Artigo

Composição Química e Atividades Biológicas do Óleo Essencial de *Peumus boldus* Molina (Monimiaceae)

Lopes, A. S. N.; Guesdon, I. R.; Corrêa, G. M.; Silva, L. S.; Mar, J. M.; Sanches, E. A.; Bezerra, J. de A.; do Carmo, D. F. M.*

Rev. Virtual Quim., 2020, 12 (2), 433-446. Data de publicação na Web: 7 de Abril de 2020

<http://rvq.sbq.org.br>

Chemical Composition and Biological Activities of the Essential Oil of *Peumus boldus* Molina (Monimiaceae)

Abstract: *Peumus boldus* essential oil, popularly known as “boldo-do-chile”, has been widely studied, because in its composition it has monoterpenes that have biological activities such as α -pinene, β -pinene, α -terpinene, limonene, linalol and 1,8-cineole. The objective of this article is to characterize the essential oil of commercially obtained Chilean leaves, and to evaluate the larvicidal properties against *Aedes aegypti* larvae, *Lipaphis erysimi* insecticide, and acetylcholinesterase inhibition *in vitro* by the adapted Ellman method, *in silico*, by computer simulation docking. The essential oil was collected by the Clevenger hydrodistillation method, and submitted to GC-MS analysis. Arithmetic indices were calculated and substances were identified by mass spectral analysis, and comparison with the library literature. The oil yielded 1.2 % and it was possible to identify 98.44 % of the chemical composition, consisting of monoterpenes, oxygenated monoterpenes, and aromatic compounds. The major constituents were ascaridol (35.24 %), 1,8-cineol (29.27 %), α -terpinene (18.16 %), isoascaridol (3.59 %), *trans*-pent-1-ene-4-ol (2.89 %) and α -pinene (1.67 %). The essential oil showed larvicidal activity against *A. aegypti* larvae ($LD_{50} < 50 \mu\text{g.mL}^{-1}$) and insecticidal activity against *Lipaphis erysimi* ($LD_{50} < 60 \mu\text{g.mL}^{-1}$). The essential oil showed no inhibition of the enzyme acetylcholinesterase, which was confirmed by the *in silico* evaluation of major substances that did not present satisfactory molecular coupling. These data corroborated the identification of the commercial leaf constituents of *Peumus boldus* and their biological properties.

Keywords: Boldo-do-chile; larvicide; insecticide; acetylcholinesterase inhibition.

Resumo

O óleo essencial de *Peumus boldus*, conhecido popularmente como boldo-do-chile, tem sido muito estudado, pois apresenta em sua composição monoterpenos que apresentam atividades biológicas como α -pineno, β -pineno, α -terpineno, limoneno, linalol e 1,8-cineol. O presente artigo tem como objetivo caracterizar o óleo essencial das folhas de boldo-do-chile, obtidas comercialmente, e avaliar as propriedades larvicida, frente às larvas de *Aedes aegypti*, inseticida contra *Lipaphis erysimi* e inibitórias da enzima acetilcolinesterase, *in vitro*, pelo método Ellman adaptado e *in silico*, por simulação computacional de docking. O óleo essencial foi coletado pelo método de hidrodestilação em aparelho de Clevenger e submetido à análise por CG-EM. Os índices aritméticos foram calculados e as substâncias foram identificadas por análise de espectros de massas e comparação com a biblioteca e literatura. O óleo apresentou rendimento de 1,2 % e foi possível identificar 98,44 % da composição química, constituído de monoterpenos, monoterpenos oxigenados e compostos aromáticos. Os constituintes majoritários foram ascaridol (35,24 %), 1,8-cineol (29,27 %), α -terpineno (18,16 %), isoascaridol (3,59 %), *trans*-pent-1-en-4-ol (2,89 %) e α -pineno (1,67 %). O óleo essencial apresenta atividade larvicida contra as larvas de *A. aegypti* ($DL_{50} < 50 \mu\text{g.mL}^{-1}$) e atividade inseticida frente a *Lipaphis erysimi* ($DL_{50} < 60 \mu\text{g.mL}^{-1}$). O óleo essencial não apresentou inibição da enzima acetilcolinesterase, o que foi confirmada pela avaliação *in silico* das substâncias majoritárias, estas não apresentaram acoplamento molecular satisfatório. Estes dados corroboraram a identificação dos constituintes de folhas comerciais de *Peumus boldus* e suas propriedades biológicas, bem como para o conhecimento do potencial farmacológico desta planta.

Palavras-chave: Boldo-do-chile; larvicida; inseticida; inibição de acetilcolinesterase.

* Universidade Federal do Amazonas, Instituto de Ciências Exatas e Tecnologia, Coordenação de Curso: Licenciatura em Química e Biologia, Campus de Itacoatiara, CEP 69103-128, Itacoatiara-AM, Brasil.

dominiquefmc@gmail.com
DOI: [10.21577/1984-6835.20200035](https://doi.org/10.21577/1984-6835.20200035)

Composição Química e Atividades Biológicas do Óleo Essencial de *Peumus boldus* Molina (Monimiaceae)

Aniele da S. N. Lopes,^a Isabel R. Guesdon,^a Geone M. Corrêa,^a Laiane S. Silva,^b Josiana M. Mar,^b Edgar A. Sanches,^b Jaqueline de A. Bezerra,^c Dominique F. de Moura do Carmo^{a,*}

^a Universidade Federal do Amazonas, Instituto de Ciências Exatas e Tecnologia, Campus de Itacoatiara, CEP 69103-128, Itacoatiara-AM, Brasil.

^b Universidade Federal do Amazonas, Laboratório de Polímeros Nanoestruturados, CEP 69077-000, Manaus, AM, Brasil

^c Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Amazonas, CEP 69020-120, Manaus-AM, Brasil.

*dominiquefmc@gmail.com

Recebido em 18 de Agosto de 2019. Aceito para publicação em 15 de Março de 2020

1. Introdução

2. Metodologia

- 2.1. Coleta e identificação botânica
- 2.2. Extração do óleo essencial
- 2.3. Análises do óleo essencial por CG-EM
- 2.4. Ensaio da atividade larvicida
- 2.5. Ensaio da atividade inseticida
- 2.6. Avaliação da inibição da acetilcolinesterase *in vitro*
- 2.7. Avaliação *in silico* do óleo essencial frente à enzima acetilcolinesterase por método de Docking Molecular
- 2.8. Análise estatística

3. Resultados e Discussões

- 3.1. Rendimento do óleo essencial
- 3.2. Identificação dos constituintes voláteis do óleo essencial
- 3.3. Ensaio da atividade larvicida frente às larvas de *A. aegypti*
- 3.4. Ensaio da atividade inseticida frente a *L. erysimi*
- 3.5. Atividade de inibição da enzima acetilcolinesterase *in vitro*
- 3.6. Avaliação *in silico* do óleo essencial frente à enzima acetilcolinesterase

4. Conclusão

1. Introdução

Peumus boldus Molina é uma espécie pertencente à família Monimiaceae, nativa das regiões central e sul do Chile. Por este motivo, é popularmente conhecida como boldo-do-chile,¹ (Figura 1). No Brasil, apesar de ser importada, a espécie é bastante conhecida e utilizada pela população de norte a sul do país, porém, confundindo-se com outras espécies diferentes (*Plectranthus barbatus* Andrews, *Plectranthus ornatus* Codd e *Vernonia condensata* Baker) também conhecidas vulgarmente como boldo.² As ações farmacológicas atribuídas à espécie boldo-do-chile e às demais espécies mencionadas estão direcionadas principalmente no tratamento de doenças digestivas associadas ao estômago e fígado, sendo o principal motivo pelo amplo consumo pela população brasileira.³ As farmacopeias fitoterápicas reconhecem os chás das folhas secas do boldo-do-chile como biologicamente ativo no tratamento de desconfortos intestinais.⁴

Além do amplo uso da espécie no tratamento de constipação intestinal,^{5,6} o boldo é bastante utilizado pelas comunidades indígenas dos Andes Chilenos no tratamento de outras doenças, sendo aplicada como anti-inflamatória, diurética, no tratamento de distúrbios hepáticos, colelitíase,¹ cálculos biliares, no reumatismo,⁷ e como antiespasmódica,⁸ dentre outras.⁹⁻¹¹ Algumas etnias, como os mapuche, utilizam as folhas da planta, em forma de chá, para tratar congestão nasal, cólicas menstruais, gases e dores de cabeça.¹²

Na composição química das folhas são mencionados a presença de óleos essenciais,

alcaloides, flavonoides, saponinas, taninos e fenólicos glicosilados.¹³ Os alcaloides são componentes majoritários na espécie¹⁴. Recentemente, através de métodos de quantificação por UHPLC-MS/MS, identificaram 18 alcaloides nas folhas, cascas, raízes e caule, sendo a boldina (alcaloide aporfinico) dominante nas cascas, laurólitsina no caule e raízes e laurotetanina nas folhas¹⁵ (Figura 2).

A boldina é considerada responsável pelas ações digestivas da planta, tanto nas secreções biliares e gástricas como na motilidade intestinal,¹⁶ além de apresentar atividade antioxidante,¹⁷ hepatoprotetora,¹⁸ atividade tripanossomícida *in vitro*,¹⁹ antitumoral, anti-inflamatória e antipirética.¹⁶ Estudos já foram realizados com ação anticolinesterásica do boldo e concluíram que a boldina poderá agir como um protótipo de futuros fármacos contra o Mal de Alzheimer.²⁰ O mal de Alzheimer é causado por um defeito na neurotransmissão colinérgica, assim, a enzima acetilcolinesterase (AChE) catalisa e hidrolisa a acetilcolina, impedindo as sinapses e a produção de estímulos.²¹ Um anticolinesterásico retarda a degradação da acetilcolina, assim, o neurotransmissor passa mais tempo na fenda sináptica, intensificando desta forma a transmissão colinérgica.²²

Os óleos essenciais (OEs) possuem esta denominação devido à sua composição lipofílica, seus constituintes são oriundos dos derivados de fenilpropanoides, compostos que apresentam uma cadeia lateral de três átomos de carbono ligada ao anel aromático, e dos terpenoides, substâncias compostas de unidades de isopreno. Os componentes terpênicos mais frequentes nos óleos essenciais são os monoterpenos,

Figura 1. Folhas secas de *Peumus boldus* (boldo-do-chile)

Figura 2. Estrutura dos alcaloides boldina (A), laurotetanina (B) e laurolitsina (C)

constituídos por 10 átomos de carbono, e os sesquiterpenos, constituídos por 15 átomos de carbono.²³⁻²⁵ Cerca de 300 membros dos terpenoides são descritos na literatura, sendo considerado um dos grupos mais importante de origem vegetal.²⁴

Relativo ao OE do boldo-do-chile, apesar de ocorrerem variações qualitativas e quantitativas na sua composição, em virtude da diferença da localidade geográfica e condições climáticas, os monoterpenos são os constituintes majoritários, sendo o ascaridol e o cineol os principais e os responsáveis pelo aroma “canforáceo” das folhas.¹²

Além do ascaridol, estudos já identificaram 46 componentes do óleo essencial, destacando-se os monoterpenos, limoneno, *p*-cimeno, β -felandreno, α -pineno, 1,8-cineol, sabineno, terpinen-4-ol, α -terpineol e os sesquiterpenos β -cariofileno, farnesol e α -humuleno.²⁶

Atividades biológicas de interesse também têm sido relatadas na literatura etnofarmacológica para o óleo essencial de *P. boldus*. Pesquisas confirmam experimentalmente que o OE microencapsulado apresenta impacto positivo na preservação de sementes de amendoim retidas na vagem,²⁷ além de apresentar atividade biológica sobre pragas, vetores²⁸ e insetos²⁹. Verdeguer e colaboradores (2011) observaram a atividade inseticida do óleo essencial de *P. boldus* e da fração enriquecida com Ascaridol frente ao mosquito *Culex quinquefasciatus* Say. Os resultados mostraram uma dose letal (DL₅₀) de 82,14 $\mu\text{g/mL}^{-1}$ para o óleo essencial, contendo 31,4% do referido monoterpeno, e uma DL₅₀ de 41,85 $\mu\text{g/mL}^{-1}$ para a fração enriquecida com ascaridol (89,5 % do monoterpeno), comprovando

o potencial larvicida das amostras.²⁹ O efeito herbicida do óleo do boldo-do-chile também já foi comprovado frente *Amaranthus hybridus* L. e *Portulaca oleracea* L. apresentando fitotoxicidade na concentração de 1 $\mu\text{L/mL}^{-1}$, sugerindo o uso do óleo essencial como um herbicida natural.³⁰

Outro estudo revelou a ação citotóxica dos óleos do boldo-do-chile,³¹ a atividade antimicrobiana também já foi reportada contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas como *Streptococcus pyogenes*, *Micrococcus* sp, *Staphylococcus aureus* e *Bacillus subtilis*.²⁶

Considerando o amplo espectro de atividades farmacológicas da planta boldo-do-chile, tanto pelos relatos da população através do uso popular quanto pelos estudos científicos realizados, este trabalho teve como objetivo analisar quimicamente o óleo essencial de *P. boldus* e avaliar sua ação larvicida frente às larvas de *A. aegypti*, inseticida frente *Lipaphis erysimi* e inibitória da enzima acetilcolinesterase (AChE) *in vitro* e *in silico*, a fim de verificar a ação anticolinesterásica dos constituintes majoritários presentes no óleo essencial de boldo-do-chile.

2. Metodologia

2.1. Coleta e identificação botânica

O material botânico de boldo-do-chile (*P. boldus*) foi obtido em um ponto comercial na cidade de Manaus (conhecido como Empório Di Grano), em outubro de 2017. A espécie é comercializada a granel em sacos plásticos de 100

g, contendo folhas secas inteiras, fragmentadas, e pequenas porções caulinares.

A identificação botânica foi realizada a partir de análise de caracteres diagnósticos como forma, filotaxia e indumento foliar. Para confirmação da autenticidade, as amostras foram analisadas comparativamente por meio de consultas em coleções de referência em herbários virtuais.

2.2. Extração do óleo essencial

Aproximadamente 100 g das folhas das espécies de *P. boldus* (amostra comercial) foram adquiridas para extração do óleo essencial. O material botânico foi submetido ao processo de hidrodestilação em aparelho do tipo Clevenger modificado. O óleo essencial obtido foi separado da fase aquosa remanescente por centrifugação por 10 min a 3500 rpm. A massa obtida foi aferida, o rendimento calculado e acondicionado em frasco âmbar a - 15 °C até as análises.

2.3. Análises do óleo essencial por CG-EM

A análise do óleo essencial foi realizada em um equipamento GC-MS modelo TRACE GC ULTRA/ISQ (Thermo Scientific) usando detector seletivo e coluna capilar TRS (30 m x 0,25 µm) (Thermo Scientific). Hélio foi utilizado como gás de arraste com fluxo de 1,0 mL.min⁻¹. A solução de injeção foi preparada dissolvendo-se aproximadamente 1 mg de óleo em 1 mL de acetato de etila grau HPLC, sendo injetado 1 µL de solução em modo Split, na razão 1:25. Programação de temperatura de forno: temperatura inicial de 50 °C, a qual permaneceu por 3 minutos e em seguida a temperatura foi aumentada gradativamente a 3 °C.min⁻¹ até atingir 180 °C, em que permaneceu por 10 minutos, tendo um tempo total de análise de 63,33 min; a temperatura utilizada no detector MS foi de 240 °C.

Para obtenção do índice de retenção (IR) foi injetada uma série homóloga de hidrocarbonetos lineares (C₁₂-C₁₇) e o cálculo foi feito de acordo com a equação de Van den Dool e Kratz (1963).³² A percentagem de cada substância foi determinada pela área do componente dividida pela área total de todas as substâncias presentes na amostra e o resultado multiplicado por 100. A identificação dos constituintes foi baseada na comparação dos espectros obtidos com aqueles armazenados

na biblioteca NIST e comparação do índice de retenção com dados da literatura.³³

2.4. Ensaio da atividade Larvicida

O ensaio larvicida foi realizado em uma sala com temperatura controlada em 26 ± 2 °C, umidade relativa de aproximadamente 80 %. O óleo foi solubilizado em DMSO (1 %) nas concentrações de 500, 250, 100, 50 e 25 mg.mL⁻¹, tendo o grupo controle contendo água e DMSO sem adição do óleo essencial. Após a dissolução, foram adicionados 200 µL em copo plástico contendo 9,8 mL de água destilada e 20 larvas no estágio três de *A. aegypti* L. O ensaio foi realizado em triplicata, tendo como controle negativo, solvente sem amostra e controle positivo, temefós a 0,012 mg.L⁻¹. Foram realizadas leituras em 24, 48 e 72 horas. Com dados da mortalidade obtidos, foram utilizados para determinação da Dose Letal (DL₅₀ e DL₉₀), realizadas pela análise de probit,³⁴ considerando o nível de significância de 95 %, calculada com o auxílio do programa POLO PC® (Leora Software Berkeley, CA) por meio de Regressão Linear dose-resposta.

2.5. Ensaio da atividade inseticida

A avaliação do potencial inseticida do óleo essencial de *P. boldus* seguiu a metodologia descrita com adaptações.^{35,36} Placas de Petri de vidro (90 mm x 20 mm) foram usadas para avaliação do efeito dos compostos voláteis. Os pulgões da espécie *L. erysimi* foram obtidos de colônias em folhas de couve (*Brassica oleracea* L.) sem qualquer exposição a pesticidas. Folhas laterais dorsais foram colocadas em papel de filtro, em seguida, 30 pulgões foram divididos em 3 grupos para cada concentração. Estes foram transferidos usando um pincel macio e deixados a assentar antes da exposição aos compostos. A amostra foi aplicada em discos de papel de filtro colocados na superfície interna da tampa da placa de Petri para evitar o contato direto com os pulgões. Foram utilizadas soluções de óleo essencial e DMSO nas concentrações de 1000 µg.mL⁻¹ a 62,5 µg.mL⁻¹, obtidas por diluição seriada. As placas foram seladas para evitar a perda dos constituintes voláteis. DMSO e timol (3,0 µg.mL⁻¹) foram usados como controle negativo e positivo, respectivamente. A mortalidade foi

avaliada após 24 h e 48 h de exposição. Os dados de mortalidade foram submetidos à análise em POLO PC®. O bioensaio com os pulgões *L. erysimi* foram realizados em triplicata.

2.6. Avaliação da inibição da acetilcolinesterase *in vitro*

O ensaio foi realizado pelo método espectrofotométrico de Ellman, modificado por Azevedo e colaboradores.³⁶ A enzima utilizada foi a acetilcolinesterase (AChE) de *Electrophorus electricus* tipo VI (Sigma®). Na microplaca foram adicionados 25 µL de acetilcolina iodada 15 mM, 125 µL de DTNB, 50 µL de tampão Tris-HCl 50 mM (pH 8,0), contendo 0,1 % de BSA (Albumina do Soro Bovino) e 25 µL do óleo essencial a 1 mg.mL⁻¹ (concentração final no ensaio de 0,1 mg.mL⁻¹). Metanol e tris-HCl foram usados como controles e eserina (10 µM), como inibidor padrão. A absorbância foi medida 5 vezes em 405 nm utilizando o leitor de microplaca (Biotek, Elx800), com intervalos de 15 s. Após essas leituras foram adicionados nos poços 25 µL de acetilcolinesterase 0,22 U.mL⁻¹. As absorbâncias foram medidas novamente 9 vezes em 405 nm, com intervalos de 15 s. Aumentos na absorbância devido à hidrólise espontânea do substrato foram corrigidos pela subtração da taxa de reação antes da adição da enzima. A porcentagem de inibição foi calculada pela comparação das taxas das amostras com os controles. Todos os ensaios foram realizados em triplicata. A atividade enzimática e o percentual de inibição da AChE foram calculados utilizando o programa Microsoft® Excel.

2.7. Avaliação *in silico* do óleo essencial frente à enzima AChE por método de Docking Molecular

A técnica utilizada foi o Docking Molecular ou Docagem Molecular, que consiste em várias etapas de processamento do ligante e da enzima, neste caso, acetilcolinesterase. A avaliação baseou-se nos resultados obtidos por CG-EM e CG-DIC, onde os ligantes ascaridol, 1,8-cineol, metileugenol, acetato de bornil e acetato de linalila foram selecionados para o docking molecular. Esta avaliação iniciou com a preparação do ligante, buscando no banco de dados (ZINC) a estereoquímica dos componentes, e em alguns casos não se encontrou a estereoquímica, então foi necessário desenhar no programa Marvin

Srtrch, salvando todos no formato PDBQT. Com o ligante pronto, houve a preparação da enzima acetilcolinesterase para receber o ligante, em um processo de retirada de água e de resíduos que não são importantes para o acoplamento, e por fim, utilizou-se o programa Auto Dock para adicionar os hidrogênios polares. Com isso, foi necessário o programa PROMPT para selecionar os comandos e obter os resultados em cálculos dos ensaios. Após a seleção das estruturas, para observação dos resultados *in silico* por docagem molecular, foi utilizado programa Discovery Studio Visualizer.

2.8. Análise estatística

O delineamento experimental utilizado nos ensaios foi casualizado com cinco tratamentos e cinco repetições. A comparação entre as médias dos tratamentos foram realizadas pelo software minitab 17.3.1, sendo considerado estatisticamente significativo quando $p < 0,05$ ³⁷.

3. Resultados e Discussão

3.1. Rendimento do óleo essencial

A amostra obtida das folhas da espécie *P. boldus* apresentou rendimento de 1,2 %, de coloração amarela, com odor suave característico. O rendimento foi aproximadamente 50 % inferior ao descrito na literatura (2,4 % de 50 g da amostra seca).²⁷ O rendimento pode variar conforme o processo de secagem, o clima da região de origem da amostra, temperatura, pluviosidade, época de colheita, idade da planta e outros.^{38,39}

3.2. Identificação dos constituintes voláteis do óleo essencial

Na análise de CG-EM e CG-DIC foi possível identificar 98,44 % da composição química do óleo essencial obtido das folhas de *P. boldus* (Figura 3). Os constituintes majoritários foram ascaridol (35,24 %), 1,8-cineol (29,27 %), α -terpineno (18,16 %), isoascaridol (3,59 %), *trans*-pent-1-en-4-ol (2,89 %) e α -pineno (1,67 %) (Tabela 1).

Estes compostos já foram anteriormente identificados em amostras comerciais de *P. boldus*, dentre os principais componentes

Figura 3. Cromatograma do óleo essencial das folhas de *P. boldus*

Tabela 1. Constituintes dos óleos essenciais das folhas de *P. boldus*

Compostos	Rendimento (%)	I.R ^a	I.R ^b
α -Tujeno	0,24	931	920
α -Pineno	1,67	939	930
Sabineno	0,23	976	970
β -Pineno	0,60	980	975
α -Felandreno	0,19	1005	1004
Ocimeno	0,47	1040	1020
Limoneno	0,28	1031	1021
Acetato de linalila	0,39	1023	1023
α -Terpineno	18,16	1019	1029
1,8-Cineol	29,17	1034	1031
γ -Terpineno	0,73	1062	1050
Fenchona	0,38	1088	1080
Terpinoleno	0,25	1090	1089
Linalool	0,8	1100	1095
<i>trans</i> -Sabineno hidratado	0,09	1099	1097
<i>trans</i> -Pinocarveol	0,47	1140	1135
Pinocarvona	0,54	1169	1160
<i>trans</i> -p-Menta-1-en-4-ol	2,89	1152	1141
α -Terpineol	0,12	1181	1190
Ascaridol	35,24	1245	1250
Acetato de bornil	0,41	1250	1280
Isoascaridol	3,59	1313	1344
Metileugenol	0,68	1403	1470
Hidrocarbonetos monoterpênicos (%)	22,82	-	-
Monoterpenos oxigenados (%)	74,94	-	-
Compostos Aromáticos (%)	0,68	-	-
Total identificados (%)	98,44	-	-

^aÍndice de retenção de acordo com Adams (2007); ^b Índice aritmético calculado

destacou-se ascaridol no óleo, com cerca de 34,80 % que coincidem com a porcentagem obtida nesta pesquisa.⁴⁰ O ascaridol é um composto orgânico tóxico, apresentando odor característico, canforáceo, pungente e levemente acre⁴¹, e talvez seja responsável pela fragrância do óleo.⁴² Dentre as ações biológicas comprovadas experimentalmente, observou-se propriedade bactericida, atividades antitumoral, antifúngica, antibacteriana, anti-malárica, anti-helmíntica, vermífugo, efeitos sedativos, teratogênico, abortivo e inibidor do desenvolvimento de *Trypanosoma Cruzi* e *Leishmania amazonensis*.^{43,44} Por apresentar o ascaridol, estudos toxicológicos sugerem que o consumo de chá de boldo deve ser feito com moderação e cuidado, principalmente no primeiro trimestre da gravidez e no uso por tempo prolongado, uma vez que há grandes indícios de teratogenia e hepatotoxicidade.⁴⁵

A maior parte das pesquisas sobre a composição do óleo essencial aponta ascaridol como o principal componente,⁴⁶ mas, recentemente, Pavela e colaboradores (2019) identificaram o monoterpeno limoneno como o componente majoritário em uma amostra de óleo essencial de *P. boldus*, enquanto ascaridol correspondeu a 1 % do total de terpenoides.²⁸ Os autores atribuem essa alteração à existência de diferentes variedades de *P. boldus*.

Outro composto que se destacou com sua quantidade na amostra de óleo essencial avaliada foi o 1,8-cineol (eucaliptol), que é característico do gênero,⁴⁷ sendo bem conhecido na literatura por ser um composto que possui propriedades pesticidas⁴⁷ e atividade antimicrobiana,^{48,49} além de apresentar considerável potencial antifúngico, anti-inflamatório, gastroprotetor, antinociceptivo⁵⁰, inseticida e repelente de insetos.⁵¹

Para os demais compostos identificados, destaca-se α -terpineno com concentração de 18,16 %, a literatura aponta a ação antimicrobiana e antifúngica deste monoterpeno.^{52, 53}

3.3. Ensaio da atividade larvicida frente às larvas de *A. aegypti*

Diversos estudos comprovam a atividade de óleos essenciais e de extratos vegetais contra diferentes espécies de mosquitos,^{54,55} incluindo

A. aegypti.⁵⁶ O estudo do potencial larvicida, inseticida e repelente dos óleos essenciais surge como tecnologia alternativa aos produtos sintéticos para controle do vetor, visto que até o momento não existe vacina pronta para uso contra os quatro sorotipos da dengue.

De acordo com Cheng e colaboradores (2003),⁵⁷ substâncias que apresentam valores de DL_{50} menores de 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ é considerado um bom agente com potencial larvicida. O óleo essencial da amostra comercial de *P. boldus* apresentou DL_{50} de 40,53 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, valor bem abaixo do descrito na literatura para ser considerado como de boa atividade,⁵⁸ demonstrando que este é viável para utilização como larvicida. Não foi verificada mortalidade nos controles e não houve diferença significativa de eficácia larvicida nas concentrações testadas.

Devido ao 1,8-cineol e ao ascaridol serem os compostos majoritários do óleo essencial de *P. boldus* com o teor de aproximadamente 29 % e 35 %, respectivamente, em relação aos demais componentes, pode-se atribuir a estes monoterpenos as atividades observadas, uma vez que a literatura descreve a ação larvicida, inseticida^{27,57,59} e repelente dos compostos⁶⁰, e suas concentrações são superiores aos demais componentes do óleo.

Também é possível pensar no sinergismo desses com outros componentes encontrados. A literatura descreve a ação larvicida de óleos essenciais contendo limoneno e linalol frente ao mosquito *A. aegypti*,⁶¹ na ocasião os autores indicaram que os compostos apresentaram menores atividades quando testados isoladamente, os monoterpenos α -pineno e β -pineno também já foram destacados como responsáveis pela ação larvicida,⁶² Simas e colaboradores (2004) indicaram que a ligação dupla exocíclica no β -pineno é importante para a atividade biológica observada.⁶³

3.4. Ensaio da atividade inseticida frente a *L. erysimi*

Na Figura 3 estão apresentados os resultados do bioensaio frente ao pulgão *L. erysimi* em relação a diferentes diluições do óleo essencial de *P. boldus*. Os resultados mostram que o óleo essencial de *P. boldus* foi eficiente na indução da mortalidade dos adultos pulgões. Após 24 horas de bioensaio observou-se mortalidade de 50 % na concentração

Tabela 2. Dose letal de 50 % (DL_{50}) e 90 % (DL_{90}) do óleo essencial das folhas de *P. boldus* contra *A. aegypti*

Exposição	$DL_{50} \pm SE$ (ppm)	95 % intervalo Fiducial (LCL–UCL)	$DL_{90} \pm SE$ (ppm)	95 % Intervalo Fiducial (LCL–UCL)	Equação de regressão
24h	40,53 $\pm$ 0,30	36,22 – 46,05	54,70 $\pm$ 0,30	47,80 – 69,09	$Y = (-15,82 + 5) + 9,84X$
48 h	20,03 $\pm$ 0,30	18,10 – 45,36	63,31 $\pm$ 0,30	40,54 – 213,34	$Y = (-5,24 + 5) + 3,62X$
72 h	23,33 $\pm$ 0,60	14,73 – 36,57	60,95 $\pm$ 0,60	38,38 – 194,59	$Y = (-4,20 + 5) + 3,07X$

Y: taxa de mortalidade (significativa a nível de $p < 0,05$); X: concentração (significativa a nível de $p < 0,05$); DL_{50} : concentração letal que mata 50 % das larvas expostas; DL_{90} : concentração letal que mata 90 % das larvas expostas; SE: erro padrão (todos os valores são significados de três repetições); LCL: menor limite de confiança; UCL: limite de confiança superior

de 55,6 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ e 90 % na concentração de 155,6 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, esta mortalidade pode ser atribuída aos monoterpenos presentes no óleo, como o 1,8-vineol, *p*-cimeno, limoneno, ascaridol, sabineno, 4-terpineol, β -pineno e α -terpineol,^{64,65} que inibem a enzima acetilcolinesterase e o citocromo P450.⁶⁶ Além disso, o monoterpeno ascaridol, que compõe 35,24 % do óleo essencial analisado, pode ter apresentado efeito tóxico sobre as mitocôndrias, devido à inibição da cadeia de transporte de elétrons.⁶⁷

A atividade inseticida de *P. boldus* foi reportada na literatura devendo-se especialmente a presença do ascaridol, o óleo essencial foi ativo na concentração de 82,14 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ e uma fração enriquecida de ascaridol (composto majoritário) foi ativo na concentração de 41,85 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$.²⁷

Após a análise dos resultados conclui-se que o óleo essencial testado apresentou eficiência na mortalidade de *L. erysimi*, não diferindo estatisticamente entre si. Estes resultados evidenciam o potencial de uso do óleo essencial de *P. boldus* tanto como inseticida para larvas de mosquito quanto para insetos-praga, como o pulgão *L. erysimi*, estas atividades estão relacionadas à presença de monoterpenos, destacando-se o ascaridol²⁷ e o 1,8-cineol⁵¹ por serem os constituintes majoritários na composição química do óleo essencial.

3.5. Atividade de inibição da enzima acetilcolinesterase *in vitro*

A determinação da atividade anticolinesterásica *in vitro* foi realizada com o óleo essencial da amostra comercial de *P. boldus*, tendo resultado negativo por não ter apresentado atividade na concentração de 1000 ppm. Devido ao intenso uso popular da espécie no tratamento de problemas digestivos, esperava-se encontrar atividade do óleo essencial frente à enzima acetilcolinesterase, porém podemos considerar que o uso popular é realizado com o chá das folhas de boldo. Em um estudo foi observado que a atividade dos extratos aquosos de *P. boldus* no processo digestivo pode ser justificada pela inibição da enzima AChE e que os extratos apresentaram atividade antioxidante com valores considerados como padrão na indústria farmacêutica.¹⁴ A atividade de inibição da enzima já foi observada para o alcaloide boldina, portanto a ação das folhas de *P. boldus* como inibidora da acetilcolinesterase não está relacionada com as substâncias do óleo essencial.

3.6. Avaliação *in silico* do óleo essencial frente à enzima acetilcolinesterase

A ancoragem molecular é uma técnica que consiste em prever a orientação e conformação de

Tabela 3. Dose Letal a 50 % (DL_{50}) e 90 % (DL_{90}) do óleo essencial das folhas de *P. boldus* contra *L. erysimi*.

Exposição	$DL_{50} \pm SE$ (ppm)	95 % intervalo Fiducial (LCL–UCL)	$DL_{90} \pm SE$ (ppm)	95 % Intervalo Fiducial (LCL–UCL)	Equação de regressão
24h	55,6 $\pm$ 0,3	30,0 – 74,3	155,6 $\pm$ 0,3	110,5 – 375,0	$Y = (-5,0 + 5) + 2,8X$
48 h	15,5 $\pm$ 0,3	2,4 – 27,1	68,4 $\pm$ 0,3	46,1 – 126,0	$Y = (-2,3 + 5) + 1,9X$

Y: taxa de mortalidade (significativa a nível de $p < 0,05$); X: concentração (significativa a nível de $p < 0,05$); DL_{50} : concentração letal que mata 50 % dos pulgões expostos; DL_{90} : concentração letal que mata 90 % dos pulgões expostos; SE: erro padrão (todos os valores são significados de três repetições); LCL: menor limite de confiança; UCL: limite de confiança superior

ligantes a um sítio ativo de ligação. A simulação de acoplamento molecular tem por objetivo prever o modo de interação de uma pequena molécula na região de ligação de um alvo molecular, a fim de identificar interações moleculares importantes para atividade biológica.⁶⁸

Através da avaliação *in silico* por docagem molecular, foram obtidos energias que variam de -7,6 a -6,7 como mostra a Tabela 4. A escolha dos constituintes baseou-se nos resultados obtidos por CG-EM e CG-DIC, neste caso os ligantes majoritários e compostos que possuem semelhança estrutural moleculares com os anticolinesterásicos fisostigmina, neostigmina e piridostigmina, relativo a função orgânica carbamato, foram selecionadas para o ensaio, considerando que tais compostos podem apresentar atividade inibitória AChE.⁶⁹

Não há carga para os componentes, pois no pH 7 do corpo humano não houve variação na estrutura química. Nenhum dos ligantes apresentam o carbono quiral, e, conseqüentemente não há configuração para esses compostos. Observa-se também que, os valores de energia de ligação é negativo para todos os cinco ligantes, mostrando que a interação entre os ligantes e a enzima ocorre espontaneamente. Como qualquer outro processo espontâneo, uma ligação não covalente

ocorre quando o valor de energia de ligação é negativo.⁷⁰

Os dados de energias dos ligantes para a espécie de *P. boldus* mostram que, o ligante que melhor apresentou tendência para inibir a acetilcolinesterase com diferentes afinidades de ligação foi o acetato de bornil conforme a figura Figura 4, pois este apresenta energia próxima da galantamina, um dos principais compostos utilizados no tratamento do Mal de Alzheimer para a inibição a acetilcolinesterase, apresentando uma energia de -9,1.

Analisando as interações, é possível observar a formação de dois tipos de interações do tipo hidrogênio convencional e Pi-Alkyl, sendo observadas também algumas interações hidrofóbicas com ligações fracas em resíduos: Ser 122, Phe 288, Phe 290, Ala 201 e His 440.

Os resultados obtidos por análise computacional docking molecular mostram que dentre os compostos do óleo essencial de *P. boldus*, o que mais se aproximou foi o acetato de bornil apresentando dois tipos de ligações podendo atuar no sítio de ligação da enzima acetilcolinesterase, podendo ser um possível candidato na tentativa do alívio de sintomas do sistema nervoso central, como o Mal de Alzheimer.

Tabela 4. Resultado da energia dos compostos de *P. boldus*

Compostos	Energia de ligação (kcal/mol)
Acetato de bornil	-7.6
Acetato de linalina	-7.3
Ascaridol	-6.9
1,8-Cineol	-6.7
Metileugenol	-6.7

Figura 4. Interação entre o composto acetato de bornil no sítio ativo da AChE

4. Conclusão

A análise química do óleo essencial de uma amostra comercial de *P. boldus* por CG-EM e GG-DIC possibilitou identificar 98,44 % de sua constituição química, sendo que os compostos majoritários foram ascaridol e 1,8-cineol. O óleo essencial apresentou potencial larvídica contra as larvas de *A. aegypti* e inseticida contra os pulgões *L. erysimi*, estas atividades foram atribuídas aos constituintes majoritários presentes na amostra comercial de *P. boldus*. Na avaliação *in silico* da inibição da enzima acetilcolinesterase, o ligante que mostrou menor energia e consequentemente uma melhor atividade de interação com o sítio ativo da enzima foi o acetato de bornil, sendo ele um dos componentes minoritários do óleo essencial de *P. boldus*, justificando a ausência de inibição da enzima no teste *in vitro* anticolinesterásico realizado.

Os resultados desta pesquisa são promissores para a comunidade científica, corroborando com o conhecimento químico de uma amostra comercial do boldo-do-chile e seu potencial larvídica e inseticida, além de contribuir com a sociedade que utiliza da medicina popular para o tratamento de malefícios que atingem a saúde pública.

Agradecimentos

Os autores agradecem a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Amazonas – FAPEAM por suporte financeiro (n. 062.00917/2015 - FIXAM) e concessão de bolsas e à Universidade Federal do Amazonas pela concessão de bolsa de Iniciação Científica para Aniele Lopes.

Referências

- ¹ Mauro, C.; Silva, C. P.; Missima, J.; Ohnuki, T.; Rinaldil, R. B.; Frota, M. Estudo anatômico comparado de órgãos vegetativos de boldo miúdo, *Plectranthus ornatus* Codd. e malvariço, *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng. Lamiaceae. *Brazilian Journal of Pharmacognosy* **2008**, *16*, 608. [CrossRef]
- ² Boeing, T.; Silva, L.M.; Somensi, L.B.; Cury, B.J.; Costa, A.P.M.; Petreanu, M.; Niero, R.; Andrade, S.F. Antiulcer mechanisms of *Vernonia condensata* Baker: A medicinal plant used in the treatment of gastritis and gastric ulcer. *Journal of Ethnopharmacology* **2016**, *184*, 196. [CrossRef]
- ³ Albuquerque, R. L.; Kentopff, M. R.; Machado, M. I. L.; Silva, M. G. V.; Matos, F. J. A. Diterpenos do Tipo Abietano Isolados de *Plectranthus barbatus* Andrews, *Química Nova* **2007**, *30*, 1882. [CrossRef]
- ⁴ Portaria nº 519, de 26 de junho de 1998. [Link]
- ⁵ Brandão, M. G. L.; Cosenza, G. P.; Moreira, R. A.; Monte-Mor, R. L. M. Medicinal plants and other botanical products from the Brazilian Official Pharmacopoeia. *Brazilian Journal of Pharmacognosy* **2006**, *16*, 408. [CrossRef]
- ⁶ Barbosa-Filho, J. M.; Nascimento-Júnior, F. A.; Tomaz, A. C. A.; Athayde-Filho, P. F.; Silva, M. S.; Cunha, E. V. L.; Souza, M. F. V.; Batista, L. M.; Diniz, M. F. F. M. Natural products with antileprotic activity. *Revista Brasileira de Farmacognosia* **2007**, *17*, 141. [CrossRef]
- ⁷ Newall, C. A.; Anderson, L. A.; Phillipson, J. D.; *Plantas Medicinais. Guia para o profissional de saúde*. Editora Premier: São Paulo, 2002.
- ⁸ Gruenwald, J.; Brendler, T.; Jaenicke, C.; *PDR for herbal medicines*. 1 ed. Medical Economics Company: New Jersey, 2000.
- ⁹ Bruneton, J.; *Farmacognosia*. 2a ed. Acribia: Zaragoza, 2001.
- ¹⁰ DerMarderosian, A.; Liberti, L.; Beutler, J. A.; Grauds, C.; Tatro, D. S.; Cirigliano, M.; DeSilva Jr., D.; *The Review of Natural products*, 2nd ed. Facts and comparisons: St. Louis, 2002.
- ¹¹ Duke, J. A.; *The Green Pharmacy Herbal Handbook*. Rodale Press: Pensilvânia, 2000.
- ¹² Alonso, J.; *Tratado de Fitofármacos y Nutracêuticos*. Editora Corpus Libros: Rosário, 2004.
- ¹³ Barbosa-Filho, J. M.; Piuvezam, M. R.; Moura, M. D.; Silva, M.S.; Lima, K.V.B.; Cunha, E.V.L.; Fachine, I.M.; Takemura, O.S. Anti-inflammatory activity of alkaloids: A twenty century review. *Revista Brasileira de Farmacognosia* **2006**, *16*, 109. [CrossRef]
- ¹⁴ Falé, P.L.; Amaral, F.; Amorim Madeira, P.J.; Sousa Silva, M.; Florêncio, M.H.; Frazão, F.N.; Serralheiro, M.L.M. Acetylcholinesterase inhibition, antioxidant activity and toxicity of *Peumus boldus* water extracts on HeLa and Caco-2 cell lines, *Food Chem. Toxicol* **2012**, *50*, 2656. [CrossRef]
- ¹⁵ Fuentes-Barros, G., Castro-Saavedra, S., Liberona, L., Acevedo-Fuentes, W., Tirapegui, C., Mattar, C., Cassels, B. K. Variation of the alkaloid content of *Peumus boldus* (boldo). *Fitoterapia* **2018**, *127*, 179. [CrossRef]

- ¹⁶ O' Brien, P.; Carrasco-Pozo, C.; Speisky, H. Boldine and its antioxidant or health-promoting properties. *Chemico-Biological Interactions* **2006**, 159, 1, 1. [\[CrossRef\]](#)
- ¹⁷ Santanam, N.; Penumetcha, M.; Speisky, H.; Parthasarathy, S. A novel alkaloid antioxidant, boldine and synthetic antioxidant, reduced form of RU486, inhibit the oxidation of LDL *in vitro* and atherosclerosis *in vivo* in LDL^{-/-} mice. *Atherosclerosis* **2004**, 173, 203. [\[CrossRef\]](#)
- ¹⁸ Piscaglia, F.; Leoni, S.; Venturi, A.; Graziella, F.; Donati, G.; Bolondi, L. Caution in the use of boldo in herbal laxatives: a case of hepatotoxicity. *Scand J Gastroenterol* **2005**, 40, 236. [\[CrossRef\]](#)
- ¹⁹ Morello, A., I. Lipchenca, B.K. Cassels, H. Speisky, J. Aldunate & Y. Repetto Comp. *Biochem Physiol* **1994**, 107, 367.
- ²⁰ Schwanz, M.; Nunes, E.; Konrath, E. L.; Vendruscolo, G. S.; Vignoli-Silva, M.; Henriques, A. T.; Mentz, L. A. Caracterização Farmacobotânica de *Peumus boldus* (Monimiaceae) e Avaliação de Atividades Biológicas do Alcalóide Boldina. *Latin American Journal of Pharmacy* **2008**, 27, 871. [\[Link\]](#)
- ²¹ Almeida, J. R; *Dissertação de Mestrado*, Universidade Federal de São Paulo, Brasil, 2011. [\[Link\]](#)
- ²² Araújo, C. R. M.; Santos, V. L. A.; Gonsalves, A. A. Acetilcolinesterase - AChE: Uma Enzima de Interesse Farmacológico. *Revista Virtual de Química* **2016**, 8, 1818. [\[CrossRef\]](#)
- ²³ Bakkali, F.; Averbeck, S.; Averbeck, D.; Idaomar, M. Biological effects of essential oils – A review. *Food and Chemical Toxicology* **2008**, 46, 446. [\[CrossRef\]](#)
- ²⁴ Buchanan, B. B.; Gruissem, W.; Jones, R. L.; *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*, 2nd ed., John Wiley & Sons: New Jersey, 2015.
- ²⁵ Rault, J. S. and Karuppayil, S. M. A Status Review on the Medicinal Properties of Essential Oils. *Industrial Crops and Products* **2014**, 62, 250. [\[CrossRef\]](#)
- ²⁶ Vila, R.; Valenzuela, L.; Bello, H.; Cañigüeral, S.; Montes, M.; Adzet, T. Composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Peumus boldus* leaves. *Planta Med* **1999**, 65, 178. [\[CrossRef\]](#)
- ²⁷ Girardi, N. S.; Passone, M. A.; García, D.; Nesci, A.; Etcheverry, M. Microencapsulation of *Peumus boldus* essential oil and its impact on peanut seed quality preservation. *Industrial crops and products* **2018**, 114, 108. [\[CrossRef\]](#)
- ²⁸ Pavela, R.; Benelli, G.; Petrelli, R.; Cappellacci, L.; Lupidi, G.; Sut, S.; Dall'Acqua, S.; Maggi, F. Exploring the Insecticidal Potential of Boldo (*Peumus boldus*) Essential Oil: Toxicity to Pests and Vectors and Non-target Impact on the Microcrustacean *Daphnia magna*. *Molecules* **2019**, 24, 879. [\[CrossRef\]](#)
- ²⁹ Castro, D. S. B; Silva, D. B; Tibúrcio, J. D; Sobral, M. E G; Ferraz, V; Taranto, A. G; Siqueira, J. M; Alves, S. N. Larvicidal Activity Of Essential Oil Of *Peumus Boldus* Molina And Its Ascaridole – Enriched Fraction Against *Culex quinquefasciatus*. *Experimental Parasitology* **2016**, 171, 84. [\[CrossRef\]](#)
- ³⁰ Verdeguer, M.; García-Rellán, D.; Boira, H.; Pérez, E.; Gandolfo, S.; Blázquez, M. A. Herbicidal Activity of *Peumus boldus* and *Drimys winterii* Essential Oils from Chile. *Molecules* **2011**, 16, 403. [\[CrossRef\]](#)
- ³¹ Souza, Wanderson Fernando Mello et al. Evaluation of the volatile composition, toxicological and antioxidant potentials of the essential oils and teas of commercial Chilean boldo samples. *Food Research International* **2019**, 124, 27. [\[CrossRef\]](#)
- ³² Van Den Dool, H.; Kratz, P. D. A generalization of the retention index system including linear temperature program medgas-liquid partition chromatograph. *Journal of Chromatography A* **1963**, 11, 463. [\[CrossRef\]](#)
- ³³ Adams R. P.; *Identification Of Essential Oil Components By Gas Chromatography/Mass Spectroscopy*, Allured Publishing: Illinois, 2007.
- ³⁴ Finney, D. J.; Forattine, O. P.; *Probit analysis*, Cambridge University Press: Cambridge, 2002.
- ³⁵ Silva, L. ; Mar, J. M.; Azevedo, S. G.; Rabelo, M. S.; Bezerra, J. A.; Campelo, P. H.; & de Souza, T. P. Encapsulation of *Piper aduncum* and *Piper hispidinervum* essential oils in gelatin nanoparticles: a possible sustainable control tool of *Aedes aegypti*, *Tetranychus urticae* and *Cerataphis lataniae*. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **2018**, 30, 685. [\[CrossRef\]](#)
- ³⁶ Azevedo, S. G.; Mar, J. M.; da Silva, L. S.; França, L. P.; Machado, M. B.; Tadei, W. P.; Sanches, E. A. Bioactivity of *Licaria puchury*-major Essential Oil Against *Aedes aegypti*, *Tetranychus urticae* and *Cerataphis lataniae*. *Records of Natural Products* **2018**, 12, 3. [\[CrossRef\]](#)
- ³⁷ Meyer, R.; Krueger, D. A.; *Minitab Guide to Statistics*, 3rd ed, Prentice Hall: New Jersey, 2001.

- ³⁸ Morais, L. A. S. Influência dos fatores abióticos na composição química dos óleos essenciais. *Horticultura Brasileira* **2009**, *27*, S4050. [Link]
- ³⁹ Fernandes, V. F. *Dissertação de Mestrado*, Universidade Estadual de Santa Cruz, Brasil, 2012. [Link]
- ⁴⁰ Bittner, M.; Aguilera, M. A.; Hernández, V.; Arbert, C.; Becerra, J.; Casanueva, M.E. Fungistatic Activity Of Essential Oils Extracted From *Peumus boldus* Mol., *Laureliopsis philippiana* (Looser) Schodde and *Laureliasempervirens* (Ruiz & Pav.) Tul. (Chilean monimiaceae). *Chilean Journal Of Agricultural Research* **2009**, *69*, 30. [Link]
- ⁴¹ Lewis, R. J.; *Hazardous Chemicals Desk Reference*, Wiley: New Jersey, 2008. [CrossRef]
- ⁴² Sena, S. B.; *Trabalho de Conclusão de Curso*, Centro Universitário São Lucas, Brasil, 2017. [Link]
- ⁴³ Almeida, E.R.; Melo, A.M.; Xavier, H. Toxicological evaluation of the hydro-alcohol extract of the dry leaves of *Peumus boldus* and boldine in rats. *Phytotherapy Research* **2000**, *14*, 99. [CrossRef]
- ⁴⁴ Apel, M.A.; Sobral, M.; Henrique, A.T. Composição química do óleo volátil de *Myrcianthes* nativas da região sul do Brasil. *Revista Brasileira de Farmacognosia* **2006**, *16*, 402. [CrossRef]
- ⁴⁵ Ruiz, A. L. T. G.; Taffarello, D.; Souza, V. H. S.; Carvalho, J. E.; Farmacologia e Toxicologia de *Peumus boldus* e *Baccharis genistelloides*. *Revista Brasileira de Farmacognosia* **2008**, *18*, 295. [CrossRef]
- ⁴⁶ Vogel H, Razmilic I, Muñoz M, Doll U, San Martin J. Studies of genetic variation of essential oil and alkaloid content in boldo (*Peumus boldus*). *Planta Med* **1999**, *65*, 90. [CrossRef]
- ⁴⁷ Batish D. R.; Singh, H. P.; Kohli, R. K.; Kaur, S. Eucalyptus Essential Oil as a Natural Pesticide. *Florest Ecology and Management* **2008**, *256*, 2166. [CrossRef]
- ⁴⁸ Sonboli, A., Babakhani, B. and Mehrabian, A. R., Antimicrobial Activity of Six Constituents of Essential Oil from *Salvia*. *Zeitschrift fur Naturforsch C* **2006**, *61*, 160. [CrossRef]
- ⁴⁹ Simionatto, E.; Porto, C.; Silva, U. F.; Squizani, M. C.; Dalcol, I.I.; Morel, A. F.; Composition and Antimicrobial Activity of the Essential Oil from *Aloysiasellowii*. *Journal of the Brazilian Chemical Society* **2005**, *16*, 1458. [CrossRef]
- ⁵⁰ Campêlo, L. M. L.; Almeida, A. A. C.; Freitas, R. L. M.; Souza, G. F.; Saldanha, G. B.; Feitosa, C. M.; Freitas, R. M. Antioxidant and antinociceptive effects of Citrus limon essential oil in mice. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* **2011**, 678673. [CrossRef]
- ⁵¹ Chagas, A. C. S.; Passos, W. M.; Prates, H. T.; Leite, R. C.; Furlong, J.; Fortes, I. C. P. Efeito acaricida de óleos essenciais e concentrados emulsionáveis de *Eucalyptus* spp em *Boophilus microplus*. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science* **2002**, *39*, 247. [CrossRef]
- ⁵² Cosentino, S.; Tuberoso, C. I. G.; Pisano, B.; Satta, M.; Mascia, V.; Arzedi, E; Palmas, F. *In-vitro* antimicrobial activity and chemical composition of Sardinian *Thymus* essential oils. *Letters in Applied Microbiology* **1999**, *29*, 130. [CrossRef] [PubMed]
- ⁵³ Sibanda, S.; Chigwada, G.; Poole, M.; Gwebu, E. T.; Noletto, J. A.; Schimidt, J. M.; Rea, A. I; Satzer, W. N. Composition and bioactivity of the leaf essential oil of *Heteropyxis dehniae* from Zimbabwe. *Journal of Ethnopharmacology* **2004**, *92*, 107. [CrossRef] [PubMed]
- ⁵⁴ Bakkali, F.; Averbeck, S.; Averbeck, D.; Idaomar, M. Biological effects of essential oils. *A Review Food and Chemical Toxicology* **2008**, *46*, 446. [CrossRef]
- ⁵⁵ Furtado, R. F.; Lima, M. G. A.; Neto, M. A.; Bezerras, J. N. S.; Silva, M. G. V. Atividade Larvicida De Óleos Essenciais Contra *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae). *Neotropical Entomology* **2005**, *34*, 843. [Link]
- ⁵⁶ Porto, K. R. A.; Roel, A. R.; Silva, M. M.; Coelho, R. M.; Scheleder, E. J. D.; Jeller, A. H. Atividade larvicida do óleo de *Anacardiumhumile* Saint Hill sobre *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera, Culicidae). *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* **2008**, *41*, 586. [CrossRef]
- ⁵⁷ Cheng, S. S.; Chang, H. T.; Chang, S. T.; Tsai, K. H.; Chen, W. J. Bioactivity of selected plant essential oil against the yellow fever mosquito *Aedes aegypti* larvae. *Bioresource Technology* **2003**, *89*, 99. [CrossRef] [PubMed]
- ⁵⁸ Santana, H. T.; Trindade, F. T. T.; Stabeli, R. G.; Silva, A. A. E.; Militão, J. S. T. L.; Facundo, V. A. Essential oils of leaves of *Piper* species display larvicidal activity against the dengue vector, *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Revista Brasileira. de Plantas Medicinai*s **2005**, *17*, 105. [CrossRef]
- ⁵⁹ Cheng, S. S.; Changa, H. T.; Chang, S. T.; Tsai, K. H.; Chen, W. J. Bioactivity of selected plant essential oils against the yellow fever mosquito *Aedes Aegypti* larvae. *Bioresource Technology* **2003**, *89*, 99. [CrossRef]

- ⁶⁰ Pandey, A. K., Palni, U. T., and Tripathi, N. N. Repellent activity of some essential oils against two stored product beetles *Callosobruchus chinensis* L. and *C. maculatus* F. (Coleoptera: Bruchidae) with reference to *Chenopodium ambrosioides* L. For the safety of pigeonpea seeds. *Journal of Food Science and Technology* **2014**, *51*, 4066. [\[CrossRef\]](#)
- ⁶¹ Furtado, R. F.; de Lima, M. G. A.; Neto, M. A.; Bezerra, J. N. S.; Silva, M. G. V. Atividade Larvívica de Óleos Essenciais Contra *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae). *Neotropical Entomology* **2005**, *34*, 843. [\[Link\]](#)
- ⁶² Santos, R. P.; Nunes, E. P.; Nascimento, R. F.; Santiago, G. M. P.; Menezes, G. H. A.; Silveira, E. R.; Deusdênia, O.; Pessoa, L. Chemical Composition and Larvicidal Activity of the Essential Oils of *Cordia leucomalloides* and *Cordia curassavica* from the Northeast of Brazil. *Journal Brazilian Chemical Society* **2006**, *17*, 1027. [\[CrossRef\]](#)
- ⁶³ Simas, N. K.; Lima, E. C.; Conceição, S. R.; Kuster, R. M.; de Oliveira Filho, A. M.; Lage, C. L. S. Produtos naturais para o controle da transmissão da dengue: atividade larvívica de *Myroxylon balsamum* (óleo vermelho) e de terpenóides e feniliterpenóides. *Química Nova* **2004**, *27*, 46. [\[CrossRef\]](#)
- ⁶⁴ Urzúa, A.; Santander, R.; Echeverría, J.; Villalobos, C.; Palacios, S. M.; Rossi, Y. Insecticidal Properties of *Peumus boldus* Mol. Essential Oil on the House Fly, *Musca domestica* L. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas* **2010**, *9*, 6. [\[Link\]](#)
- ⁶⁵ Betancur, R. J.; Gonzalo, S. A. Rodríguez, M. J. C.; Fischer, G. S.; Nelson Zapata, S. M. Insecticidal activity of *Peumus boldus* Molina essential oil against *Sitophilus zeamais* Motschulsky. *Chilean journal of agricultural research* **2010**, *70*, 399. [\[Link\]](#)
- ⁶⁶ De-Oliveira, A. C.; Ribeiro-Pinto, L. F.; Paumgartten, J. R. In vitro inhibition of CYP2B1 monooxygenase by beta-myrcene and other monoterpene compounds. *Toxicology Letters* **1997**, *92*, 39. [\[CrossRef\]](#)
- ⁶⁷ Monzote, L.; Stamberg, W.; Staniek, K.; Gille, L. Toxic effects of carvacrol, caryophyllene oxide, and ascaridole from essential oil of *Chenopodium ambrosioides* on mitochondria. *Toxicology and Applied Pharmacology* **2009**, *240*, 337. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- ⁶⁸ Oliveira, R. F. A.; Alves, C. C.; Silva, D. C. S.; Leite, F. H. A.; Teles, A. L. B.; Junior, M. C. S. Acoplamento Molecular de Compostos N-Arila Derivados na Acetilcolinesterase e Butirilcolinesterase Humana. *Textura* **2012**, *5*, 149. [\[Link\]](#)
- ⁶⁹ Araújo, M. J. C.; *Tese de Doutorado*, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Brasil, 2015. [\[Link\]](#)
- ⁷⁰ Bissantz, C.; Kuhn, B.; Stahl, M. A. Medicinal Chemist's guide to molecular interactions. *Journal of Medicinal Chemistry* **2010**, *53*, 5061. [\[CrossRef\]](#)