

Avaliação preliminar da atividade antimicrobiana do extrato de erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St. - Hil.) obtido por extração com CO₂ supercrítico

CARELLI, G.; MACEDO, S.M.D.; VALDUGA, A.T.; CORAZZA, M.L.; OLIVEIRA, J.V.; FRANCESCHI, E.; VIDAL, R.; JASKULSKI, M.R.*

Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, Campus Erechim, Av. Sete de setembro, 1621, Centro, CEP: 99700-000, Erechim-Brasil * mrj@uri.com.br

RESUMO: *Ilex paraguariensis* A. St. - Hil. (erva-mate) é uma árvore pertencente à família Aquifoliaceae, nativa da região sul da América do Sul e de grande importância cultural e econômica para os três estados da região sul do Brasil. O presente trabalho determinou o potencial antimicrobiano do extrato de erva-mate obtido por fluido supercrítico, frente a alguns microrganismos. As folhas de *Ilex paraguariensis* foram coletadas na região norte do RS. O extrato bruto da planta desidratada foi obtido pelo método de extração com fluido supercrítico, utilizando dióxido de carbono (CO₂) como solvente. Foi obtida a solução mãe desse extrato (100 mg mL⁻¹) que a seguir foi diluído (50; 25; 12,5; 6,25 mg mL⁻¹) para avaliação da atividade antimicrobiana por meio da técnica de difusão do disco em ágar Müller Hinton, sobre cepas de *Acinetobacter baumannii* (ATCC 19606), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) e *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212). As análises foram efetuadas em triplicata, utilizando como controle negativo disco estéril sem impregnação e como controle positivo discos de antibióticos comerciais variáveis de acordo com a espécie bacteriana. Após 16 a 24h de incubação a 35°C os halos com significância foram medidos. Observou-se atividade antimicrobiana frente a *S. aureus* (halos de inibição variaram entre 7 e 18 mm) e para *P. aeruginosa* (halos entre 6 e 11 mm), ambos nas concentrações de 100 até 25 mg mL⁻¹. O extrato obtido por extração em fluido supercrítico de *Ilex paraguariensis* apresentou atividade antimicrobiana frente a *S. aureus* e *P. aeruginosa*.

Palavras-chave: *Ilex paraguariensis*, atividade antimicrobiana, extrato bruto obtido por método do CO₂ supercrítico

ABSTRACT: Preliminary evaluation of the antimicrobial activity of “erva mate” (*Ilex paraguariensis* A. St. - Hil.) extract obtained by using supercritical CO₂. *Ilex paraguariensis* A. St. - Hil. (“erva mate”) is a tree of the Aquifoliaceae family, native to the south region of South America and of great cultural and economic importance for the three states of the south region of Brazil. The present study aimed to determine the antimicrobial potential of “erva mate” extract obtained by supercritical fluid against some microorganism strains. The leaves of *Ilex paraguariensis* were collected in the north region of Rio Grande do Sul State. The crude extract of dehydrated plant was obtained by supercritical fluid extraction, using carbon dioxide (CO₂) as solvent. The extract mother solution (100 mg mL⁻¹) was diluted (50; 25; 12, 5; 6.25 mg mL⁻¹) for antimicrobial activity evaluation, by means of disk diffusion method on Müller-Hinton agar, against strains of *Acinetobacter baumannii* (ATCC 19606), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) and *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212). The analyses were done in triplicate, using as negative control sterile disk without impregnation and as positive control, commercial antibiotic disks according to the bacterial species. After 16-24h incubation at 35°C, the diameters of inhibition zones were measured. Antimicrobial activity was observed against *S. aureus* (inhibition zones between 7 and 18 mm) and *P. aeruginosa* (inhibition zones between 6 and 11 mm), both at the concentrations of 100 mg mL⁻¹ to 25 mg mL⁻¹. The extract of *Ilex paraguariensis* obtained by supercritical fluid presented antimicrobial activity against *S. aureus* and *P. aeruginosa*.

Key words: *Ilex paraguariensis*, antimicrobial activity, supercritical crude extract

INTRODUÇÃO

Há muitos anos a Organização Mundial de Saúde incentiva o estudo de plantas conhecidas como medicinais, tendo como objetivo avaliar cientificamente os medicamentos fitoterápicos e os benefícios, além dos riscos do uso indevido (Loguercio et al., 2005). Estima-se que de 65 a 80% da população mundial tenha nas plantas o principal recurso de atendimento básico à saúde (Gonçalves et al., 2005).

Nos últimos anos, o interesse por plantas com atividade antimicrobiana tem aumentado significativamente. Um dos fatores relevantes para a procura de novas substâncias que substituam os medicamentos atualmente usados consiste no uso indiscriminado destes medicamentos e na resistência bacteriana já existente aos mesmos (Bispo et al., 2007).

Desta forma, uma das alternativas no tratamento de diversas infecções tem sido o uso de produtos naturais. No Brasil, as plantas medicinais são de extrema importância e extensamente utilizadas de acordo com o conhecimento adquirido através dos imigrantes de origem europeia, africana e asiática ou dos povos indígenas (Gilbert et al., 1997).

Ilex paraguariensis A. St. - Hil., popularmente conhecida como erva-mate, era consumida pelos indígenas habitantes do sul do Brasil muito antes da chegada dos colonizadores (Evans, 1998). A planta pertence à família Aquifoliaceae e é uma espécie nativa das regiões temperadas e subtropicais da América do Sul, estando presente principalmente na Argentina, Paraguai e Brasil, sendo neste amplamente difundida nos estados do sul (Bruneton, 1993; Esmelindro et al., 2002).

No Brasil a área de dispersão abrange aproximadamente 450.000 km² (Valduga et al., 2003a). A atividade ervateira é desenvolvida em cerca de 450 municípios do Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná, São Paulo e Mato Grosso do Sul, o que engloba algo em torno de 750 indústrias e um total de 700.000 empregos diretos e indiretos, gerando produção anual estimada em torno de 650.000 toneladas (Mosele, 2002).

Na produção da erva-mate não se emprega qualquer tipo de agente químico, apenas adubos orgânicos naturais (Valduga et al., 2003b).

Diversos trabalhos ressaltam a complexidade da composição química da erva-mate, pois a mesma apresenta diversas classes, tais como, alcalóides (principalmente cafeína, teobromina, teofilina), álcoois, cetonas, fenóis, ácidos graxos, saponinas, metilxantinas, vitaminas (A, B1, B2, C e E), minerais, além de celulose, dextrina, sacarina e gomas (Borille et al., 2005; Bortoluzzi et al., 2006; Kaspary & Valduga, 2008).

As análises dos compostos presentes em *Ilex paraguariensis* A. St. - Hil. conferem diversas propriedades de valor terapêutico e a torna recomendável como anti-inflamatório, antirreumático,

estimulante e lipolítico, além de ser indicada em casos de astenia ocasional e ser coadjuvante no tratamento de sobrepeso (Gosmann, 1989; Bromatos, 2000).

Ao mesmo tempo em que ocorre expressiva busca pela ampliação do mercado da erva-mate incentivado pela indústria ervateira, a indústria química e farmacêutica vem mostrando interesse na pesquisa e desenvolvimento de novos produtos e utilidades para a planta (Mosele, 2002).

No campo da microbiologia, testes realizados com extratos de *Ilex paraguariensis* A. St. - Hil. comprovam o potencial antimicrobiano frente a uma variedade de bactérias, entre elas, a *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* e *Pseudomonas fluorescens* (Hongpattarakere & Johnson, 1999).

Entre os patógenos mais utilizados em estudos sobre antimicrobianos estão *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* (Dall' Agnol et al., 2003; De Souza et al., 2004; Farago et al., 2004), além de *Enterococcus faecalis* e *Pseudomonas aeruginosa* (Bispo et al., 2007).

O presente trabalho determinou o potencial antimicrobiano *in vitro* do extrato de erva-mate obtido por fluido supercrítico usando CO₂ como solvente, frente às bactérias *Acinetobacter baumannii*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*.

MATERIAL E MÉTODO

Obtenção e preparação do material vegetal

O material vegetal foi disponibilizado pela Ervateira Barão, de cultivos adensados de monoculturas ao sol, situados no município de Barão de Cotegipe (27°37'15" de latitude Sul e 52°22' 47" Oeste, 765 m de altitude), norte do Estado do Rio Grande do Sul. Foram coletados, em outubro de 2008, ramos com folhas e flores de erva-mate com idade de 12 meses. A planta foi identificada como *Ilex paraguariensis* A. St. - Hil., da família Aquifoliaceae, pelo botânico J. Sampaio e uma exsicata foi depositada no Herbário Padre Balduino Rambo sob número 11326. Em seguida as folhas foram colocadas em estufa de ar circulante à temperatura de 30-35°C para secagem, realizando-se a seguir a trituração em moinho de facas. Posteriormente as amostras foram embaladas a vácuo e armazenadas em sacos plásticos pretos a fim de protegê-las do ar e da luz, evitando assim possível oxidação.

Preparação do extrato bruto por fluido supercrítico

A preparação do extrato ocorreu no Laboratório de Tecnologia de Alimentos da URI – Campus de Erechim (RS), seguindo metodologia descrita a seguir. A obtenção do extrato de *Ilex*

paraguariensis foi realizada pelo método de extração com fluído supercrítico (SFE), utilizando dióxido de carbono (CO₂) como solvente. Para se obter o maior número de constituintes químicos no extrato, as condições de extração ficaram definidas em 40°C de temperatura e 250 atm de pressão. As variáveis, vazão do solvente e massa de erva-mate, foram mantidas constantes em 5 g min⁻¹ e 70 g respectivamente (Jacques, 2005).

O óleo solubilizado obtido foi suspenso em diclorometano, preparando-se a solução mãe do extrato com concentração igual a 100 mg mL⁻¹, que a seguir foi diluída nas proporções de 1:0, 1:1, 1:3, 1:7 e 1:15 obtendo-se concentrações de 100 mg mL⁻¹, 50 mg mL⁻¹, 25 mg mL⁻¹, 12,5 mg mL⁻¹ e 6,25 mg mL⁻¹, respectivamente.

Avaliação da atividade antimicrobiana

Para avaliação da atividade antimicrobiana do extrato de erva-mate foram realizados testes em triplicata com cepas de *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606, *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 como modelos de bactérias Gram-negativas; *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 como modelos de bactérias Gram-positivas. Para a avaliação da susceptibilidade dos microrganismos ao extrato e aos antimicrobianos foi utilizado o método da Difusão em ágar.

As bactérias em teste foram inoculadas em ágar nutriente por 24h a 35°C com a finalidade de crescimento das mesmas. A seguir, 4 a 5 colônias de cada microrganismo foram suspensas em solução fisiológica 0,9% até obter-se a turvação equivalente ao padrão 0,5 da escala MacFarland. Um swab estéril foi introduzido na suspensão ajustada, o excesso do inóculo foi retirado comprimindo o mesmo na parede interior do tubo e, em seguida, difundido na superfície do ágar Müeller-Hinton, em três diferentes direções (Oplustil et al., 2000).

Nas placas semeadas com os microrganismos foram distribuídos os discos de papel filtro Whatmann®, estéreis, com 5 mm de diâmetro e contendo 10 µL do

extrato nas diferentes concentrações obtidas, correspondendo a 1,0; 0,5; 0,25; 0,12 e 0,06 mg de extrato, respectivamente.

Como controle negativo utilizou-se discos de papel filtro sem a adição do extrato e outros com diclorometano. Como controle positivo (sensível) foi utilizado a ceftazidima, ceftriaxona, imipenem e gentamicina para *Acinetobacter baumannii*; ciprofloxacina, penicilina e vancomicina para *Enterococcus faecalis*; ampicilina, ciprofloxacina, ceftriaxona e gentamicina para a *Escherichia coli*; ciprofloxacina, gentamicina e imipenem para *Pseudomonas aeruginosa*; eritromicina, gentamicina, oxacilina e vancomicina para *Staphylococcus aureus*.

Os discos de antibióticos comerciais, usados como controles de qualidade frente aos microrganismos, foram selecionados por terem importante indicação clínica, além de seguir as recomendações do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2007), pois possuem limites aceitáveis para estas cepas controle e têm a finalidade de monitorar a acurácia do teste de difusão do disco.

Após este procedimento as placas foram fechadas, invertidas e incubadas a temperatura de 35°C por 16-18h, com exceção do *Staphylococcus aureus* e do *Enterococcus faecalis* que permaneceram em estufa por 24h. Os discos de oxacilina e vancomicina para *Staphylococcus aureus* e vancomicina para *Enterococcus faecalis* exigem 24h de incubação. Por último foi realizada a medição dos halos de inibição.

RESULTADO E DISCUSSÃO

O extrato bruto obtido por fluído supercrítico das folhas de *Ilex paraguariensis* de cultivos adensados homogêneos demonstrou atividade antimicrobiana em duas das cinco bactérias testadas neste estudo preliminar. Os discos sem adição do extrato e com diclorometano não demonstraram nenhum halo de inibição frente às bactérias, comprovando que o diclorometano não interferiu na ação antimicrobiana do extrato.

TABELA 1. Resultados obtidos pelo método de difusão do disco, utilizando extrato bruto, obtido por método do CO₂ supercrítico, das folhas de *Ilex paraguariensis* A. St. - Hil. em diferentes quantidades. Considerando R - Resistente, e halos de inibição (mm).

Microrganismo	1,0 mg	0,5 mg	0,25 mg	0,12 mg	0,06 mg
<i>Acinetobacter baumannii</i>	R	R	R	R	R
<i>Escherichia coli</i>	R	R	R	R	R
<i>Enterococcus faecalis</i>	R	R	R	R	R
<i>Staphylococcus aureus</i>	(18)	(13)	(7)	R	R
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	(11)	(8)	(6)	R	R

Os ensaios da atividade antimicrobiana *in vitro* mostraram que o extrato inibiu o crescimento das cepas de *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) e *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), porém não foi capaz de inibir o crescimento das cepas de *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) e *Acinetobacter baumannii* (ATCC 19606), como demonstra a Tabela 1. Os controles utilizados e seus respectivos halos estão expostos na Tabela 2.

Os resultados, mesmo que preliminares, evidenciaram a susceptibilidade das cepas de *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*

nas quantidades de 1,0; 0,5 e 0,25 mg do extrato bruto da erva-mate, o que demonstra que a resposta inibitória parece ser dose dependente.

O extrato obtido não apresentou atividade frente à bactéria Gram-positiva *Enterococcus faecalis* e às Gram-negativas *Escherichia coli* e *Acinetobacter baumannii* em nenhuma das concentrações testadas. Porém, o extrato apresentou atividade frente à bactéria Gram-negativa *Pseudomonas aeruginosa*.

Nos testes realizados por Gonçalves et al. (2005) utilizando extrato hidroalcoólico (100 mg mL⁻¹), de erva-mate, houve inibição no crescimento do *Staphylococcus aureus* e não de *Escherichia coli* e

TABELA 2. Resultados dos testes de controle (antibióticos comerciais) com relação a cada microrganismo. Considerando halos de inibição (mm).

Microrganismo	AMP	CIP	CRO	GEN	OXA	IPM	VAN	PEN	ERI	CAZ
<i>Acinetobacter baumannii</i>	-	-	(25)	(18)	-	(26)	-	-	-	(22)
<i>Escherichia coli</i>	(22)	(40)	(35)	(25)	-	-	-	-	-	-
<i>Enterococcus faecalis</i>	-	(28)	-	-	-	-	(23)	(30)	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	-	(27)	(22)	-	(21)	-	(30)	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	(29)	-	(20)	-	(28)	-	-	-	-

AMP (ampicilina 10 µg), CIP (ciprofloxacina 5 µg), CRO (ceftriaxona 30 µg), GEN (gentamicina 10 µg), OXA (oxacilina 1 µg), IPM (imipenem 10 µg), VAN (vancomicina 30 µg), PEN (penicilina 10 µg), ERI (eritromicina 15 µg), CAZ (ceftazidima 30 µg).

Pseudomonas aeruginosa. Os resultados diferem parcialmente dos encontrados nesse estudo, o qual apresentou atividade antimicrobiana frente a *P. aeruginosa* inclusive em concentrações menos elevadas.

Diferentes autores têm reportado que a relação entre a sensibilidade microbiana aos extratos e a estrutura celular das bactérias não está bem esclarecida, e não possuem regra geral para tais interações. Porém é proposto que a ação inibitória mais eficiente ou menos eficiente dos extratos sobre as bactérias, tanto Gram-positivas quanto Gram-negativas podem ser associadas às peculiaridades da composição dos extratos agindo sobre a composição celular dos microrganismos (Deans & Ritchie, 1987; Dorman & Deans, 2000).

Segundo Srinivasan et al. (2001), há relação entre o teor de determinadas substâncias ativas existentes na planta e a atividade dessas substâncias contra bactérias Gram-positivas, pois estas apresentam parede celular quimicamente menos complexa, menor teor lipídico e ausência de membrana celular externa em comparação com as Gram-negativas.

De Biasi (2007), em estudo antimicrobiano com extrato hidroalcoólico de folhas de erva-mate expostas ao sol (100 e 50 mg mL⁻¹), demonstrou

atividade frente a *Staphylococcus aureus* em ambas concentrações e para *Pseudomonas aeruginosa* em 100 mg mL⁻¹, não demonstrando atividade frente a *Escherichia coli*.

Os resultados encontrados por outros autores diferem parcialmente dos encontrados no presente estudo, provavelmente em razão do método de extração, época da coleta e exposição ou não da planta ao sol durante o cultivo.

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.

Hongpattarakere & Johnson (1999) afirmam que os metabólitos secundários da erva-mate, como cafeína, triterpenos, derivados do ácido clorogênico entre outros são os responsáveis pela atividade antimicrobiana tanto para bactérias Gram-negativas como para bactérias Gram-positivas.

Uma das dificuldades encontradas para realização desse estudo foi a falta de padronização dos testes de susceptibilidade antimicrobiana, principalmente para extratos lipofílicos. Além disso, existem pouquíssimos estudos sobre atividade antimicrobiana de extratos obtidos por fluido

supercrítico, os estudos existentes sobre antimicrobianos são basicamente sobre extratos derivados de métodos tradicionais como aquoso e hidroalcoólico, tornando difícil avaliar se os resultados encontrados expressam legitimamente a realidade.

Normalmente as substâncias testadas pelos métodos propostos pelo CLSI têm caráter hidrofílico e as avaliações são padronizadas para esta condição. Nos ensaios com extratos lipossolúveis deve considerar que estes são viscosos, complexos e insolúveis em água. A falta de padronização dos testes de susceptibilidade antimicrobiana tem sido empecilho encontrado para este tipo de pesquisa (Hood et al., 2003).

Na técnica utilizada na avaliação (difusão do disco) os dados gerados são somente preliminares e qualitativos, devido à natureza hidrófoba do extrato da planta e já que essa propriedade impede a difusão uniforme dessas substâncias através do meio contendo ágar (Lambert et al., 2001).

A descoberta de plantas endêmicas com potencial terapêutico torna-se cada vez mais importante, pois a sociedade necessita de novos fármacos que sejam de qualidade e acessíveis economicamente. Levando-se em consideração os resultados obtidos neste estudo preliminar, é possível sugerir que o extrato bruto de erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St. - Hil.) obtido por fluido supercrítico utilizando CO₂ como solvente constitui uma perspectiva para obtenção de antibiótico natural, por apresentar atividade antimicrobiana frente a microrganismos como *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*.

AGRADECIMENTO

Os autores agradecem à Ervateira Barão pelo fornecimento do material vegetal.

REFERÊNCIA

BISPO, N.J.; FRANCISCO, N.M.A.C.; SCHIMITT, A.C. Avaliação da atividade antimicrobiana *in vitro* dos extratos da planta *Guettarda angelica* sobre bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. **LAES & HAES**, v.168, n.1, p.165-9, 2007.

BORILLE, W.M.A.; REISSMANN, B.C.; FREITAS, S.J.R. Relação entre compostos fitoquímicos e o nitrogênio em morfotipos de erva-mate (*Ilex paraguariensis* de St. Hil.). **Boletim do Centro de Pesquisas e Processamento de Alimentos**, v.23, n.1, p.183-98, 2005.

BORTOLUZZI, A.L.M. et al. Quantificação de metilxantinas e compostos fenólicos em amostras de erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.). In: CONGRESSO SUDAMERICANO DE LA YERBA MATE, 4., 2006, Posadas. **Anais...** Posadas: Actas, 2006. p.143-7.

BROMATOS, S.L. **Fitoterapia: vademecum de prescripción. Plantas Medicinales**. 3.ed. Barcelona: Masson, 2000. 315p.

BRUNETON, J. **Elementos de fitoquímica y de farmacognosia**. Paris: Lavoisier, 1993. 544p.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. Approved standard: M2-A9. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests. 9.ed. Wayne: CLSI, 2007.

DALL'AGNOL, R. et al. Antimicrobial activity of *Hipericum* species from south Brazil. **Phytomedicine**, v.10, n.6, p.511-6, 2003.

DE BIASI, B. **Avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos de folhas e ramos da *Ilex paraguariensis* (erva-mate)**. 2007. 11p. Monografia (Conclusão de Curso) - Departamento de Ciências da Saúde, Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, Erechim.

DE SOUZA, G.C. et al. Ethnopharmacological studies of antimicrobial remedies in the south of Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v.90, n.1, p.135-43, 2004.

DEANS, S.G.; RITCHIE, G. Antibacterial properties of plant essential oils. **International Journal of Food Microbiology**, v.5, n.2, p.165-80, 1987.

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.308-16, 2000.

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

EVANS, W.C. **Trease and Evan's Pharmacognosy**. 14.ed. Londres: WB Saunders Company, 1998. 403p.

FARAGO, P.V. et al. Atividade antibacteriana de óleos essenciais de *Ocimum selloi* Benth. (*Lamiaceae*). **Publicatio UEPG: Ciências Biológicas e da Saúde**, v.10, n.4, p.59-63, 2004.

GILBERT, B. et al. The official use of medicinal plants in public health. **Ciência e Cultura**, v.49, n.5, p.339-44, 1997.

GONÇALVES, A.L.; ALVES FILHO, A.; MENEZES, H. Estudo comparativo da atividade antimicrobiana de extratos de algumas árvores nativas. **Arquivos do Instituto de Biologia**, v.72, n.3, p.353-8, 2005.

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

HARAGUCHI, H. et al. Antimicrobial triterpenes from *Ilex integra* and the mechanism of antifungal action. **Phytotherapy Research**, v.13, n.2, p.151-6, 1999.

HONGPATTARAKERE, T.; JOHNSON, E.A. Natural antimicrobial components isolated from Yerba Maté (*Ilex paraguariensis*). **Food Research Institute**, v.11, n.3, p.42-8, 1999.

HOOD, J.R.; WILKINSON, J.M.; CAVANAGH, H.M.A. Evaluation of common antibacterial screening methods utilized in essential oil research. **Journal Essential Oil Research**, v.15, n.6, p.428-33, 2003.

JAQUES, R.A. **Caracterização química da erva-mate (*Ilex paraguariensis*): aplicação de diferentes processos de extração e influência das condições de plantio sobre a composição química**. 2005. 130p. Tese (Doutorado) - Instituto de Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

KASPARY, R.; VALDUGA, E. **Benefícios da erva-mate**, Disponível em: <<http://www.erva-mate.com/beneficios>>

html>. Acesso em: 27 mar. 2008.

LAMBERT, R.J. et al. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. **Journal of Applied Microbiology**, v.91, n.3, p.454-62, 2001.

LOGUERCIO, A.P. et al. Atividade antibacteriana de extrato hidro-alcóolico de folhas de jambolão (*Syzygium cumini* (L.) Skells). **Ciência Rural**, v.35, n.2, p.371-6, 2005.

MOSELE, S.H. **A governança na cadeia agroindustrial da erva-mate na região do Alto Uruguai Rio Grandense**. 2002. 211p. Dissertação (Mestrado em Agronegócios) - Centro de Estudos e Pesquisas em Agronegócios, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

OPLUSTIL, P.C. et al. **Procedimentos básicos em microbiologia**. 3.ed. São Paulo: Sarvier, 2000. 169p.

SRINISAVASAN, D. et al. Antimicrobial activity of certain Indian medicinal plants used in folkloric medicine. **Journal of Ethnopharmacology**, v.74, n.3, p.217-20, 2001.

VALDUGA, A.T.; FINZER, J.R.D.; MOSELE, S.H. **Processamento da erva-mate**. Erechim: Edifapes. 2003a. 182p.

VALDUGA, A.T.; BATTESTIN, V.; FINZER, J.R.D. Secagem de extratos de erva-mate em secador por atomização. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.23, n.2, p.184-9, 2003b.