



**UNIVERSIDADE DA INTEGRAÇÃO INTERNACIONAL DA LUSOFONIA AFRO-
BRASILEIRA**

PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO (PROPPG)

INSTITUTO DE ENGENHARIAS E DESENVOLVIMENTO SUSTENTÁVEL

**MESTRADO ACADÊMICO EM SOCIOBIODIVERSIDADE E TECNOLOGIAS
SUSTENTÁVEIS (MASTS)**

**ATIVIDADE FUNCIONAL DE BIOATIVOS FORMADOS POR *Saccharomyces cerevisiae* A
PARTIR DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Cymbopogon citratus* E *Piper nigrum***

RUBSON MATEUS MATOS CARVALHO

**REDENÇÃO – CEARÁ – BRASIL
2021**

RUBSON MATEUS MATOS CARVALHO

ATIVIDADE FUNCIONAL DE BIOATIVOS FORMADOS POR *Saccharomyces cerevisiae* A
PARTIR DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Cymbopogon citratus* E *Piper nigrum*

Dissertação apresentada ao curso de Mestrado em Sociobiodiversidade e Tecnologias Sustentáveis do Instituto de Engenharias e Desenvolvimento Sustentável (IEDS) da Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira (UNILAB), como requisito parcial à obtenção do título de Mestre. Área de concentração: Tecnologia e Desenvolvimento Sustentável.

Orientadora: Prof. Dr. Aluísio Marques da Fonseca.

Co-orientadora: Prof^a. Dra. Oscarina Viana de Sousa.

Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira
Sistema de Bibliotecas da UNILAB
Catalogação de Publicação na Fonte.

Carvalho, Rubson Mateus Matos.

C321a

Atividade funcional de bioativos formados por *Saccharomyces cerevisiae* a partir do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* e *Piper nigrum* / Rubson Mateus Matos Carvalho. - Redenção, 2021.
54f: il.

Dissertação - Curso de Mestrado Acadêmico em Sociobiodiversidade e Tecnologias Sustentáveis, Instituto de Engenharias e Desenvolvimento Sustentável, Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira, Redenção, 2021.

Orientador: Prof. Dr. Aluísio Marques da Fonseca.

1. Compostos bioativos. 2. Agentes antimicrobianos. 3. Essências e óleos essenciais - Ação repelete. I. Título

CE/UF/BSP

CDD 547

RUBSON MATEUS MATOS CARVALHO

ATIVIDADE FUNCIONAL DE BIOATIVOS FORMADOS POR *Saccharomyces cerevisiae* A PARTIR DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Cymbopogon citratus* E *Piper nigrum*

Dissertação apresentada à coordenação do programa de Pós-Graduação em Sociobiodiversidade e Tecnologias Sustentáveis da Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira, como requisito parcial a obtenção do título de mestre. Campus Auroras. Área de concentração: Tecnologia e Desenvolvimento Sustentável.

Aprovado em: 24/03/2021

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Alúcio Marques da Fonseca (Orientador)

Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira (UNILAB)

Prof.^a Dr.^a Oscarina Viana de Sousa (Coorientadora)

Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof.^a Dr.^a Oleniaide Oliveira Pinto

Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira (UNILAB)

Prof.^a Dr.^a Erika Helena Salles de Brito

Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Frasileira (UNILAB)

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meus pais, Sulidade e Autran, que sempre me apoiaram, além dos meus irmãos, Rudson e Breno.

Aos demais familiares, tias e tios, Conceição, Lídia (*in memoriam*), Aparecida, Maria, Evilásio, Leninha, Sandoval e Antônio. Aos primos e primas, Débora, Thayana, Hilana, Eduarda, Luís, Benjamin, Joaquim e Lia.

Ao meu orientador, Aluísio M. da Fonseca pela liberdade e apoio na pesquisa, bem como a todos que fazem o Grupo Interdisciplinar em Química (GIQ).

Agradeço a coordenação e todo o quadro de professores e colaboradores do Mestrado Acadêmico em Sociobiodiversidade e Tecnologias Sustentáveis (MASTS), bem como a Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira (UNILAB) e a todos que a compõem.

À minha coorientadora, Oscarina Viana, pela confiança e amizade, bem como a todos que fazem o Laboratório de Microbiologia Ambiental e do Pescado (LAMAP/LABOMAR/UFC).

À professora Érika Salles por viabilizar o laboratório de microbiologia, pela confiança e disponibilidade, além de todos que fazem o Centro de Estudos em Microbiologia (CEMIC/UNILAB).

Agradeço aos amigos que fiz em Redenção: Rubens Alves, Thalía, Júnior, Carol, Bruno Roberto, Geovana, Clara, entre outros. Aos amigos de mestrado Brunna Angélica, Moisés Wilkerson, Flávia Ferreira, Hudson Pimentel e aos demais.

Aos amigos da vida Alleson, Léia, Lili e João Júnior.

Agradeço a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) pela bolsa, ainda que insuficiente e defasada, obrigado por fazer o mínimo.

Agradeço também a Alexandra Elbakyan, por derrubar barreiras com o poderoso Sci-Hub, inspirar coragem e determinação. Um exemplo revolucionário para toda a comunidade científica.

Obrigado.

RESUMO

Produzidos a partir do metabolismo das plantas, os óleos essenciais apresentam-se como fontes ecológicas de compostos antioxidantes, antimicrobianos, larvicida/repelentes entre outras atividades. Como método alternativo para obtenção de compostos de forma natural surge a Biocatálise, procedimento que se utiliza da atividade de microrganismos para obtenção de novos compostos. Este trabalho teve por objetivo promover reação biocatalítica a partir dos óleos essenciais de *Piper nigrum* e *Cymbopogon citratus* usando a levedura *Saccharomyces cerevisiae* e avaliar sua composição por CG-EM, a atividade funcional dos compostos bioativos presentes nos óleos e no material (*C. citratus* BT e *P. nigrum* BT) obtido a partir deste processo. Foi avaliada a composição dos óleos e dos novos compostos formados, a atividade inibitória da enzima acetilcolinesterase (AChE), antimicrobiana e larvicida dos óleos e dos materiais biossintetizados. Os óleos essenciais de *C. citratus* e *P. nigrum* foram extraídos por hidrodestilação e o rendimento calculado a partir da massa do óleo obtido, pela massa fresca dos vegetais. A biotransformação dos óleos foi realizada pela estirpe *S. cerevisiae*. As amostras de óleo e de material biossintetizados foram testados quando à capacidade antimicrobiana contra *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* pelo método de disco-difusão. A atividade inibitória da enzima AChE foi realizada pelo método colorimétrico e o resultado observado a partir da formação de halo inibição da enzima. Para teste larvicida, foi utilizado 20 larvas de *Aedes aegypti* seguida da adição das amostras em estudo diluídas em DMSO 1%. O óleo diluído e o material biocatabolizados foram dispostos em frações de 1000 a 31,25µg/mL. Após 24 e 48h foi feita a contagem de organismos vivos. Do processo de hidrodestilação foi obtido 1,38% e 2,28% para *C. citratus* e *P. nigrum* respectivamente. O composto majoritário encontrado no óleo de *C. citratus* foi o Citral (31,75%), em *C. citratus* BT, 2-isopropenyl-5-methyl-4-hexenal (69,23%), em *P. nigrum* foi encontrado Canfeno (15,4%) e em *P. nigrum* BT predominou β-phelhandrene (23,59%). As cepas *E. coli*, *S. aureus* e *S. cerevisiae* apresentaram suscetibilidade ao óleo essencial de *C. citratus*, o material biotransformado apresentou também atividade frente *P. aeruginosa*. Enquanto o óleo de *P. nigrum* não apresentou atividade contra nenhuma das estirpes bacterianas, o material biotransformado a partir desse vegetal foi capaz de inibir todas as estirpes. A estirpe *S. cerevisiae* é capaz de promover processo de biotransformação a partir do óleo essencial de *P. nigrum* e *C. citratus* e de gerar compostos de interesse comercial. Para o ensaio da atividade inibitória da enzima AChE apenas as amostras biotransformadas apresentam resultado positivo, indicado potencial farmacológico como inibidor da enzima AChE. *C. citratus* BT apresentou melhor desempenho como agente larvicida, com Concentração Letal (CL₅₀) de 23,67µg/ml em 24h e 56,55µg/ml em 48h.

Palavras-chave: Biotransformação; CG-EM; larvicida.

ABSTRACT

Produced from the metabolism of plants, essential oils are presented as ecological sources of antioxidant, antimicrobial compounds, larvicide / repellents, among other activities. Biocatalysis is an alternative method for obtaining compounds naturally, a procedure that uses the activity of microorganisms to obtain new compounds. This work aimed to promote a biocatalytic reaction from the essential oils of *Piper nigrum* and *Cymbopogon citratus* using the yeast *Saccharomyces cerevisiae* and evaluate its composition by CG-EM, the functional activity of the bioactive compounds present in the oils and in the material (*C. citratus* BT and *P. nigrum* BT) obtained from this process. The composition of oils and new compounds formed, the inhibitory activity of the enzyme acetylcholinesterase (AChE), antimicrobial and larvicide of oils and biosynthesized materials were evaluated. The essential oils of *C. citratus* and *P. nigrum* were extracted by hydrodistillation and the yield calculated from the mass of the oil obtained, by the fresh mass of the vegetables. The biotransformation of the oils was carried out by the strain *S. cerevisiae*. The samples of oil and biosynthesized material were tested for antimicrobial capacity against *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* by the disk-diffusion method. The inhibitory activity of the AChE enzyme was performed by the colorimetric method and the result observed from the formation of the enzyme halo inhibition. For larvicidal test, 20 *Aedes aegypti* larvae were used followed by the addition of the study samples diluted in 1% DMSO. The diluted oil and the biocatabolized material were arranged in fractions of 1000 to 31.25µg / mL. After 24 and 48h, live organisms were counted. From the hydrodistillation process, 1.38% and 2.28% were obtained for *C. citratus* and *P. nigrum* respectively. The major compound found in the oil of *C. citratus* was Citral (31.75%), in *C. citratus* BT, 2-isopropenyl-5-methyl-4-hexenal (69.23%), in *P. nigrum* was found Camphene (15.4%) and *P. nigrum* BT predominated β-phelhandrene (23.59%). The strains *E. coli*, *S. aureus* and *S. cerevisiae* were susceptible to the essential oil of *C. citratus*, the biotransformed material also showed activity against *P. aeruginosa*. While *P. nigrum* oil showed no activity against any of the bacterial strains, the biotransformed material from this plant was able to inhibit all strains. The strain *S. cerevisiae* is able to promote a biotransformation process from the essential oil of *P. nigrum* and *C. citratus* and to generate compounds of commercial interest. For the assay of the inhibitory activity of the AChE enzyme, only the biotransformed samples show a positive result, indicating pharmacological potential as an inhibitor of the AChE enzyme. *C. citratus* BT performed better as a larvicidal agent, with a Lethal Concentration (LC₅₀) of 23.67µg / ml in 24h and 56.55µg / ml in 48h.

Keywords: Biotransformation; CG-EM; larvicide.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Susceptibilidade dos óleos essenciais de <i>C. citratus</i> e <i>P. nigrum</i> contra a levedura <i>S. cerevisiae</i>	27
Tabela 2. Composição química do óleo essencial de <i>C. citratus</i> e <i>P. nigrum</i> e de suas amostras biocatabolisadas por <i>S. cerevisiae</i>	28
Tabela 3. Concentração Inibitória Mínima (CIM) do óleo essencial de capim-limão, pimenta-preta e seus compostos biotransformados ($\mu\text{L}/\text{mL}$).....	30
Tabela 4. Controle do teste antimicrobiano	31
Tabela 5. Atividade Inibitória da AChE frente as amostras de óleos essenciais de <i>C. citratus</i> , <i>P. nigrum</i> e dos óleos biotransformados.....	32
Tabela 6. Concentração Letal para 50% (CL_{50}) de <i>A. aegypti</i> e coeficiente de de determinação (R^2) das amostras em estudo	33
Tabela 7. Mortalidade de <i>A. aegypti</i> em 24 e 48 horas submetidas a amostras de óleo essencial e material biocatabolizado por <i>S. cerevisiae</i>	34

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ABD	Ágar Batata Dextrose
ACh	Acetilcolina
AChE	Acetilcolinesterase
ATCC	American Type Culture Collection
ATCI	Iodeto de acetilcolina
BDO	Demanda Bioquímica de Oxigênio
BT	Biocatabolizado
CBD	Caldo Batata Dextrose
CEMIC	Centro de Estudos em Microbiologia
CG-MS	Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massa
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
CO ₂	Dióxido de carbono
DMSO	Dimetil sulfóxido
DPPH	2,2- difenil-1-picril-hidrazil
h	hora
LAMAP	Laboratório de Microbiologia Ambiental e do Pescado
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
mm	Milímetro
mmol	milimol
nm	Nanômetro
OE	Óleo Essencial
PA	Pureza analítica
pH	Potencial hidrogeniônico
rpm	Rotação por minuto
TR	Tempo de retenção
UFC	Universidade Federal do Ceará
UNILAB	Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Percentual
CL ₅₀	Concentração Letal a 50%
g	Gramma
L	Litro
mL	Mililitro
°C	Celsius
R ²	Coeficiente de determinação
α	alfa
β	beta
γ	Gamma
μ	mi
μL	Microlitro

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1.	Correlação entre a mortalidade de larvas de <i>A. aegypti</i> em 24h e a concentração de OE de <i>C. citratus</i>	35
Gráfico 2.	Correlação entre a mortalidade de larvas de <i>A. aegypti</i> em 24h e a concentração de <i>C. citratus</i> BT	35
Gráfico 3.	Correlação entre a mortalidade de larvas de <i>A. aegypti</i> em 48 horas e a concentração de OE de <i>C. citratus</i>	36
Gráfico 4.	Correlação entre a mortalidade de larvas de <i>A. aegypti</i> em 48h e a concentração de <i>C. citratus</i> BT	36
Gráfico 5.	Correlação entre a mortalidade de larvas de <i>A. aegypti</i> em 24h e a concentração de <i>P. nigrum</i> BT	37
Gráfico 6.	Correlação entre a mortalidade de larvas de <i>A. aegypti</i> em 24h e a concentração de OE de <i>P. nigrum</i>	37
Gráfico 7.	Correlação entre a mortalidade de larvas de <i>A. aegypti</i> em 48h e a concentração de OE de <i>P. nigrum</i>	38
Gráfico 8.	Correlação entre a mortalidade de larvas de <i>A. aegypti</i> em 48h e a concentração de <i>P. nigrum</i> BT	38

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1. Equação do rendimento do óleo essencial	23
Equação 2. Equação da mortalidade percentual de larvas de <i>A. aegypti</i>	34

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
2.1	Capim-limão (<i>Cymbopogon citratus</i>)	15
2.2	Pimenta-preta (<i>Piper nigrum</i>)	16
2.3	<i>Aedes aegypti</i> : dengue, zika e chikungunya	18
2.4	Atividade inibitória da Acetilcolinesterase (AChE)	20
2.5	Biocatálise e biotransformação	20
3	OBJETIVO	22
3.1	Objetivo geral	22
3.2	Objetivos específicos	22
4	MATERIAL E MÉTODOS	23
4.1	Obtenção e rendimento do óleo essencial de <i>Cymbopogon citratus</i> e <i>Piper nigrum</i> ...	23
4.2	Ensaio biocatalítico	23
4.3	Teste de susceptibilidade antimicrobiana	24
4.3.1	<i>Preparo das estirpes, das amostras e semeadura</i>	24
4.4	Atividade inibitória da Acetilcolinesterase (AChE) frente ao óleo essencial de capim-limão, pimenta-preta e biotransformados	25
4.5	Teste de atividade larvicida ante <i>Aedes aegypti</i>	26
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	27
5.1	Rendimento do óleo essencial de <i>Piper nigrum</i> e <i>Cymbopogon citratus</i>	27
5.2	Caracterização química das amostras de OE e material biocatabolizado por CG/MS.....	27
5.3	Teste de susceptibilidade	30
5.4	Atividade inibitória da enzima AChE	32
5.5	Atividade Larvicida	33
6	CONCLUSÕES	39
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	40

1 INTRODUÇÃO

Os óleos essenciais são metabólitos secundários produzidos por plantas, estes compostos apresentam alta aplicabilidade comercial, podendo ser empregados nos mais diversos tipos de indústrias, como a alimentícia, farmacêutica, perfumaria, cosmética e agrícola (ORHANYANIKAN et al. 2019; LEITE et al. 2016; EKPENYONG; AKPAN, 2015; GEROMINI et al. 2012; MARTINAZZO et al. 2010).

A aplicação dos óleos essenciais varia de acordo com a presença de compostos de interesse. Esses compostos por sua vez, variam de acordo com a espécie, condições de solo, clima entre outros fatores (GARCÍA-DÍEZ et al., 2016). Enquanto o composto majoritário do óleo essencial de capim-limão (*Cymbopogon citratus*) é o citral (OLEIVEIRA et al., 2017) e flavonóides (SILVA et al., 2017), no óleo essencial da pimenta-preta (*Piper nigrum*) o composto majoritário é a piperina (CARNEVALLI; ARAÚJO, 2013; NAHAK; SAHU, 2011) e cariofileno (BASTOS, et al., 2020).

Embora os vegetais sejam morfológicamente distintos e produzam compostos diferentes, há similaridades. Tanto o óleo essencial de *C. citratus* como o de *P. nigrum* tem ação antioxidante (SOMPARN et al., 2018; BAYALA et al., 2018), antimicrobiana (SILVA et al., 2018) e larvicida (SOONWERA; PHASOMKUSOLSIL, 2016). O amplo espectro de ação desses óleos ocorre em virtude da sua diversidade de compostos. Em ambos os vegetais, a atividade larvicida tem chamado atenção, principalmente pela ação sobre espécies transmissoras de doenças como o mosquito *Aedes aegypti*, *Anopheles gambiae*, *Anopheles dirus* (SOONWERA; PHASOMKUSOLSIL, 2016; KARUNAMOORTHY; ILANGO, 2010), *Anopheles coluzzii*, *Anopheles arabiensis* e *Anopheles quadriannulatus* (SAMUEL et al., 2016).

A prospecção de compostos naturais ocorre em virtude do risco presente em compostos sintéticos (BAKKALI et al., 2008). O uso de microrganismos em processos biocatalíticos para conversão de compostos em novos produtos tem sido bastante estudado (HARLES; DALBY; WOODLEY, 2007; LABES; WENDHAUSEN, 2008). Este processo de alta performance ocorre pela presença de enzimas produzidas por microrganismos, dentre os principais destacam-se os organismos do reino *fungi*, sendo as leveduras as mais utilizados nesse processo (LABES; WENDHAUSEN, 2008).

As leveduras apresentam grande diversidade metabólica e baixa seletividade por nutrientes, o que lhes dão maior resistência bem como uma adaptação melhor em comparação com outros microrganismos. Deste modo, as leveduras tornam-se capaz de sintetizar diversos tipos de enzimas com capacidade de hidrolisar moléculas de açúcar em tamanhos menores (SANTOS, 2012).

Neste contexto o objetivo deste trabalho foi de promover processo biocatalítico mediado por *Saccharomyces cerevisiae* a partir dos óleos essenciais de *C. citratus* e *P. nigrum* e observar a

formação de novos compostos por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (CG/MS). Em sequência testar a capacidade antimicrobiana, antioxidante, degradadora de Acetilcolinesterase, ecotoxicológica e larvicida dos óleos essenciais e do material biocatalizado.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Capim-limão (*Cymbopogon citratus*): composição, usos e propriedades

De origem asiática, a espécie *Cymbopogon citratus*, mais conhecida no Brasil por capim-cidrao, capim-santo (SHAH et al., 2011) e capim-limão (DAIO et al., 2017) pertence ao gênero *Cymbopogon* com aproximadamente 55 espécies. A planta é bastante comum em regiões tropicais e semitropicais da África e das Américas Central e do Sul (SHAH et al., 2011). Ao chá da erva, é atribuída funções terapêuticas como analgésica, anti-inflamatória, diurética, sedativa, antitérmica, antiespasmódica, ideal para transtornos do aparelho digestivo, controle da pressão arterial, entre outros benefícios a saúde (LEITE et al., 1986; SOUZA-FORMIGONI et al., 1986; OLIVEIRA; ARAÚJO, 2007; FARIAS et al., 2019).

Existem diversos estudos que comprovam que o óleo essencial (OE) de *C. citratus* é rico em compostos que beneficiam a saúde humana, entre esses compostos podem ser citados os flavonoides (SILVA et al., 2017), o β -mirceno, o geraniol, a orientina, o ácido de clorogênico, o ácido cafeico, porém o composto majoritário é o citral (na proporção de 64 a 85%) (OLIVEIRA et al., 2017), o qual é constituído por uma mistura dos isômeros neral e geranial (LEMOS et al., 2013).

A riqueza de compostos funcionais presentes no OE de capim-limão tem despertado o interesse da indústria (LEMOS et al., 2013). É reportada sua atividade potencial como agente antibacteriano (NAIK et al., 2010; SINGH et al., 2011; OLIVEIRA, et al., 2011; OLIVEIRA et al., 2013; ALMEIDA et al., 2013; LIMA et al., 2016; SILVA et al., 2017; ASSIS et al., 2017; SILVA et al., 2018), antifúngico (GUIMARÃES et al., 2011; CARMO et al., 2012; ALMEIDA et al., 2013; ASSIS et al., 2017), antioxidante (GUIMARÃES et al., 2011; SOMPARN et al., 2018; BAYALA et al., 2018), larvicida/pesticida (KARUNAMOORTHY; ILANGO, 2010; SOONWERA; PHASOMKUSOLSIL, 2016), repelente (SANTOS et al., 2016) anticâncer (VILLAVERDE et al., 2013).

Estudos sobre a aplicação de óleos essenciais com potencial antimicrobiano ocorre como resposta a emergência de bactérias resistentes aos antibióticos convencionais (GONZALES et al., 2012). Apesar do OE de capim-limão apresentar maior ação antimicrobiana sobre microrganismos Gram-positivos, se comparado os Gram-negativos (NAIK et al., 2010), o óleo pode ser considerado de amplo espectro, por ser capaz de inibir o desenvolvimento de bactérias, fungos e leveduras (OLIVEIRA et al., 2017; ASSIS et al., 2017).

Em testes *in vitro*, o óleo essencial de capim-limão mostrou-se um eficiente agente antimicrobiano ao inibir bactérias como *Listeria monocytogenes* (OLIVEIRA et al., 2011; OLIVEIRA et al., 2013) *Salmonella entérica* (ASSIS et al., 2017; SILVA et al., 2017), *Escherichia*

coli, *Staphylococcus aureus* (NAIK et al., 2010; ASSIS et al., 2017), fungos como *Fusarium oxysporum cubense*, *Colletotrichum gloesporioides* e *Alternaria alternata*, e a levedura *Candida* spp. (ALMEIDA et al., 2013; ASSIS et al., 2017). Em contra partida, a estirpe *Pseudomonas aeruginosa* é apontada como resistente ao OE de *C. citratus* (SILVA et al., 2017; ASSIS et al., 2017).

No que se refere ao potencial antioxidante, o óleo essencial de capim-limão mostrou-se capaz de reduzir radicais livres de DPPH (2,2- difenil-1-picril-hidrazil). Essa atividade foi encontrada tanto nas folhas como no caule da planta. A atividade antioxidante varia de acordo com uma série de condições, tais como a técnica de obtenção/extração do óleo, suas características, composição, modo de produção e cultivo, entre outros (HARTATIE et al., 2019).

Sobre a atividade larvicida, OE de capim-limão mostrou importante efeito sobre a mortalidade de larvas de *Aedes aegypti*, mesmo em baixas concentrações (SOONWERA; PHASOMKUSOLSIL, 2016). Além do *A. aegypti*, OE também mostrou ação larvicida sobre *Anopheles gambiae* e *Anopheles dirus*, mosquitos reconhecidos por transmitirem a malária (KARUNAMOORTHY; ILANGO, 2010; SOONWERA; PHASOMKUSOLSIL, 2016).

O OE de capim-limão também é apontado como potencial redutor de doenças cardiovasculares, os níveis séricos de colesterol total e lipoproteína de baixa densidade (LDL), também conhecido por colesterol ruim (SOMPARN et al., 2018).

2.2 Pimenta-preta (*Piper nigrum*)

Nativa do sul da Índia e do Sri Lanka, a *Piper nigrum*, conhecida no Brasil como pimenta-do-reino e no mundo por pimenta-preta (black pepper), é uma videira pertencente a família das Piperaceae sendo bastante cultivada em regiões tropicais (MAGEVSKI et al., 2011; CHANDRAN et al., 2016).

De característica monocíclica, folhas verde escuro, aroma e sabor distintos, a planta é bastante usada como tempero e condimento (MAGEVSKI et al., 2011; CHANDRAN et al., 2016). Além da culinária a *Piper nigrum* destaca-se na medicina popular no alívio da dor, reumatismo, calafrios, gripes, resfriados, dores musculares, febre (NAHAK; SAHU, 2011), além de doenças do trato digestivo (SREEJAI et al., 2019).

Estudos indicam forte potencial de aplicação do OE de *Piper nigrum* e seus compostos como agente antioxidante, antimicrobiano, antisséptico, carminativo (antigases) (CHATTERJEE et al., 2007) e anti-inflamatória (JEENA et al., 2014). Esse potencial de aplicação do OE ocorre devido a sua composição química (BAGHERI; MANAP; SOLATI, 2014). A planta é rica em alcalóides (piperina), glicosídeos, taninos, flavonóides e esteroides (NAHAK; SAHU, 2011; CARNEVALLI et

al., 2013), sendo o β -cariofileno considerado o composto majoritário (JEENA et al., 2014; BASTOS, et al., 2020), embora a concentração dos compostos possa variar de acordo com fatores climáticos, fertilidade do solo, variedade, entre outras (GARCÍA-DÍEZ et al., 2016). Outros compostos presentes no OE de *P. nigrum* são o limoneno, sabineno, β -pipeno, α -pipeno, 3-careno, α -copaeno, elemene, mirceno, α -cariofileno (CHANDRAN et al., 2016; BASTOS, et al., 2020).

A atividade antioxidante e anti-inflamatória do OE de *P. nigrum* é bastante conhecida, sendo relatada em diversos estudos que apontam para o importante potencial de aplicação desses compostos na indústria farmacêutica e alimentar, por exemplo (NAHAK; SAHU, 2011; BAGHERI; MANAP; SOLATI, 2014; ANDRIANA, et al., 2019; LI, et al., 2020). O interesse da indústria e de pesquisadores no OE, se dá pela possibilidade do desenvolvimento de produtos com ação terapêutica que atuem no alívio de dores e na eliminação de radicais livres (JEENA et al., 2014). A propriedade antioxidante é atribuída a presença de compostos terpenoides e fenólicos, além de compostos aromáticos e alifáticos.

Diversos estudos tem apontado para a potencial atividade larvicida do óleo essencial de *P. nigrum* sobre espécies de mosquitos transmissores de doenças, como a do gênero *Anopheles*, transmissor da Malária (*Anopheles gambiae*, *An. coluzzii*, *An. arabiensis* e *An. quadriannulatus*) (SAMUEL et al., 2016), e *Aedes aegypti*, transmissor de doenças como a Dengue, Zika vírus e Chikungunya (CUSTÓDIO et al., 2016; COSTA et al., 2010). Estudos sobre o efeito larvicida de óleos essenciais são considerados importantes por se apresentarem como alternativa ecologicamente viável ao uso dos larvicidas convencionais (HWANG et al., 2017; COSTA et al., 2010). Embora se saiba da capacidade larvicida do OE de *Piper nigrum*, ainda são necessários estudos que indiquem os mecanismos de ação no controle larval dos mosquitos (COSTA et al., 2010).

Quanto a atividade antimicrobiana, é relatada ação do OE contra bactérias e fungos. O óleo apresentou atividade contra *Aspergillus flavus*, *Candida albicans* e *Candida fimbriata* (LI et al., 2020). Quanto a bactérias, o OE apresentou atividade contra *Staphylococcus aureus* (LÓPEZ; MAHECHA; VARGAS, 2016; OBAD et al., 2016), *Escherichia coli* (SREEJAI et al., 2019). A atividade antimicrobiana é atribuída a alta concentração de monoterpenos no OE de *P. nigrum* (LI et al., 2020).

Estudos têm indicado para o potencial de aplicação do OE de *P. nigrum* em diversas áreas, como no tratamento da doença de Alzheimer e anti-inflamatório (TU et al., 2015; AHMED et al., 2013), conservante e flavolizante de alimentos (CHANDRAN et al., 2016), agente caricida (reduzidor de biofilme formador da placa bacteriana) (WIWATTANARATTANABUT; CHOONHARUANGDEJ; SRITHAVAJ, 2017), herbicida (ANDRIANA, et al., 2019) entre outras aplicações.

2.3 *Aedes aegypti*: dengue, zika e chikungunya

Pertencente a família Culicidae, o mosquito *Aedes aegypti* é um dos mais importantes transmissores de arboviroses, sendo considerado de grande interesse para a saúde pública por provocar danos a saúde, a economia, meio ambiente e sobre o bem estar e a qualidade de vida das pessoas (SCHAFFNER; MEDLOCK; VAN BORTEL, 2013). O mosquito *Ae. aegypti* é um eficiente vetor de vírus causadores de doenças epidêmicas como a febre amarela, chikungunya, zika, *la crosse* e principalmente a dengue. Essa eficiência esta relacionada a grande capacidade de adaptação do mosquito ao ambiente urbano (TAUIL, 2006; SCHAFFNER; MEDLOCK; VAN BORTEL, 2013).

O *Aedes Aegypti* encontra-se amplamente distribuído no globo, em especial nas áreas tropicais, o que torna o combate ao mosquito ainda mais desafiador (BRAGA; VALLE, 2007; BESERRA; FERNANDES; RIBEIRO, 2009), em especial nas cidades, onde o mosquito pode tornar-se infectado por um vírus, replicá-lo e transmiti-lo (DYE, 1992). Além disso, uma única fêmea, durante o ciclo gonadotrófico, é capaz de picar várias pessoas, assim as infectando e transmitindo os vírus (SCOTT et al., 1993). O ciclo de vida do *Ae. aegypti* também lhe confere alta resistência, já que o que embrião é capaz de resistir a um longo período de dessecação, persistindo por até 492 dias de seca, com eclosão após contato com a água (SILVA; SILVA, 1999).

Transmitida pelo mosquito *Ae. aegypti*, a dengue é uma doença infecciosa causada por vírus do gênero Flavivirus da família Flaviviridae, sendo conhecidos quatro sorotipos (DENV-1, 2, 3 e 4) (BRASIL, 2011). No Brasil, o primeiro caso de dengue foi registrado em 1981, em Boa Vista (Roraima), o surto com os sorotipos DENV-1 e DENV-4 logo foi controlado. Em 1986 um outro surto com o sorotipo 1 foi registrado no Rio de Janeiro e rapidamente evoluiu para uma epidemia que se espalhou por alguns estados. Desde 1994 surtos frequentes foram registrados por todo o país em decorrência da dispersão do mosquito transmissor (BRAGA; VALLE, 2007). Em 2010 o sorotipo DENV-4 foi novamente registrado no Estado de Roraima (TEMPORÃO et al., 2011). Em 2018 foram confirmados 159.718 casos de Dengue em todo o país, sendo 141 óbitos (BRASIL, 2018).

Assim como a dengue, os vírus Chikungunya (CHIKV) e Zika (ZIKV) também tiveram rápida dispersão pelo país em decorrência da transmissão por *Ae. aegypti*. O chikungunya chegou a o continental Americano pelo Caribe no final de 2013, sendo relatado no Brasil na metade de 2014. Enquanto para o zika, acredita-se que sua chegada tenha ocorrido no período da Copa das Confederações de Futebol em 2013 (VASCONCELOS, 2015; FARIA et al., 2016). Em 2015 o zika tornou-se caso de saúde pública (DUTRA et al., 2016) após associação da infecção de mulheres

grávidas a casos de microcefalia (MELO et al., 2016). Em 2018 foram registrados 65.480 casos de chikungunya e 3.625 casos de zika, com 49 e uma morte, respectivamente (BRASIL, 2018).

Como não existe uma vacina (HEINTZE; GARRIDO; KROEGER, 2007), as estratégias preventivas de controle dessas doenças recaem sobre o combate ao mosquito, a fim de eliminar/controlar o vetor (CORRÊA; FRANÇA; BOGUTCHI, 2005; HEINTZE; GARRIDO; KROEGER, 2007). Entre as estratégias, o governo brasileiro lançou algumas programas de controle e erradicação do mosquito como Plano de Erradicação do *Aedes aegypti* (PEAa) em 1996. Tratava-se de um programa descentralizado e com a participação do governo federal, dos estados e municípios, mas o programa fracassou justamente pela falta de ações integrativas (BRAGA; VALLE, 2007). Em 2001, o governo lançou o Plano de Intensificação das Ações de Controle da Dengue (PIACD), ao contrário do anterior, este ficou mais voltado ao controle do mosquito, ao invés de sua erradicação. Em 2002, em decorrência do aumento do risco epidêmico, elevado número de casos graves e a volta do sorotipo 3 no país foi lançado o Plano Nacional de Controle da Dengue (PNCD) (BRAGA; VALLE, 2007; FIGUEIRÓ et al., 2010). Embora planos e ações procurem estabelecer uma parceria entre o poder público e a sociedade, essa relação não é colaborativa, visto que é observado a permanência de criadouros do mosquito nas residências, aumentando o risco de transmissão de doenças (PICINATO, et al., 2015).

Outras estratégias no campo tecnológico tem sido desenvolvidas e aplicadas, como o uso de geotecnologias no mapeamento de áreas de risco, com maior e menor incidência de arboviroses (LACON et al., 2014); ações de educação participativa (PICINATO, et al., 2015); mosquitos transgênicos, incapazes de se reproduzir e/ou incapazes de transmitir doenças (REIS-CASTRO, 2012; CARVALHO et al., 2014; ARAÚJO et al., 2015); mosquitos impregnados com inseticida, onde as fêmeas ao depositar os ovos no corpo hídrico, também liberaria compostos inseticida matando as larvas (DEVINE et al., 2009; ABAD-FRANCH et al., 2015); irradiados, tornando o mosquito estéril (THOME; YANG; ESTEVA, 2010; ATYAME et al., 2016); indução de *Wolbachia*, uma bactéria natural e simbiote em mosquitos que provoca sua esterilidade (DUTRA et al., 2016); uso de repelentes em telas (BALY et al., 2011; BALY et al., 2012; SALAZAR et al. 2013), roupas (LONDONO-RENTERIA et al., 2015; ORSBORNE et al., 2016), e no ambiente (CHADEE, 2013; PAREDES-ESQUIVEL et al., 2016); além do uso de compostos naturais com potencial repelente e larvicida (SOONWERA; PHASOMKUSOLSIL, 2016; SANTOS et al., 2016). Essas tecnologias podem ser aplicadas separadamente ou em conjunto para aumentar a eficiência no combate ao mosquito (ZARA et al., 2016).

O uso de compostos naturais com ação repelente e larvicida tem despertado o interesse por se apresentar como uma alternativa viável e segura ante aos compostos convencionais, que podem ser

danosos a saúde e ao meio ambiente (SANTOS et al., 2010; SANTOS et al., 2011; SOONWERA; PHASOMKUSOLSIL, 2016). É importante que compostos com atividade larvicida apresentem efeito residual, pois ao persistirem no ambiente tem a sua ação prologada. Esse é um fator fundamental, na escolha de um composto a ser empregado em campanhas de saúde pública (ZARA et al., 2016).

2.4 Atividade inibitória da Acetilcolinesterase (AChE)

A acetilcolina (ACh) é um neurotransmissor com atividade crucial e presente em sistema nervoso, sendo importante em diversas funções como o alerta, controle motor, aprendizado e a memória. Sem a ACh, ou com presença eficiente, todas essas ações passam a ser prejudicadas (VINUTHA et al., 2007). Um das principais doenças relacionadas a deficiência na transmissão da molécula acetilcolina é doença de Alzheimer, caracterizada por atingir principalmente a população idosa (ADAMS; GMUEDNER; HAMBURGER, 2007), provocando carência cognitivas e funcional. A doença é causada pela ação da acetilcolinesterase (AChE) que hidrolisa a molécula ACh em acetado e colina, impedindo sua ação na transmissão de informações (MOTA et al., 2012).

Óleos essenciais tem apresentado atividade inibidora da Acetilcolinesterase, em especial aqueles compostos de terpenos e monoterpênicos. De acordo com alguns autores, os óleos essenciais de *C. citratus* e de *P. nigrum* tem sido apontado como potencial inibidor da AChE (XIANG et al., 2017; TU et al., 2015; ADARAMOYE, AZEEZ, 2014; AHMED et al., 2013; SATISH, 2013; KIENDREBEOGO et al., 2011).

4.5 Biocatálise e Biotransformação

A biocatálise é um processo de transformação química específica realizado por moléculas biológicas com potencial catalítico. É um bioprocesso bastante útil para a indústria, em especial para a de alimentos, rações, agricultura e química. Diversas pesquisas tem se voltado para a melhora dos processos o que tem possibilitado uma melhor exploração comercial dos compostos (KAUSHIK; BISWAS; SINGH, 2014). O processo de biocatálise é geralmente mediado por enzimas, células ou microrganismos que promovem a biotransformação de compostos (FABER, 1997).

A biotransformação é um processo conhecido desde a antiguidade na fabricação de alimentos (HOLT et al., 2018; GAMERO et al., 2011; LEÓN et al., 1998). O emprego de microrganismos é tido como pioneiro em processos biocatalíticos na produção de alimentos. Entre esses microrganismos destaca-se a levedura do pão, *Saccharomyces cerevisiae*, um microrganismos

eucariota que possui inúmeras aplicações biotecnológicas, que vão desde a produção de alimentos, até compostos químicos e biocombustíveis (HONG; NIELSEN, 2012).

Podemos citar a produção de cerveja como um exemplo de biotransformação promovida por *S. cerevisiae*, onde a levedura é incubada com cevada maltada e ao consumir os açúcares realiza a fermentação alcoólica, produzindo etanol e dióxido de carbono (CO₂), convertendo os compostos voláteis em novos compostos (HOLT et al., 2018; GAMERO et al., 2011), alterando o sabor e aroma da bebida (KIMURA; ITO, 2019).

Na modernidade, a biocatálise ganhou importância industrial quando microrganismos foram capazes de modificar esteroides na década de 1950. A medida em que as tecnologias foram avançando, os processos catalíticos puramente químicos foram substituídos por processos mediados por biocatalizadores (LEÓN et al., 1998).

Os processos de biocatálise e biotransformação apresentam-se como uma alternativa atrativa sob o ponto de vista econômico e ecológico para obtenção de matéria-prima e energia (KAUSHIK; BISWAS; SINGH, 2014; OLIVEIRA; MANTOVANI, 2009). Além disso, com o avanço das tecnologias permitiu o emprego de organismos geneticamente modificados, com atividade metabólica e enzimática programadas e controladas, tem possibilitado a aquisição de compostos de alto valor agregado e de importante interesse industrial (MANTOVANI, 2009). As enzimas tem papel fundamental nesse processo. Consistindo em um ou mais cadeias de aminoácidos, as enzimas são uma classe de macromoléculas capazes de juntar pequenas moléculas efetuando assim a reação de catálise (BOMMARIUS, 2015).

O processo biocatalítico requer cuidados com relação a inocuidade, visto que a entrada de bactérias e outros microrganismos pode prejudicar o processo de biotransformação gerando compostos indesejáveis e até mesmo a morte dos microrganismos de interesse (KIMURA; ITO, 2019).

É relatada a capacidade da estirpe *S. cerevisiae* na biotransformação de compostos presentes em *Perilla frutescens* (KIMURA; ITO, 2019), transformação de ácido ricinoleico em γ -decalactone (RONG et al., 2017), reação de fucosilação a partir de o-glicosilação (CHIGIRA et al., 2008), redução do corante índigo (SHIN; SON; YOO, 2019), conversão de ácidos graxos em alcanos (FOO et al., 2017), glicose em ácido adípico (RAJ et al., 2018), entre outras.

3 OBJETIVO

3.1 Objetivo Geral

Realizar a síntese e caracterização de derivados dos óleos essenciais de *Cymbopogon citratus* e *Piper nigrum* e verificar compostos formados frente a processo biocatalítico mediado por *Saccharomyces cerevisiae*.

3.2 Objetivos específicos

- Extrair óleo essencial de *C. citratus* e *P. nigrum* por Hidrodestilação;
- Realizar processo biocatalítico e caracterizar os produtos formados após o processo pela técnica de EC/GM e comparar com as propriedades do óleo essencial;
- Testar a atividade antibacteriana dos óleos e do material biocatabolizado pelo Método da Difusão em Disco;
- Determinar da atividade inibitória da AChE frente aos óleos e amostras em estudo; e,
- Testar a atividade larvicida frente ao *Aedes aegypti*.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados nas instalações da Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira (UNILAB), campus Auroras, nos laboratórios de Química Orgânica, Centro de Estudos em Microbiologia (CEMIC) e no Laboratório de Produtos Naturais e Biotecnologia do Departamento de Química Orgânica, da Universidade Federal do Ceará (UFC).

4.1 Obtenção do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* e *Piper nigrum* e rendimento

O procedimento para extração dos óleos essenciais de capim-limão e pimenta-preta foram realizados no Laboratório de Química Orgânica da UNILAB pelo método de Hidrodestilação em equipamento tipo Clevenger por três horas, sendo utilizada 200g de cada vegetal. O óleo de *C. citratus* foi extraído a partir da parte aérea (folhagem) fresca da planta. Enquanto para *P. nigrum*, o óleo foi extraído das sementes secas. Após extração foi possível calcular o rendimento por meio da equação 1:

Equação 1. Equação do rendimento percentual do óleo essencial.

$$ROE(\%) = \frac{Mo}{Mmv} \times 100, \text{ onde:}$$

ROE é o rendimento do óleo essencial, em %;

Mo é a massa do óleo extraído, em g;

Mmv é a massa do material vegetal, em g.

4.2 Ensaio biocatalítico

O teste biocatalítico seguiu metodologia de Nunes et al., (2013) e Yang, et. al., (2000) com adaptações e em triplicata. A estirpe *Saccharomyces cerevisiae* foi empregada como agente biotransformador dos compostos presentes no óleo essencial de capim-limão e pimenta-preta. O microrganismo pertencente a coleção de culturas microbianas Professora Regine Vieira, foi cedido pelo Laboratório de Microbiologia Ambiental e do Pescado (LAMAP/UFC).

Inicialmente a levedura *S. cerevisiae* foi submetida ao teste de susceptibilidade contra os óleos essenciais de *C. citratus* e *P. nigrum*. O procedimento foi realizado pelo método de difusão em disco de acordo com o estabelecido pela Clinical and Laboratory Standards Institute - CLSI, (2008) discutido no item 4.3 deste documento.

Para o ensaio, foi preparado o Caldo Batata Dextrose (CBD) que se deu pelo cozimento de 200g/L de batata inglesa em água destilada por 10 minutos, contados a partir do início da

fervura. Após cozimento, o líquido foi filtrado em papel filtro e adicionou-se 20g/L de Dextrose e homogeneizado. O pH foi ajustado para 6,5 e em seguida o meio de cultura foi esterilizado em autoclave a 121°C por 15 minutos.

A estirpe *Saccharomyces cerevisiae* armazenada em estufa DBO, foi renovada para tubos contendo Ágar Batata Dextrose (ABD) e incubada em estufa microbiológica por 24h a 30°C. Passado período de incubação, a estirpe foi transferida para tubos contendo solução salina 0,85%. A densidade microbiana foi ajustada de acordo com a escala de McFarland a 0,5 em espectrofotômetro (620nm).

Após o ajuste da densidade microbiana, com auxílio de swab estéril a *S. cerevisiae* foi inoculada em placas contendo ABD, com 5mm de espessura de meio, para obtenção do tapete microbiano. As placas inoculadas foram mantidas em estufa microbiológica a 30°C por 24h.

Após período de crescimento e observado a formação do tapete microbiano sobre o meio de cultura, foram perfurados discos de 0,6mm no ágar com auxílio de um perfurador. Três discos foram transferidos para erlenmeyers de 250mL contendo 50mL de Caldo Batata Dextrose. A solução foi mantida em incubadora tipo *shaker* com agitação de 120rpm, por 24h a 30°C. Observada a turvação da amostra, foi adicionado 5mL do óleo essencial de *C. citratus* e *P. nigrum* em ensaios separados e novamente os frascos foram mantidos em estufa tipo *shaker* por 72h/120rpm/35°C.

Após a amostra permanecer três dias sob incubação, os compostos orgânicos foram extraídos com Acetato de Etila P. A. (20mL) por quatro vezes e em seguida o material foi evaporado em rotoevaporador (60°C a 80rpm). Os novos compostos formados foram analisados por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa CG-MS.

4.3 Teste de susceptibilidade antimicrobiana

As cepas *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) e *Escherichia coli* (ATCC 25922) utilizadas neste trabalho foram cedidas pelo LAMAP/UFC e armazenadas no laboratório de microbiologia da Unilab.

O teste de avaliação da capacidade antimicrobiana dos óleos essenciais e das amostras biossintetizadas a partir desses óleos, seguiu os parâmetros preconizados pela CLSI, (2008) com adaptações.

4.3.1 Preparo das estirpes, das amostras e semeadura

As cepas em estudo estavam armazenadas em estufa DBO (Demanda Bioquímica de Oxigênio), foram aclimatadas a temperatura ambiente e em seguida repicadas para tubos contendo Ágar Mueller-Hinton e incubadas em estufa bacteriológica a 35°C por 24h. Após período para

crescimento, foi realizado o ajuste da densidade bacteriana a escala de McFarland 0,5, em espectrofotômetro, leitura de absorvância em 620nm.

As amostras de óleo essencial de *C. citratus*, *P. nigrum* e do material biossintetizado foram previamente diluídas em etanol 95% na proporção de 1:1; 1:2; 1:4; 1:8, 1:10 além de uma amostra bruta (B).

O tapete bacteriano foi realizado com auxílio de *swab* estéril sobre as placas contendo Ágar Mueller-Hinton (camada de meio com espessura de 5mm), em seguida, discos brancos de papel filtro estéreis foram dispostos sobre a superfície das placas e embebidos com 10µL das amostras de óleo essencial de *C. citratus*, *P. nigrum* e do material biossintetizado, previamente diluídas em etanol 95% nas proporções citadas acima, além da amostra bruta. As placas foram incubadas em estufa bacteriológica a 35°C e a leitura dos resultados realizada após 48h, sendo observado a formação de um halo de inibição de crescimento ao redor dos discos.

Como controle do teste usou-se Cloranfenicol 30µg (marca Laborclin) para *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. Para *Pseudomonas aeruginosa* o controle foi feito com Gentamicina 10µg (marca Laborclin). Como controle positivo para crescimento foi empregado um disco embebido apenas com etanol 95%. Todo o experimento foi feito em duplicata.

4.4 Atividade inibitória da Acetilcolinesterase (AChE) frente ao óleo essencial de capim-limão, pimenta-preta e biotransformados

O teste para observação da degradação da enzima acetilcolinesterase foi realizado no Laboratório de Produtos Naturais e Biotecnologia do Departamento de Química Orgânica e Inorgânica da UFC.

Baseado no protocolo descrito por Ellman et al.(1961), adaptado para CCD por Rhee et al. (2001). Trata-se de um método colorimétrico utilizado de forma qualitativa e quantitativa, mas efeitos desse trabalho foi utilizada somente a forma qualitativa. É um método rápido e sensível para a seleção de amostras com ação anticolinesterásica.

O ensaio metodológico consistiu na retirada de uma alíquota de 5µl do material em estudo, óleo essencial e óleo biotransformado, (10mg/mL) aplicado em uma cromatoplaça (DC-Alufolien, Silicagel 60 F254, 0,2 mm Merck). Após a completa evaporação do solvente, foi borrifado uma mistura (1:1) de iodeto de acetilcolina (ATCI) 1mmol.L⁻¹ com o reagente de Ellman (ácido 5,5' – Ditiobis- (2-nitrobenzóico, DTNB, 1 mmol.L-1), a placa em reação foi deixada em repouso por 3 minutos para a secagem. Em sequência foi borrifado a enzima acetilcolinesterase (4,5U/ml). Após 10 minutos, ocorreu o surgimento de uma coloração amarela, com formação de um halo branco de

inibição ao redor dos “spots” onde as amostras foram aplicadas. A formação do halo indicando resultado positivo para degradação da enzima aplicada.

Como controle positivo, foi utilizada a solução do padrão de sal Eserina 1mg/mL.

4.5 Teste de atividade larvicida ante *Aedes aegypti*

O teste foi baseado em metodologia descrita por SILVA et al., (2002) e FURTADO et al., (2005) com adaptações.

O experimento foi realizado no Laboratório de Entomologia médica do Departamento de Patologia e Medicina Legal da UFC. Inicialmente, as larvas de *Aedes aegypti*, em terceiro estágio, foram contadas e reservadas em béckers. As amostras dos óleos essenciais e do material biotransformado foram diluídas em solução aquosa de dimetil sulfóxido 2% (DMSO, Synth ACS) nas concentrações de 1000; 500; 250; 125; 62,5; 31,25µg/mL.

As larvas foram selecionadas com auxílio de pipeta de Pasteur e colocadas em papel de filtro para a remoção do excesso de água e em seguida, 20 larvas foram distribuídas em 10 béckers (50 ml) contendo 20 ml das diluições. Como controle utilizou-se água e DMSO 2%. Após 24 e 48h de exposição das larvas aos tratamentos, o número de larvas mortas foi registrado, sendo consideradas mortas aquelas que não apresentavam movimento ou não respondiam aos estímulos com uma alça.

O teste foi realizado em triplicata a temperatura ambiente (entre 27°C e 30°C). Os resultados foram tratados em *software* estatístico GraphPad Prism 6.0 e BioStat 5.0.1.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Rendimento do óleo essencial de *Piper nigrum* e *Cymbopogon citratus*

Diversos fatores podem influenciar no rendimento, como a genética da planta, manejo de cultivo, região, variação climática, horário de colheita, técnica empregada para a extração do óleo essencial, armazenamento, entre outros fatores (OLIVEIRA, 2011; SANTOS et al., 2009).

Para o capim-limão partiu-se de 180g de massa da parte aérea do vegetal, sendo obtido 2,5g de óleo, resultando em um rendimento de 1,38%. Enquanto para a pimenta-preta, foi utilizado 140g dos frutos da planta, sendo obtido 3,2g de óleo, um rendimento de 2,28%, após três horas em sistema de hidrodestilação.

Para *C. citratus*, o rendimento encontrado neste estudo foi superior ao relatado por Lima et al., (2016) e Santos et al., (2009) que obtiveram rendimentos máximos de 0,34% e 0,97%, respectivamente. De acordo com estudos, o rendimento de capim-limão não é influenciado pelo horário da colheita (LIMA et al., 2016), sendo as condições climáticas mais amenas e maior precipitação com melhor impacto sobre o rendimento desse vegetal (KOSHIMA; MING; MARQUES, 2016; SANTOS et al., 2009). Para *P. nigrum* não foram encontrados relatos para o rendimento.

5.2 Caracterização química das amostras de OE e material biocatabolizado por EC/GM

Inicialmente foi realizado o teste de susceptibilidade usando apenas os óleos essenciais e a levedura *S. cerevisiae*, a partir do foi possível determinar em 1:2 como a concentração máxima de óleo que poderia ser utilizada no experimento (Tabela 1). De forma a garantir a sobrevivência da levedura, foi estabelecida a concentração máxima de 10% de óleo a ser introduzida no sistema biocatalítico.

Tabela 1. Teste de susceptibilidade dos óleos essenciais de *C. citratus* e *P. nigrum* contra a levedura *S. cerevisiae*.

Amostra	Concentração ($\mu\text{L}/\text{mL}$)	<i>S. cerevisiae</i>
OE <i>C. citratus</i>	B	30mm
	1:1	21mm
	1:2	6mm
	1:4	-
OE <i>P. nigrum</i>	B	22mm
	1:1	11mm
	1:2	-

A partir da análise por Cromatografia Gasosa acoplada ao Espectro de Massa (CG/EM) foi possível obter a composição das amostras em estudo, tendo sido identificado no óleo essencial de *C. citratus* nove compostos, em *C. citratus* BT seis, para *P. nigrum* sete compostos e em *P. nigrum* BT cinco (Tabela 2).

Tabela 2. Composição química do óleo essencial de *C. citratus* e *P. nigrum* e de suas amostras biocatabolisadas por *S. cerevisiae*

Constituintes	<i>C. citratus</i>		<i>C. citratus</i> BT		<i>P. nigrum</i>		<i>P. nigrum</i> BT	
	TR	%	TR	%	TR	%	TR	%
4-hydroxy-4-methylpentan-2-one	4.485	5.64	-	-	-	-	-	-
6-methyl-5-hepten-2-one	8.529	1.15	-	-	-	-	-	-
β -myrcene	8.657	18.27	8.657	16.6	-	-	8.657	8.22
3-carene	12.323	1.58	-	-	-	-	-	-
<i>Cis-p</i> -mentha-2,8-dien-1-ol	14.602	1.41	14.603	7.8	-	-	-	-
Isoneral	15.239	2.81	-	-	-	-	-	-
Carveol	17.370	30.12	-	-	-	-	-	-
6,6-dimethyl-2-r-Bicyclo[3.1.1]heptano	17.794	5.71	-	-	-	-	-	-
Citral	18.427	31.75	-	-	-	-	-	-
2-isopropenyl-5-methyl-4-hexenal	-	-	14.923	69.23	-	-	-	-
Neral	-	-	15.239	0.59	-	-	-	-
Geraniol	-	-	17.400	0.50	-	-	-	-
Neric acid	-	-	22.6814	5.28	-	-	-	-
Canfeno	-	-	-	-	949	15.4	-	-
d-Limonemo	-	-	-	-	13.87	8.9	13.87	16.82
Normilacetato	-	-	-	-	1282	7.7	-	-
Delta-elemeno	-	-	-	-	1335	6.6	-	-
β -cariofileno	-	-	-	-	1416	13.5	-	-
Elemol	-	-	-	-	1544	0.3	-	-
α -bisabol	-	-	-	-	1684	0.5	-	-
α -pinene	-	-	-	-	-	-	10.64	6.58
β -phellandrene	-	-	-	-	-	-	11.95	23.59
Cubebeno	-	-	-	-	-	-	24.40	4.21
Total identificado		98,44		100		52,9		59,42

TR: Tempo de retenção; BT: Biotransformado.

A partir da análise por cromatografia gasosa do OE de *C. citratus* foi identificado o Citral como composto majoritário, representando 31,75% da composição do óleo, seguido de Carveol (30,12%), β -myrcene (18,27%), 6,6-dimethyl-2-r-Bicyclo[3.1.1]heptano (5,71%), 4-hydroxy-4-methylpentan-2-one (5,64%), Isoneral (2,81%), 3-carene (1,58%), *Cis-p*-mentha-2,8-dien-1-ol

(1,41%) e 6-methyl-5-hepten-2-one (1,15%). Resultado similar ao apresentado por outros autores, embora divirjam os percentuais e a diversidade de compostos relatados (MANH et al., 2020; PLATA-RUEDA et al., 2020; OLIVEIRA et al., 2017; LIMA et al., 2016).

Em *C. citratus* BT foi identificado β -myrcene (16,6%), cis-p-menth-2,8-dien-1-ol (7,8%), nerolic acid (5,58%), neral (0,59%), geraniol (0,50%). Chama atenção a formação majoritária de 2-isopropenyl-5-methyl-4-hexenal, correspondendo a 69,23%. Este mesmo composto também foi encontrado por Shingh et al., (2008) ao estudar óleo essencial isolado do botão floral de *Dracocephalum heterophyllum* e por Jin et al., (2010) ao estudar *Rhodiola sachalinensis*.

Observa-se em *C. citratus* BT, após reação biocatalítica, a redução percentual de β -myrcene de 18,27 para 16,6% e o aumento do isômero de p-menthadienol, cis-p-menth-2,8-dien-1-ol, de 1,41 para 7,8%. Comparativamente, este percentual é superior ao naturalmente encontrado na espécie *Elyonurus hensii* (LOUMOAMOU et al., 2017).

Segundo experimento realizado por Esmaeilil, Rohany, Safaiyan, (2013) com a cepa *Saccharomyces cerevisiae*, em seis dias houve a formação de cinco novos compostos a partir do citral e após quinze dias o processo rendeu um total de dez novos compostos. O rendimento e formação de compostos está sujeita a fatores como a técnica de cultivo celular em que a levedura foi empregada, meio nutriente e estímulos para crescimento ótimo, como rotação e temperatura.

Para *P. nigrum*, o composto majoritário foi o canfeno (15,4%), seguido do β -cariofileno (13,5%), d-limoneno (8,9%), nornilacetato (7,7%), delta-elemeno (6,6%), α -bisabol (0,5%) e elemol (0,3%). Apresentando similaridade com os resultados encontrados por outros autores, embora a diversidade de compostos tenha sido menor (BASTOS et al., 2020; CHANDRAN et al., 2016). Embora não tenham sido identificados neste estudo, β -myrcene, β -phellandrene, cubebeno e α -pipene, foram relatados em trabalhos com o óleo essencial realizado por Chandran et al., (2016) e α -pipene por Bastos et al., (2020).

Da amostra de *P. nigrum* BT, foi possível identificar β -phellandrene (23,59%) como composto majoritário, seguido de d-limoneno (16,82%), β -myrcene (8,22%), α -pipene (6,58%), cubebeno (4,21%). Chama atenção a formação de β -myrcene e β -phellandrene, 8,22% e 23,59% respectivamente, e o aumento percentual em d-Limoneno de 8,9 para 16,82%.

Entre os compostos que apresentam aplicação comercial, destacam-se o β -myrcene, d-Limoneno na indústria de alimentos como aromatizante e flavORIZANTE (OKARU; LACHENMEIER, 2017; GIARRATANA et al., 2015; LIMA et al., 2012), β -phellandrene aromatizante e cosmético, sendo considerado de difícil e onerosa obtenção (MELIS, 2017; BENTLEY et al. 2013).

O percentual, presença e diversidade de compostos podem variar, ainda que numa mesma

espécie, de acordo com fatores bióticos e abióticos, tais como interações ecológicas (planta-microrganismo, por exemplo), estágio de desenvolvimento biológico, idade, nutrientes no solo, luminosidade, regime de chuvas, entre outros (MOGHADDAM; MEHDIZADEH, 2017; MORAIS, 2009).

5.3 Teste de susceptibilidade

Os resultados do teste de susceptibilidade estão expressos na Tabela 3. A atividade inibitória das amostras tem resultado decrescente a medida em que as diluições aumentam.

Tabela 3. Concentração Inibitória Mínima (CIM) do óleo essencial de capim-limão, pimenta-preta e seus compostos biotransformados ($\mu\text{L}/\text{mL}$).

Amostra	Concentração ($\mu\text{L}/\text{mL}$)	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853
OE <i>C. citratus</i>	B	17mm	12mm	-
	1:1	15mm	6mm	-
	1:2	6mm	-	-
	1:4	-	-	-
C. citratus BT	B	17mm	15mm	14mm
	1:1	15mm	10mm	5mm
	1:2	13mm	-	-
	1:4	10mm	-	-
OE <i>P. nigrum</i>	B	-	-	-
	1:1	-	-	-
	1:2	-	-	-
	1:4	-	-	-
P. nigrum BT	B	18mm	12mm	11mm
	1:1	13mm	10mm	5mm
	1:2	-	-	-
	1:4	-	-	-

BT: Biotransformado; OE: óleo essencial; B: amostra bruta; Fonte: autor.

O óleo essencial de *Cymbopogon citratus* apresentou atividade antimicrobiana ante *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Saccharomyces cerevisiae*, mas não inibiu *Pseudomonas aeruginosa*, diferente de “*C. citratus* BT” (material biocatalisado por *S. cerevisiae* a partir do óleo de *C. citratus*) que apresentou atividade na Concentração Inibitória Mínima (CIM) de 1:1.

No teste, o óleo essencial de *Piper nigrum* não apresentou atividade ante nenhuma das estirpes, porém, a amostra *P. nigrum* BT (material biocatalisado por *S. cerevisiae* a partir do óleo de *P. nigrum*) mostrou-se eficiente em inibir todas as bactérias em estudo apresentando eficiência similar ao óleo de *C. citratus*.

O óleo bruto de capim-limão apresentou ação antimicrobiana superior ao encontrado por Lima et al., (2016) que contabilizou, a partir de uma amostra de 5µL, halos de 8 e 9mm para *E. coli* e *S. aureus* respectivamente. O resultado foi superior também ao encontrado por Bassolé et al., (2011), para *E. coli* (15mm), mas inferior para *S. aureus* (23mm).

Estudos de Assis et al., (2017); Almeida et al., (2013); Trajano et al., (2010); Naik et al., (2010) confirmam a atividade antimicrobiana sobre *E. coli* e *S. aureus*. A ausência de ação antimicrobiana do óleo essencial de capim-limão sobre *P. aeruginosa* também foi observada por Naik et al., (2010).

Para o teste com *S. aureus*, os resultados para o óleo essencial de *Piper nigrum* batem com os apresentados por García-Díez et al., (2016), em ensaio realizado pelo método de disco-difusão, onde não houve atividade inibitória. O resultado contrasta do obtido por López; Mahecha e Vargas (2016), onde foi possível observar a inibição de *S. aureus* pelo método de microdiluição em caldo. A explicação pode estar no uso de diferentes metodologias aplicadas pelo autores dos estudos, mas também na qualidade do óleo, já que a riqueza e a quantidade dos compostos varia de acordo com uma série de fatores, como clima, solo, variedade, entre outros.

A não-sensibilidade do óleo ante *E. coli* difere do resultado obtido por Sreejai et al., (2019), onde foi relatado halo de 22mm. Embora o autor também tenha observado a resistência por *P. aeruginosa* ao óleo.

Para o controle de *S. aureus* e *E. coli* foram aplicados discos impregnados com Cloranfenicol, para *P. aeruginosa* o controle foi feito com Gentamicina (Tabela 4).

Tabela 4. Controle do teste antimicrobiano.

Controle	<i>E. coli</i> (ATCC 25922)	<i>S. aureus</i> (ATCC 25923)	<i>P. aeruginosa</i> (ATCC 27853)
Cloranfenicol	39mm	36mm	-
Gentamicina	-	-	25mm

ATCC: American Type Culture Collection; Fonte: autor

5.4 Atividade Larvicida

O cálculo para Concentração Letal a 50% (CL₅₀) consiste em identificar a concentração necessária para que um composto bioativo, ao entrar em contato com um grupo de um mesmo organismo (seja adulto ou imaturo) acarrete na morte de 50% dos indivíduos.

Os dados foram tabulados utilizando *Software* estatístico GraphPad Prism 6.0, a partir de metodologia descrita por Minho, Gaspar e Domingues (2016).

De acordo com a análise estatística, o material biocatalizado a partir do OE de *C. citratus* é o mais eficiente em levar as larvas de *A. aegypti* a morte, tendo uma CL₅₀ de 28,504µg/mL, enquanto o óleo essencial apresentou concentração letal em 40,057µg/mL. O óleo essencial de *P. nigrum* apresentou CL₅₀ de 47,048µg/mL e seu material biocatabolizado de 41,590µg/mL, sendo por tanto mais eficaz que o óleo (Tabela 5).

Tabela 5. Concentração Letal para 50% (CL₅₀)¹ de *A. aegypti* e coeficiente de de determinação (R²) das amostras em estudo.

T	OE <i>C. citratus</i>		<i>C. citratus</i> BT		OE <i>P. nigrum</i>		<i>P. nigrum</i> BT	
	CL ₅₀ (CL 95%)	R ²	CL ₅₀ (CL 95%)	R ²	CL ₅₀ (CL 95%)	R ²	CL ₅₀ (CL 95%)	R ²
24h	23,67a (15,38 - 46,35)	0,987	184,2b (43,01 - 12157)	0,982	28,3a (12,12 - 336,3)	0,935	24,83a (12,91 - 101,0)	0,963
48h	56,55a (27,87 - 196,7)	0,990	222,7b (57,34 - 5821)	0,988	226,2b (36,53 -)	0,969	354,4c (39,81 -)	0,966

T: tempo; OE: Óleo essencial; BT: Biocatabolizado; CL₅₀: Concentração letal para 50% dos organismos; R²: Coeficiente de determinação; ¹Médias com mesma letra nas linhas não diferem entre si (p>0,05), pelo teste de Tukey.

Ao comparar os resultados deste estudo com o encontrado por outros autores é possível observar similaridades e discrepância, isso pode ser explicado entre outros fatores pela forma de extração de óleos e extratos, metodologia e condições de cultivo dos vegetais.

De acordo com MAHN et al., (2020), obteve CL₅₀ 120,6µg/mL para *C. citratus* e 104,4µg/mL para *Eucalyptus citriodora*, resultados muito superiores ao denotado pelas amostras em estudo. Em contra partida, quando comparado com *Cymbopogon winterianus*, CL₅₀ 38,8µg/mL, e *Eucalyptus camaldulensis*, CL₅₀ 33,7µg/mL, apenas a amostra de material biocatalizado a partir de *C. citratus* apresento concentração letal inferior.

O ensaio demonstrou que o óleo essencial e de *P. nigrum* BT é mais eficiente quando comparado com extrato da folha da planta que apresenta CL₅₀ de 32,23µg/mL (LIJA-ESCALINE et al., 2015).

A mortalidade percentual de *A. aegypti* foi calculado de acordo com a Equação 02.

Equação 2. equação da mortalidade percentual de larvas de *A. aegypti*.

$$Mo(\%) = \frac{NLM}{NLI} \times 100, \text{ onde :}$$

Mo (%): Mortalidade percentual de larvas;

NLM: Número de larvas mortas; e,

NLI: Número de larvas introduzidas.

A partir da Tabela 5 é possível observar que a medida que a dose das amostras de óleo essencial e de material biossintetizado é reduzida a quantidade de larvas vivas aumenta.

Tabela 6. Mortalidade de *A. aegypti* em 24 e 48 horas submetidas a amostras de óleo essencial e material biocatabolizado por *S. cerevisiae*.

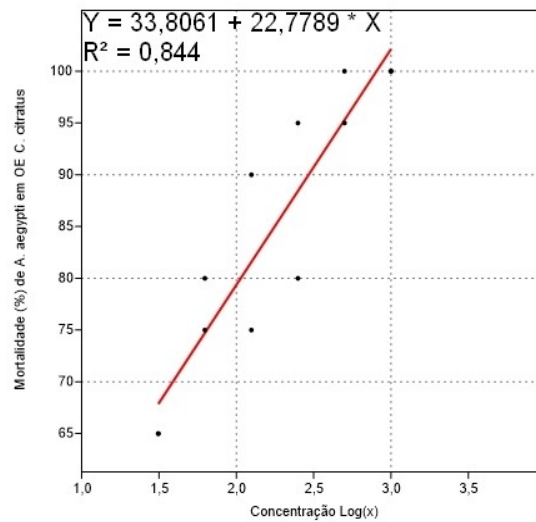
Conc. (µg/mL)	OE ¹ <i>C. citratus</i>		<i>C. citratus</i> BT		OE ¹ <i>P. nigrum</i>		<i>P. nigrum</i> BT	
	Mo (%) 24h	Mo (%) 48h	Mo (%) 24h	Mo (%) 48h	Mo (%) 24h	Mo (%) 48h	Mo (%) 24h	Mo (%) 48h
1000	100	100	90	100	87,5	92,5	95	100
500	97,5	100	87,5	97,5	85	90	80	80
250	87,5	92,5	87,5	90	80	85	85	87,5
125	82,5	87,5	90	90	77,5	85	82,5	82,5
62,5	77,5	90	87,5	87,5	75	85	75	87,5
31,25	65	77,5	82,5	82,5	52,5	72,5	57,5	75

¹Óleo essencial; ²Biossintetizado; Mo: Mortalidade.

O efeito pode ser observado também nos gráficos de correlação a seguir para 24 e 48 horas. O teste de Correção é usado para pontar um efeito dose-resposta, indo de 0 a 1. Quanto mais próximo de 1, maior é a relação dose-resposta com consequente maior inclinação da reta.

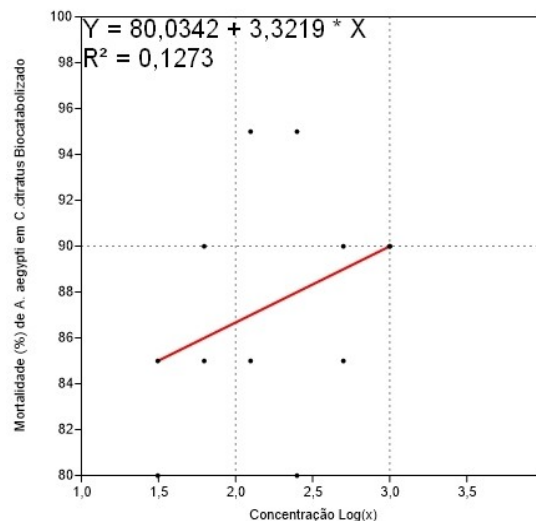
A partir do teste de correlação, é possível observar que a relação entre a dose de amostra e a mortalidade de *A. aegypti* em 24 é maior no óleo *C. citratus* com um R² de 0,844 (Gráfico 1), enquanto o menor coeficiente foi observado no seu respectivo material biossintetizado (R²: 0,1273) (Gráfico 2). O óleo essencial de *C. citratus* apresentou resultado similar ao encontrado por Soonwera e Phasomkusolsil, (2016), sendo maior em larvas de terceiro estágio (R²: 0,6281) e menor ao comparado com larvas em quarto estágio (R²: 0,9029).

Gráfico 1. Correlação entre a mortalidade de larvas de *A. aegypti* em 24h e a concentração de OE de *C. citratus*.



Fonte: o autor.

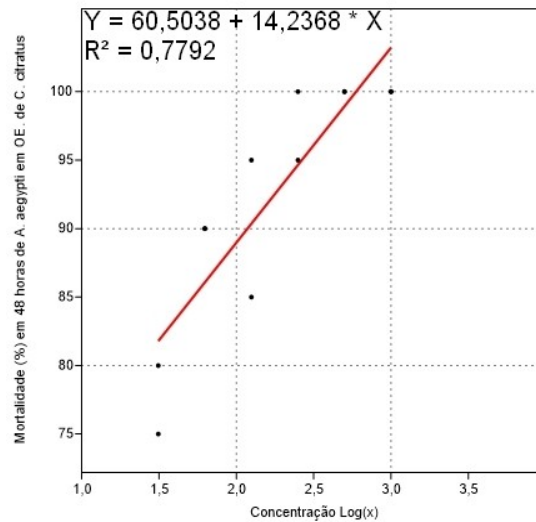
Gráfico 2. Correlação entre a mortalidade de larvas de *A. aegypti* em 24h e a concentração de *C. citratus* BT.



Fonte: o autor.

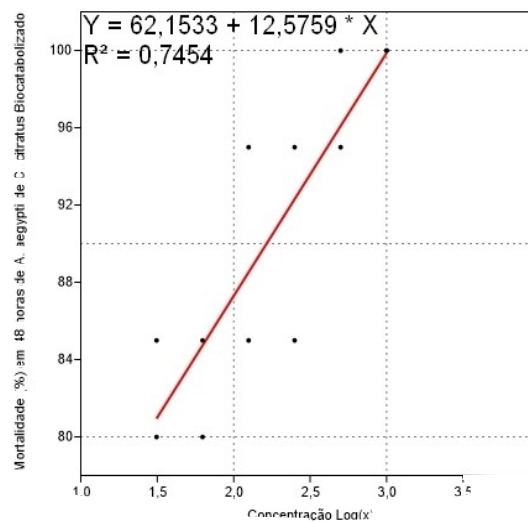
Após 48 horas houve uma redução na inclinação da reta, mas o óleo de *C. citratus* ainda apresenta relação dose-resposta mais eficiente (Gráfico 3). Para a amostra de óleo biossintetizada houve um aumento na inclinação da reta, passando a apresentar resultado similar ao do óleo (Gráfico 4).

Gráfico 3. Correlação entre a mortalidade de larvas de *A. aegypti* em 48 horas e a concentração de OE de *C. citratus*.



Fonte: o autor.

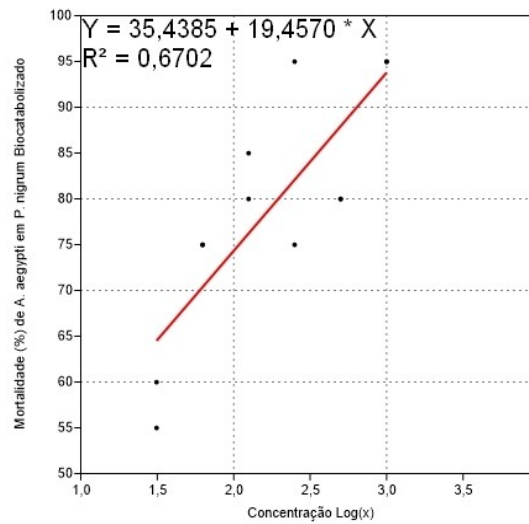
Gráfico 4. Correlação entre a mortalidade de larvas de *A. aegypti* em 48h e a concentração de *C. citratus* BT.



Fonte: o autor.

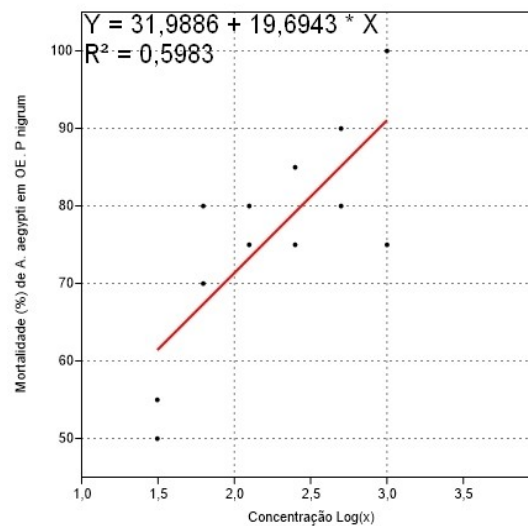
No estudo com o óleo essencial de *P. nigrum*, observa-se o inverso em relação ao demonstrado pelo OE de *C. citratus*. O material biossintetizado apresentou maior correlação dose-resposta que o óleo, com R^2 de 0,6702 (Gráfico 5) e 0,5983 (Gráfico 6) respectivamente.

Gráfico 5. Correlação entre a mortalidade de larvas de *A. aegypti* em 24 h e a concentração de *P. nigrum* BT.



Fonte: o autor.

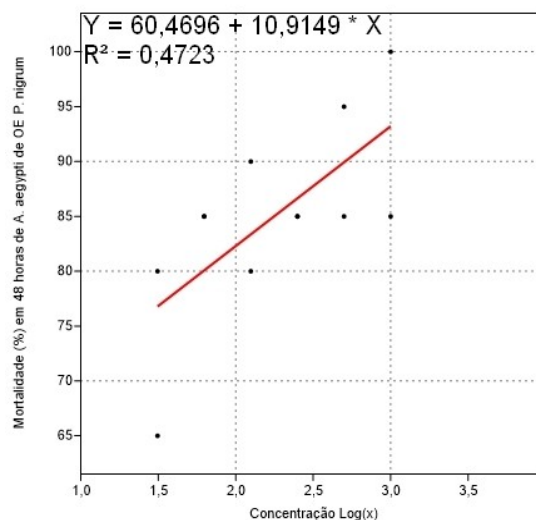
Gráfico 6. Correlação entre a mortalidade de larvas de *A. aegypti* em 24h e a concentração de OE de *P. nigrum*.



Fonte: o autor.

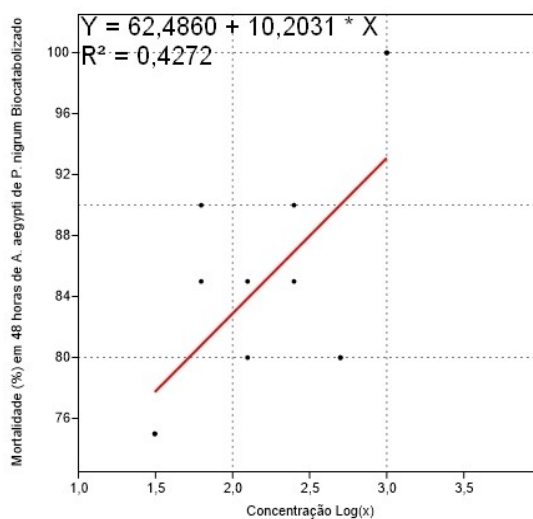
Para o óleo de *P. nigrum*, a relação é maior nas primeiras 24 horas, após 48 horas observa-se a redução na inclinação da reta de dose-resposta (Gráfico 7 e 8)

Gráfico 7. Correlação entre a mortalidade de larvas de *A. aegypti* em 48h e a concentração de OE de *P. nigrum*.



Fonte: o autor.

Gráfico 8. Correlação entre a mortalidade de larvas de *A. aegypti* em 48h e a concentração de *P. nigrum* BT.



Fonte: o autor.

A eficiência das amostras de óleo em ocasionar mortalidade de *A. aegypti* pode estar relacionada a riqueza de compostos presentes no material (SOONWERA; PHASOMKUSOLSIL, 2016).

5.5 Atividade inibitória da enzima AChE

O óleo essencial de capim-limão e de pimenta-preta não apresentaram resultado positivo para a inibição da enzima acetilcolinesterase (AChE), porém, o material biotransformado apresentou resultado satisfatório no teste (Tabela 4).

Tabela 4. Atividade Inibitória da AChE frente as amostras de óleos essenciais de *C. citratus*, *P. nigrum* e dos óleos biotransformados.

Amostra	Resultado	Diâmetro do halo (mm)
<i>Cymbopogon citratus</i>	Negativo	6
<i>Piper nigrum</i>	Negativo	8
<i>C. citratus</i> BT	Positivo	9
<i>P. nigrum</i> BT	Positivo	7
Padrão eserina	Positivo	9

BT: Biotransformado. Fonte: autor

O resultado do teste para capim-limão diverge de estudos como o de Kiendrebeogo et al., (2011), Satish, (2013) e Adaramoye e Azeez, (2014) que constataram atividade de inibição da AChE. O resultados diverge para pimenta-preta também é controverso, pois, segundo os autores Xiang et al., (2017), Tu et al., (2015) e Ahmed et al., (2013) o óleo devia apresentar atividade inibitória.

Presentes nos óleos, o β -cariofileno e o 3-carene deveriam apresentar ação anti-AChE (MENICHINI et al., 2009).

O composto α -pipene e limoneno presentes na amostra *P. nigrum* BT são relatado como inibidor da enzima AChE (ZARRAD et al., 2015; DOHI; TERASAKI; MAKINO, 2009; MENICHINI et al., 2009). Compostos como canfeno, β -myrcene, citral, neral, geraniol e canfeno não possuem ação inibitória da AChE (KAUFMANN; DOGRA; WINK, 2011).

A partir dos resultados do estudo para inibição da acetilcolinesterase pode-se concluir que os óleos essenciais de capim-limão e pimenta-preta não apresentaram comportamento como um anticolinesterásico. Enquanto as amostras dos mesmo óleos biotransformadas por *Saccharomyces cerevisiae*, apresentaram resultado positivo de inibição da AChE. Compostos capazes de inibir enzima AChE são potenciais fármacos para Doença de Alzheimer e o tratamento de doenças relacionadas.

6 CONCLUSÕES

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* é capaz de gerar novos compostos a partir de amostras de óleo essencial de *Cymbopogon citratus* e *Piper nigrum*.

As amostras biossintetizadas e de óleo essencial de *C. citratus* foram capazes de inibir os *E. coli*, *S. aureus* e *P. aeruginosa*.

Os óleos essenciais não demonstraram atividade inibitória da acetilcolinesterase, embora as amostras biossintetizados a partir das amostras de óleos tenham sido eficientes nesse sentido.

Todos as amostras de óleos essenciais e biossintetizados apresentaram atividade larvicida, sendo *C. citratus* BT o material com resultado mais relevante.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABAD-FRANCH, F.; ZAMORA-PEREA, E.; FERRAZ, G.; PADILLA-TORRES, S. D.; LUZ, S. L. B. Mosquito-disseminated pyriproxyfen yields high breeding-site coverage and boosts juvenile mosquito mortality at the neighborhood scale. **PLoS Negl Trop Dis.** v. 9, n. 4, p. 1-17, 2015.
- ADAMS, M.; GMUEDNER, F.; HAMBURGER, M. Plants traditionally used in age related brain disorders - A survey of ethnobotanical literature. **Journal of Ethnopharmacology**, v.113, p.363-81, 2007.
- ADARAMOYE, O. A.; AZEEZ, F. A. Evaluation of Antioxidant and Acetylcholinesterase-inhibitory Properties of Methanol Extracts of *Nauclea latifolia*, *Cymbopogon citratus* and *Cocos nucifera*: An *In vitro* Study. **British Journal of Medicine & Medical Research**, v. 4, n. 11, p. 2156-2170, 2014.
- AHMED, H. H.; SALEM, A. M.; SABRY, G. M.; HUSEIN, A. A.; KOTOB, S. E. Possible Therapeutic Uses of *Salvia triloba* and *Piper nigrum* in Alzheimer's Disease-Induced Rats. **J Med Food**, v. 16, n. 5, p. 437-446, 2013.
- ALMEIDA, R. B. A.; AKISUE, G.; CARDOSO, L. M. L.; JUNQUEIRA, J. C.; JORGE, A. O. C. Antimicrobial activity of the essential oil of *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf. On *Staphylococcus* spp., *Streptococcus mutans* and *Candida* spp. **Rev. Bras. Pl. Med.**, v.15, n.4, p.474-482, 2013.
- ALVES, T. M. A.; SILVA, A. F.; BRANDÃO, M.; GRANDI, T. S. M.; SMÂNIA, E. F. A.; SMÂNIA, JR., A.; ZANI, C. L. Biological screening of Brazilian medicinal plants. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 95, p. 367-373, 2000.
- AMARANTE, C. B.; MULLER, A. H.; PÓVOA, M. M.; DOLABELA, M. F. Estudo fitoquímico biomonitorado pelos ensaios de toxicidade frente à *Artemia salina* e de atividade antiplasmódica do caule de aninga (*Montrichardia linifera*). **Acta Amazônica**. v. 41, n. 3, p. 431-434, 2011.
- ANDRIANA, Y.; XUAN, T. D.; QUY, T. N.; TRAN, H. D.; LE, Q. T. Biological Activities and Chemical Constituents of Essential Oils from *Piper cubeba* Bojer and *Piper nigrum* L. **Molecules**, v. 24, p.1-16, 24101876, 2019.
- ARAÚJO, H. R. C.; CARVALHO, D. O.; IOSHINO, R. S.; COSTA-DA-SILVA, A. L.; CAPURRO, M. L. *Aedes aegypti* control strategies in Brazil: incorporation of new technologies to overcome the persistence of dengue epidemics. **Insects**. v. 6, n. 2, p. 576–594, 2015.
- ASSIS, Y. P. A. S.; ALMEIDA, A. C.; NOGUEIRA, W. C. L.; SOUZA, C. N.; GONÇALVES, S. F.; SILVA, F. E. G.; SANTOS, V. K. F. R.; MARTINS, E. R. Antibacterial activity and stability of microencapsulated lemon grass essential oil in feeds for broiler chickens. **Rev. Bras. Saúde Prod. Anim.**, v. 18, n. 4, p. 587-593, 2017.

- ATYAME, C. M.; LABBÉ, P.; LEBON, C.; WEILL, M.; MORETTI, R.; MARINI F.; GOUAGNA, L. C.; CALVITTI, M.; TORTOSA, P. Comparison of irradiation and *Wolbachia* based approaches for sterile-male strategies targeting *Aedes albopictus*. **PLoS One**, v. 11, n. 1, e0146834, 2016.
- BAGHERI, H.; MANAP, M. Y. B. A.; SOLATI, Z. Antioxidant activity of *Piper nigrum* L. essential oil extracted by supercritical CO₂ extraction and hydro-distillation. **Talanta**, v.121, p.220–228, 2014.
- BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils – a review. **Food Chem. Toxicol**, v.46, p.446–475, 2008.
- BALY, A.; FLESSA, S.; COTE, M.; THIRAMANUS, T.; VANLERBERGHE, V.; VILLEGAS, E.; JIRAROJWATANA, S.; STUYFT, P. V. D. The cost of routine *Aedes aegypti* control and of insecticide-treated curtain implementation. **Am J Trop Med Hyg**, v. 84, n. 5, p.747–752, 2011.
- BALY, A.; TOLEDO, M. E.; RODRIGUEZ, K.; BENITEZ, J. R.; RODRIGUEZ, M.; BOELAERT, M.; VANLERBERGHE, V.; STUYFT, P. V. D. Costs of dengue prevention and incremental cost of dengue outbreak control in Guantanamo, Cuba. **Trop Med Int Health**, v. 17, n. 1, p. 123–132, 2012.
- BARALDI, P.T.; CORRÊA, A.G. Baker's yeast, *Saccharomyces cerevisiae*, as a tool for the synthesis of pheromones. **Química Nova**, v. 27, n. 3, p. 421-431, 2004.
- BAROSA, J., FERREIRA, A., FONSECA, B. e SOUZA, I. **Teste de toxicidade de cobre para *Artemia salina*** – Poluição e ecotoxicologia marinha, Nov. 2003.
- BASSOLÉ, I. H. N.; LAMIEN-MEDA, A.; BAYALA, B.; OBAME, L. C.; ILBOUDO, A. J.; FRANZ, C.; NOVAK, J.; NEBIÉ, R. C.; DICKO, M. H. Chemical composition and antimicrobial activity of *Cymbopogon citratus* and *Cymbopogon giganteus* essential oils alone and in combination. **Phytomedicine**,v.18, n.12, p. 1070-1074. 2011.
- BASTOS, L. P. H.; VICENTE, J.; DOS SANTOS, C. H. C.; DE CARVALHO, M. G.; GARCIA-ROJAS, E. E. Encapsulation of black pepper (*Piper nigrum* L.) essential oil with gelatin and sodium alginate by complex coacervation. **Food Hydrocolloids**, v.102, 105605, 2020.
- BAYALA, B.; BASSOLE, I. H. N.; MAQDASY, S.; BARON, S.; SIMPORE, J.; LOBACCARO, J. M. A. *Cymbopogon citratus* and *Cymbopogon giganteus* essential oils have cytotoxic effects on tumor cell cultures. Identification of citral as a new putative anti-proliferative molecule. **Biochimie**, v. 153, p. 162-170, 2018.
- BENTLEY, F. K.; GARCÍA-CERDÁN, J. G.; CHEN, H-C.; MELIS, A. Paradigm of monoterpene (β -phellandrene) hydrocarbons production via photosynthesis in *cyanobacteria*. **BioEnergy Res**, v. 6, p. 917–929, 2013.

- BESERRA, E. B.; FERNANDES, C. R.; RIBEIRO, P. S. [Larval density as related to life cycle, size and fecundity of *Aedes (Stegomyia) aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae) in laboratory]. **Neotrop Entomol**, v. 38, n. 6, p. 847-52, 2009.
- BOMMARIUS, A. S. Biocatalysis: A Status Report. Annu. **Rev. Chem. Biomol. Eng.**, v. 6, p. 319–345, 2015.
- BOOBIS, A.; CHIODINI, A.; HOEKSTRA, J.; LAGIOU, P.; PRZYREMBEL, H.; SCHLATTER, J.; SCHÜTTE, K.; VERHAGEN, H.; WATZL, B. Critical appraisal of the assessment of benefits and risks for foods. In: BRAFO Consensus Working Group. **Fd Chem Toxicol**, v. 55. p. 659-675, 2013.
- BRACHT, F.; CONCEIÇÃO, G. C. DA; SANTOS, C. F. M. DOS. A América conquista o mundo: uma história da disseminação das especiarias americanas a partir das viagens marítima do século XVI. **Revista Brasileira de Pesquisa em Alimentos**, v. 2, n. 1, 2011.
- BRAGA, I. A.; VALLE, D. *Aedes aegypti*: histórico do controle no Brasil. **Epidemiol Serv Saude.** , v.16, n.2, p.113–8, 2007.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Saúde Brasil 2010: uma análise da situação de saúde e de evidências selecionadas de impacto de ações de vigilância em saúde [Internet]. Brasília, DF: Ministério da Saúde; 2011. Acesso em 25 de Dezembro de 2019. Disponível em: <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/saude_brasil_2010.pdf>.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Boletim Epidemiológico 59**. Brasília, 2018. 14 p.
- CARMO, E. S.; PEREIRA, F. O.; MOREIRA, A. C. P.; BRITO, L. L.; GAYOSO, C. W.; COSTA, J. G. M.; LIMA, E. O. Essential oil from *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf: a promising natural product against *Malassezia* spp. **Rev Inst Adolfo Lutz**, v. 71, n. 2, p. 386-391, 2012.
- CARNEVALLI, D. B.; ARAÚJO, A. P. S. Atividade Biológica da Pimenta Preta (*Piper nigrum* L.): Revisão de Literatura. **Uniciências**, v. 17, n. 1, p. 41-46, 2013.
- CARVALHO, D. O.; COSTA-DA-SILVA, A. L.; LEES, R. S.; CAPURRO, M. L. Two step male release strategy using transgenic mosquito lines to control transmission of vector-borne diseases. **Acta Trop.**, v. 132, p. 170–177, 2014.
- CARVALHO, G. B. M.; BENTO, C. V.; SILVA, J. B. A. Elementos Biotecnológicos Fundamentais no Processo Cervejeiro: 3ª parte—A Maturação. **Revista Analytica**, v. 27, p. 69-74, 2007.
- CHADEE, D. D. Resting behaviour of *Aedes aegypti* in Trinidad: with evidence for the re-introduction of indoor residual spraying (IRS) for dengue control. **Parasit Vectors**, v. 6, n. 1, 6:255, 2013.

- CHANDRAN, J.; NAYANA, N.; ROSHINI, N.; NISHA, P. Oxidative stability, thermal stability and acceptability of coconut oil flavored with essential oils from black pepper and ginger. **J of Food Sci & Tech**, v.54, n.1, p.144–152, 2016.
- CHANTHAI, S.; PRACHAKOLL, S.; RUANGVIRIYACHAI, C.; LUTHRIA, D. Influence of extraction methodologies on the analysis of five major volatile aromatic compounds of Citronella Grass (*Cymbopogon nardus*) and Lemongrass (*Cymbopogon citratus*) Grown in Thailand. **J of AOAC Inter**, v. 5, n. 3, p. 763-72. 2012.
- CHATTERJEE, S.; NIAZ, Z.; GAUTAM, S.; ADHIKARI, S.; VARIYAR, P. S.; SHARMA, A. Anti-oxidant activity of some phenolic constituents from green pepper (*Piper nigrum* L.) and fresh nutmeg mace (*Myristica fragrans*), **Food Chem.** v. 101, p.515–523, 2007.
- CHIGIRA, Y.; OKA, T.; OKAJIMA, T.; JIGAMI, Y. Engineering of a mammalian O-glycosylation pathway in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: production of O-fucosylated epidermal growth factor domains. **Glycobiology**, v. 18, n. 4, p. 303-314, 2008.
- CORRÊA, P. R. L.; FRANÇA, E.; BOGUTCHI, T. F. Infestação pelo *Aedes aegypti* e ocorrência da dengue em Belo Horizonte, Minas Gerais. **Rev Saúde Pública**. v.39, n.1, p.33-40, 2005.
- COSTA, J. G. M. DA.; SANTOS, P. F. DOS.; BRITO, S. A.; RODRIGUES, F. F. G.; COUTINHO, H. D. M.; BOTELHO, M. A.; LIMA, S. G. DE. Composição Química e Toxicidade de Óleos Essenciais de Espécies de *Piper* Frente a Larvas de *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae). **Lat. Am. J. Pharm.** v. 29, n. 3, p. 463-7, 2010.
- CUSTÓDIO, K. M.; OLIVEIRA, J. G. DE.; DIEGO MOTERLE, D.; ZEPON, K. M.; PROPHIRO, J. S.; LUIZ ALBERTO KANIS, L. A. A biodegradable device for the controlled release of *Piper nigrum* (Piperaceae) standardized extract to control *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae) larvae. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 49, n. 6, p. 687-692, 2016.
- DAIO, E. C. S.; SOUZA, A. S.; COELHO, M. F. B.; AMORIM, A. V. Use of medicinal plants in piroás and Barra Nova, Redenção, Ceará, Brazil. **J of Global Biosc.** v. 6, n. 2, p. 4758-4762, 2017.
- DEVINE, G. J.; PEREA, E. Z.; KILLEEN, G. F.; STANCIL, J. D.; CLARK, S. J.; MORRISON, A. C. Using adult mosquitoes to transfer insecticides to *Aedes aegypti* larval habitats. **Proc Natl Acad Sci**. v. 106, n. 28, p. 11530–11534, 2009.
- DOHI, S., TERASAKI, M., MAKINO, M. 2009. Acetylcholinesterase Inhibitory Activity and Chemical Composition of Commercial Essential Oils. **Agric. Food Chem**, n. 57, p. 4313–4318, 2009.
- DUTRA, H. L. C.; ROCHA, M. N.; DIAS, F. B. S.; MANSUR, S. B.; CARAGATA, E. P.; MOREIRA, L. A. *Wolbachia* Blocks Currently Circulating Zika Virus Isolates in Brazilian *Aedes aegypti* Mosquitoes. **Cell Host & Microbe**, v. 19, p. 771–774, 2016.

- DYE C. The analysis of parasite transmission by bloodsucking insects. **Annu Rev Entomol.** v.37, p.1–19, 1992.
- EKPENYONG, C. E.; AKPAN, E. E. Use of *Cymbopogon citratus* Essential Oil in Food Preservation: Recent Advances and Future Perspectives. **Critical Rev. Food Sci. Nutr.** v. 5, n. 0, p. , 2015.
- ELLMAN G. L., COURTNEY K. D., ANDRES V. JR., AND FEATHERSTONE R. M., A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochem. Pharmacol.** v. 7, p. 88-95, 1961.
- ESMAEILI, A.; ROHANY, S.; SAFAIYAN, S. Biotransformation of Citral by free and immobilized *Saccharomyces cerevisiae*. **Chemistry of Natural Compounds**, v. 48, n. 2, p. 288-290, 2013.
- FABER, K.; **Biotransformations, In Organic Chemistry: A Textbook**, 3rd Ed.; Springer-Verlag: Berlin, Germany, 1997.
- FARIA, N. R.; AZEVEDO, R. S. S.; KRAEMER, M. U. G.; et al. Zika virus in the Americas: Early epidemiological and genetic findings. **Science**, n. 352, v. 6283, p. 345–349, 2016.
- FARIAS, J. C.; MIRANDA, G. D. R.; SANTOS, M. H. B.; BOMFIM, B. L. S.; FONSECA FILHO, I. C.; FRANÇA, S. M.; BARROS, R. F. M.; SILVA, P. R. R. Medicinal flora cultivated in backyards of a community in Northeast, Brazil. **Ethnobotany Research & Appli.** v. 18, n. 28, p. 1-13, 2019.
- FERRARA, M. A.; ALMEIDA, D. S.; SIANI, A. C.; LUCCHETTI, L.; LACERDA, P. S.;
- FREITAS, A.; TAPPIN, M. R.; BON, E. P. Bioconversion of R-(+)-limonene to perillic acid by the yeast *Yarrowia lipolytica*. **Braz. J. Microbiol**, v. 44, n. 4, p. 1075–1080, 2013.
- FIGUEIRÓ, A. C.; SÓTER, A. P.; BRAGA, C.; HARTZ, Z. M. A.; SAMICO, I. Análise da lógica de intervenção do Programa Nacional de Controle da Dengue. **Rev Bras Saude Matern Infant.** v.10, supl.1, p.93–106, 2010.
- FOO, J. L.; SUSANTO, A. V.; KEASLING, J. D.; LEONG, S. S. J.; CHANG, M. W. Whole-Cell Biocatalytic and De Novo Production of Alkanes From Free Fatty Acids in *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 114, n. 1 , p. 232-237, 2017.
- FURTADO, R. F.; LIMA, M. G. A. de.; ANDRADE NETO, M.; BEZERRA, J. N. S.; SILVA, M. G. de V. Atividade Larvicida de Óleos Essenciais Contra *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae). **Neotropical Entomology**, v.34, n.5, p.843-847, 2005.
- GAMERO, A.; MANZANARES, P.; QUEROL, A.; BELLOCH, C. Monoterpene alcohols release and bioconversion by *Saccharomyces* species and hybrids. **Int J Food Microbiol**, v. 145, p. 92–97, 2011.

- GARCÍA-DÍEZ, J.; ALHEIRO, J.; PINTO, A. L.; SOARES, L.; FALCO, V.; FRAQUEZA, M. J.; PATARATA, L. Behaviour of food-borne pathogens on dry cured sausage manufactured with herbs and spices essential oils and their sensorial acceptability. **Food Control**, v.59, p.262-270, 2016.
- GEROMINI, K. V. N.; RORATTO, F. B.; FERREIRA, F. G.; POLIDO, P. P.; SOUZA, S. G. H.; VALLE, J. S. Atividade antimicrobiana de óleos essenciais de plantas medicinais. **Arq. Ciênc. Vet. Zool.** v. 15, n. 2, p. 127-131 2012.
- GIARRATANA, F.; MUSCOLINO, D.; PANEBIANCO, F.; PATANIA, A.; BENIANTI, C.; ZIINO, G.; GIUFFRIDA, A. Activity of (R)-(+)-limonene against anisakis larvae. **Italian Journal of Food Safety**, v. 4, n. 4, 2015.
- GONZALES, E.; MELLO, H. H. DE C.; CAFÉ, M. B. Uso de antibióticos promotores de crescimento na alimentação e produção animal. **Revista UFG**, v. 13, n. 13, p. 48-52, 2012.
- GUIMARÃES, L. G. L.; CARDOSO, M. G.; SOUSA, P. E.; ANDRADE, J.; VIEIRA, S. S. Atividades antioxidante e fungitóxica do óleo essencial de capim-limão e do citral. **Revista Ciência Agronômica**, v. 42, n. 2, p. 464-472, 2011.
- HARLES, H. C.; DALBY, P. A.; WOODLEY, J. M.; **J. Chem. Technol. Biotechnol.** v. 82, p. 1063, 2017.
- HARTATIE, E. S.; PRIHARTINI, I.; WIDODO, W.; WAHYUDI, A. Bioactive Compounds of Lemongrass (*Cymbopogon citratus*) essential oil from different parts of the plant and distillation methods as natural antioxidant in broiler meat. **IOP Conf. Series: Materials Science and Engineering**, v. 532, n. 01, p. 1-6, 2019.
- HEINTZE, C.; GARRIDO, V. M.; KROEGER, A. What do community based dengue control programmes achieve? A systematic review of published evaluations. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg**, n.101, p.317–325, 2007.
- HIROTA, B. C. K.; PAULA, C. S.;MIGUEL, O. G.; MIGUEL, M. D. Avaliação de toxicidade in vitro: aplicabilidade do ensaio de letalidade frente á *Artemia salina*. **Visão Acadêmica, Curitiba**, v. 13, n. 2, p. 42-48, 2012.
- HOLT, S.; MIKS, M. H.; CARVALHO, B. T.; FOULQUIÉ-MORENO, M. R.; THEVELEIN, J. M. The molecular biology of fruity and floral aromas in beer and other alcoholic beverages. **FEMS Microbiol Rev.**, v. 43, n. 3, p. 193–222, 2018.
- HONG, K. K.; NIELSEN, J. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae*: a key cell factory platform for future biorefineries. **Cell Mol Life Sci**, v. 69, p. 2671–2690, 2012.
- HWANG, K. S.; KIM, Y. K.; PARK, K. W.; KIM, Y. T. Piperolein B and piperchabamide D isolated from black pepper (*Piper nigrum* L.) as larvicidal compounds against the diamondback moth (*Plutella xylostella*). **Pest Management Science**, v. 73, n. 8, p. 1564–1567, 2017.

IARC (International Agency for Research on Cancer). Monographs Volume 119: Some Chemicals that Cause Tumours of the Urinary Tract in Rodents. 21 February. 2019.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística-IBGE. **Censo Agropecuário 2017**. Disponível em: <<http://www2.sidra.ibge.gov.br/>>. Acesso em: 08/11/2019.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE. Sistema IBGE de Recuperação Automática – SIDRA. Produção agrícola municipal: Pará. Rio de Janeiro: IBGE; 2014 [citado em 2014 abr 6]. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/pam/2012/default.shtm>.

JEENA, K.; LIJU, V. B.; UMADEVI, N. P.; KUTTAN, R. Antioxidant, Anti-inflammatory and Antinociceptive Properties of Black Pepper Essential Oil (*Piper nigrum* Linn). **Journal of Essential Oil Bearing Plants**, v.17, n.1, 1072954, 2014.

JIN, Y.; PARK, D. W.; LI, X.; LI, D.; ROW, K. H. Primary study of volatiles composition of *Rhodiola sachalinensis* by using gas chromatography and mass spectrometry (GC/MS). **Korean Journal of Chemical Engineering**, v. 27, n. 4, p. 1262–1268, 2010.

KARUNAMOORTHY, K.; ILANGO, K. Larvicidal activity of *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf. and *Croton macrostachyus* Del. against *Anopheles arabiensis* Patton, a potent malaria vector. **European review for medical and pharmacological sciences**, v. 14, p. 57-62, 2010.

KAUFMANN, D.; DOGRA, A. K.; WINK, M. Myrtenal inhibits acetylcholinesterase, a known Alzheimer target. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, 63(10), 1368–1371, 2011.

KAUSHIK, N.; BISWAS, S.; SINGH, J. Biocatalysis and Biotransformation Processes – An Insight. **The Scitech Journal**, v. 01, p. 15-22, 2014.

KIENDREBEOGO, M.; COULIBALY, A. Y.; NEBIE, R. C. H.; ZEBA, B.; LAMIEN, C. E.; MEDA, A. L.-; NACOUUMA, O. G. Antiacetylcholinesterase and antioxidant activity of essential oils from six medicinal plants from Burkina Faso. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 21, n. 1, p. 63-69, 2011.

KIMURA, M.; ITO, M. Bioconversion of essential oil components of *Perilla frutescens* by *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Natural Medicines**, v. 74, n. 1, p. 189-199, 2019.

KOSHIMA, F. A. T.; MING, L. C.; MARQUES, M. O. M. Produção de biomassa, rendimento de óleo essencial e de citral em capim-limão, *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf, com cobertura morta nas estações do ano. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 8, n. 4, p. 112-116, 2006.

LABES, J. R.; WENDHAUSEN, R. Seleção de microorganismos com ação sobre compostos carbonilados gerando alcoóis quirais. **Dynamis revista tecno-científica**, n. 14, v. 1, p. 73-79, 2008.

LACON, G.; MORRISON, A. C.; ASTETE, H.; STODDARD, S.T.; PAZ-SOLDAN, V. A.; ELDER, J.P.; HALSEY, E. S.; SCOTT, T. W.; KITRON, U.; VAZQUEZ-PROKOPEC, G. M.

- Shifting patterns of *Aedes aegypti* fine scale spatial clustering in Iquitos, Peru. **PLoS Negl Trop Dis.** v. 8, n.8, e3038. 2014.
- LEITE, C. J. B.; SOUSA, O.P.; MEDEIROS, J. O. A.; CONCEIÇÃO, M.L.; SILVA, V. S. F.; SOUZA, E. L. Inactivation of *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, and *Salmonella Enteritidis* by *Cymbopogon citratus* D.C. Stapf. Essential Oil in Pineapple Juice. **Journal of Food Protection.** v. 79, n. 2, p. 213-219, 2016.
- LEITE, J. R.; SEABRA, M. L.; MALUF, E.; ASSOLANT, K.; SUCHECKI, D.; TUFIK, S.; KLEPACZ, S.; CALIL, H. M.; CARLINI, E. A. Pharmacology of lemongrass (*Cymbopogon citratus* Stapf). Assessment of eventual toxic, hypnotic and anxiolytic effects on humans. **J Ethnopharmacol**, v. 17, p. 75-83, 1986.
- LEMOES, G. C. S.; SANTOS, A. D.; FREITAS, S. P.; GRAVINA, G. A. Controle de plantas invasoras em cultivo orgânico e convencional de capim-limão (*Cymbopogon citratus* (DC) Stapf.). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 15, n. 3, p. 405-414, 2013.
- LEÓN, R.; FERNANDES, P.; PINHEIRO, H. M.; CABRAL, J. M. S. Whole-cell biocatalysis in organic media. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 23, p. 483–500, 1998.
- LI, Y. X.; ZHANGA, C.; PANA, S.; CHENA, L.; LIUA, M.; YANGA, K.; ZENG, C. X.; TIANA, J. Analysis of chemical components and biological activities of essential oils from black and white pepper (*Piper nigrum* L.) in five provinces of southern China. **LWT - Food Science and Technology**, v.117, 108644, 2020.
- LIJA-ESCALINE, J.; SENTHIL-NATHAN, S.; THANIGAIVEL, A.; PRADEEPA, V.; VASANTHA-SRINIVASAN, P.; PONSANKAR, A.; EDWIN, E. S.; SELIN-RANI, S.; ABDEL-MEGEED, A. Physiological and biochemical effects of botanical extract from *Piper nigrum* Linn (Piperaceae) against the dengue vector *Aedes aegypti* Liston (Diptera: Culicidae). **Parasitology Research**, v. 114, n.11, p. 4239–4249, 2015.
- LIMA, A. B. S de.; QUEIROGA, I. M. B. N.; SILVA, G. M. S.; COSTA, J. S. da.; GUEDES, J. P. S.;DANTAS, C. O.; CAVALCANTI, M. T. Characterization and application of *Lippia alba* (Mill) and *Cymbopogon citratus* D.C. Stapf. essential oils as natural sanitizers in coriander. **Food Sci. Technol**, v.39, n.4, p.993-998, 2019.
- LIMA, A. E. F.; CASTRO, E. A.; FERREIRA, D. A.; ABREU, C. M. W. S.; COELHO, E. L.; SÁ, D. M. A. T. Rendimento, caracterização química e atividade antibacteriana do óleo essencial de capim limão coletado em diferentes horários. **Magistra**, v. 28, v. 3/4, p. 369-378, 2016.
- LIMA, N. G.; SOUSA, D. P. de; PIMENTA, F. C.; ALVES, M. F.; SOUSA, F. S. de; MACEDO, R. O.; CARDOSO, R. B.; MORAIS, L. C. de; DINIZ, M. F. M.; ALMEIDA, R. N. de. Anxiolytic-like activity and GC-MS analysis of (R)-(+)-limonene fragrance, a natural compound found in food and

- plants. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 103, n. 3, p. 450-454, 2012.
- LONDONO-RENTERIA, B.; PATEL, J. C.; VAUGHN, M.; FUNKHAUSER, S.; PONNUSAMY, L.; GRIPPIN, C.; JAMESON, S. B.; APPERSON, C.; MORES, C. N.; WESSON, D. M.; COLPITTS, T. M.; MESHNICK, S. R. Long-Lasting Permethrin-Impregnated Clothing Protects against Mosquito Bites in Outdoor Workers. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 93, n. 4, p. 869–874, 2015.
- LÓPEZ, K. J. F.; MAHECHA, M. M. A.; VARGAS, O. L. T. Evaluación de la actividad antimicrobiana de oleorresinas en el desarrollo de películas biocompuestas. **Agronomía Colombiana Suplemento**, v. 1, p. 223-226, 2016.
- LOUMOUMAMOU, A. N.; BIKINDOU, K.; BITEMOU, E.; CHALARD, P.; SILOU, T.; FIGUEREDO, G. Optimization of the extraction of the p-menthadienol isomers and aristolone contained in the essential oil from *Elyonurus hensii* using a 2³ full factorial design. **Food Sci Nutr**, v. 5, p. 784–792, 2017.
- LUNA, J.S. et al., A study of the larvicidal and molluscicidal activities of some medicinal plants from northeast Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v.97, n.2, p.199-206, 2005.
- MAGEVSKI, G. C.; CZEPAK, M. P.; SCHMILDT, E. R.; ALEXANDRE, R. S.; FERNANDES, A. A. Propagação vegetativa de espécies silvestres do gênero Piper, com potencial para uso como porta enxertos em pimenta-do-reino (*Piper nigrum*). **Rev. Bras. Pl. Med.**, v.13, especial, p.559-563, 2011.
- MANH, H. D.; HUE, D. T.; HIEU, N. T. T.; TUYEN, D. T. T.; TUYET, O. T. The Mosquito Larvicidal Activity of Essential Oils from *Cymbopogon* and *Eucalyptus* Species in Vietnam. **Insects**, n. 11, v. 128, 11020128, 2020.
- MANH, H. D.; HUE, D. T.; HIEU, N. T. T.; TUYEN, D. T. T.; TUYET, O. T. The Mosquito Larvicidal Activity of Essential Oils from *Cymbopogon* and *Eucalyptus* Species in Vietnam. **Insects**, v. 11, n. 128, 2020.
- MARTINAZZO, A. P.; MELO, E. C.; CORREA, P. C.; SANTOS, R. H. S. Modelagem matemática e parâmetros qualitativos da secagem de folhas de capim-limão [*Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf]. **Revista Brasileira Plantas Mediciniais**, v. 12, n. 4, p. 488-498, 2010.
- MELIS, A. Terpene hydrocarbons production in cyanobacteria. In: **Cyanobacteria - Omics and manipulation**. Caister Academic Press, NY, p. 187-198, 2017.
- MELO, A. S. O.; MALINGER, G.; XIMENES, R.; SZEJNFELD, P. O.; ALVES SAMPAIO, S.; BISPO DE FILIPPIS, A. M. Zika virus intrauterine infection causes fetal brain abnormality and microcephaly: tip of the iceberg? **Ultrasound Obstet. Gynecol.** 47, 6–7. 2016.
- MENICHINI, F.; TUNDIS, R.; LOIZZO, M. R.; BONESI, M.; MARRELLI, M.; STATTI G. A.; MENICHINI, F.; CONFORTI, F. Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibition of

ethanolic extract and monoterpenes from *Pimpinella anisoides* V Brig. (Apiaceae). **Fitoterapia**, n. 80, p. 297–300, 2009.

MEYER, B. N.; FERRIGNI, N. R.; PUTNAM, J. E.; JACOBSEN, L. B.; NICHOLS, D. E.; MCLAUGHLIN, J. L. Brine Shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. **Journal of Medicine Plant Research**, v. 45, p.31-4,1982.

MINHO, A. P.; GASPAR, E. B.; DOMINGUES, R. Guia Prático para Determinação de Curva Dose-Resposta e Concentração Letal em Bioensaios com Extratos Vegetais. **Comunicado Técnico 93**, Bagé, RS. 2016.

MOGHADDAM, Mohammad; MEHDIZADEH, Leila. Chemistry of Essential Oils and Factors Influencing Their Constituents. In: GRUMEZESCU, Alexandru Mihai; HOLBAN, Alina Maria, **Soft Chemistry and Food Fermentation**, Academic Press, 2017, 379-419.

MORAIS, L. A. S. Influência dos fatores abióticos na composição química dos óleos essenciais. **Horticultura Brasileira**, v. 27, S4050-S4063, 2009.

MOTA, W. M.; BARROS, M. L.; CUNHA, P. E. L.; SANTANA, M. V. A.; STEVAM, C. S.; LEOPOLDO, P. T. G.; FERNANDES, R. P. M. Avaliação da inibição da acetilcolinesterase por extratos de plantas medicinais. **Rev. Bras. Pl. Med., Botucatu**, v.14, n.4, p.624-628, 2012.

NAHAK, G.; SAHU, R. K. Phytochemical Evaluation and Antioxidant activity of *Piper cubeba* and *Piper nigrum*. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v. 01, n. 08, p.153-157, 2011.

NAIK, M. I.; FOMDA, B. A.; JAYKUMAR, E.; BHAT, J. A. Antibacterial activity of lemongrass (*Cymbopogon citratus*) oil against some selected pathogenic bacteria. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 3, n. 7, p. 535-538, 2010.

NUNES, F. M.; SANTOS, G. F.; SARAIVA, N. N.; TRAPP, M. A.; MATTOS, M. C.; OLIVEIRA, M. C. F.; RODRIGUES-FILHO, E.; New fungi for whole-cell biotransformation of carvone enantiomers. Novel p-menthane-2,8,9-triols production. **Applied Catalysis A: General**. v. 468, p. 88-94, 2013.

OBAD, K.; ALI, K. S.; LAKAL, A. M.; BEKSHOKOV, K. S.; SAIDOV, M. S. Antibacterial activity of some essential oils against *Staphylococcus aureus* and *E. coli*. **World Journal of Pharmaceutical Research**, v. 5, n. 4, p. 1774-1779, 2016.

OKARU, A. O.; LACHENMEIER, D. W. The Food and Beverage Occurrence of Furfuryl Alcohol and Myrcene - Two Emerging Potential Human Carcinogens?, **Toxics**, v. 5, n. 9, 5010009, 2017.

OLIVEIRA, A. R. M. F. **Produção de óleo essencial de mentha x piperita var. Citrata sob diferentes condições de manejo** (83f). Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, BA, Brasil, 2011.

- OLIVEIRA, C. J.; ARAÚJO, T. L. Plantas medicinais: usos e crenças de idosos portadores de hipertensão arterial. **Revista Eletrônica de Enfermagem**, v. 9, p. 93-105, 2007.
- OLIVEIRA, L. G.; MANTOVANI, S. M. Transformações biológicas: contribuições e perspectivas. **Quim. Nova**, v. 32, n. 3, p. 742-756, 2009.
- OLIVEIRA, M. A. C. de; BORGES, A. C.; BRIGHENTI, F. L.; SALVADOR, M. J.; GONTIJO, A. V. L.; KOGA-ITO, C. Y. *Cymbopogon citratus* essential oil: effect on polymicrobial caries-related biofilm with low cytotoxicity. **Original Research Microbiology**, 31:e89, 2017.
- OLIVEIRA, M. M. M.; BRUGNERA, D. F.; CARDOSO, M. G.; GUIMARÃES, L. G. L.; PICCOLI, R. H. Rendimento, composição química e atividade antilisterial de óleos essenciais de espécies de *Cymbopogon*. **Rev. Bras. Pl. Med.** v. 13, n. 1, p. 8-16, 2011.
- OLIVEIRA, T. L. C. de.; CARDOSO, M. G.; SOARES, R. A.; RAMOS, E. M.; PICCOLI, R. H.; TEBALDI, V. M. R. Inhibitory activity of *Syzygium aromaticum* and *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf. essential oils against *Listeria monocytogenes* inoculated in bovine ground meat. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.44, n.2, p.357-365, 2013.
- ORHAN-YANIKAN, E.; SILVA-JANEIRO, S.; RUIZ-RICO, M.; JIMÉNEZ-BELENQUER, A. I.; AYHAN, K.; BARAT, J. M. Essential oils compounds as antimicrobial and antibiofilm agents against strains present in the meat industry. **Food Control**, v. 101, n. p. 29-38, 2019.
- ORSBORNE, J.; BANKS, S. D.; HENDY, A.; GEZAN, S. A.; KAUR, H.; WILDER-SMITH, A.; LINDSAY, S. W.; LOGAN, J. G. Personal protection of Permethrin-Treated clothing against *Aedes aegypti*, the vector of Dengue and Zika Virus, in the laboratory. **PLOS ONE** v. 11, n, 5, e0152805, 2016.
- PAREDES-ESQUIVEL, C.; LENHART, A.; DEL RÍO, R.; LEZA, M. M.; ESTRUGO, M.; CHALCO E.; CASANOVA, W.; MIRANDA, M. Á. The impact of indoor residual spraying of deltamethrin on dengue vector populations in the Peruvian Amazon. **Acta Trop**, 54, 139–144, 2016.
- PICINATO, M. A. C.; GRISOLIO, A. P. R.; CASELANI, K.; NUNES, J. O. R.; CARVALHO, A. A. B.; FERRAUDO, A. S. Dengue: uma visão sobre o vetor urbano *Aedes aegypti* e a difícil interface do seu controle. **Veterinária em Foco Veterinária**, v.13, n.1, p.11-25, 2015.
- PLATA-RUEDA, A.; MARTÍNEZ, L. C.; ROLIM, G. S.; COELHO, R. P.; SANTOS, M. H.; TAVARES, W. S.; ZANUNCIO, J. C.; SERRÃO, J. E. Insecticidal and repellent activities of *Cymbopogon citratus* (Poaceae) essential oil and its terpenoids (citral and geranyl acetate) against *Ulomoides dermestoides*. **Crop Protection**, v. 137, 105299, 2020.
- RAJ, K.; PARTOW, S.; CORREIA, K.; KHUSNUTDINOVA, A. N.; YAKUNIN, A. F.; MAHADEVAN, R. Biocatalytic production of adipic acid from glucose using engineered *Saccharomyces cerevisiae*. **Metabolic Engineering Communications**, v. 6, p. 28–32, 2018.

- REIS-CASTRO, L. Genetically modified insects as a public health tool: Discussing the different bio-objectification within genetic strategies. **Croat. Med. J.**, n.53, p.635–638, 2012.
- RHEE, I. K.; VAN DE MEENT, M.; INGKANINAN, K.; VERPOORTE, R. Screening for acetylcholinesterase inhibitors from Amaryllidaceae using silica gel thin-layer chromatography in combination with bioactivity staining. **Journal of Chromatography**, v. 915, p. 217-223, 2001.
- RONG, S.; YANG, S.; LI, Q.; CAI, B.; GUAN, S.; WANG, J.; ZHOU, Y.; CHEN, Y. Improvement of γ -decalactone production by stimulating the import of ricinoleic acid and suppressing the degradation of γ -decalactone in *Saccharomyces cerevisiae*. **Biocatalysis and Biotransformation**, v. 35, n. 2, p. 1-7, 2017.
- ROSA, C. S.; VERAS, K. S.; SILVA, P. R.; LOPES NETO, J. J.; CARDOSO, H. L. M.; ALVES, L. P. L.; BRITO, M. C. A.; AMARAL, F. M. M.; MAIA, J. G. S.; MONTEIRO, O. S.; MORAES, D. F. C. Composição química e toxicidade frente *Aedes aegypti* L. e *Artemia salina* Leach do óleo essencial das folhas de *Myrcia sylvatica* (G. Mey.) DC. **Revista Brasileira Plantas Medicinai**s, v. 18, n. 1, p. 19-26, 2016.
- SALAZAR, F. V.; ACHEE, N. L.; GRIECO, J. P.; PRABARIPAI, A.; OJO, T. A.; EISEN, L.; DUREZA, C.; POLSOMBOON, S.; CHAREONVIRIYAPHAP, T. Effect of *Aedes aegypti* exposure to spatial repellent chemicals on BG-Sentinel™ trap catches. **Parasites & Vectors**, v. 6, n. 145, 2013.
- SAMUEL, M.; OLIVER, S. V.; COETZEE, M.; BROOKE, B. D. The larvicidal effects of black pepper (*Piper nigrum* L.) and piperine against insecticide resistant and susceptible strains of *Anopheles malaria* vector mosquitoes. **Parasites & Vectors**, v.9, n.1, p. 1-9, 2016.
- SANTOS, A.; PADUAN, R. H.; GAZIN, Z. C.; JACOMASSI, E. D.; OLIVEIRA, P. S.; CORTEZ, D. A. G.; CORTEZ, L. E. R. Determinação do rendimento e atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf em função de sazonalidade e consorciamento. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 19, n. 2, p. 436- 441, 2009.
- SANTOS, J. M.; REZENDE, P. C. M.; CASTRO, P. F. S.; FREITAS, J. G. A.; BARROS, L. F. L. Avaliação do efeito repelência e larvicida do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* e *Cymbopogon nardus* no controle do *Aedes aegypti*. **Revista eletrônica de trabalhos acadêmicos**. v. 1, n. 3, p. 91-108, 2016.
- SANTOS, R. S. D. Produção de enzimas celulolíticas e xilanolíticas por fungos filamentosos utilizando resíduos da cadeia do biodiesel como fonte de carbono. 2012. f.113. Dissertação (Mestrado em Química) Programa de Pós-graduação em Química. UFVJM. **Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri**, Diamantina.

- SANTOS, S. R.; MELO, M. A.; CARDOSO, A. V.; SANTOS, R. L.; SOUSA, D.; CAVALCANTI, S. C. Structure-activity relationships of larvicidal monoterpenes and derivatives against *Aedes aegypti* Linn. **Chemosphere**, v. 84, n. 1, p. 150–153, 2011.
- SANTOS, S. R.; SILVA, V. B.; MELO, M. A.; BARBOSA, J. D.; SANTOS, R. L.; SOUSA, D. P.; CAVALCANTI, S. C. Toxic effects on and structure-toxicity relationships of phenylpropanoids, terpenes, and related compounds in *Aedes aegypti* larvae. **Vector Borne Zoonotic Dis.**, v. 10, n. 10, p. 1049–1054, 2010.
- SATISH, S. Investigation on Essential oil of *Cymbopogon citratus* in Treatment of Alzheimer's disease. **Asian Journal of Pharmacology and Toxicology**, n.1, v.1, p.17-25, 2013.
- SCHAEFER, C. A.; SILVA, V. D.; STAMBUK, B. U.; NASCIMENTO, M da G. Use of *Saccharomyces cerevisiae* yeasts in the chemoselective bioreduction of (1E,4E)-1,5-bis(4-methoxyphenyl)-1,4-pentadien-3-one in biphasic system. **J. Braz. Chem. Soc.** v. 24 n. 7, p. 1116-1122, 2013.
- SCHAFFNER, F.; MEDLOCK, J. M.; VAN BORTEL, W. Public health significance of invasive mosquitoes in Europe. **Clin Microbiol Infect**, v. 19, n. 8, p. 685-692, 2013.
- SCOTT, T. W.; CLARK, G. G.; LORENZ, L. H.; AMERASINGHE, P. H.; REITER, P.; EDMAN, J. D. Detection of multiple blood feeding in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) during a single gonotrophic cycle using a histologic technique. **J Med Entomol.** v.30, n.1, p.94–99. 1993.
- SHAH, G.; SHRI, R.; PANCHAL, V.; SHARMA, N.; SINGH, B.; MANN, A. S. Scientific basis for the therapeutic use of *Cymbopogon citratus*, Stapf (Lemon grass). **Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research**, v. 2, p. 3-8, 2011.
- SHIN, Y.; SON, K.; YOO, D. I. Using *Saccharomyces cerevisiae* Strains as Biocatalyst for Indigo Reduction. **Fibers and Polymers**, v. 20, n. 1, p. 80-85, 2019.
- SILVA, B. C. J. de; JUNG, W. G.; HOSSAIN, S.; WIMALASENA, S. H. M. P.; PATHIRANA, H. N. K. S.; HEO, G. J. Antimicrobial property of lemongrass (*Cymbopogon citratus*) oil against pathogenic bacteria isolated from pet turtles. **Lab Anim Res**, v. 33, n. 2, p. 84-91, 2017.
- SILVA, H. H. G.; SILVA, I. G. Influência do período de quiescência dos ovos sobre o ciclo de vida de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera, Culicidae) em condições de laboratório. **Rev Soc Bras Med Trop.** v.32, n.4, p.349–355. 1999.
- SILVA, L. E. da; GONÇALVES, M. V. S.; AMARAL, W.; QUADROS, D. A.; REIS, R. A.; AMARAL, L. D. P. do; GARCIA, L. F. H. B.; Chemical composition and antibacterial activity of *Cymbopogon citratus* and *Cymbopogon flexuosus* essential oils. **Ciência e Natura**, v.40, n.2, 2018.
- SILVA, N. L.; ARAÚJO, I. P. C.; BATISTA, M. R. F.; SANTOS, T. B. A.; FERNANDO, W. L.; AMARAL, F. R. Determinação da atividade antioxidante e do teor de flavonoides totais

equivalentes em quercetina em extrato aquoso de folhas de *Cymbopogon citratus* (D.C.) Stapf e *Melissa officinalis* Lam obtidos por decocção. *Conexão Ciência*, v. 12, n. 1, p. 46 – 53, 2017.

SINGH, B. R.; SINGH, V.; SINGH, R. K.; EBIBENI, N. Antimicrobial activity of lemongrass (*Cymbopogon citratus*) oil against microbes of environmental, clinical and food origin.

International Research of Pharmacy and Pharmacology, v. 1, n. 9, p. 228-236, 2011.

SINGH, N.; KAUL, V. K.; MEGEJI, N. W.; SINGH, V.; AHUJA, P. S. Essential oil composition of three accessions of *Dracocephalum heterophyllum* Benth. cultivated at Palampur, India. **Natural Product Research**, v. 22, n. 11, p. 927–936, 2008.

SOMPARN, N.; SAENTHAWEEUK, S.; NAOWABOOT, J.; THAEOMOR, A.;

KUKONGVIRIYAPAN, V. Effect of lemongrass water extract supplementation on atherogenic index and antioxidant status in rats. **Acta Pharm.** v. 68, p. 185–197, 2018.

SOONWERA, M.; PHASOMKUSOLSIL, S. Effect of *Cymbopogon citratus* (lemongrass) and *Syzygium aromaticum* (clove) oils on the morphology and mortality of *Aedes aegypti* and *Anopheles dirus* larvae. **Parasitol Res**, v. 115, n. 4, p. 1691-1703, 2016.

SOUZA-FORMIGONI, M. L.; LODDER, H. M.; GIANOTTI, F. O.; FERREIRA, T. M.; CARLINI, E. A. Pharmacology of lemongrass (*Cymbopogon citratus* Stapf). II. Effects of daily two month administration in male and female rats and in offspring exposed "in utero". **Journal of Ethnopharmacology**, v. 17, n. 1, p. 75-83, 1986.

SOUZA, Thaúsi Frota Sá Nogueira Neves de. **Efeito antinociceptivo e anti-edematogênico do Eugenol**. Programa de pós graduação em Ciências Fisiológicas. Universidade Estadual do Ceará - UECE. 2007.

SREEJAI, R.; RAJU, A.; BENCHAMIN, D.; ROSHAN, J. F.; SUJITHA, S.; KURUP, B. S. Comparative study of anti-microbial and phytochemical analysis of *Piper longum* and *Piper nigrum*. **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry**, v. 8, n. 2, p. 195-197, 2019.

TAUIL, P. L. Perspectivas de controle de doenças transmitidas por vetores no Brasil. **Revista da sociedade brasileira de medicina tropical**, v. 39, n. 3, p. 275-277, 2006.

TEMPORAO, J. G.; PENNA, G. O.; CARMO, E. H.; COELHO, G. E.; AZEVEDO, R. S. S.; NUNES, M. R. T.; VASCONCELOS, P. F. C. Dengue virus serotype 4, Roraima State, Brazil. **Emerg. Infect. Dis.**, 17, 938–940, 2011.

THOME, R. C.; YANG, H. M.; ESTEVA, L. Optimal control of *Aedes aegypti* mosquitoes by the sterile insect technique and insecticide. *Math Biosci.*, v. 223, n. 1, p. 12–23, 2010.

TRAJANO, V. N.; LIMA, E. O.; SOUZA, E. L.; TRAVASSOS, A. E. R. Inhibitory effect of the essential oil from *Eugenia caryophyllata* Thumb leaves on coalho cheese contaminating microorganisms. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.30, n.4, p.1001-1006, 2010.

TU, Y.; ZHONG, Y.; DU, H.; LUO, W.; WEN, Y.; LI, Q.; ZHU, C.; LI, Y. Anticholinesterases and antioxidant alkaloids from *Piper nigrum* fruits, **Natural Product Research**, v. 5, n. 3, p. 1-5, 2015.

VASCONCELOS, P. F. C. Doença pelo vírus Zika: um novo problema emergente nas Américas?. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 6, p. 9-10, 2015.

VILLAVERDE, J. M.; SANCHES, L.; TERRA, V. A.; CECCHINI, R.; CECCHINI, A. L.; LUIZ, R. C. Efeitos do óleo essencial do capim-limão (*Cymbopogon citratus* Stapf) sobre células humanas de melanoma (SK-MEL 147) e queratinócitos (HaCaT). **Biosaúde**, v. 15, n. 1, p. 22-36, 2013.

VINUTHA, B. PRASHANTH, D.; SALMA, K.; SREEJA, S. L.; PRATITI, D.; PADMAJA, R.; RADHIKA, S.; AMIT, A.; VENKATESHWARLU, K.; DEEPAK, M. Screening of selected Indian medicinal plants for acetylcholinesterase inhibitory activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v.109, p.359-63, 2007.

WIWATTANARATTANABUT, K.; CHOONHARUANGDEJ, S.; SRITHAVAJ, T. In Vitro anti-cariogenic plaque effects of essential oils extracted from culinary herbs. **Journal of Clinical and Diagnostic Research**, v. 11, n.9, p.30-35, 2017.

WOLFE, P. H. **A Study of Factors Affecting the Extraction of Flavor When Dry Hopping Beer**. Dissertação de Mestrado, Oregon State University, Corvallis, OR, USA, 2012.

XIANG, C-. P.; HAN, J-. X.; LI, X-. C.; LI, Y-. H.; ZHANG, Y.; CHEN, L.; QU, Y.; HAO, C-. Y.; LI, H-. Z.; YANG, C-. R.; ZHAO, S-. J.; MIN XU, M. Chemical Composition and Acetylcholinesterase Inhibitory Activity of Essential Oils from *Piper* Species. **J. Agric. Food Chem**, n. 65, p. 3702–3710, 2017.

ZARA, A. L. S. A.; SANTOS, S. M.; FERNANDES-OLIVEIRA, E. S.; CARVALHO, R. G.; COELHO, G. E. Estratégias de controle do *Aedes aegypti*: uma revisão. **Epidemiol. Serv. Saúde**, v. 25, n. 2, p. 391-404, 2016.

ZARRAD, K., HAMOUDA, A. B., CHAIEB, I., LAARIF, A., & JEMÂA, J. M.-B. Chemical composition, fumigant and anti-acetylcholinesterase activity of the Tunisian *Citrus aurantium* L. essential oils. **Industrial Crops and Products**, n. 76, p. 121–127, 2015.