

Evaluation of antimicrobial, hypotensive and diuretic effect of *Eugenia uniflora* extracts

Joyce Marinho de Souza*
Marcus Vinicius Pimenta Rodrigues*
Renata Tardivo Cirqueira**
Maria José Queiroz de Freitas Alves***
Eliana Peresi Lordelo*
Caio Ferreira de Oliveira*
Rosemeire Cristina Linhari Rodrigues Pietro***

269

Evaluation of antimicrobial, hypotensive and diuretic effect of *Eugenia uniflora* extracts
O Mundo da Saúde, São Paulo - 2018;42(2):269-282

Abstract

The genus *Eugenia* sp. (Myrtaceae) comprises plants with reported antioxidant and antidiarrheal capability among other therapeutic potentials. The aim of this study was to evaluate the antimicrobial activity of essential oil; diuretic and hypotensive activities of aqueous extracts from leaves of *Eugenia uniflora*. The antimicrobial activity was evaluated. The diuretic and hypotensive activities were evaluated in normotensive Wistar rats by measuring blood pressure and urine flow after received four different concentrations of aqueous extracts (10%, 15%, 20% and 25%). Essential oil inhibited the growth of *Candida parapsilosis* and *Candida albicans* with MIC values lower than 14.41 mg/mL, equal to 57.75 mg/mL for *Candida krusei*. Among antibacterial effect, essential oil inhibited growth with a MIC equals to 153.93 mg/mL for all strains tested, except for *Escherichia coli* (MIC equals to 307.96 mg/mL). Aqueous extracts showed powerful reductions of the arterial pressure (34% and 31% lower than the control), after administration of 10% and 25% of aqueous extract, respectively. However, the animals that received the aqueous extract at the 15% and 20% concentrations presented a discrete hypotensive effect (20% and 21% lower than control group, respectively) concomitantly to powerful diuretic effect (280% and 91% higher than control group, respectively). These data confirmed the potential biological effect of this species, and represents an important step toward a depth study on the therapeutic properties of this species.

Keywords: *Eugenia uniflora*, aqueous extracts, essential oil, antimicrobial effect, diuretic effect, hypotensive potential, *in vitro* activity, *in vitro* assay.

INTRODUCTION

The genus *Eugenia* sp. (Myrtaceae) comprises 14 species, including *Eugenia uniflora* Linn. The main chemical constituents present in these plants are triterpenes, tannins, phenolic acids and, rarely, esters, since glycosides and alkaloids. Phytochemical studies of essential oils extracted from leaves of *Eugenia neonitida* and *Eugenia rotundifolia* showed that both species had mainly hydrocarbons and cyclic alcohols; *E. neonitida* presented, in addition, significant amounts of sesquiterpenes in its composition, and *E. rotundifolia* monoterpenes¹. Specific constituents found in *E. uniflora* are flavonoids, sesquiterpenes, anthocyanin, and saponins. It is

well known that the composition of the essential oil in fruits and leaves varies qualitatively and quantitatively, depending on the time of harvest, season and stage of maturity²⁻³.

Commonly known as pitanga, *E. uniflora* is native to Brazil, and it is well dispersed across the country as well as beyond borders to Uruguay and Argentina. This species has been used for different therapeutic purposes. Several biological and clinical effects associated with this plant have been reported, including: antifungal activity, antidiarrheal, anti-inflammatory, antihypertensive, and diuretic, hyperglycemia. and hypertriglyceridemia,

DOI: 10.15343/0104-7809.20184202269282

* Department of Biomedicine, University of Western São Paulo – UNOESTE, Presidente Prudente, SP, Brazil.

** Department of Morphology and Pathology, Center of Biological and Health Sciences, Federal University of São Carlos – UFSCar, São Carlos, SP, Brazil

*** Department of Physiology, Institute of Biosciences, São Paulo State University “Julio de Mesquita Filho” – UNESP, Botucatu, SP, Brazil

E-mail: marcusvinicius@unoeste.br

inhibitor of DNA polymerase, trypanocidal, antioxidant potential, and anti-Leishmania activity⁴⁻¹².

In the present research, were performed *in vitro* and *in vivo* combined experiments with extracts from leaves of *Eugenia uniflora*, in order to evaluate its essential oil (EO) antimicrobial activities (*in vitro*), and to evaluate the aqueous extract (AE) diuretic and hypotensive activity (*in vivo*). The aim of this study is to contribute to the improvement of knowledge about the activity of extracts from leaves of this species, aiming the possibility of future use of its compounds in several purposes.

MATERIAL AND METHODS

Plant Material: *Eugenia uniflora* specimens were collected from the garden of the Faculty of Philosophy, Sciences and Letters of Ribeirão Preto, University of São Paulo-USP FFCLRP during June (winter), and identified by Dra. Silvana Aparecida Pires Godoy (Department of Biology- USP FFCLRP) as voucher specimen 7.240. The leaves were submitted to dry at room temperature, then ground and weighed.

Plant extraction and essential oil production: The extraction of the essential oil was carried out by using the hydro distillation technique¹³, as described: 100 g of leaves and 250 mL of water were placed in a 500 mL kitasato and heated to boiling. The steam was led through a 75 cm coil type condenser with 75 cm and the oil was separated with the aid of a 500 mL separation funnel. The density of the essential oil was 0,924g/mL.

Ethnopharmacological information has suggested that the aqueous extracts (AE) of *E. uniflora* leaves (voucher specimen 7.240) should be prepared by the method of decoction¹⁴. In order to prepare the aqueous extracts at the 10%, 15%, 20% and 25% concentrations, plant samples of 1.0, 1.5, 2.0, and 2.5 g, respectively, were boiled in 10 mL of distilled water.

The plant material was kept in contact with distilled water up to its boiling point¹⁵. Immediately after reaching the boiling temperature, solutions were removed from

heat and their respective vials were capped and cooled at room temperature. AE were used immediately after preparation.

Antimicrobial activity: Bacterial strains use were *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 27853), and the yeasts strains included *Candida albicans* (ATCC 90028), *Candida krusei* (ATCC 6258) and *Candida parapsilosis* (ATCC 22019). The antimicrobial activity was evaluated by determination of the minimal inhibitory concentration (MIC) and minimal bactericidal concentration (MBC) for bacteria strains and minimal fungicidal concentration (MFC) for yeasts.

The method of microdilution in microtiter plates was used to determine the minimum inhibitory concentration (MIC) according to Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) reference method M7-A with modifications for bacteria¹⁶, and M27-A3 with modifications for yeast¹⁷. To perform MIC determination a colony of each bacteria strain was inoculated into BHI (brain heart infusion) broth and incubated at 37°C for 24h. From this inoculum, the turbidity was adjusted in 2.5 mL of saline until 0.5 McFarland scale (approximately 1,5x10⁸ CFU/ml).

On a plate containing an inoculum of 1.0 x 10⁶ mL bacterial cells diluted in BHI, 100 µL *E. uniflora* oil was added and then incubated at 37°C for 24h. The MIC determination was carried out by adding 10 µL of the dye 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC), which shows the presence of cellular metabolism by changing color. The MBC (minimum bactericidal concentration) was then performed with the aid of a Petri dish containing Mueller Hinton Agar culture medium; the assay was done incubating for 24h at 37°C, followed by visual reading.

For MFC determination of the essential oil against yeasts, the microdilution technique was employed¹⁸ as follows: isolated colonies of yeasts grown in Sabouraud agar for 24h at 35°C were suspended in saline solution and RPMI liquid plus 2% glucose in MOPS buffer(morpholinopropanesulfonic acid) 0.165M, respectively, so that the final

concentration on the inoculum plate was 0.5 to 2.5×10^4 cells/mL.

The antifungal analysis was performed by using the microdilution method on a 96 well plate, where 100 μ L of RPMI culture were placed. The visual reading of growth inhibition was done after incubation for 24h at 35°C under stirring, after adding the dye named 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC)¹⁹. From each well, an aliquot was removed and transferred to Petri dishes containing Sabouraud Agar, which was lately incubated for 24h at 35°C for subsequent reading and determination of the minimum fungicidal concentration (MFC). For the percentage calculation of MIC, MBC and MFC, the density of the essential oil in 0,924g/mL.

Diuretic and hypotensive activity measurements: The experimental protocol employed, as demonstrated^{20,21}, was approved by the local Committee of Ethics in Research (process number 013/05). The diuretic and hypotensive activities of the AE were evaluated in normotensive male Wistar rats, weighing 180 ± 32 g.

These animals were submitted to a period of three days for complete adaptation to the bioterium, receiving water and balanced feed ad libitum. After this period, the animals were anesthetized (Hypnol 3%), subjected to tracheotomy, followed by: a) cannulation of the left carotid artery for measuring blood pressure (AP) via a mercury manometer every 15min; and b) urinary bladder to measure the urine flow (V).

The experiments were divided into four phases of 30 min: basal (Ba) and experimental (E1, E2 and E3). Ba point AP was found through the mean of three measurements at 0min, 15min and 30min of stage Ba. After the step Ba, animals received intragastrically (by gavage) 1 mL of distilled water (control group: C) or 1 mL of AE (experimental groups: P10%, P15%, P20% and P25%).

During the experimental phase, determinations were made at 15min, 30min, 45min, 60min, 75min and 90min. The evaluated results were represented by the average between 15 and 30min (E1), 45 and 60min (E2), and 75 and 90min (E3). The basal (Ba) of AP and V values were compared with

those obtained at the experimental phases (E1, E2, E3) within the same group.

These values were normally distributed (normality test, $p < 0.10$) and showed homogeneity of variance, and have been analyzed by using parametric tests - analysis of variance for repeated measures and Tukey post-test performed by using the SASR software²². Data were expressed as mean \pm standard deviation and confidence limit set at $p < 0.05$.

RESULTS

Results from the present research showed that the essential oil of *E. uniflora*, with a density of 0.924g/mL, inhibited the growth of *C. albicans*, and *C. parapsilosis* with MIC values lower than 14.41mg/mL (1.56%) while for *C. krusei* growth inhibition occurred with MIC at 57.75mg/mL (6.25%) level (Table 1).

As well as the oil extracted from *E. uniflora* leaves inhibited growth of all bacteria with MIC of 153.93mg/mL (16.66%) except *E. coli* that showed a MIC of 307.96mg/mL (33.33%) (Table 2). The MBCs were equal to and greater than 307.96mg/mL for all strains.

In this study, in vivo experiments demonstrated the hypotensive activity of the AE extracted from *E. uniflora* leaves (Table 3 and Figure 1).

In group C the AP values after administration of distilled water were not statistically different from AP basal ($p > 0.05$). However, after the administration of the AE a hypotensive effect was evident. Table 2 shows that 60 min after administration of the AE at 10% concentration, the AP values decreased by 25% compared to baseline, and then reached the lowest level at the end of the experiment at 34% compared to baseline.

In animals treated with the AE at 15% and 20% concentration there was also a hypotensive effect, in comparison to AP basal around 17% and 18% at 60 min, respectively, decreasing of 20% and 21% at 90min, respectively. Animals treated with higher levels (AE 25%) showed a more intense fall in AP, decreasing by 22% at 60min reaching 31% at 90min, compared do AP baseline.

Table 1 – Determination of Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Fungicidal Concentration (MFC) of essential oil extracted from *Eugenia uniflora* leaves against yeasts in Ribeirão Preto - SP. 2016.

| Microorganisms | Oil(mg/mL) | | Fluconazole (µg/mL) | |
|------------------------|------------|--------|---------------------|------|
| | MIC | MFC | MIC | MFC |
| <i>C. albicans</i> | <14.41 | <14.41 | 1.0 | 1.0 |
| <i>C. krusei</i> | 57.75 | 57.75 | 16.0 | 16.0 |
| <i>C. parapsilosis</i> | <14.41 | <14.41 | 2.0 | 2.0 |

Table 2 – Determination of Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Bactericidal Concentration (MBC) of essential oil extracted from *Eugenia uniflora* leaves on the bacteria evaluated in Ribeirão Preto - SP. 2016.

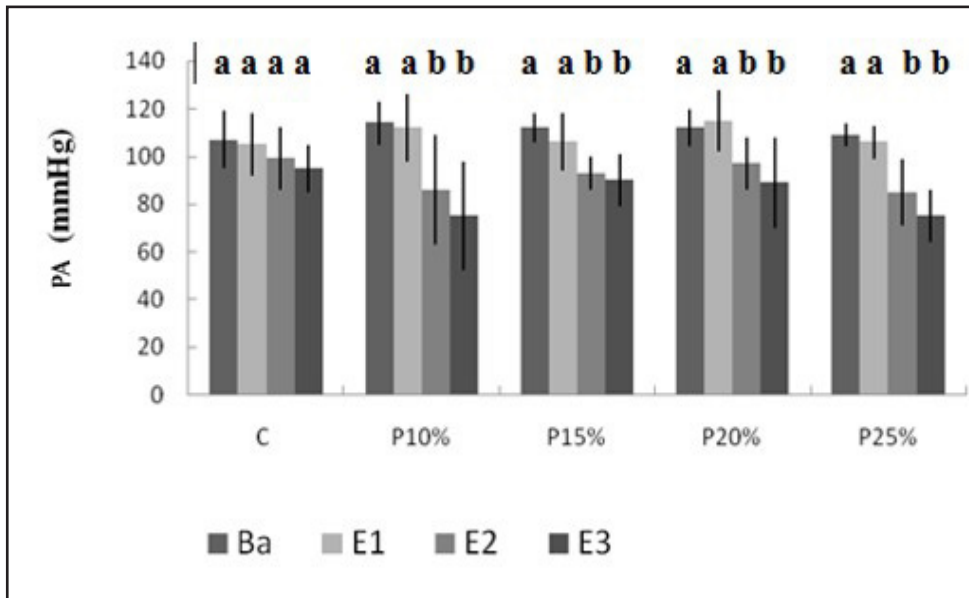
| Microorganisms | Oil (mg/mL) | | Ampicillin (µg/mL) | | Sulfamethoxazole (µg/mL) | |
|-----------------------|-------------|---------|--------------------|------|--------------------------|------|
| | MIC | MBC | MIC | MBC | MIC | MBC |
| <i>S. epidermidis</i> | 153.93 | 307.96 | 0.26 | 0.26 | Nt | Nt |
| <i>S. aureus</i> | 153.93 | >307.96 | 0.26 | 0.26 | Nt | Nt |
| <i>P. aeruginosa</i> | 153.93 | >307.96 | Nt | Nt | 4.16 | 8.33 |
| <i>E. coli</i> | 307.96 | >307.96 | Nt | Nt | 8.33 | 8.33 |

*Nt: not tested

Table 3 – Blood pressure in mmHg (AP) baseline (Ba) and after 30min (E1), 60min (E2) and 90min (E3) of distilled water administration (C) or aqueous extract (AE) from *E. uniflora* leaves at 10%, 15%, 20% and 25% concentrations in Ribeirão Preto - SP. 2016.

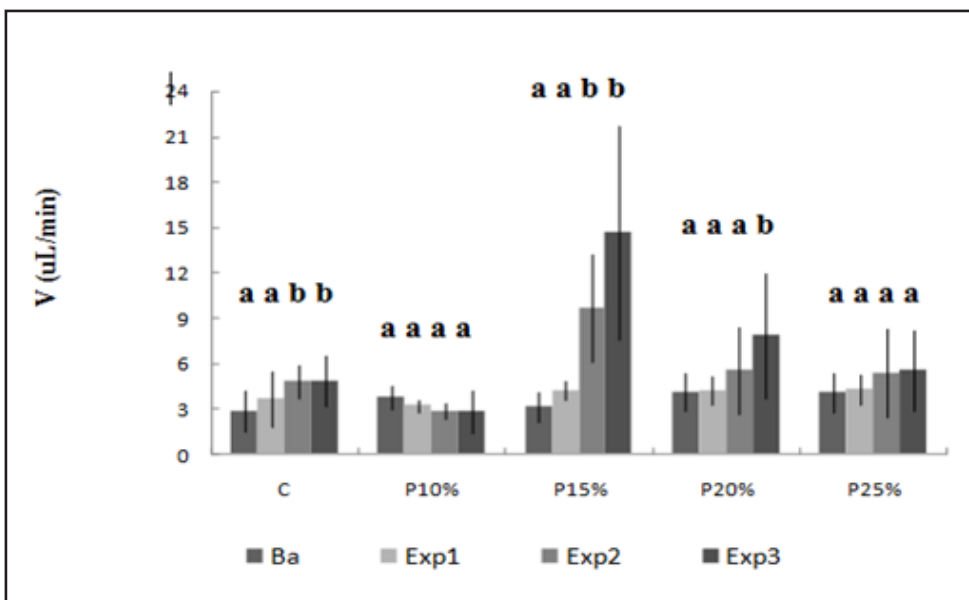
| Group | Basal | E1 | E2 | E3 |
|-------|------------|------------|------------|------------|
| C | 107 ± 12.4 | 105 ± 12.5 | 99 ± 12.6 | 95 ± 10.2 |
| P10% | 114 ± 8.7 | 112 ± 13.8 | 86 ± 22.8* | 75 ± 23.2* |
| P15% | 112 ± 5.6 | 106 ± 12.3 | 93 ± 6.8* | 90 ± 10.7* |
| P20% | 112 ± 8.5 | 115 ± 13.2 | 97 ± 10.6* | 89 ± 19.3* |
| P25% | 109 ± 4.4 | 106 ± 7.2 | 85 ± 14.0* | 75 ± 11.2* |

Within the same group, different letters indicate statistical significance (p <0.05). Data were expressed as mean ± standard deviation and confidence limit set at p<0.05. n=7.



Within the same group, different letters indicate statistical significance ($p < 0.05$). Data were expressed as mean \pm standard deviation and confidence limit set at $p < 0.05$.

Figure 1 – Blood pressure in mmHg (AP) baseline (Ba) and after 30min (E1), 60min (E2) and 90min (E3) of administration of distilled water (C) or aqueous extract (AE) from *E. uniflora* leaves at 10%, 15%, 20% and 25% concentrations in Ribeirão Preto - SP. 2016.



Within the same group, different letters indicate statistical significance ($p < 0.05$). Data were expressed as mean \pm standard deviation and confidence limit set at $p < 0.05$.

Figure 2 – Urinary flow in $\mu\text{L}/\text{min}$ (V) baseline (Ba) and after 30min (Exp1), 60min (Exp2) and 90min (Exp3) of administration of distilled water (C) or aqueous extract (AE) from *E. uniflora* leaves at 10%, 15%, 20% and 25% concentrations in Ribeirão Preto - SP. 2016.

DISCUSSION

Results from this study show that the *Eugenia uniflora* present diuretic and hypotensor effect as antibacterial and antifungal capacity. Phytochemical composition of *E. uniflora*, with ethyl acetate, quercetin and myricetin flavonoids, two hydrolysable tannins and macrocyclic compounds and phenolic eugeniflorins D1 and D2 have been previously detected in leaves is related to its effects¹⁹.

Brazilian flora is quite abundant in natural diuretics compounds and often the action mechanism that promotes such effect is unknown. Plants that alter the body hemodynamic promoting vasodilatation are potentially species with diuretic effect because they can reduce the strength of the afferent arteriole leading to an increase in hydrostatic pressure within the glomerular capillary (PGC). This increase of PGC boosts the effective pressure filtration, the glomerular filtration rate and consequently the urine flow. The diuretic and hypotensive activities of the aqueous extract from leaves of *E. uniflora*, may be related to the reduction in blood pressure has initiated reductions in renal blood flow and/or glomerular filtration. This fact can explain the absence of the diuretic effect, as expected a reduction in compensatory diuresis in order to attempt to regulate blood pressure. Moreover, the kidney is a major effector organ in maintaining the control on the blood pressure due to the excretion of salt and water and is highly dependent on renal perfusion hemodynamics body^{23,24}.

We identified inhibition of growth by means of MIC provided by treatment of strains with essential oil extracted from *E. uniflora*. The MBCs values corroborated to results obtained by previous study about bactericidal activity of essential oils from leaves of *E. uniflora* against *S. aureus* and *E. coli*²⁵. Leaves inhibited growth of *S. epidermidis*, *S. aureus* and *P. aeruginosa* with MIC of 16.66%, except for *E. coli* that showed a MIC of 33.33%. In a study evaluating the antimicrobial and antioxidant capacity of *Eugenia anomala* extracts showed no effect against *Escherichia coli* and *Listeria*

*monocytogenes*²⁶.

A study of the variation in antimicrobial activity by evaluating essential oils extracted from leaves and fruits of *E. uniflora*, harvested at different maturation stages, according to the authors, the results for *Proteus vulgaris*, *P. aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *C. albicans*, and *Trichophyton menthagrophytes* varied depending on the time of the day and season of the year in which the plant was harvested²⁷⁻²⁹.

The authors noted that these differences should be considered in the optimization of the antimicrobial activity of *E. uniflora*. Pointed out that most samples were inactive against *Staphylococcus aureus*, *Yersinia enterocolitica* and *Serratia marcescens*. In another report, *P. aeruginosa* bacteria was more sensitive, while *T. menthagrophytes* was the most sensitive fungi²⁷.

Antimicrobial capacity of *E. uniflora* can be explained by the presence of phenolic and other compounds in extracts, as it can destroy the bacterial wall, allowing its entry into cells directly affecting its metabolism³⁰. Facing that, other studies testing extract of *E. uniflora* collected in different period of the year could support and consolidate the best time to prepare the extract.

CONCLUSION

The present results show the importance of the *E. uniflora*, since the evaluation of data of their antimicrobial activity reinforces a potential antibacterial and antifungal effects obtained with essential oil extracted from its leaves against certain bacteria and may represent a source of active ingredients for *Candida* sp.

In addition, diuretic and hypotensive activities of aqueous extracts of *E. uniflora* demonstrated the interdependence between the function and renal hemodynamics, through the balance between these effects observed in animals depending on the concentration administered. However, further studies are needed to detail the mechanisms of these pharmacological data.

REFERENCES

1. Defaveri, A. C. A. et al. *Eugenia neonitida* sobral and *Eugenia rotundifolia* casar. (myrtaceae) essential oils: Composition, seasonality influence, antioxidant activity and leaf histochemistry. *J. Braz. Chem. Soc.* 22, 1531–1538 (2011).
2. Auricchio, M. T. & Bacchi, E. M. *Eugenia uniflora* L. “brazilian cherry” leaves: pharmacobotanical, chemical and pharmacological properties. *Ma. Rev. Inst. Adolfo Lutz* 62, 55–61 (2003).
3. Schmeda-Hirschmann, G., Theoduloz, C., Franco, L., Ferro B, E. & De Arias, A. R. Preliminary pharmacological studies on *Eugenia uniflora* leaves: Xanthine oxidase inhibitory activity. *J. Ethnopharmacol.* 21, 183–186 (1987).
4. Lima, E. O., Gompertz, O. F., Giesbrecht, A. M. & Paulo, M. Q. In vitro antifungal activity of essential oils obtained from official plants against dermatophytes. *Mycoses* 36, 333–336 (1993).
5. Oliveira, A. L., Lopes, R. B., Cabral, F. A. & Eberlin, M. N. Volatile compounds from pitanga fruit (*Eugenia uniflora* L.). *Food Chem.* 99, 1–5 (2006).
6. Almeida, C. E., Karnikowski, M. G. O., Foletto, R. & Baldisserotto, B. Analysis of antidiarrhoeic effect of plants used in popular medicine. *Rev. Saude Publica* 29, 428–433 (1995).
7. Consolini, A. E., Baldini, O. A. N. & Amat, A. G. Pharmacological basis for the empirical use of *Eugenia uniflora* L. (Myrtaceae) as antihypertensive. *J. Ethnopharmacol.* 66, 33–39 (1999).
8. Arai, I. et al. Improving effects of the extracts from *Eugenia uniflora* on hyperglycemia and hypertriglyceridemia in mice. *J. Ethnopharmacol.* 68, 307–314 (1999).
9. Lee, M. H., Chiou, J. F., Yen, K. Y. & Yang, L. L. EBV DNA polymerase inhibition of tannins from *Eugenia uniflora*. *Cancer Lett.* 154, 131–136 (2000).
10. Adewunmi, C. O. et al. Ethno-veterinary medicine: Screening of Nigerian medicinal plants for trypanocidal properties. *J. Ethnopharmacol.* 77, 19–24 (2001).
11. Calado, J. C. P. et al. Flavonoid Contents and Antioxidant Activity in Fruit, Vegetables and Other Types of Food. *Agric. Sci.* 6, 426–435 (2015).
12. Rodrigues, K. A. da F. et al. *Eugenia uniflora* L. Essential Oil as a Potential Anti- Leishmania Agent: Effects on *Leishmania amazonensis* and Possible Mechanisms of Action. Evidence-Based Complement. Altern. Med. 2013, 279726 (2013).
13. Craveiro, A. A. et al. Óleos essenciais de plantas do nordeste. (Edições UFC, 1981).
14. Silva, I. et al. Noções sobre o organismo humano e utilização de plantas medicinais. (Assoeste - Editora Educativa, 1995).
15. Falkenberg, M. B., Santos, R. I. & Simões, S. M. O. in *Farmacognosia: da planta ao medicamento* (eds. Simões, C. M. O. et al.) 229–245 (Editora da UFSC, 2004).
16. CLSI. in CLSI document M27-S4 (ed. CLSI) 25 (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2012).
17. CLSI. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts: approved standard - third edition. *Clin. Lab. Stand. Inst.* 1–25 (2008).
18. CLSI. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts. Approved Standart. (National Committee for Clinical Laboratory, 2011).
19. Duarte, M. C. T., Figueira, G. M., Sartoratto, A., Rehder, V. L. G. & Delarmelina, C. Anti-Candida activity of Brazilian medicinal plants. *J. Ethnopharmacol.* 97, 305–311 (2005).
20. Silveira, R. R., Rubio, C. R. & Alves, M. J. Q. F. Modificações da diurese e da pressão arterial em ratos Wistar anestesiados, após a administração oral de infuso de assa-peixe (*Vernonia polyanthes* Less). *Rev. Bras. Plantas Med.* 2, 31–5 (2000).
21. Cirqueira, R. T. & Alves, M. J. Q. F. Efeitos hipotensivo e diurético dos extratos aquosos de pitanga (*Eugenia uniflora* L.) e jambolão (*Eugenia jambolana* Lam.) em ratos normotensos anestesiados. *Rev. Bras. Plantas Med.* 7, 86–91 (2005).
22. SAS Institute Inc. SASR USER’s Guide: Statistic. (SAS Institute Inc., 1985).
23. Mello-Aires, M. in *Fisiologia* (ed. Mello-Aires, M.) 613–624 (Guanabara Koogan, 1999).
24. Braga, F. C., Wagner, H., Lombardi, J. A. & Oliveira, A. B. Screening the Brazilian flora antihypertensive plant species for in vitro angiotensin-I-converting enzyme inhibiting activity. *Phytomedicine* 7, 245–50 (2000).
25. Holetz, F. B. et al. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 97, 1027–1031 (2002).
26. Simonetti, E. et al. Avaliação da atividade antimicrobiana de extratos de *Eugenia anomala* e *Psidium salutare* (Myrtaceae) frente à *Escherichia coli* e *Listeria monocytogenes*. *Rev. Bras. Plantas Med.* 18, 9–18 (2016).
27. Adebajo, A. C., Oloke, K. J. & Aladesanmi, A. J. Antimicrobial activities and microbial transformation of volatile oils of *Eugenia uniflora*. *Fitoterapia* 50, 451–455 (1989).
28. Becker, N. A., Volcão, L. M., Camargo, T. M., Freitag, R. A. & Ribeiro, G. A. Biological properties of *Eugenia uniflora* L. essential oil: phytochemistry composition and antimicrobial activity against gram negative bacteria. *Vittale – Rev. Ciências da Saúde* 29, 22–30 (2017).
29. Costa, D. P., Santos, S. C., Seraphin, J. C. & Ferri, P. H. Seasonal variability of essential oils of *Eugenia uniflora* leaves. *J. Braz. Chem. Soc.* 20, 1287–1293 (2009).
30. Marino, M., Bersani, C. & Comi, G. Impedance measurements to study the antimicrobial activity of essential oils from Lamiaceae and Compositae. *Int. J. Food Microbiol.* 67, 187–95 (2001).

Received in October 2017.

Approved in July 2018.

Avaliação do efeito antimicrobiano, hipotensivo e diurético de extratos de *Eugenia uniflora*

Joyce Marinho de Souza*

Marcus Vinicius Pimenta Rodrigues*

Renata Tardivo Cirqueira**

Maria José Queiroz de Freitas Alves***

Eliana Peresi Lordelo*

Caio Ferreira de Oliveira*

Rosemeire Cristina Linhari Rodrigues Pietro***

276

Resumo

O gênero *Eugenia* sp. (Myrtaceae) compreende plantas com capacidade antimicrobiana e antioxidante entre outros potenciais terapêuticos. O objetivo deste estudo foi avaliar a atividade antimicrobiana de óleo essencial; atividade diurética e hipotensora de extrato aquoso de folhas de *Eugenia uniflora*. A atividade antimicrobiana foi avaliada pela determinação da concentração inibitória mínima (MIC) e concentração mínima bactericida (MBC) de cepas bacterianas e concentração fungicida mínima (MFC) para fungos. A atividade diurética e hipotensora foi avaliada em ratos Wistar normotensos pela mensuração da pressão sanguínea e fluxo urinário após administração de quatro diferentes concentrações de extrato aquoso (10%, 15%, 20% e 25%). Óleo essencial inibiu o crescimento de *Candida parapsilosis* e *Candida albicans* com valores de MIC menores que 14,41 mg/mL, igual a 57,75 mg/mL para *Candida krusei*. A respeito do efeito antimicrobiano, o óleo essencial inibiu o crescimento de todas as cepas testadas, com MIC igual a 153,93 mg/mL, exceto para *Escherichia coli* (MIC igual a 307,96 mg/mL). O extrato aquoso mostrou redução importante da pressão arterial (34% e 31% quando comparado ao controle), após administração de 10% e 25% do extrato aquoso, respectivamente. Contudo, os animais que receberam o extrato aquoso na concentração de 15% e 20% apresentaram discreto efeito hipotensor (20% e 21% menor que o grupo controle, respectivamente) concomitantemente ao importante efeito diurético (280% e 91% maior quando comparado ao grupo controle, respectivamente). Esses achados confirmam o potencial efeito biológico dessa espécie, e representa um importante embasamento para estudos relacionados as propriedades terapêuticas da *Eugenia uniflora*.

Palavras-chave: *Eugenia uniflora*, Extrato aquoso, óleo essencial, efeito antimicrobiano, efeito diurético, potencial hipotensor, atividade *in vitro*, atividade *in vivo*.

INTRODUÇÃO

O gênero *Eugenia* sp. (Myrtaceae) compreende 14 espécies, incluindo *Eugenia uniflora* Linn. Os principais constituintes químicos presentes nestas plantas são triterpenos, taninos, ácidos fenólicos e, raramente, ésteres, glicosídeos e alcalóides. Estudos fitoquímicos de óleos essenciais extraídos de folhas de *Eugenia neonitida* e *Eugenia rotundifolia* mostraram que ambas as espécies apresentaram principalmente hidrocarbonetos e álcoois cíclicos; *E. neonitida* apresentou, além disso, quantidades significativas de sesquiterpenos em sua composição, e *E. rotundifolia* monoterpênes¹.

Constituintes específicos encontrados em *E. uniflora* são flavonóides, sesquiterpenos, antocianinas e saponinas. Sabe-se que a composição do óleo essencial em frutos e folhas varia qualitativa e quantitativamente, dependendo do tempo de colheita, estação e estágio de maturidade²⁻³.

Vulgarmente conhecida como pitanga, a *E. uniflora* é nativa do Brasil, e está bem dispersa por todo o país, além das fronteiras do Uruguai e da Argentina. Esta espécie tem sido utilizada para diferentes fins terapêuticos. Vários efeitos biológicos e clínicos associados a esta planta foram relatados, incluindo:

DOI: 10.15343/0104-7809.20184202269282

* Departamento de Biomedicina da Universidade do Oeste de São Paulo - UNOESTE, Presidente Prudente, SP, Brasil.

** Departamento de Morfologia e Patologia, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de São Carlos - UFSCar, São Carlos, SP, Brasil

*** Departamento de Fisiologia, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" - UNESP, Botucatu, SP, Brasil

E-mail: marcusvinicius@unoeste.br

atividade antifúngica, antidiarréica, anti-inflamatória, anti-hipertensiva, e diurética, hiperglicemia e hipertrigliceridemia, inibidor da DNA polimerase, tripanocida, potencial antioxidante e atividade anti-Leishmania⁴⁻¹²

No presente estudo, *in vitro* e *in vivo*, combinados, foram realizados experimentos com extratos de folhas de *Eugenia uniflora*, com o objetivo de avaliar as atividades antimicrobianas do óleo essencial (OE) (*in vitro*) e avaliar a atividade diurética e hipotensora do extrato aquoso (EA) (*in vivo*). O objetivo deste estudo é contribuir para a melhoria do conhecimento sobre a atividade de extratos de folhas desta espécie, visando a possibilidade de uso futuro de seus compostos para diversos fins.

MATERIAIS E MÉTODOS

Material vegetal: As amostras de *Eugenia uniflora* foram coletados no jardim da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo-USP FFCLRP durante o mês de junho (inverno), e identificados pela Dra. Silvana Aparecida Pires Godoy (Departamento de Biologia - USP FFCLRP) como depósito de amostras (*voucher*) 7.240. As folhas foram submetidas a secagem à temperatura ambiente, depois moídas e pesadas.

Extração vegetal e produção de óleo essencial: A extração do óleo essencial foi realizada utilizando a técnica de hidrodestilação¹³, conforme descrito: 100 g de folhas e 250 mL de água foram colocados em um kitasato de 500 mL e aquecidos à ebulição. O vapor foi conduzido através de um condensador tipo bobina de 75 cm e o óleo foi separado com o auxílio de um funil de separação de 500 mL. A densidade do óleo essencial foi de 0,924g / mL.

A informação etnofarmacológica sugeriu que os extratos aquosos (EA) das folhas de *E. uniflora* (amostra *voucher* 7.240) devem ser preparados pelo método de decocção¹⁴. A fim de preparar os extratos aquosos a 10%, 15%, 20% e 25% de concentrações, amostras de plantas de 1,0, 1,5, 2,0 e 2,5 g, respectivamente, foram fervidas em 10 mL de

água destilada. O material vegetal foi mantido em contato com água destilada até seu ponto de ebulição¹⁵. Imediatamente após atingir a temperatura de ebulição, as soluções foram removidas do calor e seus respectivos frascos foram tampados e resfriados à temperatura ambiente. EA foram utilizados imediatamente após a preparação.

Atividade antimicrobiana: As cepas bacterianas utilizadas foram *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 27853) e as leveduras incluem *Candida albicans* (ATCC 90028), *Candida krusei* (ATCC 6258) e *Candida parapsilosis* (ATCC 22019). A atividade antimicrobiana foi avaliada pela determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) para linhagens bacterianas e concentração fungicida mínima (CFM) para leveduras. O método de microdiluição em placas de microtitulação foi utilizado para determinar a concentração inibitória mínima (CIM) de acordo com o método de referência M7-A do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI), com modificações para as bactérias¹⁶ e M27-A3 com modificações para o fungo¹⁷. Determinação da CIM, uma colônia de cada cepa bacteriana foi inoculada em meio BHI (*brain heart infusion agar*) e incubada a 37 ° C por 24h. A partir deste inóculo, a turvação foi ajustada em 2,5 mL de solução salina até 0,5 escala McFarland (aproximadamente 1,5 x 10⁸ CFU / mL).

Numa placa contendo um inóculo de 1,0 x 10⁶ mL de células bacterianas diluídas em BHI, foram adicionados 100 µL de óleo de *E. uniflora* e depois incubados a 37°C durante 24 h. A determinação da CIM foi realizada pela adição de 10 µL do corante cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio (TTC), o qual mostra a presença do metabolismo celular pela mudança de cor. O CBM (concentração bactericida mínima) foi então realizado com o auxílio de uma placa de Petri contendo meio de cultura *Mueller Hinton*; o ensaio foi realizado incubando por 24h a 37 ° C, seguido de leitura visual. Para a determinação do CFM do óleo essencial contra leveduras, a técnica de microdiluição empregada foi¹⁸: colônias

isoladas de leveduras cultivadas em ágar Sabouraud por 24h a 35°C foram suspensas em solução salina e RPMI líquido mais 2% de glicose em tampão MOPS (morfolinopropanosulfônico ácido acético) 0,165 M, respectivamente, de modo que a concentração final na placa de inóculo foi de 0,5 a 2,5 x 10⁴ células / mL.

A análise antifúngica foi realizada usando o método de microdiluição em uma placa de 96 poços, onde 100 µL de cultura RPMI foram colocados. A leitura visual da inibição do crescimento foi realizada após incubação por 24 horas a 35 ° C, sob agitação, após a adição do corante denominado cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio (TTC)¹⁹. De cada poço, uma alíquota foi removida e transferida para placas de Petri contendo Ágar Sabouraud, que foi recentemente incubado por 24h a 35 °C para posterior leitura e determinação da concentração fungicida mínima (CFM). Para o cálculo percentual de CIM, CBM e CFM, a densidade do óleo essencial foi 0,924g / mL.

Medidas de atividade diurética e hipotensora: O protocolo experimental empregado, conforme demonstrado^{20,21}, foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa local (processo número 013/05). As atividades diurética e hipotensora do EA foram avaliadas em ratos *Wistar* machos normotensos, pesando 180 ± 32 g. Esses animais foram submetidos a um período de três dias para completa adaptação ao biotério, recebendo água e ração balanceada *ad libitum*. Após esse período, os animais foram anestesiados (Hipnol 3%), submetidos à traqueotomia, seguida de: a) canulação da artéria carótida esquerda para aferição da pressão arterial (PA) por manômetro de mercúrio a cada 15min; e b) bexiga urinária para medir o fluxo de urina (V). Os experimentos foram divididos em quatro fases de 30 min: basal (Ba) e experimental (E1, E2 e E3). O ponto Ba para PA foi encontrado através da média de três medidas a 0min, 15min e 30min do estágio Ba.

Após o passo Ba, os animais receberam intragastricamente (por gavagem) 1 mL de água destilada (grupo controle: C) ou 1 mL de EA (grupos experimentais: P10%, P15%, P20% e P25%). Durante a fase experimental, as determinações foram feitas aos 15min, 30min, 45min, 60min, 75min e 90min. Os resultados

avaliados foram representados pela média entre 15 e 30min (E1), 45 e 60min (E2) e 75 e 90min (E3).

A linha de base (Ba) dos valores de PA e V foram comparados com os obtidos nas fases experimentais (E1, E2, E3) dentro do mesmo grupo. Esses valores foram distribuídos normalmente (teste de normalidade, $p < 0,10$) e apresentaram homogeneidade de variância, e foram analisados por meio de testes paramétricos - análise de variância para medidas repetidas e pós-teste de Tukey utilizando o software SASR²². Os dados foram expressos com a média ± desvio padrão e limite de confiança estabelecido em $p < 0,05$.

RESULTADOS

Os resultados da presente pesquisa mostraram que o óleo essencial de *E. uniflora*, com densidade de 0,924g / mL, inibiu o crescimento de *C. albicans* e *C. parapsilosis* com valores de CIM inferiores a 14,41mg / mL (1,56%), para *C. krusei* a inibição do crescimento ocorreu com CIM no nível de 57,75mg / mL (6,25%) (Tabela 1). Assim como o óleo extraído de folhas de *E. uniflora* inibiu o crescimento de todas as bactérias com CIM de 153,93mg / mL (16,66%), exceto *E. coli*, que apresentou CIM de 307,96mg / mL (33,33%) (Tabela 2). Os CBMs foram iguais e superiores a 307,96 mg / mL para todas as cepas.

Neste estudo, experimentos in vivo demonstraram a atividade hipotensora do EA extraído de folhas de *E. uniflora* (Tabela 3 e Figura 1). No grupo C, os valores de PA após a administração de água destilada não foram estatisticamente diferentes da PA basal ($p > 0,05$).

No entanto, após a administração do EA, um efeito hipotensivo foi evidente. A Tabela 2 mostra que 60 min após a administração do EA a uma concentração de 10%, os valores da PA diminuíram 25% em comparação com a linha de base e, em seguida, atingiram o nível mais baixo no final do experimento em 34% em comparação com a linha de base. Nos animais tratados com o EA na concentração de 15% e 20% também houve um efeito hipotensivo, em comparação a PA basal em torno de 17% e

18% aos 60 min, respectivamente, diminuindo de 20% e 21% aos 90min, respectivamente. Animais tratados com níveis mais altos (EA 25%) mostraram uma queda mais intensa na PA, diminuindo 22% aos 60min atingindo 31% aos 90min, comparados aos valores basais da PA.

Em relação ao efeito do EA de *E. uniflora* sobre a atividade diurética (V), o grupo controle (C) apresentou um V basal aumentado em 72% após 90 min de administração de água destilada (Figura 1). Este fato provavelmente está relacionado ao aumento do volume urinário, uma vez que 1 mL de água destilada foi, intragastricamente (gavagem), administrado

a todos os animais.

Assim, o efeito diurético observado nos animais tratados com o EA foi determinado comparando-os ao efeito obtido pelos animais do grupo C. Os animais que receberam o EA a 10% e 25% não apresentaram aumento significativo no débito urinário. No entanto, o EA a 15% causou um efeito diurético em animais após 60min (aumento de 113% na produção de urina) e atingiu um valor de aumento de 280% após 90min. Com o aumento da concentração do EA ao nível de 20%, o aumento do V basal também foi significativo (aumento de 91% na produção de urina) após 90 minutos de administração (Figura 2).

Tabela 1 – Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Fungicida Mínima (MFC) do óleo essencial extraído de folhas de *Eugenia uniflora* contra leveduras em Ribeirão Preto - SP. 2016

| Microorganismos | Óleo (mg/mL) | | Fluconazole (µg/mL) | |
|------------------------|--------------|--------|---------------------|------|
| | CIM | CFM | CIM | CFM |
| <i>C. albicans</i> | <14,41 | <14,41 | 1,0 | 1,0 |
| <i>C. krusei</i> | 57,75 | 57,75 | 16,0 | 16,0 |
| <i>C. parapsilosis</i> | <14,41 | <14,41 | 2,0 | 2,0 |

Tabela 2 – Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) do óleo essencial extraído das folhas de *Eugenia uniflora* nas bactérias avaliadas em Ribeirão Preto - SP. 2016

| Microorganismos | Óleo (mg/mL) | | Ampicilina (µg/mL) | | Sulfametoxazol (µg/mL) | |
|-----------------------|--------------|---------|--------------------|------|------------------------|------|
| | CIM | CBM | CIM | CBM | CIM | CBM |
| <i>S. epidermidis</i> | 153,93 | 307,96 | 0,26 | 0,26 | Nt | Nt |
| <i>S. aureus</i> | 153,93 | >307,96 | 0,26 | 0,26 | Nt | Nt |
| <i>P. aeruginosa</i> | 153,93 | >307,96 | Nt | Nt | 4,16 | 8,33 |
| <i>E. coli</i> | 307,96 | >307,96 | Nt | Nt | 8,33 | 8,33 |

* Nt: não testado

Tabela 3 – Pressão arterial em mmHg (PA) linha basal (Ba) e após 30min (E1), 60min (E2) e 90min (E3) de administração de água destilada (C) ou extrato aquoso (EA) de folhas de *E. uniflora* em concentrações de 10%, 15%, 20% e 25% em Ribeirão Preto - SP. 2016

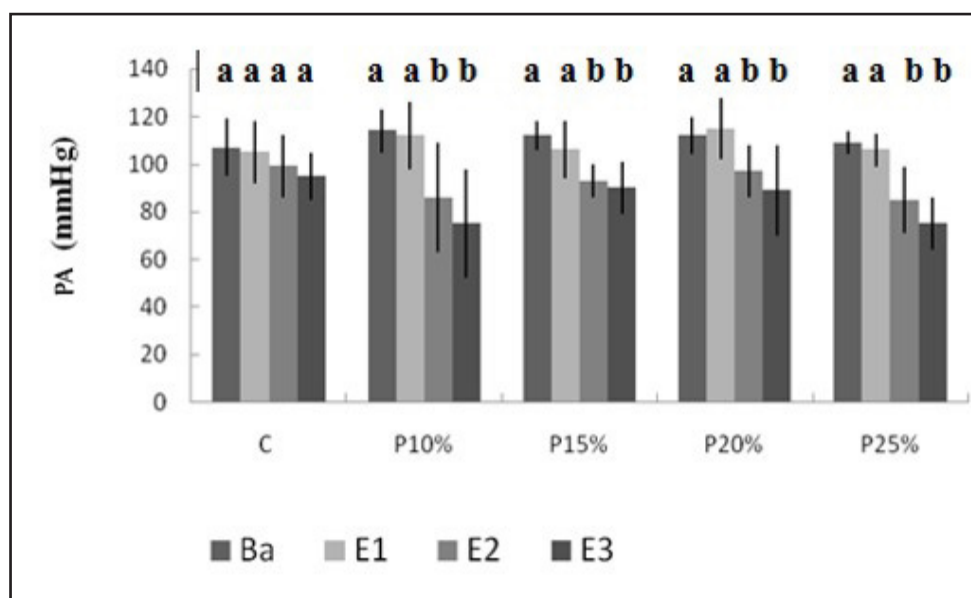
| Grupo | Basal | E1 | E2 | E3 |
|-------|------------|------------|------------|------------|
| C | 107 ± 12,4 | 105 ± 12,5 | 99 ± 12,6 | 95 ± 10,2 |
| P10% | 114 ± 8,7 | 112 ± 13,8 | 86 ± 22,8* | 75 ± 23,2* |
| P15% | 112 ± 5,6 | 106 ± 12,3 | 93 ± 6,8* | 90 ± 10,7* |

continua...

...continuação - Tabela 3

| | | | | |
|------|-----------|------------|------------|------------|
| P20% | 112 ± 8,5 | 115 ± 13,2 | 97 ± 10,6* | 89 ± 19,3* |
| P25% | 109 ± 4,4 | 106 ± 7,2 | 85 ± 14,0* | 75 ± 11,2* |

Dentro do mesmo grupo, letras diferentes indicam significância estatística ($p < 0,05$). Os dados foram expressos



Dentro do mesmo grupo, letras diferentes indicam significância estatística ($p < 0,05$). Os dados foram expressos como média ± desvio padrão e limite de confiança estabelecido em $p < 0,05$.

DISCUSSÃO

Os resultados deste estudo mostram que a *Eugenia uniflora* apresenta efeitos diuréticos e hipotensores bem como capacidade antibacteriana e antifúngica. A composição fitoquímica de *E. uniflora*, é acetato de etila, quercetina e flavonóides de miricetina, dois taninos hidrolisáveis e compostos macrocíclicos e as eugeniflorinas fenólicas D1 e D2, que foram previamente detectadas em folhas, e estão relacionadas aos seus efeitos¹⁹.

A flora brasileira é bastante abundante em compostos diuréticos naturais e muitas vezes o mecanismo de ação que promove esse efeito é desconhecido. Plantas que alteram a hemodinâmica do corpo promovendo a vasodilatação são potencialmente espécies com efeito diurético, pois podem reduzir a força da arteríola aferente levando a um aumento da pressão hidrostática dentro do

capilar glomerular (PGC). Este aumento de PGC impulsiona a filtração de pressão efetiva, a taxa de filtração glomerular e consequentemente o fluxo de urina. As atividades diurética e hipotensora do extrato aquoso das folhas de *E. uniflora*, podem estar relacionadas à redução da pressão arterial, que iniciou reduções no fluxo sanguíneo renal e / ou filtração glomerular. Este fato pode explicar a ausência do efeito diurético, como esperado uma redução na diurese compensatória, a fim de tentar regular a pressão arterial. Além disso, o rim é um importante órgão efetor na manutenção do controle da pressão arterial, devido à excreção de sal e água, e é altamente dependente da perfusão hemodinâmica renal no organismo^{23,24}.

Identificamos a inibição do crescimento por meio da CIM proporcionada pelo tratamento

de linhagens com óleo essencial extraído de *E. uniflora*. Os valores de CBMs corroboram com os resultados obtidos por estudos anteriores sobre a atividade bactericida de óleos essenciais de folhas de *E. uniflora* contra *S. aureus* e *E. coli*²⁵. Folhas inibiram o crescimento de *S. epidermidis*, *S. aureus* e *P. aeruginosa* com CIM de 16,66%, exceto para *E. coli* que apresentou uma CIM de 33,33%. Em um estudo que avaliou a capacidade antimicrobiana e antioxidante dos extratos de *Eugenia anomala*, não mostraram efeito sobre *Escherichia coli* e *Listeria monocytogenes*²⁶.

Em um estudo da variação da atividade antimicrobiana através da avaliação de óleos essenciais extraídos de folhas e frutos de *E. uniflora*, colhidos em diferentes estágios de maturação, segundo os autores, os resultados para *Proteus vulgaris*, *P. aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *C. albicans*, e *Trichophyton menthagrophytes* variaram dependendo da

hora do dia e estação do ano em que a planta foi colhida²⁷⁻²⁹.

Os autores observaram que essas diferenças devem ser consideradas na otimização da atividade antimicrobiana de *E. uniflora*. Apontaram que a maioria das amostras era inativa contra *Staphylococcus aureus*, *Yersinia enterocolitica* e *Serratia marcescens*. Em outro relato, a bactéria *P. aeruginosa* foi mais sensível, enquanto que *T. menthagrophytes* foi o fungo mais sensível²⁷.

A capacidade antimicrobiana de *E. uniflora* pode ser explicada pela presença de compostos fenólicos e outros compostos em extratos, pois pode destruir a parede bacteriana, permitindo sua entrada nas células afetando diretamente o seu metabolismo³⁰. Diante disso, outros estudos que testaram o extrato de *E. uniflora* coletados em diferentes períodos do ano puderam apoiar e consolidar o melhor momento para preparar o extrato.

CONCLUSÃO

Os presentes resultados mostram a importância da *E. uniflora*, uma vez que a avaliação de dados de sua atividade antimicrobiana reforça os potenciais efeitos antibacterianos e antifúngicos obtidos com o óleo essencial extraído de suas folhas contra certas bactérias e pode representar uma fonte de princípios ativos para *Candida* sp.

Além disso, atividades diuréticas e

hipotensoras de extratos aquosos de *E. uniflora* demonstraram a interdependência entre a função e a hemodinâmica renal, através do balanço entre estes efeitos observados em animais dependendo da concentração administrada.

No entanto, mais estudos são necessários para detalhar os mecanismos desses dados farmacológicos.

REFERÊNCIAS

1. Defaveri, A. C. A. et al. *Eugenia neonitida* sobral and *Eugenia rotundifolia* casar. (myrtaceae) essential oils: Composition, seasonality influence, antioxidant activity and leaf histochemistry. *J. Braz. Chem. Soc.* 22, 1531–1538 (2011).
2. Auricchio, M. T. & Bacchi, E. M. *Eugenia uniflora* L. "brazilian cherry" leaves: pharmacobotanical, chemical and pharmacological properties *Ma. Rev. Inst. Adolfo Lutz* 62, 55–61 (2003).
3. Schmeda-Hirschmann, G., Theoduloz, C., Franco, L., Ferro B, E. & De Arias, A. R. Preliminary pharmacological studies on *Eugenia uniflora* leaves: Xanthine oxidase inhibitory activity. *J. Ethnopharmacol.* 21, 183–186 (1987).
4. Lima, E. O., Gompertz, O. F., Giesbrecht, A. M. & Paulo, M. Q. In vitro antifungal activity of essential oils obtained from official plants against dermatophytes. *Mycoses* 36, 333–336 (1993).
5. Oliveira, A. L., Lopes, R. B., Cabral, F. A. & Eberlin, M. N. Volatile compounds from pitanga fruit (*Eugenia uniflora* L.). *Food Chem.* 99, 1–5 (2006).
6. Almeida, C. E., Karnikowski, M. G. O., Foletto, R. & Baldisserotto, B. Analysis of antidiarrhoeic effect of plants used in popular medicine. *Rev. Saude Publica* 29, 428–433 (1995).
7. Consolini, A. E., Baldini, O. A. N. & Amat, A. G. Pharmacological basis for the empirical use of *Eugenia uniflora* L. (Myrtaceae) as antihypertensive. *J. Ethnopharmacol.* 66, 33–39 (1999).
8. Arai, I. et al. Improving effects of the extracts from *Eugenia uniflora* on hyperglycemia and hypertriglyceridemia in mice. *J.*

- Ethnopharmacol. 68, 307–314 (1999).
9. Lee, M. H., Chiou, J. F., Yen, K. Y. & Yang, L. L. EBV DNA polymerase inhibition of tannins from *Eugenia uniflora*. *Cancer Lett.* 154, 131–136 (2000).
10. Adewunmi, C. O. et al. Ethno-veterinary medicine: Screening of Nigerian medicinal plants for trypanocidal properties. *J. Ethnopharmacol.* 77, 19–24 (2001).
11. Calado, J. C. P. et al. Flavonoid Contents and Antioxidant Activity in Fruit, Vegetables and Other Types of Food. *Agric. Sci.* 6, 426–435 (2015).
12. Rodrigues, K. A. da F. et al. *Eugenia uniflora* L. Essential Oil as a Potential Anti- Leishmania Agent: Effects on *Leishmania amazonensis* and Possible Mechanisms of Action. *Evidence-Based Complement. Altern. Med.* 2013, 279726 (2013).
13. Craveiro, A. A. et al. Óleos essenciais de plantas do nordeste. (Edições UFC, 1981).
14. Silva, I. et al. Noções sobre o organismo humano e utilização de plantas medicinais. (Assoeste - Editora Educativa, 1995).
15. Falkenberg, M. B., Santos, R. I. & Simões, S. M. O. in *Farmacognosia: da planta ao medicamento* (eds. Simões, C. M. O. et al.) 229–245 (Editora da UFSC, 2004).
16. CLSI. in *CLSI document M27-S4* (ed. CLSI) 25 (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2012).
17. CLSI. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts: approved standard - third edition. *Clin. Lab. Stand. Inst.* 1–25 (2008).
18. CLSI. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts. Approved Standart. (National Committee dor Clinical Laboratory, 2011).
19. Duarte, M. C. T., Figueira, G. M., Sartoratto, A., Rehder, V. L. G. & Delarmelina, C. Anti-Candida activity of Brazilian medicinal plants. *J. Ethnopharmacol.* 97, 305–311 (2005).
20. Silveira, R. R., Rubio, C. R. & Alves, M. J. Q. F. Modificações da diurese e da pressão arterial em ratos Wistar anestesiados, após a administração oral de infuso de assa-peixe (*Vernonia polyanthes* Less). *Rev. Bras. Plantas Med.* 2, 31–5 (2000).
21. Cirqueira, R. T. & Alves, M. J. Q. F. Efeitos hipotensivo e diurético dos extratos aquosos de pitanga (*Eugenia uniflora* L.) e jambolão (*Eugenia jambolana* Lam.) em ratos normotensos anestesiados. *Rev. Bras. Plantas Med.* 7, 86–91 (2005).
22. SAS Institute Inc. *SASR USER's Guide: Statistic.* (SAS Institute Inc., 1985).
23. Mello-Aires, M. in *Fisiologia* (ed. Mello-Aires, M.) 613–624 (Guanabara Koogan, 1999).
24. Braga, F. C., Wagner, H., Lombardi, J. A. & Oliveira, A. B. Screening the Brazilian flora antihypertensive plant species for in vitro angiotensin-I-converting enzyme inhibiting activity. *Phytomedicine* 7, 245–50 (2000).
25. Holecz, F. B. et al. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 97, 1027–1031 (2002).
26. Simonetti, E. et al. Avaliação da atividade antimicrobiana de extratos de *Eugenia anomala* e *Psidium salutare* (Myrtaceae) frente à *Escherichia coli* e *Listeria monocytogenes*. *Rev. Bras. Plantas Med.* 18, 9–18 (2016).
27. Adebajo, A. C., Oloke, K. J. & Aladesanmi, A. J. Antimicrobial activities and microbial transformation of volatile oils of *Eugenia uniflora*. *Fitoterapia* 50, 451–455 (1989).
28. Becker, N. A., Volcão, L. M., Camargo, T. M., Freitag, R. A. & Ribeiro, G. A. Biological properties of *Eugenia uniflora* L. essential oil: phytochemistry composition and antimicrobial activity against gram negative bacteria. *Vittalle – Rev. Ciências da Saúde* 29, 22–30 (2017).
29. Costa, D. P., Santos, S. C., Seraphin, J. C. & Ferri, P. H. Seasonal variability of essential oils of *Eugenia uniflora* leaves. *J. Braz. Chem. Soc.* 20, 1287–1293 (2009).
30. Marino, M., Bersani, C. & Comi, G. Impedance measurements to study the antimicrobial activity of essential oils from Lamiaceae and Compositae. *Int. J. Food Microbiol.* 67, 187–95 (2001).