

Avaliação da toxicidade do óleo essencial das folhas *Ocotea puberula* frente a *Artemia salina*

Viviane Mallmann¹ , Lucas Wagner Ribeiro Aragão¹ , Denize Bueno¹ , Shaline Séfara Lopes Fernandes¹ , Tauane Catilza Lopes Fernandes² , Rogério César de Lara da Silva¹ 

¹Programa de Pós-Graduação em Recursos Naturais, Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul, Dourados, Brasil

²Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Brasil

*Autor para correspondência: mallmann.mn@gmail.com

RESUMO: Em nível mundial têm aumentado a resistência de patógenos as drogas já utilizadas no controle de microrganismos patogênicos aos seres humanos, impulsionando para avanços nos estudos com produtos naturais visando o isolamento de substâncias bioativas para obtenção de novos fármacos. Sendo assim, esse estudo teve por objetivo avaliar a toxicidade do óleo essencial das folhas de *Ocotea puberula* (frente ao bioensaio com *Artemia salina*). As folhas de *O. puberula* foram coletadas no Sítio Che Kamba'i, no Município de Mundo Novo/MS em março de 2014. O óleo essencial foi obtido por hidrodestilação e o bioensaio frente *A. salina* foi realizado em diferentes concentrações. O teste de *A. salina* mostrou uma DL₅₀ igual a 10,3 µg/ml, indicando que o óleo essencial de *O. puberula* pode ser considerado tóxico e uma CL₅₀, letal para 50% dos crustáceos, na dose de 3,9 µg/ml, correspondente a altamente tóxico. Esses resultados demonstram o potencial dessa espécie para a biotecnologia de fármacos, com grande interesse para aplicação antitumoral. Outros ensaios biológicos são necessários para subsidiar pesquisas com *O. puberula*. A extração do óleo essencial das folhas não compromete a integridade da espécie durante seu crescimento e desenvolvimento, já que atualmente é uma espécie quase ameaçada de extinção.

Palavras-chave: Lauraceae, microcrustáceo, letalidade, potencial medicinal, óleos voláteis

ABSTRACT – Evaluation of the toxicity of essential oil from leaves of *Ocotea puberula* against *Artemia salina*. Worldwide, the resistance of pathogens has increased as drugs already used in the control of pathogenic microorganisms to humans, expanding to advances in studies with natural products for the protection of bioactive substances for the protection of new agents. Thus, the study had the effect of evaluating the toxicity of the essential oil of the leaves of *Ocotea puberula* in comparison to the bioassay with *Artemia salina*. The leaves of *O. puberula* were collected at the Che Kamba'i Site, in the Municipality of Mundo Novo/MS in March 2014. The essential oil was obtained by hydrodistillation and bioassay before *A. salina* was performed in different concentrations. The test of *A. salina* is equal to DL₅₀ equal to 10.3 µg/ml that is, the dose of 50% of the crustaceans, in the dose of 3.9 µg/ml, corresponding to a highly toxic. Results showed potential for a biotechnology of drugs, with great interest for the antitumor application. Other biological studies are needed to support research with *O. puberula*. Extraction of essential oil from leaves is not one of the most difficult forms of extinction.

Keywords: Lauraceae, microcrustacean, lethality, medicinal potential, volatile oils

INTRODUÇÃO

Nos últimos anos têm-se verificado um grande avanço científico envolvendo os estudos químicos e farmacológicos de plantas medicinais para a obtenção de novos compostos com propriedades terapêuticas, uma vez que, as substâncias de origem vegetal ainda desempenham papéis importantes na medicina moderna, constituindo-se na principal fonte de medicamentos ou de substâncias que podem

servir de modelos para preparação de análogos mais eficazes (Hostettmann et al. 2001; Newman et al. 2007).

Todos os dias se aumenta a população imunocomprometida (Raut et al. 2014), mesmo com a descoberta de novos fármacos, estes não evoluem concomitantemente a velocidade que evoluem microrganismos patogênicos, por exemplo. E a resistência dos microrganismos a estas drogas, se

Recebido para publicação em 06/12/2018

Aceito para publicação em 22/11/2022

Data de publicação em 17/11/2022

ISSN 1983-084X

© 2021 Revista Brasileira de Plantas Medicinais/Brazilian Journal of Medicinal Plants.

This is an open access article under the CC BY-NC-ND license

(<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

deve uso intensivo e indiscriminado de compostos, tais como antibióticos (Tavares 2007; Ramalhinho et al. 2010; Sardi et al. 2013; Raut et al. 2014).

No contexto de avanços dos estudos com produtos naturais visando o isolamento de substâncias bioativas, as plantas medicinais têm ganhado um destaque importante, no entanto, nem todas as famílias botânicas possuem um metabolismo secundário, que produzem muitos compostos especializados, necessários para a planta sobreviver em seu ambiente (Crozier et al. 2007).

A família Lauraceae apresenta inúmeras espécies com metabólitos secundários. Caracteriza-se por ser uma família botânica com distribuição pantropical, sendo bem representadas na América, Ásia tropical, Austrália, Madagascar e sul da África, possuindo 2750 espécies subordinadas a 52 gêneros (Rohwer 1993). No Brasil, ocorrem 22 gêneros, com cerca de 400 espécies, em sua maior parte em florestas pluviais, sendo observada também em restingas e cerrados (Souza et al. 2008; Barroso et al. 2002). A maioria de suas espécies são de hábito arbóreo, tendo como principais gêneros: *Aniba*, *Ocotea*, *Nectandra*, *Persea* e *Cinnamomum* (Souza et al. 2008).

A espécie *Ocotea puberula* (Rich.) Nees conhecida como canela-pinho, apresenta ampla distribuição, ocorrendo nos Estados do Amapá, Pará, Amazonas, Tocantins, Acre, Bahia, Alagoas, Goiás, Minas Gerais, Espírito Santo, São Paulo, Rio de Janeiro, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul (Quinet et al. 2011).

Atualmente encontra-se quase ameaçada de extinção, pois apesar de ser amplamente distribuída e de crescimento rápido, seus frutos são frequentemente atacados pelo fungo *Botryotinia pallida* Syd, reduzindo bruscamente a produção de sementes viáveis, comprometendo assim o potencial genético desta espécie (CNCFlora 2018).

Embora pouco se saiba sobre as propriedades medicinais de *O. puberula* no Estado de Mato Grosso do Sul, Marquesini (1995) descreveu sua utilização para o tratamento de tumores e afecções da pele no bojo cultural de indígenas do sul do País. Também existem registros do uso da seiva da casca em forma de emplastro para extrair espinhos ou estrepes e que o chá da casca auxilia no combate às diarreias e disenterias (Körbes 1995).

Estudos já foram realizados com o extrato de *O. puberula* apresentando diversos alcaloides: alcaliide aporfínico *stricto sensu* (dicentrina, predicentrina, *N*-metillaurotetanina, isodomesticina, *N*-óxido dicentrina, leucoxina, ocoteina); alcaloide

oxoaporfínico (talicminina); alcaloide diidroaporfínico (6a, 7-diidroaporfínico) (deidroocoteína); alcaloide dideidroaporfínico (dideidroocoteína); alcaloide C-3-O-aporfínico (3-hidroxicentrina) (Zanin et al. 2007). Montrucchio et al. (2012), observaram que essa espécie apresenta atividade antinociceptiva correlacionado ao alcaloide dicentrina extraídos dos frutos.

Raggi (2008) ao avaliar o óleo essencial de *O. puberula*, observou alguns constituintes majoritários: sesquiterpenos β -cariofileno (25,52%), β -elemeno (6,95%), biciclogermacreno (6,68%), α -copaeno (6,61%) e α -humuleno (5,76%), além verificar uma sensibilidade de microrganismos como *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Aspergillus niger* quando expostos ao óleo.

Em outro trabalho analisando quimicamente o óleo essencial de folhas de *O. puberula* identificou-se dois monoterpenos, atujeno e -pineno, que juntos representaram 10,6% do óleo analisado, bem como, nove sesquiterpenos, α -elemeno, β -cariofileno, α -humuleno, g-curcumeno, germacreno-D, biciclogermacreno, D-cadineno, longifoleno e germacreno, que juntos corresponderam a 77,4% do óleo. Logo, na extração do óleo essencial dos galhos de *O. puberula* foi identificado três monoterpenos (α -tujeno, β -pineno e mirceno) perfazendo juntos 15,7% do óleo, além mais oito sesquiterpenos (isoleveno, elemeno, cariofileno, humuleno, g-curcumeno, germacreno-D, biciclogermacreno, D-cadineno) representando juntos 67,2% do óleo essencial (Araujo et al. 2001).

No entanto, estudos da toxicidade do óleo essencial de *O. puberula* frente a larvas de *Artemia salina* Leach, ainda não foram encontrados a literatura. Os estudos de toxicidade são relevantes por serem rápidos, de baixo custo, com metodologias simples, possibilitando a obtenção de prognósticos na predição de um estudo anticâncer (Siqueira et al. 1998; Islam et al. 2019). Este bioensaio traz diversas vantagens para o pesquisador, permite uma leitura de fácil e inequívoca interpretação, pois apenas a letalidade dos organismos é levada em consideração, tendo como variáveis a morte ou vida deles (Meyer et al. 1982), e, no que tange a busca por compreensão da toxicidade dos extratos vegetais, atua como bioindicador, uma vez que apresenta baixa tolerância a níveis tóxicos ao meio em que está exposto (Abel 1989). Deste modo, serve como teste preliminar para nortear próximos passos de estudos com extratos vegetais. Nesse sentido, esse estudo teve por objetivo avaliar a toxicidade do óleo essencial das folhas de *O. puberula* frente ao bioensaio com *A. salina*.

MATERIAL E MÉTODOS

Coleta, identificação e extração do material vegetal

As folhas de *O. puberula* foram coletadas no Sítio Che Kamba'i, no Município de Mundo Novo/MS em março de 2014 (23°56'31,2"S; 54°13'04,8"O). A excisada foi depositada no herbário DDMS, da UFGD, registrada com o número 6388.

As análises foram realizadas no Laboratório de Química Orgânica da Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul (UEMS). Foram coletados aproximadamente 1200 g para a obtenção dos óleos essenciais por meio de hidrodestilação, utilizando o aparelho Clevenger por 4 h, com sucessivas extrações de 300 g de material vegetal cada.

Bioensaio frente a *Artemia salina*

O ensaio biológico com *A. salina* sp. foi realizado de acordo com a metodologia McLaughlin et al. (1993) e Dolabela (1997), com adaptações. Para a preparação da água de criação do microcrustáceo, simulando água do mar, foram pesados 38 g de sal marinho para 1000 ml de água destilada. Após homogeneização, filtrou-se a solução e o pH foi mantido em torno de 9,0. Foram adicionados 3 g de cistos de *A. salina*, posteriormente a solução foi armazenada em um becker com iluminação artificial a 28 °C por 24 h com aeração constante. O teste foi realizado com amostras do óleo nas seguintes concentrações 62,5; 31,25; 15,63; 7,8 µg/ml.

O procedimento experimental consistiu em adicionar a um tubo de ensaio 19800 µl de água salina, 200 µl de metanol e 20 µl de óleo essencial, sendo esta a solução mãe, que segundo a metodologia proposta está na concentração de 1000 µg/ml. A partir desta foi realizada a diluição até as concentrações previstas, sendo estas adicionadas a tubos de ensaio aos quais foram introduzidas 10 larvas de *A. salina*. Os tubos foram mantidos por 24 h em iluminação artificial a 28 °C e, em seguida foram feitas as contagens dos animais mortos e vivos. Para maior confiabilidade dos resultados, foi mantido um controle padrão, contendo apenas metanol, um solvente utilizado para dissolver o óleo, e água salina contendo o mesmo número de larvas, para eliminar a possibilidade de interferência do solvente nos resultados. Os náuplios foram contados novamente após o prazo experimental de 24 h.

Considerou-se baixa, moderada e alta toxidez quando a dose letal 50% (DL₅₀) foi respectivamente: superior a 500 µg/ml, entre 100 a 500 µg/ml e em valores menores de 100 µg/ml (Dolabela 1997).

Em seguida foi realizado a classificação da concentração letal (CL₅₀) através da determinação dos seus níveis: altamente tóxico: CL₅₀ < 80 µg/ml; moderadamente tóxico: CL₅₀ (80-250 µg/ml); com baixa toxicidade ou não tóxico: CL₅₀ > 250 µg/ml baseadas em Meyer (1982) e Vinatea (1994).

Segundo Oga et al. (2008), a curva de morte deve ser elaborada de acordo com um gráfico realizado por meio da função da concentração letal e a quantidade de animais mortos no decorrer do tempo, sendo está importante para traçar o perfil tóxico dos óleos essenciais testados.

Análise Estatística

A fundamentação estatística da toxicidade do óleo essencial baseou-se nos cálculos de DL₅₀, por meio de análise de PROBIT, com o software BioStat versão 5.9.8.5.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

O teste de *A. salina* mostrou uma DL₅₀ igual a 10,3 µg/ml, indicando que o óleo essencial de *O. puberula* pode ser considerado tóxico, por apresentar DL₅₀ < 1000 µg/ml. Logo, constatou-se que a CL₅₀, letal para 50% dos crustáceos, ocorreu na dose de 3,9 µg/ml, podendo ser considerado, altamente tóxico (Meyer 1982; Vinatea 1994) (Tabela 1).

Estes resultados evidenciam que o óleo das folhas de *O. puberula* possui potencial biotecnológico. Segundo classificação de Dolabela (1997), o óleo de *O. puberula* se enquadra como "alta toxidez", por apresentar dose letal 50% (DL₅₀) abaixo de 100 µg/ml.

Esses dados corroboram para a realização de outros testes dessa natureza para a confirmação de possíveis atividades biológicas, pois para outras espécies, pesquisadores têm correlacionado a toxicidade frente a *A. salina* (McLaughlin 1991; McLaughlin et al. 1993), com a atividade contra o *Trypanosoma cruzi* (Dolabela 1997) atividade antibacteriana (Brasileiro et al. 2006; Niño et al.

Tabela 1. Representação da DL₅₀ e CL₅₀, UEMS, Naviraí, 2014.

DL ₅₀	10,3	DL ₅₀ Erro Estándar	2,0
DL ₅₀ LCL	6,4	DL ₅₀ UCL	13,8
Log 10[DL ₅₀]	1,01	Erro Estándar	0,08
Beta	1,1	Intercepto	3,8
Beta Erro Estándar	0,2		

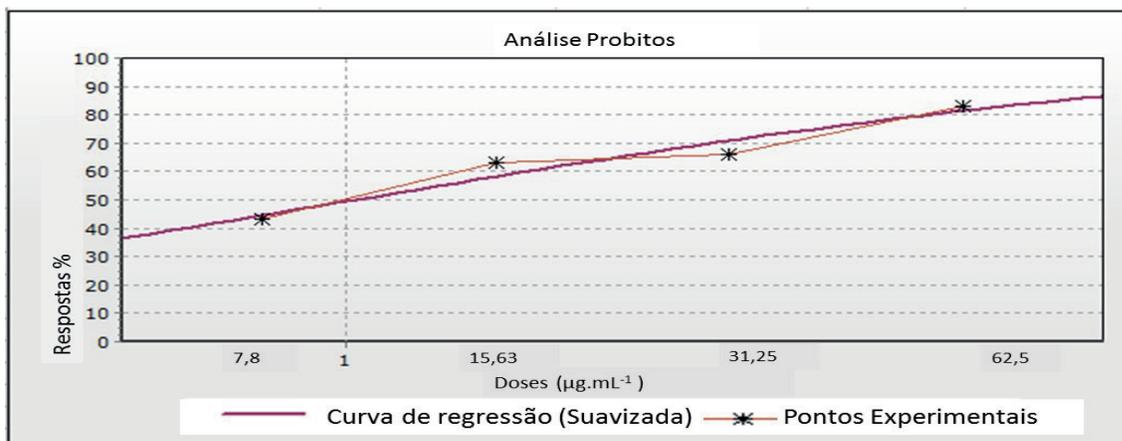


Figura 1. Letalidade de *Artemia salina*, UEMS, Naviraí, 2014.

2006; Magalhães et al. 2007) e atividade antifúngica (Niño et al. 2006; Magalhães et al. 2007).

A dose utilizada para que não haja produção de efeitos tóxicos foi 2,6 NOAEL (No Observed Adverse Effect Level), sendo assim a dose mínima a ser administrada deve ser realizada na quarta diluição para não observância de efeitos adversos. A curva de morte foi expressa pelo método de Finney (análise de Probit) pela distribuição log-normal, representando a relação da dose e resposta, evidenciando a quantidade de indivíduos mortos da população com relação à dose do óleo (Figura 1).

O efeito nocivo foi extinto no log³ na porcentagem de 50% na curva de morte dos espécimes, apresentando o percentual dos animais mortos de acordo com a dosagem administrada, apresentando duas análises com resultados considerados altamente tóxicos para o uso *in natura*, o que ressalta a necessidade de cautela na dose utilizada e no período de exposição.

Farago et al. (2010) ao avaliar o óleo essencial da casca de *O. puberula* observou uma baixa sensibilidade antimicrobiana. Dentro do mesmo gênero, estudos avaliando a atividade antituberculosis dos alcaloides ocoxilonina (1), ocoteína (2), dicentrina (3) y 1,2-metilendioxi-3,10,11-trimetoxiaporfina (4), isolados a partir da madeira de *O. discolor* Mez, demonstraram em totalidade atividade antituberculose, sendo a ocoteína (2) o composto mais ativo contra a variedade virulenta *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv (Albarracín et al. 2017).

Estudos têm demonstrado que espécies pertencentes ao gênero *Ocotea* possuem princípios ativos com uma ampla gama de atividades farmacológicas, tais como atividades anti-inflamatória, citotoxicidade, antimicrobiana, larvicida e antiproliferativa, evidenciando o potencial de aplicação e a exploração para o desenvolvimento de novos medicamentos (Salleh et al. 2017).

Os resultados obtidos nesse estudo apresentaram alta toxicidade no bioensaio do óleo essencial de *O. puberula* ocasionando letalidade em *A. salina*, indicando o potencial dessa espécie para a biotecnologia de fármacos. Ressalta-se, contudo, que novos ensaios biológicos são necessários para avaliar atividade antitumoral e antimicrobiana, e ainda, por mais que se tenha obtido um resultado que apresenta esta letalidade do óleo, sugere-se novos estudos que indiquem a nível celular (citotóxico, genotóxico e mutagênico) o grau de toxicidade do óleo em questão, uma vez que, o teste de *A. salina* apresenta suscetibilidade mesmo em compostos com baixo teor tóxico.

A presença do óleo essencial de *O. puberula* nas folhas, salienta a sua importância e relevância para a bioprospecção de novos fármacos e extração do óleo essencial das folhas não compromete a integridade da espécie durante seu crescimento e desenvolvimento, já que atualmente é uma espécie quase ameaçada de extinção.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à CAPES pela bolsa de estudos concedida a primeira autora, e ao Professor Dr. Yzel Rondon Suárez, coordenador em exercício do Programa de Pós-Graduação em Recursos Naturais (UEMS) pelo apoio e reconhecimento durante a execução da dissertação.

CONTRIBUIÇÃO DOS AUTORES

A contribuição dos autores se deu da seguinte maneira: Conceituação, V.M.; metodologia, V.M.; software, L.W.R.A.; análise formal, V.M., D.B.; investigação, V.M., S.S.L.F.; redação—preparação do rascunho original, V.M., L.W.R.A.; redação—revisão e edição, T.C.L.F., D.B.; supervisão, R.C.L.S.; aquisição de financiamento, R.C.L.S.

Todos os autores leram e concordaram com a versão publicada do manuscrito.

DECLARAÇÃO DE CONFLITO E INTERESSE

Os autores declaram que não há conflito de interesse.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abel PD (1989) *Water Pollution Biology*. Ellis Horwood Ltd, Publishers, Chichester. 296p.
- Albarracin LT, Patiño OJ, Guzman JD, Begum N, McHugh TD, Cucap LE, Ávila MC (2017) Alcaloides aporfínicos con actividad antituberculosa aislados de *Ocotea discolor* Kunth (Lauraceae). *Rev Colomb Quim* 46(3):22-27.
- Araujo AJ, Lordello ALL, Beatriz HLN, Maia S (2001) Análise comparativa dos óleos essenciais de folhas e galhos de *Ocotea puberula* (Lauraceae). *Rev Vis Acadêm* 2(2):81-84.
- Barroso GM, Costa CG, Guimarães EF, Ichaso CL, Peixoto AL (2002) Sistemática de angiospermas do Brasil. 2 ed. Viçosa, MG: UFV. 304 p.
- Brasileiro BG, Pizzio VR, Raslan DS, Jamal CM, Silveira D (2006) Antimicrobial and cytotoxic activities screening of some Brazilian medicinal plants used in Governador Valadares district. *Rev Bras Ciên Farm* 42(2):195-202.
- CNCFlora (2018) *Ocotea puberula* in Lista Vermelha da flora brasileira versão 2012.2 Centro Nacional de Conservação da Flora. Disponível em: <[http://cncflora.jbrj.gov.br/portal/pt-br/profile/Ocotea puberula](http://cncflora.jbrj.gov.br/portal/pt-br/profile/Ocotea%20puberula)>. Acesso em: 5 dez.
- Crozier A, Jaganath IB, Clifford MN (2007) Phenols, Polyphenols and Tannins: An Overview. In: Crozier A, Clifford MN, Ashihara H (Ed.) *Plant Secondary Metabolites: Occurrence, Structure and Role in the Human Diet*. 1 ed. Blackwell Publishing Ltd. 1:1-24.
- Dolabela MF (1997) Triagem *in vitro* para atividade antitumoral e anti *Trypanosoma cruzi* de extratos vegetais, produtos naturais e substâncias sintéticas. 130p. Dissertação (Mestrado em Farmacologia), Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte.
- Farago PV, Padilha J, Döll-Boscardin PM, Nakashima T (2010) Chemical composition and antibacterial activity of the essential oil from bark of *Ocotea puberula* (Rich.) Ness. *Lat Am J Pharm* 29(7):1242-5.
- Hostettmann K, Wolfender J, Terreaux C (2001) Modern screening techniques for plant extracts. *Pharm Biol* 39(1):18-32.
- Islam SU, Ahmed MB, Shehzad A, Lee YS (2019) Extrato metanólico de ovos de *Artemia salina* e várias frações em solventes diferentes contêm compostos potentes que diminuem a viabilidade celular das linhas celulares de câncer de cólon e pele e mostram atividade antibacteriana contra *Pseudomonas aeruginosa*. *eCAM* 2019:1-13. <https://doi.org/10.1155/2019/9528256>
- Körbes VC (1995) Manual de plantas medicinais. Francisco Beltrão: Associação de Estudos, Orientação e Assistência Rural, 188.
- Magalhães AF, Tozzi AMGA, Santos CC, Serrano DR, Zanotti-magalhães EM, Magalhães EG, Magalhães SLA (2007) Saponins from *Swartzia langsdorffii*: biological activities. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 98(5):713-718.
- Marquesini NR (1995) Plantas usadas como medicinais pelos índios do Paraná e Santa Catarina, sul do Brasil – Guarani, Kaingang, Xogleng, Ava-Guarani, Kraô e Cayuá. Curitiba, 290p. Dissertação de Mestrado. (Pós-graduação em Botânica), Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba.
- McLaughlin JL, Chang CJ, Smith DL (1991) “Bench-top” bioassays for the discovery of bioactive natural products: an update. In: RAHMAN, A. (ed.) *Studies in Natural Product Chemistry* 9. Amsterdam: Elsevier. 383-409.
- McLaughlin JL, Chang CJ, Smith DL (1993) Simple bench-top bioassays (brine shrimp and potato discs) for discovery of plant antitumor compounds: review of recent progress. In: Kinghorn AD, Balandrin MF (ed.). *Hum Med Ag from Plan Washington*. Nova York: ACS Symposium Series 534:112-137.1993.
- Meyer BN, Ferrigini NR, Putnam JE, Jacobsen LB, Nichols DE, McLaughlin JL (1982) A convenient general bioassay for active plant constituents. *Planta Med* 45(5):31-34. DOI: 10.1055/s2007-971236.
- Montrucchio DP, Obdulio GM, Zanin S, da Silva GA (2012) Antinociceptive effects of a chloroform extract and the alkaloid dicentrine isolated from fruits of *Ocotea puberula*. *Planta Med* 78(14):1543-1548.
- Newman DJ, Cragg GM (2007) Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. *J Nat Prod* 70(3):461-477.
- Niño J, Narváez DM, Mosquera OM, Correa YM (2006) Antibacterial, antifungal and cytotoxic activities of eight Asteraceae and two Rubiaceae plants from colombian biodiversity. *Braz J Microb* 37(4):566-570.
- Oga S, Camargo MMA, Batistuzzo JAO (2008) *Fundamentos de toxicologia*. 3.ed. São Paulo: Editora Atheneu, 643.
- Quinet A, Baitello JB, Moraes PLRD (2011) Lauraceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2011/FB008441>>. Acesso em: 05 dez 2018.
- Raggi L (2008) Estudo da composição química e das atividades biológicas de óleos voláteis de espécies de Lauraceae, em diferentes épocas do ano. 67p. Dissertação (Mestrado em Meio Ambiente) - Instituto de Botânica da Secretaria de Estado do Meio Ambiente, São Paulo.
- Ramalinho I, Ribeirinho M, Vieira I, Cabrita J (2012) A Evolução do consumo de antibióticos em ambulatório em Portugal continental 2000-2009. *AMP* 25(1):20-28.
- Raut JS, Karuppaiyl SM (2014) A status review on the medicinal properties of essential oils. *Ind Crops Prod* 62:250-264. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.05.055>
- Rohwer JG (1993) Lauraceae. In: Kubitzki K, Rohwer JG, Bittrich V(eds.) *The families and genera of vascular plants*. Springer-Verlag, Berlin. 2:366-391.
- Salleh WMNH, Ahmad F (2017) Phytochemistry and biological activities of the genus *Ocotea* (Lauraceae): A review on recent research results (2000-2016). *JAPHAC* 7(5):204-218. DOI:10.7324/JAPS.2017.70534
- Sardi JC, Scorzoni L, Bernardi T, Fusco-Almeida AM, Mendes Giannini MJ (2013) *Candida* species: current

- epidemiology, pathogenicity, biofilm formation, natural antifungal products and new therapeutic options. *J Med Microbiol* 62(1):10-24. DOI: 10.1099/jmm.0.045054-0
- Siqueira JM, Bomm MD, Pereira NFG, Boaventura MAD (1998) Estudo fitoquímico de *Unonopsis lindmanii* - Annonaceae, biomonitorado pelo ensaio de toxicidade sobre a *Artemia salina* Leach. *Quím Nova* 21(5):557-559. <https://doi.org/10.1590/S0100-40421998000500004>
- Souza VC, Lorenzi H (2008) Botânica sistemática. Guia ilustrado para identificação das famílias de angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II. 2ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum de Estudos da Flora, 640p.
- Tavares W (2007) Antibióticos e quimioterápicos para uso clínico. 3.ed. São Paulo: Editora Atheneu, 712.
- Vinatea JE (1994) *Artemia* um ser vivo excepcional. *Pan AQUI* 4(25)8-9.
- Zanin SMW, Lordello ALL. (2007) Alcaloides aporfinoídeos do gênero *Ocotea* (Lauraceae). *Quím Nova* 30(1)92-98. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422007000100020>