

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA E BIOLOGIA
BACHARELADO EM QUÍMICA

ALINE FARINA CAMPRA

**AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTIBACTERIANA E
ANTIOXIDANTE DE EXTRATOS AQUOSOS E HIDROALCOÓLICOS
DE ERVA-MATE (*Ilex paraguariensis*)**

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

CURITIBA

2017

ALINE FARINA CAMPRA

**AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTIBACTERIANA E
ANTIOXIDANTE DE EXTRATOS AQUOSOS E HIDROALCOÓLICOS
DE ERVA-MATE (*Ilex paraguariensis*)**

Trabalho apresentado como requisito parcial para a aprovação na disciplina QB78A – Trabalho de Conclusão de Curso II, do curso superior de Bacharelado em Química, do Departamento de Química e Biologia – DAQBi - da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR.

Orientadora: Profa. Dra. Giselle Maria Maciel

CURITIBA

2017

TERMO DE APROVAÇÃO

ALINE FARINA CAMPRA

AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTIBACTERIANA E ANTIOXIDANTE DE EXTRATOS AQUOSOS E HIDROALCOÓLICOS DE ERVA-MATE (*Ilex paraguariensis*)

Trabalho de Conclusão de Curso aprovado como requisito parcial à obtenção do grau de BACHAREL EM QUÍMICA pelo Departamento Acadêmico de Química e Biologia (DAQBI) do Câmpus Curitiba da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR, pela seguinte banca examinadora:

Membro 1 – Prof. Dr. Charles Windson I. Haminiuk
Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Membro 2 – Profa. Dra. Marlene Soares
Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Orientadora – Profa. Dra. Giselle Maria Maciel
Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Coordenador de Curso – Prof. Dr. Luiz Marco de Lira Faria

Curitiba, 28 de novembro de 2017.

Esta Folha de Aprovação assinada encontra-se na Coordenação do Curso.

RESUMO

CAMPRA, Aline Farina. **Avaliação das atividades antibacteriana e antioxidante de extratos aquosos e hidroalcoólicos de erva-mate (*Ilex paraguariensis*)**. 2017. 53 f. Trabalho de conclusão de curso – Bacharelado em Química. Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Curitiba, 2017.

O uso inadequado e indiscriminado de antibióticos tem contribuído significativamente com o aumento da resistência das bactérias, justificando estudos de substâncias naturais com atividade antibacteriana. A procura por tratamentos alternativos com plantas medicinais e fitoterápicos tem sido cada vez mais expressiva, com destaque para as substâncias que possuem potencial antioxidante. A erva-mate (*Ilex paraguariensis*), conhecida por suas propriedades nutritivas e fisiológicas, é uma planta pertencente à família Aquifoleaceae, com ocorrência natural no Brasil, Argentina e Paraguai. Possui relevante importância cultural e econômica nos estados do sul do Brasil, sendo tradicionalmente consumida em infusão, na forma de chimarrão. Neste contexto, o objetivo do presente trabalho foi avaliar as atividades antibacteriana e antioxidante de extratos aquosos e hidroalcoólicos de diferentes amostras de erva-mate, e determinar o conteúdo de compostos fenólicos totais presente nestes extratos. A atividade antibacteriana foi avaliada frente às bactérias *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 pelo método de microdiluição em caldo, o mesmo método foi utilizado para a determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e da Concentração Bactericida Mínima (CBM) dos extratos de erva-mate. A atividade antioxidante foi determinada utilizando o método DPPH^{*} (2,2-difenil-1-picrilhidrazil), avaliando a habilidade de substâncias presentes nos extratos em sequestrar radicais e a quantificação de compostos fenólicos totais presentes nos extratos foi realizada pelo método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu. O extrato etanólico da amostra de erva-mate preparada em esteira sem fumaça apresentou a maior atividade antioxidante e o maior conteúdo de compostos fenólicos totais $843,92 \pm 0,48 \mu\text{mol de Trolox}\cdot\text{g}^{-1}$ e $155,95 \pm 1,21 \text{ mg EAG}\cdot\text{g}^{-1}$, respectivamente. O estudo revelou que extratos de erva-mate possuem além das atividades antibacteriana e antioxidante, considerável teor de compostos fenólicos, apresentando evidente potencial para o desenvolvimento de diversos novos produtos, permitindo a sua aplicação tecnológica nas indústrias alimentícia, farmacêutica e cosmética.

Palavras-chave: Atividade antibacteriana. Atividade antioxidante. Produtos naturais. Erva-mate. Extratos. Aplicação tecnológica.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Amostras de erva-mate e extratos obtidos após agitação.....	34
Figura 2 – Microplaca de 96 poços para análise da CIM frente à <i>Escherichia coli</i> revelada com TTC 0,5% (m/v).....	35
Figura 3 – Correlação entre conteúdo de compostos fenólicos totais e atividade antioxidante, em extratos aquosos (EA) e extratos etanólicos (EE) de diferentes amostras de erva-mate.	42

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos extratos aquosos (EA) e extratos etanólicos (EE) de diferentes amostras de erva-mate.....	36
Tabela 2 – Concentração Bactericida Mínima (CBM) dos extratos aquosos (EA) e extratos etanólicos (EE) de diferentes amostras de erva-mate.....	37
Tabela 3 – Atividade antioxidante em μmol de Trolox·g ⁻¹ amostra, em extratos aquosos (EA) e extratos etanólicos (EE) de diferentes amostras de erva-mate.	38
Tabela 4 – Conteúdo de compostos fenólicos totais em mg EAG·g ⁻¹ amostra, em extratos aquosos (EA) e extratos etanólicos (EE) de diferentes amostras de erva-mate.	40
Tabela 5 – Conteúdo de compostos fenólicos totais em mg EAG·g ⁻¹ amostra, em diferentes extratos de erva-mate.....	41

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BHA	Butil-hidroxi-anisol
BHI	<i>Brain Heart Infusion</i>
BHT	Butilhidroxi-tolueno
CBM	Concentração Bactericida Mínima
CCD	Cromatografia de camada delgada
5-CQA	Ácido 5-cafeoilquínico
CMH	Caldo Mueller Hinton
CIM	Concentração Inibitória Mínima
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DPPH*	2,2-difenil-1-picril-hidrazil
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
EA	Extrato aquoso
EAG	Equivalentes de ácido gálico
EE	Extrato etanólico
mmol	Milimol
OMS	Organização Mundial da Saúde
PG	Propil galato
r	Coefficiente de correlação
rpm	Rotações por minuto
TBHQ	Terc-butilhidroquinona
Trolox	6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromo-2-ácido carboxílico
TTC	2,3,5 – trifeniltetrazólio
UFC	Unidades formadoras de colônia
μmol	Micromol

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	9
2 JUSTIFICATIVA	11
3 OBJETIVOS	12
3.1 Objetivo geral	12
3.2 Objetivos específicos	12
4 REFERENCIAL TEÓRICO	13
4.1 Erva-mate	13
4.2 Bactérias	14
4.2.1 <i>Escherichia coli</i>	15
4.2.2 <i>Staphylococcus aureus</i>	16
4.3 Agentes antimicrobianos.....	17
4.4 Atividade antibacteriana.....	18
4.4.1 Métodos de difusão	19
4.4.2 Métodos de diluição.....	20
4.4.3 Métodos bioautográficos.....	21
4.5 Antioxidantes	22
4.5.1 Extração.....	24
4.5.2 Avaliação da atividade antioxidante.....	25
4.6 Compostos fenólicos.....	26
5 METODOLOGIA	28
5.1 Bactérias.....	28
5.2 Preparo dos extratos.....	28
5.3 Atividade antibacteriana.....	29
5.3.1 Preparo e padronização do inóculo bacteriano.....	29
5.3.2 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)	30
5.3.3 Determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM).....	32
5.4 Avaliação da atividade antioxidante	32
5.5 Determinação de compostos fenólicos totais.....	33
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
6.1 Extração.....	34
6.2 Avaliação da atividade antibacteriana.....	35
6.3 Avaliação da atividade antioxidante	38
6.4 Determinação de compostos fenólicos totais.....	39

7 CONCLUSÃO	44
8 SUGESTÃO PARA TRABALHOS FUTUROS	45
REFERÊNCIAS	46

1 INTRODUÇÃO

Desde a descoberta acidental da penicilina em 1928, por Alexander Fleming, o crescente aumento no uso inadequado e indiscriminado de antibióticos tem potencializado e contribuído significativamente para a seleção de cepas bacterianas resistentes a estes medicamentos, sendo um problema alarmante para a saúde pública. Com isso, a procura e o estudo de substâncias naturais que apresentem atividade antibacteriana são fundamentais.

O estudo de substâncias naturais também é impulsionado devido a surpreendente propriedade antioxidante que costuma ser encontrada nessas substâncias. Antioxidantes são substâncias que impedem a oxidação de outras substâncias químicas, retardam o aparecimento de alterações oxidativas e bloqueiam o efeito danoso dos radicais livres. Os antioxidantes são compostos aromáticos que contêm, no mínimo, uma hidroxila, podendo ser sintéticos, ou naturais, substâncias bioativas que fazem parte da constituição de diversos alimentos. Em alimentos, os antioxidantes são adicionados com o propósito de retardar a deterioração, rancidez e descoloração decorrentes da autooxidação, preservando o alimento (FIB, 2016). Os antioxidantes sintéticos são estáveis e eficazes, amplamente utilizados pela indústria alimentícia, porém já apresentam diversas restrições quanto ao seu uso, devido ao potencial de toxicidade que apresentam. Em busca da substituição dos antioxidantes sintéticos, principalmente em alimentos, as pesquisas têm se voltado para encontrar novos compostos naturais que apresentem propriedades antioxidantes. O que se deve também em grande parte por um novo perfil de consumidores, os quais estão cada vez mais exigentes na procura de manter uma alimentação saudável, sempre associada a produtos naturais.

A erva-mate (*Ilex paraguariensis*) é uma planta pertencente à família Aquifoliaceae, naturalmente encontrada em alguns países da América do Sul, como Brasil, Argentina e Paraguai, sendo tradicionalmente consumida com água quente na forma de chimarrão. Nos últimos anos, têm aumentado o número de pesquisas

relacionadas à erva-mate, mostrando que esta planta apresenta complexa composição química e diversas propriedades farmacológicas.

Com o objetivo de se estudar fontes naturais que contenham simultaneamente propriedades antibacteriana e antioxidante para a aplicação em novos produtos, é que se propõem a avaliação de extratos aquosos e hidroalcoólicos de diferentes amostras de erva-mate.

2 JUSTIFICATIVA

Segundo relatório publicado em 2014 pela Organização Mundial da Saúde (OMS) a resistência bacteriana é uma ameaça global, não sendo apenas uma previsão e sim uma realidade. Segundo o Diretor Geral Adjunto da Segurança em Saúde, Keiji Fukuda, estamos rumo à “era do pós-antibiótico”, em que pessoas poderão morrer por infecções comuns que hoje são tratáveis e, também, por ferimentos simples. Tendo em vista este cenário preocupante, com o intuito de reduzir e tornar racional o uso de antibióticos, o estudo de novas substâncias naturais com propriedades antibacterianas é de fundamental relevância.

A erva-mate, devido à sua rica e complexa composição e por apresentar diversas propriedades fisiológicas e nutricionais, apresenta grande destaque dentre as substâncias naturais estudadas atualmente, e possui promissoras perspectivas de inovação que podem ser exploradas em diversas áreas para o desenvolvimento de novos produtos, como cosméticos, fitoterápicos, antissépticos e desinfetantes, e ainda ter aplicação na indústria alimentícia, como na composição de embalagens ativas, aumentando o tempo de vida de prateleira de produtos alimentícios.

Tendo em vista o vasto potencial da erva-mate, e devido à falta de trabalhos na literatura que estudam concomitantemente suas propriedades antibacteriana e antioxidante, neste trabalho foi proposta a avaliação destas propriedades, a partir de extratos obtidos de diferentes amostras de erva-mate, selecionando o melhor extrato para futuras aplicações tecnológicas.

OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar as atividades antibacteriana e antioxidante de extratos aquosos e hidroalcoólicos de diferentes amostras de erva-mate (*Ilex paraguariensis*).

3.2 Objetivos específicos

- Obter os extratos aquosos e hidroalcoólicos de diferentes amostras de erva-mate;
- Avaliar a atividade antibacteriana dos extratos por microdiluição em caldo;
- Determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) e a Concentração Bactericida Mínima (CBM), por microdiluição em caldo;
- Avaliar a atividade antioxidante dos extratos pelo método DPPH[•];
- Quantificar os compostos fenólicos totais presentes nos extratos, por Folin-Ciocalteu.

4 REFERENCIAL TEÓRICO

4.1 Erva-mate

A *Ilex paraguariensis* é uma planta pertencente à família Aquifoliaceae, conhecida popularmente como erva-mate. É naturalmente encontrada em países da América do Sul, como Argentina, Paraguai e Brasil. A maior ocorrência natural da erva-mate é no Brasil, distribuída nos estados de São Paulo, Mato Grosso do Sul, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul. Os estados do sul são responsáveis pela maior produção e consumo, com grande destaque para o consumo tradicional do chimarrão (ESMELINDRO et al., 2002).

A erva-mate é conhecida por possuir uma complexa composição química, pois apresenta diversas classes, como, alcalóides (principalmente cafeína e teobromina), álcoois, cetonas, fenóis, ácidos graxos, carboidratos, proteínas, saponinas, flavonoides, terpenóides, metilxantinas, vitaminas (A, B1, B2, C e E), minerais, além de celulose, dextrina e sacarina (BORILLE, REISSMANN, FREITAS, 2005; BORTOLUZZI, et al., 2006; DUCAT, QUINÁIA, 2004; GNOATTO et al., 2007). Podem ocorrer variações nos teores dos compostos presentes na erva-mate dependendo das condições ambientais (DONADUZZI, 2003) e das etapas de processamento (ESMELINDRO et al., 2002).

Diversos estudos sobre a erva-mate relatam efeitos benéficos da planta, devido às suas propriedades: nutritiva, antioxidante, anti-inflamatória, antimicrobiana, antimutagênica, estimulante, diurética e digestiva (ASOLINI et al., 2006; BASTOS et al., 2006; BRACESCO et al., 2011; BRAVO; GOYA; LECUMBERRI, 2007; FILIP et al., 2000; GONÇALVES; ALVES; MENEZES, 2005).

Pesquisas relacionadas à atividade antibacteriana da erva-mate vêm merecendo destaque como os trabalhos desenvolvidos por: Biasi et al. (2009) que avaliaram a atividade antimicrobiana de extratos de folhas e de ramos de erva-mate, comparando diferentes condições de plantio da planta, o de Carelli et al. (2011) que avaliaram a atividade antibacteriana de extratos de erva-mate obtidos por extração

com fluído supercrítico, e ainda o de Martin et al. (2013) que avaliaram a atividade antimicrobiana da erva-mate contra patógenos alimentares evidenciando que erva-mate tem alto potencial para ser utilizada na indústria alimentícia como conservante de alimentos e bebidas.

O processamento da erva-mate comercial após a colheita consiste basicamente em sapeco, secagem, cancheamento e maturação (SCHMALKO; ALZAMORA, 2001).

Segundo a Portaria nº 234 de 1998 (BRASIL, 1998), a erva-mate comercializada deve atender a certas características de composição e de qualidade. Estas especificações dizem respeito às características sensoriais, microbiológicas, microscópicas e físico-químicas. As características físico-químicas são referentes aos teores de umidade, de resíduo mineral fixo, resíduo mineral fixo insolúvel em ácido clorídrico 10%, extrato aquoso e teor de cafeína.

4.2 Bactérias

Bactérias são organismos unicelulares relativamente simples. São células procarióticas, pois seu material genético não é envolto por membrana nuclear, e não possuem organelas. São constituídas basicamente por plasmídeos, ribossomos, membrana plasmática, nucleóide e possuem parede celular composta por peptidoglicanos. As bactérias podem assumir formas básicas de cocos, bacilos e espirilos, e também podem apresentar-se nas formas de estrela ou quadrada. Podem formar pares, cadeias ou agrupamentos, as formações assumidas normalmente são características do gênero ou de uma espécie bacteriana. A reprodução destes organismos ocorre por fissão binária, com formação de duas células geneticamente iguais. Muitas bactérias apresentam flagelos que permitem sua movimentação (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012).

Uma bactéria pode ser classificada como Gram positiva ou Gram negativa de acordo com as características estruturais de sua parede celular, e podem ser diferenciadas pelo método da coloração de Gram de acordo com a

coloração que estas adquirem após o tratamento com agentes químicos específicos. As bactérias Gram positivas apresentam uma parede celular formada por diversas camadas de peptidoglicanos, são bactérias caracterizadas pela ausência de membrana externa e pela presença de ácido teicóico, o qual é responsável pela especificidade antigênica da parede celular. Já as bactérias Gram negativas possuem pequena quantidade de peptidoglicanos em sua parede celular, não apresentam ácido teicóico e são caracterizadas pela presença de uma complexa membrana externa formada por fosfolípidios, lipoproteínas e lipopolissacarídeos.

Segundo Módulo para a Detecção e Identificação de Bactérias de Importância Médica, publicado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2013), a *Enterobacteriaceae* é a maior e mais heterogênea família de bactérias Gram negativas de importância médica. As enterobactérias são bacilos Gram negativos, não esporulados, com motilidade variável, oxidase negativos, anaeróbios facultativos, catalase positivos, que fermentam glicose com ou sem produção de gás, e a maioria reduz nitrato a nitrito. Em infecções destacam-se: *Escherichia coli*, *Klebsiella spp.*, *Proteus spp.*, *Salmonella spp.*, *Shigella spp* e *Enterobacter spp*, que são as maiores responsáveis por infecções gastrointestinais e urinárias, e por boa parte das septicemias.

Já os Estafilococos são cocos Gram positivos não esporulados que mais resistem no meio ambiente, e estão entre os microrganismos mais frequentemente isolados de amostras biológicas humanas. São geralmente encontrados na pele e mucosas dos homens e de outros animais. São microrganismos imóveis, anaeróbios facultativos, não formadores de esporos. São catalase positiva, diferentemente dos estreptococos que são catalase negativa, assim o teste da catalase pode ser utilizado para a diferenciação entre estes cocos. Destacam-se entre os estafilococos a *S. aureus*, *S. intermedius* e *S. hyicus* (ANVISA, 2013).

4.2.1 *Escherichia coli*

É uma bactéria bacilar Gram negativa, anaeróbia facultativa e fermentativa, pertencente à família *Enterobacteriaceae*. A sua presença em água e

alimentos é um dos mais importantes indicadores de contaminação fecal (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012).

É um dos microrganismos habitantes mais comuns no trato intestinal de homens e animais, porém algumas das cepas existentes são patogênicas, tanto para os animais quanto para os homens. As cepas patogênicas podem ser agrupadas de acordo com suas características peculiares, como aspectos estruturais, fisiológicos e genéticos, fatores de virulência e estrutura antigênica. As linhagens patogênicas são: *E.coli* Enteropatogênica clássica (EPEC), *E.coli* Enterohemorrágica (EHEC), *E.coli* Enterotoxigênica (ETEC), *E.coli* Enteroinvasiva (EIEC), *E.coli* Enteroagregativa (EAEC) e *E.coli* Uropatogênica (UPEC) (TRABULSI; ALTERTHUM, 2004).

Doenças de origem alimentar causadas por ela são normalmente associadas à refrigeração, cozimento ou processamento inadequados, e também pela manipulação dos alimentos com cuidados insuficientes de higiene. É uma das principais causas de diarreia líquida aguda em pessoas recém-chegadas de países estrangeiros (JAY, 2005).

São bactérias Gram negativas, apresentando coloração rosa ou vermelha no teste de coloração de Gram. Não possuem a capacidade de utilizar citrato como única fonte de carbono, mas são capazes de fermentar diversos açúcares produzindo ácido e gás, dentre os açúcares fermentados por *E.coli* destaca-se a lactose, glicose e maltose. Possuem a enzima triptofanase produzindo indol ao degradar o aminoácido triptofano. São bactérias catalase positiva, oxidase e urease negativa.

4.2.2 *Staphylococcus aureus*

A *Staphylococcus aureus* é uma bactéria Gram positiva pertencente à família *Micrococcae*. São cocos imóveis que não formam esporos, são anaeróbias facultativas, e podem apresentar-se em diversas formas como cadeias curtas ou agrupadas irregularmente com aspecto semelhante a cachos de uva, ou também na forma isolada (SANTOS et al., 2007).

São bactérias encontradas na microbiota da pele e nas fossas nasais de pessoas saudáveis. Os *Staphylococcus spp.* possuem um bom crescimento sob condições de pouca umidade e alta pressão osmótica, explicando parcialmente como essas bactérias conseguem sobreviver nas secreções nasais e na pele (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012). Das 33 espécies conhecidas do gênero *Staphylococcus*, 17 podem ser isoladas de amostras biológicas humanas (SANTOS et al., 2007).

Pelo fato de serem Gram positivas apresentam coloração violeta no teste de coloração de Gram. São bactérias catalase e coagulase positiva, e oxidase negativa. Capazes de fermentar manitol podendo ser identificada utilizando o meio seletivo ágar manitol-sal. Contém a enzima lactase produzindo ácidos ao fermentar a lactose, também produzem ácidos estáveis ao fermentar glicose, mas não são capazes de utilizar citrato como única fonte de carbono. Não possuem a capacidade de degradar o aminoácido triptofano, pela ausência da triptofanase, mas possuem a enzima desoxirribonuclease sendo capazes de degradar o ácido desoxirribonucleico (DNA).

Após a descoberta dos antibióticos foi uma das primeiras bactérias a serem controladas, mas estas possuem uma enorme resistência e capacidade de adaptação, formando cepas resistentes, tornaram-se então uma das espécies de maior importância responsáveis pelas infecções hospitalares e comunitárias (SANTOS et al., 2007).

4.3 Agentes antimicrobianos

Agentes antimicrobianos são substâncias que têm a capacidade de inibir o crescimento e/ou destruir microrganismos. Em relação à sua atividade antibacteriana os agentes antimicrobianos podem ser bactericidas, quando matam os microrganismos, ou bacteriostáticos, quando apenas inibem o crescimento dos microrganismos (GOLL; FARIA, 2013). Um agente antimicrobiano também pode ser classificado de acordo com outras variáveis, como quanto aos microrganismos

susceptíveis, sendo antibacteriano, antifúngico, antiviral ou antiparasitário. Em relação à sua origem os antimicrobianos podem ser antibióticos quando produzidos por microrganismos ou quimioterápicos quando produzidos sinteticamente. Podem ser classificados quanto ao seu mecanismo de ação, alterando a parede celular ou a membrana plasmática, inibindo a síntese proteica, interferindo na replicação cromossômica e também por inibição metabólica. E por último podem ser classificadas quanto ao seu espectro de ação, podendo ser ativos sobre Gram-positivas, Gram-negativas, fungos, protozoários, espiroquetas, algas e podem também ter amplo espectro de ação (MELO; DUARTE; SOARES, 2012).

Na indústria alimentícia entre os principais antimicrobianos utilizados destacam-se o cloreto de sódio, ácido sórbico, nitratos, nitritos, sulfitos e dióxido de enxofre. Com o objetivo de garantir uma alimentação segura, sem alterar a qualidade dos alimentos é que se procura por novos agentes antimicrobianos naturais (FIB, 2010a).

4.4 Atividade antibacteriana

Existem diversos métodos que podem ser empregados para prever a sensibilidade *in vitro* de bactérias aos agentes antimicrobianos. Atualmente estes métodos têm sido muito empregados em pesquisas que buscam por novos agentes antimicrobianos.

Para se avaliar quantitativamente a atividade *in vitro* de um agente antimicrobiano contra certo isolado bacteriano pode-se determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM), que é definida como a menor concentração de um agente antimicrobiano que impede o crescimento visível de um microrganismo em testes de sensibilidade por diluição em ágar ou caldo. De acordo com os valores de CIM determinados os microrganismos podem ser classificados em três categorias distintas: sensíveis, intermediários e resistentes (NCCLS, 2003b).

A atividade de um agente antimicrobiano também pode ser avaliada pela determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM), que é definida como

a menor concentração de um agente antimicrobiano capaz de matar o microrganismo.

Existem diversos fatores que podem influenciar os resultados dos métodos, como a composição do meio de cultura, os microrganismos e cepas utilizadas nos testes, o volume do inóculo, o método de extração, a capacidade do composto se difundir no meio de cultura, o pH, temperatura de incubação, entre outros fatores (RIOS; RECIO; VILLAR, 1988). Quando se trata de produtos naturais existem ainda outros fatores influenciáveis, como a origem da planta, a época da coleta, se os extratos foram preparados a partir de plantas frescas ou secas e a quantidade de extrato testado (FENNEL et al., 2004). São estes fatores os responsáveis pela divergência de resultados encontrada entre alguns autores. Os métodos utilizados para a avaliação da atividade antimicrobiana podem ser classificados em três grupos: métodos de difusão, diluição e bioautográficos.

4.4.1 Métodos de difusão

São métodos físicos fundamentados na difusão de uma substância biologicamente ativa a ser testada em um meio de cultura sólido inoculado com um microrganismo. Após a incubação, caso a substância apresente atividade antimicrobiana, ocorre o aparecimento de um halo denominado halo de inibição, onde não há o crescimento do microrganismo. Os diâmetros dos halos de inibição produzidos podem ser medidos com régua, paquímetro ou leitor de halos, e estão relacionados com a concentração da substância testada (ALMEIDA, 2007). Com relação à dimensão dos halos de inibição os microrganismos podem ser classificados como sensíveis, intermediários e resistentes.

A aplicação do método de difusão se limita a microrganismos de crescimento rápido, sendo eles aeróbios ou aeróbios facultativos. A avaliação é feita por comparação com um padrão biológico de referência como controle positivo (OSTROSKY et al., 2008).

As técnicas de aplicação da substância antimicrobiana no método de difusão podem ser por meio de discos, cilindros de porcelana, vidro ou de aço inoxidável e pela perfuração de poços em ágar (PINTO; KANEKO; PINTO, 2015). Os diferentes métodos de difusão são definidos pela maneira pela qual ocorre o contato entre a substância ou extrato a ser testado com o meio de cultura inoculado. De acordo com o tipo de contato os métodos podem ser classificados em método do disco difusão, método dos cilindros e método de perfuração dos poços (RIOS; RECIO; VILLAR, 1988).

Nestes métodos a principal vantagem é a possibilidade de se testar vários compostos por placa frente a um único microrganismo, além de utilizar pequeno volume de amostra. Porém a presença de matéria particulada na amostra a ser testada pode interferir na difusão da substância no meio de cultura (VANDEN BERGHE; VLIETINCK 1991).

O método disco difusão é rotineiramente utilizado em laboratórios de microbiologia clínica (NCCLS, 2003b). Dentre os métodos de difusão, o do disco difusão costuma ser o mais empregado em estudos. Também é o método mais adequado quanto se deseja trabalhar com extratos vegetais extraídos com solventes orgânicos, pois o solvente é evaporado do disco, antes da colocação deste no meio de cultura (RIOS; RECIO; VILLAR, 1988).

Os testes de disco difusão baseados apenas na presença ou ausência de um halo de inibição, não são aceitáveis. O tamanho do halo deve ser considerado e correlacionado com controles positivos e negativos. Para a obtenção de resultados confiáveis e reprodutíveis a metodologia utilizada deve ser padronizada (NCCLS, 2003b).

4.4.2 Métodos de diluição

Os métodos de diluição são aqueles nos quais as substâncias ou extratos a serem estudados são adicionados a um meio de cultura adequado, que pode estar na forma líquida ou sólida. O meio de cultura escolhido deve estar

previamente inoculado com o microrganismo a ser testado. Após a incubação, o crescimento do microrganismo é determinado pela comparação da densidade de turbidez da cultura microbiana com o controle negativo, que é o meio de cultivo inoculado sem a adição da substância testada, pode-se também realizar a leitura em um espectrofotômetro em comprimento de onda apropriado (VANDEN BERGHE; VLIETINCK 1991).

O método de diluição em meio líquido é o que apresenta metodologia mais complexa, entretanto é o mais preciso, e o mais recomendado para a determinação da Concentração Inibitória Mínima (RIOS; RECIO; VILLAR, 1988). Existem duas metodologias: macro e microdiluição.

A macrodiluição é feita em tubos de ensaio, o volume do meio de cultura utilizado pode variar de 1 a 10 mL. É pouco utilizado em comparação com a microdiluição e também com outros métodos, pois é um método laborioso, que consome muito tempo, requer espaço no laboratório e gera grande quantidade de resíduos (ZGODA; PORTER, 2001).

A microdiluição utiliza microplacas que possuem 96 poços permitindo a avaliação rápida de grande número de amostras, e requer pequeno volume de meio e de amostra. É um método barato, com boa reprodutibilidade, que apresenta maior sensibilidade comparada a outros métodos (ELOFF, 1998).

Quando se deseja determinar a CIM por microdiluição, para auxiliar na leitura costuma ser feita a adição de uma solução reveladora. O 2,3,5 – trifeniltetrazólio (TTC) é um indicador de oxiderredução bastante utilizado em determinações da CIM. O 2,3,5 – trifeniltetrazólio na presença de microrganismos vivos se reduz em 1,3,5 – trifenilformazano, deixando de ser incolor e assumindo uma coloração avermelhada (ROZATTO, 2012).

4.4.3 Métodos bioautográficos

O método bioautográfico é bastante difundido no estudo da química de produtos naturais, devido às facilidades encontradas no desenvolvimento do mesmo.

Permite uma avaliação qualitativa da atividade antimicrobiana de substâncias utilizando um ensaio colorimétrico. O método tem duas variantes, bioautografia direta e indireta.

A bioautografia direta consiste no preparo e na devida aplicação do produto natural a ser testado em uma placa de cromatografia de camada delgada (CCD). Em sequência o inóculo bacteriano é preparado, e a placa de CCD é submersa na suspensão bacteriana. A placa de CCD é então colocada em uma placa de Petri e incubada durante 24 horas, permitindo o crescimento do microrganismo. Após a incubação é feita a revelação do crescimento bacteriano por um ensaio colorimétrico utilizando uma solução de sal de tetrazólio, as placas são novamente incubadas, e então é feita a medição do halo de inibição de crescimento (VALGAS, 2007).

Na variante indireta do método bioautográfico a placa de CCD é devidamente preparada com o produto natural, e em seguida é recoberta com uma camada de ágar Mueller-Hinton, sendo necessário que o produto natural se difunda para o ágar. No método indireto o contato da placa com a suspensão bacteriana pode ocorrer de formas distintas: com a aplicação da suspensão bacteriana sobre o ágar com o auxílio de um swab estéril, ou então com a inoculação da bactéria ao ágar antes que este seja vertido sobre a placa, utilizando a técnica "Pour Plate". As etapas de incubação e revelação seguem o mesmo procedimento da bioautografia direta (VALGAS, 2007).

4.5 Antioxidantes

Apesar de o oxigênio ser essencial para a vida, ele está também envolvido com efeitos potencialmente prejudiciais ao corpo humano devido à formação e atividade de radicais livres, que atuam como oxidantes contribuindo para o envelhecimento e que estão relacionados com algumas doenças.

Os radicais livres são produzidos pelos próprios processos biológicos do organismo, ou por fatores exógenos, como tabagismo, poluição do ar, radiação, pesticidas e outros (SOARES, 2002).

Os radicais livres que contêm oxigênio conhecido como espécies reativas de oxigênio (EROs), incluem os radicais superóxidos, o radical hidroxila e os derivados do oxigênio que não contêm elétrons ímpares, como o peróxido de hidrogênio e o oxigênio singlete. Os lipídeos podem ser expostos a diversas condições como oxigênio, luz, calor, entre outras, que irão promover sua oxidação. A oxidação lipídica é uma reação espontânea que acontece em três etapas: iniciação, propagação e terminação (FIB, 2016).

Na indústria alimentícia durante o processamento, distribuição e armazenamento os alimentos estão sujeitos às reações de oxidação que podem resultar, além da alteração do seu valor nutricional, alterações nas suas propriedades organolépticas, como sabor, odor, cor e textura, afetando a integridade e segurança dos alimentos, devido à formação de compostos potencialmente tóxicos. As reações de oxidação podem ser evitadas ou amenizadas pela utilização de compostos antioxidantes (SOARES, 2002).

Segundo o Dossiê de Antioxidantes publicado em 2016 pela Revista Food Ingredients Brasil, os antioxidantes são substância que retardam ou impedem a oxidação de outras substâncias químicas, tendo um importante papel na manutenção do controle dos radicais livres, pois são capazes de sequestrar elétrons reativos.

Os antioxidantes podem ser classificados em primários, sinergistas, removedores de oxigênio, biológicos, agentes quelante e antioxidantes mistos.

Os antioxidantes podem ser sintéticos, amplamente utilizados pela indústria alimentícia, ou naturais, substâncias bioativas que fazem parte da constituição de diversos alimentos.

Os antioxidantes sintéticos mais utilizados na indústria de alimentos são o butil-hidroxi-anisol (BHA), butilhidroxi-tolueno (BHT), terc-butilhidroquinona (TBHQ) e propil galato (PG), mas estudos mostram que estes compostos possuem algum potencial tóxico, assim o seu uso tem restrições pelos órgãos regulatórios, e em alguns casos seu uso já é proibido. Os antioxidantes naturais são moléculas presentes nos alimentos, em pequenas quantidades, capazes de interromper a formação de radicais livres, reduzindo a velocidade de reações de oxidação dos compostos lipídicos. As principais moléculas naturais que atuam como antioxidantes

são os isômeros da vitamina E (tocoferóis), os carotenoides, vitamina C e os polifenóis.

Em busca da substituição dos antioxidantes sintéticos por antioxidantes naturais, o estudo de novos compostos com propriedades antioxidantes é impulsionado. A erva-mate é uma fonte promissora de compostos antioxidantes, até mesmo o resíduo gerado no processamento da erva-mate apresenta proeminente atividade antioxidante, como mostra o trabalho desenvolvido por Viera et al. (2009).

4.5.1 Extração

Nos últimos anos com a preocupação crescente por uma dieta mais saudável, a demanda do uso de ingredientes naturais tem aumentado concomitantemente, e os extratos tem tido cada vez mais destaque. Sinônimos de naturais, os extratos vegetais são encontrados nos mais diversos tipos de produtos, atraindo as pessoas que buscam por uma alimentação saudável.

Extratos são preparações concentradas, obtidas a partir de matérias-primas vegetais secas e preparadas por processo envolvendo um solvente. A primeira etapa do processo de fabricação do extrato consiste na separação dos compostos específicos (a droga, ou a parte da planta que será utilizada, como raiz ou folha) utilizando um solvente apropriado, seguida da etapa de concentração, eliminando quase que por completo o solvente, dessa forma obtêm-se formas terapêuticas mais convenientes ao manuseio e administração. As matérias primas podem ou não passar por um tratamento prévio, como moagem ou inativação enzimática (FIB, 2010b).

Os processos mais utilizados para extração são maceração, infusão, decocção, digestão, percolação, destilação e secagem. Para a obtenção de extratos qualitativamente superiores existem alguns processos de extração mais sofisticados, como a extração por fluido supercrítico e a extração por solvente assistida por micro-ondas.

Devido a grande variedade e quantidade de compostos bioativos presentes nos vegetais, e também pela possibilidade de interação dos compostos antioxidantes com outros componentes como carboidratos e proteínas, não existe

sistema de extração que seja satisfatório para o isolamento de todos ou apenas de classes específicas de antioxidantes presentes na amostra vegetal. Os solventes mais utilizados na extração são: metanol, etanol, acetona, água, acetato de etila, propanol, dimetilformaldeído e suas combinações (NACZK; SHAHIDI, 2004).

A extração de compostos bioativos pode ser influenciada por alguns parâmetros como a natureza e quantidade do composto bioativo em questão, do tipo de material a ser analisado, do método de extração, da natureza e concentração do solvente empregado, da temperatura e do pH.

4.5.2 Avaliação da atividade antioxidante

Pelo fato de existirem diferentes tipos de radicais livres e estes possuírem diferentes formas de atuação nos organismos vivos, não existe um método simples e universal que permita que a atividade antioxidante seja medida precisa e quantitativamente. Existem diversos métodos para avaliar a atividade antioxidante *in vitro* de substâncias biologicamente ativas. Os testes podem avaliar a peroxidação lipídica medindo o grau de inibição de oxidação, ou os testes podem medir a habilidade de sequestro de radicais livres (SÁNCHEZ-MORENO, 2002).

Uma das maneiras de se avaliar a atividade antioxidante de um composto é pela sua habilidade em sequestrar o estável radical livre 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH[•]), o elétron desemparelhado se deslocaliza por toda a molécula, conferindo-lhe estabilidade. A molécula do DPPH[•] é caracterizada por uma banda de absorção em cerca de 520 nm e por possui coloração violeta intensa, O teste é baseado na descoloração de uma solução contendo o radical DPPH[•], devido a presença de um composto capaz de doar átomos de hidrogênio, após a redução a solução reativa de coloração violeta assume uma coloração amarela (ALVES et al., 2010). Apesar de ser um teste bastante utilizado devido a sua simplicidade e rapidez, os resultados devem ser interpretados cuidadosamente, pois pode ocorrer a sobreposição de espectros de outras substâncias, como os carotenoides, com o espectro do DPPH[•] (PRIOR; WU; SCHAICH, 2005).

4.6 Compostos fenólicos

Compostos fenólicos abrangem um extenso grupo de substâncias que possuem estrutura variável, mas são quimicamente definidos como substâncias que possuem um anel aromático contendo pelo menos um substituinte hidroxílico. A diversidade estrutural deste grupo deve-se a grande variedade de combinações que ocorrem na natureza, estas combinações são classificadas em classes como fenólicos simples, ácidos fenólicos, flavonoides, ostociferóis, ligninas, taninos e xantonas. Fazem parte deste grupo desde moléculas simples até moléculas com alto grau de polimerização (ANGELO; JORGE, 2007).

Entre os antioxidantes presentes nos vegetais, os mais ativos e frequentemente encontrados são os compostos fenólicos, que são originados do metabolismo secundário das plantas, sendo essenciais para o crescimento e reprodução da mesma. Também podem ser formados em condições de estresse como infecções, ferimentos e radiações UV. Estes compostos podem estar na forma livre ou ligados a açúcares e proteínas (SOARES, 2002).

Em alimentos os compostos fenólicos contribuem para a cor, aroma, adstringência e estabilidade oxidativa.

A análise destes compostos pode-se realizada com base na quantificação de compostos fenólicos totais presentes, de algum composto fenólico específico ou apenas uma classe de compostos fenólicos. A análise destes compostos é influenciada, além da natureza do composto, pelo método de extração empregado, o padrão utilizado e pela presença de interferentes como gorduras, terpenos e clorofilas. Para a extração comumente são empregados solventes como metanol, etanol, acetona, acetato de etila, propanol, dimetilformaldeído e água, em diferentes combinações e proporções. A solubilidade dos compostos fenólicos depende da polaridade do solvente utilizado, do grau de polimerização e da interação com outros constituintes da amostra. A determinação de compostos fenólicos pode ser feita por métodos espectrofotométricos, eletroquímicos e também cromatográficos. Para a quantificação de compostos fenólicos totais em alimentos o método mais empregado é o Folin-Ciocalteu (ANGELO; JORGE, 2007).

O método espectrofotométrico Folin-Ciocalteu é baseado na redução do ácido fosfomolibdico-fosfotúngstico pelas hidroxilas fenólicas, resultando em uma coloração azul. O grupo fenólico deve estar na forma de fenolato, por isso é necessário que a solução seja alcalina. A cor formada é controlada pelo número de grupos hidroxilas ou de grupos potencialmente oxidáveis. O método pode sofrer a interferência de algumas substâncias como açúcares, ácido ascórbico e redutores, assim devem ser feita a eliminação de interferentes (ANGELO; JORGE, 2007).

5 METODOLOGIA

A estratégia para os métodos experimentais foi pautada em três etapas principais. A primeira etapa constituiu na obtenção dos extratos aquosos e hidroalcoólicos de diferentes amostras de erva-mate. Na segunda etapa foi determinada a atividade antibacteriana dos extratos. Na última etapa foi analisada a atividade antioxidante dos extratos e quantificado os compostos fenólicos totais presentes nestes extratos.

5.1 Bactérias

Para avaliação da atividade antibacteriana foram utilizadas duas espécies de bactérias: *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, estas espécies foram escolhidas, pois são comumente associadas a intoxicações alimentares e por serem cepas padrões para a realização de testes antibacterianos. Estas foram obtidas no banco de cepas do Laboratório de Biotecnologia, da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, UTFPR, no *Campus* Curitiba. Em câmara de fluxo laminar as bactérias foram ativadas em placas de Petri contendo caldo BHI (*Brain Heart Infusion*) com ágar bacteriológico, e então incubadas em estufa durante 24 horas a 37°C, e após a incubação foram conservadas dentro de sacos plásticos em geladeira a 4°C.

5.2 Preparo dos extratos

As amostras de folhas de erva-mate foram disponibilizadas pela Embrapa de Colombo, Paraná, e estas haviam sido obtidas a partir de uma mesma amostragem, e em seguida desidratadas em diferentes condições: 40°C e 60°C em estufa, em esteira sem fumaça, por liofilização e por micro-ondas, sendo

posteriormente trituradas em moinho de facas, totalizando cinco diferentes amostras. Após o recebimento das amostras, com o propósito de se obter uma granulometria uniforme, as amostras foram passadas em peneira de mesh 20 (0,841 mm), e então armazenadas em temperatura ambiente até o momento do preparo dos extratos.

Foram obtidos extratos aquosos e etanólicos das cinco amostras de erva-mate, totalizando dez extratos diferentes. Os extratos aquosos foram preparados com água quente a 70°C. Os extratos etanólicos foram obtidos com solução de etanol 40% (v/v) (HAMINIUK et al., 2011).

Os extratos brutos foram preparados em frascos Erlenmeyers pela suspensão de 1 g da amostra de erva-mate em 20 mL do solvente extrator, equivalente a uma concentração de 50 mg·mL⁻¹. Os frascos foram mantidos sob agitação constante de 130 rpm em incubadora Shaker (Marconi, MA 420) a 25,0°C durante 2 horas. Após o término da extração, os extratos foram centrifugados em uma centrífuga (Quimis, Q222T2) por 15 minutos a 2040 rpm.

5.3 Atividade antibacteriana

A atividade antibacteriana de todos os extratos obtidos foi primeiramente avaliada por microdiluição em caldo. Os extratos que apresentaram alguma atividade antibacteriana tiveram a sua Concentração Inibitória Mínima (CIM) e a sua Concentração Bactericida Mínima (CBM) determinadas.

Os testes foram realizados em duplicata, e para minimizar os riscos de contaminação foi testada uma cepa bacteriana por vez.

5.3.1 Preparo e padronização do inóculo bacteriano

O inóculo bacteriano foi preparado e padronizado segundo a metodologia do protocolo da Nature Protocols: *Agar and broth dilution methods to*

determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances, (WIEGAND; HILPERT; HANCOCK, 2008), conforme descrito a seguir.

Para a realização dos testes, primeiramente foi feito o repique das culturas bacterianas em placas de Petri contendo ágar nutriente, as placas foram incubadas a 37°C por 24 horas.

Após as 24 horas de incubação, o inóculo foi preparado por suspensão direta em solução salina estéril, para isso três a cinco colônias morfológicamente semelhantes e isoladas das placas anteriormente preparadas em ágar nutriente foram selecionadas e transferidas com o auxílio de uma alça de platina estéril para um tubo contendo solução de NaCl 0,85% (m/v), a solução foi agitada em vórtex para homogeneização.

O inóculo bacteriano foi padronizado através da escala de McFarland, utilizando como controle padrão de turbidez uma solução de BaSO₄ comercial (Probac do Brasil), equivalente ao valor de 0,5 da escala McFarland, resultando em uma suspensão com aproximadamente $1-2 \times 10^8$ UFC/mL. A turvação foi avaliada por comparação visual, tendo o auxílio de um cartão de fundo branco com linhas pretas contrastantes e uma boa iluminação.

A suspensão foi ajustada até que a sua turbidez coincidissem com a da solução padrão 0,5 da escala McFarland. Caso a turbidez da suspensão estivesse muito elevada o ajuste era feito por adição de solução salina estéril. E caso a turbidez da suspensão estivesse muito baixa o ajuste era feito por adição de mais colônias bacterianas.

Após a padronização, o inóculo foi utilizado no máximo em 15 minutos, para que não ocorresse alteração no número de células presente.

5.3.2 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi determinada pela técnica da microdiluição em caldo, em microplacas de 96 poços, de acordo com a metodologia padronizada sugerida pelo *National Committee for Clinical Laboratory Standart* no documento M7-A6 – *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard* – do NCCLS, (NCCLS 2003a) e

pelo protocolo da Nature Protocols: *Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances* (WIEGAND; HILPERT; HANCOCK, 2008).

A microplaca foi preparada de modo que o volume final em cada poço fosse de 100 μL . Uma das colunas de poços foi utilizada como controle de crescimento, contendo caldo Mueller Hinton (CMH) estéril e o inóculo bacteriano. E uma das colunas foi utilizada como controle de esterilidade contendo apenas CMH. O solvente utilizado na extração foi utilizado como controle negativo. E como controle positivo uma solução do antibiótico Amoxicilina (Prati Donaduzzi) em concentrações que variaram de 32 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ a 0,062 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ para *Escherichia coli* e de 1 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ a 0,0031 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ para *Staphylococcus aureus*.

Com exceção dos poços da primeira coluna, os demais poços foram preenchidos com 50 μL de CMH. Nos poços da primeira coluna foram adicionados 100 μL dos extratos, previamente diluídos em CMH em tubos eppendorf na proporção de 1:1. As concentrações dos extratos foram então obtidas por diluição seriada de razão 2 na própria microplaca, resultando em concentrações que variaram de 12,5 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ a 0,024 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, após a adição do inóculo.

O inóculo preparado e padronizado conforme descrito no item 5.3.1 foi diluído em CMH estéril na proporção de 1:100. Em seguida foram adicionados 50 μL do inóculo padronizado diluído em todos os poços da microplaca, exceto aos poços da coluna do controle de esterilidade. Após a adição do inóculo obteve-se uma solução de 1×10^5 UFC/mL.

Para evitar a influência nos resultados devido à condensação da solução contida nos poços, papéis filtro estéreis foram posicionados na tampa das microplacas, e então as microplacas eram incubadas a 37°C durante 16-20 horas.

A presença de turvação nos poços indicou que houve crescimento do microrganismo, e para facilitar a determinação da CIM por meio da leitura visual, foram acrescentados 30 μL de solução aquosa de 2,3,5 – trifeniltetrazólio (TTC) 0,5% (m/v) e as microplacas foram novamente incubadas a 37°C por 1 hora. Qualquer mudança na coloração foi considerada como indicativo de crescimento bacteriano.

5.3.3 Determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM)

Para a determinação da CBM, 20 μL da solução dos poços da microplaca onde não havia crescimento bacteriano visível foram transferidos para placas de Petri contendo ágar nutriente. Para evitar a influência nos resultados devido à condensação da solução, papéis filtro estéreis eram posicionados na tampa das placas, e então as placas eram incubadas a 37°C por 24 horas.

5.4 Avaliação da atividade antioxidante

A avaliação da atividade antioxidante dos extratos foi feita pelo método DPPH^{*} em duplicata e baseada na metodologia descrita por Brand-Williams, Cuvelier e Berset (1995) com algumas modificações, sendo avaliada a habilidade dos extratos de erva-mate agirem como doadores de átomos de hidrogênio transformando o radical DPPH^{*} na sua forma reduzida. Como antioxidante de referência foi utilizado o Trolox (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromo-2-ácido carboxílico), um antioxidante sintético equivalente à vitamina E.

Primeiramente os extratos brutos obtidos foram diluídos em água destilada por um fator de diluição de 50. Em seguida, em tubos de ensaio uma alíquota de 0,1 mL do extrato diluído era misturada com 3,9 mL de solução de DPPH^{*} $60 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ em etanol. Os tubos foram agitados em vórtex para homogeneização e então foram deixados em repouso ao abrigo de luz e à temperatura ambiente. Após o tempo de reação a absorbância das soluções preparadas foi medida em espectrofotômetro UV-Vis (Bel Photonics, UV-M51) a 517 nm.

Os resultados foram expressos em μmol de Trolox $\cdot\text{g}^{-1}$ de amostra e calculados a partir de uma curva padrão de Trolox frente ao DPPH^{*} construída nas concentrações de $0 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ a $1000 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$.

5.5 Determinação de compostos fenólicos totais

Seguindo metodologia proposta por Singleton e Rossi (1965), os compostos fenólicos totais dos extratos foram estimados em duplicata pelo método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu, utilizando ácido gálico como padrão.

Primeiramente os extratos brutos obtidos foram diluídos em água destilada por um fator de diluição de 60. Em seguida, em balões volumétricos de 10,0 mL uma alíquota de 150 μL do extrato diluído era misturada com 5,0 mL de água destilada, e após a adição de 500 μL do reagente de Folin-Ciocalteu a solução era deixada em repouso por 3 minutos, seguida da adição de 2,0 mL de solução aquosa de Na_2CO_3 15% (m/v), e então o volume do balão era completado com água destilada.

Os balões contendo as soluções foram deixados reagindo durante duas horas na ausência de luz, à temperatura ambiente. Após o tempo de reação a absorbância das soluções preparadas foi medida em espectrofotômetro UV-Vis (Bel Photonics, UV-M51) a 765 nm.

Os resultados foram expressos em miligramas equivalentes de ácido gálico por grama de amostra ($\text{mg EAG}\cdot\text{g}^{-1}$), e calculados a partir de uma curva padrão de ácido gálico construída nas concentrações de 50 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ a 500 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Extração

Os extratos aquosos foram preparados com água quente a 70°C, com o objetivo de simular o consumo do tradicional chimarrão e os extratos etanólicos foram obtidos com etanol 40% (v/v), todos os extratos foram preparados em uma concentração de 50 mg·mL⁻¹. A Figura 1 apresenta diferentes amostras de erva-mate peneiradas e os extratos obtidos após a etapa de agitação.



Figura 1 – Amostras de erva-mate e extratos obtidos após agitação.

Por se tratar de diferentes amostras e por ter empregado diferentes solventes extratores, os extratos obtidos eram visualmente diferentes entre si.

A avaliação da atividade antibacteriana foi realizada no mesmo dia da extração, enquanto a avaliação da atividade antioxidante e a quantificação dos compostos fenólicos totais foram sempre realizadas no dia seguinte à extração, para isso os extratos eram congelados em eppendorfs estéreis.

6.2 Avaliação da atividade antibacteriana

A avaliação inicial por microdiluição em caldo mostrou que a amostra de erva-mate preparada em estufa a 60°C não apresentou nenhuma atividade antibacteriana frente às bactérias: *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Os extratos aquosos da erva-mate preparada em estufa 40°C e da erva-mate liofilizada também não apresentaram atividade antibacteriana frente a estas bactérias. Os demais extratos apresentaram atividade antibacteriana.

As análises da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e da Concentração Bactericida Mínima (CBM) foram desenvolvidas apenas para os extratos que apresentaram atividade antibacteriana na avaliação inicial. Os extratos foram avaliados em diferentes concentrações variando de 12,5 mg·mL⁻¹ a 0,024 mg·mL⁻¹. A Figura 2 mostra uma das microplacas preparadas neste trabalho utilizando como revelador uma solução aquosa de 2,3,5 – trifeniltetrazólio (TTC) 0,5% (m/v) que na presença de microrganismos vivos é reduzida assumindo uma coloração avermelhada.

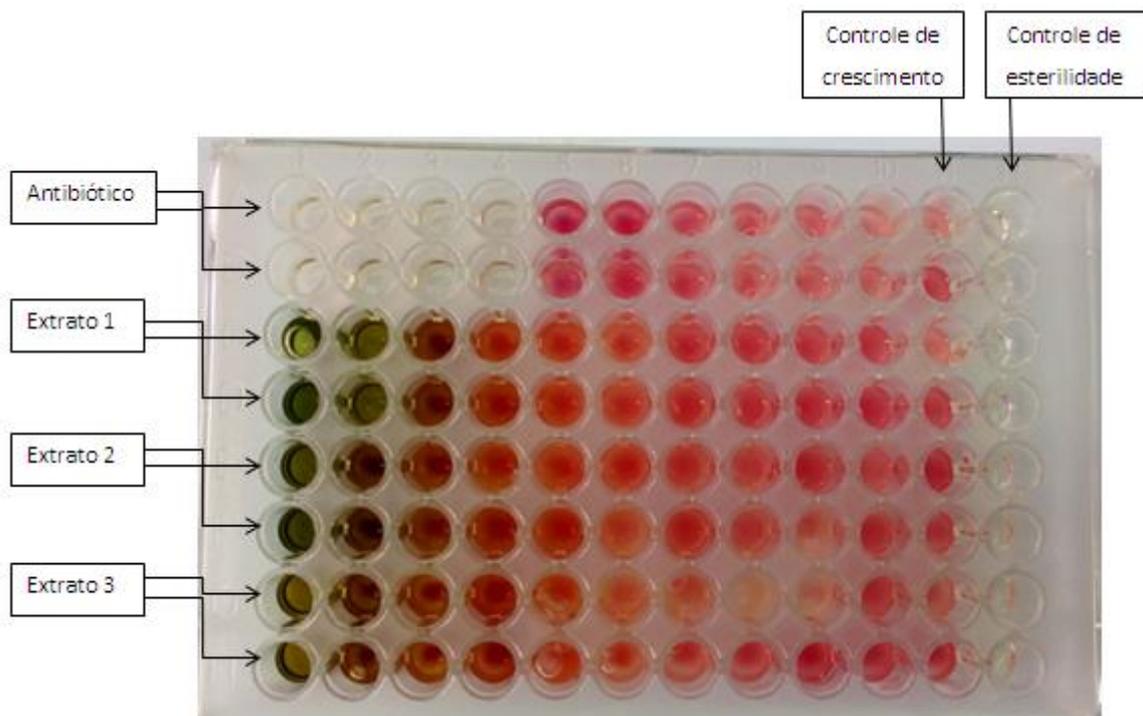


Figura 2 – Microplaca de 96 poços para análise da CIM frente à *Escherichia coli* revelada com TTC 0,5% (m/v).

A solução do antibiótico amoxicilina utilizada como controle positivo apresentou CIM igual a $4,0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ para *Escherichia coli* e $0,0062 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ para *Staphylococcus aureus*. A solução de etanol 40% (v/v) utilizada como controle negativo não apresentou nenhuma ação inibitória frente aos microrganismos testados.

Os resultados referentes à CIM dos extratos analisados estão expostos na Tabela 1.

Tabela 1 – Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos extratos aquosos (EA) e extratos etanólicos (EE) de diferentes amostras de erva-mate.

Extratos	CIM ($\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$)	
	<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
EE Liofilizado	6,25	6,25
EA Esteira sem fumaça	6,25	3,12
EE Esteira sem fumaça	6,25	3,12
EE Estufa 40°C	6,25	6,25
EA Micro-ondas	6,25	6,25
EE Micro-ondas	6,25	3,12

Os extratos apresentaram poder bacteriostático, sendo capazes de inibir o crescimento das bactérias, dificultando a sua proliferação.

Os extratos apresentaram um maior potencial antibacteriano frente à *Staphylococcus aureus*, o que pode ser relacionado à ausência de membrana celular externa e a uma menor complexidade química de sua parede celular por se tratar de uma bactéria Gram positiva, podendo ainda ter outros mecanismos enzimáticos envolvidos.

A CBM foi considerada como a menor concentração na qual não houve crescimento de colônias na superfície do meio de cultura (MARTIN, 2011).

Na faixa das concentrações testadas a maioria dos extratos apresentou poder bactericida sendo capaz de matar o inóculo bacteriano, os valores da CBM encontrados estão dispostos na Tabela 2.

Tabela 2 – Concentração Bactericida Mínima (CBM) dos extratos aquosos (EA) e extratos etanólicos (EE) de diferentes amostras de erva-mate.

Extratos	CBM (mg·mL ⁻¹)	
	<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
EE Liofilizado	6,25	6,25
EA Esteira sem fumaça	6,25	6,25
EE Esteira sem fumaça	> 12,5	3,12
EE Estufa 40°C	6,25	6,25
EA Micro-ondas	6,25	12,5
EE Micro-ondas	> 12,5	6,25

Os extratos etanólicos apresentaram maior atividade antibacteriana comparada aos extratos aquosos, devido a uma melhor extração, o que vai ao acordo com os estudos de Asolini et al. (2006) e Girolometto et al. (2011).

Os resultados obtidos indicam que os extratos de erva mate são uma fonte natural promissora que pode ser empregada no desenvolvimento de novos produtos eficientes no controle da contaminação por patógenos alimentares, mesma conclusão encontrada por Burris et al. (2012).

Com relação à atividade antibacteriana da erva-mate frente à *Escherichia coli*, não há consenso na literatura, pois a eficácia de extratos de erva-mate diverge entre diferentes autores. Os resultados obtidos neste estudo corroboram com os resultados de Burris et al. (2011) e Costa (2016), porém divergem dos resultados encontrados por Biasi et al. (2009), Carelli et al. (2011) e Martim (2011) que verificaram a ausência de atividade antibacteriana de extratos da planta frente à *Escherichia coli* ATCC 25922.

Os estudos sobre atividade antibacteriana de diferentes extratos de erva-mate divergem devido à variação da composição química das diferentes partes da planta utilizadas na preparação do extrato, como folhas, cascas e ramos, e ainda devido às diferentes condições empregadas na extração. Dentre os compostos encontrados na erva-mate os que comumente são associados à atividade antibacteriana contra patógenos de origem alimentar destacam-se a cafeína, quercetina, rutina, caempferol, teobromina e os ácidos caféico, clorogênico e quínico (BURRIS et al., 2011).

6.3 Avaliação da atividade antioxidante

Segundo Brand-Williams, Cuvelier e Berset (1995) podem ocorrer três diferentes tipos de comportamento cinético entre compostos com atividade antioxidante e o radical DPPH^{*}. Os compostos de cinética rápida que reagem rapidamente com o DPPH^{*}, completando a reação em menos de um minuto. Os compostos de cinética intermediária que chegam ao final da reação em até 30 minutos. E os compostos de cinética lenta que demoram mais de uma hora para completar a reação.

Devido a essas diferenças comportamentais, a redução do radical DPPH^{*} foi monitorada por meio do declínio da absorbância a 517 nm, em tempo inicial, após 1 minuto e a cada 15 minutos até a reação atingir um platô com valores estáveis de absorbância. A erva-mate apresentou um comportamento de cinética intermediária, completando a reação de redução do radical em 30 minutos.

Os resultados obtidos na avaliação da atividade antioxidante dos extratos de erva-mate, expressos em μmol de Trolox·g⁻¹ de amostra, estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 3 – Atividade antioxidante em μmol de Trolox·g⁻¹ amostra, em extratos aquosos (EA) e extratos etanólicos (EE) de diferentes amostras de erva-mate.

Atividade antioxidante (μmol de Trolox·g⁻¹)

Atividade antioxidante ($\mu\text{mol de Trolox}\cdot\text{g}^{-1}$)		
Amostras	EA	EE
Liofilizada	216,35 \pm 23,58	426,95 \pm 4,20
Esteira sem fumaça	634,01 \pm 9,53	843,92 \pm 0,48
Estufa 40°C	180,84 \pm 10,50	392,01 \pm 11,63
Estufa 60°C	89,13 \pm 6,14	75,99 \pm 18,90
Micro-ondas	702,54 \pm 2,10	810,12 \pm 4,04

Dentre todos os extratos analisados a maior atividade antioxidante foi observada no extrato etanólico da amostra preparada em esteira sem fumaça, com valor de 843,92 $\mu\text{mol de Trolox}\cdot\text{g}^{-1}$. Os valores encontrados neste estudo, em geral, foram superiores aos encontrados por Pagliosa (2009) que avaliou a atividade antioxidante de extratos de erva-mate frente ao DPPH* e obteve 300,33 e 250,94 $\mu\text{mol de Trolox}\cdot\text{g}^{-1}$ em extratos aquosos obtidos a partir de cascas e folhas de erva-mate, respectivamente.

Pelo fato de existirem diversos tipos de radicais livres e estes possuírem diferentes formas de atuação, não existe um método simples e universal que permita que a atividade antioxidante seja medida precisa e quantitativamente. A comparação de resultados entre estudos é dificultada pelo fato de existirem diversos métodos para avaliar a atividade antioxidante *in vitro* de substâncias biologicamente ativas e ainda devido às diversas formas de se expressar os resultados obtidos.

Neste estudo, ao comparar os resultados para uma mesma amostra, em diferentes extratos, em geral o extrato etanólico apresenta uma maior atividade antioxidante em relação ao extrato aquoso.

6.4 Determinação de compostos fenólicos totais

Para que a absorvância não ultrapassasse o valor de 1,0 os extratos brutos obtidos foram diluídos em água destilada por um fator de diluição igual a 60.

Após o tempo de reação de duas horas, na ausência de luz, as absorvâncias das soluções preparadas foram medidas em 765 nm. Os resultados obtidos na determinação dos compostos fenólicos totais presentes nos extratos de erva-mate expressos em miligramas equivalentes de ácido gálico por grama de amostra ($\text{mg EAG}\cdot\text{g}^{-1}$), estão expostos na Tabela 4.

Tabela 4 – Conteúdo de compostos fenólicos totais em $\text{mg EAG}\cdot\text{g}^{-1}$ amostra, em extratos aquosos (EA) e extratos etanólicos (EE) de diferentes amostras de erva-mate.

Conteúdo de compostos fenólicos totais ($\text{mg EAG}\cdot\text{g}^{-1}$)		
Amostras	EA	EE
Liofilizada	77,55 \pm 2,85	105,98 \pm 2,14
Esteira sem fumaça	123,28 \pm 1,50	155,95 \pm 1,21
Estufa 40°C	50,57 \pm 0,07	77,85 \pm 1,00
Estufa 60°C	14,72 \pm 5,42	14,47 \pm 4,63
Micro-ondas	153,73 \pm 3,07	135,73 \pm 3,42

A maior quantidade de compostos fenólicos totais, assim como a maior atividade antioxidante, também foi observada no extrato etanólico da amostra preparada em esteira sem fumaça, com valor de 155,95 $\text{mg EAG}\cdot\text{g}^{-1}$. Em ambos os extratos, a amostra preparada em estufa a 60°C apresentou teor de compostos fenólicos totais bastante inferior comparado às outras amostras, o que pode ser explicado pela degradação de alguns destes compostos devido a uma maior temperatura empregada na preparação da amostra.

Ao comparar os resultados para uma mesma amostra, em diferentes extratos, em geral o extrato aquoso apresenta um menor teor de compostos fenólicos totais em relação ao extrato etanólico.

O modo mais comum do consumo de erva-mate é na forma de infusão com água quente, porém alguns compostos fenólicos podem apresentar uma baixa solubilidade em solução aquosa. A utilização de um solvente com polaridade intermediária (solução de etanol 40%) permitiu uma maior extração dos compostos

fenólicos presentes na maioria das amostras de erva-mate. Entretanto, a solubilidade dos compostos fenólicos não varia somente de acordo com a polaridade do solvente utilizado na extração. Segundo Naczki e Shahidi (2004) a solubilidade destes compostos também pode ser influenciada pelo seu grau de polimerização e ainda pela interação com outros constituintes do tecido vegetal da amostra.

Comparando os resultados obtidos referentes à atividade antibacteriana e o conteúdo de compostos fenólicos totais, é possível inferir que a concentração desses compostos nos extratos esteja diretamente relacionada ao potencial antibacteriano dos mesmos (MARTIN, 2011).

Ao se comparar os resultados obtidos referentes à atividade antioxidante e o conteúdo de compostos fenólicos totais, sugere-se que os compostos fenólicos são os principais responsáveis pela atividade antioxidante da erva-mate, estando de acordo com outros estudos (BRAVO; GOYA; LECUMBERRI, 2007; PAGLIOSA, 2009). Porém, a capacidade antioxidante não depende apenas do conteúdo de compostos fenólicos, mas também do tipo de compostos fenólicos presentes e ainda da posição de hidroxilas e anéis aromáticos (BASTOS et al., 2006). Levando isso em consideração, para complementar os resultados já obtidos, seria necessário separar, identificar e quantificar os compostos fenólicos presentes nos extratos, por meio de análises cromatográficas.

Na tabela 5 estão dispostos os teores de compostos fenólicos totais encontrados em diferentes extratos de erva-mate, obtidos na literatura.

Tabela 5 – Conteúdo de compostos fenólicos totais em mg EAG·g⁻¹ amostra, em diferentes extratos de erva-mate.

Parte da planta	Extração	mg EAG·g ⁻¹	Referências
Folhas	Água fervente	145,00	ASOLINI et al.(2006)
Folhas	Etanol 80%	53,00	ASOLINI et al.(2006)
Folhas	Água à frio	77,00	BURRIS et al. (2015)
Folhas	Etanol 60%	193,90	MARTIN et al.(2011)
Folhas	Metanol 70%	173,00	MARTIN et al.(2011)
Casca	Água à 85°C	125,30	PAGLIOSA (2009)
Folhas	Água à 85°C	70,10	PAGLIOSA (2009)
Folhas	Água à frio	83,00	RACANICCI et al. (2008)
Folhas	Etanol	25,00	RACANICCI et al. (2008)
Resíduo do processamento	Etanol 80%	28,00	VIEIRA et al. (2009)
Folhas	Etanol 40%	155,95	Neste trabalho

A discrepância nos valores encontrados por diferentes autores é devida a diversos fatores como as condições ambientais e composição do solo no local de plantio, condições fisiopatológicas da planta, (ZIELINSKI et al., 2014), grau de polimerização dos compostos fenólicos, interação destes com outros constituintes do tecido vegetal (NACZK; SHAHIDI, 2004), técnicas, condições e solventes utilizados na extração (CANTERLE, 2005) e ainda qual parte da planta foi utilizada (PAGLIOSA, 2009).

Para determinar qual o grau de correlação entre duas variáveis emprega-se o coeficiente de Pearson, também chamado de coeficiente de correlação (r), quando o coeficiente de correlação é igual a 1 indica uma correlação positiva perfeita entre as variáveis. Ao analisar os resultados obtidos e a Figura 3, pode-se observar que houve boa correlação entre o conteúdo de compostos fenólicos totais e a atividade antioxidante nos extratos aquosos e etanólicos de erva-mate ($r=0,96$ e $r=0,97$, respectivamente). Os derivados cafeíol presentes na erva-mate, são em grande parte, os responsáveis pela atividade antioxidante (FILIP et al., 2000).

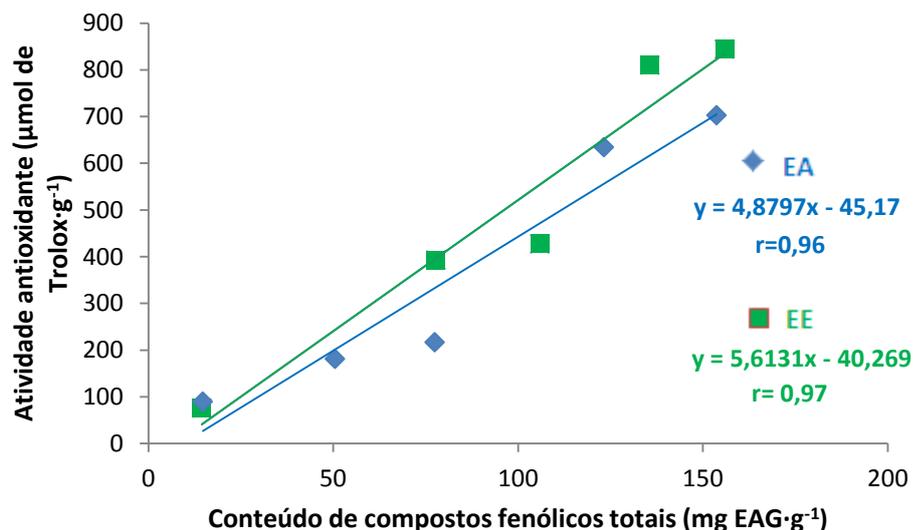


Figura 3 – Correlação entre conteúdo de compostos fenólicos totais e atividade antioxidante, em extratos aquosos (EA) e extratos etanólicos (EE) de diferentes amostras de erva-mate.

Os compostos fenólicos presentes na erva-mate diferem significativamente do chá verde (*Camelia sinensis*), conhecido por ser rico nestes compostos. A erva-mate contém altas concentrações de ácidos fenólicos, enquanto o chá verde apresenta elevadas concentrações de flavonóides (CHANDRA; MEJIA, 2004).

Os ácidos fenólicos podem ser agrupados em duas classe: os ácidos hidroxibenzóicos e os ácidos hidroxicinâmicos. A erva-mate apresenta elevado teor de compostos derivados do ácido hidroxicinâmico, principalmente os derivados do ácido cafeico, como o ácido clorogênico (BRAVO; GOYA; LECUMBERRI, 2007). Com relação aos derivados do ácido hidroxibenzóico poucos são encontrados na erva-mate, dentre eles os ácidos gálico e siríngico, conhecidos por apresentar menor atividade antioxidante (PAGLIOSA, 2009).

O ácido 5-cafeoilquínico (5-CQA) é o ácido fenólico majoritário da erva-mate. Bastos et al. (2005) determinaram que uma cuia de chimarrão contém em média 27 mg de ácido 5-cafeoilquínico. Outros compostos fenólicos comumente associados a atividade antioxidante como os ácidos clorogênico, 3,4-dicafeoilquínico, 3,5-dicafeoilquínico e 4,5-dicafeoilquínico, são encontrados em grandes quantidades na erva-mate (BRAVO; GOYA; LECUMBERRI, 2007; FILIP et al.,2001).

7 CONCLUSÃO

Ao final deste estudo, pode-se comprovar que a maioria dos extratos de erva-mate preparados apresentaram-se eficazes na inibição frente aos microrganismos *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, sendo que uma maior inibição foi verificada frente à *Staphylococcus aureus*

Com exceção dos extratos da amostra de erva-mate preparada em estufa a 60°C, os demais extratos apresentaram bons resultados com relação a atividade antioxidante e o conteúdo de compostos fenólicos totais, sendo que a solução de etanol 40% (v/v) utilizada como solvente extrator apresentou uma maior eficiência na extração de compostos com atividade antioxidante, quando comparado a água quente.

Neste estudo ficou evidente a correlação positiva entre a atividade antioxidante e teor de compostos fenólicos totais presentes nos extratos. O extrato etanólico da amostra de erva-mate preparada em esteira sem fumaça apresentou a maior atividade antioxidante no método do DPPH[•] e o maior conteúdo de compostos fenólicos totais pelo método de Folin-Ciocalteu, $843,92 \pm 0,48 \mu\text{mol de Trolox}\cdot\text{g}^{-1}$ e $155,95 \pm 1,21 \text{ mg EAG}\cdot\text{g}^{-1}$, respectivamente.

Os resultados obtidos indicam que extratos obtidos a partir de folhas de *Ilex paraguariensis*, em especial, extratos etanólicos, apresentam atividades antibacteriana e antioxidante, e considerável teor de compostos fenólicos. Considerando estas características e a rica composição química desta planta há um enorme potencial de inovação que deve ser explorado para o desenvolvimento de novos produtos, permitindo sua aplicação tecnológica nas indústrias alimentícia, farmacêutica e cosmética, requerendo estudos futuros quanto ao isolamento, purificação e identificação dos compostos bioativos.

8 SUGESTÃO PARA TRABALHOS FUTUROS

Sugere-se para trabalhos futuros que os extratos de erva-mate sejam analisados por cromatografia para que os compostos fenólicos presentes sejam separados, identificados e quantificados, possibilitando o conhecimento dos compostos presentes em cada amostra para uma melhor associação com as atividades antibacteriana e antioxidante.

Sugere-se ainda que os próximos estudos sejam voltados para a aplicação tecnológica dos extratos de erva-mate, podendo, por exemplo, serem aplicados no desenvolvimento de novos produtos como desinfetantes e antissépticos, ou ainda na composição de embalagens ativas para alimentos, por meio da tecnologia de microencapsulação, com o propósito de aumentar o tempo de vida de prateleira dos alimentos.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, A. A. P. **Atividade antimicrobiana de extratos e de compostos fenólicos e nitrogenados do café: avaliação *in vitro* e em modelo alimentar**. 2007. 135 f. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2007.
- ALVES, C. Q. et al. Métodos para determinação de atividade antioxidante *in vitro* em substratos orgânicos. **Química Nova**, v. 33, n.10, p. 2202- 2210, 2010.
- ANGELO, P. M.; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos – Uma breve revisão. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 66, n. 1, p. 1-9, 2007.
- ASOLINI, F. C. et al. Antioxidant and Antibacterial Activities of Phenolic Compounds from Extracts of Plants Used as Tea. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 9, n. 3, p. 209-215, 2006.
- BASTOS, D. H. M. et al. Essential oil and antioxidante activity of green mate and mate tea (*Ilex paraguariensis*) infusions. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 19, n. 6-7, p. 538-543, 2006.
- BASTOS, D. H. M. et al. The chlogenic acid and caffeine contente of yerba maté (*Ilex paraguariensis*) beverages. **Acta Farmacéutica Bonarense**, v. 24, n. 1, p. 91-95, 2005.
- BRACESCO, N. et al. Recent advances on *Ilex paraguariensis* research: Minireview. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 136, p. 378–384, 2011.
- BIASI, B.; GRAZZIOTIN, N. A.; HOFMANN, A. E. Atividade antimicrobiana dos extratos de folhas e ramos da *Ilex paraguariensis* A. St.-Hil., Aquifoliaceae. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 19, n. 2, p. 582-585, 2009.
- BORILLE, W. M. A.; REISSMANN, B. C.; FREITAS, S. J. R. Relação entre compostos fitoquímicos e o nitrogênio em morfotipos de erva-mate (*Ilex paraguariensis* de St. Hil.). **Boletim do Centro de Pesquisas e Processamento de Alimentos**, v. 23, n. 1, p. 183-98, 2005.

BORTOLUZZI, A. L. M. et al. Quantificação de metilxantinas e compostos fenólicos em amostras de erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.). In: CONGRESO SUDAMERICANO DE LA YERBA MATE, 4., 2006, Posadas. **Anais...** Posadas: Actas, 2006. p.143-147.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Lebensmittel Wissenschaft Und Technologie**, v. 28, p. 25-30, 1995.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção Relacionada à Assistência à Saúde**. Módulo 6: Detecção e identificação de bactérias de importância médica. Brasília: Anvisa, 2013. 150 p.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária. Portaria nº 234, de 1998. **Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade para erva-mate**. Diário Oficial da União, seção 1-E, p. 7, 25 de março de 1998.

BRAVO, L.; GOYA, L.; LECUMBERRI, E. LC/MS characterization of phenolic constituents of mate (*Ilex paraguariensis*, St. Hil.) and its antioxidant activity compared to commonly consumed beverages. **Food Research International**, v. 40, n. 3, p. 393-405, 2007.

BURRIS K. P. et al. Antimicrobial Activity of yerba mate (*Ilex paraguariensis*) aqueous extracts against *Escherichia coli* O157:H7 and *Staphylococcus aureus*. **Journal of Food Science**, v. 76, n. 6, p. 456-462, 2011.

BURRIS K. P. et al. Aqueous Extracts of yerba mate (*Ilex paraguariensis*) as a natural antimicrobial against *Escherichia coli* O157:H7 in a microbiological medium and pH 6.0 apple juice. **Journal of Food Protection**, v. 75, n. 4, p. 753-757, 2012.

BURRIS, K. P.; HIGGINBOTHAM, K. L.; STEWART, C. N., JR. Aqueous extracts of yerba mate as bactericidal agents against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in microbiological medium and ground beef mixtures. **Food Control**, v. 50, p.748-753, 2015.

CANTERLE, L. P. **Erva-mate e atividade antioxidante**. 2005. 100 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia dos Alimentos) – Centro de Ciências Rurais, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2005.

CARELLI, G. et al. Avaliação preliminar da atividade antimicrobiana do extrato de erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St. - Hil.) obtido por extração com CO₂ supercrítico. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 13, n. 1, p. 110-115, 2011.

CHANDRA, S.; MEJIA, G.E. Polyphenolic compounds, antioxidant capacity, and quinone reductase activity of an aqueous extract of *Ardisia compressa* in comparison to Mate (*Ilex paraguariensis*) and green (*Camellia sinensis*) teas. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 11, p. 3583-3590, 2004.

COSTA, D. E. M. **Atividade antioxidante e antimicrobiana da erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil) em carne de peito de frango**. 2016. 108 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Animais) – Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, Brasília, 2016.

DONADUZZI, C. M. et al. Variação nos teores de polifenóis e taninos em dezesseis progênies de erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) cultivadas em três municípios do Paraná. **Arquivos de Ciências da Saúde**, v. 7, n. 2, p. 129-133, 2003.

DUCAT, G.; QUINÁIA, O. S. Avaliação do teor de minerais da *Ilex paraguariensis* da região centro-oeste do estado do Paraná. **Revista Ciências Exatas e Naturais**, v. 6, n. 1, p. 31-42, 2004.

ELOFF, J. N. A sensitive and quick microplate method to determine the minimal inhibitory concentration of plant extracts for bactéria. **Planta Medica**, v. 64, p. 711-713, 1998.

ESMELINDRO, M. C. et al. Caracterização físico-química da erva mate: Influência das etapas do processamento industrial. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 22, n. 2, p.193-204, 2002.

FENNEL, C. W. et. al. Review: Assessing Afric medicinal plants for efficacy and safety: pharmacological screening and toxicology. **Journal Ethnopharmacology**, v. 94. n. 3, p. 205-217, 2004.

FIB. Agentes Antimicrobianos. **Revista Food Ingredients Brasil**, São Paulo, n. 15, p. 36-42, 2010a. Disponível em: <<http://www.revista-fi.com/materias/155.pdf>>. Acesso em: 27 mai. 2017.

FIB. Dossiê antioxidantes. **Revista Food Ingredients Brasil**, São Paulo, n. 36, p. 31-48, 2016. Disponível em: <<http://www.revista-fi.com/materias/516.pdf>>. Acesso em: 22 mai. 2017.

FIB. Extratos Vegetais. **Revista Food Ingredients Brasil**, São Paulo, n. 11, p. 16-20, 2010b. Disponível em: <<http://www.revista-fi.com/materias/120.pdf>>. Acesso em: 24 mai. 2017.

FILIP, R. et al. Antioxidant activity of *Ilex paraguariensis* and related species. **Nutrition Research**, v. 20, n. 10, p. 1437-1446, 2000.

FILIP, R. et. al. Phenolic compounds in seven South American Ilex species. **Fitoterapia**, v. 72, n. 7, p. 774-778, 2001.

GIROLOMETTO, G. et al. Atividade antibacteriana de extratos de erva-mate (*Ilex paraguariensis* A.St. - Hil.). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 11, n. 1, p. 49-55, 2009.

GNOATTO, S. C. B. et, al. Influência do método de extração nos teores de metilxantinas em erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil., Aquifoliaceae). **Quimica Nova**, v. 30, n. 2, p. 304-307, 2007.

GONÇALVES, A. L.; ALVES, F. A.; MENEZES, H. Estudo comparativo da atividade antimicrobiana de extratos de algumas árvores nativas. **Arquivos do Instituto de Biologia**, v. 72, n. 3, p. 353-358, 2005.

GOLL, A. S.; FARIA, M. G. I. Resistência Bacteriana como consequência do uso inadequado de antibióticos. **Brazilian Journal of Surgery and Clinical Research**, v. 5, n. 1, p. 69-72, 2013.

HAMINIUK, C. W. I. et al. Chemical antioxidante and antibacterial study of Brazilian fruits. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 46, n. 7, p. 1529-1537, 2011.

JAY, J. M. **Microbiologia de alimentos**. 6 ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. 712 p.

MARTIN, J. G. P. **Atividade antimicrobiana de produtos naturais: erva-mate e resíduos agroindustriais**. 2011. 137 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2011.

MARTIN, J. G. P. et al. Antimicrobial activity of yerba mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) against food pathogens. **Revista Argentina de Microbiología**, v. 45, n. 2, p. 93-98, 2013.

MELO, V.V.; DUARTE, I. P.; SOARES, A. Q. **Guia de Antimicrobianos**. 2012. 57 f. Guia (Coordenação de Farmácia) – Hospital das Clínicas, Universidade Federal de Goiás (HC-UFG). 1 ed. Goiânia, 2012.

NACZK, M.; SHAHIDI, F. Extraction and analysis of phenolics in food (Review). **Journal of Chromatography A**, v. 1054, n.1-2, p. 95-111, 2004.

NCCLS. **Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard - Sixth Edition**. NCCLS document M7-A6. Pennsylvania USA, 2003a.

NCCLS. **Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard - Eighth Edition**. NCCLS document M2-A8. Pennsylvania USA, 2003b.

OSTROSKY, E. A. et al. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI) de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, João Pessoa, v. 18, n. 2, p. 301-307, 2008.

PAGLIOSA, C.M. **Caracterização química do resíduo de ervais e folhas “in natura” de erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil.)**. 2009. 146 f. Dissertação (Mestrado em Ciências dos Alimentos) – Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 2009.

PINTO, T. J. A.; KANEKO, T. M.; PINTO, A. F. **Controle biológico de qualidade de produtos farmacêuticos, correlatos e cosméticos**. 4 .ed. São Paulo: Manole, 2015. 432 p.

PRIOR, R. L.; WU, X.; SCHAICH, K. Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p, 4290-4302, 2005.

RACANICCI, A.M.C., DANIELSEN, B., SKIBSTED, L. H. Mate (*Ilex paraguariensis*) as a source of water extractable antioxidant for use in chicken meat. **European Food Research and Technology**. v.277, p. 255-260, 2008.

RIOS, J. L.; RECIO, M. C.; VILLAR, A. Screening methods for natural products with antimicrobial activity: a review of the literature. **Journal Ethnopharmacology**, v. 23, p. 127-149, 1988.

ROZATTO, M. R. **Determinação da atividade antimicrobiana *in vitro* de extratos, frações e compostos isolados de *Arrabidaea brachypoda***. 2012. 101 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2012.

SÁNCHEZ-MORENO, C. Review: Methods Used to Evaluate the Free Radical Scavenging Activity in Foods and Biological Systems. **Food Science and Technology International**, v. 8, n. 3, p. 121-137, 2002.

SANTOS, A. L. *et al.* *Staphylococcus aureus*: Visitando uma cepa de importância hospitalar. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 43, n. 6, p. 413-423, 2007.

SCHMALKO, M. E.; ALZAMORA, S. M. Color, chlorophyll, caffeine, and water content variation during yerba mate processing. **Drying technology**, v. 19, n. 3, p. 599-610, 2001.

SINGLETON, V. L.; ROSSI, J. A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolibdic-phosphotungstic acid reagents. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 16, p. 144-158, 1965.

SOARES, S. E. Ácidos fenólicos como antioxidantes. **Revista de Nutrição**. Campinas, v. 15, n. 1, p. 71-81, 2002.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 10 ed. Porto Alegre: Artmed, 2012. 894 p.

TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. 4 ed. São Paulo: Atheneu, 2004. 718 p.

VALGAS, C. Screening methods to determine antibacterial activity of natural products. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 38, n. 2, 2007.

VANDEN BERGHE, D. A.; VLIETINCK, A. J. Screening methods for antibacterial and antiviral agents from higher plants. In: **Methods in Plant Biochemistry**, v. 6, p. 47-69, 1991.

VIEIRA, M. A. et al. Análise de Compostos Fenólicos, Metilxantinas, Tanino e Atividade Antioxidante de Resíduo do Processamento da Erva-Mate: Uma Nova Fonte Potencial de Antioxidantes. In INTERNATIOCAL WORWSHOP - ADVANCES IN CLEANER PRODUCTION, 2., 2009, São Paulo. **Anais...** São Paulo: UNIP, 2009, p. 1-11.

WIEGAND, I.; HILPERT, K.; HANCOCK, R. E. W. Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. **Nature Protocols**, v. 3, n. 2, p. 163-175, 2008.

ZGODA, J. R.; PORTER, J. R. A conveniente microdilution method for screening natural products against bactéria and fungi. **Jounal Pharmaceutical Biology**. v. 9. p. 221-225, 2001.

ZIELINSKI, A. A. F. et al. A comparative study of the phenolic compounds and the *in vitro* antioxidant activity of different Brazilian teas using multivariate statistical techniques. **Food Research International**, v. 60, p. 246-254, 2014.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Antimicrobial Resistance**: Global Report on Surveillance. France, 2014. Disponível em: <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/112642/1/9789241564748_eng.pdf?ua=1>. Acesso em: 22 mai. 2017.