

**ELOÁ RAMALHO DE CAMARGO**

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS EXTRATOS  
BRUTOS, RESÍDUOS AQUOSOS E DAS FRAÇÕES DE ACETATO DE  
ETILA DE *Ilex paraguariensis* St. Hil. (Erva Mate)**

Bragança Paulista

2010

**ELOÁ RAMALHO DE CAMARGO**

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS EXTRATOS  
BRUTOS, RESÍDUOS AQUOSOS E DAS FRAÇÕES DE ACETATO DE  
ETILA DE *Ilex paraguariensis* ST. HIL. (Erva Mate)**

Dissertação apresentada ao Curso de  
Pós-Graduação *Stricto Sensu* em  
Ciências da Saúde da Universidade  
São Francisco para obtenção de título  
em mestre em Ciências da Saúde.

Bragança Paulista

2010

ii

QV766.....Camargo, Eloá Ramalho de.¶  
C176a.....Avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos¶  
.....brutos, resíduos aquosos e das frações de acetato de etila.¶  
.....de Ilex paraguariensis St. Hil. (erva-mate) / Eloá¶  
.....Ramalho de Camargo. --- Bragança Paulista, 2010.¶  
.....85 p.¶

¶  
.....Dissertação (mestrado) — Programa de Pós-¶  
.....Graduação Stricto Sensu em Ciências da Saúde da¶  
.....Universidade São Francisco.¶  
.....Orientação de: Marcelo Lima Ribeiro.¶

.....¶  
.....1. Erva-mate. 2. Extratos brutos. 3. Resíduos aquosos e frações. 4. Atividade bactericida mínima. 5. Plantas¶  
.....medicinais. I. Título. II. Ribeiro, Marcelo Lima.¶

¶  
Ficha catalográfica elaborada pelas bibliotecárias do Setor de¶  
Processamento Técnico da Universidade São Francisco.¶



---

**BANCA EXAMINADORA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

---

---

Orientador: Prof<sup>o</sup> Dr. Marcelo Lima Ribeiro

---

---

Membros:

---

---

1 - Prof<sup>o</sup> Dr. Marcelo Lima Ribeiro

---

---

2 – Prof<sup>o</sup> Dr. Lúcio Fábio Caldas de Ferraz

---

---

3- Prof<sup>a</sup> Dr. Natália Reiko Sato Miyasaka

---

---

Suplentes:

---

---

1 - Prof<sup>o</sup> Dr. Marcelo Lima Ribeiro

---

---

2 – Patrícia Oliveira de Carvalho

---

---

3 – Dr. Marcelo Sady Plácido Ladeira

---

**Programa de Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências da Saúde da  
Universidade São Francisco.**

**Data: 26 / 02 /2010**

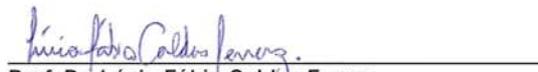


CAMARGO, Eloá Ramalho de. "Avaliação da Atividade Antimicrobiana de Extratos Brutos, Resíduos Aquosos e Frações de Acetato de Etila de *Ilex paraguariensis* St. Hil. (Erva Mate)". Dissertação defendida e aprovada no Programa de Pós Graduação *Stricto Sensu* em Ciências da Saúde da Universidade São Francisco em vinte e seis de Fevereiro de 2010 pela Banca examinadora constituída pelos professores:



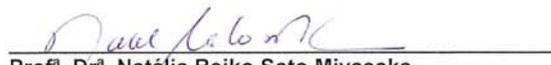
---

**Prof. Dr. Marcelo Lima Ribeiro - Orientador e Presidente**  
Universidade São Francisco



---

**Prof. Dr. Lúcio Fábio Caldas Ferraz**  
Universidade São Francisco



---

**Prof. Dr. Natália Reiko Sato Miyasaka**  
Universidade São Francisco

CÂMPUS DE BRAGANÇA PAULISTA Av. São Francisco de Assis, 218 - CEP 12916-900 Fone (11) 4034-8000 - FAX (11) 4034-1825  
CÂMPUS DE CAMPINAS Rod. Gen. Milton Tavares de Lima, 1572 - CEP 13083-680 - Distrito de Barão Geraldo - Fone: (19)3754-3300  
CÂMPUS DE ITATIBA Rua Alexandre Rodrigues Barbosa, 45 - CEP 13251-900 Fone (11) 4534-8000 - FAX (11) 4524-1933  
CÂMPUS DO PARI - SÃO PAULO Rua Hannemann, 352 - Pari - CEP 03031-040 Fone (11) 3315-2000 - FAX (11) 3315-2036

*A minha mãe, a Marisa Alvarez e a Sara Wood, pelo exemplo de força, garra, determinação, amor e generosidade.*

## AGRADECIMENTOS

A DEUS por me dar forças pra não desistir dos meus objetivos.

Ao Prof<sup>o</sup> Dr. Marcelo Lima Ribeiro por tudo que fez por mim durante esses anos, por me dar a oportunidade de ser sua aluna, de participar de um dos seus projetos e me ensinar a trabalhar com pesquisa. Por toda a atenção e paciência.

Aos meus Amigos da UNIFAG Tanila, Karim, Wlad, Nathalia, Demétrius, Bia, Daniel, Juliana, Carol, Simone, Rafael, Erica, Angélica, pela amizade, pelo apoio, incentivo, compreensão, pelas horas de descontração no laboratório.

A Marisa pela ajuda e orientação nos últimos anos, pelo companheirismo e conselhos e por todo incentivo.

A meus pais e minhas irmãs, aos meus tios Mauro, Cristina, Val, Silvana, “Foca” pelo apoio, amor, estímulo, em todos os momentos da minha vida.

Aos meus amigos Aline, Sandra, Garbas e Emanuele, por estarem ao meu lado nos bons e maus momentos, pela amizade.

Sem o apoio de vocês não seria possível a realização deste trabalho, portanto fica aqui o meu muito obrigado.

A Prof<sup>a</sup> Grace Gosmann e a todas as suas alunas do laboratório de fitoquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), em especial a Adriana Barlette por tudo que fizeram por mim, pela amizade, e companheirismo por todos os momentos inesquecíveis.

Aos funcionários do Laboratório de Microbiologia em especial a Sônia, e todas as pessoas que direta ou indiretamente contribuíram para realização deste trabalho.

A CAPES pela concessão da bolsa de estudo.

“ O insucesso é apenas uma oportunidade para recomeçar de novo com mais inteligência.”

Henry Ford

## RESUMO:

A Erva Mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) é muito consumida em países da América do Sul, suas folhas são usadas para o preparo de chimarrão, chás, tererê. Esta possui diversas propriedades benéficas à saúde tais como atividade antioxidante, estimulante, auxilia na digestão lenta e atividade antimicrobiana. Acredita-se que tais atividades biológicas possam ser atribuídas aos constituintes químicos encontrados nesta espécie tais como os compostos fenólicos, metilxantinas, saponinas, taninos, e minerais. Sabe-se que a redução na eficácia terapêutica a diversos antimicrobianos é preocupante, visto que há um aumento de microrganismos patogênicos resistentes a estes. Assim, a procura de novas substâncias que apresentem atividade antimicrobiana tem sido de grande interesse científico nos últimos anos. Dessa forma, o presente trabalho teve como objetivo a obtenção e caracterização dos extratos brutos, resíduos aquosos e das frações de acetato de etila da erva mate verde fresca, seca e do produto comercial Mate Leão, por cromatografia em camada delgada. Além disso avaliou-se a atividade antimicrobiana frente às linhagens bacterianas Gram-negativas como *Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae*, *Salmonella typhimurium*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, e Gram-positivas, *Bacillus cereus*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus* pelo método qualitativo de difusão em disco e quantitativamente através da Concentração Bactericida Mínima. Os resultados obtidos com a caracterização revelaram a presença de rutina e ácido clorogênico nos extratos brutos, resíduos aquosos hidroetanólicos e aquosos, entretanto, nas frações de acetato de etila folha verde e seca hidroetanólicas e seca aquosa, ainda não foi identificado os compostos que exerçam atividade antimicrobiana. As linhagens bacterianas se mostraram resistentes quando avaliadas por difusão em disco. Entretanto, foram observados valores de CBM entre 0,625 a 20 mg/mL dos diferentes extratos, resíduos e frações de acetato de etila. Sendo que *Staphylococcus aureus* e *Bacillus cereus* foram as espécies que apresentaram maior sensibilidade aos extratos.

Palavras Chave: Erva mate, extratos brutos, resíduos aquosos e frações, atividade bactericida mínima

## Abstract

Yerba Mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) is very popular in countries of South America, its leaves are used to prepare mate, teas, tererê. This has many beneficial health properties such as antioxidant activity, stimulating, helps to slow digestion and antimicrobial activity. It is believed that these biological activities can be attributed to the chemical constituents found in species such as phenolic compounds, methylxanthines, saponins, tannins, and minerals. It is known that the reduction in the efficacy of many antimicrobials is worrying, since there is an increase of pathogens resistant to these. Thus, the search for new substances which have antimicrobial activity has been of great scientific interest in recent years. Thus, this study aimed to obtain and characterization of crude extracts, wastewater and fractions of ethyl acetate of green mate cool, dry and commercial product Mate Leao, by thin layer chromatography. Also evaluated the antimicrobial activity against strains of Gram-negative bacteria such as *Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae*, *Salmonella typhimurium*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, and Gram-positive bacteria *Bacillus cereus*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus* by means of diffusion disk and quantitatively by the Minimal Bactericidal Concentration (CBM). The results of the characterization revealed the presence of rutin and chlorogenic acid in crude extracts, aqueous wastes and aqueous hydroethanolic, however, the fractions of ethyl acetate and dried green leaf phytochemical and dry water, not yet identified compounds that perform activities antimicrobial. The bacterial strains proved resistant when evaluated by disk diffusion. However, it showed CBM between 0.625 to 20 mg / mL of different extracts, fractions and residues of ethyl acetate. Since *Staphylococcus aureus* and *Bacillus cereus* were the species most sensitive to the extracts.

Keywords: *Yerba mate*, crude extract Wastewater extract and fractions, minimal bactericidal concentration.

## **Lista de Abreviaturas siglas**

AcOEt: acetato de etila

ATCC: American Type Culture Colection

DMSO: Dimetilsulfóxido

Frç: Fração

Hidroetn: hidroetanólico

IBGE: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

LDL: Lipoproteína de baixa densidade

MRSA: *Staphylococcus aureus* meticilina resistente

OMS: Organização Mundial da Saúde

TSA: Tripticaseína e Soja

## Lista de Tabela

Tabela 1 - Linhagens de bactérias Gram-negativas utilizadas para os testes microbiológicos.	41
Tabela 2 - Linhagens de bactérias Gram-positivas utilizadas para os testes microbiológicos.	42
Tabela 3 - Resultados difusão em disco medida dos halos em mm. ....	48
Tabela 4 - Avaliação da concentração bactericida mínima (CBM) do extrato bruto, resíduo aquoso e da fração de acetato de etila do Mate Leão®. ....	50
Tabela 5 - Avaliação da concentração bactericida mínima (CBM) do extrato bruto da folha verde fresca hidroetanólico, resíduo aquoso folha verde fresca <i>Ilex</i> hidroetanólico, e da fração de acetato de etila. ....	51
<b>Tabela 6</b> - Avaliação da concentração bactericida mínima (CBM) do extrato bruto da folha seca <i>Ilex</i> aquoso, resíduo aquoso folha seca <i>Ilex</i> aquoso, e da fração de acetato de etila folha seca <i>Ilex</i> . ....	52
Tabela 7 - Avaliação da concentração bactericida mínima (CBM) do extrato bruto da folha seca hidroetanólico, resíduo aquoso folha seca hidroetanólico, e da fração de acetato de etila folha seca. ....	53

## Lista de Figura

<b>Figura 1</b> - Plantio de mudas de erva mate ( <i>Ilex paraguariensis</i> St. Hil.), Jardim Botânico, Porto Alegre.....	29
Figura 2 - Organograma do processo de extração. ....	39
Figura 3 - Placa de CBM indicando crescimento e inibição das linhagens bacterianas pelos extratos de erva mate. ....	44
Figura 4 - Presença de rutina no resíduo aquoso Mate Leão. 1-Rutina; 2-Extrato bruto Mate Leão®; 3-Fração Acetato Mate Leão; 4-Resíduo aquoso Mate Leão; 5-Ac. Clorogênico; Reagente natural luz visível; BAW 5:1:4. Os círculos indicam a presença de rutina. ....	45
Figura 5 - CCD – presença de rutina nos extratos brutos, resíduos aquosos.....	46
Figura 6 - CCD presença de ácido clorogênico nos extratos brutos, resíduos aquosos . ....	47
Figura 7 - CCD – presença de ácido clorogênico no extrato bruto Mate Leão, resíduo aquoso Mate Leão e fração de acetato de etila Mate Leão. ....	47

## SUMÁRIO

<b>1.</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>15</b>
1.1.	<b>MICROORGANISMOS E ANTIMICROBIANOS</b> .....	<b>15</b>
1.1.1.	Bactérias Gram-positivas.....	18
1.1.1.1.	<i>Bacillus cereus</i> .....	18
1.1.1.2.	<i>Enterococcus faecalis</i> .....	19
1.1.1.3.	<i>Staphylococcus aureus</i> .....	19
1.1.2.	Bactérias Gram-negativas.....	20
1.1.2.1.	<i>Escherichia coli</i> .....	20
1.1.2.2.	<i>Enterobacter cloacae</i> .....	21
1.1.2.3.	<i>Salmonella thyphimurium</i> .....	21
1.1.2.4.	<i>Klebsiella pneumoniae</i> .....	22
1.1.2.5.	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	22
1.2.	<b>ATIVIDADE ANTIMICROBIANA</b> .....	<b>23</b>
1.3.	<b>PRODUTOS NATURAIS</b> .....	<b>24</b>
1.4.	<i>Ilex paraguariensis</i> – <b>HISTÓRICO</b> .....	<b>27</b>
1.5.	<b>CLASSIFICAÇÃO TAXONÔMICA</b> .....	<b>28</b>
1.6.	<b>ÁREAS DE DISTRIBUIÇÃO E PRODUÇÃO</b> .....	<b>30</b>
1.7.	<b>PROCESSAMENTOS DA ERVA MATE</b> .....	<b>32</b>
1.7.1.	Chimarrão e Tererê.....	32
1.7.2.	Mate Tostada - Produto Comercial Mate Leão®.....	33
1.8.	<b>PROPRIEDADES BIOLÓGICAS E COMPOSTOS QUÍMICOS DA ERVA MATE</b> 34	
<b>2.</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>36</b>
<b>3.</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>37</b>
3.1.	<b>OBTENÇÃO DO MATERIAL VEGETAL</b> .....	<b>37</b>
3.2.	<b>PREPARAÇÃO E FRACIONAMENTO DOS EXTRATOS</b> .....	<b>37</b>
3.2.1.	Fracionamento dos Compostos Bioativos da Erva Mate.....	38
3.2.2.	Caracterização dos Extratos Através de Cromatografia em Camada Delgada... 40	
3.2.3.	Rendimento dos Extratos.....	40
3.3.	<b>MANUTENÇÃO DOS MICROORGANISMOS</b> .....	<b>41</b>
3.4.	<b>AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA</b> .....	<b>42</b>
3.4.1.	Preparo dos Inóculo.....	42
3.4.2.	Difusão em Disco.....	42
3.4.3.	Concentração Bactericida Mínima (CBM) por Microdiluição.....	43
<b>4.</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>45</b>
4.1.	<b>ANÁLISE CROMATOGRÁFICA</b> .....	<b>45</b>
4.2	<b>TESTES DE SUSCEPTIBILIDADE AOS EXTRATOS</b> .....	<b>48</b>
4.2.1	Difusão em Disco.....	48
4.2.2	Concentração Bactericida Mínima.....	49
<b>5.</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	<b>54</b>
<b>6.</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	<b>61</b>
<b>7.</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>62</b>
<b>8.</b>	<b>ANEXO I</b> .....	<b>71</b>

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. MICRORGANISMOS E ANTIMICROBIANOS

Dentre os diferentes grupos de patógenos causadores de infecções hospitalar estão fungos, vírus e bactérias. No entanto, o grupo que mais se destaca é o das bactérias que constituem a flora humana e que normalmente não trazem riscos a indivíduos saudáveis, embora possam causar infecções em indivíduos com estado clínico comprometido (ANVISA, 2004).

As bactérias são seres procarióticos relativamente simples, e a grande diversidade de espécies desses microrganismos pode ser diferenciada por diversos fatores como morfologia, composição química, as necessidades nutricionais, atividades bioquímicas e a fonte de energia. A membrana citoplasmática situada no interior da parede celular tem como função servir como uma barreira seletiva, produção de energia por transporte de elétrons, duplicação do DNA e secreção de enzimas. (TRABULSI, *et al.*, 2004; SCHAECHTER *et al.*(2002).

Envolvendo a parede celular pode ocorrer uma terceira camada, a cápsula. No interior da célula, além do citoplasma, encontra-se uma região correspondente ao núcleo, chamada nucleóide, e grânulos diversos. Frequentemente ocorrem prolongamentos filamentosos que partem da superfície bacteriana, são os flagelos e as fimbrias (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 1997).

A parede celular é uma estrutura complexa, semi-rígida responsável pela morfologia da célula (bacilo ou bastonetes, cocos e espiraladas). Tem como função prevenir a ruptura da célula bacteriana devido à entrada de água, além de ser essencial para a divisão e o crescimento celular (BLACK, 1996).

As bactérias podem ser divididas em Gram-positivas e Gram-negativas, de acordo com a constituição da parede celular, e o que as diferencia são as propriedades de permeabilidade e os componentes de superfície (SCHAECHTER *et al.*, 2002). Nas bactérias Gram-positivas, a parede consiste de muitas camadas de peptidoglicana,

formando uma estrutura espessa e rígida, e contém ácidos teiônicos (formados a partir de glicerol e ribitol) (TORTORA *et al.*, 2005).

Em contrapartida, a parede de bactérias Gram-negativas é mais complexa que a das Gram-positivas, sendo formada de poucas camadas de peptidoglicanas e uma membrana externa, sendo esta formada por uma dupla camada lipídica: uma camada interna composta de fosfolipídeos e uma externa contendo lipopolissacarídeos e proteínas (TORTORA *et al.*, 2005).

A membrana externa das bactérias Gram-negativas é hidrofílica, mas componentes lipídicos das moléculas constituintes conferem propriedades hidrofóbicas também. A membrana externa forma uma barreira adicional à entrada de algumas substâncias, como antibióticos (SILVA *et al.*, 1999; TRABULSI *et al.*, 2004).

Para manter o metabolismo celular a membrana externa é permeável a algumas substâncias hidrofílicas como: açúcares, aminoácidos, e certos íons. Para isso, proteínas de membrana denominadas porinas formam canais de entrada destas substâncias (TORTORA *et al.*, 2005; PELCZAR *et al.*, 1996).

O que separa a membrana externa da plasmática é o espaço periplasmático composto de camada de peptidoglicana e diversas proteínas que participam do transporte de soluto para dentro das células, além de enzimas (proteases, lipases, nucleases) a qual a membrana é impermeável. Também apresentam enzimas como a  $\beta$ -lactamases, responsável pela inativação de algumas drogas, que fazem com que microrganismos se tornem resistentes a muitos antimicrobianos (SCHAECHTER *et al.*, 2002).

Mesmo com a ação diversificada dos antimicrobianos, a exposição excessiva aos fármacos por longos períodos contribuíram para o desenvolvimento de diversos mecanismos de resistências bacterianas (WRIGHT, 2005). Os agentes antimicrobianos são classificados de acordo com a estrutura química, mecanismo de ação, espectro de ação, entre outros (RANG *et al.*, 2007). De acordo com o mecanismo de ação, os antimicrobianos podem ser classificados em:

1. Inibidores de Síntese de Parede celular:

Antibióticos de parede celular atuam produzindo uma parede celular bacteriana com defeitos estruturais e atuam sobre o processo de replicação celular. Para

a inibição de síntese de parede celular são utilizados penicilinas, cefalosporinas, bacitracinas e vancomicina (TORTORA *et al.*, 2005).

## 2. Inibidores de Síntese de Proteínas:

A síntese protéica sofre interferências durante os seguintes processos: na formação do RNA-mensageiro, na fixação do RNA-mensageiro ao ribossoma, por alterações no ribossoma e na fixação do RNA-transportador ao ribossoma, ou seja, inibição da tradução e transcrição do material genético. Entre os antibióticos que interferem a síntese protéica estão o cloranfenicol, a eritromicina, Estreptomicina e as Tetraciclina (TORTORA *et al.*, 2005).

## 3. Inibidores da Síntese de Ácidos Nucleicos:

Alguns antibióticos interferem nos processos de replicação e transcrição do DNA dos microrganismos. Algumas drogas com esse modo de ação apresentam uso limitado devido à interação com o DNA e o RNA dos mamíferos. Outras são mais utilizadas na quimioterapia porque têm maior grau de toxicidade seletiva. Para a inibição da síntese de ácidos nucleicos são utilizadas na quimioterapia rifampicinas e quinolonas por apresentarem maior grau de toxicidade seletiva (TORTORA *et al.*, 2005).

## 4. Inibidores da Membrana Citoplasmática:

Quando as moléculas dos antibióticos se intercalam na membrana provocam sua desorganização alterando sua permeabilidade seletiva com a saída de elementos vitais da célula como fosfatos, íons, purinas, e ácido nucleicos ou a entrada de substâncias nocivas ao metabolismo bacteriano, resultando em morte celular (RANG *et al.*, 2007; TRABULSI *et al.*, 2004). Os fármacos utilizados podem ser classificados em:

- Fármacos que desorganizam a membrana celular citoplasmática: tirociclina, polimixinas.
- Fármacos que produzem poros na membrana citoplasmática: gramicidina.

## 5. Inibidores do Metabolismo dos Folatos:

Alguns agentes que interferem no metabolismo de folato na célula bacteriana por competitividade, bloqueando a biossíntese de tetraidrofolato, o qual atua como carregador de fragmentos do carbono-um e é necessário para o término da síntese do DNA, RNA, e proteínas da parede celular.

- Inibidor da síntese do ácido pteróico: sulfonamidas

- Inibidores da dihidrofolato redutase: trimetoprim

Com o aumento de resistência microbiana aos medicamentos normalmente indicados para tratamento e controle de diversas infecções, medidas defensivas a serem tomadas incluem o controle do uso de antimicrobianos, pesquisas que ajudem a compreender os mecanismos de resistência microbiana (NASCIMENTO *et al.*, 2000), e a busca por novas drogas com ação antimicrobiana. Produtos naturais de origem vegetal têm sido investigados por diversos pesquisadores em todo mundo, como uma estratégia para obtenção de novos compostos com propriedades terapêuticas, drogas sintéticas ou naturais que possam auxiliar ou controlar a disseminação desses microrganismos (TAVARES, 2000; MIMS *et al.*, 1999; LIMA, 2001; SCHAECHTER *et al.*, 2002).

### **1.1.1. Bactérias Gram-positivas**

#### ***1.1.1.1. Bacillus cereus***

Estudos epidemiológicos mostram que a maioria de surtos por contaminação alimentar diagnosticados estão fortemente relacionados à patógenos veiculados a alimentos preparados em locais como Unidades de Alimentação e Nutrição. Diversos microrganismos estão envolvidos na contaminação de alimentos, dentre eles *Bacillus cereus*, uma bactéria Gram-positiva, possui forma de bastonete, e apresenta motilidade, é formadora de esporos, e é considerado um agente etiológico de doenças de origem alimentar. *Bacillus cereus* é normalmente encontrado no solo seu reservatório natural. No entanto, devido a resistência de seus esporos, pode ser

encontrado na natureza, contaminando alimentos, vegetais, cereais, condimentos, carne bovina, suína e de frango, laticínios, sorvetes, pudins, carne cozida, sopas, pratos à base de vegetais e arroz cozido (HARMON *et al.*, 1992).

### **1.1.1.2. *Enterococcus faecalis***

O gênero *Enterococcus* constitui-se de bactérias Gram-positivas que se dispõem aos pares e em curtas cadeias, e são catalase negativos encontrados normalmente no trato gastrointestinal, no trato genital feminino e da cavidade bucal, porém pode ser encontrado também no trato urinário, uretra masculina e vesícula biliar. Esses microrganismos são resistentes a variações extremas de temperatura, de ambientes, ou seja, hipotônicos e hipertônicos, ácidos e alcalinos. Mais de 90% das infecções humanas enterocócicas são causadas por *E. faecalis*, sendo as demais por *E. faecium*. Doenças relacionadas a outras espécies desse gênero são raras (PARADELLA *et al.*, 2007).

Nos Estados Unidos estudos revelaram que os *Enterococcus* tornaram-se o segundo microrganismo mais comumente observado em infecções cirúrgicas, infecções nosocomiais e do trato urinário, e a terceira mais comum de bacteremia hospitalar (d' AZEVEDO *et al.*, 2004). Entre os mecanismos de resistência relacionados a esse gênero variando entre resistências intrínsecas e adquiridas, destacam-se os *Enterococcus* resistentes a vancomicina-VRE um dos medicamentos mais usados para o tratamento de indivíduos com infecções provocadas por essas cepas (ABADIA-PATINO *et al.*, 2004).

### **1.1.1.3. *Staphylococcus aureus***

Na década de 30, o uso de sulfanilamidas parecia ter solucionado o problema de contaminação e de doenças infecciosas por *Staphylococcus aureus*. Mas nas décadas de 50 e 70 surtos epidêmicos frequentes provocados por contágio por este microrganismo trouxeram novamente a preocupação quanto a sua resistência agora a penicilina e o surgimento de linhagens multirresistentes (MRSA) (SILVA, 2007).

O gênero *Staphylococcus* pertence à família *Micrococcae* e compreende várias espécies dentre elas o *Staphylococcus aureus*. Segundo sua classificação morfológica descrita em (TRABULSI *et al.*, 2004) são cocos Gram-positivos e quando observados por microscopia aparecem agrupados em cachos semelhantes aos de uva. Geralmente não-encapsulado, com colônias que apresentam coloração amarelo-ouro. Em indivíduos saudáveis são encontrados na pele e nas fossas nasais, entretanto pode causar infecções piogênicas como (celulite), até infecções mais graves na pele como (foliculite, furúnculo), pneumonia, meningite, endocardite, septicemia, entre outras. (JAWETZ *et al.*, 2005).

## **1.1.2. Bactérias Gram-negativas**

### ***1.1.2.1. Escherichia coli***

É um bacilo Gram-negativo, pertence à família *Enterobacteriaceae*, encontrado no trato intestinal de seres humanos e animais, e faz parte da microbiota normal, embora esteja relacionada a diversas infecções. *Escherichia coli* apresenta uma diversidade patogênica por produzirem enterotoxinas e são classificadas em cinco categorias: enteroxigênica -ETEC, enteroinvasora -EIEC, enteropatogênica – EPEC, êntero-hemorrágica – EHEC e enteroagregativa - EaggEC, de acordo com o grau de invasibilidade celular distintas por causarem enterites e gastroenterites por mecanismos diferentes (KONEMAN *et al.*, 2008; MIMS *et al.*, 1999).

Além ser considerada a causa mais comum de infecção no trato urinário, meningite, e outras infecções extra-intestinais e a infecções hospitalares (JAWETZ *et al.*, 2005).

### **1.1.2.2. *Enterobacter cloacae***

A bactéria *Enterobacter cloacae* é um bacilo Gram-negativo pertencente à família *Enterobacteriaceae* são anaeróbios facultativos, portanto capazes de fermentar glicose e lactoses como fonte de carbono durante seu processo metabólico (TORTORA *et al.*, 2005). Entre as espécies clinicamente significativas, encontram-se *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter agglomerans*, e *Enterobacter sakazakii* (KONEMAN *et al.*, 2008).

As espécies de *Enterobacter* dificilmente são agentes primários de infecção, normalmente são isoladas de espécimes clínicos, de pacientes hospitalizados e 70% das amostras de *Enterobacter* isoladas correspondem à *E.cloacae* (TRABULSI *et al.*, 2004).

Normalmente são isoladas de amostras biológicas, encontram-se amplamente distribuídas em solo, na águas, esgoto, e vegetais, fazem parte da microbiota entérica. *Enterobacter cloacae* está associada a várias infecções oportunistas que afetam as vias urinárias, o trato respiratório, as feridas cutâneas e podem causar septicemia e meningite (KONEMAN *et al.*, 2008).

### **1.1.2.3. *Salmonella typhimurium***

O gênero *Salmonella* é constituído de mais 2300 variedades sorológicas. Deve ser levado em consideração os diferentes sintomas apresentados pelos pacientes em decorrência da variação no mecanismo de patogenicidade, que não está relacionado apenas ao tipo sorológico, mas também a idade e estado imunológico do paciente. Normalmente a *Salmonella typhimurium* provoca, em adultos, apenas enterocolites que evoluem sem complicações, no entanto em crianças pode invadir a circulação causando infecções em outros órgãos (SCHAECHTER *et al.*, 2002)

#### **1.1.2.4. *Klebsiella pneumoniae***

*Klebsiella pneumoniae* é um bacilo Gram-negativo, normalmente encontrado no intestino, também está relacionado a infecções do aparelho urinário, endocardites e vários tipos de infecções pós-cirúrgicas, além de causar pneumonia lobar (TRABULSI *et al.*, 2004).

Um dos maiores problemas relacionados à contaminação por *Klebsiella pneumoniae* ocorre em unidades pediátricas com crianças imunodeprimidas. A incidência de cepas de *Klebsiella pneumoniae* produzindo enzimas betalactamases de espectro expandido (ESBLs), nos Estados Unidos situa-se em torno de 5%. Na Europa, esta prevalência pode situar em torno de 14% a 16%. As ESBLs são geralmente transmitidas através de plasmídios. Como os plasmídios são facilmente transmitidos entre diferentes membros das enterobactérias, a acumulação de genes de resistência resulta em cepas que possuem plasmídios que codificam para multirresistência. As ESBLs produzidas por *Klebsiella pneumoniae* são a principal causa de aumento da resistência às cefalosporinas normalmente utilizadas para o tratamento de indivíduos (MENEZES *et al.*, 2007).

#### **1.1.2.5. *Pseudomonas aeruginosa***

Segundo TRABULSI (2004), *Pseudomonas aeruginosa* é um bacilo Gram-negativo, encontrado normalmente em solo e plantas e em ambiente hospitalares (água, equipamentos, utensílios, desinfetantes). Sua ampla distribuição ambiental é resultado de poucas exigências para seu crescimento. É um microrganismo natural da microbiota do intestino e da pele, embora se comporte como oportunista em pacientes imuno comprometidos (SOUZA *et al.*, 2007).

Por apresentar diversos fatores estruturais e toxinas que estimulam sua virulência é um microrganismo de grande importância clínica, estando envolvido em varias implicações clínicas em ambiente hospitalar. Indivíduos imunocomprometidos com neutropenia, diabetes mellitus, queimaduras extensas, em

indivíduos com processo respiratório comprometido, que tenham passado por processos invasivos e que façam uso de ventilação mecânica, são muito suscetíveis a infecções por *P. aeruginosa* (TORTORA *et al.*, 2005). Uma das características das *Pseudomonas* é a capacidade de substituir o oxigênio por nitrato como o aceptor final dos elétrons. Este processo de respiração anaeróbica fornece tanta energia quanto a respiração aeróbica, e causam perda significativa do nitrogênio presente nos fertilizantes e no solo. Sua habilidade de utilizar proteínas e lipídeos contribui para degradação de alimentos (TORTORA *et al.*, 2005).

## 1.2. ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

Os flavonóides têm como função vegetal, a formação de complexos de pigmentos, proteção contra crescimento microbiano, filtro contra radiação UV e contra ataque de insetos. Dentre as atividades biológicas estudadas nos últimos anos estão antimicrobiana, antiinflamatória, antioxidante, proteção contra peroxidação lipídica, proteção contra doenças cardíacas (SILVA *et al.*, 2004).

Os ácidos fenólicos podem ser divididos em três grupos. O primeiro é composto pelos ácidos benzóicos, e são os ácidos fenólicos mais simples encontrados na natureza. O segundo é formado pelos ácidos cinâmicos, os mais comumente encontrados no reino vegetal. O terceiro grupo é representado pelos ácidos fenólicos, a combinação mais importante destes ácidos ocorre com o ácido caféico, o qual, associado a um álcool-ácido cíclico, denominado ácido quínico, origina o ácido clorogênico (SOARES, 2002).

A *Ilex paraguariensis* é uma planta rica em compostos bioativos, alguns autores avaliaram o potencial antimicrobiano de extratos hidroetanólicos das folhas verdes da erva mate. Estes autores observaram a inibição no crescimento de linhagens bacterianas tais como *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina, *Staphylococcus aureus* spp, *Streptococcus pyogenes* e *Staphylococcus saprophyticus* (BOTORIN, 2006). Segundo estes autores tais resultados poderiam ser atribuídos a sua composição química que apresentam diversos compostos dentre eles: alcalóides, cafeína, teobromina

e teofilina, taninos, flavonóides e várias saponinas, onde a maior concentração de caféina encontra-se em suas folhas (LORENZI e MATOS, 2002).

Com as diversas aplicações de uso alternativo da erva mate, pesquisas no âmbito microbiológico, farmacológico e biotecnológico para determinar seus princípios ativos, para posteriormente seja possível sua aplicação comercial e terapêutica de forma segura. Uma vez que o uso de plantas medicinais no Brasil contribui significativamente para os cuidados básicos com a saúde e para o tratamento de infecções comuns. No entanto, muitas plantas são utilizadas sem nenhuma evidência científica de sua eficácia terapêutica (BOTORIN, 2006).

### **1.3. PRODUTOS NATURAIS**

O uso de plantas para tratamento de enfermidades, através de chás (infusão, decocção, macerado), banho, unguento, cataplasma e tinturas é uma prática comum e tão antiga quanto a civilização humana, sendo possível encontrar registros que descrevem as terapias desenvolvidas por antigos povos da China, Egito, Roma, Ásia, e as propriedades medicinais de diversas plantas (ALMEIDA, 1993).

Segundo OLIVEIRA e GOKITI (2000), a farmacognosia é o termo utilizado para descrever o estudo de drogas e medicamentos de origem natural, sendo na maioria de origem vegetal. Essa área da farmacologia é subdividida em áreas mais específicas, como por exemplo, a farmacoquímica (fitoquímica) que estuda a origem, a síntese e as formas de extração de compostos naturais.

A fitoterapia deriva de duas palavras gregas: *phyton*, que significa planta, e *therapeia*, que conclui a idéia de tratamento de enfermidades no qual são empregados vegetais frescos, drogas vegetais, ou extratos vegetais preparados com esses dois tipos de matérias-primas (OLIVEIRA e GOKITI, 2000).

Secretaria de Vigilância Sanitária, segundo a portaria no. 6 de 31 de janeiro de 1995, acrescenta que fitoterápico é “todo medicamento obtido e elaborado utilizando-se exclusivamente de matérias-primas vegetais tendo como característica a profilaxia, cura, levando em consideração o conhecimento da eficácia e dos riscos do seu uso, a reprodutibilidade e constância de sua qualidade. Sendo produto acabado, embalado e

rotulado. Em sua preparação podem ser utilizados adjuvantes farmacêuticos permitidos na legislação vigente. No entanto, não podem ser incluídas substâncias ativas de outras origens, quando não for considerado produto fitoterápico qualquer substância ativa, mesmo que de origem vegetal, isolada ou mesmo suas misturas”.

Os termos plantas medicinais, drogas vegetais e princípios ativos são definidos diferentemente para que não hajam erros conceituais. Planta medicinal é considerada todo vegetal que contém em um, ou em vários de seus órgãos, substâncias que podem ser empregadas para fins terapêuticos, ou que sejam precursores de substâncias utilizadas para tais fins (OLIVEIRA e GOKITI, 2000). Drogas vegetais são todos os vegetais, parte deles ou seus produtos derivados, que a após passar por processo de coleta, preparo e conservação, ainda possuam composição e propriedades que possibilitem o seu uso no estado bruto, componente de um medicamento, ou com necessidade farmacêutica (OLIVEIRA *et al.*, 1991).

Uma das características principais da droga é a presença de princípios ativos, que é definido por OLIVEIRA e GOKITI, (2000) como substâncias quimicamente definidas presentes nas matérias-primas e nos fitoterápicos responsáveis pela atividade, ou seja, pela ação terapêutica desses materiais. Em 1978, a OMS ( Organização Mundial da Saúde) deu início a um programa que enfatizou o uso de plantas medicinais, onde a população de baixo poder aquisitivo pudesse fazer uso de medicamentos com menores custos e que fossem destituídos de efeitos colaterais (OLIVEIRA e GOKITI, 2000).

O desenvolvimento de novos fármacos a partir de produtos naturais tem apresentado alguns benefícios como maior eficácia terapêutica, diminuição de possíveis efeitos colaterais, variedade de estruturas químicas e homólogas que possam ser incorporadas aos medicamentos. Uma vez que muitos medicamentos convencionais têm custo de produção elevado, considerando ainda o tempo gasto com pesquisas. Uma das principais razões para falta de acessibilidade está relacionada a questões financeiras, medicamentos com preços inacessíveis a população com menor poder aquisitivo (HARVEY, 2000; STROHL, 2000; LAWRENCE, 1999).

Pesquisas realizadas por AKERELE (1993) mostraram que 65 a 80% da população mundial recorrem à medicina popular devido à falta condições financeiras para realizar um tratamento farmacológico tradicional, por morarem em regiões afastadas de centros urbanos onde possam receber tratamento em hospitais públicos. A

OMS reconhece a importância do potencial terapêutico das plantas, mas faz advertências quanto ao uso e preparo inadequado, e recomenda cuidados se considerarmos a falta de conhecimento sobre os possíveis efeitos colaterais com uma administração conjunta a medicamentos prescritos (CALIXTO, 2000; DE SMET, 1997; FARNSWORTH, 1994; MOERMAN, 1991).

A fitoterapia é utilizada para o tratamento de doenças há vários séculos e o uso de plantas medicinais está relacionado à medicina popular de diversas partes do mundo, é notável o avanço científico envolvendo estudos para o conhecimento e obtenção de novos compostos com propriedades terapêuticas (FILHO e YUNES, 1997).

Segundo FILHO e YUNES (1997), uma grande diversidade de plantas tem seu potencial terapêutico investigado, trabalhos científicos em várias áreas têm como objetivo avaliar e caracterizar atividades terapêuticas em relação às composições químicas e princípios ativos. Com o desenvolvimento de novos métodos de análise e integração de profissionais de várias áreas, as estruturas moleculares das plantas vêm ganhando espaço e interesse por demonstrarem efeitos farmacológicos e biológicos de grande relevância.

Embora existam em todo o globo terrestre 250.000 espécies de plantas, apenas uma pequena porcentagem tem sido avaliada fitoquimicamente, e suas frações obtidas e submetida a um screening para determinar suas atividades biológicas é ainda menor. No Brasil apenas 8% das espécies vegetais nativas foram analisadas com o propósito de obtenção de novas moléculas bioativas (PIMM *et al.*, 1995).

Com o conhecimento obtido com trabalhos relacionados às propriedades terapêuticas das plantas foi possível obter inúmeros medicamentos de extrema importância para medicina como os digitálicos, quinina, atropina, pilocarpina, artemisinina, além de algumas drogas usadas no tratamento de câncer como: vimblastina, vincristina, taxol, campotecinas (SIMÕES *et al.*, 2007).

Não só no Brasil, mas como em países de todo mundo vem crescendo cada vez mais a procura de plantas com potencial terapêutico. Dentre inúmeras plantas estudadas destaca-se a *Ilex paraguariensis* St. Hil, popularmente conhecida como erva mate. Esta é muito consumida em diversos países da América do Sul, como: Paraguai, Uruguai, Argentina e Brasil, sendo a região sul a maior produtora e consumidora do país. Suas

folhas são utilizadas principalmente para o preparo de chá, chimarrão e terêre (CANSIAN *et al.*, 2008).

As propriedades farmacológicas das folhas da erva mate têm sido largamente estudadas ao longo dos anos e têm demonstrado ter ação terapêutica descritas pela medicina popular para o tratamento de: artrites, reumatismo, doenças hepáticas e gastrointestinais (auxilia na digestão lenta), diurético, além de ser estimulante do sistema nervoso central e possuir funções biológicas, tais como: ação antioxidante; antiinflamatória; imunomodulatória e anticancerígena (GUGLIUCCI, 1995). De acordo com HECK e MEJIA (2007), essas qualidades podem ser atribuídas aos diversos compostos biativos encontrados na planta.

A erva mate tem apresentado atividade antimicrobiana, estudos demonstram que extratos etanólicos preparados com as folhas da erva mate verde inibiram o crescimento de linhagens bacterianas como *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Salmonella enteritidis* e *Escherichia coli* (GIROLOMETTO *et al.*, 2009), *Listeria monocytogenes* e *Pseudomonas fluorescens* (HONGPATTARAKERE e JOHNSON, 1999).

#### **1.4. *Ilex paraguariensis* – HISTÓRICO**

O primeiro registro que se tem do consumo da erva mate é de 1554. As folhas da planta eram utilizadas pelos índios do Guaíra (Paraná) para o consumo, em um porongo, um canudo de taquara, com um trançado de fibras na ponta feito para que pequenos fragmentos das folhas não passassem. A planta foi chamada pelos Guaranis de caá-i (água de erva saborosa), mas era também conhecida por diversas outras denominações dentre elas: chá-do-paraguai, chá-dos-jesuítas (FILIP *et al.*, 1998; FILIP, LÓPEZ e FERRARO, 1999), chá-das-missões, mate-do-paraguai, congonha, congonha-das-missões, congonha, erva, mate-legítimo, mate verdadeiro, entre outras (GOSMANN, 1989).

O impulso maior para a comercialização da erva mate ocorreu a partir do século XVI com os Jesuítas, que na época já estudavam o sistema vegetativo da planta, sendo os primeiros no cultivo sistemático e a produzirem mudas, para o consumo na forma de chimarrão nos estados do sul do Brasil (Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul) e tererê no Paraguai e Mato Grosso do Sul (COSTA, 1989). No período entre 1864 a 1870, com a Guerra do Paraguai, foi proibida as exportações da erva-do-paraguai pelo rio Paraná para o rio do Prata. Com isso muitos comerciantes se instalaram no Paraná transformando Curitiba num centro de exportação, chamando a atenção de importadores argentinos. A predominância brasileira no mercado ervateiro teve duração até 1930, chegando ao fim com a concorrência argentina no mercado (DA CROCE e FLOSS, 1999).

## **1.5. CLASSIFICAÇÃO TAXONÔMICA**

Com a vinda ao Brasil do naturalista francês August de Saint Hilaire em 1820, amostras da erva mate foram recolhidas para a identificação taxonômica da planta. Com o seu retorno a França dois anos mais tarde, entregou a Academia de Ciências do Instituto da França um relatório propondo a classificação da erva mate como *Ilex paraguariensis* St. Hil, por ser idêntica a espécie encontrada no Paraguai (DA CROCE e FLOSS, 1999) (Figura 1).



**Figura 1** - Plantio de mudas de erva mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.), Jardim Botânico, Porto Alegre.

Segundo DA CROCE e FLOSS (1999), a erva mate apresenta a seguinte classificação botânica:

**Subdivisão:** Angiospermae

**Classe:** Dicotiledôneas

**Subclasse:** Archiclamydeas

**Ordem:** Celastrales

**Família:** Aquifoliaceae

**Gênero:** *Ilex*

**Espécie:** *paraguariensis*

**Nome científico:** *Ilex paraguariensis* St. Hilaire

**Nome popular:** erva mate

Esta família é representada por aproximadamente 600 espécies, sendo que 400 pertencem ao gênero *Ilex*. No Brasil são encontradas aproximadamente 60 espécies desta família (CANSIAN, 2008)

A erva mate é uma árvore perene, de altura variável de 3 a 5 m. No entanto, quando em floresta nativa pode chegar a 25 m de altura e 70 cm de diâmetro (CARVALHO, 2003). O tronco é cilíndrico, reto e pouco tortuoso, fuste (parte do

tronco da árvore desprovida de ramos) e curto, normalmente atingindo 7 m de comprimento (CANSIAN, 2008).

As folhas são simples alternas, geralmente estipuladas, margem irregular serrilhada ou dentada o terço da base geralmente lisa, com ápice obtuso; nervuras laterais pouco impressas por cima e salientes por baixo (GILBERTI, 1994; EMATER, 1991; MACEDO e CHIEA, 1986; REITZ e EDWIN, 1967).

As flores estão localizadas nas axilas das folhas, são pequenas, polígamas, com cálice e corola de constituição tetrâmera, pedunculadas e com quatro pétalas, são consideradas dióicas, com plantas femininas e masculinas separadamente (CASIAN, 2008). O período de floração ocorre de setembro a dezembro (OLIVA, 2007; CANSIAN, 2008).

Os frutos consistem numa drupa globosa de 4 a 6 mm de diâmetro, tetralocular, de superfície lisa, de cor violácea, quase preta quando madura, com 4 a 5 sementes e polpa mucilaginosa. Apresenta frutificação abundante e a disseminação é feita por pássaros. No endocarpo (fruto-semente), está aderida internamente a semente, tegumento membranáceo, castanho claro, forma variável, endosperma carnosos; embrião minúsculo apical e rudimentar. O amadurecimento dos frutos ocorre nos meses de janeiro e março (OLIVA, 2007; CANSIAN, 2008).

Em relação a reprodutividade, a planta pode ser considerada dióica, entretanto apesar de ser encontrado pistilo e estames em todas as flores, os estames são estéreis e nas plantas masculinas o pistilo aborta (BRAGAGNOLO *et al.*, 1980). Neste caso a única forma de polinização é a fecundação cruzada (ZAMPIER, 2001; FOSSATI, 1997).

## **1.6. ÁREAS DE DISTRIBUIÇÃO E PRODUÇÃO**

A erva mate é uma espécie tolerante a sombra, que cresce na Floresta Ombrófila Mista (floresta com Araucária), em altitudes de 500 a 1500 m, em clima subtropical, clima úmido, com temperaturas variando entre períodos mais quentes superiores e inferiores a 22°C, um ecossistema associado à Mata Atlântica, onde pode atingir densidades de centenas de árvores/ha (MIRANDA e URBAN, 1998).

A área de ocorrência natural é de aproximadamente 540 000 Km<sup>2</sup> entre o Brasil (Argentina (Corrientes, Misiones), Paraguai (Alto Parana, Amambay, Caaguazu, Canendiyu, Central, Guairá, Itapua, Misiones, San Pedro) e Uruguai (noroeste), entre as latitudes 21° S e 30° S e longitudes de 48° 30' W até 56° 10' W (HECK e MEJIA, 2007).

No Brasil, segundo OLIVEIRA e ROTTA (1985), a erva mate pode chegar a cobrir uma área de 450. 000 Km<sup>2</sup> (5% do território brasileiro), normalmente encontrado nos estados: (Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Paraná, Rio Grande do Sul, Rio de Janeiro, Santa Catarina, São Paulo). A erva mate é encontrada em solo pobre, ou seja, baixos níveis de nutrientes, pH baixo e alto teor de alumínio (HECK e MEJIA, 2007).

A erva mate tem um papel importante não só na cultura social, mas também econômica. A indústria tem demonstrado interesse na utilização da planta não só para comercialização de bebidas, mas também de outros produtos como cosméticos e para higiene (CANSIAN *et al.*, 2008). Em 1997, dados apresentados no CONGRESSO SUL-AMERICANO DE ERVA MATE, a produção anual mundial de erva mate atingiu 500 mil toneladas, sendo que 260 mil toneladas foram produzidas na Argentina, 180 mil toneladas no Brasil e apenas 30 mil no Paraguai. No Brasil, por ser atividade econômica central no sul do país, o cultivo da erva mate gera em torno de R\$ 150 milhões aos produtores, envolvendo 600 empresas e gerando 700 mil empregos com o cultivo da planta.

Segundo MEDRADO *et al.* (2002), desde o início do plantio da erva mate, a maneira inadequada de cultivo e colheita (principalmente em áreas nativas), sem medidas preservacionistas, deram lugar a produção agrícola, provocando uma diminuição gradativa da produção de erva mate, que em 2004 foi de 246.766 toneladas segundo IBGE (2005).

Segundo dados do IBGE (2008), a produção anual brasileira de erva mate foi de 206.000 t em 2001, 246.837 toneladas em 2004, e de 233.360 toneladas em 2006. Neste último ano, a participação do Paraná foi de 152.971 toneladas, representando cerca de 65 % da produção nacional, sendo o município de São Mateus do Sul o maior produtor (14 % da produção nacional).

## **1.7. PROCESSAMENTOS DA ERVA MATE**

A erva mate é um produto alimentar e faz-se necessário alguns cuidados com a finalidade de evitar qualquer tipo de contaminação que possa vir a ocorrer. Deve ser observado no momento da colheita se as folhas não apresentam contaminação por insetos ou se estão sujas de terra. A higienização do material durante todo o processo de preparação consiste de várias etapas como sapeco, secagem, armazenamento, peneiramento, e preparação do chá mate tostado. A depender do processamento o rendimento industrial pode variar. Normalmente, após todas as operações de pós-colheita a erva mate sofre uma redução em seu peso, da ordem de 50 a 60% conforme o estado de maturação das folhas e as condições do processo de beneficiamento (EMBRAPA, 2009).

### **1.7.1. Chimarrão e Tererê**

O processamento da erva mate para chimarrão consiste basicamente de três etapas: sapeco, secagem e cancheamento. O sapeco é realizado junto ao fogo direto e consiste na passagem rápida dos ramos com folhas sobre as chamas do sapecador. O equipamento consiste de um cilindro metálico, perfurado e inclinado através do qual a erva colhida passa recebendo as chamas. Esta etapa tem por função a retirada da umidade superficial e inativação de enzimas (peroxidase e polifenoloxidase) que causam a oxidação do produto (ESMELINDRO *et al.*, 2002). Assim, o sapeco deve ser realizado logo após a colheita, no prazo de até 24 h, para evitar a fermentação, que é favorecida pela umidade e temperatura, causando a perda da qualidade da erva mate colhida (MACCARI JÚNIOR e SANTOS, 2000).

A temperatura média da erva na entrada do sapecador é de 400°C e na saída é de 65°C. O tempo de residência oscila em torno de 8 minutos. Neste processo é realizada a retirada da umidade superficial (ESMELINDRO, 2002), impedindo que as folhas se tornem pretas/pardas (oxidadas), mantendo uma coloração uniforme, de verde-amarelado a verde-oliva e desprendendo um aroma agradável. Caso contrário, a

coloração passa a verde-escuro ou preto, com aspecto queimado (BATESTIN e FINZER, 2003; VALDUGA, 2003).

A etapa de secagem pode ser realizada em dois tipos de secadores mecânicos - rotativo e de esteira. A principal diferença entre os dois tipos de secadores está relacionada com o contato da matéria-prima com a fumaça durante o processo de secagem. No secador rotativo, a fumaça entra em contato direto com o produto, e no secador de esteira, o contato é indireto, causando menores danos à matéria-prima. O tempo de residência e a temperatura média da erva nos secadores dependem das características operacionais de cada um. No secador de esteira, o tempo médio é de 3 horas e a temperatura varia entre 90 e 110°C. No secador rotativo, o produto permanece em contato direto com a fumaça por aproximadamente 30 minutos. No entanto, a temperatura não apresenta a mesma uniformidade da utilizada no secador de esteira, sendo que na entrada do secador a temperatura média é de 350°C e na saída, 110°C (ESMELINDRO, 2002).

O cancheamento é a etapa que consiste na trituração da erva-mate, após o processo de secagem. É realizada em trituradores ou cancheadores e tem o objetivo de reduzir o tamanho das folhas e dos ramos secos, que em seguida são submetidos ao soque, através de uma rosca sem fim ou, mecanicamente, por meio de uma bateria de pilões, até atingir a granulometria desejada (MENDES, 2005).

### **1.7.2. Mate Tostada - Produto Comercial Mate Leão<sup>®</sup>**

A erva mate padronizada para ser tostada passa por um sistema de forno com fogo indireto semelhante ao que se usa para torrefação de café, para então dar origem ao chá mate tostado. Após tostado o mate passa por um processo de extração, por água quente e vapor sob pressão, em colunas extratoras, onde são retirados os sólidos solúveis. O líquido extraído (extrato) é adoçado transformando-se em xarope. O extrato é desidratado em contato com ar quente transformando-se em mate solúvel (EMBRAPA, 2009).

É importante considerar que fatores naturais interferem diretamente nos componentes físico-químicos da erva mate. Também devem ser considerados os

sistemas de processamento do mate, que além desta interferência, ainda determinam a qualidade do produto e suas características organolépticas (ESMELINDRO, 2002).

## **1.8. PROPRIEDADES BIOLÓGICAS E COMPOSTOS QUÍMICOS DA ERVA MATE**

Em 1944, alguns compostos foram isolados da erva mate entre eles foram encontrados: celulose, dextrina, glicose, legumina, albumina, cafeína, teofilina, cafearina, cafamarina, ácido matetânico, ácido fólico, ácido cafêico, clorofila e colessterina (VALDUGA, 1995). Outros autores discutem a presença de flavonóides, terpenóides, metilxantinas, saponinas, taninos, carotenóides, aminoácidos, ácidos graxos, carboidratos, proteínas, glicídios, vitaminas e minerais (ALIKARIDIS, 1987; FILIP *et al.*, 2001; BRENELLI, 2003; DUCAT e QUINÀIA, 2004; REISSMANN e CARNEIRO, 2004; BORILLE *et al.*, 2005; GNOATTO *et al.*, 2005; BORTOLUZZI, 2006; GNOATTO *et al.*, 2007). A composição química da erva mate e de outras plantas pode variar consideravelmente. Isto ocorre por que a presença de compostos químicos nas plantas pode ser afetada dependendo de estágio de desenvolvimento da planta, da época da colheita, das características climáticas e das condições do solo (VALDUGA *et al.*, 1995).

Os benefícios atribuídos ao consumo de erva mate estão relacionados aos, metabólitos secundários produzidos pela planta, que possuem ação antimicrobiana, diurética, digestiva, cicatricial e estimulante, cardioprotetora, oxidação do LDL *in vitro*, antioxidante, efeito protetor a danos induzidos ao DNA *in vitro*, aterosclerose, efeito termogênico, melhora tolerância à glicose, anti-obesidade (FILIP *et al.*, 2000; GORZALCZANY *et al.*, 2001; VIDOR *et al.*, 2002; GONÇALVES *et al.*, 2005; KOWALCZYK *et al.*, 2006; MARTINS *et al.*, 2008; MIRANDA *et al.*, 2008; ARÇARI *et al.*, 2009; DUTRA *et al.*, 2009).

Com o aumento na incidência de doenças infecciosas provocadas por resistência bacteriana, principalmente relacionada a pacientes hospitalizados e imunocomprometidos, é de grande importância e de interesse científico a procura de

novas substâncias, que apresentem atividade antimicrobiana, obtidas principalmente de plantas.

Sendo assim este trabalho teve como intuito avaliar a atividade antimicrobiana de diferentes extratos obtidos a partir de folhas da erva mate frente a bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, na tentativa de se encontrar substâncias capazes de atuarem como antimicrobiano.

## 2. OBJETIVOS

### Objetivo geral

- ✓ Avaliar a atividade antimicrobiana dos extratos brutos, dos resíduos aquosos e das frações de acetato de etila das folhas verdes frescas e secas da erva mate e do produto comercial Mate Leão<sup>®</sup> (*Ilex paraguariensis* St. Hil.).

### Objetivos específicos

- ✓ Caracterizar os extratos obtidos a partir da erva mate verde fresca e seca e o produto comercial Mate Leão<sup>®</sup>.
- ✓ Avaliar qualitativamente a ação antimicrobiana *in vitro* dos extratos brutos e dos resíduos aquosos e das frações de acetato de etila da erva mate verde fresca e seca, e do Mate Leão<sup>®</sup> frente às bactérias Gram-negativas *Salmonella typhimurium*, *Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, e frente às bactérias Gram-positiva, *Bacillus cereus*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, pelo método de difusão em disco.
- ✓ Determinar quantitativamente a Concentração Bactericida Mínima (CBM) dos extratos brutos, dos resíduos aquosos e das frações de acetato de etila frente aos microrganismos utilizados.

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1. OBTENÇÃO DO MATERIAL VEGETAL**

As folhas e ramos de *Ilex paraguariensis* A. St. Hil. foram coletados em área cultivada no Sítio Olho D'Água no município de Soledade/RS em novembro de 2008, no período da manhã com temperatura de aproximadamente 20°C. Parte do material foi seco em estufa de ar circulante a temperatura de 30°C durante 15 dias. Outra parte do material foi utilizada na forma fresca.

O produto comercial de Mate Leão® (solúvel) foi gentilmente cedido pela empresa Leão Júnior S.A.

#### **3.2. PREPARAÇÃO E FRACIONAMENTO DOS EXTRATOS**

As folhas verdes e picadas foram maceradas em etanol comercial na proporção de 1 kg de material vegetal em 10 L de etanol 70%, durante 7 dias. Uma segunda maceração foi realizada após a filtração do primeiro macerado. Os dois filtrados foram reunidos e o etanol foi evaporado em evaporador rotatório. Esse extrato foi denominado “Extrato bruto folha verde *Ilex* fresca hidroetanólico”.

Um kilo das folhas secas e picadas foram maceradas em 10 L de etanol 70% durante 7 dias. Uma segunda maceração foi realizada após a filtração do primeiro macerado. Os dois filtrados foram reunidos e o etanol foi evaporado em evaporador rotatório. Esse extrato foi denominado “Extrato bruto folha seca *Ilex* hidroetanólico”.

As folhas secas e picadas foram maceradas na proporção de 1 kg de material vegetal em 10 L de água destilada, durante 8 horas sob agitação. Uma segunda maceração foi realizada após a filtração do primeiro macerado. Os dois filtrados foram reunidos e o extrato foi liofilizado. Esse extrato foi denominado “Extrato bruto folha seca *Ilex* aquoso”.

O extrato denominado Extrato Bruto Mate Leão® não foi preparado foi utilizado o produto comercial.

### **3.2.1. Fracionamento dos Compostos Bioativos da Erva Mate**

Os resíduos aquosos e as frações de acetato de etila foram obtidos pelo método de particionamento com solvente de diferentes polaridades. Utilizou-se 250 mL da fase aquosa remanescente de cada extrato preparado a partir das folhas verdes frescas e secas (macerados realizada com álcool ou água), adicionou-se 1000 mL de água destilada e fracionou-se com o solvente acetato de etila (4 x 300 mL) em funil de separação. Para a extração do Extrato bruto Mate Leão® pesou-se 10g de Mate Leão® e adicionou-se 1000 mL de água destilada e fracionou-se com o solvente acetato de etila (4 x 300 mL) em funil de separação. A fração acetato de etila foi evaporada em evaporador rotatório, e os resíduos aquosos tanto das folhas verdes frescas quanto secas e o produto comercial foram liofilizados, resultando em duas frações para cada extrato bruto: fração acetato e resíduo aquoso, obtendo-se 12 frações como mostra o organograma ilustrado na Figura 2.

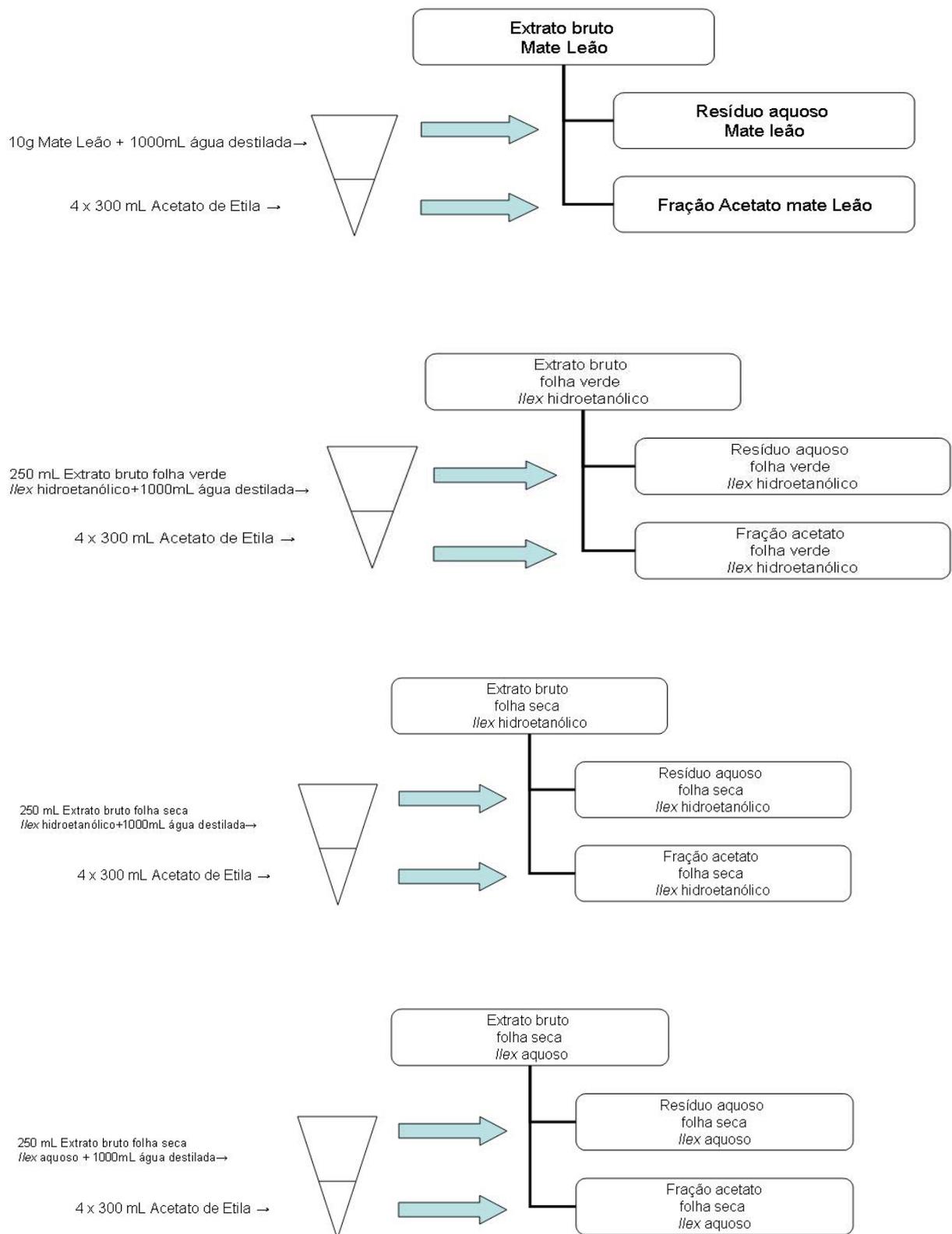


Figura 2 - Organograma do processo de extração.

### **3.2.2. Caracterização dos Extratos Através de Cromatografia em Camada Delgada**

Os extratos brutos, as frações acetato de etila e os resíduos aquosos foram analisados por cromatografia em camada delgada (CCD), utilizando cromatoplaças Aldrich® (Si gel GF<sub>254</sub>) e butanol: ácido acético: água (4:1:5) como eluente. Como agente revelador foi empregado reagente natural ácido difenilbórico complexado com etanolamina (98% de pureza, solubilizado em metanol na concentração de 0,5%) sob luz visível e também sob luz UV 365nm. Como substâncias de referência utilizou-se ácido clorogênico e rutina.

### **3.2.3. Rendimento dos Extratos**

Com as folhas verdes foram obtidos o extrato bruto, resíduo aquoso e a fração de acetato de etila (hidroetanólicos), com rendimentos de 3,10 g, 0,674 g, 7,525 g respectivamente. Com as folhas secas foram obtidos o extrato bruto da folha, resíduo aquoso e a fração de acetato de etila (hidroetanólicos) com rendimento de 5,451 g, 1,447 g, 4,127 g. Com as folhas secas também foram obtidos extrato bruto, resíduo aquoso, e a fração de acetato de etila (aquoso), com rendimento de 1,714g, 0,238 g, 1,237 g. Com o produto comercial de Mate Leão®, também foram obtidos o extrato bruto Mate Leão (5 g), o resíduo aquoso (5,104 g), e a fração de acetato de etila (3,800 g).

### 3.3. MANUTENÇÃO DOS MICRORGANISMOS

As linhagens bacterianas Gram-negativas *Salmonella typhimurium*, *Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, e Gram-positivas: *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* e *Enterococcus faecalis* utilizadas neste trabalho foram gentilmente cedidas pelo Laboratório de Microbiologia da Universidade São Francisco (USF), *campus* de Bragança Paulista.

Para o crescimento das cepas, tubos de ensaio contendo 5 mL meio de cultura TSA (Oxoid) foram preparados e devidamente identificados, em seguida os tubos foram inclinados e após a solidificação, as cepas foram espalhadas e incubadas em estufa a 37°C por 24h.

O teste de Coloração de Gram foi realizado com todas as linhagens bacterianas, para confirmação de pureza. As cepas escolhidas são padrões ATCC recomendadas para testes de susceptibilidade (CLSI, 2003).

**Tabela 1 - Linhagens de bactérias Gram-negativas utilizadas para os testes microbiológicos.**

	<b>Microrganismos</b>	<b>ATCC</b>
<b>Gram-negativas</b>	<i>Enterobacter cloacae</i>	13047
	<i>Salmonella typhimurium</i>	133111
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	27853
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	10031
	<i>Escherichia coli</i>	25922

Tabela 2 - Linhagens de bactérias Gram-positivas utilizadas para os testes microbiológicos.

	<b>Microrganismos</b>	<b>ATCC</b>
<b>Gram-positivas</b>	<i>Bacillus cereus</i>	14579
	<i>Enterococcus faecalis</i>	2922
	<i>Staphylococcus aureus</i>	6538

### 3.4. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

#### 3.4.1. Preparo dos Inóculo

Para o preparo dos inóculos foram selecionadas de 3 a 4 colônias isoladas em meio de cultura TSA e em seguida foram aplicadas em solução salina a 0,85% até atingir a turbidez correspondente ao tubo 0,5 da escala de Mac-Farland (0,05 mL de cloreto de bário dihidratado a 1,175% em 9,95 mL de ácido sulfúrico 1%) correspondendo aproximadamente  $1,5 \times 10^8$  UFC/mL.

#### 3.4.2. Difusão em Disco

Através do método de difusão em disco é possível avaliar qualitativamente a atividade antimicrobiana de compostos em diferentes concentrações. Para este estudo foram preparadas diferentes concentrações do Extrato bruto folha verde *Ilex* fresca hidroetanólico e Extrato Bruto folha seca *Ilex* hidroetanólico, que variaram de 20 mg/mL a 1 mg/mL.

O teste consiste no inóculo bacteriano na superfície de meio de cultura sólido Mueller-Hinton (Oxoid), em placas Petri. Estas placas foram semeadas com 100µl de suspensão bacteriana preparada conforme descritas acima, espalhadas com alça de Drigalski. Discos de papel filtro (Cecon) de 6 mm de diâmetro estéreis foram

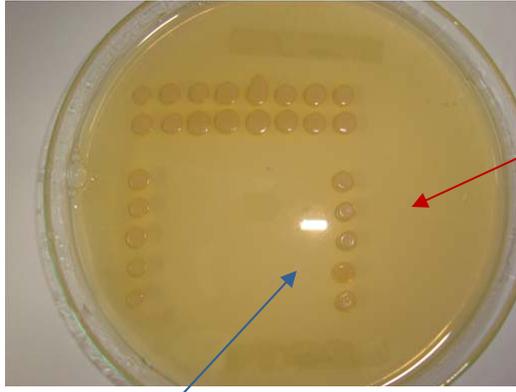
aplicados sobre o meio já inoculado e em seguida impregnados com 10µl (água + DMSO 2%) da solução de cada composto a ser testado. As placas permaneceram a 37°C por 24h. Após este período foi realizado a leitura dos resultados. Todos os testes foram realizados em triplicata. Os halos ao redor dos discos foram medidos em mm, e foi considerado como resultado final de cada extrato a média das 3 medidas e como suscetível halo igual ou acima de 10 mm de diâmetro. Discos também foram impregnados com DMSO (2%) (Merck-germany) como controle negativo.

### **3.4.3. Concentração Bactericida Mínima (CBM) por Microdiluição**

A microdiluição utiliza microplacas com 96 poços. Na primeira etapa dos testes foi realizado o preparo das diluições dos compostos a serem avaliados atingindo as seguintes concentrações finais: 20 mg/mL; 10 mg/mL; 5 mg/mL, 2,5 mg/mL; 1,25mg/mL; 0,625mg/mL, para tal usou-se água contendo 2% de DMSO como solvente. Em seguida foram realizadas diluições em tubos microtubos estéreis pela adição de quantidade suficiente de caldo Brucella assim como os diferentes volumes dos compostos avaliados para atingir as concentrações pré-estabelecidas. Todos os poços tiveram seu volume final ajustado para 100 µl.

As suspensões bacterianas foram preparadas em solução salina e mantidas em gelo durante todo o procedimento. As mesmas foram ajustadas em escala 0,5 da escala de Mac-Farland.

A microplaca foi carregada com as diferentes diluições do extrato a ser estudado, posteriormente foram acrescentados 1µl de cada suspensão bacteriana aos poços. Após este procedimento as placas foram incubadas por 24h a 37°C. Depois deste período foram transferidos 1µl de cada poço, pelo replicador de *steers*, para uma placa Petri preparada com meio de cultura Mueller-Hinton. As placas foram incubadas por 24h a 37°C novamente, e em seguida os resultados foram registrados. Todos testes foram realizados em duplicata.



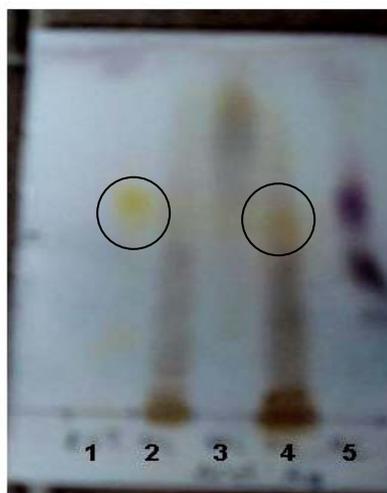
**Figura 3** - Placa de CBM indicando crescimento e inibição das linhagens bacterianas pelos extratos de erva mate.

→ Indica inibição do crescimento bacteriano; → Indica crescimento bacteriano

## 4. RESULTADOS

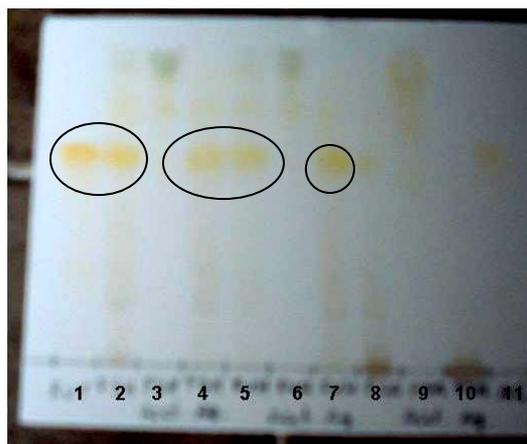
### 4.1. ANÁLISE CROMATOGRÁFICA

Em CCD, a rutina (rf 0,625) quando revelada com reagente natural aparece como uma mancha amarela em luz visível. Foi observada a presença de rutina no Resíduo aquoso do Mate Leão® (Figura 4).



**Figura 4** - Presença de rutina no resíduo aquoso Mate Leão. 1-Rutina; 2-Extrato bruto Mate Leão®; 3-Fração Acetato Mate Leão; 4-Resíduo aquoso Mate Leão; 5-Ac. Clorogênico; Reagente natural luz visível; BAW 5:1:4. Os círculos indicam a presença de rutina.

Conforme mostrado na Figura 5, observou-se a presença de rutina no extrato bruto folha verde *Ilex* fresca hidroetanólico e no extrato bruto folha seca hidroetanólico. Também observou-se rutina no resíduo aquoso folha verde hidroetanólico, resíduo aquoso folha seca hidroetanólico e resíduo aquoso Mate Leão. A rutina não foi observada em nenhum dos extratos obtidos a partir da folha seca aquosa e em nenhuma das frações de acetato de etila.



**Figura 5** - CCD – presença de rutina nos extratos brutos, resíduos aquosos.

1-Rutina; 2-Ex. Bruto Folha Seca Hidroetanólico; 3- Fração Acetato Folha Seca Hidroetanólico ; 4- Resíduo aquoso Folha Seca Hidroetanólico ; 5- Ex. Bruto Folha Verde Hidroetanólico; 6- Fração Acetato Folha Seca Hidroetanólico; 7- Resíduo Aquoso Folha Verde Hidroetanólico; 8- Ex. Bruto Folha Seca Aquosa; 9-Fração Acetato Folha Seca Aquosa; 10- Resíduo Aquoso Folha Seca Aquosa; 11-Ac. Clorogênico; Reagente natural luz visível ; BAW 5:1:4. Os círculos indicam a presença de rutina nos extratos.

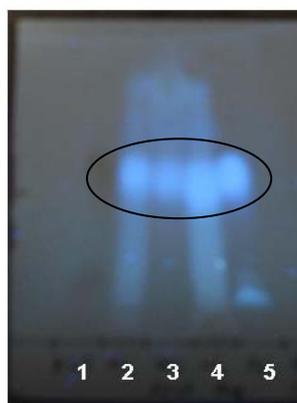
Já o ácido clorogênico (rf 0,604) pode ser identificado quando revelado com reagente natural e exposto a luz UV 365nm, apresentando fluorescência. Este foi observado em todos os extratos brutos, tanto nos hidroetanólicos quanto nos aquosos (Figura 5 e 6). O ácido clorogênico também foi observado nos resíduos aquosos de todos os extratos.

Nas frações acetato de etila não foi observado ácido clorogênico, exceto na fração acetato de etila do Mate Leão<sup>®</sup> (Figura 6). As demais bandas presentes ainda não foram identificadas e quantificadas. Esses resultados serão confirmados através de análise quantitativa por HPLC.



**Figura 6** - CCD presença de ácido clorogênico nos extratos brutos, resíduos aquosos .

1-Rutina; 2-Ex. Bruto Folha Seca Hidroetanólico; 3- Fração Acetato Folha Seca *Ilex* Hidroetanólico ; 4- Resíduo aquoso Folha Seca Hidroetanólico ; 5- Ex. Bruto Folha Verde Hidroetanólico; 6- Fração Acetato Folha verde fresca *Ilex* Hidroetanólico; 7- Resíduo Aquoso Folha Verde Hidroetanólico; 8- Ex. Bruto Folha Seca Aquosa; 9-Fração Acetato Folha Seca Aquosa; 10- Resíduo Aquoso Folha Seca Aquosa; 11- Ac. Clorogênico; Reagente natural luz UV 365 ; BAW 5 :1 :4.



**Figura 7** - CCD – presença de ácido clorogênico no extrato bruto Mate Leão, resíduo aquoso Mate Leão e fração de acetato de etila Mate Leão.

1-Rutina; 2-Mate Leão®; 3-Fração Acetato ML; 4-Resíduo aquoso ML; 5-Ac. Clorogênico; Reagente natural luz UV 365 ; BAW 5:1:4. O círculo indica a presença de ácido clorogênico.

## 4.2 TESTES DE SUSCEPTIBILIDADE AOS EXTRATOS

### 4.2.1 Difusão em Disco

Para avaliar provável atividade antimicrobiana dos extratos brutos folha verde *Ilex* hidroetanólico e do extrato bruto folha seca *Ilex* hidroetanólico da erva mate, foi realizado primeiramente o teste qualitativo de difusão em disco. Nos discos foram aplicados de 20 mg/ mL a 15mg/ mL; 10 mg/ mL a 5 mg/ mL; 1 mg/mL de cada composto. Foi considerado como atividade de inibição quando a presença de halos de inibição iguais ou superiores a que 10 mm, o que não foi observado em nenhuma das linhagens das linhagens estudadas (Tabela 3).

**Tabela 3** - Resultados difusão em disco medida dos halos em mm.

<i>Microrganismos</i>	Extrato bruto folha verde <i>Ilex</i> hidroetn. mm	Extrato bruto folha seca <i>Ilex</i> hidroetn. mm
<i>Escherichia coli</i>	8	8
<i>Enterococcus faecalis</i>	9	8
<i>Staphylococcus aureus</i>	9	9
<i>Bacillus cereus</i>	9	9
<i>Enterobacter cloacae</i>	7	7
<i>Salmonella tiphymurium</i>	7	7
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	7	7
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	7	7

## 4.2.2 Concentração Bactericida Mínima

Para determinar a concentração bactericida mínima dos compostos testados frente aos microrganismos, foi realizada uma primeira etapa que consiste em diluições dos diferentes compostos obtidos a partir do processo de maceração da erva mate verde fresca, seca e do produto comercializado Mate Leão®. O intervalo de concentrações utilizados para testar os compostos variou de 20 mg/mL a 0,625 mg/mL.

Os resultados obtidos pelo processo de microdiluição estão apresentados nas Tabelas 3 a 6.

Quando avaliada a CBM realizada com o extrato bruto, resíduo aquoso e a fração de acetato de etila foram possíveis observar uma diferença nos valores bactericidas entre os compostos preparados a partir do produto comercial Mate Leão®.

Os valores mais significativos observados pela CBM realizada com o produto comercial Mate Leão® foram obtidos com resíduo aquoso e a fração de acetato de etila, no valor de 1,25 mg/ML para a bactéria *Staphylococcus aureus*, e ainda a fração apresentou valor de CBM 0,625 mg/ML contra a bactéria *Bacillus cereus*.

O extrato bruto Mate Leão® apresentou valores de CBM variando entre 5 a 6 mg/ML. O resíduo aquoso apresentou valores da CBM variando entre 6 a 10 mg/ML, exceto para bactéria *Staphylococcus aureus*. A fração de acetato de etila apresentou valor de 5 mg/ML exceto para bactéria *Bacillus cereus* e *Staphylococcus aureus* (Tabela 4).

**Tabela 4** - Avaliação da concentração bactericida mínima (CBM) do extrato bruto, resíduo aquoso e da fração de acetato de etila do Mate Leão®.

	<b>Extr. Bruto Mate Leão mg/ mL</b>	<b>Resíduo aquoso Mate Leão mg/ mL</b>	<b>Frç.(AcOEt) Mate Leão mg/ mL</b>
<i>Escherichia coli</i>	6	6,0	5
<i>Enterococcus faecalis</i>	6	10	5
<i>Enterobacter cloacae</i>	5	10	5
<i>Bacillus cereus</i>	5	10	0,625
<i>Staphylococcus aureus</i>	5	1,25	1,25
<i>Salmonella typhimurium</i>	5	10	5
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	6	6,0	5
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	6	10	5

Também ocorreram variações entre os valores bactericidas encontrados com o extrato bruto folha verde fresca *Ilex hydroetanólico*, resíduo aquoso folha verde fresca *Ilex hydroetanólico*, e com a fração de acetato de etila folha verde fresca *Ilex hydroetanólico*.

Conforme a Tabela 5, o resíduo aquoso apresentou ação eficaz contras as bactérias Gram-positivas *Bacillus cereus* e *Staphylococcus aureus*, e contra a bactéria Gram-negativa *Enterobacter cloacae*, com valor do CBM de 5 mg/mL. Este valor também foi observado para a *Bacillus cereus* quando testada a atividade da fração de acetato de etila e com extrato bruto. Os outros microrganismos apresentaram valores bactericidas variando entre 6 mg/mL e 10 mg/mL com o extrato bruto. Os valores de CBM do resíduo aquoso também variaram entre 7 e 18 mg/mL. No entanto, a bactéria *Escherichia coli* não foi inibida nem com a maior concentração de 20 mg/mL. Exceto para a bactéria *Bacillus cereus*, as demais linhagens apresentaram valores de CBM que variaram entre 5 a 10 mg/mL.

**Tabela 5** - Avaliação da concentração bactericida mínima (CBM) do extrato bruto da folha verde fresca hidroetanólico, resíduo aquoso folha verde fresca *Ilex* hidroetanólico, e da fração de acetato de etila.

	Extr. Bruto folha verde fresca <i>Ilex</i> hidroetn. mg/mL	Resíduo aquoso folha verde fresca <i>Ilex</i> hidroetn. mg/mL	Frç.(AcOEt) folha verde fresca <i>Ilex</i> mg/mL
<i>Escherichia coli</i>	10	>20	10
<i>Enterococcus faecalis</i>	10	7	10
<i>Enterobacter cloacae</i>	10	5	10
<i>Bacillus cereus</i>	5	5	5
<i>Staphylococcus aureus</i>	6,0	5	7
<i>Salmonella typhimurium</i>	10	7	5
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	10	18	10
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	10	7	10

Os resultados analisados da CBM com o resíduo aquoso folha seca *Ilex* aquoso para a bactéria *Staphylococcus aureus* foi de 1,25 mg/mL e com da fração de acetato de etila da folha seca *Ilex* aquosa para as bactérias *Bacillus cereus* de 1,25 mg/mL. O extrato bruto apresentou valores de CBM variando entre 12 a 20 mg/mL (Tabela 5).

**Tabela 6** - Avaliação da concentração bactericida mínima (CBM) do extrato bruto da folha seca *Ilex* aquoso, resíduo aquoso folha seca *Ilex* aquoso, e da fração de acetato de etila folha seca *Ilex*.

	Extr. Bruto folha seca <i>Ilex</i> aquoso mg/ml	Resíduo aquoso folha seca <i>Ilex</i> aquoso mg/ml	Frç. (AcOEt) folha Verde seca <i>Ilex</i> aquosa mg/ml
<i>Escherichia coli</i>	20	20	20
<i>Enterococcus faecalis</i>	12	20	18
<i>Enterobacter cloacae</i>	12	6,0	20
<i>Bacillus cereus</i>	12	9,0	1,25
<i>Staphylococcus aureus</i>	12	1,25	18
<i>Salmonella typhimurium</i>	14	6,0	20
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	20	18	20
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	10	20	18

Os resultados para o extrato bruto, resíduo aquoso e da fração de acetato de etila para folha verde seca *Ilex* hidroetanólico estão representados na Tabela 6, mostraram uma melhor atividade bactericida com a fração de acetato de etila contra *Bacillus cereus* e com o resíduo aquoso contra *Staphylococcus aureus* ambos com valores de CBM de 1,25 mg/mL.

A fração de acetato inibiu apenas o crescimento de duas linhagens *Bacillus cereus* e *Pseudomonas aeruginosa*, as demais não foram inibidas.

O resíduo aquoso não inibiu o crescimento das linhagens Gram-negativas *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*. As demais bactérias apresentaram valores variando entre (6 a 18 mg/mL). O extrato bruto apresentou valor de CBM > 20mg/mL para as bactérias Gram-negativas *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *Pseudomonas aeruginosa*, as demais foram inibidas em 12mg/mL (Tabela 7).

**Tabela 7** - Avaliação da concentração bactericida mínima (CBM) do extrato bruto da folha seca hidroetanólico, resíduo aquoso folha seca hidroetanólico, e da fração de acetato de etila folha seca.

	Extr. Bruto folha seca <i>Ilex</i> Hidroetn. mg/mL	Resíduo aquoso folha seca <i>Ilex</i> hidroetn mg/mL	Frç.(AcOEt) Mate Folha seca hidroetn. <i>Ilex</i> mg/mL
<i>Escherichia coli</i>	>20	>20	>20
<i>Enterococcus faecalis</i>	12	12	>20
<i>Enterobacter cloacae</i>	12	6,0	>20
<i>Bacillus cereus</i>	12	9,0	1,25
<i>Staphylococcus.aureus</i>	12	1,25	>20
<i>Salmonella typhimurium</i>	12	12	>20
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	>20	18	>20
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	>20	>20	18

## 5. DISCUSSÃO

A introdução de fitoterápicos na medicina se tornou uma importante opção para profissionais da área de saúde. Ao contrário do que parece, a fitoterapia não tem sido implantada para substituir medicamentos convencionalmente prescritos, mas para aumentar as opções terapêuticas ofertando medicamentos que apresentem a mesma qualidade terapêutica, que sejam mais baratos, e que possivelmente não tenham contra-indicações como aquelas provocadas pelas medicações existentes. Sendo assim, o uso tradicional das plantas como medicamentos, contribuíram para a intensa investigação no qual óleos essenciais e extratos poderiam ser úteis em condições terapêuticas específicas (SIMÕES *et al.*, 2007).

Os compostos de plantas bioativos são, em sua maioria, produtos de metabólitos secundários que são produzidos normalmente em resposta a diversos estímulos externos como competição, mudanças nutricionais e infecções por agressores (STROHL, 2000). Neste sentido, muitas espécies têm sido utilizadas por apresentarem atividade antimicrobiana, as quais são atribuídas às substâncias sintetizadas no metabolismo secundário (NASCIMENTO *et al.*, 2000).

Os extratos podem ser obtidos de diversas partes das plantas. Visando uma semi-purificação destas substâncias, estas são submetidos a um processo de partição líquido-líquido, com solventes de polaridades crescentes que são capazes de extrair variadas classes de compostos (FILHO e YUNES, 1997). Os compostos isolados de plantas são substâncias cuja estrutura química, com raras exceções, apresentam grandes diferenças estruturais em relação aos antibióticos derivados de microrganismos. Sugere-se que estes agentes antimicrobianos isolados de plantas superiores podem agir como reguladores do metabolismo intermediário, ativando ou bloqueando reações enzimáticas, afetando diretamente uma síntese enzimática seja em nível nuclear ou ribossomal, ou mesmo alterando estruturas de membranas. Entretanto, a grande maioria das plantas, normalmente empregadas como fitoterápicos ainda não tiveram seus potenciais terapêuticos comprovados (SINGH e SHUKLA, 1984). Diferentes resultados com relação à ação antimicrobiana de extratos frente a diversos microrganismos podem ser encontrados, uma vez que devem ser levados em consideração alguns pontos importantes tais como: diferentes condições ambientais que podem influenciar no

conteúdo final dos metabólitos secundários, e as diversas metodologias empregadas para extração e avaliação do produto natural obtido (FILHO e YUNES, 1997).

Dentre os métodos empregados para separar e caracterizar os constituintes químicos de extratos naturais destaca-se a cromatografia em camada delgada (CCD), que possibilita comparar o conteúdo de compostos extraídos dos diferentes extratos (FILHO e YUNES, 1997). Os resultados oriundos das análises por CCD apresentados no presente trabalho indicaram a presença de rutina e ácido clorogênico. A rutina foi encontrada tanto nos extratos brutos e resíduos aquosos hidroetanólicos e aquosos, com exceção do extrato bruto folha seca aquosa e das frações de acetato de etila. O ácido clorogênico foi encontrado nos extratos brutos hidroetanólicos e aquosos e também nos resíduos aquosos dos extratos brutos, com exceção do resíduo aquoso folha seca aquosa.

Embora não tenha sido possível detectar a presença de rutina e ácido clorogênico em alguns dos extratos brutos, resíduos aquosos e nas frações de acetato de etila, tais resultados não indicam a ausência destes. Sabe-se que nas sucessivas etapas de purificação sempre há grandes perdas das substâncias. Tendo em vista que estas substâncias normalmente acham-se em níveis relativamente baixos na planta, a ausência destes compostos, nas análises feita por CCD, poderia ser atribuída a estes fatores. Adicionalmente, faz-se necessário o uso de outras técnicas de cromatografia para purificação, melhor separação e isolamento, quantificação precisa de tais substâncias. De modo complementar, GAMBETA, (2008) avaliou a presença de ácidos orgânicos, alcalóides terciários, alcalóides quaternários, cumarinas voláteis, fenóis, flavonóides, saponinas, e taninos dos extratos hidroalcoólicos de folha e caule de *Ilex paraguariensis* cultivados ao sol, utilizando metodologias adequadas para análise de cada um dos compostos e também por extração por fluido supercrítico utilizando dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) como solvente a fim de obter o maior número de constituintes químicos no extrato. Os resultados indicaram a presença de ácidos orgânicos, alcalóides terciários, flavonóides e saponinas no extrato hidroalcoólico de folha cultivado ao sol. No extrato hidroalcoólico de caule cultivado ao sol, foi constatada a presença de ácidos orgânicos, flavonóides, saponinas e taninos. Ácidos orgânicos, alcalóides terciários e flavonóides foram verificados no extrato por fluido supercrítico de folha cultivada ao sol.

HECK e MEJIA (2007), sugerem que a quantidade de polifenóis extraídos do mate é afetada pelo método de extração e o solvente água ou solvente orgânico. Em

relação à presença de flavonóides, obteve-se indicação da presença desse metabólito no material resinoso na forma da rutina, confirmando os estudos de BASTOS e TORRES (2003), MATSUBARA e RODRIGUEZ-AMAYA (2006) e RIBANI e RODRIGUEZ-AMAYA (2006).

As metilxantinas mais abundantes - cafeína, teobromina e teofilina – são constituintes químicos importantes de várias bebidas alimentícias e/ou de estimulantes não alcoólicos (café, chá, cola, mate, guaraná) consumidas em todo mundo, seja como preparações caseiras ou como produtos industrializados (SIMÕES *et al.*, 2001). Os ensaios fitoquímicos, mostraram a presença dos metabólitos secundários metilxantinas (cafeína, teobromina e teofilina), polifenóis, saponinas, flavonóides, alcalóides, taninos e aminogrupos, nos extratos aquoso e hidroalcoólico estudados.

O teste de difusão em disco é estabelecido como padrão pelo NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards) (BARRY e THORNSBERRY, 1991), e consiste na avaliação de alguma potencialidade antimicrobiana dos compostos a serem testados. Neste trabalho foram escolhidas as linhagens Gram-positivas como: *Bacillus cereus*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus* e Gram-negativas como *Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*. O método de difusão em disco é há muito tempo empregado na microbiologia apresenta algumas vantagens. A técnica de Difusão Disco em é rápida, barata e de fácil execução, e tem a vantagem de fornecer dados qualitativos de atividade antimicrobiana, que servirão para a busca de um novo antibiótico funcional (VENZKE *et al.*, 2008). Entretanto devem ser apontadas algumas desvantagens tais como: a baixa reprodutibilidade e o aspecto apenas qualitativo dos resultados.

Neste trabalho, os extratos brutos folha verde fresca *Ilex* hidroetanólico e extrato bruto folha seca *Ilex* hidroetanólico apresentaram baixo coeficiente de difusão ao meio. Nossos dados mostraram que em todas as linhagens padrões testadas não houve halo de inibição igual ou maior que 10 mm. Entretanto, a maior concentração de extrato empregada no presente trabalho, foi de 20 mg/mL, uma vez que em concentrações mais altas, as soluções dos extratos não permitiram uma absorção total nos discos.

Embora a difusão em disco seja um método muito utilizado e recomendado para este tipo de análise, os resultados apresentados por alguns autores são discrepantes. Nos testes realizados por GONÇALVES *et al.* (2005), utilizando extrato hidroalcoólico

(100mg/mL), a erva mate inibiu o crescimento do *Staphylococcus aureus* e não de *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Klebsiella pneumoniae*. Os resultados diferem dos encontrados nesse estudo, no qual todas as linhagens tanto Gram-negativas quanto Gram-positivas se mostraram resistentes aos extratos hidroetanólicos na concentração de 20 mg/mL.

Tendo em vista os resultados obtidos pelo método de difusão em disco optou-se em avaliar a atividade antimicrobiana dos extratos brutos, resíduos aquosos e das frações de acetato de etila da erva mate através da concentração bactericida mínima.

Nossos resultados indicam que o extrato bruto folha verde fresca *Ilex* hidroetanólicos, os extratos brutos folha verde seca *Ilex* hidroetanólico e aquoso apresentaram atividade antimicrobiana, que pode ser atribuída aos diversos compostos químicos presentes nestes extratos, dentre eles a rutina e o ácido clorogênico. Observou-se uma ação bactericida mínima frente a todas as linhagens bacterianas, com exceção ao extrato bruto folha seca *Ilex* hidroetanólico, que não inibiu o crescimento de *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *Pseudomonas aeruginosa*.

Por outro lado ASSOLINI *et al.* (2006) mostraram que extratos aquosos de erva mate não apresentaram inibição para *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*. Estes autores demonstraram uma sensível melhora na extração de compostos antimicrobianos da planta quando o extrato foi preparado com etanol como solvente. Embora o extrato aquoso não tenha demonstrado atividade antimicrobiana significativa em relação ao extrato etanólico, o mesmo apresentou uma quantidade maior de compostos fenólicos totais. De modo complementar DE BIASI *et al.* (2007) observaram a resistência das bactérias *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Proteus mirabilis* aos extratos preparados com folhas e ramos com e sem exposição ao sol.

A CBM realizada com o resíduo aquoso folha verde fresca *Ilex* hidroetanólico, foi mais eficiente frente as bactérias *Enterobacter cloacae*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, enquanto que o resíduo aquoso folha seca *Ilex* aquoso e resíduo aquoso folha seca hidroetanólico, foram mais efetivos contra *Staphylococcus aureus*. No entanto, não foi identificado pela cromatografia, até o momento, o composto que supostamente teria ação antimicrobiana.

Apenas no resíduo aquoso do Mate Leão foi detectado a presença de rutina e ácido clorogênico. No extrato bruto e na fração de acetato de etila foi observado apenas a presença de ácido clorogênico. No resíduo aquoso observou-se uma atividade bactericida contra as bactérias com *Staphylococcus aureus* enquanto na fração de acetato de etila *Bacillus cereus* foi observada atividade bactericida contra *Staphylococcus aureus* e *Bacillus cereus*.

As demais frações de aceto de etila folha verde fresca *Ilex* hidroetanólico e folha seca *Ilex* hidroetanólico apresentaram resultados significativos quanto a atividade antimicrobiana contra as bactérias *Bacillus cereus*, mas até o presente momento não foram identificados compostos que provavelmente explicassem a atividade antimicrobiana.

O planejamento de estudos com relação a potencialidade terapêutica de plantas consideradas medicinais na forma de chá e de extratos exige investigações minuciosas em razão as inúmeros fatores que comumente dificultam a comprovação em modelos experimentais, além de variarem constantemente em sua composição, muitos compostos podem agir sinergicamente com outros compostos por estes motivos muitos resultados ainda são divergentes (CALIXTO, 2003).

Segundo DEANS e RITCHIE (1987); DORMAN e DEANS (2000) a relação entre a sensibilidade microbiana a extratos naturais e a estrutura celular bacteriana ainda não está bem esclarecida, entretanto sugere-se que uma maior eficiência inibitória ou não destes produtos naturais frente a bactérias estaria intimamente associada a composição dos extratos que interagem com os componentes celulares dos microrganismos.

De acordo com SRINIVASAN *et al.* (2001) determinadas substâncias ativas encontradas na *Ilex paraguariensis* estão diretamente relacionadas a atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas, pois a parede celular destas bactérias são quimicamente menos complexas do que as das bactérias Gram-negativas. Entretanto, no presente trabalho os diferentes extratos, resíduos aquosos e frações de acetato de etila apresentam ação bactericida frente aos microrganismos Gram-positivos e Gram-negativos. Sendo que os resultados mais significativos foram observados contra as bactérias Gram-negativas.

Em um trabalho realizado por HONGPATTARAKERE e JONHSON (1999) indica que os metabólicos secundários da erva-mate, como cafeína, triterpenos, derivados do ácido clorogênico e entre outros, apresentaram atividade antimicrobiana tanto para bactérias Gram-positivas como Gram-negativas.

Segundo MASON e WASSERMAN (1987) entre muitos compostos presentes na erva mate que demonstram atividade antimicrobiana, os compostos fenólicos parecem inibir a ação de enzimas, e ainda são tóxicas às células bacterianas. Diversos ensaios *in vivo* e *in vitro* vêm comprovando a ampla variedade das atividades biológicas dos compostos flavonóidicos. Os flavonóides têm apresentado efeitos potenciais como antioxidante, antiinflamatório, analgésico, antialérgico, antitumoral, cicatrizante e também atividade antimicrobiana (SIMÕES *et al.*, 2007).

Sugere-se, pois, que a ação antimicrobiana dos flavonóides provavelmente esteja relacionada à capacidade de complexar proteínas extracelulares e solúveis, bem como com estruturas de parede celular bacteriana. Flavonóides mais lipofílicos poderiam atuar provocando o rompimento das membranas microbianas. Descrever o mecanismo de ação para os compostos flavonóicos não é simples devido as informações muitas vezes contraditórias: alguns autores acreditam que flavonóides com poucos grupos hidroxilas nos seus anéis são mais ativos contra microorganismos do que aqueles que possuem mais hidroxilas, o que leva a crer que o alvo é a membrana microbiana, uma vez que se acredita que os compostos lipofílicos possam romper a estrutura da membrana. No entanto, outros autores mostram o efeito oposto: quanto maior a hidroxilação maior a atividade (SATO *et al.*, 1961; CHABOT *et al.*, 1992).

Os resultados apresentados para determinação da concentração bactericida mínima obtidos neste estudo sugerem que os extratos brutos, resíduos aquosos e frações de acetato de etila, hidroetanólicos e aquosos de erva mate verde fresca e seca e o produto comercial Mate Leão, avaliados frente aos microrganismos Gram-positivos e Gram-negativos escolhidos para este estudo, possuem potencial antimicrobiano. No entanto, são necessários estudos complementares para caracterizar as substâncias responsáveis por esta atividade e a realização de testes toxicológicos para viabilizar sua utilização.

Os resultados obtidos concordam com a literatura, sugerindo que compostos de origem natural possam ser utilizados para o desenvolvimento de novos medicamentos,

principalmente devido à crescente aquisição de resistência pelas bactérias aos antimicrobianos tradicionalmente utilizados.

## 6. CONCLUSÃO

✓ A caracterização preliminar por cromatografia de camada delgada realizada com os extratos obtidos com as folhas verdes frescas e secas e produto comercial de erva mate mostrou a presença de rutina e ácido clorogênico.

✓ Não foi possível avaliar a atividade antimicrobiana de erva mate pelo método de difusão em disco.

✓ Os extratos do produto comercial Mate Leão® apresentaram atividade bactericida mínima da fração de acetato de etila na concentração de 0,625 mg/mL contra a bactéria *Bacillus cereus* e de 1,25 mg/mL do resíduo aquoso e da fração de acetato de etila contra a bactéria *Staphylococcus aureus*.

✓ Com a folha verde fresca *Ilex* Hidroetanólico, extrato bruto apresentou valor de CBM de 5 mg/ ML contra a *Bacillus cereus*).

✓ O resíduo aquoso folha verde fresca *Ilex* Hidroetanólico apresentou valor de CBM de 5 mg/ ML contra as bactérias *Enterobacter cloacae*, *Bacillus cereus* e *Staphylococcus aureus*.

✓ A fração de acetato de etila apresentou valor de CBM de 5 mg/ ML contra a bactéria *Bacillus cereus*).

✓ O resíduo aquoso folha seca *Ilex* aquoso apresentou valor de CBM de 1,25 mg/mL para bactéria *Staphylococcus aureus* e a fração de acetato de etila apresentou valor de 1,25 mg/mL para bactéria *Bacillus cereus*.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABADIA-PATINO, L, KERYN C, JAN B, COURVALIN, P, PERICHON, B. VanE-Type Vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis* clinical isolates from Australia **antimicrobial agents chemotherapy**. 48:4882-4885, 2004.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA – **Manual de Microbiologia Clínica para Controle de Infecção em Serviços de Saúde**. Disponível em: [www.anvisa.gov.br](http://www.anvisa.gov.br) Acesso em fevereiro de 2008.

ALMEIDA, E. R. **Plantas medicinais brasileiras**. São Paulo: Hemus, 1993, p. 341.

ALIKARIDIS, F. Natural constituents of *Ilex* species. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 20,p. 121-144, 1987.

AKERELE, O. Summary of WHO guidelines for the assessment of herbal medicines. **Herbal Gram**, v. 28, p. 13-19, 1993.

ARÇARI, P.D; BARTCHEWSKY, W; DOS SANTOS, W.T.O; OLIVEIRA, A.K; FUNK,A; PEDRAZZOLI,J; DE SOUZA, F.F..M; SAAD, J.M; BASTOS, MH.D; GAMBERO, A; CARVALHO, O.P; RIBEIRO, L.M. Antiobesity effects of yerba mate extract ( *Ilex paraguariensis*) in high-fat diet-induced obese mice. **Obesity Dec**;17(12):2127-33. May 14. Epub, 2009.

ASOLINI, C.F. Atividade Antioxidante e Antibacteriana dos Compostos Fenólicos dos Extratos de Plantas Usadas como Chás. **Brazilian Journal of Food Technology**, v.9, n.3, p. 209-215, jul./set. 2006.

BARRY, A. L, THORNSBERRY, C, 1991. Susceptibility tests: Diffusion Test Procedures. In: Balows A, Hauser WJ, Hermann KL, Isenberg HD, Shamody HJ 1991. **Manual of clinical microbiology**. 5.ed. Washington, DC: American Society for Microbiology, p. 1117-1125.

BASTOS, D. H. M.; TORRES, E. A. F. S. Bebidas a base de erva-mate (*Ilex paraguariensis*) e saúde pública. **Sociedade Brasileira de Alimentação e Nutrição**, São Paulo, v. 26, p. 77-89, 2003.

BLACK, J.G. **Microbiology: Principles & Applications**. 3ed New Jersey: Simom & Scuster, 1996.

BOTORIN, F. **Estudo da Atividade Antimicrobiana do Extrato Hidroalcoólico de Erva-Mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil)**. 2006. 23f. Trabalho de Conclusão de Curso – Faculdade de Farmácia, FCBS, Tuiuti, 2006.

BORRILE, W. M. A.; REISSMANN, B. C.; DE FREITAS, S. J. R. Relação entre Compostos fitoquímicos e o nitrogênio em morfotipos de erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.). **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v. 23, p. 183-198, 2005.

BORTOLUZZI, A. L. M.; PASQUALATO, R. P. R.; GUESSER, G.; CARDOZO JR, E. L.; DONADUZI, C. M.; MITSUI, M. **Quantificação de Metilxantinas e Compostos Fenólicos em Amostras de Erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.)**. 4º Congresso Sudamericano de la Yerba Mate – 4º Reunión Técnica de la Yerba Mate; 2º Exposición de Agronegocios de la Yerba Mate. **Anais...** Posadas, Argentina, 2006.

BRAGAGNOLO, N., PAN, W., FILHO, L. K. **O manual de erva mate**. Emater/Pr, p. 22-33, Curitiba, 1980.

BRENELLI, S. C. E. A extração de cafeína em bebidas estimulantes – uma nova abordagem para um experimento clássico em química orgânica. **Química Nova**, v. 26, p. 136-138, 2003.

CALIXTO, J. B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). **Brazilian Journal of Medical and Research**, v. 33, p. 179-189, 2000.

CALIXTO, J. B. Biodiversidade como fonte de medicamentos. **Ciência & Cultura**, Campinas, v.55, n. 3, p. 37, 2003.

CANSIAN, R. L, MOSSI A.J, MOSELE,S.H, TONIAZZO, G, TREICHEL,H, PAUROUL,N, OLIVEIRA,J.V, OLIVEIRA, D, MAZUTTI, M, ECHEVERRIGARAY, S. Genetic Conservation and Medicinal Proprietaries of mate (*Ilex paraguariensis* St.Hil), **Pharmacognosy Reviews**, 2: 326-328. issue 4, 2008.

CHABOT, S; BEL-RHLID, R; CHENEVERT, R. Hyphal growth promotion *in vitro* of the VA mycorrhizal fungus. *Gigaspora margarita* Becker and Hall, by the activity of structurally specific flavonoid compounds under CO<sub>2</sub>. **New Phytologist**, 122, 461-467, 1992.

CLSI. CLINICAL LABORATORY STANDARDS INSTITUTE - **Performance Standards For Antimicrobial Disk Susceptibility Tests: Approved Standard**- Eighth Edition. document M2-A8 [ISBN 1-56238-485-6]. CLSI. 2003a.

COWAN, M.M. Plant products as antimicrobial agents. **Clinical Microbiology Reviews**. v.12, p.564-582, 1999.

CONGRESSO SUL-AMERICANO DA ERVA-MATE.; REUNIÃO TÉCNICA DA ERVAMATE, **Anais**. Encantado: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, p. 294-297, 2000.

DA CROCE, D. M.; FLOSS, P. A. **Cultura da erva-mate no Estado de Santa Catarina**. Florianópolis: Epagri, 1999. 81p.

DA SILVA, S. L.; CALGAROTTO, K.A; KUNTZA, M. F; HOILSON, F; CUCHIA, L; FOGOLARIA, O; MIOTTOA, S; MASOA, V; TOYAMAB, H. M; MARANGONI, S; DE MOURA, F, N. Aspectos químicos e biológicos associados aos flavonóides de origem natural: uma revisão da literatura. **ACTA AMBIENTAL CATARINENSE**, v., n.2, jun/dez, 2004.

DE BIASI, B. **Avaliação da Atividade Antimicrobiana dos Extratos de Folhas Ramos de *Ilex paraguariensis* (Erva-mate)**. 2007. 11p. Artigo/Trabalho de Conclusão de Curso – Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, URI, Erechim, 2007.

DEANS,S.G.; RITCHIE, G. Antibacterial properties of plant essential oils. **International Journal of Food Microbiology**, v. 5, n. 2, p. 165-180, 1987.

DE SMET, P. A. G. M. The role of plant-derived drugs and herbal medicines in healthcare. **Drugs**, v. 54, p. 801-840, 1997.

d'AZEVEDO, P. A. Avaliação de um sistema automatizado na identificação de espécies de *Enterococcus*. **Journal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 40, n. 4, p. 237-9, 2004.

DORMAN, H.J.D.; DEANS, S.G. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 88, n.2, p. 308-316, 2000.

DUCAT, G.; QUINÁIA, O. S. Avaliação do teor de minerais da *Ilex paraguariensis* da região Centro-Oeste do Estado do Paraná. **Revi. Ciên. Exat. e Nat**, v. 6, p. 31-42, 2004.

DUTRA, G. L. F; HOFFMANN-RIBANI, R; RIBANI, M. Determination of phenolic compounds by isocratic high performance liquid chromatographic method during storage of yerba-mate. **Química Nova**, Vol. 97, n.7, p.1027-1031, 2009.

EMATER. EMPRESA PARANAENSE DE ASSISTÊNCIA TÉCNICA E EXTENSÃO RURAL. **Manual da erva-mate (*Ilex paraguariensis*)**. Curitiba, 1991.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA (EMBRAPA): Cultivo da Erva mate. Disponível em: <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Ervamate/CultivodaErvaMate> Acesso em: 22 de setembro 2009.

ESMELINDRO, M. C.; TONIAZZO, G.; WACZUK, A.; DARIVA, C.; OLIVEIRA, D. Caracterização físico-química da erva mate: Influência das etapas do processamento industrial. **Ciên. Tecn. de Alim**, v. 2, p. 193-204, 2002.

FARNSWORTH, N. R. **Ethnobotany and the search for new drug**. Wiley, 1994.

FILHO, C. V.; YUNES, A. R. FAQFAR - **Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade**. Universidade do Vale do Itajaí-Florianópolis, 1997.

FILIP, R.; LÓPEZ, P.; COUSSIO, J.; FERRARO, G. Mate substitutes or adulterants: study of xanthine content. **Phytotherapy Research**, v. 12, p.129-131, 1998.

FILIP, R.; LOTITO, S.B; FERRARO, G, FRAGA, C.G. Antioxidant activity of *Ilex paraguariensis* and related species. **Nutr Res** 20: 1437-1446, 2000.

FILIP, R.; LÓPEZ, P.; GILBERTI, G.; COUSSIO, J.; FERRARO, G. Phenolic compounds in seven South American *Ilex* species. **Fitoterapia**, v. 72 p. 774-778, 2001.

FILIP, R.; LÓPEZ, P.; FERRARO, G. Phytochemical study of *Ilex dumosa*. **Acta Hort.**,n. 502, p. 405-408, 1999.

FOSSATI, L. C. **Avaliação do estado nutricional e da produtividade da ervamate (*Ilex paraguariensis* St.Hil.), em função do sítio e da dioxina**. Curitiba,1997. 113f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal). Curso de Pós-Graduação em Engenharia Florestal. Universidade Federal do Paraná.

GAMBETA, M. R . **Perfil fitoquímico de diferentes extratos de *Ilex paraguariensis* St. Hilarie**- trabalho de Conclusão de Curso, 2008.

GILBERTI, G. C. ***Ilex* em Sudamérica: florística, sistemática y potencialidades com relación a um banco de germoplasma para la yerba mate**. In: Erva-mate: Biologia e Cultura no Cone Sul. Ed. Universidade/UFRGS Porto Alegre, RS, Brasil, p. 303-312. 1994.

GIROLOMETTO, G.; AVANCINI, C.A.M.; CARVALHO, H.H.C.; WIEST, J.M., Atividade antibacteriana de extratos de erva mate (*Ilex paraguariensis* A.St.-Hil.) **Rev. Bras. Pl. Med**, Botucatu, v.11, n.1, p.49-55, 2009.

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

GNOATTO, S. C. B.; BASSANI, V. L.; COELHO, G. C.; SCHENKEL, E. P. Influência do método de extração nos teores de metilxantinas em erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil., Aquifoliaceae). **Química. Nova**, v. 2, p. 304-307, 2007.

GORZALCZANY, S.; FILIP, R.; ALONSO, M. R.; MINO, J.; FERRERO, G.; ACEVEDO, C. Choleric effect and intestinal propulsion of "mate" (*Ilex*

*paraguariensis*) and its substitutes or adulterantes. **J. Ethnopharmacol**, v. 75, p. 291-294, 2001.

GOSMANN, G. **Saponinas de *Ilex paraguariensis* de St. Hil. Dissertação** (Mestrado em Farmácia) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, p.108, 1989.

GUGLIUCCI, A. A. N. D, STAHL, A .J. C. Low density lipoprotein oxidation is inhibited by extract of *Ilex paraguariensis*, **Bioch. Mol. Biol. Int.** 35: 47-56, 1995.

HARMON, S. M, GOEPFERT, J. M, BENNETT, R. W. *Bacillus cereus*. In: VANDERZANT C, SPLITTSTOESSER F. Compendium of methods for the microbiological examination of foods. 3rd ed. Washington DC: **American Public Health Association**. p. 593-604, 1992.

HARVEY, A. Strategies for discovering drugs from previously unexplored natural Products. **Drug Discovery Today**. v. 5, p. 294-300, 2000.

HECK e MEJIA. YERBA MATE TEA (*Ilex paraguariensis*): A comprehensive review on chemistry, health implications, and technological considerations. **Journal of Food Science**. vol.72, n.9, 2007.

HONGPATTARAKERE, T.; JOHNSON, E. A. Natural antimicrobial components isolated from Yerba Maté (*Ilex paraguariensis*). **Food Research Institute**, v.11, n.3. 1999.

IBGE - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Produção da extração vegetal e da silvicultura. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/pevs/2003/pevs2003.pdf> [Acesso em 10 maio. 2008.]

IBGE - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Produção da extração vegetal e da silvicultura. Rio de Janeiro: IBGE, v. 21, 2006, 45 p. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/pevs/2006/default.shtm>. [Acesso em 25 jun. 2008.]

JAWETZ E, MELNICK J, ADELBERG E. 1968. **Microbiologia Médica**. 22ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara, 2005, p,653.

JUNQUEIRA, L. C; CARNEIRO, J. Biologia Celular e Molecular. 6ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997.

KONEMAN, E. W; ALLEN, S. D; JANDA, W. M; SCHRECKENBERGER, P. C; WINN JR, M. W. C. **Diagnóstico Microbiológico**. 6 ed. Rio de Janeiro: MEDSI, 2008, p. 1465.

KOWALCZYK, E. C, VALDUGA, T.A; HOFMANN JR., E. A; ROMAN, S. S. Efeito do extrato de *Ilex paraguariensis* (Erva Mate) no reparo tecidual de feridas em ratos. 4º

**Congreso Sudamericano de la Yerba Mate - 4º Reunión Técnica de la Yerba Mate; 2º Exposición de Agronegocios de la Yerba Mate.** Posadas, Argentina. 2006.

LAWRENCE, R. N. Rediscovering natural product biodiversity. **Drug Discovery Today**, v. 4, p. 449-451, 1999.

LIMA, E. O. **Plantas e suas propriedades antimicrobianas: uma breve análise histórica:** In: YUNES, R. A; CALIXTO, J. B. Plantas Medicinais sob a Óptica da Química Medicinal Moderna. Chapecó: Agros, 2001 p. 479-499.

LORENZI, H.; MATOS, F.I.A. Plantas medicinais no Brasil (nativas e exóticas). Nova Odessa, SP: Instituto Plautarum, 2002.

MACCARI JÚNIOR, A.; SANTOS, A. P. R. Aplicações potenciais da erva-mate em produtos de higiene e no tratamento de resíduos. In: PRODUTOS alternativos e desenvolvimento da tecnologia industrial na cadeia produtiva da erva-mate. Curitiba, PR: MCT/CNPq/PADCT, 160 p. 2000.

MACEDO, I. C. C.; CHIEA, S. C. **Flora Fanerogâmica da reserva do parque estadual das fontes do Ipiranga (SP).** Hoehnea, v. 13, p 141-143, 1986.

MATSUBARA, S.; RODRIGUEZ AMAYA, D. Conteúdo de mirecitrina, quercetina e kaempferol em chás comercializados no Brasil. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, v.26, n. 2, p. 380-385, abr./jun., 2006.

MASON, T. L; WASSERMAN, B. P. Inactivation of red betaglucan synthase by native and oxydized phenolic compounds. **Phytochemistry**, v.26, p.2197-2202. 1987.

MEDRADO, M. J. S.; DALZOTO, D. N.; OLIZESKI, A.; MOSELE, S. H. **Recuperação de ervais degradados.** Colombo: Embrapa Florestas, (Embrapa Florestas. Comunicado técnico, 86), v.6 p, 2002.

MENDES, R. M. O. **Caracterização e a avaliação da erva mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) beneficiada no Estado de Santa Catarina.** Florianópolis, 2005. 119f. Dissertação (Mestrado Engenharia Química) – Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos, USFC.

MENEZES, A.E; DO NASCIMENTO, M.K; SOARES, P.K; AMORIM, N.L; NETO, L.G.J; CUNHA, A.F. Evaluation of the *in vitro* activity of meropenem against strains of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* isolated in the city of Fortaleza, Ceará. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** 40(3):349-350, mai-jun, 2007.

MIMS, C. C; PLAYFAIR, J; ROITT; WAKELIN, D; WILLIANS, R. **Microbiologia Médica.** 2ed. São Paulo: Manole, 1999.

MIRANDA, D.D.; ARÇARI, D.P.; PEDRAZZOLI, J. Jr.; CARVALHO, P. D.; CERUTTI, S. M.; BASTOS, D .H.; RIBEIRO, M. L. Protective effects of mate tea (*Ilex*

*paraguariensis*) on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced DNA damage and DNA repair in mice. **Mutagenesis**, 24 (4):375-81, 2008.

MIRANDA, N.; URBAN, T. **Engenhos & barbaquas**. Curitiba: Posigraf, 1998. 120p.

MOERMAN, D.E. The medicinal flora of native North America: an analysis. **Journal of Etnopharmacology**, v. 31, p. 1-42, 1991.

NASCIMENTO, G. G. F; LOCATELLI, J; FREITAS, P. C; SILVA, G. L. Antibacterial activity off plant extract and phytochemicals on antibiotic-resistant bactéria. **Brazilian Journal of Microbiology**. v31, n.2, p. 247-256, 2000.

OLIVA, E. V. Composição química e produtividade de procedências e progênes de erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) cultivadas em latossolo vermelho distrófico no município de Evaí – Paraná tese de mestrado, 2007.

OLIVEIRA, F. GOKITI, A. Fundamentos da Farmacobotânica. 2ªed. Atheneu: São Paulo, 157-162, 2000.

OLIVEIRA, Y. M. M.; ROTTA, E. **Área de distribuição natural de erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.)**. In: X Seminário sobre atualidades e perspectivas florestais: silvicultura da erva-mate, Curitiba, EMBRAPA – CNPF documentos, v. 15, p. 17-36, 1985.

PARADELLA T.C; KOGA-ITO, C.Y; JORGE, A. O. C. *Enterococcus faecalis*: clinical and microbiological considerations. **Rev Odontol**. UNESP. 36(2): 163-68, 2000.

PELCZAR Júnior, M. J; CHAN, E. C. S; KRIEG, N. R;. **Microbiologia: Conceitos e Aplicações**, São Paulo: Makron books, 2ªedição, 1996.

PIMM, S. L. The future of biodiversity. **Science**. v. 269, p. 347-350, 1995.

RANG, H. P.; DALE, M.M.; RITTER, J.M. **Farmacologia**. 6ª. Ed. Rio de Janeiro: Elsevier, p. 920, 2007.

REISSMANN, C. B.; CARNEIRO, C. Crescimento e Composição química de erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.), transcorridos oito anos de colagem. **Floresta**, v 34, p. 381-386, 2004.

REITZ, P. R.; EDWIN, G. **Aquifoliáceas. Flora Ilustrada Catarinense**, Itajaí: R Reitz, 47p., 1967.

RIBANI, R. H.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. **Compostos fenólicos em erva-mate e frutas**. Campinas, 2006. 137 f. Tese (Doutorado Ciência de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Unicamp, SP.

SATO, M; FUJIMOWARA, S; TSUCHIYA, H. Flavones with antibacterial activity against cariogenic bacteria. **Journal of Ethnopharmacology**, 54, 171-176, 1961.

SCHAECHTER, M; ENGLEBERG, N. C; EISENSTEN, B. I; MEDOFF, G. **Microbiologia Mecanismos da Doença Infecciosa**. 3ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002.

SILVA J. G; SOUZA, I.A; HIGINO, J.S; SIQUEIRA-JUNIOR; J.P; PEREIRA, J. V; PEREIRA, M. S. V. Atividade antimicrobiana do extrato de *Anacardium occidentale* Linn. em amostras multiresistentes de *Staphylococcus aureus*. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, 17(4): 572-577, Out./Dez, 2007.

SIMÕES, C; SCHENKEL, E; GOSMANN, G; MELLO, J; MENTZ, L; PETROVICK, P. **Farmacognosia da planta ao medicamento**. Florianópolis: 6ª Ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora Universidade/URFGS/Ed. Da UFSC, 2007.

SINGH, K.V. & SHUKLA, N.P. Activity on multiple resistant bacteria of garlic (*Allium sativum*) extract. **Fitoterapia**, v.55, p.313-315, 1984.

SOARES, S.E. Ácidos fenólicos como antioxidantes. **Rev Nutr**, 15(1): 71-81, 2002.

SOUZA, O. C; MARTINS, D. D; BARBOSA, S. C. C; RODRIGUES, N. S; YOSHIDA. S. P. Antimicrobial resistance profile of *Pseudomonas aeruginosa* isolated in feces of patients infected with human immunodeficiency virus. **CADERNO SAÚDE COLETIVA**, Rio de Janeiro, 15 (3): 392 -379, 2007.

SRINISAVASAN, D; NATHAN, S; SURESH, T; PERUMALSAMY, P. L. Antimicrobial activity of certain Indian medicinal plants used in folkloric medicine. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 74, n. 3, p. 217-220, 2001.

STROHL, W. R. The role of natural products in a modern drug discovery program. **Drug Discovery Today**, v. 5, p. 39-41, 2000.

TAVARES, W. Bactérias Gram-positivas problemas: resistência do estafilococo, do enterococo e do pneumococo aos antimicrobianos. **Rev. Soc. Brasil.Med. Trop.**, 33: 281-301, 2000.

TRABULSI, L.R; RACHID, L. Microbiologia. 4 ed, São Paulo: Atheneu, 2004 p. 720.

TORTORA, G. J; FUNKE, B. R; CASE; C. L. **Microbiologia**. 8ª Ed. Porto Alegre: Artmed, 2005.p .920.

WRIGHT, G. D. Bacterial resistance to antibiotics. Enzymatic degradation and modification. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.57, p. 1451-1470, 2005.

VALDUGA, E.; FREITAS, R. J. S. de; REISSMANN, C. B.; NAKASHIMA, T. Caracterização química da folha de *Ilex paraguariensis* St. Hil. (erva mate) e de outras espécies utilizadas na adulteração do mate. **Boletim do Centro de pesquisa de Processamento de Alimentos**, Curitiba, v. 15, n. 1, p. 25-36, 1995.

VALDUGA, T.A; BATTESTIN, V; FINZER, D.R.J. Secagem de extratos de erva mate em secador por Atomização. **Ciên. Technol. Aliment.**, Campinas, 23(2):184-189, maio-ago, 2003.

VENZKE, D; SERPA, R; Lima, C. M; RIBEIRO, A. G; FREITAG, A. R; BRETANHA, C. L; GOUVÊA, P. D. Disco-Difusão: Sensibilidade de Cepas Bacterianas à Tansagem. XVI Encontro de Química da Região Sul (16-SBQSul) FURB, 13 a 15 de novembro de 2008.

VIDOR, A. M, RUIZ, P. C, MORENO, V. S, FLOSS, A. P. variabilidade genética em um ensaio de progênies de erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.). **Ciência Rural** 32: 583-584, 2002.

**VIGILÂNCIA SANITÁRIA** disponível em:  
<http://elegis.bvs.br/leisref/public/showAct.php?id=10230> [Acesso em maio de 2009].

ZAMPIER, A.C. **Avaliação dos Níveis de Nutrientes, Cafeína e Taninos Após Adubação Mineral e Orgânica e Sua Relação com a Produtividade em Erva mate (*Ilex paraguariensis*)**. Dissertação (Mestrado) UFPR, 160P. 2001

## 8. ANEXO I

### **ANTI- *Helicobacter pylori* ACTIVITY OF PLANT EXTRACTS TRADITIONALLY USED FOR THE TREATMENT OF GASTROINTESTINAL DISORDERS**

Laura Lúcia Cogo<sup>1,2\*</sup>; Cristina Leise Bastos Monteiro<sup>2</sup>; Marilis Dallarmi Miguel<sup>3</sup>;  
Obdulio Gomes Miguel<sup>3</sup>; Miriam Machado Cunico<sup>3</sup>; Marcelo Lima Ribeiro<sup>4</sup>; Eloá  
Ramalho de Camargo<sup>4</sup>; Gislene Maria Botão Kussen<sup>1</sup>; Keite da Silva  
Nogueira<sup>1,3</sup> and Libera Maria Dalla Costa<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup>Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR, Brasil;

<sup>2</sup>ProGrma de Pós Graduação em Processos Biotecnológicos da Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR, Brasil; <sup>3</sup>ProGrma de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR, Brasil; <sup>4</sup>Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular da Unidade Integrada de Farmacologia e Gastroenterologia da Universidade São Francisco, Bragança Paulista, SP, Brasil.

\*Corresponding Author: Mailing address: Setor de Bacteriologia do Hospital de Clínicas, UFPR - Rua Padre Camargo, 280. CEP 80.060-240 - Curitiba - PR - Brasil. Tel.: +55 41 3360 7975. Fax: + 55 41 3360 1811. E-mail: lauracogo@ufpr.br

## **ABSTRACT**

The antibacterial activity of plant extracts obtained from *Bixa orellana* L., *Chamomilla recutita* L., *Ilex paraguariensis* A. St.-Hil., *Malva sylvestris* L., *Plantago major* L. and *Rheum rhaponticum* L. has been evaluated against two reference strains and eleven clinical isolates of *Helicobacter pylori*. All the plant species chosen are used in popular Brazilian cuisine and folk medicine in the treatment of gastrointestinal disorders. Initial screening was made by the disk diffusion test and then minimum inhibitory concentration was determined by the agar dilution method. The results presented in this work demonstrated that among the plant preparations analyzed, *B. orellana* L., *C. recutita* L., *I. paraguariensis* A. St.-Hil. and *M. sylvestris* L. were capable of inhibiting the *in vitro* growth of *H. pylori*.

**Key words:** *Helicobacter pylori*, antibacterial activity, plant extracts.

## INTRODUCTION

*Helicobacter pylori* is a Gram-negative spiral-shaped bacterium that was first isolated by Barry Marshall and J. Robin Warren. Since its discovery in 1983, the microorganism has been associated with the etiopathogenesis of several diseases of the digestive system, such as gastritis, peptic ulcer disease and gastric cancer (11). Conventional treatment for eradication therapy of these infections is mainly based on the use of multiple drugs, such as clarithromycin, amoxicillin, furazolidone, tetracycline and metronidazole with bismuth or a proton pump inhibitor (15).

Although the conventional treatment for eradication therapy of *H. pylori* allows obtaining high cure rates, eradication failure rate remains of 5-20 %. This fact may be partially explained by non-compliance in some patients who do not follow the treatment properly and by the development of resistance to antibiotics used (10). Therefore, there is a growing need to search new therapeutic agents that can hopefully eradicate this significant human pathogen and medicinal plants are a useful source of novel drugs. Several natural products have demonstrated antibacterial activity against *H. pylori* (18) and for centuries a wide variety of plants and substances derived from plants have been used to treat gastrointestinal disorders (2).

Many plants used in Brazil to treat these infections do not present any scientific evidence of efficacy. It is interesting to determine whether their traditional uses are supported by pharmacological effects or merely based on folklore. Within this context, extracts obtained from *Bixa orellana* L. (annatto),

*Chamomilla recutita* L. (chamomile), *Ilex paraguariensis* A. St.-Hil. (roasted and green yerba maté), *Malva sylvestris* L. (mallow), *Plantago major* L. (plantain) and *Rheum rhaponticum* L. (rhubarb) - all of which are used in popular Brazilian cuisine and folk medicine in the treatment of gastrointestinal disorders - were investigated for their anti-*H. pylori* activity.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **General**

Roots, rhizomes or aerial parts (leaves, stems, seeds, inflorescence) of the plants *Bixa orellana* L., *Chamomilla recutita* L., *Ilex paraguariensis* A. St.-Hil., and *Plantago major* L. were collected in Paraná state, Southern region of Brazil (cities of Morretes, Lapa, Piraquara, and Curitiba respectively) and identified by Dr. Gerdt Hatschbach from Museu Botânico Municipal da Prefeitura de Curitiba, Paraná (MBM), where the vouchers have been deposited. The plants *Malva sylvestris* L. and *Rheum rhaponticum* L. were obtained commercially (Flores & Ervas, Piracicaba, SP, Brazil); the voucher specimens, including identification and classification of plant materials, had been preserved by the company.

The parts of each plant examined and voucher numbers are shown in Table 1.

## **Extraction of materials**

A total of 50g of each plant species was exhaustively extracted with aqueous 96% ethanol (v/v) by maceration at room temperature. The extracts were obtained after filtration and concentration of the material under reduced pressure until the final volume of 50 ml.

Stock solutions of the extracts were made with sterile distilled water at concentration of 100 mg/ml which were used in the disk diffusion test. Another was made at the same concentration, now with dimethylsulphoxide (DMSO), to perform the determination of the minimum inhibitory concentration. Final concentration of DMSO in the culture medium did not exceed 1% (12).

## **Bacterial strains**

A total of eleven clinical isolates of *H. pylori* obtained from the gastric mucosa of patients submitted to upper endoscopy and subsequently diagnosed with gastritis, peptic ulcer disease or gastric cancer were used in the present study. Clinical isolates were coded with the numbers of access BP-84, BP-667, BP-660, BH-27, BP-446, BP-650, BP-118, BP-713, BP-132, BP-652 and F-39 in order to preserve the identity of the patients from whom they were obtained and were previously approved by the Ethics Committee with the issuing of protocol number 982.021/2005-01.

Reference strains *H. pylori* 26695 (23) and J99 (1), that had their genomes completely sequenced, were tested as control. All the strains were previously evaluated against clarithromycin, amoxicillin, furazolidone,

tetracycline and metronidazole, which are antibiotics commonly used in conventional therapy.

### **Preparation of bacterial suspensions**

An inoculum of each strain used in susceptibility tests was prepared by transferring fresh colonies of the microorganisms in tubes containing sterile physiological saline solution and adjusting the turbidity to the 2.0 McFarland standard (7). This turbidity produces a suspension that corresponds to approximately  $6.0 \times 10^8$  CFU/mL of *H. pylori*.

### **Disk diffusion test**

In the initial phase, the disk diffusion test was used as screening to analyze the susceptibility of reference strains *H. pylori* 26695 and J99 against to different plant extracts. The bacterial suspensions were spread-plated onto Columbia Agar plates (Oxoid, Basingstoke, UK) supplemented with 10% defibrinated sheep blood (Newprov, Curitiba, Brazil). Filter paper disks of 6mm diameter impregnated with 5mg of each extract (50 $\mu$ l of stock solutions) were placed onto the surface of the inoculated agar. The plates were incubated at 37°C under microaerophilic conditions and observed after 3 to 5 days. The tests were performed in triplicate and the antimicrobial activity was expressed in terms of the mean diameter of the inhibition zone around the disks impregnated with the plant extracts tested, as presented in Table 1.

## Determination of the minimum inhibitory concentration

All the extracts that had produced an inhibition zone greater than 6 mm in the disk diffusion test were separated to determine the MIC by the agar dilution method. In addition to reference strains, 11 clinical *H. pylori* isolates were subjected to this test.

The stock solutions made with DMSO were further serially diluted in distilled sterile water and 1 mL of each dilution was incorporated into 19 mL of molten Columbia agar (Oxoid, Basingstoke, UK) containing 10% defibrinated sheep blood (Newprov, Curitiba, Brazil) to be then transferred separately into Petri dishes. The final concentrations of the extracts in the culture medium ranged from 5.0 to 0.625 mg/mL.

Bacterial suspensions were prepared as described above, and 1  $\mu$ L of each suspension was spotted with a multipoint inoculator onto the surface of the agar plates containing consecutive dilutions of plant extracts. After that, plates were incubated at 37°C in a microaerophilic atmosphere for 72 hours and MIC, which is defined as the lowest concentration of an extract that inhibits the visible growth of a microorganism, was determined. For clinical isolates, MIC<sub>50</sub> and MIC<sub>90</sub> were determined and defined as the concentrations that inhibited, respectively, 50 and 90% of the strains evaluated. All tests were conducted in triplicate, in addition to growth controls with and without DMSO.

[Suggestion for the approximate location of Table1]

## RESULTS AND DISCUSSION

According to the data reported in Table 1, of all the plant extracts submitted to the screening test, *B. orellana* L., *C. recutita* L., *I. paraguariensis* A. St.-Hil. (green and roasted Yerba Maté varieties) and *M. sylvestris* L. produced inhibition zone diameters by the disk diffusion test. However, there is a disadvantage to this method in that it yields only qualitative results. The absence of objective quantification inherent in the method makes it impossible to compare the degree of antimicrobial activity of the extracts against the *H. pylori* strains investigated (3). For that reason, in the next stage of the study, MIC values were determined by the agar dilution method. The results obtained are shown in Table 2.

[Suggestion for the approximate location of Table 2]

The agar dilution test confirmed an anti-*H. pylori* activity of all the plant extracts evaluated, with *C. recutita* L. and *I. paraguariensis* A. St.-Hil. (green Yerba Maté variety) showing to be more potent (MIC<sub>50</sub>: <0.625 mg/ml) than *B. orellana* L. (MIC<sub>50</sub>: 1.25 mg/ml), *I. paraguariensis* A. St.-Hil. (roasted Yerba Maté variety) (MIC<sub>50</sub>: 1.25 mg/ml) and *M. sylvestris* L (MIC<sub>50</sub>: >5.0 mg/ml). The MIC<sub>90</sub> values demonstrated that *I. paraguariensis* A. St.-Hil. was able to inhibit a higher number of clinical isolates when compared with other extracts, although the green Yerba Maté variety (MIC<sub>90</sub>: 5.0 mg/ml) was slightly less active than the roasted variety (MIC<sub>90</sub>: 2.5 mg/ml).

Previous investigations have demonstrated that *I. paraguariensis* A. St.-Hil., widely consumed as part of the usual diet in Brazil in the form of tea

(roasted yerba maté) and *chimarrão* (green yerba maté), presents several secondary metabolic products that have antimicrobial activity, including phenolic compounds, triterpenes and flavonoids (21). As for *C. recutita* L., this plant has anti-inflammatory and calming properties and is also used to treat gastric colic, and several forms of gastritis, stomatitis, laryngitis and pharyngitis (17). Flavonoids - particularly apeginine - and essential oils are among the main constituents of the plant extract (13).

Research conducted by Stamatidis *et al.* (22) confirmed the anti-*H. pylori* activity of *C. recutita* L. extract. Although, the plant part used to produce the extract in their work was not specified, which may directly influence the development of results (5).

*B. orellana* L. and *M. sylvestris* L. were other plant extracts evaluated by the agar dilution method. The first plant - widely used in Brazilian home cooking - is known to contain an essential oil rich in *all-E*-geranylgeraniol, oxygenated monoterpenes and sesquiterpenes (8). The second one is composed of mucilage, tannins, essential oils and flavonoids (4) reasons why it is used as anti-inflammatory and support in the treatment of different types of infections (14).

Moreover, it is important to note that the most active substances found in the plants screened in these experiments have recognized properties in gastrointestinal digestive diseases and presented stable activity at acid pH (9).

[Suggestion for the approximate location of Table3]

Increasing antimicrobial resistance is a serious global problem that is present in this important human pathogen (6). Mendonça *et al.* reported the

susceptibility profile involving Brazilian *H. pylori* strains. Resistance rates were observed as to metronidazole, amoxicillin and clarithromycin of 42%, 29% and 7% respectively; values of furazolidone (4%) and tetracycline (7%) were also presented (16).

In this study, for each *H. pylori* strain evaluated for the antimicrobial activity of plant extracts, susceptibility to antibiotics used in conventional therapy, was also characterized as shown in Table 3. These strains presented different susceptibility profiles and, in some cases, resistance to one or more antibiotics. Interestingly, the resistant strains evaluated against the different extracts, demonstrated a similar profile when compared to sensitive ones (Table 2).

In summary, a variety of plant species is capable of synthesizing many substances which show antibacterial activity. These properties have been described to extracts of many plants found in Brazilian flora (19,20). However, as regards the plant extracts included in this work, there are no previous studies that evaluate the proposed feature, except for *C. recutita* L. (22). Results demonstrate that the extracts obtained from plants *B. orellana* L., *C. recutita* L., *I. paraguariensis* A. St.-Hil. and *M. sylvestris* L. were capable of inhibiting the *in vitro* growth of *H. pylori* and could form a promising basis for further investigation in the discovery of new natural anti-*H. pylori* compounds.

## **ACKNOWLEDGEMENTS**

The authors would like to thank Dr. Gerdt Guenther Hatschbach from Museu Botânico Municipal da Prefeitura de Curitiba, for the botanical identification and NEBaC (Núcleo de Estudos em Bacteriologia Clínica de Curitiba), for the financial support.

## REFERENCES

1. Alm, R. A.; Ling, L. S.; Moir, D. T.; King, B. L.; Brown, E. D.; Doig, P. C.; Smith, D. R.; Noonan, B.; Guild, B. C.; deJonge, B. L.; Carmel, G.; Tummino, P. J.; Caruso, A.; Uria-Nickelsen, M.; Mills, D. M.; Ives, C.; Gibson, R.; Merberg, D.; Mills, S. D.; Jiang, Q.; Taylor, D. E.; Vovis, G. F.; Trust, T. J. (1999). Genomic-sequence comparison of two unrelated isolates of the human gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature*, 397(6715):176-80.
2. Borrelli, F.; Izzo, A. A. (2000). The plant kingdom as a source of anti-ulcer remedies. *Phytother. Res.*, 14, 581-591.
3. Bresolin, T. M. B.; Cechinel Filho (2003). Ciências Farmacêuticas - Contribuição ao Desenvolvimento de Novos Fármacos e Medicamentos. Editora Univali, Itajaí, Santa Catarina, Brasil.
4. Buffon, M. C. M.; Lima, M. L. C.; Galarda, I.; Cogo, L. (2001). Avaliação da eficácia dos extratos de *Malva sylvestris*, *Calêndula officinalis*, *Plantago major* e *Curcuma zedoarea* no controle do crescimento das bactérias da placa dentária. Estudo "in vitro". *Visão Acadêmica*, 2 (1), 31-38.

5. Cechinel Filho, V.; Yunes, R. A. (1998). Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. *Quím. Nova*, 21 (1), 99-105.
6. Chatterjee, A.; Yasmin, T.; Bagchi, D.; Stohs, S. (2004). Inhibition of *Helicobacter pylori in vitro* by various berry extracts, with enhanced susceptibility to clarithromycin. *Mol. Cell. Biochem*, 265, 19-26.
7. Clinical and Laboratory Standards Institute (2006). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Sixteenth informational supplement M100-S16. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
8. Coelho, A. M. S. P.; Silva, G. A.; Vieira, O. M. C.; Chavasco, J. K. (2003). Atividade antimicrobiana de *Bixa orellana* L. (Urucum). *Revista Lecta*, 21 (1/2), 47-54.
9. Friedman, M., Jürgens, H. S. (2000). Effect of pH on the stability of plant phenolic compounds. *J. Agr. Food Chem.*, 48 (6): 2101-2110.
10. Gadhi, C. A.; Benharref, A.; Jana, M.; Lozniewski, A. (2001). Anti-*Helicobacter pylori* activity of *Aristolochia paucinervis* Pomel extracts. *J. Ethnopharmacol.*, 75 (2-3), 203-205.
11. Kusters, J. G.; Van Vliet, A. H.; Kuipers, E. J. (2006). Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. *Clin. Microbiol., Rev.* 19 (3), 449-490.
12. Li, Y.; Xu, C.; Zhang, Q.; Liu, J. Y.; Tan, R. X. (2005). In vitro anti-*Helicobacter pylori* action of 30 Chinese herbal medicines used to treat ulcer diseases. *J. Ethnopharmacol.*, 98 (3), 329-33.

13. Mapeli, N. C.; Viera, M. C.; Heredia, Z. N. A.; Siqueira, J. M. (2005). Produção de biomassa e de óleo essencial dos capítulos florais da camomila em função de nitrogênio e fósforo. *Hortic. bras.*, 23 (1), 32-37.
14. Martinazzo, A. P.; Martins, T. (2004). Plantas medicinais utilizadas pela população de Cascavel/PR. *Arq. Ciênc. Saúde Unipar*, 8 (1), 3-6.
15. Megraud, F.; Lehours, P. (2007). *Helicobacter pylori* detection and antimicrobial susceptibility testing. *Clin. Microbiol. Rev.*, 20 (2), 280-322.
16. Mendonça, S.; Ecclissato, C.; Sartori, M. S.; Godoy, A. P.; Guerzoni, R. A.; Degger, M.; Pedrazzoli Jr, J. (2000). Prevalence of *Helicobacter pylori* resistance to metronidazole, clarithromycin, amoxicillin, tetracycline, and furazolidone in Brazil. *Helicobacter*, 5(2):79-83
17. Morais, T. C.; Vieira, M. C.; Heredia, Z. N. A.; Teixeira, I. R.; Ramos, M. B. M. (2006). Produção de biomassa e teor de óleos essenciais da camomila (*Chamomilla recutita* (L.) Rauschert) em função das adubações com fósforo e nitrogênio. *Rev. Bras. Pl. Med.*, 8 (4), 120-125.
18. Nostro, A.; Cellini, L.; Di Bartolomeo, S.; Di Campi, E.; Grande, R.; Cannatelli, M.A.; Marzio, L.; Alonzo, V. (2005). Antibacterial effect of plant extracts against *Helicobacter pylori*. *Phytother. Res.*, 19 (3), 198-202.
19. Oliveira, D. F.; Pereira, A. C.; Figueiredo, H. C. P; Carvalho, D. A.; Silva, G.; Nunes, A. S.; Alves, D. S.; Carvalho, H. W. P. (2007). Antibacterial activity of plant extracts from Brazilian southeast region. *Fitoterapia*, 78, 142-145.

20. Sartoratto, A.; Machado, A. L. M.; Delarmelina, C.; Figueira, G. M.; Duarte, M. C.; Rehder, V. L. G. (2004). Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. *Braz. J. Microbiol.*, 31, 247-256.
21. Schubert, A.; Zanin, F.F.; Pereira, D.F.; Athayde, M.L. (2006). Variação anual de metilxantinas totais em amostras de *Ilex paraguariensis* A. St. - Hil. (erva-mate) em Ijuí e Santa Maria, Estado do Rio Grande do Sul. *Quím. Nova*, 29 (6), 1233-1236.
22. Stamatis, G.; Kyriazopoulos, P.; Golegou, S.; Basayiannis, A.; Skaltsas, S.; Skaltsa, H. (2003). In vitro anti-*Helicobacter pylori* activity of Greek herbal medicines. *J. Ethnopharmacol.*, 88, 175-179.
23. Tomb, J. F.; White, O.; Kerlavage, A. R.; Clayton, R. A.; Sutton, G. G.; Fleischmann, R. D.; Ketchum, K. A.; Klenk, H. P.; Gill, S.; Dougherty, B. A.; Nelson, K.; Quackenbush, J.; Zhou, L.; Kirkness, E. F.; Peterson, S.; Loftus, B.; Richardson, D.; Dodson, R.; Khalak, H. G.; Glodek, A.; McKenney, K.; Fitzgerald, L. M.; Lee, N.; Adams, M. D.; Hickey, E. K.; Berg, D. E.; Gocayne, J. D.; Utterback, T. R.; Peterson, J. D.; Kelley, J. M.; Cotton, M. D.; Weidman, J. M.; Fujii, C.; Bowman, C.; Watthey, L.; Wallin, E.; Hayes, W. S.; Borodovsky, M.; Karp, P. D.; Smith, H. O.; Fraser, C. M.; Venter, J. C. (1997). The complete genome sequence of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature*, 388(6642):539-47.

**Table 1.** Analysis of anti-*Helicobacter pylori* activity of plant extracts by disk diffusion test.

Species (voucher numbers)	Family	Plant part used	Mean of inhibition zone * (mm)	
			<i>H. pylori</i> J99	<i>H. pylori</i> 26695
<i>Bixa orellana</i> L. (MBM 212752)	Bixaceae	Seed	7	10
<i>Chamomilla recutita</i> L. (MBM 189637)	Asteraceae	Inflorescence	10	11
<i>Ilex paraguariensis</i> A. St.-Hil. (MBM 113738)	Aquifoliaceae	green leaves	9	10
<i>Ilex paraguariensis</i> A. St.-Hil. (MBM 113738)	Aquifoliaceae	roasted leaves	9	9
<i>Malva sylvestris</i> L. (Flores & Ervas)	Malvaceae	inflorescence and leaves	10	8
<i>Plantago major</i> L. (MBM 243458)	Plantaginaceae	above-ground parts	< 6	< 6
<i>Rheum rhaponticum</i> L. (Flores & Ervas)	Polygonaceae	Root	< 6	< 6

\*Final concentration of each extract = 5 mg/disk

**Table 2.** MIC (mg/mL) values of plant extracts against clinical isolates and reference strains of *Helicobacter pylori*.

<i>H. pylori</i> strains	Plant extracts				
	<i>B. orellana</i>	<i>C. recutita</i>	<i>I. paraguariensis</i> (green yerba mate)	<i>I. paraguariensis</i> (roasted yerba mate)	<i>M. sylvestris</i>
<i>H. pylori</i> 26695	< 0.625	< 0.625	< 0.625	< 0.625	< 0.625
<i>H. pylori</i> J99	< 0.625	< 0.625	< 0.625	2.5	1.25
BP-84	>5.0	>5.0	5.0	1.25	>5.0
BP-667	>5.0	>5.0	5.0	5.0	>5.0
BP-660	>5.0	>5.0	5.0	1.25	>5.0
BH-27	1.25	< 0.625	< 0.625	< 0.625	>5.0
BP-446	1.25	< 0.625	< 0.625	2.5	>5.0
BP-650	>5.0	>5.0	5.0	< 0.625	>5.0
BP-118	< 0.625	< 0.625	< 0.625	< 0.625	0.625
BP-713	>5.0	< 0.625	2.5	5.0	2.5
BP-132	>5.0	< 0.625	< 0.625	2.5	5.0
BP-652	< 0.625	< 0.625	< 0.625	2.5	2.5
F-39	1.25	< 0.625	< 0.625	< 0.625	>5.0
<b>MIC<sub>50</sub></b>	1.25	<0.625	<0.625	1.25	>5.0
<b>MIC<sub>90</sub></b>	>5.0	>5.0	5.0	2.5	>5.0

**Table 3.** Susceptibility test of *Helicobacter pylori* reference strains and clinical isolates.

Strains	Antibiotics				
	Cla	Am	Fu	Tet	Met
26695*	S**	S	S	S	S
J99*	S	S	S	S	S
BP-84	S	R***	S	S	S
BP-667	S	S	R	S	S
BP-660	S	S	S	S	S
BH-27	S	R	S	S	S
BP-446	R	S	S	S	R
BP-650	S	S	S	S	S
BP-118	S	R	S	R	S
BP-713	S	S	S	S	S
BP-132	S	R	S	S	S
BP-652	S	S	S	S	S
F-39	S	S	S	S	S

Cla - Clarithromycin, Am - Amoxicillin, Fu - Furazolidone, Tet - Tetracycline, Met – Metronidazole

\* Reference strains, \*\* Susceptibility, \*\*\*Resistance.