

MINISTÉRIO DA SAÚDE

**MONOGRAFIA DA ESPÉCIE *Eugenia uniflora* L.
(PITANGUEIRA)**

Organização: Ministério da Saúde e Anvisa

Fonte do Recurso: Ação 20K5 (DAF/ SCTIE/ MS)/2013

BRASÍLIA

2015

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Folhas e frutos da espécie <i>Eugenia uniflora</i> L.	1
Figura 2 – Distribuição geográfica da espécie <i>Eugenia uniflora</i> L. em território brasileiro.....	2
Figura 3 – Exsicata de <i>Eugenia uniflora</i> L.....	4
Figura 4 – Secções paradérmicas da lâmina foliar de <i>Eugenia uniflora</i> L.	6
Figura 5 - Secção transversal da lâmina foliar de <i>Eugenia uniflora</i> L.	6
Figura 6 - Fórmula estrutural do composto (-) - (1S,2R,6S,7R,8R,8aR) - 1,2,6,7,8-pentahydroxyindolizidine obtido por extração aquosa da planta <i>Eugenia uniflora</i> L.....	60

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Testes de toxicidade aguda realizados com os extratos da <i>Eugenia uniflora</i> L....	19
Quadro 2 –Ensaio microbiológico realizado com óleos essenciais obtidos de <i>Eugenia uniflora</i>	23
Quadro 3 –Ensaio microbiológico realizado com o extrato etanólico obtido de <i>Eugenia uniflora</i>	26
Quadro 4 –Ensaio <i>in vivo</i> realizado com a <i>Eugenia uniflora</i> L.....	42
Quadro 5 – Ensaio <i>ex vivo</i> com extratos das folhas de <i>Eugenia uniflora</i> L.....	51
Quadro 6 –Sequência de procedimentos para o uso do kit experimental, contendo escova, recipiente para coleta de amostras microbiológicas e sprays de higienização.....	55

ABREVIATURAS

AI: anáfase

ALT: Alanina aminotransferase

ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária

AST: Aspartato aminotransferase

ATCC: American Type Culture Collection

BHT: hidroxitolueno butilado

Ca²⁺: Íon cálcio

CCl₄: tetracloreto de carbono

CE₅₀: concentração eficaz média

CI₅₀: concentração inibitória média

Cl⁻: Íon cloreto

CIM: Concentração inibitória mínima

COX-2: ciclooxigenase 2

DI₅₀: Dose inibitória média

DL₅₀: Dose letal média

DNA: Ácido desoxirribonucléico

DPPH: radical 1,1-difenyl-2-picrilhidrazil

EPO: European Patent Office

GC-MS: Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa

GMPc: Monofosfato cíclico de guanosina

HDL: Lipoproteína de alta densidade

HPLC: cromatografia líquida de alta performance

IFN γ : Interferon gama

IL-1 β : Interleucina-1 beta

IL-2: Interleucina-2

IL-6: Interleucina-6

INCQS – Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

iNOS: Óxido nítrico sintase induzida

INPI: Instituto Nacional de Propriedade Intelectual

I.P.: Intraperitoneal

JPO: Japan Patent Office

K⁺: Íon Potássio

KCl – Cloreto de potássio

L-NAME: N ω -Nitro-L-arginina metil ester hydrochloride

MDA: Malonildialdeído

MeI: Metáfase

MI: Índice mitótico

Na⁺: Íon sódio

NADPH: Fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina

PI: Prófase

Qsp: quantidade suficiente para.

RDC: Resolução da Diretoria Colegiada

RMN: ressonância magnética nuclear

®: Marca registrada

TBA: Ácido tiobarbitúrico

TBARS: Espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico

TI: telófase

TNF α : Fator de necrose tumoral alfa

UFC: Unidade formadora de colônia

UFPEDA: Universidade Federal de Pernambuco-Departamento de Antibióticos

USPTO: United States Patent and Trademark Office

V.O.: Via Oral

WIPO: World Intellectual Property Organization

SUMÁRIO

1 IDENTIFICAÇÃO	1
1.1 NOMENCLATURA BOTÂNICA	1
1.2 SINONÍMIA BOTÂNICA	1
1.3 FAMÍLIA	1
1.4 FOTO DA PLANTA	1
1.5 NOMENCLATURA POPULAR	2
1.6 DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA	2
1.7 OUTRAS ESPÉCIES CORRELATAS DO GÊNERO, NATIVAS OU EXÓTICAS ADAPTADAS	3
2 INFORMAÇÕES BOTÂNICAS	3
2.1 PARTE UTILIZADA / ÓRGÃO VEGETAL	3
2.2 DESCRIÇÃO MACROSCÓPICA DA PARTE DA PLANTA UTILIZADA	3
2.3 DESCRIÇÃO MICROSCÓPICA DA PARTE DA PLANTA UTILIZADA	4
2.4 INFORMAÇÕES SOBRE POSSÍVEIS ESPÉCIES VEGETAIS SIMILARES QUE POSSAM SER UTILIZADAS COMO ADULTERANTES	7
3 INFORMAÇÕES DE CONTROLE DE QUALIDADE	7
3.1 ESPÉCIE VEGETAL / DROGA VEGETAL.....	7
3.1.1 Caracteres organolépticos	7
3.1.2 Requisitos de pureza	7
3.1.2.1 <i>Perfil de contaminantes comuns</i>	7
3.1.2.2 <i>Microbiológico</i>	7
3.1.2.3 <i>Teor de umidade</i>	7
3.1.2.4 <i>Metal pesado</i>	7
3.1.2.5 <i>Resíduos químicos</i>	7
3.1.2.6 <i>Cinzas</i>	7
3.1.3 Granulometria	8
3.1.4 Prospecção fitoquímica	8
3.1.5 Testes físico-químicos	9
3.1.6 Testes de identificação	9
3.1.7 Testes de quantificação	11

3.1.7.1 Componentes químicos e suas concentrações: descritos e majoritários, ativos ou não	11
3.1.8 Outras informações úteis para o controle de qualidade	11
3.2 DERIVADO VEGETAL	11
3.2.1 Descrição	11
3.2.2 Método de obtenção	11
3.2.3 Caracteres organolépticos	12
3.2.4 Requisitos de pureza	12
3.2.4.1 Perfil de contaminantes comuns	12
3.2.4.2 Microbiológico	12
3.2.4.3 Teor de umidade	12
3.2.4.4 Metal pesado	12
3.2.4.5 Resíduos químicos	12
3.2.5 Testes físico-químicos	12
3.2.6 Prospecção fitoquímica	12
3.2.7 Testes de identificação	13
3.2.8 Testes de quantificação	14
3.2.8.1 Componentes químicos e suas concentrações: descritos e majoritários, ativos ou não	14
3.3 PRODUTO FINAL	16
3.3.1 Forma farmacêutica	16
3.3.2 Testes específicos por forma farmacêutica	16
3.3.3 Requisitos de pureza	16
3.3.4 Resíduos químicos	16
3.3.5 Prospecção fitoquímica	16
3.3.6 Testes de identificação	16
3.3.7 Testes de quantificação	16
3.3.7.1 Componentes químicos e suas concentrações: descritos e majoritários, ativos ou não	16
4 INFORMAÇÕES DE SEGURANÇA E EFICÁCIA	17
4.1 USOS POPULARES / TRADICIONAIS	17
4.2 PRESENÇA NA NOTIFICAÇÃO DE DROGAS VEGETAIS	18
4.3 ESTUDOS NÃO-CLÍNICOS	18
4.3.1 Estudos toxicológicos	18

4.3.1.1 Toxicidade aguda	18
4.3.1.2 Toxicidade subcrônica	21
4.3.1.3 Toxicidade crônica	21
4.3.1.4 Genotoxicidade	21
4.3.1.5 Sensibilização dérmica	22
4.3.1.6 Irritação cutânea	22
4.3.1.7 Irritação ocular	22
4.3.2 Estudos farmacológicos	22
4.3.2.1 Ensaaios <i>in vitro</i>	22
4.3.2.1.1 Efeito antimicrobiano <i>in vitro</i> da <i>Eugenia uniflora</i> L.....	23
4.3.2.1.2 Efeito antioxidante <i>in vitro</i> da <i>Eugenia uniflora</i> L.....	33
4.3.2.1.3 Efeito antiparasitário <i>in vitro</i> da <i>Eugenia uniflora</i> L.....	37
4.3.2.1.4 Efeito antidiarreico <i>in vitro</i> da <i>Eugenia uniflora</i> L.....	39
4.3.2.1.5 Efeito inibidor enzimático <i>in vitro</i> da <i>Eugenia uniflora</i> L.....	39
4.3.2.1.7 Outros efeitos <i>in vitro</i> da <i>Eugenia uniflora</i> L.....	40
4.3.2.2 Ensaaios <i>in vivo</i>	40
4.3.2.3 Ensaaios <i>ex vivo</i>	51
4.4 ESTUDOS CLÍNICOS	54
4.4.1 Fase I	54
4.4.2 Fase II	55
4.4.3 Fase III	55
4.4.4 Fase IV	55
4.4.5 Estudos observacionais	56
4.5 RESUMO DAS AÇÕES E INDICAÇÕES POR DERIVADO DE DROGA ESTUDADO	56
4.5.1 Vias de Administração	56
4.5.2 Dose Diária	56
4.5.3 Posologia (Dose e Intervalo)	56
4.5.4 Período de Utilização	56
4.5.5 Contra Indicações	56
4.5.6 Grupos de Risco	56
4.5.7 Precauções de Uso	57
4.5.8 Efeitos Adversos Relatados	57
4.5.9 Interações Medicamentosas	57

4.5.9.1 Descritas	57
4.5.9.2 Potenciais	57
4.5.10 Informações de Superdosagem	57
4.5.10.1 Descrição do quadro clínico	57
4.5.10.2 Ações a serem tomadas.....	57
5 INFORMAÇÕES GERAIS	57
5.1 FORMAS FARMACÊUTICAS /FORMULAÇÕES DESCRITAS NA LITERATURA	57
5.2 PRODUTOS REGISTRADOS NA ANVISA E OUTRAS AGÊNCIAS REGULADORAS	58
5.3 EMBALAGEM E ARMAZENAMENTO	58
5.4 ROTULAGEM	58
5.5 MONOGRAFIAS EM COMPÊNDIOS OFICIAIS E NÃO OFICIAIS	58
5.6 PATENTES SOLICITADAS PARA A ESPÉCIE VEGETAL	59
REFERÊNCIAS.....	61

1 IDENTIFICAÇÃO

1.1 NOMENCLATURA BOTÂNICA

Eugenia uniflora L. (1)

1.2 SINONÍMIAS BOTÂNICAS

Eugenia uniflora, *Eugenia arechavaletae*, *Eugenia brunnea*, *Eugenia dasyblasta*, *Eugenia decídua*, *Eugenia diáfana*, *Eugenia fuscopunctata*, *Eugenia gracilipes*, *Eugenia michelii*, *Eugenia oblongifolia*, *Eugenia strigosa*, *Eugenia zeylanica*, *Eugenia brasiliana*, *Eugenia costata*, *Eugenia indica*, *Eugenia lacustres*, *Eugenia microphylla*, *Eugenia parkeriana*, *Plinia rubra*, *Stenocalyx nhampiri*, *Eugenia lineatifolia*, *Eugenia bergii*, *Luma arechavaletae*, *Luma costata*, *Luma dasyblasta*, *Luma strigosa*, *Myrtus brasiliana*, *Myrtus willdenowii*, *Plinia pedunculata*, *Plinia petiolata*, *Plinia tetrapétala*, *Stenocalyx affinis*, *Stenocalyx brunneus*, *Stenocalyx costatus*, *Stenocalyx dasyblastus*, *Stenocalyx glaber*, *Stenocalyx grandifolius*, *Stenocalyx impunctatus*, *Stenocalyx lucidus*, *Stenocalyx michelii*, *Stenocalyx oblongifolius*, *Stenocalyx strigosus*, *Syzygium michelii*, *Stenocalyx uniflorus* (1-3).

1.3 FAMÍLIA

Myrtaceae (1-3)

1.4 FOTO DA PLANTA



Figura 1 – Folhas e frutos da espécie *Eugenia uniflora*L. Fonte:Yanna Dantas Rattmann

1.5 NOMENCLATURA POPULAR

No Brasil seus nomes populares mais conhecidos são pitanga (que significa “vermelho profundo em Tupi) e pitangueira, porém podem variar entre as diferentes regiões do Brasil ou entre os países onde a espécie pode ser encontrada, passando a ser também conhecida como pitango, cereja brasileira, cereja pitanga, ibitanga, pitangatuba, ginja, nangapiry, cereja cayena, cereja do Suriname, cerejeira kanak, cerejeira de Cayenne, cerejeira de Maré e boobo (4-12)

1.6 DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA

A *Eugenia uniflora* L. é nativa do Brasil e comumente encontrada entre os estados da Bahia até o Rio Grande do Sul (1, 13, 14). Também encontra-se amplamente distribuída em outros países da América do Sul, como Argentina, Paraguai e Uruguai (15, 16). Além disso, pode ser encontrada nas Guianas e em países da América Central (17, 18), no sudeste da Ásia e da África (19) e também na Austrália (18), caracterizando-se, sobretudo, como uma espécie de regiões tropicais e subtropicais (20). Esta espécie tem sido cultivada na Flórida, Califórnia, Havaí, China Meridional, Ceilão, Sri Lanka, Índia, Argélia, Tunísia, Egito, Nigéria, Madagascar, África do Sul, Israel, Sul da França e Holanda (21-24).



Figura 2 – Distribuição geográfica da espécie *Eugenia uniflora* L. em território brasileiro. Ressaltando sua maior presença nos estados da Bahia, Mato Grosso do Sul, Espírito Santo, Minas Gerais, Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná, Rio Grande do Sul e Santa Catarina. Fonte: Lista de Espécies da Flora do Brasil (1), com modificação. Disponível em: <<http://www.floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB10560>>. Acesso em: 08 Nov. 2014

1.7 OUTRAS ESPÉCIES CORRELATAS DO GÊNERO, NATIVAS OU EXÓTICAS ADAPTADAS

Segundo a estratégia de busca aplicada, foram relatadas as seguintes espécies correlatas do gênero: *Eugenia dysenterica* (25), *Eugenia jambolana* (16, 19, 26), *Eugenia malaccensis* (27), *Eugenia beaurepaireana*, *Eugenia brasiliensis*, *Eugenia catharinae* e *Eugenia umbeliflora* (28), *Eugenia caryophyllata* (29), *Eugenia schuechiana*, *Eugenia plicato-costata*, *Eugenia rostrifolia*, *Eugenia involucrata*, *Eugenia tiguyensis* (30), *Eugenia caryophyllus* (31).

2 INFORMAÇÕES BOTÂNICAS

2.1 PARTE UTILIZADA / ÓRGÃO VEGETAL

Foram obtidos registros da utilização dos ramos finos (11), das cascas do caule (7), das sementes (32, 33), das partes aéreas (34), frutos (35) e folhas. Porém, o material vegetal de interesse farmacológico é, sobretudo, as folhas, que constituem 72% da bibliografia analisada, entre as quais constam relatos da utilização das folhas secas, folhas frescas, brotos ou folhas jovens (36-40).

2.2 DESCRIÇÃO MACROSCÓPICA DA PARTE DA PLANTA UTILIZADA

As folhas da *Eugenia uniflora* L. são simples, ovais laceoladas, em geral com 4,5 cm a 6,2 cm de comprimento e 2,0 cm a 2,7 cm de largura, glabras, membranáceas a levemente coriáceas, com ápice agudo a acuminado, por vezes levemente falcado, base aguda a obtusa, margem inteira, penínervias, com nervura principal mais proeminente na região mediano basal da face abaxial (ver figura 3). Nervação camptódromo-broquidódroma, cada nervura secundária partindo em ângulo agudo em relação à principal, anastomosando-se com sua superior subsequente, de modo a formar uma série de arcos nas proximidades do bordo foliar; as nervuras secundárias e de ordem superior determinam aréolas incompletas, com terminações vasculares livres. Pecíolo com 0,3 cm a 0,6 cm de comprimento. No material seco, a face adaxial da lâmina é verde escura e a abaxial mais clara. As glândulas, presentes na lâmina, dificilmente são visualizadas sem auxílio de lentes (41).

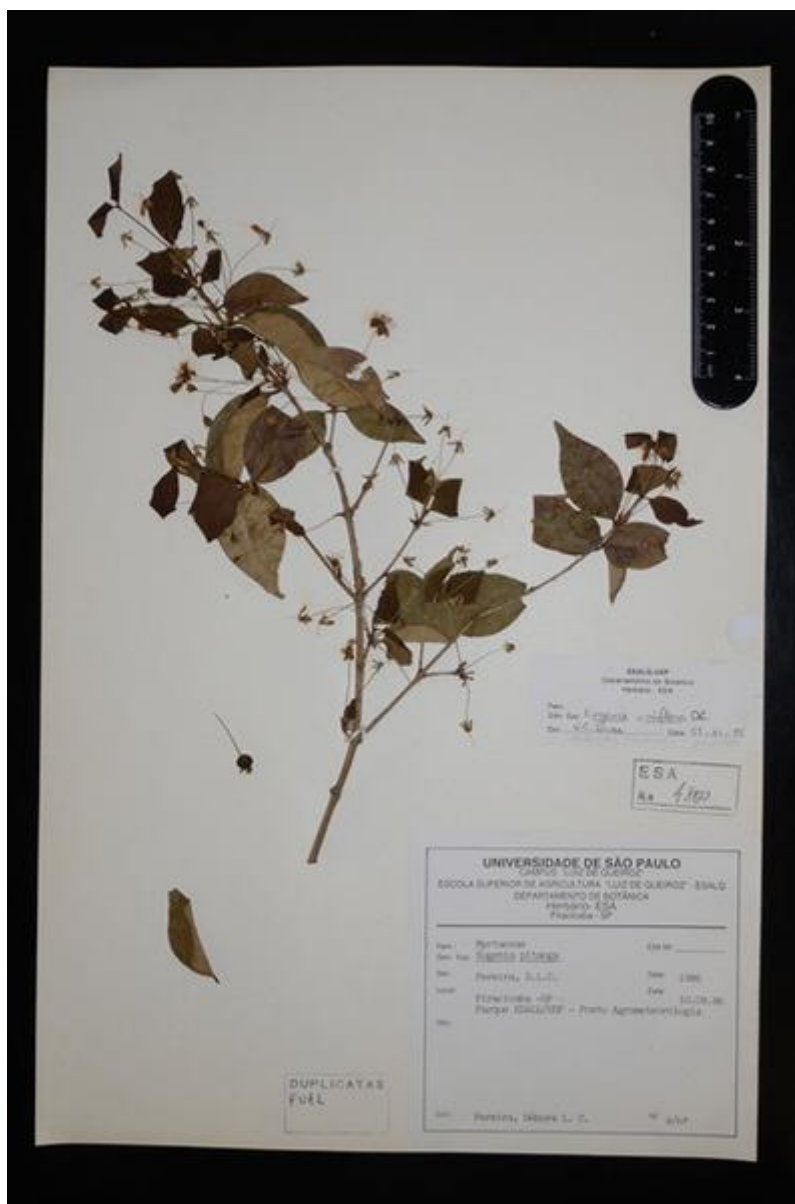


Figura 3: Exsicata de *Eugenia uniflora* L. Fonte:(1). Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB10560>>. Acesso em: 26 Out. 2014

2.3 DESCRIÇÃO MICROSCÓPICA DA PARTE DA PLANTA UTILIZADA

De acordo com a Farmacopeia Brasileira (41), as folhas da espécie *Eugenia uniflora* L. são hipoestomáticas, de mesofilo dorsiventral. Em secção transversal, a lâmina foliar apresenta epiderme uniestratificada, recoberta por espessa camada de cutícula. Os estômatos são do tipo paracítico, ocorrendo na mesma altura que as células epidérmicas fundamentais. Estas, em ambas as faces, mostram dimensões variadas e paredes anticlinais sinuosas. Nas células-guarda o espessamento da face interna é proeminente, sendo visualizado na forma de alteres. O parênquima paliçádico é uniestratificado e acompanhado por células coletoras. As

células em paliçada ocupam de 25,0% a 30,0% do mesofilo, sendo em geral, de dimensões menores na porção basal da lâmina. O parênquima esponjoso possui de sete a nove estratos de células com projeções braciiformes relativamente longas, o que permite a formação de amplos espaços intercelulares. No mesofilo são comuns idioblastos cristalíferos contendo cristais rômnicos de oxalato de cálcio e drusas, sendo estas mais abundantes especialmente junto aos feixes vasculares. Cavidades secretoras esquizolisígenas, em média com 60 µm de diâmetro, contendo gotas de óleo, são comuns subjacentes à epiderme, em ambas as faces foliares, embora mais abundantes na face adaxial. As duas a quatro células epidérmicas que recobrem externamente a cavidade secretora apresentam paredes internas retas. O epitélio destas cavidades, em secção transversal, é formado por cinco a oito células. Na região da nervura principal, de contorno plano-convexo, ou raramente levemente côncavo-convexo ou biconvexo, ocorrem subjacentes à epiderme uma a três camadas de colênquima anelar comespessamentos tênues. O feixe vascular principal é do tipo bicolateral, em arco aberto, envolto por dois a três estratos de células parenquimáticas de paredes espessadas, e uma bainha de fibras, exceto nas extremidades do arco. O floema apresenta abundância de cristais rômnicos de pequenas dimensões. As nervuras secundárias e as de menor calibre são colaterais, com calotas de fibras em ambos os polos dos tecidos condutores. O pecíolo, de contorno côncavoconvexo, apresenta pequenas expansões laterais. A epiderme é uniestratificada, contendo substâncias de coloração castanha, também presente nas células do parênquima fundamental subjacente, colenquimatoso, o qual apresenta todas as suas células com tênues espessamentos em celulose. Cavidades secretoras, semelhantes às da lâmina, também estão presentes subepidêrmicamente. Grãos de amido, drusas e cristais ocorrem em abundância por todo o parênquima fundamental. O feixe vascular configura-se em arco aberto, bicolateral, com abundância de cristais rômnicos no floema, envolto por quatro a oito camadas de tecido parenquimático de paredes espessadas, formando uma bainha perivascular. Fibras, isoladas ou em grupos de dois a três elementos, raramente estão presentes ao redor do feixe vascular (41). Detalhes adicionais nas figuras a seguir.

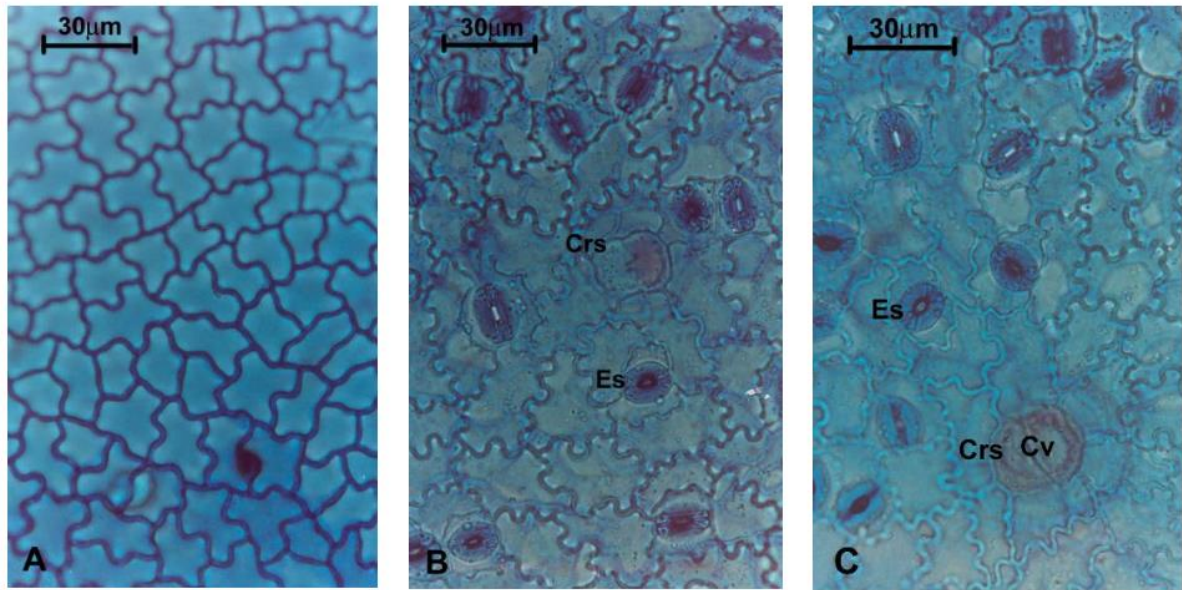


Figura 4. Seções paradermicas da lâmina foliar de *Eugenia uniflora* L. Fonte: (42). Em coloração com azul de Alcian/Safranina, A – Epiderme adaxial. B e C – Epiderme abaxial. Crs = células que circundam radialmente a cavidade secretora; Cv = cavidade secretora; Es = estômato. Disponível em: <http://www.revistas.ufg.br/index.php/REF/article/download/5148/4255>. Acesso em: 08 Nov. 2014.

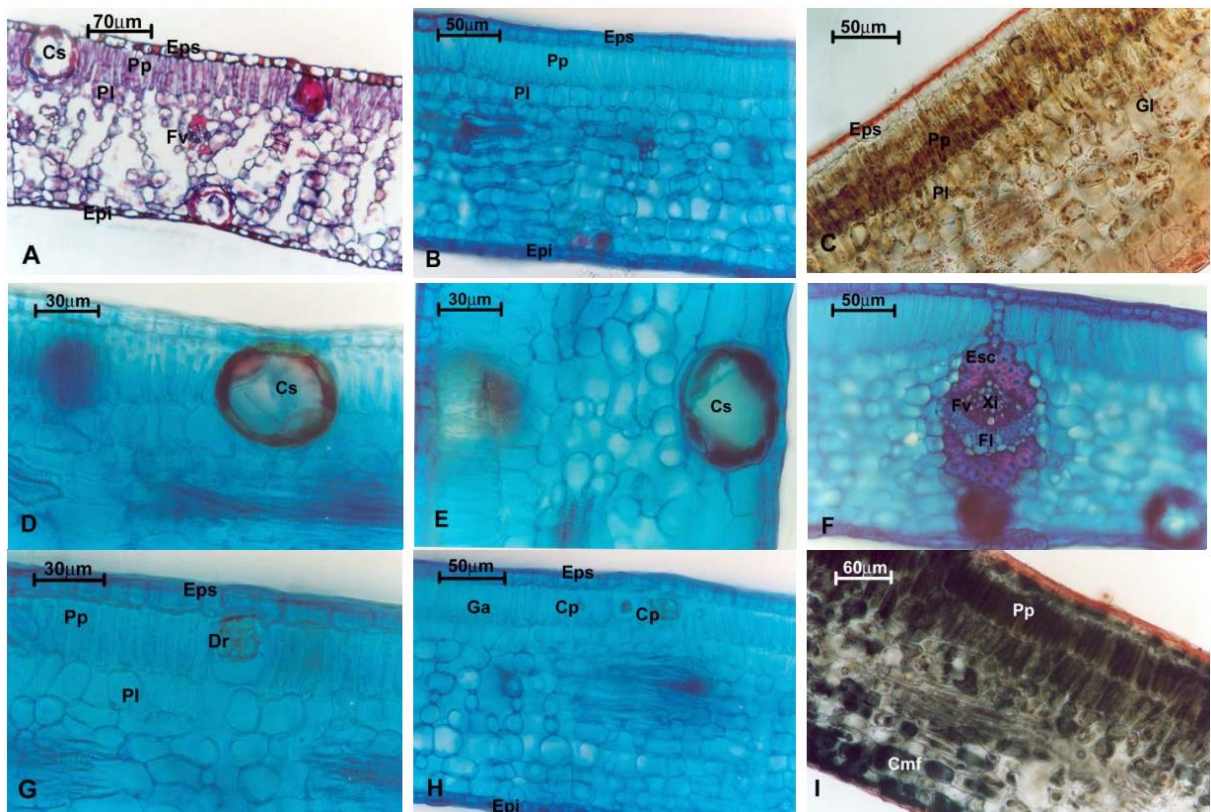


Figura 5. Seção transversal da lâmina foliar de *Eugenia uniflora*. Fonte: (42) Apresenta epiderme unisseriada em ambas as faces. Na face adaxial observa-se cutícula espessa (Painel C), mesofilo dorsiventral com parênquima paliádico unisseriado, parênquima lacunoso com várias camadas de células (Painéis A, B e C), cavidades secretoras próximas à epiderme adaxial (Painéis A e D) e abaxial (Painéis A e E). Em algumas regiões nota-se parênquima paliádico bisseriado (Painel I). Observam-se no parênquima paliádico idioblastos contendo drusas (Painel G) e cristais prismáticos (Painel H). Os feixes vasculares de menor calibre apresentam extensão de bainha e esclerênquima associado ao floema e xilema (Painel F). Reações histoquímicas com o

reagente de Steinmetz evidenciam além da cutícula espessa na epiderme adaxial, compostos fenólicos no parênquima paliçádico e lacunoso (Painel I). Compostos fenólicos são também evidenciados pelo cloreto férrico. Em reação com Sudan III, além da cutícula, observam-se gotas de material lipídico nos parênquimas paliçádico e lacunoso (Painel C). Disponível em: <http://www.revistas.ufg.br/index.php/REF/article/download/5148/4255>. Acesso em: 08 Nov. 2014.

2.4 INFORMAÇÕES SOBRE POSSÍVEIS ESPÉCIES VEGETAIS SIMILARES QUE POSSAM SER UTILIZADAS COMO ADULTERANTES

Dado não encontrado na literatura pesquisada.

3 INFORMAÇÕES DE CONTROLE DE QUALIDADE

3.1 ESPÉCIE VEGETAL / DROGA VEGETAL

3.1.1 Caracteres organolépticos

As folhas secas apresentam odor cítrico e sabor picante (41).

3.1.2 Requisitos de pureza

3.1.2.1 Perfil de contaminantes comuns

Não determinado. Porém, a Farmacopeia Brasileira estipula no máximo 2% de material estranho na constituição de droga vegetal (41).

3.1.2.2 Microbiológico

Informação não descrita nas referências consultadas.

3.1.2.3 Teor de umidade

O teor de água aceito nas amostras tem o limite máximo estipulado de 10% (41).

3.1.2.4 Metal pesado

Informação não descrita nas referências consultadas.

3.1.2.5 Resíduos químicos

Informação não descrita nas referências consultadas.

3.1.2.6 Cinzas

O teor de cinzas totais deve ser no máximo 11,0%, enquanto o teor de cinzas sulfatadas, 14% (41).

3.1.3 Granulometria

Informação não descrita nas referências consultadas.

3.1.4 Prospecção fitoquímica

A Farmacopeia Brasileira descreve, em detalhes, diferentes metodologias para os testes de prospecção para taninos totais e flavonoides totais (41):

Taninos totais: preparar a solução estoque pesando exatamente 0,75 g da droga pulverizada (250 μm) e transferindo para um erlenmeyer de 250 mL com boca esmerilhada. Adicionar 150 mL de água destilada. Aquecer em banho-maria durante 30 minutos à temperatura de 60 °C. Resfriar em água corrente e transferir para um balão volumétrico de 250 mL. Lavar o erlenmeyer e transferir as águas de lavagem com todo conteúdo de droga vegetal para o mesmo balão volumétrico. Completar o volume com água destilada. Deixar decantar e filtrar o líquido sobrenadante em papel de filtro. Desprezar os primeiros 50 mL do filtrado. Em seguida, proceder com a Espectrofotometria de absorção no visível(41).

Para o doseamento de flavonoides totais, deve-se preparar as soluções descritas a seguir e proceder com a Espectrofotometria de absorção no visível.

- Solução estoque: pesar, exatamente, cerca de 0,4 g de droga moída (240 μm), e transferir para um balão de fundo redondo de 100 mL. Adicionar 1 mL de solução de metenamina a 0,5% (p/v) em água, 20 mL de acetona e 2 mL de ácido clorídrico. Aquecer sobre manta de aquecimento, mantendo sob refluxo, por 30 minutos. Filtrar através de pequena quantidade de algodão para um balão volumétrico de 100 mL. Lavar o resíduo da droga e o algodão, no mesmo balão de fundo redondo, com 20 mL acetona. Manter sob refluxo, por 10 minutos, e filtrar em algodão para o mesmo balão volumétrico de 10 mL. Repetir essa operação mais uma vez. Resfriar à temperatura ambiente, e completar o volume com acetona. Transferir 20 mL de solução acetônica, para funil de separação (125 mL), 20 mL de água destilada e extrair com uma porção de 15 mL de acetato de etila, repetir a extração por três vezes, com porções de 10 mL de acetato de etila. Reunir as fases acetato de etila e lavar em funil de separação com duas porções de 50 mL de água destilada. Transferir a fase acetato de etila para balão volumétrico de 50 mL e completar o volume com acetato de etila.

- Solução amostra: transferir volumetricamente 10 mL da Solução estoque para balão volumétrico de 25 mL, adicionar 1 mL da solução de cloreto de alumínio a 2% (p/v) em metanol, completar o volume com solução metanólica de ácido acético a 5% (v/v).
- Solução branco: transferir 10 mL da Solução estoque para balão volumétrico de 25 mL e completar o volume com solução metanólica de ácido acético a 5% (v/v). Medir a absorvância da Solução amostra a 425 nm, em cubeta com 1 cm de espessura, 30 minutos após seu preparo, utilizando a Solução branco para ajuste do zero. Calcular o teor flavonoides totais, expressos em quercetina (41).

3.1.5 Testes físico-químicos

Informação não descrita nas referências consultadas.

3.1.6 Testes de identificação

De acordo com a Farmacopeia Brasileira (41), deve-se utilizar o método de cromatografia em camada delgada, utilizando sílica-gel F254, com espessura de 250 μm , como fase estacionária e mistura de acetato de etila, ácido fórmico e água (75:5:5), como fase móvel. Aplicar, separadamente, à placa, em forma de banda, 20 μL da Solução (1) e 10 μL da Soluções (2) e da Solução (3), recentemente preparadas, conforme descritas a seguir:

- Solução (1): pesar, exatamente, cerca de 10 g da droga moída, acrescentar 100 mL de água e aquecer sob refluxo por 15 minutos. Após resfriamento à temperatura ambiente, filtrar a solução obtida em algodão, sob pressão reduzida. Extrair a fase aquosa resultante com três porções de 25 mL de acetato de etila em funil de separação de 125 mL. Deixar em repouso em freezer a temperatura de $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 15 minutos, para total separação das fases. Reunir e filtrar as frações orgânicas com 5 g de sulfato de sódio anidro. Evaporar a fração orgânica em evaporador rotatório sob pressão reduzida até resíduo. Ressuspender o resíduo com 1 mL de metanol.
- Solução (2): pesar cerca de 1 mg de epicatequina e dissolver em 2 mL de metanol.
- Solução (3): pesar cerca de 1 mg de 4'-O-metilgalocatequina e dissolver em 1 mL de metanol.

Desenvolver o cromatograma. Remover a placa e deixar secar em capela de exaustão. Nebulizar a placa com solução de cloreto férrico a 1% (p/v) em metanol. O cromatograma obtido com a Solução (1) apresenta duas manchas de coloração cinza azulada, na mesma

altura que as verificadas nos cromatogramas obtidos com a Solução (2) e a Solução (3) (R_f de aproximadamente 0,85 e 0,87, respectivamente), no quadrante central são observadas duas manchas de coloração castanho azulada.

A Farmacopeia Brasileira descreve ainda o método para a identificação de curzerenos, conforme o procedimento em cromatografia a gás. Deve-se utilizar cromatógrafo provido de detector de espectrometria de massas; coluna capilar de 30 m de comprimento e 0,25 mm de diâmetro interno, preenchida com propilenoglicol, com espessura do filme de 0,25 μm ; temperatura da coluna de 60 °C a 250 °C, a 3 °C por minuto (total de 80 minutos), temperatura do injetor a 220 °C e temperatura do detector a 230 °C; utilizar hélio a uma pressão de 80 kpa como gás de arraste com fluxo de 1 mL/ minuto. Utilizar mistura de nitrogênio, ar sintético e hidrogênio (1:1:10) como gases auxiliares. Deve-se injetar 1 μL do óleo volátil em éter etílico (2:100) no cromatógrafo a gás, utilizando divisão de fluxo de 1:50. Os isômeros do curzereno devem apresentar tempo de retenção relativo de aproximadamente 1845 (41).

A Farmacopeia Brasileira fornece diferentes opções para a identificação de taninos, conforme transcritas a seguir:

- Aquecer, sob refluxo, cerca de 3 g da droga pulverizada com 60 mL de água destilada durante 15 minutos. Esfriar e filtrar. A 2 mL do extrato adicionar duas gotas de ácido clorídrico e gotejar gelatina. O aparecimento de precipitado nítido indica reação positiva para taninos.
- A 2 mL do extrato obtido no teste para identificação do curzerenos, adicionar 10 mL de água e duas a quatro gotas de solução de cloreto férrico a 1% (p/v) em etanol. O desenvolvimento de coloração cinza-escuro indica reação positiva para taninos.
- A 2 mL do extrato obtido no teste para identificação do curzerenos, adicionar 0,5 mL de vanilina a 1% (p/v) em metanol e 1 mL de ácido clorídrico. O desenvolvimento de coloração vermelha indica reação positiva para taninos.
- A 5 mL do extrato obtido no teste para identificação do curzerenos, adicionar 10 mL de ácido acético 2 M e 5 mL de acetato de chumbo SR. O aparecimento de precipitado esbranquiçado, indica presença de taninos.

Além destes testes, a Farmacopeia Brasileira descreve uma forma de identificação de agliconas flavonoídicas, por meio da adição de pequenos fragmentos de magnésio e 1 mL de ácido clorídrico a 5 mL do extrato obtido no teste para identificação do curzerenos. O aparecimento de coloração vermelha indica a presença de agliconas flavonoídicas (41).

3.1.7 Testes de quantificação

3.1.7.1 Componentes químicos e suas concentrações: descritos e majoritários, ativos ou não

De acordo com a Farmacopeia Brasileira, a droga vegetal constituída pelas folhas secas da espécie contém, no mínimo, 5,0% de taninos, 1,0% de flavonoides totais, expressos em quercetina; e, 0,8% de óleos voláteis. O óleo volátil é constituído de, no mínimo, 27,0% de curzerenos (cis e trans) (41).

3.1.8 Outras informações úteis para o controle de qualidade

A Farmacopeia Brasileira e os artigos científicos consultados não sugeriram um marcador específico a ser considerado para fins de produção e padronização de fitoterápicos.

3.2 DERIVADO VEGETAL

3.2.1 Descrição

Nos artigos consultados, diferentes extratos foram obtidos: aquosos (4, 7, 43), hidroalcoólicos (5, 44, 45), metanólico (46, 47), etanólico (6, 25, 34, 48-50), orgânicos (51-53) e fluído supercrítico (CO₂) (24, 54). Além de frações: metanólica, butanólica, acetato de etila, clorofórmio e hexano (5, 13). E muitos estudos foram realizados com o óleo essencial (8, 55-63).

3.2.2 Método de obtenção

Diversos métodos de extração foram utilizados. Entre eles infusão (4), decocção (16) Soxhlet (5, 38, 64), maceração estática (7, 25, 47), maceração dinâmica (48), extração supercrítica (24, 54, 65). Os óleos essenciais foram extraídos frequentemente por arrasto de vapor em um aparato do tipo Clevenger (8, 55, 63, 66), também por meio de extração em Soxhlet com hexano (67), ou ainda por extração supercrítica (17).

A Farmacopeia Brasileira descreve os seguintes procedimentos para a obtenção dos óleos voláteis: utilizar balão de 1000 mL contendo 500 mL de água destilada como líquido de destilação e 0,5 mL de xileno, que deve ser introduzido pela abertura lateral. Utilizar planta

seca rasurada e não contundida. Proceder à determinação de óleo volátil, a partir de 100 g da droga rasurada. Destilar durante quatro horas (41).

Em uma das referências consultadas, um extrato etnoterapêutico foi preparado no dia da sua administração em animais usando-se a proporção de 0,7 gramas de folhas secas para cada litro de água. As folhas foram fervidas durante 20 minutos e posteriormente filtradas, de acordo com a forma de preparo tradicional (68). Estimou-se que a quantidade ingerida em 24 horas por um homem de 70 kg corresponde a uma dose terapêutica de 0,4 mg/kg/h, a qual foi reproduzida nos testes posteriores de hipotensão em animais (a ser detalhado em outro item).

3.2.3 Caracteres organolépticos

Esta informação não foi descrita para o derivado vegetal nas referências avaliadas.

3.2.4 Requisitos de pureza

3.2.4.1 Perfil de contaminantes comuns

Informação não descrita nas referências consultadas.

3.2.4.2 Microbiológico

Informação não descrita nas referências consultadas.

3.2.4.3 Teor de umidade

Informação não descrita nas referências consultadas.

3.2.4.4 Metal pesado

Informação não descrita nas referências consultadas.

3.2.4.5 Resíduos químicos

Informação não descrita nas referências consultadas.

3.2.5 Testes físico-químicos

Informação não descrita nas referências consultadas.

3.2.6 Prospecção fitoquímica

O conteúdo total de compostos fenólicos foi predominantemente avaliado pelo método colorimétrico de Folin-Ciocalteu, o qual confirmou a presença destes constituintes químicos

em vários extratos e frações obtidas da *Eugenia uniflora* L. (18, 22, 24, 27, 32, 40, 69-71). Gupta e colaboradores (2009) determinaram o conteúdo total de compostos fenólicos para os extratos aquoso e extrato metanólico das folhas, resultando respectivamente em $8,75 \pm 1,34$ e $16,80 \pm 1,82$ mg de ácido gálico por peso seco (72).

Determinações colorimétricas também confirmaram a presença de flavonoides e de derivados flavonóis, sobretudo na fração acetato de etila e fração butanólica (5, 27, 36, 69, 70, 73).

Os extratos e frações da *Eugenia uniflora* L. ainda apresentaram testes positivos para, alcaloides, cumarinas, antraquinona, esteroides, triterpenos heterosídios e saponinas (10, 50, 74, 75).

Na fração diclorometano das folhas foram obtidas reações positivas para esteroides e triterpenos; na fração acetato de atila, compostos fenólicos e flavonoides; e na fração aquosa foram detectados os elagitaninos (33).

Foram relatadas ainda reações positivas para mucilagens, glicosídeos cardiotônicos e óleo essencial nas folhas de *E. uniflora* (76).

Foram realizados ainda ensaios colorimétricos específicos que confirmaram a presença de antocianinas, beta-caroteno e licopeno nos extratos da polpa dos frutos de *Eugenia uniflora* L. (77).

3.2.7 Testes de identificação

A composição química do óleo essencial foi frequentemente avaliada usando cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (GC-MS) (14, 21, 78-80).

Foram realizados ensaios de identificação dos constituintes de extrações de diferentes partes da *Eugenia uniflora* L. por meio de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa, carbono treze e hidrogênio (14, 30, 32, 37, 46, 77, 81). A identificação dos compostos individuais foi obtida por comparação dos índices de retenção com arquivos da biblioteca do GC/MS ou da literatura científica (8, 18). A cromatografia líquida de alta performance (HPLC) e a ressonância magnética (RMN) também contribuíram para a identificação dos compostos presentes na planta (8, 55, 71, 82).

Foram identificados diversos constituintes, na fração butanólica das folhas da *Eugenia uniflora* L. entre estes a quercetina, a miricetina (compostos majoritários), ácido gálico, açúcares isolados como a arabinose, ramnose, galactose, e glicose, ou associados aos constituintes como a miricetina-ramnosídeo, quercetina-ramnosídeo, miricetina-hexosil-galato,

quercetina-hexosil-galto, quercetina-ramnosil-galato (5). Outros estudos com extratos das folhas confirmaram a presença da mitocitrina, esteróides, compostos mono e triterpenoides, taninos, antraquinonas, fenóis, cineol e óleos essenciais nas folhas (48), e hiperosídeo (83)

No extrato metanólico da polpa dos frutos foram identificadas antocianinas, especialmente a cianidina-3-glicosídeo e delphinidina-3-glicosídeo (46). Também nos frutos foram identificados vários compostos fenólicos como a miricetina e derivados da quercetina, como a quercitrina, isoquercitrina, além da cianidina derivados, entre outros (48), selina-1,3,7(11)-trien-8-ona, além do ácido cítrico, oxalático, pectina e carotenoides (84).

A extração supercrítica dos frutos resultou em um extrato rico em compostos fenólicos, incluindo antocianinas e os seguintes carotenoides: All-trans-luteína, All-trans-zeaxantina, All-trans-ribuxantina, cis-rubixantina I, cis-rubixantina II, All-trans-beta-criptoxantina, All-trans-licopeno, 13-cis-licopeno, All-trans-alfa-caroteno, all-trans-gama-caroteno, (all-trans-+9-cis)-beta-caroteno e (13-cis-+15-cis)-beta-caroteno (54). A fração aquosa dos frutos de pitanga contém, além dos flavonoides miricitrina, quercetina, e seus derivados, os terpenóides como monoterpenos, triterpenos, sesquiterpenos, e taninos hidrolisados como eugeniflorina D1 e o eugenoflorina D2.

No óleo essencial das folhas foram identificados α -copaeno, β -elemeno, α -humuleno, allo-aromadendreno, β -selineno, ledol, spatulenol, cubenol (8), curzereno, selina 1,3,7, trien-8-ona, atractilona e furanodiona (55), citronol, geraniol, cineol e sesquiterpenos (67), citronelol, geraniol, linalol (85), β -cariophyleno, óxido selina-1,3,7, trieno-ona, germacreno A, germacreno B, germacreno D (78).

Melo e colaboradores (2007) ainda identificaram no óleo essencial os seguintes compostos: δ -elemeno, β -E-caryofileno, γ -elemeno, aromadendreno, allo-aromadendreno, β -chamigreno, β -selineno, biciclogermacreno, anodieno/furanoelemeno, δ -cadinene, selina-3,7(11)-dieno, ledol, spatulenol, globulol, viridiflorol, guaiol, β -elemenona, 1,10-di-epi-cubenol, 10-epi- β -eudesmoi, 1-epi-cubenol, γ -eudesmol, τ -cadinol, τ -muurolol, β -eudesmol, α -cadinol, atractilona, α -bisabolol, (E,E)-germacrona, (E)-nerolidol acetato (57).

3.2.8 Testes de quantificação

3.2.8.1 Componentes químicos e suas concentrações: descritos e majoritários, ativos ou não

No extrato etanólico das folhas de *Eugenia uniflora* L., o conteúdo de compostos fenólicos totais correspondeu a 9,22%, o de taninos 5,08% e flavonoides 0,53% (20).

No óleo essencial obtido por extração das folhas por hidrodestilação e posterior extração com diclorometano foram quantificados os seguintes constituintes: curzerene (85,1%), germacrene B, (2,0%), β -elemene (1,9%), furanodiene (1,2%), selina-11-en-4-alfa-ol (1,0%), germacrene D (0,9 %), bicyclogermacrene (0,9%), e atractilone (0,8%), entre outros, totalizando 97,3% do óleo essencial (58). Em outro estudo, foram identificados em diferentes concentrações o furanodieno e seu produto de rearranjo, furanoelemeno (ou curzereno, 50,2%), β -elemeno (5,9%) e α -cadinol (4,7%), os quais foram os compostos majoritários no óleo essencial extraído das folhas (57).

Em um estudo de Ogunwande e colaboradores (2005) foi relatado que os componentes majoritários do óleo essencial das folhas eram: curzerene (19,7%), selina-1,3,7(11)-trien-8-ona (17,8%), atractilona (16,9%) e furanodieno (9,6%), enquanto aqueles majoritários no óleo dos frutos eram: germacrona (27,5%), selina-1,3,7(11)-trien-8-ona (19,2%), curzereno (11,3%) e oxidoselina-1,3,7(11)-trien-8-ona (11,0%) (79).

A análise multivariada da composição química dos óleos essenciais das folhas de *Eugenia uniflora* L., provenientes de plantas com cores distintas de fruto, indicou a presença de três grupos de óleos em relação ao biótipo do fruto das amostras. O primeiro grupo incluiu amostras de frutos amarelos, vermelhos escuros e roxos contendo altas percentagens de germacreno B (11,1-30,7%), germacrona (9,8-54%) e atractilona (0-19,9%). No grupo II, com amostras de frutos vermelhos claro, os constituintes majoritários foram o curzereno (42,0-43,2%), germacreno D (8,7-9,0%) e germacreno A (5,9-8,9%), enquanto que o grupo III incluiu amostras com frutos vermelho-alaranjado, caracterizadas por um alto conteúdo de selina-1,3,7(11)-trien-8-ona (40,3-55,4%) e epóxido de selina-1,3,7(11)-trien-8-ona (12,7-24,4%) (37).

A variabilidade química de *Eugenia uniflora* L. reflete as influências ambientais a que a planta está sujeita. Análise de componentes principais revelaram a ocorrência de altos teores de taninos hidrolisáveis durante as estações de chuvosas, enquanto os flavonoides foram produzidos principalmente nas estações secas. Estes fatos confirmam que mudanças climáticas são capazes de afetam as concentrações de fenóis em *Eugenia uniflora* (86).

As concentrações de curzereno determinadas em óleos essenciais de amostras de *Eugenia uniflora* L., provenientes de diferentes locais do Brasil e da Nigéria, apresentaram grandes variações, desde 34,8% em Goiás até 85,1% em Minas Gerais. Estas variações apresentaram-se ainda maiores quando comparadas à concentração de curzereno obtida da amostra da planta proveniente da Nigéria, que correspondeu a 19,7% (58).

3.3 PRODUTO FINAL

3.3.1 Forma farmacêutica

Nas referências bibliográficas avaliadas, foi possível identificar as formas farmacêuticas: spray, confeccionado a base de óleo essencial de *Eugenia uniflora* a 2% (67); e dentifrício ou creme dental contendo extrato hidroalcoólico do fruto maduro da *Eugenia uniflora* a 3% (84).

3.3.2 Testes específicos por forma farmacêutica

Informação não descrita nas referências consultadas.

3.3.3 Requisitos de pureza

Informação não descrita nas referências consultadas.

3.3.4 Resíduos químicos

Informação não descrita nas referências consultadas.

3.3.5 Prospecção fitoquímica

Informação não descrita nas referências consultadas.

3.3.6 Testes de identificação

Informação não descrita nas referências consultadas.

3.3.7 Testes de quantificação

3.3.7.1 Componentes químicos e suas concentrações: descritos e majoritários, ativos ou não

Nas referências consideradas não ocorreram testes específicos para avaliar os componentes químicos da *Eugenia uniflora* e suas concentrações no extrato hidroalcoólico ou no óleo essencial utilizados para a produção do spray e do dentifrício, respectivamente. Foi relatado que o spray fora confeccionado usando óleo essencial das folhas de *Eugenia uniflora* a 2% (67); e queo dentifrício continha a seguinte composição: extrato hidroalcoólico do fruto maduro da *Eugenia uniflora* a 3%; conservantes (parabenos) a 0,02 g e base de dentifrício (adquirido em farmácia de manipulação): qsp (67). Entretanto, afirmou-se que o óleo

essencial contém citronol, geraniol, cineol e sesquiterpenos (67) e que no fruto encontram-se a selina-1,3,7 (11)-trien-8-ona, além do ácido cítrico, oxálico, pectina e carotenoides (84).

4 INFORMAÇÕES DE SEGURANÇA E EFICÁCIA

4.1 USOS POPULARES / TRADICIONAIS

São numerosos os usos populares da *Eugenia uniflora* nos países da América do Sul, sobretudo no Brasil, Argentina, Paraguai e Uruguai (20, 45). Sugere-se que o seu uso tenha sido introduzido na medicina popular pelos índios Guaranis no século XV (40). Na literatura científica consultada encontram-se os seguintes usos terapêuticos desta planta: antidiarreica (4, 15, 17, 55, 87), anti-inflamatória (5, 7, 8, 48, 51), antirreumática (15, 17, 45, 47, 48, 55), antipirética (7, 15, 17, 47, 48, 55, 88), hipotensora (17, 36, 45, 47-49, 55, 68, 88, 89), diurética (15, 17, 47, 48, 55), hipolipidêmica e hipercolesterolemia (48, 55, 88), antioxidante (48, 49, 51), antifúngica (6, 9, 15, 45, 66), vermífuga (85), antiparasitária (7, 34, 47), antimicrobiana (8, 9, 45, 48, 49, 90), carminativa (47, 55), expectorante (55), adstringente (17, 34). Além disso é descrita para tratar doenças do trato digestório (8, 17, 45, 47, 48, 55, 87), amigdalite (9, 45, 91), gripe (36, 45), febre amarela (17, 69), gota (47, 48, 55, 88), doenças hepáticas (45, 47, 48), infecção urinária (92), conjuntivite (93), obesidade (17, 47, 55, 88, 94, 95), diabetes (15, 45, 47, 87, 94), dor de cabeça (47), bronquite (47), hemorroidas (64), resfriado (47), tosse (47, 55), doenças de pele (43, 87). É ainda usada para estimular o fluxo menstrual (17, 47), auxiliar no parto (47) e para tratar sintomas relacionados à depressão, como distúrbios de humor, nervosismo, ansiedade e irritação (28, 87). Como utilidade adicional, ainda é descrita como repelente de insetos (17, 47).

No Paraguai, o pó das folhas de *Eugenia uniflora* L. é adicionado à erva mate (*Ilex paraguariensis*) para a ingestão da tradicional bebida tereré. Naquele país, é utilizada pela população, sobretudo, como diurética, anti-hipertensiva, para cólica menstrual, controle do colesterol e ácido úrico e ainda como digestivo e adstringente (45, 82).

A *Eugenia uniflora* L., cultivada em outros continentes, também tem sido utilizada na medicina popular. Por exemplo, nas Ilhas Madeira é usada para o tratamento da bronquite, gripe, e distúrbios intestinais (13, 20), na Nigéria, é usada como antipirético (13, 20) e em Maurício é usada como emenagogo (63).

4.2 PRESENÇA NA NOTIFICAÇÃO DE DROGAS VEGETAIS

A resolução RDC 10/2010 (96), já revogada, incluía a *Eugenia uniflora* L. como espécie passível de ser tratada como droga vegetal sujeita à notificação, apresentando as seguintes informações:

Nomenclatura botânica: *Eugenia uniflora*

Nomenclatura popular: Pitangueira

Alegações: Diarreia não infecciosa

Parte utilizada: Folhas

Forma de utilização: Infusão: 3 g (1 colher de sopa) em 150 mL (xíc chá)

Posologia e modo de usar: Utilizar 1 cálice (30 mL) após a evacuação em no máximo 10 x ao dia

Via: Oral

Uso: Adulto

Porém, a *Eugenia uniflora* não consta na Instrução Normativa número 02, de 13 de Maio de 2014, a qual publica a “Lista de medicamentos fitoterápicos de registro simplificado” e a “Lista de produtos tradicionais fitoterápicos de registro simplificado” (97).

4.3 ESTUDOS NÃO-CLÍNICOS

4.3.1 Estudos toxicológicos

4.3.1.1 Toxicidade aguda

Foram obtidos seis estudos que envolvem testes de toxicidade aguda com extratos da *Eugenia uniflora*. Entre estes, cinco foram realizados em camundongos, nos quais as vias utilizadas foram a oral e a intraperitoneal. Um dos testes foi realizado em peixes tilápias (*Oreochromis niloticus*), pela via oral.

Para avaliar os sinais de toxicidade nos camundongos verificou-se a presença ou não de alterações respiratórias, digestivas e neurológicas que incluem: sialorréia, taquipnéia, hemoptise, náusea, vômito, diarreia, tremor, mioclonia, convulsão, agitação, piloereção, irritabilidade, resposta ao toque, aperto de cauda, contorção, força de agarrar, tremores, respiração, número de mortos, conforme teste hipocrático (10, 45, 82, 88, 98). Após o período de observação foi realizada a coleta do sangue dos animais para posterior análise bioquímica (45), necropsia para análises histopatológicas (82, 88), ou realizadas análise macroscópica

(aspecto, cor e tamanho) e pesagem do fígado, rins, coração e pulmões (10, 98). Os resultados se encontram organizados no Quadro 1 a seguir.

Quadro 1. Testes de toxicidade aguda realizados com os extratos da *Eugenia uniflora* L.

Extrato testado	Doses, via e animal	Período de observação	Resultados	DL₅₀	Ref.
Extrato Bruto Hidroalcoólico das folhas	125, 250, 500, 1000 e 2000 mg/kg, por via oral, em camundongos.	Após 30 minutos e 1, 2, 4, 6, 12, 24, e 48 horas da administração	Os grupos tratados com doses de 500 e 2000 mg/kg apresentaram alterações comportamentais significativas a partir da ingestão até completar 48 horas de observação. O grupo tratado com 1000 mg/kg do extrato apresentou alteração comportamental significativa imediatamente após a sua ingestão e após a quarta hora de observação. A dose de 2000mg/kg causou efeitos tóxicos sobre a atividade espontânea nos tempos 0, 30, 1, 2, 4, e 6 horas após a administração. Ocorreram óbitos nas doses de 500, 1000 e 2000mg/kg em machos, onde ocorreram respectivamente 4, 1 e 3 mortes. Nas fêmeas, ocorreram óbitos nos grupos tratados com 500 e 1000mg/kg do extrato, respectivamente 1 e 2 mortes. As enzimas hepáticas AST, ALT e bilirrubina apresentaram-se alteradas principalmente nos animais tratados com as doses 500 e 2000mg/kg.	A DL ₅₀ de todos os animais independente de sexo foi calculada em 1.924,41 mg/kg de extrato.	(45)
Extrato aquosodas folhas	300 mg/kg, por via oral, em camundongos	Foram observados durante 48 horas	Os resultados não diferiram nas comparações com animais do grupo controle	Não calculada, pois não houve morte	(88)
Extrato hidroalcoólico das folhas	50, 100, 500 ou 1100 mg/kg administrados por	Foram observados durante 6 dias.	Observou-se diminuição da atividade motora, paralisia das patas traseiras, exolfalmia, cianose das patas e	220 mg/kg	(82)

	intraperitoneal, em camundongos.		orelhas, piloereção e mortalidade para as duas maiores doses. Não foram observadas alterações histopatológicas.		
Extrato hidroalcoólico das folhas	3,0; 3,6; 4,3; 5,2 e 6,2 g/kg por via oral, em camundongos	Foram observados durante 14 dias, a cada 24 horas	Nas primeiras 4 horas após a administração ocorreu piloereção, pouca reação a estímulos e desinteresse por água e ração. Os primeiros óbitos ocorreram nas primeiras 24 horas, para dose de 6,2 g/kg. De um modo geral, os animais foram se recuperando até o sexto dia de observação, quando não se notou diferença de comportamento dos grupos tratados em relação aos grupos controle; apenas nas duas doses mais altas ocorreram os óbitos, até o quarto dia após a administração do extrato. Ao final do ensaio, não foram observadas diferenças no aspecto geral (cor, tamanho) de coração, pulmão, fígado e rins, nem nas massas relativas dos órgãos, em comparação ao controle.	5,93 g/kg	(10)
Extrato hidroacetônico das folhas	0,05, 0,1 e 0,5 g/kg por via intraperitoneal, em camundongos.	Durante as primeiras 4 horas, os camundongos foram observados constantemente. Nas 4 horas seguintes, estes foram observados a cada hora. Depois, a cada dia, durante 3 semanas.	Poucos minutos após a administração observou-se diminuição da atividade, paralisia das patas posteriores e piloereção, seguidas por cianose nas extremidades, agrupamento dos animais, diminuição ou perda dos reflexos e passividade ao toque. Estas características se apresentaram com intensidade dependente da dose. As doses de 0,10 e 0,50 g/kg causaram morte dos camundongos nas primeiras 24 horas de experimento, com um quadro de convulsões,	0,2 g/kg	(98)

			cianose. Nas necropsias observaram-se macroscopicamente que o coração, pulmões fígado e estômago apresentavam aspecto normal.		
--	--	--	---	--	--

Um dos artigos avaliados testou a ação do extrato etanólico das folhas e as frações hexânica, clorofórmica e acetato de etila em peixes tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*), por meio de uma metodologia que, segundo o autor, pode contribuir para estabelecer a tilápia nilótica como modelo experimental para testes de princípios ativos de plantas (60). Para isso, o extrato etanólico e as frações das folhas da *Eugenia uniflora* foram incorporados à ração administrados aos peixes por via oral, nas concentrações de 280 mg/ kg do extrato etanólico e as concentrações de 70, 140 e 280 para cada uma das frações (hexânica, clorofórmica e acetato de etila). A exposição durou 24 horas e os peixes foram sacrificados para a avaliação histológica das brânquias de cada peixe. Pelas análises qualitativas na microscopia de luz, concluiu-se que o extrato etanólico bruto e as frações das folhas da *E. uniflora* apresentaram efeito sistêmico nas tilápias nilóticas atingindo as brânquias. As ações tóxicas, como destacamento e descamação do epitélio respiratório e hiperplasia das células do epitélio interlamelar, foram mais pronunciadas nas tilápias que ingeriram maiores concentrações das frações (60).

4.3.1.2 Toxicidade subcrônica

Essa informação não foi descrita nas referências consultadas.

4.3.1.3 Toxicidade crônica

Essa informação não foi descrita nas referências consultadas

4.3.1.4 Genotoxicidade

Foi realizada uma avaliação dos parâmetros citológicos induzidos pelo extrato aquoso das folhas de *Eugenia uniflora*, entre outras sete plantas usadas como agentes anti-hipertensivos na medicina tradicional argentina.

A evidência de genotoxicidade foi investigada com um modelo que utiliza as raízes de *Allium cepa*. Estas foram expostas aos extratos das diferentes plantas durante 48 horas, e então foram separadas, fixadas e montadas para a avaliação do índice mitótico (MI), da

prófase (PI), metáfase (MeI), anáfase (AI) e telófase (TI), bem como das anormalidades cromossômicas, produção de micronúcleo e células binucleadas na interfase. A água foi usada como controle negativo, enquanto o paracetamol foi o controle positivo.

Nos resultados, os extratos aquosos de todas as plantas avaliadas, inclusive da *E. uniflora*, induziram uma inibição no índice mitótico (MI) em relação ao controle. Além disso, causou dispersão dos cromossomos na metáfase, sugerindo o seu potencial genotóxico (89). O acesso ao artigo completo não foi possível, limitando as informações como a concentração testada.

4.3.1.5 Sensibilização dérmica

O óleo essencial das folhas de *Eugenia uniflora* foi extraído para fins de utilização na indústria de perfumes e posteriormente testado em humanos, por via tópica, na concentração de 1,5% de óleo essencial dissolvido em etanol. Os parâmetros observados foram a sensibilização ou a irritação da pele. Não foi observada nenhuma reação da pele humana ao contato com o óleo essencial (12). Foram apresentados poucos detalhes da metodologia utilizada para ensaio, constituindo-se em uma limitação deste estudo.

4.3.1.6 Irritação cutânea

Essa informação não foi descrita nas referências consultadas.

4.3.1.7 Irritação ocular

Essa informação não foi descrita nas referências consultadas.

4.3.2 Estudos farmacológicos

4.3.2.1 Ensaios *in vitro*

Foram descritos 65 ensaios *in vitro* entre os artigos científicos considerados nesta monografia. Os testes para avaliar as ações farmacológicas dos extratos, frações, óleos essenciais ou compostos isolados da *Eugenia uniflora* concentraram-se nas atividades antimicrobiana (6, 18, 20, 25, 31, 33, 37, 55, 61, 63, 66, 79, 85, 91, 93, 100, 102, 108, 109-111, 114, 116), antioxidante (10, 24, 40, 51, 54, 69, 71, 72, 117-120), antiparasitária (7, 47, 49, 50, 56, 59, 73, 74, 112), antidiarreica (4), inibidora enzimática (82, 123, 124), entre outras

relatadas com menor frequência (imunomoduladora, interferência sobre o fluxo de canais de Ca^{2+} e alelopática) (27, 125). Os detalhes encontram-se distribuídos nas seções a seguir, conforme atividade farmacológica e extratos testados.

4.3.2.1.1 Efeito antimicrobiano *in vitro* da *Eugenia uniflora* L.

Óleos essenciais

A maior parte dos estudos *in vitro* considerados nesta monografia referem-se à atividade antimicrobiana de *E. uniflora*, as quais somam 33 investigações. Deste total, existem 13 testes farmacológicos como óleo essencial das folhas, e 2 destes testes incluem o óleo essencial obtido dos frutos de *E. uniflora*, conforme Quadro 2 abaixo.

Quadro 2. Ensaio microbiológicos realizados com óleos essenciais obtidos de *Eugenia uniflora*.

Fonte do óleo essencial	Concentrações	Microorganismos	Resultado	Ref.
Folhas	4, 2, 1, 0,5 e 0,25%	Fungos: <i>Candida albicans</i> , <i>C. albicans</i> , <i>C. guilliermondii</i> , <i>C. guilliermondii</i> , <i>C. krusei</i> , <i>C. krusei</i> , <i>C. parapsilosis</i> , <i>C. parapsilosis</i> , <i>C. stellatoidea</i> , <i>C. stellatoidea</i> , <i>C. tropicalis</i> , <i>C. tropicalis</i> .	Nas concentrações testadas, detectou-se atividade inibitória somente sobre a <i>Candida krusei</i> , com um halo de inibição correspondente a 12 mm, na concentração de 2%.	(66)
Frutos	62,5 a 500 µg/mL	Fungos: <i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	Houve completa inibição do crescimento destes fungos na concentração de 62,5 µg/mL	(37)
Folhas e frutos	Óleo puro, 8, 4, 2, 1, 0,5 e 0,25%	Fungos: <i>C. tropicalis</i> , <i>C. stellatoidea</i> , <i>C. pseudotropicalis</i> , <i>C. parapsilosis</i> , <i>C. krusei</i> , <i>C. guilliermondii</i> , <i>C. albicans</i> .	A inibição só ocorreu nos testes com o óleo essencial puro (que mistura folhas e frutos). Houve inibição da <i>Candida albicans</i> , com halo de inibição correspondente a 30 mm. Para esta mesma cepa, o cetoconazol inibiu 50 mm. Para a <i>Candida. kruseio</i> halo de inibição correspondeu a 12 mm.	(99)
Não consta (cita “obtido comercialmente”)	Parte da concentração inicial de 5000 µg/mL para as diluições posteriores (não cita quais)	Fungos: <i>Candida albicans</i> e <i>Candida tropicalis</i> .	O óleo essencial da <i>E. uniflora</i> foi capaz de inibir discretamente (10 mm) somente a espécie <i>C. albicans</i> . Não houve nenhum efeito inibitório sobre as <i>C. tropicalis</i> .	(100)
Folhas	1:10, 1:20 e 1:50	Fungos: <i>Candida dubliniensis</i> , <i>Candida tropicalis</i> , <i>Candida albicans</i> , <i>Candida glabrata</i> , <i>Candida parapsilosis</i> , <i>Candida krusei</i> , <i>Cryptococcus grubii</i> , <i>Cryptococcus gattii</i> ,	O óleo essencial da <i>E. uniflora</i> desempenhou um papel significativo contra várias bactérias Gram-positivas, principalmente <i>S. equi</i> [CIM= 7,50 (inibição de 55 ± 6%)] e <i>S. epidermidis</i> [7,50 (87 ± 2%)]. Adicionalmente, a <i>E. uniflora</i> mostrou	(18)

		<i>Cryptococcus gattii</i> e <i>C. neoformans</i> Bactérias: <i>Escherichia coli</i> , <i>Serratia marcescens</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Streptococcus equi</i> , <i>Staphylococcus epidermidis</i> ;	atividade contra todos os fungos testados, especialmente contra <i>C. gattii</i> [1,80 (75 ± 21%)] e <i>C. neoformans</i> [0,11 (87 ± 13%)].	
Folhas e frutos	100 mg/mL	Bactérias: <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Yersinia enterocolitica</i> , <i>Proteus vulgaris</i> , <i>Serratia marcescens</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , Fungos: <i>Candida albicans</i> , <i>Trichophyton mentagrophytes</i> , <i>Aspergillus niger</i> , <i>Aspergillus flavus</i> .	As bactérias mais susceptíveis aos óleos voláteis das folhas frescas e frutos foram a <i>P. aeruginosa</i> . Enquanto a <i>S. aureus</i> e <i>S. marcescens</i> foram resistentes. Os fungos mais susceptíveis foram <i>T. mentagrophytes</i> , enquanto o <i>C. albicans</i> foi o mais resistente.	(63)
Folhas	2 e 8%	Bactérias: <i>Escherichia coli</i> , <i>Salmonella typhimurium</i> e <i>Staphylococcus aureus</i>	O óleo essencial (8%) apresentou atividade bactericida contra <i>S. aureus</i> e <i>S. typhimurium</i> . Nenhuma atividade sobre <i>Psidium cattleianum</i> .	(101)
Folhas	0,025 a 10%	Bactérias: <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Salmonella Typhimurium</i> .	A CIM estabelecida foi de 0,156 mg/mL para <i>S. aureus</i> , 0,625 mg/mL para <i>E. coli</i> e 0,685 mg/mL sobre <i>P. aeruginosa</i> . Os valores de CIM _{90%} obtidos variaram de 50,82 a 92,4 mg/mL. <i>E. uniflora</i> mostrou uma fraca atividade (CIM _{90%} variando de 50,82 mg/mL a 92,4 mg/mL)	(55)
Folhas	5000 a 39 µg/mL em 100 µL	Bactérias: <i>Streptococcus mutans</i> , <i>Streptococcus salivarius</i> e <i>Streptococcus mitis</i>	O óleo da <i>E. uniflora</i> apresentou atividade contra as bactérias cariogênicas <i>S. mitis</i> (CIM= 468 µg/ml) e <i>S. salivarius</i> (3,750 µg/mL). Não apresentou efeito significativo sobre <i>S. mutans</i> na concentração testada neste estudo.	(85)
Folhas	100, 1000 e 10000 ppm	Bactérias: <i>Escherichia coli</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Bacillus cereus</i>	O óleo da <i>E. uniflora</i> promoveu atividade moderada contra <i>E. coli</i> (Gram-negativa) e <i>B. cereus</i> (gram-positiva), mas não foi ativo contra <i>S. aureus</i> (Gram-positivo).	(102)
Folhas e frutos	As soluções contendo óleo essencial foram progressivamente diluídas (1:1). Não relata as concentrações finais.	Ambos óleos essenciais foram testados contra bactérias Gram positivas: <i>Bacillus cereus</i> e <i>Staphylococcus aureus</i> e as bactérias Gram negativas: <i>Pseudomonas aeruginosa</i> e <i>Escherichia coli</i> .	As concentrações mínimas inibitórias dos óleos essenciais das frutas e das folhas contra as bactérias <i>Bacillus cereus</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Escherichia coli</i> e <i>Pseudomonas aeruginosa</i> foram respectivamente: 625, 39, 625 e 625 µg/mL para o óleo das frutas e 39, 156, 625 e 625 µg/mL para o óleo das folhas. Para a gentamicina (controle positivo), 1,22; 0,61; 2,44 e 1,22 µg/mL.	(79)
Folhas	8, 4, 2, 1, 0,5 e 0,25%	Bactérias: <i>Enterobacter spp</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	O óleo essencial da <i>E. uniflora</i> causou uma discreta atividade sobre as cepas de <i>P. aeruginosa</i> (diâmetro de inibição de 7mm), mas não causou nenhum efeito inibitório no crescimento das demais bactérias testadas. O cloranfenicol apresentou	(31)

			halo de inibição=26 mm para as mesmas bactérias inibidas pela <i>E. uniflora</i> .	
Folhas	Não descreve	Bactérias: <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>E. Escherichia coli</i>	Para a <i>S. aureus</i> , a CIM _{90%} do óleo essencial foi 2,2 mg/mL. Para a <i>E. coli</i> , a CIM _{90%} foi 27,6 mg/mL.	(61)

CIM: Concentração inibitória mínima

A atividade antimicrobiana foi investigada em fungos e em bactérias (Gram-positivas e Gram-negativas). Embora a metodologia empregada seja semelhante em todos os estudos (difusão em meio sólido ou diluição em caldo), os resultados obtidos frequentemente apresentam-se confusos devido à omissão de detalhes, pela diversidade de concentrações e unidades empregadas, ou ainda pela ausência de resultados quantitativos. Apesar destas limitações, os estudos confirmam, em sua maioria, a atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Eugenia uniflora*. Além disso, os resultados dos óleos essenciais das folhas ou dos frutos foram muito semelhantes (79).

Nos ensaios com fungos, foram observadas atividades inibitórias significantes contra as seguintes espécies: *Candida krusei* (66), *Paracoccidioides brasiliensis* (37), *Trichophyton mentagrophytes* (63), *Candida dubliniensis*, *Candida tropicalis*, *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis*, *Candida krusei*, *Cryptococcus grubii*, *Cryptococcus gattii*, *sobretudo*, *Cryptococcus gattii* e *Cryptococcus neoformans* neste estudo (18). As maiores contradições ocorreram nos ensaios envolvendo a espécie *Candida albicans*, para a qual, nas mesmas concentrações ou em concentrações semelhantes, houve relevante divergência de resultados. Estes variaram da total ausência de efeito (63, 66) ou efeito discreto (18, 100) para uma importante inibição (99), próxima à inibição causada pelo cetoconazol, antifúngico usado como controle positivo (99).

Em relação à ação antibacteriana do óleo essencial da *E. uniflora* tem sido frequentemente relatada atividade antibacteriana moderada (55, 62, 102). Entre as bactérias que demonstraram maior susceptibilidade nos testes com o óleo essencial de *E. uniflora* encontram-se a *Pseudomonas aeruginosa* (55, 62, 63, 79), *Streptococcus aqui* (18), *Staphylococcus epidermidis* (18), *Salmonella typhimurium* (101) e as bactérias cariogênicas *Streptococcus mitis* (85), *Streptococcus salivaris* (85). Entre as bactérias que demonstraram resistência encontram-se a *Serratia marcescens* (63), *Streptococcus mutans* (85), *Enterobacter spp.* (31), *Klebsiella pneumoniae* (31).

Resultados contraditórios ocorreram com a bactéria *Staphylococcus aureus*, para a qual a maioria dos artigos descreve atividade inibitória (8, 55, 61, 79, 101), porém outros

demonstraram ausência de atividade (63, 102). De forma semelhante ocorreu com a descrição da ação do óleo essencial de *E. uniflora* contra a bactéria *Escherichia coli*, para a qual existem artigos demonstrando sua ação inibitória (55, 61, 79, 102) enquanto outro demonstra a ausência desta atividade (31). A bactéria *Bacillus cereus* também teve resultados antagônicos, os quais descreveram que o óleo essencial inibia o crescimento desta bactéria (79), mas também seria inativo contra ela (102).

Estas contradições nos resultados, também ocorridas nos testes com os fungos, podem, ao menos em parte, ser explicadas pela variabilidade genética das diferentes cepas de um mesmo micro-organismo (103), ou ainda pela variabilidade na composição química dos óleos essenciais testados, uma vez que a produção dos metabólitos secundários está sujeita à alterações nas condições ambientais (104).

A ação antimicrobiana demonstrada pelos óleos essenciais de *Eugenia uniflora* tem sido atribuída aos sesquiterpenos existentes na sua composição (18). Estes compostos, assim como outros terpenoides, têm sido frequentemente relacionados à atividade antibacteriana, e também antifúngica, de óleos essenciais de diversas plantas (105-107).

Extrato etanólico

Os estudos da atividade antimicrobiana também foram realizados com o extrato etanólico das folhas de *E. uniflora*. Foram descritos 7 estudos, que são detalhados no Quadro 3 a seguir.

Quadro 3. Ensaio microbiológicos realizados com o extrato etanólico obtido de *Eugenia uniflora*.

Fonte do extrato etanólico	Concentrações	Microorganismos	Resultado	Ref.
Folhas	62,5 a 1000 mg/mL	Fungo: <i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	O extrato demonstrou inibição completa do crescimento do <i>P. brasiliensis</i> na concentração de 750 mg/mL.	(6)
Folhas	7,8 a 1000 µg/mL	Fungos: <i>Microsporumcanis</i> , <i>Microsporumgypseum</i> , <i>Trichophytonrubrum</i> e <i>Trichophytonmetagrophytes</i>	As maiores inibições ocorreram para as concentrações de 500 e 1000 µg/mL. A dose de 500 µg/mL causou inibição de 40% do <i>M. canis</i> e do <i>T. metagrophytes</i> , 60% do <i>M. gypseum</i> , e 100% do <i>T. rubrum</i> . A dose de 1000 µg/mL causou inibição de 100% do crescimento de todos os fungos testados.	(25)
Folhas	31,25-500 µg/mL	Fungos: <i>Candida krusei</i> e <i>Aspergillus fumigatus</i>	O extrato da <i>E. uniflora</i> apresentou ação contra ambos fungos, entretanto com maior potência contra o <i>C. krusei</i> , com CIM=250 µg/mL, enquanto para <i>A. fumigatus</i> foi superior a 500 µg/mL.	(108)

			Em comparação, as CIM Itraconazol foram 0,125 e 0,157, respectivamente para os fungos <i>C. krusei</i> e <i>A. fumigatus</i>	
Folhas	Entre 8 e 1024 µg/mL	Fungos: <i>Candida albicans</i> , <i>Candida krusei</i> , e <i>Candida tropicalis</i>	A atividade antifúngica do extrato da <i>E. uniflora</i> demonstrou que a CIM foi superior a 1024 µg/ mL, a qual não demonstra relevância clínica para o possível uso deste extrato como droga de escolha contra estes fungos. Entretanto, observou-se uma potencialização interessante da atividade antifúngica quando o extrato foi associado com o metronidazol contra a cepa de <i>C. tropicalis</i> , reduzindo a desta droga de 128 para 32 na presença do extrato de <i>E. uniflora</i> .	(109)
Folhas	0,1367 a 70 mg/mL	Fungos: <i>Candida albicans</i> Bactérias: <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Staphylococcus epidermidis</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Micrococcus roseus</i> , <i>Micrococcus luteus</i> , <i>Bacillus cereus</i> , <i>Bacillus stearothermophilus</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Enterobacter aerogenes</i> , <i>Serratia marcescens</i> , <i>Enterobacter cloacae</i> .	Apresentou atividade inibitória sobre <i>C. albicans</i> (CIM = 0, 547 mg/mL). Houve inibição das bactérias Gram-positivas <i>S. aureus</i> , <i>S. epidermidis</i> , <i>M. roseus</i> , <i>M. luteus</i> (CIMs variando de 0,273 a 8,75 mg/mL), entre estas as bactérias formadoras de esporos, <i>B. cereus</i> , <i>B. stearothermophilus</i> e <i>B. subtilis</i> exibindo CIMs de 1,094 a 2,187 mg/mL. As CIMs para a maioria das bactérias Gram-negativas (<i>E. cloacae</i> , <i>E. aerogenes</i> , <i>E. coli</i> e <i>P. aeruginosa</i>) variaram de 4,375 a 17,5 mg/ mLmg/ mL. Para <i>Serratia marcescens</i> , a CIM foi igual a 35,0 mg/mL.	(20)
Folhas	128 µg/mL	Bactérias: <i>Escherichia coli</i> (EC27) isolada clinicamente e resistente a antibióticos, e <i>E. coli</i> (ATCC8539), usada como controle.	O extrato não mostrou nenhum efeito antibacteriano contra as cepas testadas. Entretanto, embora o extrato não tenha mostrado atividade, quando adicionado ao meio provocou uma redução da concentração inibitória mínima para a gentamicina para a <i>E. coli</i> (cepa 27, mas não com a cepa controle ATCC 8539), demonstrando um efeito sinérgico do extrato com os antibióticos	(110)
Folhas	1 a 1024 µg/mL	Bactérias <i>Staphylococcus aureus</i> (SA358), resistentes a vários aminoglicosídeos	A CIM da <i>S. aureus</i> ocasionada pelo extrato da <i>E. uniflora</i> correspondeu a 32 µg/mL. Esta CIM foi confrontada com diferentes antibióticos para verificar se o extrato potencializava seus efeitos. Observou-se que: (i) diminuiu a CIM da amicacina de 8 para 4; (ii) diminuiu a MIC da gentamicina de 8 para 2; (iii) diminuiu drasticamente a CIM da kanamicina de ~1024 para 16; (iv) da neomicina de 16 para 4; (v) das teobramicina de 8 para 2 µg/mL.	(111)

CIM: Concentração inibitória mínima

O extrato etanólico das folhas de *Eugenia uniflora* foi efetivo na inibição dos seguintes fungos: *Paracoccidioides brasiliensis* (6), *Microsporium canis*(25), *Trichophyton metagrophytes* (25), *Microsporium gypseum* (25), *Trichophyton rubrum* (25), *Aspergillus fumigatus* (108).

Em relação à *Candida albicans*, ocorreram diferentes situações. Fiúza e colaboradores (2008) relataram a atividade inibitória do extrato etanólico sobre *Candida albicans* (CIM = 0,547 mg/mL) (20), entretanto, esta inibição não foi identificada em outro estudo com o mesmo extrato, cuja CIM foi superior a 1024 µg/mL (109). Resultados divergentes também ocorreram para o fungo *Candida krusei*, para o qual foi demonstrada inibição pelo extrato etanólico (108), mas também resistência deste fungo ao mesmo extrato (109).

Um estudo realizado por Santos e colaboradores (2013) demonstrou que, embora o extrato etanólico da *E. uniflora* não tivesse causado inibição direta dos fungos *Candida tropicalis*, ocorreu inibição quando houve a associação do extrato ao metronidazol. Este antifúngico teve a sua concentração reduzida em quatro vezes, confirmando que a associação com o extrato etanólico de *E. uniflora* é capaz de potencializar significativamente a sua ação farmacológica (109).

Estes efeitos sinérgicos também foram demonstrados para a atividade antibacteriana do extrato etanólico das folhas de *E. uniflora*. Em relação à bactéria resistente *E. coli* (cepa 27), o extrato sozinho não demonstrou efeito significativo, porém o efeito sinérgico ocorreu após associação com o antibiótico gentamicina (110). Em relação à bactéria *Staphylococcus aureus* (SA358) resistente a vários aminoglicosídeos, o extrato etanólico na concentração de 32 µg/mL potencializou o efeito dos aminoglicosídeos amicacina (100%), gentamicina (400%), canamicina (6400%), neomicina (400%) e teobramicina (400%)(111).

O extrato etanólico das folhas de *E. uniflora* foi capaz de inibir consideravelmente bactérias Gram-positivas (*Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Micrococcus roseus*, *Micrococcus luteus*), inclusive aquelas formadoras de esporos (*Bacillus cereus*, *Bacillus stearothermophilus* e *Bacillus subtilis*), além de inibir, em maiores concentrações, as bactérias Gram-negativas (*Enterobacter cloacae*, *Enterobacter aerogenes*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Serratia marcescens*) (20).

Extrato aquoso

O extrato aquoso das folhas de *Eugenia uniflora*, obtido por infusão ou por decocção foi testado por Schapoval e colaboradores (1994) contra as bactérias *Staphylococcus aureus*(ATCC 6538) e *Escherichia coli* (ATCC 25922), e contra os fungos *Candida albicans*

(strain ATCC 10231) pelo método de difusão em ágar. Nas concentrações testadas (não reveladas) não houve inibição do crescimento dos microorganismos investigados (88).

O extrato aquoso das folhas também foi testado pelo método de difusão em ágar, nas concentrações entre 11 a 1000 µg/ mL, quanto à atividade inibitória sobre a bactéria *Salmonella typhi* (cepa obtida clinicamente). Nos resultados, confirmou-se a inibição do crescimento desta bactéria pelo extrato, porém os resultados foram apenas qualitativos (112).

Pesquisadores indianos elaboraram uma revisão da ação dos extratos de diversas plantas sobre a bactéria causadora da tuberculose, a *Mycobacterium tuberculosis*. Neste estudo o extrato aquoso de *E. uniflora*, foi relatado por possuir uma discreta ação sobre *M. tuberculosis* (cepa ATCC 27294), uma vez que sua zona de inibição correspondeu a menos de 0,5 mm. O extrato foi testado na concentração de 10 mg/ mL, pelo método de difusão em ágar (43).

O extrato aquoso das folhas de *E. uniflora*, nas concentrações de 5 a 100 µg/ mL, também foi testado frente as bactérias *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Shigella dysenteriae*, *Escherichia coli* e *Bacillus subtilis*. As concentrações inibitórias mínimas necessárias para obter uma inibição total do crescimento bacteriano foram: 80 µg/ mL para *S. aureus*, 80 µg/ mL para *S. dysenteriae*, 20 µg/ mL para *E. coli* e 80 µg/ mL para *B. subtilis* (113).

Extrato hidroalcoólico

O extrato hidroalcoólico das folhas de *Eugenia uniflora* foi testado em 20 variedades de *Salmonella*. Observou-se que este extrato foi ativo frente a 89,47% das salmonelas. As concentrações responsáveis pelas atividades bacteriostática e bactericida foram calculadas e correspondem, respectivamente, a 80 mg/ mL e 240 mg/ mL (44).

Quando testado nas bactérias *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 15442), *Bacillus subtilis* (ATCC 6623) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), as concentrações necessárias para inibir o crescimento destas bactérias foram elevadas e corresponderam a > 1000 µg/ mL, > 1000 µg/ mL, 250 µg/ mL e 500 µg/ mL, respectivamente (91). Este mesmo artigo demonstrou os efeitos deste extrato hidroalcoólico das folhas sobre os fungos *Candida krusei*, *Candida parapsilosis* e *Candida tropicalis*. As concentrações necessárias para inibir o crescimento destes fungos foram significativamente menores se comparadas às relatadas previamente para as bactérias. Estas corresponderam, respectivamente, a 31,2 µg/ mL, 125 µg/ mL e 31,2 µg/ mL (91).

Atividade antimicrobiana do extrato hidroalcoólico de folhas de *Eugenia uniflora* também foi avaliada, por outros autores, frente às bactérias *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 10708), *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) e *Staphylococcus choleraesuis* (ATCC 6538). As concentrações inibitórias mínimas obtidas para estas cepas foram, respectivamente, 400 mg/ mL, 80 mg/ mL e 100 mg/ mL (10). Neste mesmo estudo, foi investigada a atividade do extrato sobre os fungos *Candida albicans* (ATCC 10231) e *Aspergillus niger* (ATCC16404), cujas concentrações mínimas inibitórias corresponderam a 500 mg/ mL e 900 mg/ mL, respectivamente (10). Apesar de bactérias em comum nos estudos, há divergências nos resultados encontrados. Além disso, os resultados são expressos em unidades diferentes.

Além dos estudos com o extrato hidroalcoólico das folhas de *E. uniflora*, foi realizado um estudo, de interesse odontológico, utilizando o extrato obtido dos frutos maduros desta planta. A faixa de concentrações utilizadas e incorporadas ao creme dental foram: substância pura, 1:1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16 e 1:32. Os testes avaliaram a atividade sobre as bactérias *Streptococcus mutans* (ATCC 25175), as quais compõem 60% dos micro-organismos do biofilme dentário. Com exceção da diluição 1:32, todas as outras foram capazes de inibir o crescimento bacteriano. Os halos de inibição corresponderam a 14, 12, 11, 10, 7 e 7 mm, respectivamente, para o extrato puro e as diluições 1:1, 1:2, 1:4, 1:8 e 1:16 do extrato. O controle positivo, Colgate Total 12®, nas mesmas diluições apresentou halos de inibição que variaram entre 18 e 9 mm (84).

Extrato metanólico

O extrato metanólico das folhas de *Eugenia uniflora* foi testado em concentrações não relatadas sobre as bactérias *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. As concentrações inibitórias mínimas que causaram inibição de 90% do crescimento do micro-organismo (CIM_{90%}) foi determinada para cada bactéria. Para a *S. aureus*, a MIC_{90%} correspondeu a 24,1 mg/ mL, e para a *E. coli*, a MIC_{90%} foi 15,9 mg/ mL (61).

Em outro estudo, o extrato metanólico bruto das partes aéreas da *E. uniflora* foi testado contra sete micro-organismos usando o teste de difusão em agar. Os micro-organismos selecionados foram *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538P), *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228), *Micrococcus luteus* (ATCC 9341), *Bacillus subtilis* (ATCC 6633), *Escherichia coli* (ATCC 25922) e *Candida albicans* (ATCC 10231). As concentrações utilizadas não foram relatadas. Nos resultados, o extrato apresentou efeito contra os micro-organismos *Micrococcus luteus* (diâmetro de inibição entre 16,1–20 mm), contra *Bacillus subtilis* e *Staphylococcus aureus* (para ambos, o diâmetro de inibição foi entre 8–11 mm).

Staphylococcus epidermidis, *Escherichia coli*, *Candida albicans*, *Saccharomyces cerevisiae* foram resistentes ao extrato metanólico da *E. uniflora* (114).

Adebajo e colaboradores (1988) (115) investigaram a ação do extrato metanólico das folhas de *E. uniflora*, na concentração de 500 mg/ mL, em diferentes bactérias (*Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella aerogenes*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Serratia marcescens*) e fungos (*Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Lasiodiplodia theobromae*). A determinação da zona de inibição demonstrou que o extrato foi capaz de causar inibição do crescimento de *Proteus vulgaris* (7 mm), *Pseudomonas aeruginosa* (8 mm), *Bacillus subtilis* (9 mm), *Staphylococcus aureus* (7 mm) e *Serratia marcescens* (8 mm). Não houve interferência no crescimento das bactérias *Escherichia coli* e *Klebsiella aerogenes*, e também de nenhum dos fungos testados. Os controles antimicrobianos (trimetoprima + sulfametoxazol ou o paraclorocressol, ambos 50 mg/ mL) apresentaram zona de inibição variando entre 7 e 20 mm (115).

Outras extrações, frações e compostos isolados

Fadeyi e Akpan (1989) testaram o extrato ciclohexânico obtido das folhas de *Eugenia uniflora*, nas concentrações 5 e 100 µg/ mL, sobre o crescimento das bactérias *Staphylococcus aureus* (duas cepas, produtora ou não produtora de β-lactamase, enzima que confere resistência às bactérias), *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Shigella dysenteriae*, *Escherichia coli* e *Bacillus subtilis*. A concentração inibitória mínima obtida foi de 100 µg/ mL para a *S. aureus* produtora de β-lactamase, 20 µg/ mL para a *S. aureus* não produtora de β-lactamase; 60 µg/ mL para *Shigella dysenteriae*, e 20 µg/ mL para a *Escherichia coli*. Não houve inibição do crescimento da bactéria *Bacillus subtilis* nas concentrações testadas. Estes resultados confirmam o potencial antimicrobiano de *E. uniflora*, inclusive sobre bactérias resistentes (113).

Adebajo e colaboradores (1988), além de testarem o extrato metanólico, também investigaram a ação do extrato acetato de etila das folhas de *E. uniflora*. A concentração usada foi de 500 mg/ mL, sobre as bactérias *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella aerogenes*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Serratia marcescens*, e sobre os fungos *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Lasiodiplodia theobromae*. A zona de inibição demonstrou que este extrato foi capaz de causar inibição do crescimento de *Escherichia coli* (7 mm), *Proteus vulgaris* (7 mm), *Pseudomonas aeruginosa* (8 mm), *Klebsiella aerogenes* (9 mm), *Bacillus subtilis* (9 mm), *Staphylococcus aureus* (7 mm). Não houve inibição do crescimento da bactéria *Serratia marcescens* e também de

nenhum dos fungos testados. Os controles antimicrobianos (trimetoprima + sulfametoxazol ou o paraclorocressol, ambos 50 mg/ mL) apresentaram zona de inibição variando entre 7 e 20 mm (115).

Sá e colaboradores (1994) investigaram o efeito de um extrato de *Eugenia uniflora* (não relatam que tipo de extração) e de outras nove plantas sobre bactérias que comumente causam conjuntivite. As concentrações testadas foram 1250, 2500 e 5000 µg/ mL, e a técnica usada foi de difusão em meio sólido. As bactérias investigadas foram *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 10145), *Bacillus subtilis* (INCQS112), *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Streptococcus pneumoniae* (INCQS 00104), *Streptococcus pyogenes* (ATCC 0070) e *Neisseria gonorrhoeae* (INCQSS 0063). Nos resultados, entre as diferentes plantas testadas, o extrato de *E. uniflora* encontra-se entre os mais ativos. A *E. uniflora* causou inibição dependente da concentração (1250, 2500 e 5000 µg/ mL) dos diâmetros (mm) dos halos das bactérias *B. subtilis* (respectivamente 10, 14 e 16 mm), *S. aureus* (10, 12 e 14) e *N. gonorrhoeae* (6, 10 e 15). Não houve inibição do crescimento das demais bactérias. O cloranfenicol (50 µg/ mL), controle antimicrobiano, causou inibição do crescimento de todas as bactérias, com 22 a 26 mm de diâmetro do halo de inibição (93).

Em relação a compostos isolados obtidos da *Eugenia uniflora*, poucos estudos farmacológicos foram identificados. Um deles se refere à ação antimicrobiana da proteína lecitina, isolada das sementes do fruto da *E. uniflora*. Sua ação foi investigada sobre as cepas de bactérias Gram-positivas: *Staphylococcus aureus* (UFPEDA-01), *Streptococcus sp.* (UFPEDA-295) e *Bacillus subtilis* (UFPEDA-16) e sobre cepas Gram-negativas: *Klebsiella sp.* (LBUFRP-01), *Pseudomonas aeruginosa* (LBUFRPE-02), *Corynebacterium bovis* (LBUFRPE-03) e *Escherichia coli* (LBUFRPE-04). A lecitina foi testada nas concentrações de 1 e 2 mg/ mL e seus resultados foram comparados ao controle positivo, amoxicilina 2,5 mg/ mL. No resultado, a lecitina demonstrou importante atividade antibacteriana não seletiva. Inibiu fortemente o crescimento de *Staphylococcus aureus* (20 mm), *Pseudomonas aeruginosa* (18,6 mm) e *Klebsiella sp.* (19,6 mm), com concentrações inibitórias mínimas (CIM) de 1,5 µg/ mL. A lecitina ainda inibiu moderadamente o crescimento de *Bacillus subtilis* (12 mm), *Streptococcus sp.* (17,3 mm) e *Escherichia coli* (12 mm) com concentração mínima inibitória de 16,5 µg/ mL para todas (33). Contraditoriamente, este artigo exhibe diferentes unidades de concentrações nos métodos (mg/ mL) e nos resultados (µg/ mL), comprometendo a interpretação dos mesmos.

Além do carboidratolecitina, outro composto que tem sido citado na literatura é o taninoenotefina. Este composto foi isolado das folhas de *E. uniflora* e é capaz de interferir na

morfologia celular dos fungos *Paracoccidioides* e inibir a enzima PbFKS1 (1,3-β-D-glucan synthase) envolvida na síntese da parede celular deste fungo, comprometendo assim a sua capacidade de infecção (116).

4.3.2.1.2 Efeito antioxidante *in vitro* da *Eugenia uniflora* L.

Óleo essencial

O óleo essencial das folhas de *E. uniflora* foi testado nas concentrações de 500, 700, 1000 e 3000 µg/ mL frente ao radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazil em solução (DPPH). A concentração que causou 50% de inibição do radical DPPH correspondeu a $833,3 \pm 20,7$ µg/ mL (117).

A ação antioxidante do óleo essencial das folhas de *E. uniflora* também foi testada em tecidos animais. Victoria e colaboradores (2013) verificaram a capacidade do óleo essencial (10, 50, 100 e 500 µg/ mL) em proteger contra a peroxidação lipídica em estruturas cerebrais (hipocampo, córtex e cerebelo) de camundongos. Os níveis de malonaldeído foram usados como marcadores da peroxidação lipídica. A concentração do óleo essencial da *E. uniflora* 50 µg/ mL promoveu as maiores inibições da peroxidação lipídica em todas as estruturas cerebrais. As inibições máximas no hipocampo, no córtex e no cerebelo foram, respectivamente, $37,5 \pm 12,50\%$, $53,0 \pm 1,90\%$ e $53,0 \pm 14,6\%$. As CI_{50} para o córtex e cerebelo foram também calculadas e corresponderam a $93,30 \pm 5,10$ µg/ mL e $47,0 \pm 2,80$ µg/ mL, respectivamente (118). O próprio óleo essencial, examinado ao longo de 30 dias, demonstrou ser resistente à auto peroxidação lipídica (119).

Extrato etanólico

O extrato etanólico das folhas de *E. uniflora* foi testado nas concentrações de 12,5 a 75 µg/ mL, quanto à atividade sequestradora do radical livre DPPH. No resultado, observou-se que o efeito antioxidante não foi relevante, mesmo quando testado em altas concentrações. Por exemplo, a concentração de 1000 µg/ mL causou somente 6,18% do efeito antioxidante (40).

Martinez-Correa e colaboradores (2011) investigaram a ação antioxidante do extrato etanólico das folhas de *E. uniflora* (5 a 250 µg/ mL) sobre o radical DPPH e obtiveram uma CE_{50} correspondente a $6,2 \pm 0,3$ µg/ mL, a qual foi inferior ao efeito obtido para o extrato aquoso, investigado paralelamente (24).

Kade e colaboradores (2008) investigaram os efeitos antioxidantes dos extratos etanólicos das folhas de *E. uniflora* submetidas a diferentes condições: (i) folhas secas ao sol ou (ii) folhas secas ao abrigo da luz. Os efeitos antioxidantes foram testados pela mensuração da habilidade dos diferentes extratos em inibir a formação de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), induzidas por agentes pro-oxidantes como o ferro (II) e o nitroprussiato de sódio, em cérebro e fígado de rato. Os resultados demonstraram que extrato seco ao abrigo da luz inibiu significativamente ($P < 0.0001$) a formação do TBARS em ambos tecidos homogeneizados, enquanto o extrato seco sob sol não apresentou nenhum efeito. Os autores sugerem que as folhas secas ao abrigo da luz (secas pelo ar) preservam os compostos fenólicos, diretamente relacionados ao efeito antioxidante (120).

Extrato aquoso

O extrato aquoso das folhas de *Eugenia uniflora* foi testado quanto à sua capacidade antioxidante por meio de diferentes metodologias: poder antioxidante redutor do íon Férrico; determinação do poder redutor; avaliação da capacidade antioxidante total pelo método do fosfomolibdênio; e atividade sequestradora do radical DPPH. As concentrações testadas foram 2,5 a 0,5 mg/ mL. Para cada metodologia, os resultados foram: (i) poder antioxidante redutor do íon Férrico: $21,30 \pm 0,96$ mM Fe(II)/g peso seco; (ii) determinação do poder redutor: $0,17 \pm 0,01$ de absorvância a 700 nm; (iii) avaliação da capacidade antioxidante total pelo método do fosfomolibdênio: $14,65 \pm 0,57$ mg BHT/g peso seco; (iv) atividade sequestradora do radical DPPH: $21,52 \pm 0,32\%$ (72).

O extrato aquoso da *E. uniflora* foi testado também, nas concentrações de 12,5 a 75 $\mu\text{g/ mL}$, quanto à atividade sequestradora do DPPH. O extrato novamente apresentou atividade antioxidante. A CI_{50} para este efeito foi correspondente a 321 $\mu\text{g/ mL}$ (40).

No estudo de Martinez-Correa e colaboradores (2011) foi investigada a ação antioxidante do extrato aquoso das folhas de *E. uniflora* (5 a 250 $\mu\text{g/ mL}$), também sobre o radical DPPH e obtiveram uma CE_{50} correspondente a 15 ± 30 $\mu\text{g/ mL}$ (24).

Apesar das variações de potência, demonstradas pelos valores de CE_{50} encontrados nos resultados, todos os dados confirmam o potencial antioxidante do extrato aquoso, independentemente das diferentes metodologias empregadas.

Extrato hidroalcoólico

O extrato hidroalcoólico (70%) das folhas de *E. uniflora* foi investigado em diferentes concentrações (não relatadas) para determinação da concentração que causa 50% de inibição

do processo de oxidação (CE₅₀). A metodologia usada foi a auto oxidação espontânea em homogenato de cérebro de ratos, a qual foi mensurada pela reação do malonildialdeído (MDA) com o ácido tiobarbitúrico (TBA), na presença e ausência do extrato em estudo. A concentração de 34,6 µg/ mL do extrato hidroetanólico promoveu a inibição de 50% da lipoperoxidação em homogenato de cérebro de ratos, confirmando o significativo potencial antioxidante deste extrato (10).

Massarioli e colaboradores (2013) realizaram um estudo da capacidade antioxidante do extrato hidroalcoólico (80%) das frutas liofilizadas de *E. uniflora*. A atividade antioxidante foi investigada colorimetricamente por meio da reação do extrato (1000 µg/ mL) com o radical 1,1-diphenyl-2-picrilhidrazyl em solução (DPPH). A porcentagem de inibição foi determinada e correspondeu a 45,03±2,87% (71).

Estes resultados confirmam, portanto, que a extração hidroalcoólica das folhas e dos frutos da *E. uniflora* apresentam ação antioxidante, confirmada em diferentes metodologias.

Extrato metanólico

O extrato metanólico das folhas de *Eugenia uniflora* foi testado quanto à sua capacidade antioxidante por meio de diferentes metodologias: poder antioxidante redutor do íon Férrico; determinação do poder redutor; avaliação da capacidade antioxidante total pelo método do fosfomolibdênio; e atividade sequestradora do radical DPPH. As concentrações testadas foram 2,5 a 0,5 mg/ mL. Para cada metodologia, os resultados foram: (i) poder antioxidante redutor do íon Férrico: 42,15 ± 2,13 mM Fe(II)/g peso seco; (ii) determinação do poder redutor: 0,21 ± 0,02 de absorbância a 700 nm; (iii) avaliação da capacidade antioxidante total pelo método do fosfomolibdênio: 22,75 ± 1,24 mg BHT/g peso seco; (iv) atividade sequestradora do radical DPPH: 28,76 ± 0,23% (72). Em outro estudo relacionado, utilizando o extrato metanólico das folhas de *E. uniflora*, foi demonstrada uma ação antioxidante dependente da dose na metodologia de peroxidação lipídica induzida pelo Fe²⁺/ascorbato (CI₅₀ = 6,9 µg/ mL). Também se observou o efeito significativo do extrato na metodologia de peroxidação lipídica induzida pelo CCl₄/NADPH (CI₅₀ = 6,2 µg/ mL). O extrato da *E. uniflora* também foi eficaz em sequestrar ânions superóxidos (CI₅₀ = 7,7 µg/ mL) e radicais DPPH (CI₅₀ = 9,1 µg/ mL) (121). Estes dados confirmam o potencial antioxidante do extrato metanólico das folhas de *E. uniflora* nos diferentes ensaios empregados para avaliar o efeito antioxidante.

Bagetti e colaboradores (2009) investigaram a capacidade antioxidante de extratos metanólicos das sementes de *E. uniflora*. As sementes foram agrupadas em 3 diferentes

categorias, de acordo com a cor do fruto da qual se originou (roxo, vermelho ou laranja). Os testes foram realizados, em concentrações não especificadas, nas metodologias de (i) atividade sequestradora do radical DPPH e (ii) poder antioxidante redutor do íon férrico. A capacidade antioxidante foi expressa em mmol de trolox por 100g. No teste da atividade sequestradora do DPPH, foram observados valores semelhantes para todos os extratos metanólicos, independentemente da cor dos frutos. Os valores (em mmol de trolox por 100g) foram $14,6 \pm 0,6$ (sementes de frutos roxos), $16,7 \pm 1,3$ (vermelhos) e $17,4 \pm 1,4$ (laranja). Para o teste do poder antioxidante redutor do íon férrico, os valores (em mmol de trolox por 100g) foram $26,2 \pm 2,8$ (semente de fruta roxa), $6,1 \pm 0,7$ (vermelha) e $6,4 \pm 0,4$ (laranja). Ao contrário do ocorrido com o ensaio do DPPH, o extrato das sementes da pitanga roxa apresentou alta capacidade de reduzir o íon férrico quando comparado às demais sementes (das frutas vermelhas e laranjas). Estes testes indicam que as sementes da pitanga parecem fontes promissoras de antioxidantes, uma vez que sua atividade no teste do DPPH foi cerca de duas vezes maior que aquela apresentada pelas polpas de vários frutos tropicais, incluindo uva e açaí, segundo os autores (51).

Estes mesmos autores, em 2011, investigaram posteriormente a capacidade antioxidante dos frutos de *E. uniflora*. Foram testados os extratos metanólicos das polpas da pitanga roxa, vermelha e laranja. A capacidade antioxidante foi novamente avaliada pelas metodologias de (i) atividade sequestradora do radical DPPH e (ii) poder antioxidante redutor do íon férrico, e expressos em mmol de trolox por 100g. No teste do DPPH, os resultados para os extratos das polpas dos frutos roxo, vermelho e laranja foram, respectivamente, $3,1 \pm 0,7$; $1,4 \pm 0,1$; $1,4 \pm 0,0$. No ensaio do poder antioxidante redutor do íon férrico os valores para os extratos das polpas dos frutos roxo, vermelho e laranja foram, respectivamente $3,1 \pm 0,6$; $1,4 \pm 0,3$; $1,1 \pm 0,1$. Mais uma vez, os resultados indicam que a pitanga de cor roxa possui alta capacidade antioxidante. Esta capacidade antioxidante apresentou alta correlação com o conteúdo de fenólicos totais, estudado no mesmo artigo (69).

Outras extrações, frações e compostos isolados

Santos (2012) realizou uma extração supercrítica (com CO₂ a altas pressões) das sementes da fruta de *E. uniflora* e realizou testes de ação antioxidante. As concentrações de 5000, 7500 e 10000 ppm foram testadas para avaliar a capacidade antioxidante pelo método do DPPH. O melhor efeito obtido para o extrato supercrítico ocorreu na concentração de 10000 ppm, e correspondeu a 22,29% de inibição. Porém, o efeito obtido pelo extrato aquoso

das sementes em soxhlet, na mesma concentração, foi maior, 35,5%, sugerindo que ocorrem modificações na composição química do extrato obtido por extração supercrítica (54).

Em relação a estudos com compostos isolados, foram testados os flavonoides quercetina e miricetina, ambos identificados na *E. uniflora*, pelo método do DPPH, nas concentrações entre 3,13 e 1000 µg/ mL. Os dois flavonoides apresentaram importante ação antioxidante com CI_{50} correspondentes a 110,28 µg/ mL para a quercetina, e 152,63 µg/ mL para a miricetina (40).

4.3.2.1.3 Efeito antiparasitário *in vitro* da *Eugenia uniflora* L.

O extrato hidroalcoólico das folhas de *E. uniflora*, a 100 µg/ mL, foi capaz de inibir *in vitro* crescimento das formas promastigota e amastigota da *L. amazonensis* em, respectivamente, $38,0 \pm 3,8\%$ e $51,6 \pm 0,8\%$ (73). Na forma promastigota dessa espécie, foi testado o óleo essencial das folhas de *E. uniflora* nas concentrações entre 3,12 a 400 µg/ mL. O óleo essencial foi efetivo de forma dose-dependente e inibiu 100% do crescimento da *L. amazonensis* a partir da concentração de 100 µg/ mL. A CI_{50} correspondeu a 1,75 µg/ mL. A Anfotericina B foi usada como controle positivo, e sua CI_{50} correspondeu a 2 µg/mL (56). O extrato metanólico das folhas de *E. uniflora* também foi testado sobre a forma promastigota da *L. amazonensis*. Neste estudo, a concentração capaz de inibir 50% do crescimento deste protozoário foi superior a 250 µg/ mL (74). Diante destes estudos, o melhor efeito contra a *L. amazonensis* foi obtido com o óleo essencial das folhas de *E. uniflora*.

O extrato metanólico das folhas de *E. uniflora* inibiu 50% do crescimento, de forma significativa, da *Leishmania chagasi* a uma concentração também superior a 250 µg/ mL (74).

O extrato etanólico das folhas de *E. uniflora*, testado nas concentrações de 100 e 500 µg/ mL, foram capazes de inibir, significativamente, o crescimento da forma promastigota de *Leishmania brasiliensis*. As inibições máximas foram 65 e 75%, respectivamente, para as concentrações de 100 e 500 µg/ mL (49).

O efeito antiparasitário do extrato metanólico das cascas de *E. uniflora* foi investigado frente a *Leishmania donovani*. A concentração necessária para inibir o crescimento deste protozoário em 50% foi superior a 50 µg/ mL neste estudo, que envolveu diferentes plantas com ação antiparasitária (7).

Os efeitos de diferentes extratos obtidos de *E. uniflora* foram avaliados também em parasitas do gênero *Trypanosoma*. O extrato hidroalcoólico das folhas de *E. uniflora*, a 100

$\mu\text{g}/\text{mL}$, foi capaz de inibir o crescimento da forma epimastigota do *Trypanosoma cruzi* em $34,3 \pm 4,6\%$ (73). Em outro estudo, o extrato hidroalcoólico das folhas de *E. uniflora* foi testado nas concentrações entre 10 e 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ sobre a forma epimastigota do *T. cruzi*. E obteve-se a concentração letal capaz de matar 50% destes parasitas correspondente a 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (39). O extrato etanólico das folhas de *E. uniflora* também foi testado contra *T. cruzi*. Nas concentrações de 1, 10 e 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, as inibições da forma epimastigota corresponderam a 27,3%, 64,8% e 80,8%, respectivamente. A CE_{50} calculada correspondeu a 62,76 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (50).

Um estudo realizado por Holetz e colaboradores (2002), verificou o efeito de 15 plantas medicinais, inclusive da *E. uniflora*, no crescimento e diferenciação celular de *Herpetomonas samuelpessoai*, um tripanosomatídeo não patogênico utilizado como modelo biológico, que apresenta antígenos semelhantes aos do *Trypanosoma cruzi*. O extrato bruto das folhas, obtido com etanol 90%, foi testado na concentração de 1.000 $\mu\text{g}/\text{mL}$. O extrato da *E. uniflora* causou uma fraca inibição do crescimento do parasita (aproximadamente 15%) (122).

Sobre o *Tripanosoma brucei* foi testado o extrato aquoso da casca de *E. uniflora*, o qual resultou numa CI_{50} superior a 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (7). Em outro estudo, os extratos n-hexano, clorofórmio, acetato de etila e metanol, obtidos das folhas de *E. uniflora*, foram testados sobre *Tripanosoma brucei* e foram obtidas as seguintes concentrações letais para 50% dos parasitas (CL_{50}): $117,33 \pm 3,1$; $137,9 \pm 4,3$; $148,8 \pm 1,8$ e $148,8 \pm 1,8$ $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectivamente (59).

Na investigação anterior, os mesmos extratos n-hexano, clorofórmio, acetato de etila e metanol, obtidos das folhas de *E. uniflora*, foram testados sobre *Tripanosoma congolense*, incluindo uma cepa resistente. Foram obtidas as seguintes concentrações letais para 50% dos parasitas: $146,16 \pm 5,9$; $156,8 \pm 0$; $12,5 \pm 0$ e $120,8 \pm 1,9$ $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectivamente. Para a cepa resistente do *Tripanosoma congolense*, somente o extrato acetato de etila se mostrou ativo ($\text{CL}_{50} = 12,5 \pm 0$ $\mu\text{g}/\text{mL}$) (59).

O extrato aquoso da casca de *E. uniflora* foi testado sobre *Trichomonas vaginalis*, o qual resultou numa CI_{50} superior a 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (7). Em outro estudo, após 24 horas da administração, o extrato metanólico das folhas de *E. uniflora* causou a mortalidade de 50% dos parasitas *Trichomonas gallinae*, com a concentração de $61,70 \pm 1,65$ $\mu\text{g}/\text{mL}$ (47).

O extrato aquoso da casca de *E. uniflora* não apresentou efeito significativo contra *Caenorhabditis elegans* (7).

4.3.2.1.4 Efeito antidiarreico *in vitro* da *Eugenia uniflora* L.

O efeito do extrato aquoso das folhas de *E. uniflora* foi investigado em intestino isolado de rato, quanto à capacidade propulsora intestinal. Neste experimento, camundongos foram previamente tratados por gavagem com 0,1 mL do extrato/ 10g de peso + charcoal (marcador de propulsão intestinal). O controle recebeu o mesmo tratamento, porém o extrato foi substituído por água. 45 minutos depois, os animais foram mortos, todo o intestino foi isolado e a distância percorrida pelo charcoal foi determinada. Estabeleceu-se uma relação entre esta distância e a extensão total do intestino. No resultado, observou-se que a razão da distância percorrida pela extensão total do intestino correspondeu a $0,72 \pm 0,05$ no controle. Enquanto correspondeu a $0,50 \pm 0,06$ no grupo tratado com o extrato de *E. uniflora*. Houve uma diminuição da distância percorrida pelo corante, sugerindo uma redução moderada do trânsito intestinal e consequente benefício em eventos de diarreia (4).

4.3.2.1.5 Efeito inibidor enzimático *in vitro* da *Eugenia uniflora* L.

Morais e colaboradores (2013) investigaram a ação do extrato etanólico das partes aéreas de *E. uniflora* sobre a ação da enzima acetilcolinesterase, por um método que emprega cromatografia em camada delgada e uma reação colorimétrica. A concentração testada foi 2 mg/ mL, a qual gerou um halo de inibição de 0,5 cm, confirmando a ação inibitória sobre a enzima acetilcolinesterase. O carbaxol foi o controle positivo utilizado, o qual gerou um halo de 1,0 cm. A inibição da enzima acetilcolinesterase prediz possíveis usos terapêuticos contra Alzheimer e outras doenças que envolvam a carência do neurotransmissor colinérgico (123).

Schmeda-Hirschmann e colaboradores (1987) investigaram o efeito do extrato alcoólico das folhas de *E. uniflora* na atividade da enzima xantina oxidase, que cataliza a oxidação da xantina e gera a hipoxantina e, por fim, o ácido úrico. Esta é a razão do interesse em testar a ação inibidora desta enzima, uma vez que o excesso do ácido úrico induz a gota (que a pitanga parece tratar popularmente). No resultado, o extrato cru das folhas inibiu a xantina oxidase, apresentando CI_{50} de 22 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (com limite de confiança de 12,6 a 31,4 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Esta atividade foi atribuída aos flavonoides quercitrina, quercetina, miricitrina e miricetina, identificados neste extrato (82).

Lee e colaboradores (2000) investigaram os efeitos de taninos isolados da *E. uniflora* sobre a enzima DNA polimerase de vírus Epstein-Barr, vírus humano da herpes diretamente

relacionado com o carcinoma nasofaríngeo. Observaram-se valores de CI_{50} de inibição da DNA polimerase de 26,5 mM para gallocatechin; 62,3 mM para oenothéin B; 3,0 mM para eugeniflorin D₁ e 3,5 mM para eugeniflorin D₂. Portanto, esses taninos são potenciais inibidores da DNA polimerase do vírus Epstein-Barr. Estas enzimas são relacionadas à replicação viral e, portanto, sua inibição pode ocasionar redução da quantidade de novos vírus causadores do câncer nasofaríngeo (124).

4.3.2.1.6 Outros efeitos *in vitro* da *Eugenia uniflora* L.

Além dos efeitos relatados até o momento, a *E. uniflora* tem sido citada quanto à sua capacidade imunomoduladora. Os testes foram realizados em esplenócitos de camundongos. Foram testadas as concentrações de 1, 5, 10 e 25 µg/ mL das frações acetato de etila, butanólica e aquosa obtidas das folhas e das sementes de *E. uniflora*. As citocinas (IFN-gama, IL-2 e IL-6), além do óxido nítrico, foram quantificadas no cultivo de esplenócitos. Nos resultados, não houve alteração significativa das citocinas e do óxido nítrico, indicando que os extratos e frações testados não são pró-inflamatórios nas concentrações avaliadas (27).

Morioka e colaboradores (2000) investigaram o efeito do extrato aquoso das folhas de *E. uniflora* sobre o fluxo de cálcio em cardiomiócitos. Os cardiomiócitos foram isolados por meio de tratamento enzimático do coração (ventrículos) de cobaias e acondicionados em líquido nutritivo. O potencial de membrana foi avaliado pela metodologia de patch-clamp, com foco no fluxo de íons Ca^{2+} . O extrato nas concentrações de 100 µg/ mL e 1 mg/ mL reduziu, respectivamente, 7% e 21% das correntes de Ca^{2+} dependentes de voltagem. Em concentrações superiores, não houve diferença significativa. Esse resultado pode sugerir a existência de princípios ativos na composição do extrato que possuem atividade inibidora sobre canais de cálcio dependentes de voltagem. Clinicamente, o referido extrato e seus componentes ativos podem ser útil no tratamento da hipertensão arterial (125).

4.3.2.2 Ensaio *in vivo*

Foram selecionados 14 artigos científicos que investigam a ação de extratos, frações, óleos essenciais ou compostos semipurificados (sesquiterpenos) da *Eugenia uniflora* em modelos animais. Os experimentos ocorreram em camundongos (8 estudos), em ratos (5 estudos) ou em macacos (1 estudo).

Foram investigadas as ações: hipotensora (3 ensaios) (83, 68, 125), no desempenho cardíaco, (1 ensaio) (29), diurética (2 ensaios) (68, 83), anti-inflamatória (3 ensaios) (5, 14, 88), antinociceptiva (2 ensaios) (88, 126), antipirética (1 ensaio) (126), no trânsito intestinal (1 ensaio) (88), antidepressiva (2 ensaios) (28, 118), ação reguladora do metabolismo lipídico e/ou glicêmico (3 ensaios) (38, 64, 95), e ação protetora (1 ensaio) (78) da *Eugenia uniflora*. Maiores detalhes dos experimentos e seus resultados encontram-se no Quadro 4 a seguir.

Quadro 4. Ensaios *in vivo* realizados com a *Eugenia uniflora L.*

Atividade	Produto testado	Animal	Dose, via e frequência	Metodologia	Resultados	Ref.
Hipotensora	Extrato aquoso das folhas	Ratos normotensos	Doses de: 56, 94, 145, 172 mg/ kg, administradas por via oral (gavagem), uma única exposição.	Os ratos foram anestesiados e submetidos a uma cirurgia que inclui traqueostomia, e introdução de um cateter de polietileno na carótida para aferição da pressão arterial média em manômetro de mercúrio. A pressão arterial dos animais foi verificada nos tempos 30, 60 e 90 minutos após a administração do extrato.	Não ocorreram variações significantes da pressão arterial no tempo de 30 minutos para as doses testadas. Entretanto, nos tempos de 60 e 90 ocorreram reduções significantes da pressão arterial, de forma tempo dependente. As doses de 56, 94, 145, 172 mg/ kg causaram reduções de 24%, 17%, 13% e 21%, respectivamente para o tempo de 60 minutos. As mesmas doses, para o tempo de 90 minutos causaram respectivamente 34%, 20%, 20% e 31% de reduções da pressão arterial.	(83)
Hipotensora	Extrato aquoso das folhas	Ratos normotensos	Dose de 1 mg/ kg pela via intraperitoneal, ou 8 mg dl/ kg, pela via intravenosa.	Os ratos foram anestesiados e submetidos a uma cirurgia de traqueostomia e introdução de um cateter na artéria carótida. O cateter foi conectado a um transdutor de pressão que permite aferição e o registro das modificações na pressão arterial média em um polígrafo. Os animais foram divididos em dois grupos distintos: 1º grupo: dose de 1 mg/ kg por via intraperitoneal, administrada a cada 30 minutos, para registro da pressão arterial por 4-7horas. 2º grupo: uma curva dose-resposta com a fenilefrina nas doses cumulativas de 1 µg/ kg a 2 mg/ kg foi realizada antes e depois do tratamento com o extrato, na dose de 8 mg dl/ kg, administrado pela via intravenosa.	A administração intraperitoneal de 1 mg/ kg do extrato causou uma redução aproximada de 48% da pressão arterial média em relação ao grupo controle. A dose hipotensora máxima (8 mg dl/ kg) do extrato inibiu hipertensão causada pela fenilefrina em aproximadamente 80% de sua resposta máxima.	(68)
Hipotensora	Extrato aquoso das folhas	Ratos normotensos	Única dose de 5 mg/ kg, administrada pela via intravenosa	Os ratos anestesiados tiveram a artéria carótida canulada e conectada a um sistema computadorizado, para acompanhamento da pressão arterial média. O extrato foi injetado por meio de um segundo catéter introduzido na veia femoral.	A pressão arterial média foi reduzida de 120 mmHg para 60 mmHg (50%), e recuperou seus níveis normais após 30 segundos. Esta redução foi atribuída a mecanismos periféricos.	(125)
Desempenho cardíaco	Extrato aquoso das folhas	Ratos	Foram administradas pela via	Ratos foram anestesiados e submetidos a uma cirurgia de introdução de catéter na artéria carótida para acompanhamento da frequência	A frequência cardíaca aumentou de 246 para 257 (2 mg dl/ kg), 290 (4 mg dl/ kg), 304 (8 mg dl/kg) e 348 batidas/min (16 mg dl/ kg) e permaneceu	(29)

			intravenosa as doses de 2, 4, 8, 16 mg dl/ kg, podendo atingir a dose de 67 mg dl/ kg.	cardíaca e da força de contração (secundária à pressão arterial diferencial), por meio de um sistema de registro acoplado a um transdutor de pressão. O extrato foi injetado pela jugular para obtenção do resultado.	constante em altas doses (67 mg dl/ kg). A pressão diferencial (sistólica menos diastólica) diminuiu de 7,5 mmHg para 4 mmHg na dose de 16 mg dl/ kg.	
Diurética	Extrato aquoso das folhas	Ratos normotensos	Doses de: 56, 94, 145, 172 mg/ kg, administradas por via oral (gavagem), uma única exposição.	Em animais anestesiados foi realizada uma incisão (2 cm acima do pênis) através da qual foi localizada, exteriorizada e canulada a bexiga urinária para coletar amostras de urina e proceder com a medida gravimétrica do seu volume e determinação das concentrações de sódio e potássio. Os parâmetros foram avaliados nos tempos de 30, 60 e 90 minutos.	O melhor efeito diurético foi observado para a dose de 94 mg/ kg, a qual aumentou a diurese em 213% e 373% nos tempos de 60 e 90 minutos. A dose de 145 mg/ kg apresentou menor efeito, cuja diurese correspondeu a 91% no tempo de 90 min. Observou-se que as doses intermediárias (94 e 145 mg/ kg), além de apresentarem melhor efeito diurético, também aumentaram a natriurese e caliurese.	(83)
Diurética	Extrato aquoso das folhas	Ratos normotensos	Este experimento foi realizado em ratas tratadas por gavagem com o extrato nas doses de 15, 60 ou 120 mg d.l./ kg	As ratas foram colocadas em gaiolas metabólicas e o volume da urina foi coletado a cada 30 minutos durante um total de 4 horas depois do tratamento com o extrato. Foram contabilizados o volume de urina e as concentrações de Na ⁺ , K ⁺ e Cl ⁻ . A amilorida (20 mg/ kg) foi usada como controle positivo de diurese.	Nas doses de 15 e 60 mg dl/ kg o extrato não causou aumento da diurese. Porém, a atividade foi observada na dose de 120 mg dl/ kg, a qual causou efeito diurético semelhante ao controle positivo (amilorida). (Atividades Diuréticas Absolutas de 273,2 ± 60,3% e 335,2 ± 52,1%, respectivamente para <i>E. uniflora</i> e a amilorida), porém ocorreram diferenças na composição iônica da urina. A amilorida induziu perda de Na ⁺ e reteve o K ⁺ , enquanto o extrato ocasionou uma urina com pouco Na ⁺ e Cl ⁻ .	(68)
Anti-inflamatória	Óleo essencial, extratos aquoso e etanólico das folhas	Camundongos	150 e 300 mg/ kg, por via oral	Para avaliar a ação anti-inflamatória, foi realizado o ensaio de edema de pata induzido por carragenina. As patas foram mensuradas antes da administração do agente flogístico e após 1, 2 e 4 horas do tratamento.	O óleo essencial e os extratos apresentaram ação anti-inflamatória, evidenciada pela redução do edema de pata, em todos os tempos avaliados. Os melhores resultados foram obtidos para a dose de 300 mg/ kg, no tempo de 4 h após sua administração. Nestas condições, o óleo essencial e os extratos aquoso e etanólicos chegaram a inibir respectivamente 32,5%, 57,5% e 34,5% do edema.	(88)
Anti-inflamatória	Fração butanólica das	Camundongos	75, 150 e 300 mg/ kg, administrados	Após uma incisão no abdome, a válvula íleo-cecal foi exposta, ligada parcialmente e perfurada. Em seguida, foi recolocada na cavidade abdominal e o	A letalidade foi significativamente reduzida e de forma dependente da dose (respectivamente 25, 50 e 57%). A fração butanólica da <i>E. uniflora</i> inibiu	(5)

	folhas		por via oral, uma vez ao dia, durante 7 dias consecutivos	animal foi tratado e acompanhado durante 7 dias, para quantificação da letalidade. Alguns animais passaram pelo mesmo procedimento, porém, após 6 horas da indução, foram destinados à coleta de do sangue, pulmões e fígado. Estes tecidos foram utilizados para os testes de parâmetros inflamatórios, como citocinas, mieloperoxidase e expressão das enzimas iNOS e COX-2	todos os parâmetros pró-inflamatórios avaliados. A dose de 300 mg/ Kg V.O. inibiu 32,3 do TNF α , 38,8% do IL-1 β , 57,6% da atividade da mieloperoxidase, 75% da iNOS e 80,8% da expressão da COX-2.	
Anti-inflamatória	Óleo essencial	Camundongos	Dose de 200 mg/ kg, pela via oral	Foi investigada por meio da metodologia de edema de orelha induzido pelo éster de forbol. Este foi aplicado no volume de 20 μ L na orelha dos camundongos 1 hora depois do tratamento com o óleo essencial. Depois de 6 horas os animais foram sacrificados e as orelhas cortadas e pesadas para investigação do efeito.	No teste de edema de orelha, o óleo bruto não apresentou diferença significativa em relação ao edema causado no controle.	(14)
Antinociceptiva	Extratos aquoso e etanólico das folhas	Camundongos	300 mg/ kg, por via oral	A atividade antinociceptiva foi determinada de duas maneiras: (i) usando o método da placa quente, sobre a qual é quantificado o tempo de permanência (latência) do animal sobre a superfície da placa, constantemente aquecida entre 50 e 55 °C, e (ii) teste de contorções induzidas pela administração intraperitoneal de ácido acético.	Em ambos testes, não houve diferença significativa em relação ao controle	(88)
Antinociceptiva	Óleo essencial bruto, frações e sesquiterpenos	Camundongos	O óleo essencial cru e a fração pentanol: 50, 100, 200 e 500 mg/ kg. As frações diclorometano e metanol: 200 mg/kg, e os sesquiterpenos majoritários a 100 mg/ kg. Todos pela via oral	A atividade antinociceptiva foi determinada de duas maneiras, usando o método da placa quente e o teste de contorções abdominais induzidas pela administração intraperitoneal de ácido acético.	O óleo essencial bruto inibiu as contorções em 48% na dose de 200 mg/ kg. A fração pentano, na mesma dose, apresentou uma inibição superior, 70%. Os sesquiterpenos inibiram 74% das contrações abdominais. Todos os produtos da <i>E. uniflora</i> testados aumentaram o tempo de latência na placa quente significativamente. Os sesquiterpenos foram responsáveis pelo melhor efeito, aumentando o tempo de latência para além do período de corte (de 30 segundos, visando a segurança dos animais)	(126)
Antipirética	Óleo essencial	Camundongos	O óleo essencial,	Os camundongos foram tratados com os diferentes produtos e concentrações. Então as	O óleo essencial e os sesquiterpenos conseguiram reduzir a temperatura entre 1,5 e 2°C, no período	(126)

	bruto, e sesquiterpenos		fração pentanol: 50, 100, 200 e 500 mg/ kg. As frações diclorometano e metanol: 200 mg/ kg. Sesquiterpenos majoritários: 100 mg/ kg. Todos pela via oral	temperaturas retais dos animais foram mensuradas a cada hora, até completar 3h e comparadas com os animais do grupo controle.	investigado de 3h.	
Antidepressiva	Extrato etanólico das folhas	Camundongos	Doses 1, 10 e 100 mg/ kg, administradas pela via oral	Os camundongos foram tratados com o extrato, água ou fluoxetina (10 mg/ kg). Foram aguardados 60 minutos antes dos testes de suspensão da cauda e do teste de Campo aberto para avaliar o potencial antidepressivo da planta. O tempo de imobilidade no teste de suspensão da cauda e atividade locomotora no campo aberto foram os parâmetros avaliados.	O extrato nas doses de 1, 10 e 100 mg/ kg não interferiu no tempo de imobilidade. A fluoxetina, controle positivo, provocou a redução deste tempo, como esperado. Portanto, o extrato testado nestas doses não produziu nenhum efeito antidepressivo significativo. Da mesma forma, também não houve variação significativa da atividade locomotora no teste de campo aberto, confirmando que não houve prejuízo da habilidade motora neste estudo.	(28)
Antidepressiva	Óleo essencial das folhas	Camundongos	1 a 50 mg/ kg, administradas pela via oral.	Os animais foram pré-tratados com diferentes doses do óleo essencial ou com a fluoxetina (32 mg/ kg, c.o.) ou veículo, 60 minutos antes do teste de suspensão da cauda. Para investigar o envolvimento da via noradrenérgica, alguns animais foram tratados com prazosin (1 mg/ kg, I.P.), antagonista seletivo alfa-1 adrenérgico, ou ioimbina (1 mg/ kg, I.P.), antagonista seletivo alfa-2 adrenérgico. E para avaliar o envolvimento da via serotoninérgica, foram usados antagonistas, entre eles a ketanserina (antagonista não seletivo de receptores 5-HT _{2A/2C} , receptores 5 mg/ kg I.P.).	O óleo essencial reduziu significativamente o tempo de imobilidade. A DI ₅₀ foi 9,1±1.2 mg/ kg e a inibição máxima para o óleo essencial foi 72,8±17.1% para a dose de 50 mg/kg no teste de suspensão da cauda. A fluoxetina reduziu 56.3% quando comparada com o veículo. O pré-tratamento dos camundongos com ketanserina, ioimbina e prazosin preveniu este efeito antidepressivo evidenciado por este modelo. Este resultado confirma o envolvimento, ao menos em parte, dos sistemas adrenérgico e serotoninérgico no efeito da <i>E. uniflora</i> .	(118)
Trânsito intestinal	Extratos aquoso e etanólico das folhas	Camundongos	300 mg/ kg, por via oral em camundongos	Os animais receberam, por via oral, uma solução aquosa de 10% de carvão ativado (0,3 mL/animal) 1 hora antes do tratamento com a <i>Eugenia uniflora</i> . Posteriormente, os animais foram mortos e a distância percorrida pelo marcador foi medida e comparada entre os grupos	O extrato aquoso foi capaz de reduzir a distância percorrida pelo carvão no intestino. Os valores para o extrato aquoso e para o controle tratado com água foram, respectivamente 52,4 % e 62,5%.	(88)

				tratados em relação ao controle.		
Reguladora do metabolismo lipídico e glicêmico	Extrato bruto hidroalcolico das folhas	Macacos <i>Cebus apella</i>	O extrato foi administrado pela via oral, na concentração de 0,5 g/ kg, durante 14 dias	Além da alimentação convencional, foi administrado aos macacos, duas vezes ao dia, uma emulsão de triglicerídeos e colesterol (30% óleo, 2% colesterol, 45% açúcar, 23% água e 0.1% polpa de banana, w/w), 10 mL/ kg (0.5g extrato/kg), por via oral. Houve coleta prévia para comparação dos parâmetros a serem comparados antes e depois dos tratamentos. A administração do extrato da <i>E. uniflora</i> começou quando o colesterol aumentou 30% dos seus níveis basais. Amostras de sangue dos animais foram coletadas para avaliação.	O extrato não demonstrou atividade significativa sobre o metabolismo lipídico de triglicerídeos e colesterol. Além disso, não ocorreram efeitos significativos na uremia e glicemia, também avaliadas.	(38)
Reguladora do metabolismo lipídico e glicêmico	Foram testadas as frações hexânica, acetato de etila, aquosa, e Precipitado	Camundongos	300 mg/ kg, por via oral, para todas as frações	Os camundongos previamente tratados foram submetidos aos testes plasmáticos para avaliar uma possível ação hipoglicemiante e hipotriglicémiante das frações da <i>Eugenia uniflora</i>	A fração precipitada da <i>E. uniflora</i> demonstrou ser eficaz na hiperglicemia pós-prandial pela sua inibição da decomposição de carboidratos, bem como da absorção de glicose. As frações acetato de etila, aquosa e precipitada inibiram a atividade da lipase pancreática, mostrando-se efetivas na hipertriglicidemia pós-prandial. No teste de tolerância a glicose, as frações hexânica e precipitada inibiram a elevação da glicose no plasma. Estes efeitos foram aparentemente devido à inibição da absorção da glicose pelo intestino.	(64)
Reguladora do metabolismo lipídico	Extrato aquoso das folhas	Ratos	Dose: quantidade de 5% do extrato, por via oral, incorporado (ou não) a uma ração rica em lipídios	Os animais foram tratados com uma dieta rica em lipídios, contendo ou não o extrato da <i>E. uniflora</i> , durante 8 semanas. Em seguida, houve a avaliação do peso corporal, níveis de colesterol, glicose e leptina, além da gordura visceral	Houve inibição significativa do peso corporal dos ratos tratados ($p < 0.05$), redução da gordura visceral, dos níveis de colesterol e da leptina no plasma destes animais. Entretanto, o HDL e a glicose plasmática não foram afetados por este tratamento, e não houve modificação da absorção lipídica. Os autores sugerem (contraditoriamente) como principal mecanismo, a diminuição da leptina no plasma.	(95)
Hepatoprotetora	Óleo essencial das folhas	Camundongos	200 mg/ kg por via oral	Os camundongos receberam 300 mg/ kg de acetaminofeno (300 mg/ kg, que causa lesão por aumento da peroxidação lipídica), ou veículo (salina). Depois de 30 minutos, o óleo essencial (200 mg/ kg) ou veículo (óleo canola) foram	O óleo essencial das folhas de <i>E. uniflora</i> (200 mg/ kg) restaurou todos os parâmetros bioquímicos modificados pelo acetaminofeno, como o conteúdo de tióis não proteicos, atividades da δ -Ala-D e glutathiona-S-transferase, reduziu o nível de	(78)

				administrados. Decorridas 24 horas, os camundongos foram anestesiados e amostras do sangue, fígado e rins foram coletados para avaliar as enzimas alanina transaminase (ALT), aspartato transaminase (AST), δ -aminulevunilate dehidratase (δ -Ala-D), catalase, glutationa S-transferase, e os níveis de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e de tióis não proteicos.	TBARS no fígado e nos rins. Além disso, aumentou a atividade plasmática da ALT e da AST.	
--	--	--	--	--	--	--

Todos os ensaios para avaliar a ação hipotensora foram realizados com o extrato aquoso das folhas de *E. uniflora* em ratos normotensos, em doses e vias variadas. Os resultados confirmaram o potencial hipotensor desta planta. Pela via oral, a dose de 172 mg/kg foi capaz de reduzir a pressão arterial em 31%, após 90 minutos da administração (83). Pela via intravenosa, a dose de 5 mg/ kg reduziu 50% da pressão arterial, a qual retornou aos níveis basais após 30 segundos da administração (125).

Ainda, relacionado ao sistema cardiovascular, um estudo avaliou a capacidade do extrato de *E. uniflora* em modificar o desempenho cardíaco. Observou-se um efeito inotrópico negativo (redução da força de contração cardíaca), a qual foi atribuída a um possível bloqueio não competitivo de canais de Ca^{2+} . Foi observado ainda um aumento na frequência cardíaca, justificado pela liberação de catecolaminas (ou existência de compostos agonistas de receptores β -adrenérgicos no extrato) e pela ativação dos receptores do barorreflexo (este ativado pela hipotensão causada pelo extrato) (29).

Os dois estudos realizados para avaliar a atividade diurética foram conduzidos paralelamente aos estudos da atividade hipotensora. Ambos ocorreram em ratos normotensos, tratados por via oral com extrato aquoso das folhas de *E. uniflora*, em diferentes doses (máximo de 172 mg/ kg). Nos dois estudos, observou-se o aumento da atividade diurética (referências). Cirqueira (2006) (83) demonstrou que a dose de 94 mg/ kg aumentou a diurese em 213% e 373% nos tempos de 60 e 90 minutos, respectivamente, acompanhada pela excreção de maior quantidade de íons na urina (83). Em relação à composição iônica da urina e sua contribuição osmótica para hipovolemia, houve discordância entre os estudos, uma vez que Cirqueira (2006) detectou o aumento da excreção de Na^+ e K^+ , enquanto Consolini e colaboradores (1999) verificaram uma diminuição da excreção do Na^+ e Cl^- . Consolini e colaboradores (1999) justificaram que o efeito diurético foi discreto, provavelmente por ser um evento fisiológico secundário ao aumento do fluxo sanguíneo renal (68).

Para avaliar os efeitos da *E. uniflora* na inflamação, encontram-se descritos três ensaios em artigos distintos. Todos foram desenvolvidos em camundongos e os produtos da planta (óleo essencial, extrato aquoso, extrato etanólico e frações) foram administrados por via oral. Schapoval e colaboradores (1994) (68) utilizaram o modelo de edema de pata e, resumidamente, a maior inibição do edema (57,5%) ocorreu após 4 horas do tratamento com o extrato aquoso, 300 mg/ kg V.O. (68). Entretanto, em

modelo de edema de orelha induzido pelo óleo de cróton (14), não foi observada diferença significativa entre os grupos controle e tratado com o óleo essencial das folhas da *E. uniflora*, 200 mg/ kg V.O.(14), corroborando com a possibilidade de uma maior concentração dos compostos anti-inflamatórios nas extrações mais polares das folhas. Rattmann e colaboradores (2012), por sua vez, investigaram na sepse experimental os efeitos da fração butanólica proveniente da extração hidroalcoólica das folhas da *E. uniflora*. Na dose de 300 mg/ kg V.O. ocorreram os melhores resultados. Por exemplo, a letalidade foi reduzida em 57% (curiosamente, quase o mesmo valor de inibição do edema de pata, relatado previamente, o qual também ocorreu na mesma dose de 300 mg/ kg). Estes autores ainda demonstraram que a fração butanólica, rica em flavonoides, também inibiu consideravelmente vários parâmetros pró-inflamatórios, como citocinas pró-inflamatórias, atividade enzimática da mieloperoxidase (grande produtora de espécies livres de oxigênio), além de inibir a expressão das enzimas iNOS (óxido nítrico sintase induzida) e COX-2 (cliclooxigenase 2), fortemente implicadas na manutenção dos processos inflamatórios(5).

A avaliação da atividade antinociceptiva, a qual prediz o efeito da *E. uniflora* na dor, também foi investigada. Amorin e colaboradores (2009) (126) relataram que o óleo essencial bruto, 200 mg/ kg V.O., causou uma diminuição de 48% no número de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético. Este efeito ainda foi maior para a fração pentano (70%) e para os sesquiterpenos (74%), na mesma dose. Além disso, todos estes produtos da *E. uniflora* aumentaram o tempo de latência na placa quente, confirmando o potencial analgésico desta planta para o óleo essencial e seus derivados (126). Porém, estes efeitos não ocorreram quando os mesmos ensaios foram realizados por Schapoval e colaboradores (1994) utilizando os extratos aquoso e etanólico das folhas de *E. uniflora*, a 300 mg/ kg V.O. (88). Baseando-se nestes resultados, é possível inferir que os compostos com ação antinociceptiva encontram-se predominantemente nas extrações mais apolares, especialmente naquelas que concentram os sesquiterpenos (126). Curiosamente, estas mesmas extrações foram relatadas neste artigo por causarem efeitos antipiréticos nos camundongos (126).

O efeito antidepressivo, por sua vez, foi investigado em camundongos, por meio do teste de suspensão da cauda, no qual a fluoxetina, antidepressivo usado como controle positivo, reduz o tempo de imobilidade dos animais. Neste contexto, foram realizados estudos com extrato etanólico (127) ou com o óleo essencial das folhas (118). Embora as doses administradas fossem praticamente as mesmas e a via oral em

ambos ensaios, a ação antidepressiva só ocorreu nos animais tratados com óleo essencial. Além disso, o mecanismo de ação do óleo essencial foi investigado e confirmou o envolvimento das vias adrenérgica e serotoninérgica no efeito antidepressivo da *E. uniflora*, as quais são vias comumente envolvidas no mecanismo de ação de medicamentos antidepressivos convencionais (118).

A infusão das folhas de *E. uniflora* é comumente usada em casos de diarreia (88). Um método experimental para investigar a peristalse intestinal consiste em administrar um corante (ex.: charcoal) e verificar a distância que ele percorre no intestino em um determinado intervalo de tempo, de acordo com os tratamentos investigados. Schapoval e colaboradores (1994) realizaram este experimento para testar o trânsito intestinal de camundongos tratados com o extrato aquoso das folhas de *E. uniflora*, 300 mg/ kg. Os autores observaram que houve redução de 10% no trânsito intestinal dos animais tratados, confirmando o potencial antidiarreico desta planta (88).

Os efeitos sobre o metabolismo de lipídios e de carboidratos foi investigado por meio da administração oral de diferentes tipos de extrações das folhas de *E. uniflora*, testados em diferentes animais (macacos, camundongos e ratos).

Nos macacos (*Cebus apela*) não foram observadas alterações no metabolismo lipídico ou glicêmico, mesmo após administração do extrato bruto etanólico durante 14 dias consecutivos (38). Entretanto, as frações (i) precipitado, (ii) acetato de etila, (iii) aquosa, obtidas de uma extração aquosa inicial, foram capazes de diminuir a glicemia em camundongos, além de inibir a enzima lipase pancreática, cuja ação permite a maior absorção de lipídios pelo intestino (64). Os resultados poderiam sugerir benefícios para o tratamento da diabetes e para a prevenção de doenças cardiovasculares, além de outros benefícios terapêuticos, como na redução do peso corporal.

Este possível efeito contra a obesidade foi investigado por um grupo de pesquisa do Japão (Umemiya et al., 1999) e publicado originalmente em língua japonesa. O ensaio foi realizado em ratos alimentados com ração rica em lipídios, acrescida de 5% de extrato aquoso das folhas de *E. uniflora*. Após 8 semanas de tratamento, observou-se a inibição do peso corpóreo dos animais, além da diminuição da gordura visceral, do colesterol e da leptina (95). A leptina é um hormônio anorexigênico produzido e liberado pelo tecido adiposo em quantidades proporcionais à massa de gordura no corpo. A deficiência de leptina ou/ou dos seus receptores induz a obesidade mórbida, além de aumento do apetite, hiperglicemia, hiperlipidemia e redução do gasto energético, em roedores e em humanos (128).

Após compreender a função da leptina, é possível se contrapor à justificativa dada por Umemiya e colaboradores (1999) para explicar a perda do peso corporal no ensaio descrito anteriormente, uma vez que a redução dos níveis de leptina favoreceria o ganho do peso corporal dos ratos, e não sua redução demonstrada no estudo (129).

4.3.2.3 Ensaio *ex vivo*

Na literatura consultada foram identificados cinco estudos que avaliaram as ações da *Eugenia uniflora* por meio de testes farmacológicos *ex vivo*. Dentre os estudos, quatro se referem a avaliações da atividade cardiovascular e um avalia a atividade antiespasmódica, conforme informações descritas no Quadro 5 a seguir:

Quadro 5. Ensaio *ex vivo* com extratos das folhas de *Eugenia uniflora* L.

Extrato testado	Concentrações	Órgãos isolados/ animal	Metodologia/parâmetro observado	Resultado	Ref.
Extrato aquoso bruto das folhas	0,2, 0,6 e 1,2 g dl/ 100 mL	Leito mesentérico de rato	A aorta foi canulada e conectada para perfusão com solução de Krebs a um fluxo constante de 3 ml/min. A veia cava inferior foi cortada para deixar a perfusão prosseguir. A cânula arterial foi conectada a um transdutor para registro da pressão de perfusão em um polígrafo. Variações nos registros de pressão de perfusão induzidas pelo extrato sobre o leito previamente contraído por KCl 80 mM. Estas variações indicam alterações no tônus vascular.	Induziu vasodilatação dependente da concentração em leito mesentérico previamente contraído com KCl 80 mM. A inibição máxima do tônus foi de 32,3% (n=6, P<0,05) a 1,2 g dl/ 100 mL	(68)
Extrato aquoso bruto das folhas	Nas concentrações para perfusão de 0,3, 0,6 e 1,2% em líquido nutritivo de Krebs	Coração de rato	Ratos de ambos os sexos foram heparinizados e anestesiados e o coração foi rapidamente removido e preparado para o experimento de acordo com o método de Langendorf. Um balão de látex foi introduzido no ventrículo esquerdo e conectado a um transdutor de pressão para registro das contrações em polígrafo. Os músculos foram estimulados eletricamente e também perfundidos via aorta com Krebs aerado com carbogênio. O extrato bruto foi dissolvido em líquido nutritivo de Krebs nas concentrações para	Observou-se que a perfusão com o extrato aquoso bruto da <i>E. uniflora</i> durante 20 minutos causou 50% de diminuição do valor basal da pressão intraventricular esquerda máxima, sugerindo um efeito inotrópico negativo de compostos presentes no extrato. Por fim, a curva concentração-resposta do cálcio foi inibida de forma não-competitiva pelo extrato da <i>E. uniflora</i> , sugerindo um possível	(29)

			perfusão de 0,3, 0,6 e 1.2%. Em outro set de experimentos, foi feita uma curva por infusão de diferentes concentrações do cálcio (0,5 - 2 mM), antes e depois da infusão do extrato a 1.2% por 25 minutos.	bloqueio de canais de cálcio por compostos presentes no extrato.	
Extrato aquoso bruto das folhas	Aorta: 30 a 3000 µg/mL. Átrio: 0,01 - 10 mg/mL	Artéria aorta de rato e átrios de camundongo	A aorta e o coração foram removidos e acondicionados em cubas aquecidas, aeradas e contendo líquidos nutritivos. Do coração foram isolados os átrios esquerdo (de contração espontânea) e direito (contrações estimuladas eletricamente de forma artificial). O relaxamento vascular dos anéis de aorta e as alterações da força de contração e da frequência cardíaca dos átrios foram mensuradas por meio dos registros obtidos do polígrafo.	O extrato aquoso da <i>E. uniflora</i> causou vasodilatação da aorta pré-contráida com prostaglandina PGF _{2α} (CI ₅₀ = 713 µg/ mL) ou com KCl (828 µg/ mL). Além disso reduziu a força de contração dos átrios (CI ₅₀ = 1,04 mg/ mL, sem redução da frequência cardíaca.	(125)
Extrato hidroalcoólico das folhas e sua fração acetato de etila	Extrato hidroalcoólico: 1-300 microg/ mL; fração acetato de etila: 0.3-300 microg/ mL	Aorta de rato	Anéis de aorta 3-4 mm foram obtidos de ratos (250-330 g). Os anéis com e sem endotélio foram colocados em cubas de vidro, contendo líquido nutritivo, aquecido a 37°C, aerado com carbogênio, e sob tensão de 1g. As tensões geradas pelas substâncias testadas foram registradas em polígrafos. Após confirmar o efeito relaxante, buscou-se informações sobre o mecanismo. Para isso os anéis de aorta foram incubados com L-NAME (inibidor da síntese do NO), Indometacina (inibidos de prostaciclina), azul de metileno (inibidor de GMPc), e bloqueadores seletivos de canais de potássio. Além disso, testou-se se o efeito era via receptores muscarínicos, usando o antagonista atropina, ou histamínico, usando pirlamina (antagonista de receptores histaminérgicos H1).	O extrato hidroalcoólico induziu relaxamento dependente do endotélio, do óxido nítrico e do GMPc. Por outro lado, não foi afetado pelo tratamento prévio com a indometacina, nem pelos bloqueadores dos canais de potássio ou pelos antagonistas muscarínico e histaminérgico. Mostrando que não envolve a prostaciclina e nem agem em receptores muscarínicos ou H1 para produzir este efeito relaxante.	(130)
Extratos hexânico, clorofórmico, acetato de etila, metanólico e o óleo	Concentrações de 0 a 4% para compor curva concentração-resposta para cada extrato. Além de 0.01%-0.8%	Jejuno de rato	O duodeno foi dissecado e acondicionado em cuba de órgão isolado contendo líquido nutritivo, aeração e aquecimento. O órgão foi tensionado e as curvas de contração foram realizadas com os extratos e comparadas com a curva controle da acetilcolina (4,4 a 70.10 ⁻⁷ M). Os registros	Os extratos metanólico e clorofórmico resultaram em contrações semelhantes às induzidas pela acetilcolina. Portanto, estes extratos nas doses testadas apresentaram atividade contracturante do jejuno. O extrato acetato de etila causou contração quatro	(53)

essencial	para os testes com o óleo essencial.		das contrações foram obtidos em quimógrafo.	vezes maior do que a acetilcolina. Por outro lado, o extrato hexânico não atingiu metade da contração causada pela curva controle da acetilcolina. Os valores das CI_{50} para as curvas e suas respostas máximas não foram apresentadas nesta referência. O óleo essencial não causou contração do jejuno, porém foi capaz de inibir as contrações espontâneas ou aquelas induzidas pela acetilcolina a 5.10^{-7} M	
-----------	--------------------------------------	--	---	---	--

Em átrios isolados de camundongos observou-se uma redução da força de contração (efeito inotrópico negativo), sem alteração na frequência cardíaca (125). Este mesmo efeito foi confirmado em coração isolado de rato, cujo estudo relatou um possível boqueio de canais de cálcio como responsável por este efeito inotrópico negativo observado em ambos os estudos (29).

Os estudos em leito mesentérico e em vasos isolados demonstraram a vasodilatação causada pela *Eugenia uniflora* (68, 125, 130). Este efeito corrobora com a capacidade hipotensora relatada pelas indicações populares para o uso desta planta.

Por outro lado, o teste em jejuno evidenciou uma atividade contrátil dos extratos da *Eugenia uniflora* sobre a musculatura lisa intestinal nas concentrações testadas (53). Diante dos resultados obtidos, os autores sugeriram seu uso para o tratamento da constipação, contrariando as indicações populares desta planta para uso na diarreia. Entretanto, o óleo essencial das folhas da *E. uniflora*, neste mesmo estudo, demonstrou um efeito que corrobora com o uso popular, uma vez que este foi capaz de inibir as contrações espontâneas do jejuno, bem como de inibir as contrações causadas pela acetilcolina (53).

4.4 ESTUDOS CLÍNICOS

4.4.1 Fase I

Ambos estudos clínicos de fase I realizados com *Eugenia uniflora* ocorrem no âmbito da Odontologia e foram fundamentados na capacidade antimicrobiana desta planta (9, 84).

No primeiro deles investigou-se a atividade do extrato hidroalcoólico dos frutos maduros da *E. uniflora* em 40 voluntários de ambos os sexos, com idades entre 21 e 24 anos, que fizeram o uso de um dentifrício contendo o extrato da planta ou um dentifrício comercial (controle positivo) pelo menos três vezes ao dia. Cada 10 mL de dentifrício de *E. uniflora* continha em sua composição: extrato hidroalcoólico do fruto maduro da planta a 3%; conservantes (parabenos) 0,02 g; e base de dentifrício qsp (84). Os participantes usaram os dentifrícios durante 22 dias consecutivos, após os quais foram mensurados os índices de acúmulo de biofilme, doença gengival e contagem de *Streptococcus. mutans* salivar, nos tempos antes do uso, 15 dias de uso e 22 dias de uso dos produtos (84).

Observou-se redução estatisticamente significativa entre os tempos antes e depois de 22 dias de uso em ambos os grupos para os índices de acúmulo de biofilme, doença gengival e unidades formadoras de colônias de *S. mutans* ($p < 0,01$, teste t Student). Ao comparar os grupos dentifrício de *E. uniflora* e Colgate total 12®, constatou-se diferença estatística apenas para o índice de doença gengival ($p < 0,01$). Portanto, os autores concluíram que o dentifrício contendo o extrato hidroalcoólico do fruto maduro da *Eugenia uniflora* possui eficácia semelhante ao dentifrício comercial (grupo controle) (84).

O segundo estudo avaliou a eficácia da descontaminação das escovas de dentes pelo spray contendo do óleo essencial das folhas de *Eugenia uniflora* L. Para isto, foi realizado um ensaio clínico cruzado duplo cego, com uma amostra de 28 universitários entre 19 e 25 anos de idade, de ambos os gêneros, que não utilizavam antibióticos ou antissépticos e autorizaram sua participação por meio da assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Os participantes usaram três sprays pelo período padronizado de uma semana: spray teste (óleo essencial das folhas de *E. uniflora* a 2%, água destilada e Tween-80), spray controle positivo (clorexidina a 2%) e spray controle negativo (água destilada e Tween-80). A cada semana, foi disponibilizado um “kit”

contendo escova dental com capa, creme dental, e um dos três sprays, tendo um intervalo de uma semana entre o uso destes (conforme esquema do Quadro 6).

Quadro 6. Sequência de procedimentos para o uso do kit experimental, contendo escova, recipiente para coleta de amostras microbiológicas e sprays de higienização.

Conduas	Tempo				
	1ª semana	2ª semana	3ª semana	4ª semana	5ª semana
1º) lavar a escova dentária com água da torneira;	Sim	I N T E R V A L O	Sim	I N T E R V A L O	Sim
2º) borrifar 6 vezes o spray nas cerdas;	Spray 1		Spray 2		Spray 3
3º) deixar secar durante 1 hora;	Sim		Sim		Sim
4º) Acondicionar no recipiente fornecido.	Sim		Sim		Sim
Coleta	7º. dia		21o. dia		35o. dia
- coleta das escovas	Sim		Sim		Sim
- exame microbiológico	Sim		Sim		Sim
- contagem das UFC/mL.	Sim	Sim	Sim		

Fonte: (67)

Após os procedimentos, avaliou-se o grau de contaminação bacteriana das escovas pelo *S. mutans*, depois do uso de cada spray por uma semana, sendo semeadas as diluições de 10^{-3} do soro fisiológico, onde as escovas foram submersas, no meio de cultura Ágar Mitis Salivarius–Bacitracina. Após a semeadura, as placas foram incubadas em estufa a 37°C por 48 horas em microaerofilia e feita a contagem de UFC/mL. As médias de UFC/ mL foram: spray teste = 1968,07, controle negativo = 4867,82 e controle positivo = 337,93. Foram observadas diferenças significativas ao nível de 1% ($p = 0,01$) ao Teste t de Student entre as médias para todos os grupos. Concluiu-se que o spray testado foi eficaz na descontaminação das escovas dentárias(67).

4.4.2 Fase II

Dado não encontrado na literatura pesquisada.

4.4.3 Fase III

Dado não encontrado na literatura pesquisada.

4.4.4 Fase IV

Dado não encontrado na literatura pesquisada.

4.4.5 Estudos observacionais

Dado não encontrado na literatura pesquisada.

4.5 RESUMO DAS AÇÕES E INDICAÇÕES POR DERIVADO DE DROGA ESTUDADO

A maioria dos estudos pré-clínicos encontrados para a espécie foram conduzidos com óleos essenciais, extrato aquoso ou extrato hidroalcoólico das folhas de *Eugenia uniflora*, ou com derivados destes extratos. As ações mais fundamentadas em ensaios pré-clínicos são as ações antimicrobiana, antiparasitária, antioxidante, hipotensora, diurética, anti-inflamatória e antidiarreica, e em menor grau de evidência a sua ação antidepressiva e inibidora enzimática (lipase pancreática, acetilcolinesterase, xantina oxidase e DNA polimerase de vírus patogênicos).

4.5.1 Vias de Administração

Os artigos científicos citam a via oral como via preferencial para uso de *E. uniflora* (131).

4.5.2 Dose Diária

Para a finalidade de tratar diarreia não infecciosa, a literatura científica sugere preparar uma infusão das folhas de *E. uniflora*, na proporção de 3 g das folhas (1 colher de sopa) em 150 mL (1 xícara de chá) (131). Não foram encontrados outros relatos de doses para outros fins terapêuticos.

4.5.3 Posologia (Dose e Intervalo)

Para diarreia, utilizar 1 cálice (30 mL) após a evacuação em no máximo 10 vezes ao dia (131).

4.5.4 Período de Utilização

Dado não encontrado na literatura pesquisada.

4.5.5 Contra Indicações

Dado não encontrado na literatura pesquisada.

4.5.6 Grupos de Risco

Dado não encontrado na literatura pesquisada.

4.5.7 Precauções de Uso

Os 30 mL da infusão relatada no tópico 4.5.2 não devem ser administrados mais de 10 vezes ao dia (131).

4.5.8 Efeitos Adversos Relatados

Dado não encontrado na literatura pesquisada.

4.5.9 Interações Medicamentosas

4.5.9.1 Descritas

Dado não encontrado na literatura pesquisada.

4.5.9.2 Potenciais

Dado não encontrado na literatura pesquisada.

4.5.10 Informações de Superdosagem

4.5.10.1 Descrição do quadro clínico

Dado não encontrado na literatura pesquisada.

4.5.10.2 Ações a serem tomadas

Não foram relatadas na literatura científica considerada. Porém, cabem as instruções gerais, como suspender o uso e procurar orientação médica para que sejam adotadas as medidas preventivas contra danos maiores, como manobras de apoio e controle das funções vitais.

5 INFORMAÇÕES GERAIS

5.1 FORMAS FARMACÊUTICAS/FORMULAÇÕES DESCRITAS NA LITERATURA

Na literatura investigada, foram encontrados somente dois estudos que descrevem formas farmacêuticas contendo *Eugenia uniflora* na composição. Ambos são estudos clínicos e foram confeccionados um creme dental e um spray para testes de interesse odontológico. Cada 10 mL do dentífrico de *E. uniflora* continha em sua composição: extrato hidroalcoólico do fruto maduro da planta a 3%; conservantes (parabenos) 0,02 g; e base de dentífrico qsp (84). O spray, por sua vez, continha o óleo essencial das folhas de *E. uniflora* a 2%, água destilada e Tween-80 (67).

5.2 PRODUTOS REGISTRADOS NA ANVISA E OUTRAS AGÊNCIAS REGULADORAS

Não acessíveis no site de consultas a produtos registrados pela ANVISA (http://www7.anvisa.gov.br/datavisa/Consulta_Produto/consulta_medicamento.asp)

Não estão disponíveis bulas de produtos registrados pela ANVISA, conforme consulta ao bulário desta agência, acessível em: http://www.anvisa.gov.br/datavisa/fila_bula/index.asp

Porém sabe-se do uso de *Eugenia uniflora* em produtos cosméticos e saneantes.

5.3 EMBALAGEM E ARMAZENAMENTO

A Farmacopeia Brasileira (5ª Edição, Volume 2) sugere que os produtos de *Eugenia uniflora* sejam armazenados em recipientes bem fechados, ao abrigo da luz e do calor (41).

5.4 ROTULAGEM

Informação não encontrada na literatura pesquisada, porém todos os Medicamentos Fitoterápicos ou os Produtos Tradicionais Fitoterápicos devem seguir as regras dispostas na Resolução da Diretoria Colegiada da ANVISA Nº 26, de 13 de maio de 2014, Capítulo VII, artigos 46 e 47.

5.5 MONOGRAFIAS EM COMPÊNDIOS OFICIAIS E NÃO OFICIAIS

A *Eugenia uniflora* está presente na Farmacopeia Brasileira (5ª Edição, Volume 2, página 1206) (41). Esta espécie não foi encontrada nas buscas às Monografias da Organização Mundial de Saúde, nem entre as Monografias da Comissão E (German Commission E Monographs), nem ainda entre as Monografias da ESCOP (The Scientific Foundation for Herbal Medicinal Products).

5.6 PATENTES SOLICITADAS PARA A ESPÉCIE VEGETAL

A busca aos bancos de patentes INPI (Instituto Nacional de Propriedade Intelectual), WIPO (World Intellectual Property Organization), USPTO (United States Patent and Trademark Office), EPO (European Patent Office) e JPO (Japan Patent Office), realizada em dezembro de 2014, utilizando o termo “*Eugenia uniflora*” resultou em 45 registros. Dentre estes, vários eram repetidos, uma vez que os pedidos de patente foram depositados em diferentes países. Do total de registros, a grande maioria (32 registros) consistia de produtos ou métodos para fins agrônômicos, como métodos de obtenção de vegetais transgênicos, aplicáveis para inúmeras espécies de plantas citadas, inclusive a *E. uniflora*. Os demais registros referiam-se a alimentos e cosméticos, ambos resultantes de associação de muitas plantas em sua composição. Todos os registros repetidos ou que envolveram usos não medicinais e associação de várias plantas foram removidos. Após leitura do resumo das patentes, utilizando os critérios de seleção mencionados previamente, somente 2 registros foram considerados nesta seção e listados a seguir.

Patente 1:

Título: Extratos de *Eugenia uniflora*

Inventora: Corinna Wirth

Requerente: MERCK PATENT GMBH

Data de depósito: 06/12/2012

Número do depósito: WO/2012/163469

Resumo: A presente invenção relata o uso dos extratos de partes da planta *Eugenia uniflora* para clareamento da pele, e preparação de cosméticos contendo estes extratos, bem como um processo de preparação destes.

Patente 2:

Título: Novo composto pentahidroxiindolizidine e inibidor da alfa-glucosidase

Inventor: Momose Yasunori

Requerente: Momose Yasunori

Data de depósito: 31/08/1998

Número do depósito: JP19980245307 19980831

Resumo: O referido compostos extraído a partir da planta *E. uniflora*, tem um efeito inibitório sobre a enzima alfa-glucosidase, sem efeitos secundários. Útil para distúrbios gastrintestinais, hepáticos, para o tratamento de diabetes, obesidade, etc. Quando é administrada por via oral, pode ser formulado usando aglutinantes, tais como amido, e desintegrantes, tais como hidroxipropilamido. O agente oral obtido é administrado a uma dose de 1-10 g / adulto / dia, distribuídos entre 1 a 3 administrações.

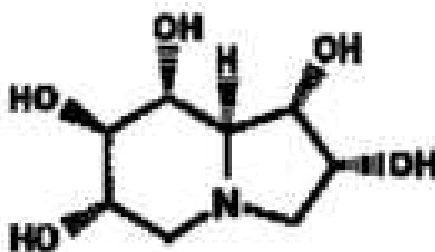


Figura6. Fórmula estrutural do composto (-)-(1S,2R,6S,7R,8R,8aR)-1,2,6,7,8-pentahydroxyindolizidine obtido por extração aquosa da planta *Eugenia uniflora* L. Fonte: Patente de Mamouse Yasunori, 1998.

REFERÊNCIAS

1. Lista de espécies da Flora do Brasil [Internet]. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. 2013 [cited 03 out. 2014]. Available from: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/>.
2. Missouri Botanic Garden [Internet]. 2014 [cited 03 out. 2014]. Available from: <http://www.tropicos.org>.
3. International Plant Names Index [Internet]. 2014 [cited 03 out. 2014]. Available from: <http://www.ipni.org/>.
4. Almeida CE, Karnikowski MGO, Foletto R, Baldisserotto B. Analysis of antidiarrhoeic effect of plants used in popular medicine. *Revista de Saude Publica*. 1995;29(6):428-33.
5. Rattmann YD, De Souza LM, Malquevicz-Paiva SM, Dartora N, Sasaki GL, Gorin PAJ, et al. Analysis of flavonoids from *Eugenia uniflora* leaves and its protective effect against murine sepsis. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*. 2012;2012.
6. Santos SC, Ribeiro JP, Guimarães DO, Silva MO, Ferri PH, Garcia ACF, et al. Antifungal activity of *Eugenia uniflora* L. fractions against *Paracoccidioides brasiliensis* (Splendore) Almeida. *Revista Brasileira de Plantas Medicinaiis*. 2005;7(1):30-3.
7. Desrivot J, Waikedre J, Cabalion P, Herrenknecht C, Bories C, Hocquemiller R, et al. Antiparasitic activity of some New Caledonian medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*. 2007;112(1):7-12.
8. Prestes LS, Schuch LFD, Alves GH, dos Santos MAZ, Rodrigues MRA, Meireles MCA. Evaluation of the bactericidal action of essential oils from guava, Surinam cherry and strawberry guava. *Evaluación de la actividad bactericida de aceites esenciales de hojas de guayabo, pitango y arazá*. 2011;16(4):324-30.
9. Oliveira CB, Soares DGdS, Bomfim IPR, Drumond MRS, Paulo MdQ, Padilha WWN. Avaliação da eficácia da descontaminação de escovas dentárias pelo uso do spray de óleo essencial da *Eugenia uniflora*L. (Pitanga). Evaluation of the effectiveness of the decontamination of toothbrushes by the use of the spray of essential oil of *Eugenia uniflora*L. (Pitanga). *Ciênc odontol bras*.12(2):29-34.
10. Auricchio MT, Bugno A, Barros SBM, Bacchi EM. Antimicrobial and antioxidant activities and toxicity of *Eugenia uniflora*. *Atividades antimicrobiana e antioxidante e toxicidade de Eugenia uniflora*. 2007;26(1):76-81.
11. Maia JGS, Andrade EHA, Da Silva MHL, Zoghbi MGB. A new chemotype of *Eugenia uniflora* L. from North Brazil. *Journal of Essential Oil Research*. 1999;11(6):727-9.

12. Gallucci S, Neto AP, Porto C, Barbizan D, Costa I, Marques K, et al. Essential oil of *Eugenia uniflora* L: An industrial perfumery approach. *Journal of Essential Oil Research*. 2010;22(2):176-9.
13. Fiuza TS, Silva PC, De Paula JR, Tresvenzol LMF, Sabóia-Morais SMT. Bioactivity of crude ethanol extract and fractions of *Eugenia uniflora* (Myrtaceae) in the hepatopancreas of *Oreochromis niloticus* L. *Biological Research*. 2009;42(4):403-14.
14. Amorim ACL. Pitangueira (*Eugenia uniflora* L.): fitoquímica e avaliação farmacológica do óleo essencial bruto e frações: UFRJ; 2007.
15. Costa AGV, Garcia-Diaz DF, Jimenez P, Silva PI. Bioactive compounds and health benefits of exotic tropical red-black berries. *Journal of Functional Foods*. 2013;5(2):539-49.
16. Cirqueira RT, Alves MJQF. Hypotensive and diuretic effects of pitanga (*Eugenia uniflora* L.) and jambos (*Eugenia jambolana* Lam.) aqueous extracts in normotensive anesthetized rats. Efeitos hipotensivo e diurético dos extratos aquosos de pitanga (*Eugenia uniflora* L) e jambolão (*Eugenia jambolana* Lam) em ratos normotensos anestesiados. 2005;7(2):86-91.
17. Rissato SR, Almeida MVd, Silva LCd. Estudo do óleo essencial de *Eugenia uniflora* como subsídio para aplicação como fitofármaco. *Study of Eugenia uniflora essential oil for use in medicinal applications*. *Salusvita*. 23(2):209-22.
18. Lago JHG, Souza ED, Mariane B, Pascon R, Vallim MA, Martins RCC, et al. Chemical and biological evaluation of essential oils from two species of myrtaceae - *Eugenia uniflora* L. and *plinia trunciflora* (O. Berg) kausel. *Molecules*. 2011;16(12):9827-37.
19. Warjeet Singh L. Traditional medicinal plants of Manipur as anti-diabetics. *Journal of Medicinal Plants Research*. 2011;5(5):677-87.
20. Fiúza TS, Sabóia-Morais SMT, De Paula JR, Tresvenzol LMF, Pimenta FC. Evaluation of antimicrobial activity of the crude ethanol extract of *Eugenia uniflora* L. leaves. *Revista de Ciências Farmaceuticas Basica e Aplicada*. 2008;29(3):245-50.
21. Alves E. Diversidade arbórea e potencial de produção de óleo essencial de *Eugenia uniflora* L. e *Myrcia multiflora* (Lam.) dc. no município de turvo-pr: Universidade Estadual do Centro-Oeste; 2012.
22. Celli GB, Pereira-Netto AB, Beta T. Comparative analysis of total phenolic content, antioxidant activity, and flavonoids profile of fruits from two varieties of Brazilian cherry (*Eugenia uniflora* L.) throughout the fruit developmental stages. *Food Research International*. 2011;44(8):2442-51.
23. Kanazawa A, Patin A, Greene AE. Efficient, highly enantioselective synthesis of selina-1,3, 7(11)-trien-8-one, a major component of the essential oil of *Eugenia uniflora*. *J Nat Prod*. 2000;63(9):1292-4.
24. Martinez-Correa HA, Magalhães PM, Queiroga CL, Peixoto CA, Oliveira AL, Cabral FA. Extracts from pitanga (*Eugenia uniflora* L.) leaves: Influence of extraction

process on antioxidant properties and yield of phenolic compounds. *Journal of Supercritical Fluids*. 2011;55(3):998-1006.

25. Hasimoto E Souza LK, Alves De Oliveira CM, Henrique Ferri P, Costa Santos S, De Oliveira Jr JG, Borges Miranda AT, et al. Antifungal properties of Brazilian cerrado plants. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2002;33(3):247-9.

26. Schwanke RC. Avaliação da atividade anti-inflamatória do flavonoide miricitrina na colite induzida pelo sulfato sódico de dextrana (dss) em camundongo e estudo do seu perfil farmacocinético em roedores: Universidade Federal de Santa Catarina; 2012.

27. Figueirôa EDO, Nascimento Da Silva LC, De Melo CML, Neves JKDAL, Da Silva NH, Pereira VRA, et al. Evaluation of antioxidant, immunomodulatory, and cytotoxic action of fractions from *Eugenia uniflora* L. and *Eugenia malaccensis* L.: Correlation with polyphenol and flavanoid content. *The Scientific World Journal*. 2013;2013.

28. Colla ARS, MacHado DG, Bettio LEB, Colla G, Magina MDA, Brighente IMC, et al. Involvement of monoaminergic systems in the antidepressant-like effect of *Eugenia brasiliensis* Lam. (Myrtaceae) in the tail suspension test in mice. *Journal of Ethnopharmacology*. 2012;143(2):720-31.

29. Consolini AE, Sarubbio MG. Pharmacological effects of *Eugenia uniflora* (Myrtaceae) aqueous crude extract on rat's heart. *J Ethnopharmacol*. 2002;81(1):57-63.

30. Henriques AT, Sobral ME, Cauduro AD, Schapoval EES, Bassani VL, Lamaty G, et al. Aromatic plants from Brazil. II. The chemical composition of some *Eugenia* essential oils. *Journal of Essential Oil Research*. 1993;5(5):501-5.

31. Lima EdO, Farias NMP, Souza EL, Santos BHC. Propriedades antibacterianas de óleos essenciais de plantas medicinais Antibacterial properties of essential oils from medicinal plants. *Rev Bras Ciênc Saúde*. 7(3):251-8.

32. Oliveira AL, Destandau E, Fougère L, Lafosse M. Isolation by pressurised fluid extraction (PFE) and identification using CPC and HPLC/ESI/MS of phenolic compounds from Brazilian cherry seeds (*Eugenia uniflora* L.). *Food Chemistry*. 2014;145:522-9.

33. Oliveira MDL, Andrade CAS, Santos-Magalhães NS, Coelho LCBB, Teixeira JA, Carneiro-Da-Cunha MG, et al. Purification of a lectin from *Eugenia uniflora* L. seeds and its potential antibacterial activity. *Letters in Applied Microbiology*. 2008;46(3):371-6.

34. Arcanjo DDR, Albuquerque ACM, Melo-Neto B, Santana LCLR, Medeiros MGF, Cító AMGL. Bioactivity evaluation against *Artemia salina* Leach of medicinal plants used in Brazilian Northeastern folk medicine. Avaliação da bioatividade frente à *Artemia salina* Leach de plantas medicinais utilizadas na medicina popular na Região Nordeste do Brasil. 2012;72(3):505-9.

35. Pino JA, Bello A, Urquiola A, Agüero J, Marbot R. Fruit Volatiles of Cayena Cherry (*Eugenia uniflora* L.) from Cuba. *Journal of Essential Oil Research*. 2003;15(2):70-1.
36. Albertasse PD, Thomaz LD, Andrade MA. Medicinal plants and their uses in Barra do Jucu community, Vila Velha Municipality, Espírito Santo State, Brazil. *Plantas medicinais e seus usos na comunidade da Barra do Jucu, Vila Velha, ES*. 2010;12(3):250-60.
37. Costa DP, Filho EGA, Silva LMA, Santos SC, Passos XS, Do Rosário R. Silva M, et al. Influence of fruit biotypes on the chemical composition and antifungal activity of the essential oils of *Eugenia uniflora* leaves. *Journal of the Brazilian Chemical Society*. 2010;21(5):851-8.
38. Ferro E, Schinini A, Maldonado M, Rosner J, Hirschmann GS. *Eugenia uniflora* leaf extract and lipid metabolism in *Cebus apella* monkeys. *J Ethnopharmacol*. 1988;24(2-3):321-5.
39. Pizzolatti MG, Koga AH, Grisard EC, Steindel M. Trypanocidal activity of extracts from Brazilian Atlantic Rain Forest plant species. *Phytomedicine*. 2003;10(5):422-6.
40. Braatz SM. Avaliação do efeito citoprotetor do extrato bruto das folhas de *Eugenia uniflora* L. (pitanga) e de compostos bioativos isolados em células secretoras de insulina: UEPG / UNICENTRO; 2010.
41. BRASIL. Farmacopeia Brasileira. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Vol. 2. 5 ed. Brasília. 2010. 904 pp.
42. Tatiana S. Fiuza MHR, Simone M. T. Sabóia-Morais, , Maria Teresa F. Bara, Leonice M. F. Tresvenzol, José Realino de Paula. Caracterização farmacognóstica das folhas de *Eugenia uniflora* L. (Myrtaceae) *Revista Eletrônica de Farmácia* [Internet]. 2008 08 nov. 2014; Vol. V(2):[1-11 pp.].
43. Gautam R, Saklani A, Jachak SM. Indian medicinal plants as a source of antimycobacterial agents. *Journal of Ethnopharmacology*. 2007;110(2):200-34.
44. Voss-Rech D, Klein CS, Techio VH, Scheuermann GN, Rech G, Fiorentin L. Antibacterial activity of vegetal extracts against serovars of salmonella, atividade antibacteriana de extratos vegetais sobre sorovares de salmonella. *Atividade antibacteriana de extratos vegetais sobre sorovares de Salmonella*. 2011;41(2):314-20.
45. Lora J. Avaliação da toxicidade aguda do extrato hidroalcoólico de folhas de *Eugenia uniflora* L. (Myrtaceae): UNESC; 2007.
46. Einbond LS, Reynertson KA, Luo XD, Basile MJ, Kennelly EJ. Anthocyanin antioxidants from edible fruits. *Food Chemistry*. 2004;84(1):23-8.
47. Ibikunle GF, Adebajo AC, Famuyiwa FG, Aladesanmi AJ, Adewunmi CO. In-vitro evaluation of anti-trichomonal activities of *Eugenia uniflora* leaf. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*. 2011;8(2):170-6.

48. Denardin CC, Parisi MM, Martins LAM, Terra SR, Borojevic R, Vizzotto M, et al. Antiproliferative and cytotoxic effects of purple pitanga (*Eugenia uniflora* L.) extract on activated hepatic stellate cells. *Cell Biochemistry and Function*. 2014;32(1):16-23.
49. Santos KKA, RolónHe M, Vega C, de Arias AR, da Costa JGM, Coutinho HDM. Antileishmanial in vitro activity of *Eugenia uniflora* and *Momordica charantia*. Atividade leishmanicida in vitro de *Eugenia uniflora* e *Momordica charantia*. 2013;34(1):47-50.
50. Santos KKA, Matias EFF, Tintino SR, Souza CES, Braga MFBM, Guedes GMM, et al. Anti-Trypanosoma cruzi and cytotoxic activities of *Eugenia uniflora* L. *Experimental Parasitology*. 2012;131(1):130-2.
51. Bagetti M, Facco EMP, Rodrigues DB, Vizzotto M, Emanuelli T. Antioxidant capacity and composition of pitanga seeds. Capacidade antioxidante e composição de sementes de pitanga. 2009;39(8):2504-10.
52. Adewunmi CO, Agbedahunsi JM, Adebajo AC, Aladesanmi AJ, Murphy N, Wando J. Ethno-veterinary medicine: Screening of Nigerian medicinal plants for trypanocidal properties. *Journal of Ethnopharmacology*. 2001;77(1):19-24.
53. Gbolade AA, Ilesanmi OR, Aladesanmi AJ. The contractile effects of the extracts of *Eugenia uniflora* on isolated rat duodenum. *Phytotherapy Research*. 1996;10(7):613-5.
54. Santos DNE. Extração com dióxido de carbono supercrítico e estudo da composição dos extratos de sementes de pitanga (*Eugenia uniflora* L.): Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo; 2012.
55. Probst IDS. Atividade antibacteriana de óleos essenciais e avaliação de potencial sinérgico: UNESP - Universidade Estadual Paulista Júliode Mesquita Filho/Botucatu; 2012.
56. Rodrigues KADF, Amorim LV, Oliveira JMGD, Dias CN, Moraes DFC, Andrade EHDA, et al. *Eugenia uniflora* L. essential oil as a potential anti-leishmania agent: Effects on *Leishmania amazonensis* and possible mechanisms of action. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*. 2013;2013.
57. Melo RM, Corrêa VFS, Amorim ACL, Miranda ALP, Rezende CM. Identification of impact aroma compounds in *Eugenia uniflora* L. (Brazilian Pitanga) leaf essential oil. *Journal of the Brazilian Chemical Society*. 2007;18(1):179-83.
58. Chang R, de Moraes SAL, Napolitano DR, Duarte KC, Guzman VB, do Nascimento EA. A new approach for quantifying furanodiene and curzerene. A case study on the essential oils of *Eugenia uniflora* (pitangueira) leaves. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*. 2011;21(3):392-6.
59. Adewunmi CO, Agbedahunsi JM, Adebajo AC, Aladesanmi AJ, Murphy N, Wando J. Ethno-veterinary medicine: screening of Nigerian medicinal plants for trypanocidal properties. *J Ethnopharmacol*. 2001;77(1):19-24.

60. Fiuza TS, Silva PC, Paula JR, Tresvenzol LMF, Souto MED, Sabóia-Morais SMT. Tissue and cell analysis of *Oreochromis niloticus* L. gill treated with crude ethanol extract and fractions from pitanga (*Eugenia uniflora* L.) leaves - Myrtaceae. Análise tecidual e celular das brânquias de *Oreochromis niloticus* L tratadas com extrato etanólico bruto e frações das folhas da pitanga (*Eugenia uniflora* L) - Myrtaceae. 2011;13(4):389-95.
61. Silva NCC, Barbosa L, Seito LN, Fernandes Junior A. Antimicrobial activity and phytochemical analysis of crude extracts and essential oils from medicinal plants. Natural Product Research. 2012;26(16):1510-4.
62. Lima EdO, Farias NMP, Souza EL, Santos BHC. Propriedades antibacterianas de óleos essenciais de plantas medicinais. Antibacterial properties of essential oils from medicinal plants. Rev bras ciênc saúde. 7(3):251-8.
63. Adebajo AC, Oloke KJ, Aladesanmi AJ. Antimicrobial activities and microbial transformation of volatile oils of *Eugenia uniflora*. Fitoterapia. 1989;60(5):451-5.
64. Arai I, Amagaya S, Komatsu Y, Okada M, Hayashi T, Kasai M, et al. Improving effects of the extracts from *Eugenia uniflora* on hyperglycemia and hypertriglyceridemia in mice. J Ethnopharmacol. 1999;68(1-3):307-14.
65. Filho GL, De Rosso VV, Meireles MAA, Rosa PTV, Oliveira AL, Mercadante AZ, et al. Supercritical CO₂ extraction of carotenoids from pitanga fruits (*Eugenia uniflora* L.). Journal of Supercritical Fluids. 2008;46(1):33-9.
66. Lima IDO, Oliveira RDAG, Lima EDO, Farias NMP, Souza ELD. Atividade antifúngica de óleos essenciais sobre espécies de *Candida*. Antifungal activity from essential oils on *Candida* species. Rev bras farmacogn. 16(2):197-201.
67. Oliveira CB, Soares DGdS, Bomfim IPR, Drumond MRS, Paulo MdQ, Padilha WWN. Avaliação da eficácia da descontaminação de escovas dentárias pelo uso do spray de óleo essencial da *Eugenia uniflora* L. (Pitanga) Evaluation of the effectiveness of the decontamination of toothbrushes by the use of the spray of essential oil of eugenia uniflora l. (Pitanga). Ciênc odontol bras. 12(2):29-34.
68. Consolini AE, Baldini OAN, Amat AG. Pharmacological basis for the empirical use of *Eugenia uniflora* L. (Myrtaceae) as antihypertensive. Journal of Ethnopharmacology. 1999;66(1):33-9.
69. Bagetti M, Facco EMP, Piccolo J, Hirsch GE, Rodriguez-Amaya D, Kobori CN, et al. Physicochemical characterization and antioxidant capacity of pitanga fruits (*Eugenia uniflora* L.). Caracterização físico-química e capacidade antioxidante de pitangas (*Eugenia uniflora* L). 2011;31(1):147-54.
70. Santos RM, Oliveira MS, Ferri PH, Santos SC. Seasonal variation in the phenol content of *Eugenia uniflora* L. leaves. Variação sazonal nos teores de fenóis de folhas de *Eugenia uniflora* L. Rev bras plantas med. 13(1):85-9.

71. Massarioli AP, Oldoni TLC, Moreno IAM, Rocha AA, de Alencar SM. Antioxidant activity of different pitanga (*Eugenia uniflora* L.) fruit fractions. *Journal of Food, Agriculture and Environment*. 2013;11(1):288-93.
72. Gupta AD, Pundeer V, Bande G, Dhar S, Ranganath IR, Kumari GS. Evaluation of antioxidant activity of four folk antidiabetic medicinal plants of India. *Pharmacologyonline*. 2009;1:200-8.
73. Luize PS, Tiuman TS, Morello LG, Maza PK, Ueda-Nakamura T, Dias Filho BP, et al. Effects of medicinal plant extracts on growth of *Leishmania (L.) amazonensis* and *Trypanosoma cruzi*. *Revista Brasileira de Ciencias Farmaceuticas/Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2005;41(1):85-94.
74. Braga FG, Bouzada MLM, Fabri RL, de O. Matos M, Moreira FO, Scio E, et al. Antileishmanial and antifungal activity of plants used in traditional medicine in Brazil. *Journal of Ethnopharmacology*. 2007;111(2):396-402.
75. Alice CB, Vargas VM, Silva GA, de Siqueira NC, Schapoval EE, Gleye J, et al. Screening of plants used in south Brazilian folk medicine. *J Ethnopharmacol*. 1991;35(2):165-71.
76. Figueiroa Ede O, Nascimento da Silva LC, de Melo CM, Neves JK, da Silva NH, Pereira VR, et al. Evaluation of antioxidant, immunomodulatory, and cytotoxic action of fractions from *Eugenia uniflora* L. and *Eugenia malaccensis* L.: correlation with polyphenol and flavanoid content. *ScientificWorldJournal*. 2013:125027.
77. Da Silva LMR, De Figueiredo EAT, Ricardo NMPS, Vieira IGP, De Figueiredo RW, Brasil IM, et al. Quantification of bioactive compounds in pulps and by-products of tropical fruits from Brazil. *Food Chemistry*. 2014;143:398-404.
78. Victoria FN, Anversa RG, Savegnago L, Lenardão EJ. Essential oils of *E. uniflora* leaves protect liver injury induced by acetaminophen. *Food Bioscience*. 2013;4:50-7.
79. Ogunwande IA, Olawore NO, Ekundayo O, Walker TM, Schmidt JM, Setzer WN. Studies on the essential oils composition, antibacterial and cytotoxicity of *Eugenia uniflora* L. *International Journal of Aromatherapy*. 2005;15(3):147-52.
80. Costa DP, Santos SC, Seraphin JC, Ferri PH. Seasonal variability of essential oils of *Eugenia uniflora* leaves. *Journal of the Brazilian Chemical Society*. 2009;20(7):1287-93.
81. De Moraes SM, Craveiro AA, Machado MIL, Alencar JW, Matos FJA. Volatile constituents of *Eugenia uniflora* leaf oil from northeastern Brazil. *Journal of Essential Oil Research*. 1996;8(4):449-51.
82. Schmeda-Hirschmann G, Theoduloz C, Franco L, Ferro B E, De Arias AR. Preliminary pharmacological studies on *Eugenia uniflora* leaves: Xanthine oxidase inhibitory activity. *Journal of Ethnopharmacology*. 1987;21(2):183-6.

83. Cirqueira RT. Efeitos dos extratos aquosos de jambolão (*Eugenia jambolana* Lamark) e pitanga (*Eugenia uniflora* Linnaeus) sobre os parâmetros renais e a pressão arterial em ratos wistar: USP/RP; 2006.
84. Jovito VDC, Almeida LDFDd, Ferreira DADH, Moura D, Paulo MDQ, Padilha WVN. Avaliação in vivo de dentifrício contendo extrato da *Eugenia uniflora* L. (Pitanga) sobre indicadores de saúde bucal; In vivo evaluation of a dentifrice containing *Eugenia uniflora* L. extract, on the oral health indicators. *Pesqui bras odontopediatria clin integr.*9(1).
85. Alves LA, Freires IdA, Castro RDd. Efeito Antibacteriano de Óleos Essenciais sobre Bactérias Formadoras do Biofilme DentárioAntibacterial Effect of Essential Oils on Biofilm-forming Bacterial. *Rev bras ciênc saúde.*14(2).
86. Santos RM, Oliveira MS, Ferri PH, Santos SC. Seasonal variation in the phenol content of *Eugenia uniflora* L. leaves. *Varição sazonal nos teores de fenóis de folhas de Eugenia uniflora L.* 2011;13(1):85-9.
87. De Barros FMC, Pereira KN, Zanetti GD, Heinzmann BM. Medicinal plants used by people from São Luiz Gonzaga, RS, Brazil. *Plantas de uso medicinal no Município de São Luiz Gonzaga, RS, Brasil.* 2007;26(5):652-62.
88. Schapoval EES, Silveira SM, Miranda ML, Alice CB, Henriques AT. Evaluation of some pharmacological activities of *Eugenia uniflora* L. *Journal of Ethnopharmacology.* 1994;44(3):137-42.
89. Amat AG, Yajia ME, Gonzalez CF, Lorca GL, Sanchez Gonzalez F, Riglos AG, et al. Evaluation of cytological parameters induced by aqueous extracts of seven plants used as antihypertensive agents in Argentine folk medicine. *Acta Farmaceutica Bonaerense.* 2002;21(1):37-42.
90. Alves LA, Freires IdA, Castro RDd. Efeito Antibacteriano de Óleos Essenciais sobre Bactérias Formadoras do Biofilme DentárioAntibacterial Effect of Essential Oils on Biofilm-forming Bacterial. *Rev bras ciênc saúde.*14(2).
91. Holetz FB, Pessini GL, Sanches NR, Cortez DAG, Nakamura CV, Dias Filho BP. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz.* 2002;97(7):1027-31.
92. De Medeiros PM, Ladio AH, Albuquerque UP. Patterns of medicinal plant use by inhabitants of Brazilian urban and rural areas: A macroscale investigation based on available literature. *Journal of Ethnopharmacology.* 2013;150(2):729-46.
93. Sá LDD, Xavier Filho L, Paulo MdQ, Lima EdO. Estudo sobre a atividade antimicrobiana de extratos vegetais sobre bactérias causadoras de conjuntivite; Study on the use of vegetal extracts on therapy of conjunctivitis caused by bacteria. *CCS.*13(1):13-7.
94. Akah PA, Okoli CO, Nwafor SV. Phytotherapy in the management of diabetes mellitus. *Journal of Natural Remedies.* 2002;2(1):1-10.

95. Umemiya Y, Yumita N, Iimura M, Momose Y. Effects of extracts from nangapiry (*Eugenis Uniflora* L.) on obesity and fatty metabolism in rats. *Pharmacometrics*. 2009;76(3-4):79-83.
96. BRASIL - Resolução - RDC Nº 10, de 09 de março de 2010. Dispõe sobre a notificação de drogas vegetais junto à Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e dá outras providências. In: ANVISA, editor. 2010.
97. BRASIL. Instrução Normativa número 02, de 13 de Maio de 2014. Publica a “Lista de medicamentos fitoterápicos de registro simplificado” e a “Lista de produtos tradicionais fitoterápicos de registro simplificado”. In: ANVISA, editor. 2014.
98. Santos RM, Fortes GAC, Ferri PH, Santos SC. Influence of foliar nutrients on phenol levels in leaves of *Eugenia uniflora*. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*. 2011;21(4):581-6.
99. Lima EdO, Farias NMPd. Atividade antifúngica de óleos essenciais, obtidos de plantas medicinais, contra leveduras do gênero *Candida*; Antifungal activity of essential oils, obtained of medicinal plants, against yeasts of he gender *Candida*. *Rev bras ciênc saãde*.3(1/3):51-64.
100. de Castro RD, Lima EO. Screening of essential oils antifungal activity on *Candida* strains. *Screening da atividade antifúngica de óleos essenciais sobre cepas de Candida*. 2011;11(3):341-5.
101. de Souza Prestes L, Damé Schuch LF, Hörnke Alves G, Ziemann dos Santos MA, Alves Rodrigues MR, Araújo Meireles MC. Evaluación de la actividad bactericida de aceites esenciales de hojas de guayabo, pitango y arazá; Evaluation of the bactericidal action of essential oils from guava, Surinam cherry and strawberry guava. *Rev cuba plantas med*.16(4):324-30.
102. Lopes MM. Composição química, atividade antibacteriana e alelopática dos óleos essenciais de *Eugenia uniflora* L. e *Myrciaria glazioviana* (Kiaersk) G. M. Barroso & Sobral (Myrtaceae): UFV; 2008.
103. Weig M, Brown AJ. Genomics and the development of new diagnostics and anti-*Candida* drugs. *Trends Microbiol*. 2007;15(7):310-7.
104. O'Reilly-Wapstra JM, Potts BM, McArthur C, Davies NW. Effects of nutrient variability on the genetic-based resistance of *Eucalyptus globulus* to a mammalian herbivore and on plant defensive chemistry. *Oecologia*. 2005;142(4):597-605.
105. Zarai Z, Kadri A, Ben Chobba I, Ben Mansour R, Bekir A, Mejdoub H, et al. The in-vitro evaluation of antibacterial, antifungal and cytotoxic properties of *Marrubium vulgare* L. essential oil grown in Tunisia. *Lipids Health Dis*. 2011;10:161.
106. Tyagi AK, Malik A. Liquid and vapour-phase antifungal activities of selected essential oils against *Candida albicans*: microscopic observations and chemical characterization of *Cymbopogon citratus*. *BMC Complement Altern Med*. 2010;10:65.

107. Béjaoui A, Chaabane H, Jemli M, Boulila A, Boussaid M. Essential oil composition and antibacterial activity of *Origanum vulgare* subsp. glandulosum Desf. at different phenological stages. *J Med Food*. 2013;16(12):1115-20.
108. Correa-Royero J, Tangarife V, Durán C, Stashenko E, Mesa-Arango A. In vitro antifungal activity and cytotoxic effect of essential oils and extracts of medicinal and aromatic plants against *Candida krusei* and *Aspergillus fumigatus*. Atividade antifúngica in vitro e os efeitos citotóxicos de óleos essenciais e extratos de plantas medicinais e aromáticas contra *Candida krusei* e *Aspergillus fumigatus*. 2010;20(5):734-41.
109. Santos KKA, Matias EFF, Tintino SR, Souza CES, Braga MFBM, Guedes GMM, et al. Enhancement of the antifungal activity of antimicrobial drugs by *Eugenia uniflora* L. *Journal of Medicinal Food*. 2013;16(7):669-71.
110. Coutinho HDM, Costa JGM, Falcão-Silva VS, Siqueira-Júnior JP, Lima EO. Potentiation of antibiotic activity by eugenia uniflora and eugenia jambolanum. *Journal of Medicinal Food*. 2010;13(4):1024-6.
111. Coutinho H, Costa J, Falcão-Silva V, Siqueira-Júnior J, Lima E. Fruits to potentiate the antibiotic activity: The effect of *Eugenia uniflora* and *Eugenia jambolanum* L. against MRSA. *Acta Alimentaria*. 2012;41(1):67-72.
112. Pérez C, Anesini C. In vitro antibacterial activity of Argentine folk medicinal plants against *Salmonella typhi*. *J Ethnopharmacol*. 1994;44(1):41-6.
113. Fadeyi MO, Akpan UE. Antibacterial activities of the leaf extracts of *Eugenia uniflora* Linn. (synonym *Stenocalyx michelli* Linn.) Myrtaceae. *Phytotherapy Research*. 1989;3(4):154-5.
114. Coelho De Souza G, Haas APS, Von Poser GL, Schapoval EES, Elisabetsky E. Ethnopharmacological studies of antimicrobial remedies in the south of Brazil. *Journal of Ethnopharmacology*. 2004;90(1):135-43.
115. Adebajo AC, Oloke KJ, Aladesanmi AJ. Antimicrobial activity of the leaf extract of *Eugenia uniflora*. *Phytotherapy Research*. 1989;3(6):258-9.
116. Zambuzzi-Carvalho PF, Tomazett PK, Santos SC, Ferri PH, Borges CL, Martins WS, et al. Transcriptional profile of Paracoccidioides induced by oenothien B, a potential antifungal agent from the Brazilian Cerrado plant *Eugenia uniflora*. *BMC Microbiology*. 2013:227.
117. Victoria FN, Lenardão EJ, Savegnago L, Perin G, Jacob RG, Alves D, et al. Essential oil of the leaves of *Eugenia uniflora* L.: Antioxidant and antimicrobial properties. *Food and Chemical Toxicology*. 2012;50(8):2668-74.
118. Victoria FN, de Siqueira Brahm A, Savegnago L, Lenardão EJ. Involvement of serotonergic and adrenergic systems on the antidepressant-like effect of *E. uniflora* L. leaves essential oil and further analysis of its antioxidant activity. *Neuroscience Letters*. 2013;544:105-9.

119. Folarin OM, Akinhanmi TF. Antioxidant activity of essential oils of some aromatic plants. *Biosciences Biotechnology Research Asia*. 2006;3(1 A):87-90.
120. Kade IJ, Ibukun EO, Nogueira CW, da Rocha JB. Sun-drying diminishes the antioxidative potentials of leaves of *Eugenia uniflora* against formation of thiobarbituric acid reactive substances induced in homogenates of rat brain and liver. *Exp Toxicol Pathol*. 2008;60(4-5):365-71.
121. Velazquez E, Tournier HA, Mordujovich de Buschiazso P, Saavedra G, Schinella GR. Antioxidant activity of Paraguayan plant extracts. *Fitoterapia*. 2003;74(1-2):91-7.
122. Barbieri Holetz F, Ueda-Nakamura T, Dias Filho BP, Garcia Cortez DA, Palazzo Mello JC, Vataru Nakamura C. Effect of plant extracts used in folk medicine on cell growth and differentiation of *Herpetomonas samuelpessoai* (kinetoplastida, trypanosomatidae) cultivated in defined medium. *Acta Scientiarum - Biological and Health Sciences*. 2002;24(3):657-62.
123. Morais SM, Lima KSB, Siqueira SMC, Cavalcanti ESB, Souza MST, Menezes JESA, et al. Correlation between the anti-radical, anti-acetylcholinesterase activities and phenolic content of some extracts of live herbal pharmacies in the northeast of Brazil. *Correlação entre as atividades antiradical, antiacetilcolinesterase e teor de fenóis totais de extratos de plantas medicinais de farmácias vivas*. 2013;15(4):575-82.
124. Lee MH, Chiou JF, Yen KY, Yang LL. EBV DNA polymerase inhibition of tannins from *Eugenia uniflora*. *Cancer Lett*. 2000;154(2):131-6.
125. Morioka K, Nojima H, Kurosaki E, Arisawa M, Kuraishi Y, Momose Y. Hypotensive action of Nangapiry, a Paraguayan natural medicine, in rodents. *Phytomedicine*. 2000;7(2):99-103.
126. Amorim ACL, Lima CKF, Hovell AMC, Miranda ALP, Rezende CM. Antinociceptive and hypothermic evaluation of the leaf essential oil and isolated terpenoids from *Eugenia uniflora* L. (Brazilian Pitanga). *Phytomedicine*. 2009;16(10):923-8.
127. Colla AR, Machado DG, Bettio LE, Colla G, Magina MD, Brighente IM, et al. Involvement of monoaminergic systems in the antidepressant-like effect of *Eugenia brasiliensis* Lam. (Myrtaceae) in the tail suspension test in mice. *J Ethnopharmacol*. 143(2):720-31.
128. Kim JD, Leyva S, Diano S. Hormonal regulation of the hypothalamic melanocortin system. *Front Physiol*. 2014;5:480.
129. Wabitsch M, Funcke J, Lennerz B, Kuhnle-Krahl U, Lahr G, Debatin K, et al. Biologically Inactive Leptin and Early-Onset Extreme Obesity. *N Engl J Med*. 2015;372(1):48-54.

130. Wazlawik E, Da Silva MA, Peters RR, Correia JFG, Farias MR, Calixto JB, et al. Analysis of the role of nitric oxide in the relaxant effect of the crude extract and fractions from *Eugenia uniflora* in the rat thoracic aorta. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 1997;49(4):433-7.

131. Alonso JR. *Tratado de fitofármacos y nutraceuticos*. Rosarios (Argentina): Ed. Corpus; 1350 pp, 2004.