

Avaliação da Atividade Antimicrobiana de Erva-Mate (*Ilex paraguariensis*) sobre Sorovares de *Salmonella* spp. de Origem Avícola

Evaluation of Antimicrobial Activity of Erva-Mate (*Ilex paraguariensis*) over Serovars of *Salmonella* spp. of Poultry Origin

Eliana de Almeida Mira De Bona^{a*}; Fabiana Gisele da Silva Pinto^b; Aline Monike Chaves Borges^c; Laís Dayane Weber^d; Thomas Kehrwald Fruet^e; Luis Francisco Angeli Alves^f; Alexandre Carvalho de Moura^g

Resumo

Foi avaliada a atividade antimicrobiana do extrato aquoso de *Ilex paraguariensis* sobre 14 diferentes sorovares de *Salmonella* spp. isolados de aves. O método utilizado foi o de microdiluição em caldo. Distribuiu-se 160 µL de Caldo Müller-Hinton (MH) em poços de uma placa de microdiluição, adicionou-se 8 µL de inóculo bacteriano previamente padronizado e por último 160 µL do respectivo extrato com concentrações de 50, 100, 150 e 200 mg/mL. As microplacas foram incubadas a 35°C/24h, em condições de aerobiose. A determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) teve como base a presença ou ausência de turvação, sendo que a presença de turvação indica crescimento bacteriano e ausência não crescimento. A partir dos poços que não apresentaram crescimento bacteriano visível, foi retirada uma alíquota de 10 µL e semeada na superfície do ágar Müller-Hinton incubado a 35°C e após 48h foi determinada a Concentração Bactericida Mínima. Verificou-se através da Concentração Inibitória Mínima do extrato de *Ilex paraguariensis*, que 57% dos sorovares de *Salmonella* spp. (*S. Derby*, *S. Orion*, *S. Enteritidis*, *S. Enterica*, *S. Infantis*, *S. Mbandaka*, *S. Lexington*, *S. Kentucky*) apresentaram suscetibilidade ao extrato testado.

Palavras-chave: Bactericida. Bacteriostático. Extrato vegetal. *Salmonella*.

Abstract

The antimicrobial activity of aqueous extract of *Ilex paraguariensis* on 14 *Salmonella* different serovars isolated from poultry was evaluated. The method used was microdilution in broth. One hundred and sixty microliters of Müller-Hinton broth were distributed in wells of a microdilution plate, 8 µL of bacterial inoculum previously standardized and 160 µL of the respective extract with concentrations of 50, 100, 150 and 200 mg/mL were added. The microplates were incubated at 35°C/24 h in aerobic conditions. The determination of Minimum Inhibitory Concentrations (MICs) was based on the presence or absence of turbidity, considering the presence of turbidity as bacterial growth and absence as no growth. From the wells that showed no visible bacterial growth an 10 µL aliquot was with drawing and seeded on the MH agar surface, incubated at 35°C and after 48 hours the minimal bactericidal concentration was determined. It was verified, through the MIC of extract of *Ilex paraguariensis*, that 57% of the serovars of *Salmonella* spp. (*S. Derby*, *S. Orion*, *S. Enteritidis*, *S. Enterica*, *S. Infantis*, *S. Mbandaka*, *S. Lexington*, *S. Kentucky*) were susceptible to the extract of tested.

Keywords: Bactericidal. Bacteriostatic. Plant extract. *Salmonella*.

^a Mestranda em Conservação e Manejo de Recursos Naturais - Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE). E-mail: eliana_mira@hotmail.com.

^b Doutora em Microbiologia - Universidade Estadual de Londrina (UEL). Docente da Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE). E-mail: fabianagsp@yahoo.com.br.

^c Graduanda em Ciências Biológicas - Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE). E-mail: alinemonike@hotmail.com.

^d Graduanda em Ciências Biológicas - Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE). E-mail: layweber@gmail.com.

^e Graduando em Ciências Biológicas - Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE). E-mail: thomas_brr@yahoo.com.br.

^f Doutor em Entomologia Agrícola - Escola superior de Agricultura "Luiz de Queiroz". Docente da Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE). E-mail: lfaalves@unioeste.br.

^g Mestre em Microbiologia - Universidade Estadual de Londrina (UEL). Docente da Faculdade Assis Gurgacz (FAG). E-mail: alexcmoura@uol.com.br.

* Endereço para correspondência: Laboratório de Biotecnologia. Rua Universitária 2069, Jardim Universitário. Caixa Postal 711, CEP: 85819-110. Cascavel - PR.

1 Introdução

A ampla distribuição de *Salmonella* spp. entre os animais e sua capacidade de sobreviver por longos períodos no meio ambiente contribuem para seu destacado papel em saúde

pública. A ocorrência e quantidade de *Salmonella* spp. presente na carne de frango varia de acordo com as condições de manejo durante a criação e com os cuidados higiênicos nas operações de abate dos animais e posterior manipulação das carcaças¹. Os dados epidemiológicos disponíveis no Paraná indicam que a partir de 1995, a salmonelose passou a ser a principal doença transmitida por alimentos com 91 surtos de salmonelose registrados entre 1999 e 20022.

Contudo, na busca constante por métodos eficientes para combater a salmonelose e outras doenças de origem avícola, o uso indiscriminado de antibióticos gerou outro problema: a seleção de bactérias resistentes. A resistência bacteriana determinou a intensificação no uso dos antimicrobianos, bem como a elaboração de medicamentos mais fortes e potentes, cuja ação contra esses micro-organismos fosse realmente eficaz. A incidência de *Salmonella* spp. resistente às drogas antimicrobianas representa dupla ameaça ao homem e aos animais, sendo decorrente do intenso emprego de antimicrobianos em medicina humana e veterinária³.

O consumo de carne de aves tem aumentado notoriamente em todo o mundo, em 2009 a produção de frango no Brasil foi de 11,36 milhões de toneladas alcançando o "ranking"

das exportações com 3,8 milhões de toneladas exportadas no mesmo ano⁴. O aumento da produtividade avícola tem sido obtido, em grande parte, pela crescente utilização de produtos sanitários, antibióticos, probióticos, vacinas e diversos produtos químicos sintéticos. No entanto, sabe-se que o uso intensivo e a aplicação inadequada desses insumos causam diversos problemas ambientais e à saúde dos consumidores.

A utilização de extratos vegetais para combater a salmonelose e outras doenças poderá ser alternativa natural representando uma forma menos danosa ao consumidor, que estará livre das super dosagens dos antibióticos e possíveis danos à saúde. Embora os estudos com extratos vegetais ainda sejam recentes, já pôde ser evidenciado que algumas plantas produzem em seu metabolismo secundário, substâncias com a capacidade de inibir a atividade de bactérias e outros microorganismos⁵.

A Erva-Mate pertence à família Aquifoliaceae, compreendendo cerca de 400 espécies, das quais 50 ocorrem no Brasil⁶. A análise fitoquímica de erva-mate mostrou que o aroma característico das folhas se deve a mistura complexa de cerca de 250 substâncias voláteis e têm como seus principais constituintes fixos os alcalóides cafeína, teobromina e teofilina, taninos e alguns compostos orgânicos derivados do ácido clorogênico, bem como flavonóides e várias saponinas triterpenóides derivados dos ácidos ursólico e oleanólico⁷.

Erva-Mate é espécie nativa das regiões subtropicais e temperadas da América do Sul, encontrada mais especificamente na Argentina, Brasil e Paraguai. Apresenta expressiva participação na economia nacional, consagrado como um dos importantes ciclos econômicos^{8,9}. Ocupando ainda, relevante posição como cultura de bens sociais, sendo largamente comercializada por pequenos produtores¹⁰. A importância da erva-mate concentra-se também na área de bebidas por infusão, como chás, chimarrão, tereré e sucos¹¹.

O consumo da erva-mate atraiu a atenção da comunidade científica que vem desenvolvendo inúmeras pesquisas em relação a ela¹². Dentre as aplicações já existentes destaca-se a utilização como conservante natural, corante natural, estimulante do sistema nervoso e no tratamento de hipertensão, bronquite e pneumonia, bactericida, como esterilizante natural e na fabricação de cosméticos¹³.

Entre os trabalhos já realizados sobre a capacidade de inibição e/ou eliminação bacteriana produzida pela erva-mate verificou-se relatos de atividade antimicrobiana estudada por alguns autores. Girolometto *et al.*⁶ verificaram a atividade do extrato aquoso e etanólico em cepas padrões ATCC de bactérias gram positivas e negativas e De Biasi *et al.*⁷ em *Candida albicans*, bactérias gram positivas e negativas, todos de coleção ATCC e Gonçalves *et al.*¹⁵ estudaram o extrato hidro-alcoólico em bactérias gram positivas e negativas isolados de focos infecciosos.

Baseado neste contexto, o presente trabalho teve como objetivo avaliar o efeito do extrato aquoso de folhas e cambitos de erva-mate sobre cepas de *Salmonella* spp. isoladas de aves.

2. Material e Método

2.1 Amostras de bacterianas

As cepas de *Salmonella* spp. foram obtidas da bacterioteca do Centro de Diagnóstico Veterinário Brasil Sul Ltda – MercoLab; todas foram isoladas de carcaças de aves: “swab” de arrasto, órgãos, farinha de osso, forro de caixa, “swab” de cloaca, vísceras, ração e mecônio. São elas: *S. Derby*, *S. Heidelberg*, *S. Cubana*, *S. Orion*, *S. Enteritidis*, *S. Enterica*, *S. Infantis*, *S. Mbandaka*, *S. Agona*, *S. Lexington*, *S. Give*, *S. Newport*, *S. Montevideo* e *S. Kentucky*.

Os sorovares selecionados foram semeados em ágar *Salmonella-Shigella* e incubados a 35°C/24h e novamente semeados em ágar estoque e incubados a 35°C/24h, sendo então, levados para o laboratório da Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE).

2.2 Preparação e avaliação do extrato

O extrato aquoso de erva-mate foi obtido de acordo com Stangarlin¹⁶ com modificações, a partir da trituração de cambitos e folhas (200 g em 1L de água destilada) para o extrato a 200 mg/mL em liquidificador. Para as demais concentrações testadas (150, 100 e 50 mg/mL) foram realizadas diluições a partir do extrato na maior concentração (200 mg/mL). Após ser homogeneizado e filtrado, avaliaram-se os extratos pelo método de microdiluição em caldo para a determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM).

A CIM foi determinada com base na metodologia descrita no documento National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS)¹⁷ e consistiu na distribuição de 160 µL de Caldo Müller-Hinton (MH) em poços de uma placa de microdiluição. Os sorovares foram previamente inoculados em meio de enriquecimento, “Brain Heart Infusion” (BHI) e incubados a 35°C/16-18h. Em seguida foram diluídos em solução salina (0,85%) até atingir a concentração de 1x10⁸ UFC/ mL na escala MacFarland. Posteriormente foi realizada a diluição de 1:100 em caldo MH e a partir desta diluição (1x10⁶ UFC/ mL), adicionou-se 8 µL da bactéria e por último 160 µL do respectivo extrato. Como controle positivo foi utilizado solução de cloranfenicol 30mg/mL em caldo MH; e para o controle negativo, água destilada estéril. As microplacas foram incubadas a 35°C/24h, em condições de aerobiose. A determinação das CIMs teve como base presença ou ausência de turvação, sendo convencionado presença de turvação como crescimento bacteriano e ausência como não crescimento bacteriano. Dessa forma, foi analisada a menor concentração do extrato capaz de causar inibição total do crescimento. Estes ensaios foram realizados em quintuplicata.

Determinação da Concentração Bactericida Mínima: A partir dos poços onde não houve crescimento bacteriano visível, com base na metodologia de Santurio¹⁸, foi retirada uma alíquota de 10 µL e semeada na superfície do ágar MH. As placas foram incubadas a 35°C/48h foi definida a

concentração bactericida mínima como a menor concentração do extrato em estudo capaz de causar a morte do inóculo. Os ensaios de CIM e CBM foram realizados em quintuplicata.

3 Resultados e Discussão

A CBM e CIM dos extratos vegetais de erva-mate frente aos 14 diferentes sorovares de *Salmonella* spp testados estão descritos na tabela 1. Verificou-se através da CIM do extrato de erva-mate, que 6 (43%) sorovares de *Salmonella* spp (*S. Heidelberg*, *S. Cubana*, *S. Agona*, *S. Give*, *S. Newport* e *S. Montevideo*) não foram suscetíveis a este extrato em nenhuma das concentrações testadas. Já nas 8 (57%) sorovares restantes (*S. Derby*, *S. Orion*, *S. Enteritidis*, *S. Enterica*, *S. Infantis*, *S. Mbandaka*, *S. Lexington*, *S. Kentucky*) houve alguma atividade inibitória.

Tabela 1: Atividade bactericida e bacteriostática do extrato vegetal de erva-mate sobre sorovares de *Salmonella* spp.

Sorovar	Concentração do extrato (mg/mL)			
	50	100	150	200
<i>S. Derby</i>	SA	SA	BT	BC
<i>S. Heidelberg</i>	SA	SA	SA	SA
<i>S. Cubana</i>	SA	SA	SA	SA
<i>S. Orion</i>	SA	SA	SA	BT
<i>S. Enteritidis</i>	SA	SA	BT	BC
<i>S. Enterica</i>	SA	SA	BT	BC
<i>S. Infantis</i>	SA	SA	SA	BT
<i>S. Mbandaka</i>	SA	SA	BT	BT
<i>S. Agona</i>	SA	SA	SA	SA
<i>S. Lexington</i>	BT	BT	BC	BC
<i>S. Give</i>	SA	SA	SA	SA
<i>S. Newport</i>	SA	SA	SA	SA
<i>S. Montevideo</i>	SA	SA	SA	SA
<i>S. Kentucky</i>	SA	SA	SA	BC

Legenda: BT=Bacteriostático; BC=Bactericida; SA= Sem Atividade

A *S. Lexington* demonstrou maior sensibilidade ao extrato, sendo que as concentrações de 50 e 100 mg/mL apresentaram efeito bacteriostático e a partir de 150 mg/mL o efeito foi bactericida.

Foi encontrada atividade bacteriostática na concentração de 150 mg/mL para *S. Mbandaka*, *S. Enteritidis*, *S. Enterica*, *S. Derby* e a 200 mg/mL para *S. Infantis* e *S. Orion*. A atividade bactericida pode ser verificada na concentração de 150 mg/mL para *S. Lexington* e a 200 mg/mL para *S. Derby*, *S. Kentucky*, *S. Enterica* e *S. Enteritidis*. Estes resultados coincidem com Girolometto¹² para *S. Enteritidis*.

Girolometto¹² realizaram testes de diluição, em sistema de tubos múltiplos, com extratos hídricos (decocto), etanólicos (alcooolatura e hidroalcooolatura) de cambitos e de folhas de erva-mate, em concentração de 50%. Os testes foram sobre as bactérias *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Enterococcus faecalis* (ATCC 19433), *Escherichia coli* (ATCC 11229) e também a *Salmonella enteritidis* (ATCC 11076) e mostraram

que todas as formas de extração apresentaram capacidade de inativação e/ou inibição seletivas sobre as bactérias avaliadas. Os extratos originados por destilação etanólica apresentaram os melhores resultados, sendo que as cepas de *Salmonella enteritidis* apresentaram maior sensibilidade ao extrato.

Gonçalves et al.¹⁵ estudaram a atividade antimicrobiana de diversas plantas pelo método de difusão em ágar. Dentre eles o extrato hidro-alcólico de erva-mate na concentração de 10% demonstrou atividade para *Shigella sonnei*, *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus* spp. coagulase. Não houve atividade em *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis* e *Pseudomonas aeruginosa*.

De Biasi¹⁴ realizaram avaliação da atividade antimicrobiana de erva-mate nas concentrações de 50 e 100 mg/mL nos micro-organismos: *Candida albicans*, *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis*., utilizando o método de difusão do disco com extratos hidro-alcólicos das folhas e ramos. Os extratos inibiram o crescimento de levedura, bacilos gram-negativos e cocos gram-positivos, não apresentando atividade frente à *Escherichia coli*. Para os autores as divergências entre seus resultados com os de Gonçalves et al.¹⁵ podem estar relacionados com a exposição ou não da planta ao sol, decorrentes da época da colheita da planta.

Embora o método de difusão em ágar seja o método de escolha da maioria dos autores citados, o método da microdiluição, desenvolvido por Eloff em 1998, vem sendo bastante utilizado, principalmente devido à sua sensibilidade e quantidade mínima de reagentes, o que possibilita maior número de réplicas, aumentando a confiabilidade dos resultados¹⁹. Porém, deve-se ressaltar que pode haver divergências quando comparado os resultados entre diferentes metodologias. Deve-se estar alerta para possíveis equívocos em conclusões obtidas pela comparação entre observações e experimentos que não utilizaram a mesma metodologia²⁰.

Comparando os trabalhos citados na literatura com a nossa pesquisa, verifica-se que a atividade antimicrobiana de erva-mate não está diretamente relacionada com o emprego de extratos aquosos ou alcólicos, nem com a caracterização do Gram, visto que *Salmonella* spp. inclui bacilos Gram-negativos, os quais foram testados em todos os trabalhos com suscetibilidade à erva-mate. Contudo, a atividade inibitória em *Salmonella* spp. pode estar relacionada a altas concentrações dos extratos de erva-mate, conforme demonstram os resultados.

A atividade bacteriostática ou bactericida demonstrada pelo extrato aquoso de erva-mate pode ser atribuída à composição química da planta, que é composta por alcalóides como: a cafeína, teobromina e teofilina, taninos, flavonóides e várias saponinas triterpenóides e derivados do ácido clorogênico entre outros¹¹ que apresentam atividade antimicrobiana comprovada tanto para bactérias gram positivas como gram negativas²¹. Além disso, a presença dessas substâncias, confere a planta um efeito antioxidante²²⁻²⁴.

Os resultados obtidos neste estudo preliminar sugerem que o extrato aquoso de erva-mate constitui uma perspectiva para a utilização desta planta como antibiótico natural por apresentar evidente atividade antimicrobiana sobre diferentes sorovares de *Salmonella*. Entretanto, há a necessidade de investigação fitoquímica mais apurada para certificação dos resultados.

4 Conclusão

Concluiu-se que, 57% dos sorovares de *Salmonella* spp. testados, apresentaram suscetibilidade ao extrato aquoso de erva-mate. Os resultados obtidos, nas condições desta pesquisa sugerem a realização de estudos mais aprofundados sobre a eficácia deste extrato, para melhor caracterização das substâncias ativas encontradas na planta. Bem como a metodologia mais eficiente para a inibição dos micro-organismos, visando o uso futuro como substituinte dos promotores de crescimento nas rações para aves.

Referências

- Carvalho CFB, Cortez ALL. *Salmonella* spp. em carcaças, carne mecanicamente separada, linguiças e cortes comerciais de frango. *Cienc. Rural*. 2005;35(6):1465-8.
- Alcocer I, Oliveira KMP, Vidotto MC, Oliveira TCRM. Discriminação de sorovares de *Salmonella* spp. Isolados de carcaças de frango por REP e ERIC – PCR e fagotipagem do sorovar Enteritidis. *Cienc Tecnol Aliment*. 2006;26(2):414-20.
- Van Duijkeren E, Wannet WJ B, Houwers DJ, Van Pelt W. Antimicrobial susceptibilities of *Salmonella* strains isolated from humans, cattle, pigs and chickens in the Netherlands from 1984 to 2001. *Journal of Clinical Microbiology*. 2003;41(8):3574-8.
- ABEF – Associação Brasileira dos Produtores e Exportadores de Frangos. Relatório Anual 2008/2009. [acesso em 13 abr 2010]. Disponível em: <http://www.abef.com.br/portal/_clientes/abef/cat/Abef%20RA_4021.pdf>.
- Duarte MCT, Figueira GM, Pereira B, Magalhães PM, Delarmelina C. Atividade antimicrobiana de extratos hidroalcoólicos de espécies da coleção de plantas medicinais, *Rev. Bras. de Farmacognosia*. 2004;14(1):6-8.
- Souza VC, Lorenzi H. Botânica sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II. Nova Odessa: Plantarum; 2005.
- Lorenzi H, Matos FJA. Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas. São Paulo: Instituto Plantarum; 2002.
- Gnoato SCB, Bassani VL, Coelho G, Schenkel EP. Influência do método de extração nos teores de metilxantinas em erva-mate (*Ilex paraguariensis* A.St. Hil., Aquifoliaceae). *Quimica Nova*. 2007;30(2):304-7.
- Croce DM. Caracterização físico-química de extratos de erva-mate (*Ilex paraguariensis* ST. Hil.) no estado de Santa Catarina. *Ciência Florestal*. 2002;12(2):107-13.
- Maccari Junior A, Santos APR. Parâmetros tecnológicos para a utilização industrial da erva-mate. In: Maccari Junior, A.; Mazuchowski, J. Z. *Produtos alternativos e desenvolvimento da tecnologia industrial na cadeia produtiva da erva-mate*. Curitiba: SEAB; 2000.
- Carvalho PER. *Ilex paraguariensis* Saint-Hilaire; erva-mate. In: Espécies florestais brasileiras: recomendações silviculturais, potencialidades e uso da madeira. Colombo: EMBRAPA-CNPQ/SPI; 1994.
- Girolometto G, Avancini CAM, Carvalho, HHC, Wiest JM. Atividade antibacteriana de extratos de erva mate (*Ilex paraguariensis* A.St.-Hil.). *Rev. Bras. Pl. Med*. 2009;11(1):49-55.
- Bassani VL, Campos AM. Desenvolvimento de extratos secos nebulizados de *Ilex paraguariensis* St. Hil., Aquifoliaceae (erva mate) visando a exploração do potencial do vegetal como fonte de produtos. In: 1 Congresso Sul-Americano da Erva Mate, 1997, Reunião Técnica da Erva Mate, 2., 1997, Curitiba. Anais... Colombo: EMBRAPA/CNPQ, 1997.
- De Biasi B, Grazziotin NA, Hofmann Junior AE. Atividade antimicrobiana dos extratos de folhas e ramos da *Ilex paraguariensis* A. St.-Hil., Aquifoliaceae. *Rev. bras. farmacogn*. 2009;19(2):582-5.
- Gonçalves AL, Alves Filho A, Menezes H. Estudo comparativo da atividade antimicrobiana de extratos de algumas árvores. *Arquivo do Instituto Biológico*. 2005;72(3):353-8.
- Stangarlin JR, Schwan-estrada KRF, Cruz MES, Nozak MH. Plantas medicinais e o controle alternativo de fitopatógenos. *Biocientia. Ciência & Desenvolvimento*. 1999(11):16-21.
- NCCLS - National Committee for Clinical Laboratory Standards. Metodologia dos testes de sensibilidade a agentes antimicrobiana por diluição para bactéria de crescimento aeróbio. Norma aprovada. Brasília: ANVISA; 2003.
- Santurio MJ, Santurio DF, Pozzati P, Moraes C, Franchin PR, Alves SH. Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de orégano, tomilho e canela frente a sorovares de *Salmonella* de origem avícola. *Ciência Rural*. 2007;37(3):803-8.
- Ostrosky EA, Mizumoto MK, Lima MEL, Kaneko TM, Nishikaw SO, Freitas BR. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais. *Rev Bras Farmacogn*. 2008;18(2):301-7.
- Borowsky LM, Bessa MC, Cardoso MI, Avancini CAM. sensibilidade e resistência de amostras de *Salmonella* Typhimurium isoladas de suínos abatidos no Rio Grande do Sul / Brasil frente aos desinfetantes químicos quaternário de amônio e iodoform. *Cien Rural*. 2006;36(5):1474-9.
- Hongpattarakere T, Johnson EA. Natural antimicrobial components isolated from yerba maté (*Ilex paraguariensis*). *Food research institute*. 1999;11(3):39.
- Schinella GR, Troiani G, Dávila V, Buschiazzo PMD, Tournier HA. Antioxidant effects of an aqueous extract of *Ilex paraguariensis*. *Biochem Biophys Res Commun*. 2000;269(2):357-60.
- Filip R, Lotito SB, Ferraro G, Fraga C. Antioxidant activity of *Ilex paraguariensis* and related species. *Nutr Res*. 2000;20(10):1437-46.
- Bastos DHM, Ishimoto EY, Marques MO, Ferri AF, Torres EAF. Essential oil and antioxidant activity of green maté and maté-tea (*Ilex paraguariensis*) infusions. *J. Food Comp. Anal*. 2006;19(6/7):538-43.