N<sub>2</sub> atmosphere, Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>/KF (0.32 g, obtained as described above) was added at room temperature. Then, the temperature was slowly raised to 60 °C. The reaction progress was followed by TLC, and after 3 h (see Table 2) the product was extracted with hexanes (3 × 5 mL). The solvent was evaporated under reduced pressure and the residue was purified by column chromatography over

silica gel eluting with hexanes, yielding a 1:1 mixture of *syn* and *anti* 2-phenylseleno citronellal **2h** (0.248 g, 80%) as a light yellow oil. MS *m/z* (rel. int.) 310 (M<sup>+</sup>), 156, 135, 83, 69. IR (KBr) □ (C=O) 1708 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H NMR (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 9.38 and 9.36 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H); 7.48-7.55 (m, 2H); 7.20-7.32 (m, 3H); 5.00-5.15 (m, 1H); 3.43-3.53 (m, 1H); 1.23-2.47 (m, 5H); 1.70, 1.67, 1.62 and 1.58 (4s, 6H); 1.17 and 1.07 (2d, *J* = 6.6 Hz, 3H); <sup>13</sup>C NMR (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>) □□□192.8, 192.5, 135.3, 135.2, 132.1, 132.0, 129.3, 129.2, 128.6, 128.5, 127.1, 126.8, 123.7, 123.6, 61.3, 60.5, 35.4, 34.7, 31.6, 31.5, 25.7, 25.6, 25.3, 24.9, 17.9, 17.8, 17.7, 17.6.

16. Lenardão, E. J.; Botteselle, G. V.; Azambuja, F.; Perin, G.; Jacob, R. G. *Tetrahedron* **2007**, 63, 6671.

17. Gherke, I. T. S.; Bourscheid, L. R.; Gobo, A. B. *Resumos da 25ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química*, Poços de Caldas, Brazil, 2002.

18. Wang, S.-X.; Li, J.-T.; Yang, W.-Z.; Li, T.-S.; *Ultrason. Sonochem.* **2002**, 9, 159.

#### **4. ARTIGO 2**

*Antimicrobial activity of 2-phenylseleno citronellal and 2-phenylseleno citronellool against foodborne pathogenic bacteria*

A ser submetido ao periódico *Food Chemistry*

ISSN: 0308-8146

## Antimicrobial activity of $\alpha$ -phenylseleno citronellal and $\alpha$ -phenylseleno citronellool against foodborne pathogenic bacteria

Victoria, F. N.<sup>1</sup>; Radatz, C.<sup>2</sup>; Sachini, M.<sup>2</sup>; Jacob, R. G.<sup>2</sup>; Perin, G.<sup>2</sup>; Silva, W. P.<sup>1</sup>; Lenardão, E. J.<sup>2</sup>.

<sup>1</sup>Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial, Universidade Federal de Pelotas, UFPel, PO Box 354, 96010900 Pelotas, RS, Brasil

<sup>2</sup>Instituto de Química e Geociências, LASOL, Universidade Federal de Pelotas, UFPel, PO Box 354, 96010-900 Pelotas, RS, Brazil

### ABSTRACT

Microbial growth and oxidation reactions occurring on food surface are two of the main causes of deterioration in food products. Plant essential oils are attracting interest for their potential as natural food preservatives as they have Generally Recognised as Safe (GRAS) status and many of them display a wide spectrum of antimicrobial activity, with potential for control of foodborne pathogens and spoilage bacteria. A number of novel pharmaceutical agents, which are selenium-based are under development due to a variety of organoselenium compounds that possess pharmacological activity. The synthesis of 2-phenylseleno citronellal **1** and 2-phenylseleno citronellool **4** was carried out according to the methodology proposal by our research group (Victoria, Radatz, Sachini, Jacob, Perin, Silva, & Lenardão, 2009). The agar diffusion method was employed for screening the antimicrobial activities of the products and the minimum inhibitory concentration was determined by the broth macrodilution method, according to the methods of National Committee of Clinical Laboratory Standards (NCCLS, 2007). The activity of organoselenium compounds derived from (+)-*R*-citronellal were between 0,03mM and 1mM for *Salmonella* Typhimurium. This results showed that the addition of organoselenium increased the antimicrobial activity of (+)-*R*-citronellal against foodborne pathogenic bacteria *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus*, between the tested products 2-phenylseleno citronellal showed the best results.

Keywords: (+)-*R*-citronellal, organoselenium compounds, antimicrobial activity

#### 4.1 Introduction

Plants contain a variety of substances called “phytochemicals” that come from naturally occurring components present in plants. The phytochemical preparations with dual functionalities in preventing lipid oxidation and antimicrobial properties have tremendous potential for extending the shelf life of food products. Although it remains unclear which of the compounds of plants are the active ones, essential oils and phenolics recently have received increasing attention because of some interesting new findings regarding their biological activities, and are widely distributed in edible plants (Bakkali, Averbeck, Averbeck & Idaomar, 2008; Kamel et al., 2007; Archana, Dasgupta, & De, 2005).

Microbial growth and oxidation reactions occurring on food surface are two of the main causes of deterioration and loss of fresh in food products. In order to extend food shelf life, preservatives are widely added to many food at the quantity required to control the degradation phenomena such as growth of natural microflora or oxidation of native vitamins colorants, flavors etc., in amounts regulated by food additive legislation (Guillard, Issoufov, Redl, & Gontard, 2009). Nowadays, the consumer is aware that he may daily ingest non-negligible quantity of preservatives from different food sources which may have with time an impact on his health (Davidson & Juneja, 1990).

Plant essential oils (EOs) are attracting interest for their potential as natural food preservatives as they have Generally Recognized As Safe (GRAS) status and many of them display a wide spectrum of antimicrobial activity, with potential for control of foodborne pathogens and spoilage bacteria (Gutierrez, Rodriguez, Barry-Ryan, & Bourke, 2008). However, if EOs are expected to be widely applied as natural antimicrobials, the organoleptic impact should be considered as the use of naturally derived preservatives can alter the taste of food or exceed acceptable flavor thresholds (Hsieh, Mau, & Huang, 2001; Nazer, Kobilinsky, Tholozana, & Dubois-Brissonneta, 2005).

The increased demand for safe and natural food, without chemical preservatives, provokes many researchers to investigate the antimicrobial effects of natural compounds. Numerous investigations have confirmed the antimicrobial action of essential oils (EOs) in model food systems and in real food (Koutsoumanis, Tassou, Taoukis, & Nychas, 1998; Tsigarida, Skandamis, & Nychas, 2000). In addition, many natural compounds found in dietary plants,

such as extracts of herbs and fruit extracts, possess antimicrobial activities against foodborne pathogenic bacteria (Cowan, 1999; Hao, Brackett, & Doyle, 1998; Kim, Marshall, & Wei, 1995). Several constituents of EO exhibit significant antimicrobial properties when tested separately (Kim et al., 1995; Lambert, Skandamis, Coote, & Nychas, 2001).

A number of novel pharmaceutical agents, which are selenium-based or which target specific aspects of selenium metabolism, are under development due to a variety of organoselenium compounds that possess pharmacological activity (Nogueira, Quinhones, Jung, Zeni, & Rocha 2003; Nogueira, Meotti, Curte, Pilissão, Zeni, & Rocha, 2003; Nogueira, Geni, & Rocha 2004). In fact, organoselenium compounds were found to have antioxidant (Meotti, Stangherlin, Zeni, Nogueira, & Rocha, 2004), anticancer, antiviral, antimicrobial and antiinflammatory properties (Sies, 1993; Nogueira, Quinhones, Jung, Zeni, & Rocha, 2003; Zasso, Gonçalves, Jung, Araldi, Zeni, & Rocha, 2005; Savegnago, Pinto, Jesse, Alves, Rocha, & Nogueira, 2007).

Microbial activity is one of the major causes of the food deterioration and often associated with loss of quality and safety. The concern about food pathogenic bacteria and fungi has increased because the increasing of outbreaks of foodborne illness. With the increasing on number of bacteria that are antibiotic-resistant bacteria there is a considerable interest in the investigation of the antimicrobial effects new compounds. Microbial contamination of food is a major concern for the food industry, regulatory agencies and consumers. An estimated 76 million people contract foodborne illnesses each year in the United States; the estimated costs related to foodborne diseases in the United States is between \$10 billion and \$83 billion annually (USFDA, 2001)

In a previous study we reported the synthesis of new organoselenium compounds derived from the (+)-*R*-citronellal, the major constituent of the essential oil of citronella (*Cymbopogon nardus* (L) Rendle) (Victoria, Radatz, Sachini, Jacob, Perin, Silva, & Lenardão, 2009). The aim of this study is determine the antimicrobial activity of the organoselenium compounds synthesized by our research group, against the food pathogenic bacteria *Listeria monocytogenes* (ATCC 19117), *Staphylococcus aureus* (ATCC 27664) and *Salmonella* Tiphymurium (ATCC 14028).

## 4.2 Material and Methods

### 4.2.1 Oil material and their constituents

Essential oil of citronella (*Cymbopogon nardus* (L) Rendle) was extracted from the plant grown in southern Brazil (Três Passos-RS) and the major component was found to be (+)-*R*-citronellal (40–51%). The (+)-*R*-citronellal was isolated of the essential oil by steam distillation with reduced pressure.

### 4.2.2 Essential oil analysis

#### 4.2.2.1 Gas Chromatography with mass specter (GC-MS) analysis

The identification of the chemical components of the oil was performed by the GC-MS analysis. The oil was dissolved in hexane and the volume of the injected sample was 1.0  $\mu$ l. A Shimadzu GC-MS QP2010 was used for the analysis. The capillary column DB-5 (30 m  $\times$  0.25 mm i.d., film thickness 0.25  $\mu$ m) was used and the temperature was first held a 40  $^{\circ}$ C, and then raised to 250  $^{\circ}$ C (10 min) at rate of 20  $^{\circ}$ C/min. The carrier gas was N<sub>2</sub> at a flow rate of 3 mL/min. The components of the oil were recognized by the comparison of their retention time with that of as mass spectra databases.

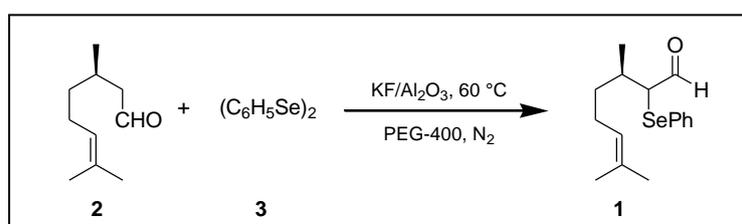
#### 4.2.2.2 Gas chromatography (GC)

GC analyses of the major constituent of the essential oil, (+)-*R*-citronellal, were performed using a Shimadzu GC-2014, 230V series gas chromatograph equipped with a FID and a DB-5 fused silica capillary column (30 m  $\times$  0.25 mm i.d., film thickness 0.25  $\mu$ m). Initial oven temperature was held at 40  $^{\circ}$ C for 3 min, then increased up to 200  $^{\circ}$ C with 20  $^{\circ}$ C/min increments and held at this temperature for 1 min, then remained at 10  $^{\circ}$ C/min to 250  $^{\circ}$ C for 10 min. Injector temperature was set at 280  $^{\circ}$ C. Carrier gas was N<sub>2</sub> (80 KPa) at a flow rate of 1.1 ml/min, sample size, 1.0  $\mu$ l; split ratio, 50:1. Percentage composition of the individuals components were obtained from electronic integration using flame ionization detection (FID) at 280  $^{\circ}$ C.

### 4.2.3 Synthesis of 2-phenylseleno citronellal and 2-phenylseleno citronellool

The synthesis of 2-phenylseleno citronellal **1** was carried out according to the methodology proposal by our research group (Victoria, Radatz, Sachini, Jacob, Perin, Silva, & Lenardão,

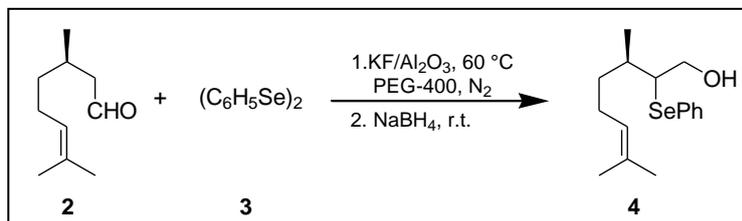
2009), Scheme 1. To a mixture of (R)-citronellal **2**, diphenyl diselenide **3** and PEG-400 under N<sub>2</sub> atmosphere, Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>/KF was added at room temperature. Then, the temperature was slowly raised to 60 °C. The reaction progress was followed by TLC, and after 3 h the product **1** was isolated.



Scheme 1.

#### Synthesis of 2-phenylseleno citronellal **1**

The protocol was applied in the one-pot preparation of 2-phenylseleno citronellol **4**. Thus, after the formation of **1** was added 2 equiv of NaBH<sub>4</sub> and the mixture was stirred at room temperature for additional 2.5 h affording the alcohol **4**, scheme 2.



Scheme 2.

#### Synthesis of 2-phenylseleno citronellol **4**

##### 4.2.4 Bacterial strains

Bacterial strains used in all antimicrobial assays were: *Listeria monocytogenes* (ATCC 19117), *Salmonella* Typhimurium (ATCC 14028), and *Staphylococcus aureus* (ATCC 27664), all strains were obtained from the American Type Culture Collection (Rockville, MD, USA). The bacteria were maintained in soft Tryptic Soy Agar (TSA) at 4 °C.

#### 4.2.5 Antimicrobial assay using a disc diffusion method

The agar diffusion method was employed for screening of the antimicrobial activities of the products. The antimicrobial test was done according to the methods of National Committee of Clinical Laboratory Standards (NCCLS, 2007). Freshly cultures of *S. aureus* and *S. Typhimurium* were inoculated and grown in BHI broth (Brain Heart Infusion) and *L. monocytogenes* on TSB-YE broth (Tryptic Soy Yeast Extract). After 24 h the cultures were standardized to a cell density of  $1,5 \times 10^8$  UFC/mL (McFarland 0,5). Briefly the suspension of the tested microorganism was spread on the MHA (Muller-Hinton Agar). Filter paper discs (6 mm in diameter) were soaked with 25  $\mu$ L of the concentrations of the product tested and allowed to dry and placed on the inoculated plates; the plates were incubated at 37 °C for 24 h. The diameters of the inhibition zones were measured in millimeters. Discs with solvent (DMSO) used for dissolution were used as negative control. The organoselenium compounds were tested in concentrations ranging from 64 mM – 16 mM, the solvent used was DMSO (dimethylsulfoxide). All experiments were performed in triplicate.

#### 4.2.6 Minimum inhibitory concentration assay

The minimum inhibitory concentration was determined by the broth macrodilution method, according to the methods of National Committee of Clinical Laboratory Standards (NCCLS, 2007) with a slight modification. A series of two-fold dilution of each product, ranging from 8 mM – 3,5  $\mu$ M, were prepared in BHI broth (*Staphylococcus aureus* and *Salmonella* Typhimurium) and in TSB-YE broth (*Listeria monocytogenes*). The cultures were adjusted to  $1,5 \times 10^8$  UFC/mL (McFarland) and after diluted to  $5 \times 10^5$  UFC/mL with saline solution (0,85%). A 1 mL of each dilution of the products and of each culture of the bacteria strains were added to test tube agitated and incubated at 37 °C for 24 h. After the time of incubation a 100 $\mu$ L of resazurin solution was added to the tubes and incubated again at 37 °C/ 30 min, positive and negative controls were used. Resazurin is an oxidation-reduction indicator and has been used to assess viability and bacterial contamination and to test antimicrobial activity (Smith & Townsend, 1999). The minimum inhibitory concentration (MIC) of an antimicrobial is defined as its lowest concentration of the product that no demonstrated visible growth in 24 h of incubation.

#### 4.2.7 Statistical Analysis

Statistical analysis was performed using ANOVA, to compare means followed by Tukey testing at  $p < 0,05$  in order to follow changes over time as well as differences between treatments.

### 4.3 Results and Discussion

#### 4.3.1 Chemical Analysis of the essential oil of Citronella

The GC–MS analysis of the essential oil led to the identification of four major components, the components and retention index (RI) are showed in Fig. 1. The major constituents of the essential oil were identified how (+)-*R*-citronellal **2**, (+)-*R*-citronellol **5**, geraniol **6** and limonene **7**. (+)-*R*-citronellal was found to be the major constituent of the essential oil of citronella with 45,4 % of the total composition of the oil. This component was isolated of the essential oil by steam distillation with reduced pressure, and their purity was confirmed by GC.

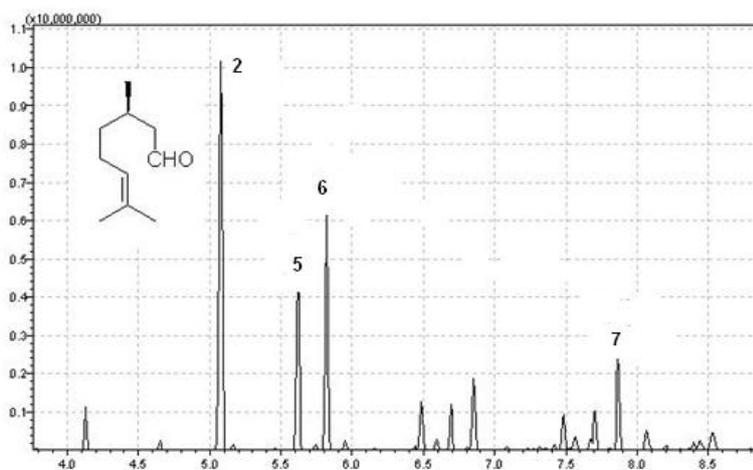


Fig.1 Typical gas chromatograms of citronella oil

#### 4.3.2 Antimicrobial activity

In a first set of experiments, antimicrobial activity was evaluated by the disc diffusion method. The *in vitro* antimicrobial activities of compounds **1** e **4** were compared with **2** e **5** and the chemical structure of the tested compounds are showed in Fig. 2. The assays against *L. monocytogenes*, *S. aureus* and *S. Tiphymurium* were qualitatively and quantitatively assessed

by the presence or absence of inhibition zones (zone diameters) and MIC. The results of the antimicrobial activity and of the minimum inhibitory concentration are given in Table 1 and 2, respectively.

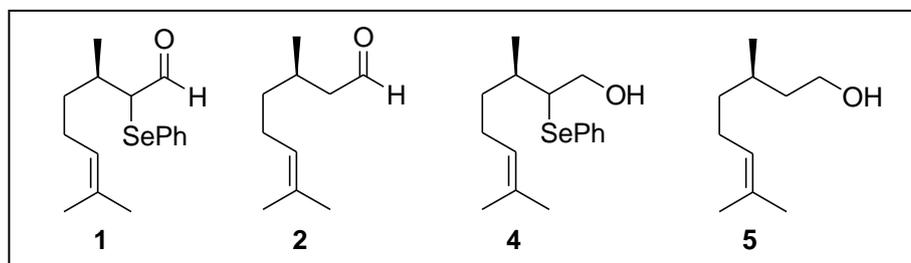


Fig. 2 Chemical structure of 2-phenylseleno citronellal **1**, (+)-*R*-citronellal **2**, 2-phenylseleno citronellol **4** and (+)-*R*-citronellol **5**

Table 1.

Antimicrobial activity of 2-phenylseleno citronellal **1**, 2-phenylseleno citronellool **4**, (+)-*R*-citronellal **2** and (+)-*R*-citronellool **5**.

	Inhibition zone* (mm)								
	<i>L. monocytogenes</i>			<i>S. aureus</i>			<i>S. Typhimurium</i>		
	64mM	32mM	16Mm	64mM	32mM	16mM	64mM	32mM	16mM
<b>1</b>	18 a, A	16,7 b, D	14,8 c, F	17 d, I	14,7 e, L	12,8f, N	16 g, P	14,3 g, h, R	14 h, U
<b>4</b>	11 h, B	9,7 h, E	8,7 h, G	11,3 i, J	10 i, M	9,3 i, O	13 j, Q	11 j, R	10 j, V
<b>2</b>	13,3 l, C	12,7 l, D, E	10,3 l, G, H	13,0 m, J	11,7 n, L, M	8,3 o, O	13 p, P, Q	12,7 q, R, S	10 p, U, V
<b>5</b>	17,7 r, A	16,3 r, D	11 s, F, H	15,3 t, I, J	15,0 t, L	8,3 u, O	13,7 v, P, Q	7,7 x, T	7,0 x, U

\* Results are the mean of three repetitions.

\*\*Means follow by different small letters in horizontal are significantly different ( $p < 0,05$ ) for each bacteria between the concentrations.

\*\*\*Means follow by different capital-letter in vertical are significantly different ( $p < 0,05$ ) for each concentration between the products.

Table 2.

Minimum inhibitory concentration (MIC) of 2-phenylseleno citronellal **1**, 2-phenylseleno citronellol **4**, (+)-*R*-citronellal **2** and (+)-*R*-citronellol **5**.

	MIC values (mM)**		
	<i>L.monocytogenes</i>	<i>S.aureus</i>	<i>S.Typhimurium</i>
	(5x10 <sup>5</sup> UFC/mL)	(5x10 <sup>5</sup> UFC/mL)	(5x10 <sup>5</sup> UFC/mL)
<b>1</b>	0,12 a, A	0,5 b, E	0,03 c, I
<b>4</b>	8 d, B	1 e, F	1 e, J
<b>2</b>	>8 f, C	>8 f, G	4 g, L
<b>5</b>	2 h, D	4 i, H	8 j, M

\*\* Results are the mean of two repetitions

\*\*Means follow by different small letters in horizontal are significantly different ( $p < 0,05$ ) for each bacteria between the concentrations.

\*\*\*Means follow by different capital-letter in vertical are significantly different ( $p < 0,05$ ) for each concentration between the products.

As shown in Table 1, the antimicrobial activity of 2-phenylseleno citronellal **1** was the higher, but statistically the effect of **1** wasn't different of (+)-*R*-citronellol against the Gram-positive bacteria *L. monocytogenes* and *S. aureus* and the Gram-negative *S. Typhimurium*, in almost all concentrations, the both products were statistically different of 2-phenylseleno citronelol **4** and (+)-*R*-citronelal **2** ( $p < 0,05$ ). When we compared the function aldehydes and alcohols its possible concludes by the statistics data that in Gram-positive and negative bacteria the effect of this functions wasn't different in almost all concentrations for *S. aureus* and *S. Typhimurium*. According to Morton (1983) alcohols and aldehydes with long chain were particularly active against Gram-positive bacteria, and the antimicrobial activity of alcohols is known to increase with molecular weight. But in our works this doesn't happened because in product **4**, adding of organoselenium compound the antibacterial activity of **5** has decreased for *L. monocytogenes* and *S. aureus* (Gram-positve) and increased for *S. Typhimurium* (Gram negative). According to the literature the mechanism of action of alcohols and aldehydes without modification is different, alcohols acting on protein denaturation and disruption of membranes and can thus

dissolve various lipids in the cytoplasm, aldehydes inactivating proteins to form covalent cross-linking with various organic functional groups (-NH<sub>2</sub>, -OH, -COOH and -SH) (Tortora, Funke, Case, 2008).

Comparing the sensitivity of the bacterial strains to the chemical modification of the aldehyde **2** with the functionalized selenium aldehyde **1**, there is significantly difference between then in *L. monocytogenes* and *S. aureus* (Gram-positives bacteria). In fact the addition of diphenyl diselenide to (+)-*R*-citronelal increased the antimicrobial activity of this compound against Gram-positives and Gram-negative bacteria. Some studies suggesting that Gram-positive bacteria have been found to be more sensitive to essential oils and their constituents than Gram-negative bacteria, which, it has been suggested, may be due to the relatively impermeable outer membrane that surrounds Gram-negative bacteria (Smith-Palmer, Stuart, & Fyfe, 1998). Although this explanation has been generally well accepted (Delaquis, Stanich, Girardi, & Mazza, 2002; Burt 2004), there have also been studies that suggest there is only a time delay in the growth of Gram-negative bacteria, but our results do not comprove this fact because the Gram-negative bacteria *Salmonella* Typhimurium was more sensitive to inhibition by the (+)-(*R*)-citronellal and by the (+)-(*R*)-citronellal modified by the addition of organoselenium that the Gram-positive bacteria *L. monocytogenes* and *S. aureus*.

The high antimicrobial activity of the 2- phenylseleno citronellal **1** was confirmed by the minimum inhibitory concentration assay (table 2), exhibiting minimal inhibitory concentration values of 0,12mM (*L. monocytogenes*), 0,5mM (*S. aureus*) and 0,03mM (*S. Typhimurium*). In little concentrations the product **1** was stronger against Gram-negative bacteria, *S. Typhimurium*. According to the statistics data **1** was different of all other products tested ( $p < 0, 05$ ), and the action of **1** was different for each bacteria tested. The MIC assay has to led saw the advantages of addition of organoselenium group at (+)-*R*-citronelal. The biological effects of selenium including antioxidant, antiinflammatory and antiviral activities, however, little information exists about the antimicrobial activity of selenium compound. More studies about the action of product **1** against other foodborne bacteria, antioxidant activity and toxicity will be done.

In summary, this study has demonstrated the antibacterial activity of organoselenium compounds derived form (+)-*R*-citronelal and showed that the addition of organoselenium

increased the antimicrobial activity of (+)-*R*-citronelal against foodborne pathogenic bacteria *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* and *Salmonella* Typhimurium.

#### 4.4 Acknowledgments

This project is funded by CNPq, CAPES and FAPERGS

#### 4.5 References

- Archana, B., Dasgupta, N., De, B., (2005). *In vitro* study of antioxidant activity of *Syzygium cumini* fruit. *Food Chem.* 90, 727–733.
- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., & Idaomar, M., (2008). *Biological effects of essential oils: a review.* *Food Chem. Toxicol.* 46, 446–475.
- Burt, S. (2004). *Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in food – a review.* *Int. J. Food Microbiol.*, 94, 223–253.
- Cowan, M. M. (1999). *Plant products as antimicrobial agents.* *Clinical Microbiology Reviews*, 12, 564–582.
- Davidson, P.M., & Juneja, V. K. (1990). *Antimicrobial agents.* In A. L. Branen, P.M. Davidson, & S. Salminen (Eds.), *Food Additives*, 83–137. New York: Marcel Dekker.
- Delaquis, P. J., K. Stanich, B. Girard, & G. Mazza. (2002). *Antimicrobial activity of individual and mixed fractions of dill, cilantro, coriander and eucalyptus essential oils.* *Int. J. Food Microbiol.* 74, 101-109.
- Guillard, V., Issoufov, V., Redl, A., & Gontard, N. (2009). *Food preservative content reduction by controlling sorbic acid release from a superficial coating.* *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 10, 108-115.
- Gutierrez, J., Rodriguez, G., Barry-Ryan, C., & Bourke, P. (2008). *Efficacy of plant essential oils against food-borne pathogens and spoilage bacteria associated with ready to eat vegetables: Antimicrobial and sensory screening.* *Journal of Food Protection*, 71, 1846–1854.

Hao, Y. Y., Brackett, R. E., & Doyle, M. P. (1998). *Inhibition of Listeria monocytogenes and Aeromonas hydrophila by plant extracts in refrigerated cooked beef. Journal of Food Protection, 61*, 307–312.

Hsieh, P-C., Mau, J-L., & Huang, S-H. (2001). *Antimicrobial effect of various combinations of plant extracts. Food Microbiology, 18*, 35–43.

Kamel, C., Hafedh, H., Tarek, Z., Amel, B.K.N., Mahmoud, R., Kacem, M., Amina, B., 2007. *The chemical composition and Biological activity of Clove essential oil, Eugenia caryophyllata (Syzigium aromaticum L Myrtaceae): a short Review. Phytother. Res. 21*, 501–506.

Kim, J. M., Marshall, M. R., & Wei, C. (1995). *Antibacterial activity of some essential oil components against five foodborne pathogens. Journal of Agriculture Food Chemistry, 43*, 2839–2845.

Koutsoumanis, K., Tassou, C. C., Taoukis, P. S., & Nychas, G.-J. E. (1998). *Modelling the effectiveness of a natural antimicrobial on Salmonella enteritidis as a function of concentration, temperature and pH, using conductance measurements. Journal of Applied Microbiology, 84*, 981–987.

Lambert, R. J. W., Skandamis, P. N., Coote, P. J., & Nychas, G.-J. E. (2001). *A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. Journal of Applied Microbiology, 91*, 453–462.

Meotti, F.C., Stangherlin, E., Zeni, G., Nogueira, C.W., & Rocha, J.B.T. (2004) *Protective role of aryl and alkyl diselenide on lipid peroxidation. Environ Res 94*, 276–282.

Morton, H.E., (1983). *Alcohols*. In: Block, S.S. (Ed.), *Disinfection, Sterilization and Preservation*. Lea and Febiger, Philadelphia, pp. 225– 239.

Nazer, A. I., Kobilinsky, A., Tholozana, J. -L., & Dubois-Brissonneta, F. (2005). *Combinations of food antimicrobials at low levels to inhibit the growth of Salmonella sv. Typhimurium: a synergistic effect? Food Microbiology, 22*, 391–398.

National Committee of Clinical Laboratory Standards - *Antimicrobial Disk Susceptibility Test. Approved Standart – 8<sup>th</sup> ed. Document M2-A8, 23, 1, 2003.*

Nogueira, C. W., Meotti, F. C., Curte, E., Pilissão, C., Zeni, G., Rocha, J. B. T. (2003). *Investigations into the potential neurotoxicity induced by diselenides in mice and rats. Toxicology 183*, 29–37.

Nogueira, C. W., Quinhones, E. B., Jung, E. A. C., Zeni, G., Rocha, J.B.T. (2003). *Antiinflammatory and antinociceptive activity of diphenyl diselenide. Inflamm 52*, 56–63.

Nogueira, C.W., Zeni, G., Rocha, J.B.T. (2004) *Organoselenium and organotellurium compounds: pharmacology and toxicology. Chem Rev 104*, 6255–86.

Savegnago, L., Pinto, L. G., Jesse, C. R., Alves, D., Rocha, J. B. T., Nogueira, C. W.,(2007). *Antinociceptive properties of diphenyl diselenide: evidences for the mechanism of action. Eur J Pharmacol 555*, 129–138.

Sies, H. (1993). *Ebselen, a selenoorganic compounds as glutathione peroxidase mimic. Free Radic Biol Med 14*, 313–323.

Smith, C. F., and D. E. Townsend. (1999). *A new medium for determining the total plate count in food. J. Food Prot. 62*, 1404–1410.

Tsigarida, E., Skandamis, P., & Nychas, G.-J. E. (2000). *Behaviour of L. monocytogenes and autochthonous fora on meat stored under aerobic, vacuum and modified atmosphere packaging conditions with or without the presence of oregano essential oil at 5 °C. Journal of Applied Microbiology, 89*, 901–909.

Tortora, G. J., Case, C. L., & Funke, B. R. (2005). *Microbiology*. 8<sup>th</sup> edition, Ed. Artmed, São Paulo.

United State Food and Drug Administration (USFDA) (2001). 2001 Food Code. *Food and Drug Administration*, Washington, DC.

Victoria, F. N., Radatz, C., Sachini, M., Jacob, R. G., Perin, G., Silva, W. P., Lenardão, E. J. (2009) *KF/Al2O3 and PEG-400 as a recyclable medium for the selective a-selenation of aldehydes and ketones. Preparation of potential antimicrobial agents, Tetrahedron Lett., 50*, 6761–6763

Zasso, F. Bb, Gonçalves, C. E. P., Jung, E. A. C., Araldi, D., Zeni, G., Rocha, J. B.T. (2005). *On the mechanisms involved in antinociception induced by diphenyl diselenide*. *Environ Toxicol Phamacol* 19, 283–289.

## 5. Conclusões Gerais e Perspectivas

Foi possível sintetizar vários compostos organosselênio a partir de aldeídos e cetonas, incluindo o aldeído (+)-*R*-citronelal, principal componente do óleo essencial de citronela, uma fonte renovável. Foi utilizada uma nova metodologia mais limpa, empregando o meio reciclável PEG e  $\text{KF/Al}_2\text{O}_3$ , com bons rendimentos.

Os compostos sintetizados apresentaram atividade antimicrobiana contra *L. monocytogenes*, *S. aureus* e *S. Typhimurium*, porém o composto 2-fenilselenocitronelal mostrou melhores resultados como agente antimicrobiano contra bactérias patogênicas em alimentos. Estudos sobre a atividade *in vivo*, toxicidade e testes sensoriais, serão realizados visando a utilização industrial dos produtos como agentes antimicrobianos.

## 6. Referências

ABRAHÃO, P. R. S. **Ocorrência de *Listeria monocytogenes* e de outros microrganismos em gelados comestíveis fabricados e comercializados na região metropolitana de Curitiba, Paraná.** 2005. 123f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia, Parasitologia e Patologia) – Departamento de Patologia básica, Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

ANWAR, F.; et al. Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of basil (*Ocimum basilicum*) essential oils depends on seasonal variations. **Food Chemistry**, v. 108, p. 968-995. 2008.

AKGUL, A. & KIVANC, M.; Sensitivity of four foodborne moulds to essential oils from Turkish spices, herbs and citrus peel. **J. Sci. Food Agric.**, v. 47, p.129-132, 1989.

ALCARADZ, L.E., BLANCO, S.E., PUIG, O.N., TOMADS, F., FERRETTI, F.H.,. Antibacterial activity of flavonoids against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. **J. Theor. Biol.**, v. 205, p. 231–240, 2000.

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

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

ANASTAS, P., FARRIS, C., **Benign by Design: Alternative Synthetic Design for Pollution Prevention**; American Chemical Society; Washington, DC, 1994.

ANTHONY, Y. H. W.; MARY, M. Y. W.; KWAN, H. S.; MELANIE, C. Y. C.; CHANA, C. F.; CHRISTOPHER, H. K. C. Inhibition of ATPases by *Cleistocalyx operculatus*. A possible mechanism for the cardio tonic actions of the herb. **Vasc. Pharm**, v. 38, p. 163-168, 2002.

ARCHANA, B.; DASGPUTA, N.; DE, B.; In vitro study of antioxidant activity of *Syzygium cumini* fruit. **Food Chemistry**, v. 90, p. 727 – 733, 2005.

AZZOUZ, M.A. & BULLERMAN, L.B.; Comparative antimycotic effects of selected herbs, spices, plant components and commercial antifungal agents. **J. Food Protect.**, v. 15, p. 1298-1301, 1982.

BACK, T. G. **Organoselenium Chemistry: A Practical Approach**; Oxford, UK: Oxford University Press, 1999.

BAIRD-PARKER, A .C. Foods and microbiological risks. **Microbiology**, v. 140, p. 687 – 695, 1994.

BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils: a review. **Food Chem, Toxicol.**, v. 46, p. 446 – 475, 2008.

BANTHORPE, D. V.; CHARLWOOD, B. V.; FRANCIS, M. J. O. Biosynthesis of monoterpenes. **Chem. Rev.**, v. 72, p. 115, 1972.

BARCELOUX, D.G. Selenium. **J. Toxicol. Clin. Toxicol.**, v. 37, p. 145–172, 1999.

BECKERS, H. J. Incidence of foodborne diseases in Netherlands: annual summary, 1982 and an overview from 1979 to 1982. **J. Food Prot.**, v.51, p.327-333, 1988.

BELICCHI-FERRARI, M.; BISCEGLIE, F.; BUSCHINI, A.; FRANZONI, S.; PELOSI, G.; PINELLI, S.; TARASCONI, P.; TAVONE, M.; Synthesis, structural characterization and antiproliferative and toxic bio-activities of copper (II) and nickel (II) citronellal N-ethylmorpholine thiosemicarbazones, **J. Inorg. Bioc.**, v. 104, p. 199-206, 2010.

BHATTACHARYA, J.; GOLDMAN, D.; McCAFFREY, D.; Estimating probit models with self-selected treatments. **Statistics in Medicine**, v. 25, p. 389 – 413, 2005.

BOVIN, S.; OUTURQUIN, F.; PAULMIER, C. Stereospecific synthesis of 2,3-disubstituted aziridines from  $\beta$ -alkylamino phenylselenides. **Tetrahedron Lett.**, v. 41, p. 663 - 666, 2000.

BORGES, L. P., NOGUEIRA, C. W., PANATIERI, R. B., ROCHA, J. B. e ZENI, G. Acute liver damage induced by 2-nitropropane in rats: effect of diphenyl diselenide on antioxidant defenses. **Chem Biol Interact**, v. 160, p. 99-107, 2006.

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

BRENNEISEN, P., STEINBRENNER, H., SIES, H. Selenium, oxidative stress, and health aspects. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 26, p. 256–267, 2005.

BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in food – a review. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 94, p. 223–253, 2004.

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

CHASTEEN, T. G.; BENTLEY, R. Biomethylation of selenium and tellurium: microorganisms and plants. **Chem. Rev.**, v. 103, p. 1–25, 2003.

COMASSETO, J. V. Vinylic Selenides. **J. Org. Chem.**, v. 253, p.131-181 1983.

COSENTINO, S.; TUBEROSO, C. I. G.; PISANO, B.; SATTA, M.; MASCIA, V.; ARZEDI, E.; PALMAS, F.; **Lett. Appl. Microbiol.**, v. 29, p. 130-135, 1999.

CRAVEIRO, A. A. **Óleo essenciais de plantas do nordeste**. Fortaleza: Universidade Federal do Ceará, p. 210, 1981.

DEANS, S.G. & RITCHIE, G.; Antibacterial properties of plant essential oils. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 5, p. 165-180, 1987.

DEIDDA, D.; LAMPIS, G.; MAULLU, C.; POMPEI, R.; ISAIA, F.; LIPPOLIS, V.; VERANI, G.; Antifungal, antibacterial, antiviral and cytotoxic activity of novel thio- and seleno-azoles; **Pharmacological Research**, v. 36, p. 193-197, 1997.

DEVITO, S. C.; GARRET, R. L., **Design Safer Chemicals: Green Chemistry for Pollution Prevention**. American Chemical Society, Washington: ACS Symp., 1996.

DUMONT, E., VANHAECKE, F., CORNELIS, R. Selenium speciation from food source to metabolites: A critical review. **Anal. Bioanal. Chem.**, v. 385, p. 1304–1323, 2006.

EDWARDS, K. J., KAUFMANN, M. E., SAUNDERS, N. A. Rapid an accurate identification of coagulase-negative staphylococci by realtime PCR. **J. Clin. Microbiol.**, v. 39, p. 3047–3051, 2001.

FARBER, J. M.; PETERKIN, P.I. *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. **Microbiol. Rev.**, v. 53, p. 476 –511, 1991.

FATIMAH, I.; Zirconium Dioxide Dispersed in SiO<sub>2</sub>-Montmorillonite: Heterogeneous Catalyst For Citronellal Conversion To Isopulegol. **J. Appl. Sci. Res.**, v. 5, p. 1277-1284, 2009.

FISHER, K.; ROWE, C.; PHILIPS, C. A. The survival of three strains of *Arcobacter butzleri* in the presence of lemon, orange and bergamot essential oils and their components in vitro and on food. **Lett. Appl. Microbiol.**, v. 44, p. 495 – 499, 2006.

FITZNER, J. N.; SHEA, R. G.; FANKHAUSER, J. E.; HOPKINS, P. B. Asymmetric Carbon to Nitrogen Bond Formation Using Optically Active Allylic Selenides: A New General Method for the Synthesis of N-Protected Optically Active  $\alpha$ -Amino Acids. **J. Org. Chem.**, v. 50, p. 417 - 418, 1985.

**FOOD AND NUTRITIONAL BOARD.** National Research Council. Recommended Dietary Allowance. 10th ed, Washington, DC: National Academy Press, 1989.

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

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia de Alimentos**, São Paulo: Ed. Atheneu, 1996.

FRIEDMAN, M., HENIKA, P. R., LEVIN, C. E., & MANDRELL, R. E. Antibacterial activities of plant essential oils and their components against *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella enterica* in apple juice. **J. Agric. Food Chem.**, v. 52, p. 6042–6048, 2004.

GBOLADE, A. A.; LOCKWOOD, G. B. J. Metabolic studies of volatile constituents in tissue cultures of *Petroselinum crispum* (Mill) Nyman Z. Naturforsch. **Plant Physiol.**, v. 136, p. 198, 1990.

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

GUTIERREZ, J., BARRY-RYAN, C., & BOURKE, P. The anti-microbial efficacy of plant essential oil combinations and interactions with food ingredients. **International J. Food Microbiol.**, v. 124, p. 91–97, 2008.

HAMMER, K.A., CARSON, C.F.; JILEY, T.V.; Antimicrobial activity of essential oil and other plants extracts. **J. Appl. Microbiol.**, v. 86, p. 985-990, 1999.

HAO, Y.Y; BRACKET, R.E.; DOYLE, M.P. Efficacy of plant extracts in inhibiting *Aeromonas hydrophila* and *Listeria monocytogenes* in refrigerated cooked poultry. **Food Microbiol.**, v. 15, p. 367-378, 1998.

HARTIKAINEN H. Biogeochemistry of selenium and its impact on food chain quality and human health. **J. Trace Elem. Med. Biol.**, v. 18, p. 309–318, 2005.

HEINZ, G.H., PENDLETON, G.W., KRYNITSKY, A.J., GOLD, L.G.. Selenium accumulation and elimination in mallards. **Arc. Env. Cont. Toxicol.**, v. 19, p. 374-379, 1990.

HOLMGREN, A. Thioredoxin. **Ann. Rev. Biochem.**, v. 54, p. 237-271, 1985.

HORVÁTH, I. T., JOÓ, F., **Aqueous Organometallic Chemistry and Catalysis**, Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1995.

HSIESH, P-C., MAU, J-L., & HUANG, S-H. Antimicrobial effect of various combinations of plant extracts. **Food Microbiol.**, v. 18, p. 35–43, 2001.

IP, C., LISK, D. J., STOEWSAND, G. S. Mammary cancer prevention b regular garlic and selenium-enriched garlic. **Nutr. Cancer**, v. 17, p. 279–286, 1992.

JABLONSKI, L. M.; BOHACH, G. A.; **Food Microbiology: Fundamental e Frontiers**, 2<sup>o</sup> ed, Washington DC: ASM Press, 2001.

JAY, J. M., LOESSNER, M. J., & GOLDEN, D. A. **Modern food microbiology**, 7<sup>th</sup> ed. New York, NY: Springer. p. 545 – 634, 2005.

JACOB, R.G.; PERIN, G.; LOI, L.N.; PINNO, C.S.; LENARDAO, E.J.; Green synthesis of (-)-isopulegol from (+)-citronellal: application to essential oil of citronella, **Tetrahedron Lett.**, v. 44, p. 3605-3608, 2003.

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

JOGLEKAR, S. S. & DHAVLIKAR, R. S. Microbial Transformation of Terpenoids. **Appl. Microbiol.**, v. 18, p. 1084 - 1087, 1969.

KAMEL, C.; HAFEDH, H.; TAREK, Z.; AMEL, B. K. N.; MAHMOUD, R.; KACEM, M.; AMINA, B.; The chemical composition and Biological activity of Clove essential oil, *Eugenia caryophyllata* (*Syzygium aromaticum* L Myrtaceae): a short Review. **Phytother. Res.**, v. 21, p. 501–506, 2007.

KLOTZ, L. O. e SIES, H. Defenses against peroxynitrite: selenocompounds and flavonoids. **Toxicol. Lett.**, v. 140, p. 125-132, 2003.

LANGE, C.; CARDOSO, M.; SENCZEK, D.; SCHWARZ, S. Molecular subtyping of *Staphylococcus aureus* isolates from cases of bovine mastitis in Brazil. **Vet. Microbiol.**, v. 67, p. 127-141, 1999.

LASCHAT, S.; LAUTERWEIN, J. Intramolecular hetero-Diels-Alder reaction of N-arylimines. Applications to the synthesis of octahydroacridine derivatives. **J. Org. Chem.**, v. 58, p. 2856, 1993.

LASCHAT, S.; NOE, R.; RIEDEL, M. Novel (imino- $\eta^6$ -arene)chromium complexes and their diastereoselective intramolecular hetero-Diels-Alder reactions. **Organometallics**, v. 12, p. 3738 - 3742, 1993.

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-thioorganylcitronellals, potential antimicrobial agents. **Tetrahedron Lett.**, v. 48, p. 6763 – 6766, 2007.

LENARDÃO, E. J.; FREITAG, R. A., DABDOUB, M. J., BATISTA, A. C. F., & SILVEIRA, C. C. “Green Chemistry” – os 12 princípios da química verde e sua inserção nas atividades de ensino e pesquisa, **Quim. Nova**, v. 26, p. 123-129, 2003.

LENARDÃO, E. J.; MENDES, S.R.; FERREIRA, P.C.; PERIN, G.; SILVEIRA, C.C., JACOB, R.G.; Selenium- and tellurium-based ionic liquids and their use in the synthesis of octahydroacridines; **Tetrahedron Lett.**, 47, 7439-7442, 2006.

LENARDÃO, E. J.;BOTTESELLE, G. V.; AZAMBUJA, F.; PERIN, G.; JACOB, R. G. Citronellal as key compound in organic synthesis. **Tetrahedron**, v. 63, p. 6671, 6712, 2007.

LEROUGE, P.; PAULMIER, C. Synthèse D'α-hydroxyallenes α-fonctionnalisés partir D'α-phenylselenoenals. **Tetrahedron Lett.**, v. 25, p. 1987 - 1990, 1984.

LI, C. J. Organic reactions in aqueous media - with a focus on carbon-carbon bond formation. **Chem. Rev.**, v. 93, p. 2023 - 2025, 1993.

LIOTTA, D. **Organoselenium Chemistry**; Wiley: New York, 1987;

LIU, Z.; ERHAN, S. Z.; AKIN, D. E.; BARTON, F. E. "Green" Composites from Renewable Resources: Preparation of Epoxidized Soybean Oil and Flax Fiber Composites. **J. Agric. Food Chem.**, v. 54, p.2134 - 2137, 2006.

LOGUERCIO, A. P., BATTISTIN, A., VARGAS, A. C., HENZEL, A., WITT, N. M. Atividade antibacteriana de extrato hidro alcoólico de folhas de jambolão (*Syzygium cumini* (L) Skells). **Ciência Rural**, v. 35, p. 371-376, 2005.

LUCHESE, C., STANGHERLIN, E. C., ARDAIS, A. P., NOGUEIRA, C. W. e SANTOS, F. W. Diphenyl diselenide prevents oxidative damage induced by cigarette smoke exposure in lung of rat pups. **Toxicology**, v. 230, p. 189-196, 2007.

MABBERLEY, D.J. **The Plant Book**, Cambridge, UK: Cambridge University Press, 1997.

MAHALWAL, V. S.; ALI, M. Volatile constituents of *Cymbopogon nardus* (Linn.) Rendle. **Flavor and Fragrance Journal**, v.18, p.73-76, 2002.

MAIORINO, M., ROVERI, A. e URSINI, F. Antioxidant effect of Ebselen (PZ 51): peroxidase mimetic activity on phospholipid and cholesterol hydroperoxides vs free radical scavenger activity. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 295, p. 404-409, 1992.

MAJHENIC, L., SKERGET, M., KNEZ, Z. Antioxidant and antimicrobial activity of guarana seed extracts. **Food Chem.**, v. 104, p. 1258–1268, 2007.

MALMSTRÖM, J.; JONSSON, M.; COTGREAVE, I. A.; HAMMARSTROM, L.; SJODIN, M.; ENGMAN, L. The Antioxidant Profile of 2,3-Dihydrobenzo[*b*]furan-5-ol and Its 1-Thio, 1-Seleno, and 1-Telluro Analogues **J. Am. Chem. Soc.**, v. 123, p. 3434 - 3440, 2001.

MARTÍNEZ-FLORES, S.; GONZÁLES-GALLEGO, J.; CULEBRAS, J. M. **Nutrición Hospitalaria**, v. 17, p. 271-278, 2002.

MASUMOTO, H. & SIES, H. The reaction of ebselen with peroxyxynitrite. **Chem. Res. Toxicol.**, v. 9, p. 262-267, 1996.

MATA, A. T.; PROENÇA, C.; FERREIRA, A. R.; SERRALHEIRO, M. L. M.; NOGUEIRA, J. M. F.; ARAÚJO, M. E. M. Antioxidant and antiacetylcholinesterase activities of five plants used as Portuguese food spices. **Food Chem.**, v. 10, p. 778-786, 2007.

MATASYOH, J. C., MAIYO, Z. C. NGURE, R. M., CHEPKORIR, R. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Coriandrum sativum*. **Food Chem.**, v. 113, p. 526-529, 2009.

MAYEKAR, N. V.; NAYAK, S. K.; CHATTOPADHYAY, S. Two Convenient One-Pot Strategies for the Synthesis of Octahydroacridines. **Synth. Commun.**, v. 34, p. 3111 - 3119, 2004.

MLOCHOWSKI, J.; PIETKA-OTTLIK, M.; WÓJTOWICZ-MLOCHOWSKA, H.; KOŁODZIEJCZYK, K.; PIASECKI, E. New Organoselenium Compounds Active against Pathogenic Bacteria, Fungi and Viruses. **Chem. Pharm. Bull.**, v. 56, p. 1423—1427, 2008.

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

MUGESH, G.; DU MONT, W. W.; SIES, H. Chemistry of biologically important synthetic organoselenium compounds. **Chem. Rev.**, v. 101, p. 2125 - 2179, 2001.

NAGESHWAR, D.; MURALIMOHAN, R.; ACHALYULU, P. V. R.; Terpenes to ionic liquids: Synthesis and Characterization of Citronellal-Based Chiral Ionic Liquids, **Synth. Commun.**, v.39, p.3357-3368, 2009

NAVARRO-ALCARON, M., HERNÁNDEZ, F., GIL HERNANDEZ, A. Selenio, manganeso, cromo, molibdeno, yoduro y otros oligoelementos minoritarios. In: Gil Hernández A, editor. **Tratado de Nutrición Tomo I: Bases fisiológicas y Bioquímicas de la Nutrición**. Madrid: Acción Medica; p. 997–1036, 2005.

NAVARRO-ALARCON, M. & LÓPEZ-MARTÍNEZ, M. C. Essentiality of selenium in the human body: relationship with different diseases. **Sci. Total Environ**, v. 249, p. 347–71, 2000.

NAZARI, M.; MOVASSAGH, B.  $\alpha$ -Phenylselenenylation of aldehydes and ketones with diphenyl diselenide mediated by KF/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>. **Tetrahedron Lett.**, v. 50, p. 1453 - 1455, 2009.

NAZER, A. I., KOBILINSKY, A., THOLOZANA, J. L., DUBOIS-BRISSENETA, F. Combinations of food antimicrobials at low levels to inhibit the growth of *Salmonella* sv. Typhimurium: a synergistic effect? **Food Microbiol.**, v. 22, p. 391– 439, 2005.

NGUYEN, T. D.; KIM, J. M.; KANG, S. C. Chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil and the ethanol extract of *Cleistocalyx operculatus* (Roxb.) Merr and Perry buds. **Food and Chem. Toxicol.**, v. 46, p. 3632 – 3639, 2008.

NOGUEIRA, C. W., MEOTTI, F. C., CURTE, E., PILISSÃO, C., ZENI, G., ROCHA, J. B. T. Investigations into the potential neurotoxicity induced by diselenides in mice and rats. **Toxicology**, v. 183, p. 29–37, 2003.

NOGUEIRA, C. W., ROTTA, L. N., ZENI, G., SOUZA, D. O. e ROCHA, J. B. Exposure to ebselen changes glutamate uptake and release by rat brain synaptosomes. **Neurochem Res**, v. 27, p. 283-288, 2002.

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

NOMA, Y.; AKEHI, E.; MIKI, N.; ASAKAWA, Y. Biotransformation of terpene aldehydes, aromatic aldehydes and related compounds by *Dunaliella tertiolecta* **Phytochemistry**, v. 31, p. 515 – 517, 1992.

NOMA, Y.; TAKAHASHI, H.; ASAKAWA, Y. Biotransformation of terpene aldehydes by *Euglena gracilis* Z. **Phytochemistry**, v. 30, p.1147 – 1151, 1991.

NOTERMANS, S., GIESSEN VAN DER, A . Foodborne disease in the 1980s and 1990s, the Dutch experience. **Food Cont.**, v. 4, p. 122 - 124, 1993.

OBLINGER, J. L. Bacteria associated with foodborne diseases. **Food Technol.**, v. 42, p. 181-200, 1988.

ODA, S.; INADA, Y.; KOBAYASHI, A.; KATO, A.; MATSUDOMI, N.; OHTA, H. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 62, p. 2216, 1996.

OHLAN, R.; NARASIMHAN, B.; OHLAN, S.; NARANG, R.; JUDGE, V. Synthesis and antimicrobial evaluation of urea inclusion complexes. **Org. Commun.**, v. 1, p. 24 – 32, 2008.

OHLENDORF, H.M.. Selenium. In: Fairbrother, A., Locke, L.N., Hoff, G.L. (Eds.), **Noninfectious Diseases of Wildlife**. Iowa: Iowa State University Press, Ames, p. 128-140, 1996.

PARANAGAMA, P. A.; JAYARATNE, K. H. T., NUGALIYADDE, L.; ABEYWICKRAMA, K. P. Bioactivity of the essential oil of *Cymbopogon citratus* (Lemongrass) on *Sitophilus oryzae* (L.) (Coleoptera: Curculionidae). Anais do 57° **Annual Sessions of Sri Lanka Association for the Advancement of Science**, D160, 2001.

PARANAGAMA, P. A.; JAYARATNE, K. H. T.; NUGALIYADDE, L.; ABEYWICKRAMA, K. P. Toxicity and repellence of essential oils from four medicinal plants against stored rice weevil *Sitophilus oryzae*. Beijing, China: **International rice congress**, 2002.

PARNHAM, M. J. e GRAF, E. Seleno-organic compounds and the therapy of hydroperoxide-linked pathological conditions. **Biochem. Pharmacol.**, v. 36, p. 3095-3102, 1987.

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

PYBUS, D.; SELL, C.; **The Chemistry of Fragrances**, Cambridge: The Royal Society of Chemistry, 1999.

RAHMAN, A.; KANG, S. C.; In vitro control of food-borne and food spoilage bacteria by essential oil and ethanol extracts of *Lonicera japonica* Thunb. **Food Chem.**, v. 116, p. 670 - 675, 2009.

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

REICH, H. J. Functional group manipulation using organoselenium reagents. **Acc. Chem. Res.**, v. 12, p. 22 – 30, 1979.

REICH, H. J.; REICH, I. L.; RENGA, J. M. Organoselenium chemistry. .alpha.-Phenylseleno carbonyl compounds as precursors for .alpha.,.beta.-unsaturated ketones and esters. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 95, p. 5813 - 5815, 1973.

REICH, H. J.; RENGA, J. M.; REICH, I. L. Organoselenium chemistry. Conversion of ketones to enones by selenoxide syn elimination. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 97, p. 5434 - 5447, 1975.

ROJAS-GRAÜ, M.A.; AVENA-BUSTILLOS, R.J.; OLSEN, C.; FRIEDMAN, M.; HENIKA, P.R.; MARTÍN-BELLOSO, O.; PAN, Z.; McHUGH, T.H.; Effects of plant essential oil compounds in mechanical barrier and antimicrobial properties of alginate-apple puree edible films; **J. Food Eng.**, v. 81, p. 634-641, 2007.

ROTRUCK, J. T., POPE, A. L., GANTHER, H. E., SWANSON, A. B., HAFEMAN, D. G. e HOEKSTRA, W. G. Selenium: biochemical role as a component of glutathione peroxidase. **Science**, v. 179, p. 588-590, 1973.

SANDRI, I. G.; ZACARIA, J.; FRACARO, F.; DELAMARE, A. P. L.; ECHEVERRIGARAY, S.; Antimicrobial activity of the essential oils of Brazilian species of the genus of *Cunila* against foodborne pathogenic bacteria. **Food Chem.**, v. 103, p. 823-828, 2007.

SANTOS, F. W., ZENI, G., ROCHA, J. B., DO NASCIMENTO, P. C., MARQUES, M. S. e NOGUEIRA, C. W. Efficacy of 2,3-dimercapto-1- propanesulfonic acid (DMPS) and diphenyl diselenide on cadmium induced testicular damage in mice. **Food Chem. Toxicol.**, v. 43, p. 1723-1730, 2005.

SAVEGNAGO, L., TREVISAN, M., ALVES, D., ROCHA, J.B.T., NOGUEIRA, C.W. ZENI, G. Antisecretory and antiulcer effects of diphenyl diselenide. **Environ. Toxicol. Pharmacol.**, v. 21, p. 86–92, 2006.

SCHIMIDA, R.; ANTOULAS, S.; RUTTIMANN, A.; SCHIMID, M.; VECCHI, M.; WEISERB, H. Synthesis of All Four Stereoisomers of (E)-Vitamin K<sub>1</sub> (Phylloquinone), Analysis of Their Diastereoisomeric and Enantiomeric Purities and Determination of Their Biopotencies. **Helv. Chim. Acta**, v. 73, p. 1276 – 1299, 1990.

SEIXAS, T.G.; KEHRIG, H.A.; O selênio no meio ambiente. **Oecol. Bras.**, v. 11, p. 264-276, 2007.

SELL, C. S. **A Fragrant Introduction to Terpenoid Chemistry**. Cambridge: The Royal Society of Chemistry, 2003.

SEYDIM, A. C. & SARIKUS, G. Antimicrobial activity of whe protein based edible films incorporated with oregano, rosemary and garlic essential oils. **Food Res. Int.**, v. 39, p. 639–644, 2006.

SHARPLESS, K. B.; YOUNG, M. W. Olefin synthesis. Rate enhancement of the elimination of alkyl aryl selenoxides by electron-withdrawing substituents. **J. Org. Chem.**, v. 40, p. 947 -949, 1975.

SHASANY, A.K.; Phenotypic and RAPD diversity among *Cymbopogon winterianus* Jowitt accessions in relation to *Cymbopogon nardus* Rendle, **Gen. Res. Crop Evol.**, v. 17, p.553-559, 2000.

SHEA, R. G.; FITZNER, J. N.; FANKHAUSER, J. E.; SPALTENSTEIN, A.; CARPINO, P. A.; PEEVEY, R. M.; PRATT, D.V. TENGE, B. J.; HOPKINS, P. B. J. Allylic selenides in organic synthesis: new methods for the synthesis of allylic amines **J. Org. Chem.**, v. 51, p. 5243 - 5252, 1986.

SIMÕES,C.M.O.;SPITZER,V. Óleos Voláteis. In: Simões, C.M.O. et al. **Farmacognosia da planta ao medicamento**. Porto Alegre/Florianópolis: Ed UFRGS/ Ed UFSC, p. 387-416, 1999.

SPALLHOLZ, J. E.; HOFFMAN, D. J. Selenium toxicity: cause and effects in aquatic birds. **Aquat. Toxicol.**, v. 57, p. 27-37, 2002

STEEN A.; STROM T.; BERNHOFT A. Organic selenium supplementation increased selenium concentrations in ewe and newborn lamb blood and in slaughter lamb meat compared to inorganic selenium supplementation. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 50, p. 225 – 230, 2008.

SUNDÉN, H.; RIOS, R.; CÓRDOVA, A. Organocatalytic highly enantioselective  $\alpha$ -selenenylation of aldehydes. **Tetrahedron Lett.**, v.48, p. 7865-7869, 2007.

TANAKA, K.; TODA, F. Solvent-Free Organic Synthesis **Chem. Rev.**, v. 100, p. 1025 - 1074, 2000.

TOBIA, M.B.; MENGONI, G.B.; PELION, H.S. *Listeria monocytogenes* e *Listeria sp* em produtos termoprocessados. **Rev. Argentina Microbiol.**, v.29, p. 109-113, 1997.

TORTORA, G. J., CASE, C. L., & FUNKE, B. R. **Microbiology**. 8<sup>o</sup> edição. São Paulo: Ed. Artmed, 2005.

TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. 5<sup>o</sup> edição. São Paulo: Ed. Atheneu, 2008.

ULLRICH, V., WEBER, P., MEISCH, F. e VON APPEN, F. Ebselenbinding equilibria between plasma and target proteins. **Biochem. Pharmacol.**, v. 52, p. 15-19. 1996.

URSINI, F., HEIM, S., KIESS, M., MAIORINO, M., ROVERI, A., WISSING, J. e FLOHÉ, L. Dual function of the seleno-protein PHGPx during sperm maturation. **Science**, v. 285, p. 1393-1396 1990.

VALERO, M.; GINGER, M. J. Effects of antimicrobial on growth of *Bacillus cereus* INRA L2104 in and sensory quality of carrot broth. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 106, p. 90-94, 2006.

VAN CAUWENBERGH, R. V., ROBBERECHT, H., VAN VLASLAER, V. Comparison of the serum selenium content of healthy adults living in the Antwerp region (Belgium) with recent literature data. **J. Trace Elem. Med. Biol.**, v.18, p. 99–112, 2004.

VANACLOCHA, B.; CANIGUERAL, S.; **Fitoterapia: Vademécum de prescripción**, 4<sup>a</sup> ed., Barcelona: Masson, 2003.

VANEK, T.; NOVOTNY, M.; PODLIPNA, R.; SAMAN, D.; VALTEROVA, I. Biotransformation of Citronellal by *Solanum aviculare* Suspension Cultures: Preparation of *p*-Menthane-3,8-diols and Determination of Their Absolute Configurations. **J. Nat. Prod.**, 66, 1239, 2003.

VELANKAR, H. R.; HEBLE, M. R. Biotransformation of (L)-citronellal to (L)-citronellol by free and immobilized *Rhodotorula minuta*. **Electronic J. Biotechnol.**, v. 6, p. 90 - 93, 2003.

WALL, M. E.; WANI, M.; Camptothecin and taxol: from discovery to clinic. **J. Ethnopharmacol.**, v. 51, p. 239 - 254, 1996.

WARD, A. D.; COOPER, M. A.. Formation of dihydroxyselenides from allylic alcohols and their conversion to *b*-hydroxy epoxides via substitution of a phenylselenonyl group. **Tetrahedron**. v. 60, p. 7963-7972, 2004.

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

WHANGER, P. D., IP, C., POLAN, C. E., UDEN, P. C., WELBAUM, G. Tumorigenesis, metabolism, speciation, bioavailability, and tissue deposition of selenium in selenium-enriched ramps (*Allium tricoccum*). **J. Agricul. Food Chem.** v. 48, p. 5723–5730, 2000.

WHEELER, J.G.; SETHI, D.; COWDEN, J.M.; WALL, P.G.; RODRIGUES, L.C.; TOMPKINS, D.S.; HUDSON, M.J.; RODERICK, P.J. Study of infectious intestinal disease in England: rates in the community, presenting to general practice, and reported to national surveillance. **British Medical Journal**, v.318, p.1046-1050, 1999.

WONG, D. W. S.; ROBERTSON, G. H. **Combinatorial chemistry and its applications in agriculture and food**. In Shahidi, F., Kolodziejczyk, P., Whitaker, J. R., Munguia, A. L., Fuller, G., Eds. *Chemicals Via Higher Plant Bioengineering*, New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers, p. 91-105, 1999.

YADAV, J. S.; REDDY, B. V. S.; CHETIA, L.; SRINIVASULU, G.; KUNWAR, A. C. Zn/[bmim]PF<sub>6</sub>-mediated Markovnikov allylation of unactivated terminal alkynes. **Tetrahedron Lett.**, v. 46, p. 8411 - 8413, 2005.

YAMAZAKI, K.; YAMAMOTO, T., KAWAI, Y., INOUE, N. Enhancement of antilisterial activity of essential oil constituents by nisin and diglycerol fatty acid ester. **Food Microbiol.**, v. 21, p. 283-289, 2004.

## 7. Apêndices



(a)



(b)



(c)

Figura 13: Halos de inibição do produto 2-fenilselenocitronelal contra as bactérias: (a) *Listeria monocytogenes*, (b) *S. aureus* e (c) *S. Typhimurium*



Figura 14: Ensaio da determinação da Concentração Inibitória Mínima