

Artigo Original

**Atividade antimicrobiana de extratos de *Ilex paraguariensis***

Antimicrobial activity of *Ilex paraguariensis* extracts

Júlia Oliveira Penteadó<sup>1</sup>, Lisiane Martins Volcão<sup>1</sup>, Daniela Fernandes Ramos<sup>1</sup>, Flávio Manoel da Silva-Júnior<sup>1</sup>, Ana Luiza Muccillo-Baisch<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> Universidade Federal de Rio Grande, Rio Grande, RS, Brasil.

Submissão: 26/09/2016

Aceite: 03/10/2016

[julia-penteadó@hotmail.com](mailto:julia-penteadó@hotmail.com)

**RESUMO**

**JUSTIFICATIVA E OBJETIVO:** A *Ilex paraguariensis* St. Hilaire é conhecida popularmente como mate ou erva-mate, consumida popularmente no sul do Brasil, Paraguai e Argentina. Estudos têm evidenciado atividades bioativas da *Ilex paraguariensis*, como a atividade antioxidante, antiinflamatória, diurética, digestiva, cicatricial e estimulante, conferindo um potencial terapêutico à mesma. Tais atividades bioativas da *Ilex paraguariensis* podem estar relacionadas com os compostos presentes na planta. Como exemplo a presença de polifenóis, flavonoides, xantinas, aminoácidos, vitaminas e minerais. Devido às informações contraditórias sobre os compostos das plantas que contribuem para a atividade antimicrobiana, o presente trabalho teve por objetivo determinar o potencial antimicrobiano dos extratos hexânico, metanólico e aquoso de *Ilex paraguariensis*, frente as bactérias gram-positivas e gram-negativas. **METODOLOGIA:** Para avaliação da atividade antimicrobiana foi realizada a técnica de microdiluição em caldo, frente às cepas *Staphylococcus aureus* (ATCC 12598), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 700603), *Acinetobacter baumannii* (ATCC 19606) e *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 15442). **RESULTADOS:** A atividade antimicrobiana de *Ilex paraguariensis* foi demonstrada pelo extrato hexânico e aquoso nos quais apresentaram atividade antimicrobiana frente a todos os microrganismos estudados. Sendo que, a melhor inibição para o extrato aquoso CMI = 25 µg/mL foi frente ao *Staphylococcus aureus*, enquanto para o extrato hexânico a CMI 100 µg/mL para a *Acinetobacter baumannii*. **CONCLUSÃO:** Portanto, a *Ilex paraguariensis* é uma fonte de pesquisa para novos agentes antimicrobianos naturais. Estes extratos são possíveis candidatos cuja atividade antimicrobiana poderá contribuir para o tratamento de doenças infecciosas causadas tanto por bactérias gram-positivas quanto negativas.

**DESCRITORES:** *Ilex paraguariensis*. Bactérias. Produtos naturais.

## INTRODUÇÃO

A *Ilex paraguariensis* A. St. - Hil (Aquifoleaceae) é uma espécie vegetal e suas folhas secas e moídas são utilizadas no preparo de uma bebida peculiar, consumida por parte da população da América do Sul<sup>1</sup>. Nos países onde é consumida recebe diferentes denominações, sendo “chimarrão” no Sul do Brasil, “mate” na Argentina e Uruguai e “tererê” no Paraguai<sup>2</sup>. Mais recentemente, está crescendo em popularidade nos Estados Unidos como um ingrediente alimentar ou em suplementos alimentares<sup>3,4</sup>.

Alguns estudos indicam que os derivados de *Ilex paraguariensis* possuem diversas propriedades benéficas, tais como atividade antioxidante, antitumoral, diurética, digestiva, cicatricial e estimulante, conferindo um grande potencial terapêutico a mesma<sup>5</sup>. Estas bioatividades estão relacionadas com a presença de diferentes classes de compostos fenólicos, principalmente, ácido gálico, ácido siríngico, ácido cafeico, ferúlico e  $\rho$ -cumárico, quercetina, rutina e metilxantinas<sup>6</sup>.

A pesquisa com substâncias naturais, como as plantas, tem se tornado um indicativo medicinal, isto devido às propriedades farmacológicas já relatadas, como atividades antioxidante, antitumoral, antiinflamatória e antimicrobiana<sup>7-9</sup>. O uso medicinal das plantas pode ser explicado devido à diversidade dos compostos e a estrutura complexa das plantas que podem agir em sinergismo com outras substâncias<sup>10</sup>. Em particular, as plantas demonstram a vantagem de mimetizar os efeitos secundários associadas ao tratamento de antimicrobianos convencionais<sup>11-12</sup>.

O sucesso do uso de qualquer agente terapêutico é comprometido com o desenvolvimento de resistência do agente ao composto a partir do momento no qual é empregado. Isto se aplica para agentes utilizados no tratamento de infecções bacterianas, fúngicas, parasitárias, virais e para o tratamento de doenças crônicas como o câncer e diabetes<sup>13</sup>.

No caso específico de agentes antimicrobianos, esta situação tem sido agravada por um aumento do desenvolvimento de resistência por diferentes microrganismos, incluindo bactérias e parasitas, e o custo elevado de agentes antimicrobianos<sup>14</sup>. O aumento da prevalência das bactérias multirresistentes e com dose dependente dos antibióticos denota a situação direta de morbidade e mortalidade. Logo, se busca novas estratégias de combate a infecção<sup>15</sup>. O desenvolvimento de novos fármacos, eficientes e de baixo custo é, portanto, de grande importância.

Nos últimos anos, poucos estudos têm sido realizados a fim de evidenciar a relação do potencial antimicrobiano de *Ilex paraguariensis* com os espectros de bactérias gram-positivas e gram-negativas<sup>14,14,17</sup>. Existem informações contraditórias sobre quais os compostos das plantas podem contribuir para a atividade antimicrobiana e, se estes compostos, podem ter efeito bactericida ou sinérgico quando utilizados em combinação<sup>4</sup>.

Diante do exposto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade antimicrobiana do extrato de *Ilex paraguariensis* frente a quatro bactérias de interesse clínico.

## MÉTODOS

### Caracterização e preparo da amostra

A *Ilex paraguariensis* foi adquirida localmente a partir do comércio da cidade de Rio Grande, Rio Grande do Sul, Brasil. Os extratos foram obtidos por banho de ultrassom usando o modelo Ultronique Q3.0/40A em frequência de 40 KHz, por 20 minutos. Após, a filtragem dos extratos foi realizada utilizando papel filtro 12,5 µm.

Os extratos foram evaporados por liofilização a vácuo (SPD1010-115 *speed vac* ® Thermo savant) em frequência 50/60Hz e mantidos sob refrigeração. Para os ensaios, os extratos foram dissolvidos em DMSO 10mg/mL – 200µg/mL.

### Avaliação da atividade antimicrobiana

Para o estudo foram avaliados os extratos de *Ilex paraguariensis* através do método de microdiluição em caldo de acordo com CLSI (2012), conforme descrito: foram adicionados 50µL de caldo Muller Hinton e 50µL de cada extrato de *Ilex paraguariensis*, realizada a microdiluição 1:2 de maneira a testar os extratos nas concentrações de 200 a 0,390 µg/mL. Após foram adicionados 50µL de inóculo de *Staphylococcus aureus* (ATCC 00022), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 700603), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 15442) e *Acinetobacter baumannii* (ATCC 19606).

A placa foi incubada por 24 horas a 37°C. Além disso, foram adicionados controles de esterilidade do meio e dos extratos e de viabilidade bacteriana. Após o período de incubação foi adicionado 30µL de resazurina 0,02% e realizada a leitura a

600nm. A Concentração Inibitória Mínima (CMI) foi definida como sendo a menor concentração do extrato capaz de inibir o crescimento bacteriano. Além disso, foi definida o IC 90% (concentração inibitória de 90% da população bacteriana).

## RESULTADOS

Neste estudo, foram testados os extratos hexânico, metanólico e aquoso de *Ilex paraguariensis*, sendo que apenas os extratos hexânico e aquoso foram ativos com CMI entre 25µg/mL e 200µg/mL, respectivamente, para todas as espécies bacterianas avaliadas.

O presente estudo de atividade antimicrobiana *in vitro* demonstrou que os extratos inibiram o crescimento de bactérias gram-positiva e gram-negativas. Sendo que, o extrato que apresentou melhor inibição para as cepas estudadas foi o extrato aquoso (CMI 25µg/mL).

O extrato aquoso de *Ilex paraguariensis* apresentou melhor atividade antimicrobiana frente a *S. aureus* (IC90%= 18,532µg/mL) quando comparada com as demais espécies bacterianas avaliadas, cujo IC90% foi de 151,09, 82,70 e 34,40 para *K. pneumoniae*, *A. baumannii* e *P. aeruginosa*, respectivamente.

Já o extrato hexânico frente a *A. baumannii* apresentou a melhor IC90% (99,60µg/mL) quando comparada com *K. pneumoniae* (166,72 µg/mL), *P. aeruginosa* (125.68µg/mL) e *S. aureus* (105,30µg/mL).

**Tabela 1. Concentração mínima inibitória das bactérias gram-positiva e gram-negativa pelos tratamentos dos extratos de *Ilex paraguariensis*.**

Cepas	Extratos (CMI µg/mL)		
	Hexânico	Metanólico	Aquoso
<i>Staphylococcus aureus</i>	200µg/mL	200µg/mL	25µg/mL
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	200µg/mL	200µg/mL	200µg/mL
<i>Acinetobacter baumannii</i>	100µg/mL	200µg/mL	50µg/mL
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	200µg/mL	200µg/mL	100µg/mL

## DISCUSSÃO

A família Aquifoliaceae abrange mais de 400 espécies do gênero *Ilex*, algumas destas já foram relatadas na literatura demonstrando atividade antimicrobiana frente a diversas bactérias gram-positivas e gram-negativas. A *Quercus ilex* encontrada peculiarmente no Marmara, Egeu e Turquia apresentou atividade antimicrobiana contra sete cepas diferentes com CMI entre 125-500 µg/mL<sup>18-20</sup>. *Ilex integra*, distribuída à beira-mar em todo o Japão, Taiwan e China, demonstrou atividade antimicrobiana significativa contra bactérias e fungos filamentosos<sup>21</sup>, já as *Ilex latifolia* e *Ilex Kudingcha*, tradicional em diferentes áreas da China, foram caracterizadas com atividade antimicrobiana devido aos seus compostos bioativos ácidos fenólicos, flavonóides e os óleos essenciais presente na mesma<sup>22-23</sup>.

Os extratos de *Ilex paraguariensis* demonstram diferentes atividades inibitórias para os microrganismos estudados, o que pode ser atribuído a variação da composição química de cada extrato. Os estudos divergem sobre quais compostos podem contribuir para a atividade antimicrobiana e se, estes compostos, podem ter efeitos aditivos ou sinérgicos quando utilizados em combinação. Os principais compostos encontrados nos extratos de *Ilex paraguariensis* que podem contribuir para sua atividade antimicrobiana incluem o ácido caféico, cafeína, ácido clorogênico, kaempferol, quercetina, ácido quínico, rutina e teobromina<sup>4,24</sup>.

A ação antimicrobiana contra bactérias gram-positivas pode ser compreendida por estas apresentarem parede celular quimicamente menos complexa, com menor teor lipídico e ausência de membrana celular externa em comparação às gram-negativas<sup>25-26</sup>. Porém, Haraguchi et al. (1999) sugerem que os triterpenos encontrados nas plantas do gênero *Ilex* geram mudança na permeabilidade da membrana, resultando na alteração da membrana lipídica do microrganismo, sendo essa a razão da atividade antimicrobiana.

Diante dos resultados obtidos pelo presente trabalho, o qual evidenciou ação antimicrobiana dos extratos hexano e aquoso de *Ilex paraguariensis* frente à bactéria gram-positiva *Staphylococcus aureus*, pode-se inferir que ambos os extratos, possivelmente, expressem capacidade de inibir outros microrganismos gram-positivos assim como a bactéria gram-positiva *Staphylococcus aureus* do presente estudo.

O estudo realizado por Rempe et al. (2015) corrobora com estes achados demonstrando ação antimicrobiana do extrato aquoso de *Ilex paraguariensis* frente à bactéria gram-positiva *Staphylococcus aureus*. Assim como Martin et al. (2013) com diferentes extratos das folhas de *Ilex paraguariensis* (metanólico e etanólico). E,

Girolometto et al. (2009) evidenciam a mesma associação com os extratos etanólico e hidroalcoólico de *Ilex paraguariensis*.

Alguns autores relatam que bactérias gram-negativas são menos suscetíveis à ação antimicrobiana<sup>29-30</sup>, porém o presente estudo encontrou tal atividade contra as bactérias *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii*. Isto pode ser explicado devido aos polifenóis encontrados no extrato hexânico de *Ilex paraguariensis* (em média uma quantidade de 92 mg), tais como o ácido caféico e clorogênico que agem, principalmente, contra bactérias gram-negativas rompendo a membrana celular dessas bactérias<sup>31</sup>. Além de outros numerosos fitoquímicos ativos identificados no extrato aquoso de *Ilex paraguariensis*, entre eles, as xantinas (caféina e teobromina), os flavonóides (quercetina e kampferol), aminoácidos, minerais (P, Fe, e Ca), e vitaminas (C, B1 e B2)<sup>32,33</sup>.

Não há consenso na literatura com relação à atividade antimicrobiana da *Ilex paraguariensis* e as bactérias gram-negativas. Porém, o presente trabalho encontrou atividade antimicrobiana dos extratos hexânico e aquoso de *Ilex paraguariensis*, nos quais demonstraram inibição para todas as bactérias gram-negativas *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* e *Klebsiella pneumoniae*.

Alguns autores relatam a associação da atividade antimicrobiana com diferentes extratos de *Ilex paraguariensis* frente bactérias gram-negativas. Em estudo De Biasi et al. (2009) evidenciaram atividade antimicrobiana com extrato hidroalcoólico de *Ilex paraguariensis* frente à bactéria *Pseudomonas aeruginosa* (CMI = 100mg/mL), resultado igual ao do presente trabalho (CMI = 100mg/mL). Os achados demonstrados por Carelli et al. (2011) divergem, parcialmente, do presente trabalho, pois descrevem atividade antimicrobiana da bactéria *Pseudomonas aeruginosa* (CMI = 100mg/mL), porém não encontraram atividade frente à cepa *Acinetobacter baumannii* enquanto os extratos hexano (CMI = 100mg/mL) e aquoso (CMI = 50mg/mL) de *Ilex paraguariensis* apresentam inibição para ambas bactérias do presente estudo. Bittencourt-Junior et al. (2012) reportaram não haver atividade inibitória do extrato hidroalcoólico de *Ilex paraguariensis* frente à bactéria *Klebsiella pneumoniae*, divergindo do identificado pelos extratos hexano (CMI = 200mg/mL) e aquoso (CMI = 200mg/mL) neste trabalho.

A utilização da *Ilex paraguariensis* como um antimicrobiano é um conceito relativamente novo<sup>36</sup> e ainda não foi completamente estudado e analisado. Portanto, os achados do presente estudo reforçam a importância da *Ilex paraguariensis* como uma

fonte promissora de pesquisa para novos agentes antimicrobianos naturais. Isto, principalmente com relação ao extrato hexânico de *Ilex paraguariensis*, devido à escassez de estudos na literatura com esse tipo de extrato, e também devido a elevada atividade antimicrobiana encontrada no mesmo. Estes extratos são possíveis candidatos cuja atividade antimicrobiana poderá contribuir para o tratamento de doenças infecciosas causadas tanto por bactérias gram-positivas quanto negativas.

## REFERÊNCIAS

1. Boomsma J, Jensen A, Meyling N, et al. Evolutionary interaction networks of insect pathogenic fungi. *Annu Rev Entomol* 2014;59:467-485. DOI: <https://www.doi.org/10.1146/annurev-ento-011613-162054>
2. Bracesco N, Sanchez AG, Contreras V, et al. Recent advances on *Ilex paraguariensis* research: Minireview. *J Ethnopharmacol* 2011; 136(3): 378-384. DOI: <https://www.doi.org/10.1016/j.jep.2010.06.032>
3. Heck CI, Schmalko M, de Mejia EG, et al. Effect of growing and drying conditions on the phenolic composition of mate teas (*Ilex paraguariensis*). *J Agric Food Chem* 2008;56(18):8394–8403. DOI: <https://www.doi.org/10.1021/jf801748s>.
4. Burris KP, Davidson PM, Stewart CN Jr, et al. Antimicrobial activity of yerba mate (*Ilex paraguariensis*) aqueous extracts against *Escherichia coli* O157:H7 and *Staphylococcus aureus*. *J Food Sci* 2011;136(3): 378-384. DOI: <https://www.doi.org/10.1111/j.1750-3841.2011.02255.x>
5. Fagundes A, Danguy LB, Schmitt V, et al. *Ilex paraguariensis*: compostos bioativos e propriedades nutricionais na saúde. *RBONE* 2015;9(53):213-222.
6. Martin JGP, Porto E, Alencar SM De, et al. Antimicrobial activity of yerba mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) against food pathogens. *Rev Argent Microbiol* 2013;45(2):93-98. DOI: [https://www.doi.org/10.1016/s0325-7541\(13\)70006-3](https://www.doi.org/10.1016/s0325-7541(13)70006-3)
7. Mendes LPM, Maciel KM, Vieira ABR, et al. Atividade Antimicrobiana de Extratos Etanólicos de *Peperomia pellucida* e *Portulaca pilosa*. *Rev Ciênc Farm Básica Apl* 2011;32(1):121-5.
8. Santos PO, Melo PO, Trindade DLFM, et al. Investigação da atividade antimicrobiana do látex da mangabeira (*Harcomia speciosa* GOMES). *Rev Bras Plantas Med* 2007;9(2):108-111.
9. Carvalho HHC, Wiest JM, Greco DP. Atividade antibacteriana e a preditividade do condimento *Artemisia dracunculus* Linn. (Asteraceae), variedade inodora -estragão - frente a *Salmonella* sp. *Food Sci. Technol.* 2006;26(1):75-79.
10. Lima MRF, Ximenes CPA, Luna JS, et al. The antibiotic activity of some Brazilian medicinal plants. *Rev Bras Farmacogn* 2006;16: 300-306. DOI: <https://www.doi.org/10.1590/S0102-695X2006000300004>

11. Walsh FM, Amyes SG. Microbiology and drug resistance mechanisms of fully resistant pathogens. *Curr Opin Microbiol* 2004;7(5):439–444. DOI: <https://www.doi.org/10.1016/j.mib.2004.08.007>
12. Montalvo CL, Boulogne I, Suárez JG. A screening for antimicrobial activities of Caribbean herbal remedies. *BMC Complementary and Alternative Medicine* 2013;13(126):2-9. DOI: <https://www.doi.org/10.1186/1472-688213-126>
13. Davies J, Davies D. Origins and Evolution of Antibiotic Resistance. *Microbiol Mol Biol Rev* 2010;74(3):417–433. DOI: <https://www.doi.org/10.1128/MMBR.00016-10>
14. Mahamoud A, Chevalier J, Alibert-Franco S, et al. Antibiotic efflux pumps in Gram-negative bacteria: the inhibitor response strategy. *J Antimicrobial Chemotherapy* 2007; 59:1223–1229 DOI: <https://www.doi.org/10.1093/jac/dkl493>
15. Etkin N. Perspectives in Ethnopharmacology: forging a closer link between bioscience and traditional empirical knowledge. *J Ethnopharmacology* 2001;76:177-182.
16. Hongpattarakere T, Johnson EA. Natural antimicrobial components isolated from Yerba Maté (*Ilex paraguariensis*). *Food Research Institute* 1999;11(3):42-48.
17. Gonzalez-Gil F, Diaz-Sanchez S, Pendleton S, et al. Yerba mate enhances probiotic bacteria growth in vitro but as a feed additive does not reduce Salmonella Enteritidis colonization in vivo. *Poultry Science* 2014;93:434–440. DOI: <https://www.doi.org/10.3382/ps.2013-03339>
18. Karioti A, Sokovic M, Ciric A, et al. Antimicrobial properties of Quercus ilex L. proanthocyanidin dimers and simple phenolics: evaluation of their synergistic activity with conventional antimicrobials and prediction of their pharmacokinetic profile. *J Agric Food Chem* 2011;59(12):6412-22. DOI: <https://www.doi.org/10.1021/jf2011535>.
19. Berahou A, Auhmani A, Fdil N, et al. Antibacterial activity of Quercus ilex bark's extracts. *J Ethnopharmacol* 2007;112(3):426-429. DOI: <https://www.doi.org/10.1016/j.jep.2007.03.032>
20. Gulluce M, Adiguzel A, Oqutçu H, et al. Antimicrobial effects of Quercus ilex L. extract. *Phytother Res* 2004;18(3):208-211. DOI: <https://www.doi.org/10.1002/ptr.1419>
21. Haraguchi H, Kataoka S, Okamoto S, et al. Antimicrobial triterpenes from ilex integra and the mechanism of antifungal action. *Phytother Res* 1999;13(2):151-156. DOI: [https://www.doi.org/10.1002/\(SICI\)1099-1573\(199903\)13:2<151::AID-PTR391>3.0.CO;2-C](https://www.doi.org/10.1002/(SICI)1099-1573(199903)13:2<151::AID-PTR391>3.0.CO;2-C)
22. Jiang JM, Wang B, Xu SB, et al. Research on the antibacterial activity of Kudingcha. *Pharm Clin Chin Mat Med* 2001;17:18–19.

23. Li L, Xu JL, Xiao PG. The large-leaved Kudingcha (*Ilex latifolia* Thunb and *Ilex kudingcha* C.J. Tseng): a traditional Chinese tea with plentiful secondary metabolites and potential biological activities. *J Natural Med* 2013;67(3):425-437. DOI: 10.1007/s11418-013-0758-z.
24. Heck CI, Mejia EG. Yerba Mate Tea (*Ilex paraguariensis*): a comprehensive review on chemistry, health implications, and technological considerations. *J Food Sci* 2007;72:138-151. DOI: <https://www.doi.org/10.1111/j.1750-3841.2007.00535.x>
25. Srinivasan D, Nathan S, Suresh T. Antimicrobial activity of certain Indian medicinal plants used in folkloric medicine. *J Ethnopharmacology* 2001;74(3):217-220. DOI: [https://www.doi.org/10.1016/S0378-8741\(00\)00345-7](https://www.doi.org/10.1016/S0378-8741(00)00345-7)
26. Carelli G, Macedo SMD, Valduga AT, et al. Avaliação preliminar da atividade antimicrobiana do extrato de erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St. - Hil.) obtido por extração com CO<sub>2</sub> supercrítico. *Rev Bras Pl Med* 2011;13(1):110-115.
27. Rempe CS, Burris KP, Woo HL, et al. Computational Ranking of Yerba Mate Small Molecules Based on Their Predicted Contribution to Antibacterial Activity against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Plos ONE* 2015;10(5):1-18. DOI: <https://www.doi.org/10.1371/journal.pone.0123925>
28. Girolometto G, Avancini CAM, Carvalho HHC, et al. Atividade antibacteriana de extratos de erva mate (*Ilex paraguariensis* A.St.-Hil.). *Rev Bras Plantas med* 2009;11(1):49-55. DOI: <https://www.doi.org/10.1590/S1516-05722009000100009>
29. Kubo I, Muroi H, Himejima M. Antibacterial activity against *Streptococcus mutans* of mate tea flavor components. *J Agr Food Chem* 1993;41:107-111.
30. Daglia M, Tarsi R, Papetti A, et al. Antiadhesive effect of green and roasted coffee on *Streptococcus mutans*' adhesive properties on saliva-coated hydroxyapatite beads. *J Agr Food Chem* 2002;50:1225-1229. DOI: <https://www.doi.org/10.1021/jf010958t>
31. Dall'Orto VC. Comparison of tyrosinase biosensor and colorimetric method for polyphenol analysis in different kinds of teas. 2005;28:19-33. DOI: <https://www.doi.org/10.1081/AL-200043435>
32. Pomilio AB, Trajtemberg S, Vitae AA. High-performance capillary electrophoresis analysis of Mate infusions prepared from stems and leaves of *Ilex paraguariensis* using automated micellar electrokinetic capillary chromatography. *Phytochem Anal* 2002;13:235-241. DOI: <https://www.doi.org/10.1002/pca.647>
33. Zaporozhets OA, Krushynska OA, Lipkovska NA, et al. A new test method for the evaluation of total antioxidant activity of herbal products. *J Agric Food Chem* 2004;52:21-25. DOI: <https://www.doi.org/10.1021/jf0343480>
34. De Biasi B, Grazziotin NA, Hofmann AE Jr. Atividade antimicrobiana dos extratos de folhas e ramos da *Ilex paraguariensis* A. St.-Hil., Aquifoliaceae. *Braz J*

Pharmacognosy 2009;19(2B):582-585. DOI: <https://www.doi.org/10.1590/S0102-695X2009000400013>

35. Bittencourt-Junior FF, Santos P, Mello F, et al. Study of antibacterial activity of hidroalcoholic extract of *Ilex Paraguariensis*. Interbio 2012;6(2):48-54.

36. Racanicci AMC, Allesen-Holm BH, Skibsted LH. Sensory evaluation of precooked chicken meat with mate (*Ilex paraguariensis*) added as antioxidant. Eur Food Res Technol 2009;229:277-280. DOI: <https://www.doi.org/10.1007/s00217-009-1052-x>

AHEAD OF PRINT