



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE ITAPÚA**

**FACULTAD DE CIENCIAS Y TECNOLOGÍA**

**PROGRAMA PARAGUAYO PARA EL DESARROLLO DE LA  
CIENCIA Y TECNOLOGÍA**

**MAESTRÍA EN BIOTECNOLOGÍA EN ALIMENTOS**

**“ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA *IN VITRO* DE EXTRACTOS  
HIDROALCOHÓLICOS SECOS DE YERBA MATE ELABORADA  
PROCEDENTE DE PARAGUAY”**

**AUTOR: BQCA. JOHANA CECILIA GONZÁLEZ CORIA**

**DIRECTOR: MGTER. BQCA. MARTA AURELIA HORIANSKI**

**Encarnación – Paraguay**

**2018**

*Dedicatoria*

*A Dios*

*A mis padres, Manuel y Elba*

*A mis hermanas, Vanesa, Carola y Rocío*

*A mis pequeños, Gustavo, Amira y Santino*

## *Agradecimientos*

Primeramente, quiero agradecer al Consejo Nacional de Ciencias y Tecnología (CONACYT), por apoyar a la formación de jóvenes investigadores en Paraguay, mediante la financiación de la Maestría en Biotecnología en Alimentos.

A la Facultad de Ciencias y Tecnología de la Universidad Nacional de Itapúa y a la coordinación de la maestría, por apostar en la educación mediante la organización y estructuración de los programas de cada cátedra.

A los profesores, por la enseñanza, disposición y paciencia; especialmente a mi directora de tesis Mgter. Bqca. Marta Horianski, por encaminarme y acompañarme para que el trabajo de investigación culmine con éxito.

Al Dr. Ing. Luis Brumovsky, por permitirme realizar parte de mi trabajo en el laboratorio de la Fundación para el Desarrollo e Investigación Científica y Tecnológica (DINCYT).

A la Universidad Nacional de Misiones (UNAM) de Posadas, Misiones, Argentina por darme el acceso al laboratorio de Microbiología del módulo de Bioquímica y Farmacia, de la Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales.

Y a todos aquellos que de alguna forma han colaborado para que este trabajo culmine con éxito.

*Johana*

## ÍNDICE DE CONTENIDO

DEDICATORIA.....	I
AGRADECIMIENTOS .....	II
ÍNDICE DE FIGURAS.....	VIII
ÍNDICE DE TABLAS .....	X
LISTA DE ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS .....	XII
RESUMEN.....	XV
ABSTRACT .....	XVI
INTRODUCCIÓN .....	XVII
OBJETIVOS.....	XXI
HIPÓTESIS .....	XXII
CAPÍTULO I.....	1
REVISIÓN Y ANÁLISIS DE LITERATURA.....	1
1. YERBA MATE .....	2
1.1. Descripción botánica y distribución geográfica .....	2
1.2. Yerba mate elaborada .....	2
1.2.1. Consumo y uso tradicional de la yerba mate .....	3
1.3. Procesamiento de la yerba mate elaborada.....	3
1.3.1. Cosecha .....	3
1.3.2. Procesamiento primario .....	4
1.3.2.1. Zapecado .....	4
1.3.2.2. Secado .....	5
1.3.2.3. Canchado.....	5
1.3.3. Estacionamiento.....	6
1.3.4. Molienda .....	6
1.3.5. Envasado .....	7
1.4. Composición química.....	7

	IV
1.4.1. Compuestos polifenólicos .....	8
1.4.1.1. Ácido clorogénico .....	9
1.4.2. Metilxantinas o alcaloides purínicos metilados .....	10
1.4.3. Saponinas .....	10
1.5. Adulterantes de la yerba mate elaborada .....	11
1.6. Influencia de la zona de cultivo y procesamiento de la yerba mate en sus características físicoquímicas .....	11
1.7. Propiedades biológicas de la yerba mate .....	14
1.7.1. Propiedades antimicrobianas .....	15
1.7.1.1. Actividad antibacteriana .....	16
1.7.1.2. Actividad antifúngica .....	16
1.7.2. Agentes antimicrobianos .....	17
2. EXTRACTOS VEGETALES .....	17
2.1. Definición .....	17
2.2. Tipos de extractos vegetales .....	17
2.3. Métodos para la obtención de extractos vegetales .....	18
2.4. Métodos para evaluar la composición química de los extractos vegetales .....	20
2.5. Metodologías para evaluar <i>in vitro</i> la actividad antibacteriana de extractos vegetales o compuestos de origen vegetal .....	22
2.5.1. Métodos de difusión .....	23
2.5.2. Métodos de dilución .....	24
2.5.2.1. Método de dilución en caldo .....	24
2.5.2.2. Método de dilución en agar .....	25
2.5.3. Factores que intervienen en los métodos .....	25
3. BACTERIAS DE IMPORTANCIA EN ALIMENTOS .....	26
3.1. <i>Escherichia coli</i> .....	26
3.2. <i>Salmonella spp.</i> .....	27
3.3. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	27

	V
3.4. <i>Staphylococcus spp.</i> .....	28
4. AGENTES ANTIMICROBIANOS USADOS EN LA CONSERVACIÓN DE ALIMENTOS.....	30
4.1. Aplicación de extractos de yerba mate en productos alimenticios.....	31
CAPÍTULO II .....	33
MATERIALES Y MÉTODOS .....	33
1. Materiales .....	34
1.1. Muestra .....	34
1.2. Microorganismos .....	35
1.3. Antibióticos controles.....	35
1.4. Materiales de Laboratorio.....	35
1.5. Reactivos .....	36
1.6. Equipos .....	36
2. Métodos.....	37
2.1. Obtención de los extractos hidroalcohólicos secos .....	37
2.1.1. Molienda de la muestra.....	37
2.1.2. Determinación del contenido de humedad (agua) de la yerba mate molida.....	37
2.1.3. Preparación del extracto fluido .....	38
2.1.4. Determinación del rendimiento de los extractos.....	40
2.1.5. Evaporación de los extractos hidroalcohólicos.....	40
2.1.6. Secado de los extractos hidroalcohólicos .....	40
2.1.7. Determinación del contenido de humedad (agua) de los extractos hidroalcohólicos secos.....	41
2.2. Ensayos de la actividad antimicrobiana de los extractos hidroalcohólicos secos de yerba mate por los métodos de difusión con discos y de difusión por pocillos .....	41
2.2.1. Preparación de las soluciones de trabajo de los extractos secos.....	41
2.2.2. Evaluación de la contaminación de los extractos .....	41

	VI
2.2.3. Preparación de los discos de papel de filtro .....	42
2.2.4. Ensayos de los métodos de difusión con disco y de difusión por pocillos .....	43
2.2.4.1. Preparación del inóculo .....	43
2.2.4.2. Siembra.....	43
2.3. Determinación de la concentración inhibitoria mínima .....	45
2.4. Determinación de la concentración bactericida mínima.....	47
2.5. Análisis fitoquímico preliminar de los extractos hidroalcohólicos secos de yerba mate elaborada.....	47
2.5.1. Taninos.....	47
2.5.2. Flavonoides .....	48
2.5.3. Saponinas .....	48
2.5.4. Alcaloides .....	48
2.6. Determinación del contenido de polifenoles totales.....	49
2.6.1. Preparación de la curva de calibración .....	49
2.6.2. Determinación de polifenoles totales en los extractos hidroalcohólicos secos y en la yerba mate elaborada .....	49
2.7. Análisis estadístico .....	50
CAPÍTULO III .....	51
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	51
1. Obtención de los extractos hidroalcohólicos secos .....	52
1.1. Molienda de la muestra .....	52
1.2. Determinación del contenido de humedad (agua) de la yerba mate elaborada molida .....	53
1.3. Preparación del extracto fluido .....	53
1.4. Determinación del rendimiento de los extractos .....	54
1.5. Evaporación de los extractos hidroalcohólicos .....	55
1.6. Secado de los extractos hidroalcohólicos .....	56

1.7. Determinación del contenido de humedad (agua) de los extractos hidroalcohólicos secos.....	56
2. Ensayos de la actividad antimicrobiana de los extractos hidroalcohólicos secos .....	57
2.1. <i>Salmonella enteritidis</i> cepa salvaje.....	57
2.2. <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923.....	59
2.3. <i>Staphylococcus aureus</i> cepa salvaje .....	62
2.4. <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 .....	65
2.4. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853 .....	67
3. Porcentaje del efecto de inhibición de los extractos hidroalcohólicos secos de yerba mate elaborada .....	75
4. Determinación de la concentración inhibitoria mínima y concentración bactericida mínima...79	
5. Análisis fitoquímico preliminar de los extractos hidroalcohólicos secos de yerba mate elaborada .....	83
6. Determinación del contenido de polifenoles totales .....	85
6.1. Curva de calibración.....	85
6.2. Determinación de polifenoles totales en los extractos hidroalcohólicos secos y en la yerba mate elaborada.....	85
CAPÍTULO IV.....	90
CONCLUSIONES .....	91
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	93
ANEXOS.....	104



## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Tamiz de malla N° 40 con apertura de 420 $\mu$ . Molino modelo FW 100.....	37
Figura 2. Sonicador modelo UC 150.....	39
Figura 3. Filtración al vacío. ....	39
Figura 4. Rotavapor SENCO modelo R 206B. ....	40
Figura 5. Soluciones de trabajo de los extractos obtenidos.....	41
Figura 6. Evaluación de la contaminación de los extractos en agar Müeller Hinton.....	42
Figura 7. Discos de papel de filtro Whatman cargados con 40 $\mu$ L de diferentes concentraciones del extracto 4 obtenido. ....	43
Figura 8. Método de difusión con discos. ....	44
Figura 9. Método de difusión por pocillos. ....	45
Figura 10. Esquema de trabajo para la determinación de la CIM. ....	46
Figura 11. Yerba mate elaborada molida y tamizada.....	52
Figura 12. Extracto hidroalcohólico fluido de yerba mate preparado con solvente de extracción metanol:agua (60:40). ....	53
Figura 13. Gráfico de medias del % del rendimiento de los extractos con intervalos de Fisher. ....	54
Figura 14. Extracto hidroalcohólico con solvente de extracción metanol:agua (60:40) concentrado obtenido mediante evaporación al vacío.....	56
Figura 15. Extracto hidroalcohólico seco de yerba mate preparado con solvente de extracción etanol:agua (60:40) en placa de Petri. ....	56
Figura 16. Ensayo de actividad antibacteriana de los extractos de yerba mate elaborada frente a <i>Salmonella enteritidis</i> por el método de difusión por pocillos.....	58
Figura 17. Ensayo de actividad antibacteriana de los extractos de yerba mate elaborada frente a <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 por el método de difusión con discos.....	60
Figura 18. Ensayo de actividad antibacteriana de los extractos de yerba mate elaborada frente a <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 por el método de difusión por pocillos.....	61

Figura 19. Ensayo de actividad antibacteriana de los extractos de yerba mate elaborada frente a <i>Staphylococcus aureus</i> cepa salvaje por el método de difusión con discos. ....	63
Figura 20. Ensayo de actividad antibacteriana de los extractos de yerba mate elaborada frente a <i>Staphylococcus aureus</i> cepa salvaje por el método de difusión por pocillos. ....	64
Figura 21. Ensayo de actividad antibacteriana de los extractos de yerba mate elaborada frente a <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 por el método de difusión con discos. ....	66
Figura 22. Ensayo de actividad antibacteriana de los extractos de yerba mate elaborada frente a <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 por el método de difusión por pocillos. ....	67
Figura 23. Ensayo de actividad antibacteriana de los extractos de yerba mate elaborada frente a <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853 por el método de difusión con discos. ....	68
Figura 24. Ensayo de actividad antibacteriana de los extractos de yerba mate elaborada frente a <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853 por el método de difusión por pocillos. ....	69
Figura 25. Concentración inhibitoria mínima para <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 utilizando como revelador resazurina. ....	80
Figura 26. Concentración bactericida mínima para <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923. ....	80
Figura 27. Concentración inhibitoria mínima para <i>Staphylococcus aureus</i> cepa salvaje utilizando como revelador resazurina. ....	81
Figura 28. Concentración bactericida mínima para <i>Staphylococcus aureus</i> cepa salvaje. ....	81
Figura 29. Concentración inhibitoria mínima para <i>Salmonella enteritidis</i> cepa salvaje utilizando como revelador resazurina. ....	82
Figura 30. Concentración bactericida mínima para <i>Salmonella enteritidis</i> cepa salvaje. ....	82
Figura 31. Contenido de polifenoles totales de los extractos hidroalcohólicos secos y de yerba mate elaborada. ....	86

**ÍNDICE DE TABLAS**

Tabla 1. Principales microorganismos causantes de enfermedades transmitidas por alimentos en base a la severidad de la enfermedad o por el número de casos que produce. ....	29
Tabla 2. Factores y niveles utilizados para el análisis factorial completo. ....	38
Tabla 3. Extractos hidroalcohólicos preparados a partir de yerba mate elaborada. ....	38
Tabla 4. Concentraciones de la solución de los extractos secos de yerba mate cargados en los discos de papel de filtro y cantidades de los extractos secos por disco. ....	42
Tabla 5. Contenido de humedad de la yerba mate elaborada molida y tamizada. ....	53
Tabla 6. Rendimiento de los extractos hidroalcohólicos de yerba mate elaborada. ....	54
Tabla 7. Contenido de humedad de los extractos hidroalcohólicos secos de yerba mate elaborada. ....	57
Tabla 8. Ensayo de actividad antibacteriana de diferentes cantidades de los extractos hidroalcohólicos secos de yerba mate frente a <i>Salmonella enteritidis</i> cepa salvaje, por el método de difusión con discos. ....	57
Tabla 9. Ensayo de actividad antibacteriana de diferentes cantidades de los extractos hidroalcohólicos secos de yerba mate frente a <i>Salmonella enteritidis</i> cepa salvaje por el método de difusión por pocillos. ....	58
Tabla 10. Ensayo de actividad antibacteriana de diferentes cantidades de los extractos hidroalcohólicos secos de yerba mate frente a <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 por el método de difusión con discos. ....	60
Tabla 11. Ensayo de actividad antibacteriana de diferentes cantidades de los extractos hidroalcohólicos secos de yerba mate frente a <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 por el método de difusión por pocillos. ....	61
Tabla 12. Ensayo de actividad antibacteriana de diferentes cantidades de los extractos hidroalcohólicos secos de yerba mate frente a <i>Staphylococcus aureus</i> cepa salvaje por el método de difusión con discos. ....	63
Tabla 13. Ensayo de actividad antibacteriana de diferentes cantidades de los extractos hidroalcohólicos secos de yerba mate frente a <i>Staphylococcus aureus</i> cepa salvaje por el método de difusión por pocillos. ....	64

Tabla 14. Ensayo de actividad antibacteriana de diferentes cantidades de los extractos hidroalcohólicos secos de yerba mate frente a *Escherichia coli* ATCC 25922 por el método de difusión con discos. .... 66

Tabla 15. Ensayo de actividad antibacteriana de diferentes cantidades de los extractos hidroalcohólicos secos de yerba mate frente a *Escherichia coli* ATCC 25922 por el método de difusión por pocillos..... 67

Tabla 16. Ensayo de actividad antibacteriana de diferentes cantidades de los extractos hidroalcohólicos secos de yerba mate frente a *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 por el método de difusión con discos. .... 68

Tabla 17. Ensayo de actividad antibacteriana de diferentes cantidades de los extractos hidroalcohólicos secos de yerba mate frente a *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 por el método de difusión por pocillos. .... 69

Tabla 18. Porcentaje del efecto de inhibición de crecimiento de los distintos extractos frente a *Salmonella enteritidis* cepa salvaje por el método de difusión con discos. .... 75

Tabla 19. Porcentaje del efecto de inhibición de crecimiento de los distintos extractos frente a *Salmonella enteritidis* cepa salvaje por el método de difusión por pocillos. .... 75

Tabla 20. Porcentaje del efecto de inhibición de crecimiento de los distintos extractos frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 por el método de difusión con discos..... 76

Tabla 21. Porcentaje del efecto de inhibición de los distintos extractos frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 por el método de difusión por pocillos. .... 77

Tabla 22. Porcentaje del efecto de inhibición de crecimiento de los distintos extractos frente a *Staphylococcus aureus* cepa salvaje por el método de difusión con discos..... 78

Tabla 23. Porcentaje del efecto de inhibición de crecimiento de los distintos extractos frente a *Staphylococcus aureus* cepa salvaje por el método de difusión por pocillos..... 78

Tabla 24. Concentración inhibitoria mínima (CIM) y concentración bactericida mínima (CBM) de los extractos hidroalcohólicos secos de yerba mate elaborada. .... 79

Tabla 25. Análisis fitoquímico preliminar de extractos hidroalcohólicos secos de yerba mate elaborada. .... 83

Tabla 26. Contenido de polifenoles totales en los extractos hidroalcohólicos secos y en la yerba mate elaborada..... 86

**LISTA DE ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS**

AI: Ausencia de inhibición

AMP: Ampicilina

ANOVA: Análisis de varianza

APD: Agar papa dextrosa

ATCC: *American Type Culture Collection*

ATC: Agar triptona de soya

atm: Atmósfera

CAZ: Ceftazidima

CBM: Concentración bactericida mínima

CE: Electroforesis capilar

CGA: Ácido clorogénico

CIM: Concentración inhibitoria mínima

CLSI: *Clinical Laboratory Standards Institute*

CO<sub>2</sub>: Dióxido de carbono

CSD: Caldo sabouraud dextrosa

CTS: Caldo tripticasa de soya

CV: Coeficiente de variación

d: Factor de dilución

D: Densidad óptica

DE: Desvío estándar

DINCYT: Desarrollo e Investigación Científica y Tecnológica

DMF: N-metilformamida

DMSO: Dimetilsulfóxido

E: Estándar

EAG: Equivalente de ácido gálico

EE: Error estándar

EI: Efecto inhibitorio

ETA: Enfermedad transmitida por alimentos

FAO: *Food and Agriculture Organization*

FDA: *Food and Drug Administration*

g: Gramo/s

GC–MS: Cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas

h: Hora

H: Humedad

HPLC: Cromatografía líquida de alta presión

HPLC–PDA–MS: Cromatografía líquida de alta presión con detector de diodos y espectrometría de masas

Hz: Hertz

I: *Ilex*

IAE: Intoxicación alimentaria estafilocócica

IMP: Imipenem

INTN: Instituto Nacional de Tecnología y Normalización

ISO: *International Organization for Standardization*

Kg: Kilogramos

Km<sup>2</sup>: Kilómetros cuadrados

Khz: Kilohercios

L: Litro/s

LC–MS: Cromatografía líquida – espectrometría de masas

LC–UV/VIS: Cromatografía líquida ultravioleta – visible

m: Metro/s

m: Masa

mg: Miligramos

MH: Müller Hinton

min: Minuto/s

mL: Mililitros

mm: Milímetros

MRSA: *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina

nm: Nanómetros

pH: Potencial de hidrógeno

QMS: Espectrómetro de masas cuadrupolar

RMN: Resonancia magnética nuclear

RPC: Cromatografía de fase inversa

RPM: Revolución por minutos

spp.: Especies

ST: Solución de trabajo

TLC: Cromatografía en capa fina

UFC: Unidades formadoras de colonias

USP: *United States Pharmacopeia*

V: Volumen

W: Peso de la muestra

W: Watt

W<sub>DM</sub>: Contenido de materia seca

W<sub>T</sub>: Contenido total de polifenoles

YM: Yerba mate

% R: Rendimiento porcentual

Nº: Número

$\bar{X}$ : Promedio

## RESUMEN

En los últimos años ha aumentado mundialmente la demanda de conservantes naturales en las industrias alimentarias con el objeto de reemplazar a los conservantes sintéticos. Los compuestos vegetales bioactivos son una fuente potencial de nuevas formulaciones antimicrobianas. La yerba mate es una especie vegetal con diversas propiedades. El objetivo del presente trabajo fue evaluar la actividad antibacteriana *in vitro* de extractos hidroalcohólicos secos de yerba mate elaborada procedente de Paraguay sobre bacterias de importancia en alimentos. Se trabajó con yerba mate elaborada procedente de establecimientos yerbateros del Departamento de Itapúa, Paraguay. Se prepararon extractos hidroalcohólicos secos por los métodos de maceración y sonicación, secado a 40 °C. Se emplearon como solventes de extracción metanol y etanol en proporciones 60:40 y 70:30 (alcohol:agua). La actividad antimicrobiana se evaluó empleando cantidades de 10, 8, 4 y 2 mg del extracto hidroalcohólico seco. Los ensayos se realizaron frente a *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella enteritidis* cepa salvaje, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Staphylococcus aureus* cepa salvaje, utilizando los métodos de difusión con discos y por pocillos. Se determinó la concentración inhibitoria mínima (CIM) por el método de microdilución en caldo y la concentración bactericida mínima (CBM) por siembra en placa. Se realizó un análisis de la composición química preliminar y se determinó el contenido de polifenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu. Los resultados demostraron sensibilidad *in vitro* de las cepas de *Staphylococcus aureus* frente a todos los extractos ensayados y de la cepa de *Salmonella enteritidis* frente a tres de los extractos evaluados, en las condiciones ensayadas. *Staphylococcus aureus* presentó mayor sensibilidad con CIM y CBM menores que *Salmonella enteritidis*. El análisis fitoquímico preliminar evidenció la presencia de taninos, flavonoides y saponinas mientras que no se detectó presencia de alcaloides. El contenido de polifenoles totales fue significativamente mayor en los extractos hidroalcohólicos secos que en la yerba mate elaborada. Estos hallazgos sugieren que los extractos obtenidos podrían utilizarse como potenciales conservantes naturales en productos alimenticios. En la actualidad, no se han reportado estudios de actividad antibacteriana *in vitro* realizados a la yerba mate elaborada procedente de Paraguay, convirtiéndose este en el primer informe.

**Palabras clave:** Yerba mate; Actividad antibacteriana; Extractos hidroalcohólicos.



**ABSTRACT**

In recent years, the demand for natural preservatives in the food industries has increased globally in order to replace synthetic preservatives. Bioactive plant compounds are a potential source of new antimicrobial formulations. Yerba mate is a plant species with diverse properties. The objective of the present work was to evaluate the *in vitro* antibacterial activity of dry hydroalcoholic extracts of yerba mate elaborated Paraguayan on food importance bacteria. We worked with yerba mate elaborated from yerba mate establishments in the department of Itapúa, Paraguay. Dry hydroalcoholic extracts were prepared by maceration and sonication methods, drying at 40 ° C. Methanol and ethanol extraction solvents in proportions of 60:40 and 70:30 (alcohol: water) were used as extraction solvents. The antimicrobial activity was evaluated using amounts of 10, 8, 4 and 2 mg of the dry hydroalcoholic extract. The assays were performed against *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella enteritidis* wild strain, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 and *Staphylococcus aureus* wild strain, using disk and well diffusion methods. The minimum inhibitory concentration (MIC) was determined by the microdilution method in broth and the minimum bactericidal concentration (MBC) by plating. An analysis of the preliminary chemical composition was carried out and the content of total polyphenols was determined by the Folin–Ciocalteu method. The results showed *in vitro* sensitivity of the *Staphylococcus aureus* strains against all the extracts tested and of the *Salmonella enteritidis* strain against three of the evaluated extracts, under the conditions tested. *Staphylococcus aureus* showed higher sensitivity with MIC and CBM lower than *Salmonella enteritidis*. The preliminary phytochemical analysis evidenced the presence of tannins, flavonoids and saponins while no presence of alkaloids was detected. The content of total polyphenols was significantly higher in the dry hydroalcoholic extracts than in the yerba mate elaborated. These findings suggest that the extracts obtained could be used as potential natural preservatives in food products. At present, no studies of antibacterial activity *in vitro* have been reported on yerba mate elaborated Paraguayan, this being the first report.

**Keywords:** Yerba mate; Antibacterial activity; Hydroalcoholic extract.

## INTRODUCCIÓN

La industria alimentaria busca obtener alimentos con buena calidad, que conserven todas sus características nutricionales y organolépticas, además de ser inocuos. Un alimento inocuo es aquel que no ocasiona daño al consumidor. Los alimentos al ser expuestos a diversos agentes pueden perder su inocuidad. Los agentes pueden ser físicos, químicos o biológicos (De la Fuente Salcido y Barboza Corona, 2010). La ingestión de alimentos y/o agua que contienen agentes etiológicos, en cantidades tales, que afectan la salud del consumidor causan la aparición de un conjunto de síntomas que se denomina enfermedad transmitida por alimentos (ETA) (Soto Varela *et al.*, 2016). Las ETAs se dividen en dos tipos: infecciones alimentarias e intoxicaciones alimentarias. Las infecciones alimentarias se producen por la ingestión de alimentos y/o agua contaminados con agentes infecciosos específicos, tales como bacterias, virus, hongos o parásitos, los cuales se multiplican o se lisan y producen toxinas, o invaden la pared intestinal y desde allí son capaces de alcanzar otros aparatos o sistemas. Las intoxicaciones alimentarias son causadas por la ingestión de toxinas formadas en tejidos de plantas o animales, por la ingestión de productos derivados del metabolismo de microorganismos presentes en el alimento, o por la ingestión de sustancias químicas que se incorporan a los alimentos de modo accidental, incidental o intencional en cualquier momento desde su producción hasta su consumo (Guerrero, 2016). Los principales agentes biológicos causantes de ETAs en base a su severidad son: *Campylobacter jejuni*, *Clostridium botulinum*, *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella spp.*, *Staphylococcus aureus*, *Shigella spp.*, *Vibrio vulnificus*, *Yersinia enterocolitica* y *Toxoplasma gondii* (De la Fuente Salcido y Barboza Corona, 2010).

Para prevenir las ETAs, es necesaria la adición de conservantes a los alimentos. En los últimos años ha aumentado mundialmente la demanda de conservantes naturales en las industrias alimentarias para reemplazar los conservantes sintéticos (Burriss *et al.*, 2011). Los compuestos vegetales bioactivos son una fuente potencial de nuevas formulaciones antimicrobianas debido a los compuestos fitoquímicos que estos presentan (Rempe *et al.*, 2015).

Según Burriss *et al.* (2011), la yerba mate podría ser utilizada como un potencial agente antimicrobiano en alimentos y bebidas debido a que los extractos acuosos dializados de té comercial, de *Ilex paraguariensis* presentan capacidad de inhibir o inactivar patógenos bacterianos transmitidos por alimentos tales como *Escherichia coli* O157: H7 y *Staphylococcus aureus*.

La yerba mate, denominada científicamente como *Ilex paraguariensis* A. Saint Hilaire, es una especie vegetal procedente del sur de Brasil, Argentina y Paraguay. Sus hojas secas y trituradas se utilizan para elaborar infusiones conocidas regionalmente como mate y tereré, que se preparan con agua caliente y fría, respectivamente, además de mate cocido e infusión de té (Fernandes *et al.*, 2012). El empleo de yerba mate como ingrediente alimentario, en suplementos dietéticos y como bebida energizante natural, ha aumentado en gran medida en Estados Unidos, Europa y Oriente Medio (Bergottini *et al.*, 2017). La yerba mate contiene diversos componentes incluyendo nutrientes, minerales y vitaminas hidrosolubles. Este producto resulta de gran interés por su alto contenido de fitoquímicos tales como metilxantinas, saponinas y en particular los polifenoles, estos últimos muy conocidos por sus actividades biológicas (Cardozo Junior y Morand, 2016).

De acuerdo con la Norma NP 3500193 del Instituto Nacional de Tecnología y Normalización (INTN), se define a la yerba mate como el producto formado por las hojas desecadas y ligeramente tostadas, desmenuzadas de *Ilex paraguariensis* A. St Hil (*Aquifoliaceae*), las cuales pueden estar mezcladas o no con fragmentos de ramas jóvenes, pecíolos, pedúnculos florales y semillas de la misma (Degen *et al.*, 2011). El producto final de la yerba mate elaborada puede diferir debido a ciertas condiciones a las cuales es expuesta como el procesamiento y otros parámetros como el sexo de la planta, la variabilidad genética y el tipo de suelo; los cuales pueden influir en la calidad, en las características sensoriales y en la cantidad de compuestos bioactivos (Bastos *et al.*, 2007). Los reportes indican que las etapas de zapeado y secado son las de mayor incidencia (Escalada *et al.*, 2011).

Se han empleado extractos de plantas como conservantes naturales de alimentos, sin embargo, estos presentan un efecto sensorial negativo debido a que aportan sabores y olores indeseables a los alimentos. La yerba mate característicamente presenta sabor amargo, ácido, astringente con notas a heno, hierba verde y húmeda (Burriss *et al.*, 2012a). Si bien, estos términos le confieren características negativas a lo que se está buscando, en un estudio realizado por Racanicci *et al.* (2009) en albóndigas de pollo precocidas, en las que incorporó yerba mate como antioxidante, no se observó efecto negativo en el sabor ni en el olor del producto alimenticio. En otro estudio realizado por Beal *et al.* (2011) donde se emplearon extractos de hojas de yerba mate como antioxidante natural en salchichas de tipo italiano, las características sensoriales de sabor y de textura no fueron afectadas. Estos estudios indican su posible aceptación sensorial cuando es empleada como aditivo en los alimentos.

Se han realizado investigaciones relativamente limitadas del empleo de extractos de hojas de yerba mate como potencial agente antimicrobiano en productos alimenticios. Pese a que se conocen muchos de los compuestos bioactivos presentes en extractos de yerba mate, no se conocen por completo los compuestos que contribuyen a la actividad antimicrobiana y si presentan efectos combinados, antagonísticos o sinérgicos. Sin embargo, las investigaciones se limitan aún más en la yerba mate elaborada (Burriss *et al.*, 2012a). Los diez principales compuestos identificados en yerba mate como potenciales componentes antimicrobianos son: linalol,  $\alpha$ -ionona,  $\beta$ -ionona,  $\alpha$ -terpineol, ácido octanoico, geraniol, 1-octanol, nerolidol, geranilactone y eugenol. Los que han demostrado ser activos contra un amplio espectro de bacterias tanto Gram positivas como Gram negativas. Los compuestos polifenólicos presentes en yerba mate incluyen el ácido cafeico, la cafeína, los derivados de cafeoil, el ácido cafeoilshikímico, el ácido clorogénico, el ácido feruloilquínico, el kaempferol, la quercetina, el ácido quínico, la rutina y la teobromina, los cuales han demostrado que contribuyen a la actividad antimicrobiana contra patógenos transmitidos por alimentos. Asimismo, los ácidos cafeico y clorogénico han evidenciado actividad antibacteriana contra bacterias Gram negativas. Por otra parte, los derivados de ácido cafeoilquínico contribuyen a la actividad antimicrobiana en los extractos de plantas crudas (Burriss *et al.*, 2012a).

Investigaciones científicas realizadas por Prado Martín *et al.* (2013), Girolometto *et al.* (2009) y Rempe *et al.* (2015) han demostrado actividad antimicrobiana de extractos etanólicos, metanólicos y acuosos de yerba mate sobre patógenos alimentarios.

Debido a la creciente necesidad de la industria alimentaria de satisfacer la demanda por alimentos saludables y libre de aditivos sintéticos, surge el interés por conocer el espectro de actividad antimicrobiana que presenta la yerba mate elaborada procedente de Paraguay con el propósito de ser utilizada como bioconservante de alimentos y de bebidas. El uso de la misma presentaría claras ventajas desde el punto de vista nutritivo y toxicológico. Paraguay no cuenta con estudios realizados sobre la actividad antimicrobiana de la yerba mate elaborada producida a nivel nacional. Ante lo expuesto surge la siguiente pregunta de investigación: ¿Presentan actividad antibacteriana los compuestos presentes en los extractos hidroalcohólicos secos obtenidos de la yerba mate elaborada procedente de Paraguay frente a bacterias de importancia en alimentos?

A continuación, se expondrán los diferentes capítulos y sus respectivos contenidos que se ajustan a los objetivos propuestos:

En el primer capítulo se describen los antecedentes y se hace una revisión bibliográfica de los diferentes conceptos relacionados al tema de investigación, con sus características correspondientes.

El segundo capítulo detalla los materiales y métodos empleados de acuerdo a metodologías validadas.

En el tercer capítulo se hace la presentación, descripción, análisis de los resultados y discusión de los mismos de acuerdo a los antecedentes.

Por último, en el cuarto capítulo se presentan las conclusiones, en la cual se exponen las consideraciones finales, teniendo en cuenta el objetivo general e hipótesis donde se evidencia el aporte del trabajo de investigación al área.

## OBJETIVOS

### General

Evaluar la actividad antibacteriana *in vitro* de extractos hidroalcohólicos secos de yerba mate elaborada procedente de Paraguay sobre bacterias de importancia en alimentos.

### Específicos

1. Obtener extractos hidroalcohólicos secos de yerba mate elaborada procedente de Paraguay utilizando como solvente soluciones hidroetanólicas e hidrometanólicas con proporciones 70:30 y 60:40 (alcohol:agua).
2. Ensayar la actividad antibacteriana de los extractos hidroalcohólicos secos frente a bacilos Gram negativos: *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella enteritidis* cepa salvaje y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 y cocos Gram positivos: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Staphylococcus aureus* cepa salvaje, por los métodos de difusión con discos y de difusión por pocillos.
3. Determinar la concentración inhibitoria mínima y la concentración bactericida mínima.
4. Analizar las características fitoquímicas de los extractos hidroalcohólicos secos con actividad antimicrobiana.
5. Cuantificar el contenido de polifenoles totales de los extractos hidroalcohólicos secos de yerba mate elaborada.

## **HIPÓTESIS**

Los extractos hidroalcohólicos secos de yerba mate elaborada procedente de Paraguay contienen compuestos con actividad antimicrobiana contra cepas bacterianas de importancia en alimentos.

# CAPÍTULO I

REVISIÓN Y ANÁLISIS DE LITERATURA



## 1. YERBA MATE

### 1.1. Descripción botánica y distribución geográfica

El género *Ilex* perteneciente a la familia *Aquifoliaceae*, está compuesto por aproximadamente 500 especies vegetales que crecen como árboles o arbustos en climas relativamente húmedos y subtropicales (Heck y De Mejia, 2007).

*Ilex paraguariensis* es conocida como árbol de yerba mate. Es una planta perenne, dióica, originaria de la Selva Subtropical Paranaense, localizada en el corazón de la Cuenca del Plata. Esta consiste en una región de aproximadamente 540.000 Km<sup>2</sup> (Prat Krikum, 2015). Su distribución se restringe al nordeste de Paraguay, a los estados meridionales de Brasil, al nordeste de Argentina y en Uruguay, donde se encuentra únicamente como poblaciones pequeñas aisladas. Es una planta subtropical que requiere altas temperaturas, entre 20–23 °C como promedio anual, conjuntamente, requiere alta humedad de suelo y del ambiente. Su demanda anual de precipitaciones de alrededor de 1500–2000 mm, principalmente de septiembre a febrero. Para su desarrollo requiere de suelos rocosos, arenosos, arcillosos y permeables, ricos en ácido fosfórico, potasio y óxido de hierro, donde el agua no se estanca (Cascales *et al.*, 2014, Prat Krikum, 2015).

Se encontraba distribuida en la selva original formando pequeños grupos de 10 a 20 árboles y arbustos de diferentes edades y alturas de 2,5 a 15 m, con una distribución heterogénea. Puede alcanzar hasta 18 m de altura. Actualmente, la explotación de yerba mate consiste en emplear la población nativa y favorecer el desarrollo de renovales en condiciones óptimas para su mayor aprovechamiento (Prat Krikum, 2015).

### 1.2. Yerba mate elaborada

El Instituto Nacional de Tecnología y Normalización (INTN), es el organismo paraguayo responsable de estipular las normas que se requieren para la venta de los productos alimentarios, dentro de los cuales se sitúa la yerba mate elaborada y compuesta. La norma NP 3500193 define a la yerba mate como el producto formado por las hojas desecadas y ligeramente tostadas, desmenuzadas de *Ilex paraguariensis* A. St Hil (*Aquifoliaceae*), las cuales pueden estar mezcladas o no con fragmentos de ramas jóvenes, pecíolos, pedúnculos florales y semillas de la misma. Dicha norma establece los requisitos que debe cumplir la yerba mate, en cuanto a caracteres organolépticos, morfológicos, anatómicos, físicos,

químicos y microbiológicos; asimismo establece ciertos criterios para el muestreo y las condiciones de almacenamiento, de envasado y de rotulado (Degen *et al.*, 2011).

### **1.2.1. Consumo y uso tradicional de la yerba mate**

El origen del consumo de la yerba mate se encuentra asociada a la tradición guaraní, grupo étnico precolombiano habitante de diferentes zonas de América del Sur (Paraguay, Argentina, Brasil y Uruguay). En estas zonas se manifestó una mezcla cultural entre la población nativa y los colonizadores europeos (españoles y portugueses), naciendo una tradición peculiar del consumo de mate, ligada a la cultura local. En ese entonces surgió el mito guaraní de la asociación entre el consumo del mate y la mejora de la calidad de vida en la vejez (Cardozo Junior y Morand, 2016). La yerba mate es explotada e industrializada para la producción de bebidas tónicas y estimulantes no alcohólicas. Para su consumo, la yerba mate sufre varios procesos de elaboración. El consumo tradicional depende de la temperatura del agua utilizada, el tradicional tereré se bebe con agua fría, mientras que, el mate se bebe con agua caliente, así también el mate cocido o infusión de yerba mate. La demanda de los productos a base de yerba mate ha aumentado en otros países, incluyendo Estados Unidos, Alemania y Siria, y se ha expandido a España, Italia, Australia, Francia, Japón, Corea y Rusia, debido a su sabor, propiedades estimulantes y energizantes (Cardozo Junior y Morand, 2016).

### **1.3. Procesamiento de la yerba mate elaborada**

Para la elaboración de la yerba mate elaborada se requieren una serie de etapas de procesamiento que incluyen, primeramente, la recolección de la materia prima (cosecha), luego la recepción de la muestra, el zapeado, el secado, el canchado, el estacionamiento, y posteriormente, la molienda, y el empaquetamiento o el envasado del producto (Isolabella *et al.*, 2010).

#### **1.3.1. Cosecha**

La cosecha de la yerba mate, denominada zafra, se lleva a cabo por un periodo de aproximadamente seis meses. Inicia entre los meses de abril y mayo y finaliza en el mes de septiembre. Se evita cosechar cuando la planta se halla en la etapa de brotación, floración o fructificación. El cultivo muestra un crecimiento monopodial, con dos ciclos de brotación,

que ocurren en los meses de marzo a mayo y de septiembre a diciembre. El tiempo de mayor brotación se encuentra entre los meses de septiembre a diciembre. Las hojas se encuentran en una etapa de maduración intermedia durante los meses de enero y marzo, es decir, una parte de las hojas han alcanzado su ciclo de crecimiento, mientras que otra parte aun no. En los meses de junio a julio, las hojas alcanzan su ciclo de crecimiento completo, donde se hallan prácticamente maduras (Escalada *et al.*, 2011).

### **1.3.2. Procesamiento primario**

El procesamiento primario consta de tres etapas que incluyen el zapecado, el secado y el canchado (Escalada *et al.*, 2011). Durante la etapa de zapecado, la yerba es sometida a un tratamiento térmico para inactivar las enzimas que se encuentran en las hojas, simultáneamente ocurre una pérdida importante de agua, principalmente en las hojas (Känzig *et al.*, 2015). La etapa siguiente es el secado, que tiene como finalidad la reducción del contenido de humedad de la yerba mate desde 29–34 %, hasta aproximadamente 5 % en base húmeda (Escalada *et al.*, 2011). Seguidamente, se lleva a cabo una molienda gruesa del material, proceso denominado canchado (Känzig *et al.*, 2015).

#### **1.3.2.1. Zapecado**

El zapecado se realiza en el zapecador. Este es un equipo que consiste en un cilindro giratorio a bajas revoluciones (10 rpm), en el cual, las ramas son introducidas por el extremo del cilindro. En este además se produce el quemado de leña, permitiendo que las ramas reciban calor por radiación de la llama. El aire y las ramas se desplazan hacia el extremo opuesto del cilindro en corrientes paralelas. Dicho desplazamiento es producido por una serie de aletas dispuestas de forma discontinua con una ligera inclinación y por el arrastre de los gases de combustión. El flujo de gases es producido por una chimenea situada en el extremo de salida, y es regulado por un deflector ubicado en su interior. Las ramas ingresan con un contenido de humedad de aproximadamente 60 % en base húmeda y salen con un contenido de humedad que varía entre 10–30 %. Los palos pierden muy poca humedad, entre 5–10 %. La temperatura de entrada de los gases se estima entre 400–500 °C y la temperatura de salida es del orden de 120–250 °C. La finalidad de esta etapa es producir la inactivación de enzimas para evitar el pardeamiento durante la etapa de secado. Durante esta etapa, ocurren diversas modificaciones en el material que afectan su estructura física y composición química, las que

posteriormente influirán en gran medida en las etapas del procesamiento y en la calidad del producto final (Känzig et al., 2015).

### **1.3.2.2. Secado**

Las condiciones de trabajo de los establecimientos industriales varían entre sí, como el tipo de secadero utilizado, la temperatura del aire y/o el tiempo de residencia. En la actualidad se utilizan tres tipos de secado, comprenden el secado tipo barbacuá, el secado tipo cinta y el secado rotatorio o tubular. El primero consiste en secar el material durante 6–24 h sobre un lecho de ramas, de 0,8–1,2 m de altura. Son secaderos discontinuos con flujo de gases de combustión de leña y aire, que pasan a través de dicho lecho, con una temperatura que varía entre 60–90 °C. En los secaderos de tipo cinta, el lecho de hojas, que presenta una altura entre 0,7–1 m, es transportado a baja velocidad de un extremo al otro sobre una malla móvil perforada en contacto con aire caliente y gases de combustión de leña. El tiempo de residencia varía entre 2 a 6 h y la temperatura varía entre 80–130 °C. El secadero puede tener una longitud de hasta 30 m por 5 m de ancho. En los secaderos rotatorios, el material se seca en tambores rotatorios con una duración de 10–20 minutos, a temperaturas superiores a los 200 °C. En este tipo de secado, las ramas no toman contacto directo con los gases de combustión sino únicamente con el aire caliente (Escalada *et al.*, 2011).

### **1.3.2.3. Canchado**

Posteriormente al secado, se realiza el canchado, que consiste en la molienda gruesa de las ramas de yerba mate. Este se efectúa con un molino de martillo que tiene una criba de salida. La finalidad de dicha etapa consiste en preparar el material para la etapa de estacionamiento, reduciendo de esta manera el volumen y aumentando la superficie de contacto entre el material y el aire. Además, en esta etapa, se realiza un tamizado con tamices rotatorios con el fin de eliminar los palos de gran tamaño. Posteriormente, la yerba mate canchada es colocada en bolsas de 50 kg las que son guardadas en depósitos para su estacionamiento. El estacionamiento se lleva a cabo en algunos casos en los establecimientos de procesamiento primario, mientras que la mayoría de las veces se lleva a cabo en las empresas molineras (Känzig *et al.*, 2015).

### 1.3.3. Estacionamiento

Durante el estacionamiento, la yerba mate se mantiene almacenada cierto periodo para la adquisición de las características de sabor y de color requeridas por los consumidores. Existen tres tipos: el estacionamiento natural, acelerado o mixto. El estacionamiento natural requiere de un depósito, lugar donde se mantiene el producto entre 6–24 meses. Este no requiere de ningún tipo de control de las condiciones ambientales. Por lo general, estos depósitos son de mampostería, techos de chapa y piso de madera, en los cuales las bolsas de yerba mate canchada son apiladas hasta alturas de 10 m. Las puertas y ventanas deben ser mantenidas cerradas para evitar el ingreso de plagas y polvo. En los días cálidos y secos, estos se abren para airear. Por otra parte, el estacionamiento acelerado requiere de cámaras acondicionadas, en las que la yerba mate es almacenada durante un periodo de hasta 60 días. La temperatura de las cámaras debe encontrarse entre 50–60 °C y con una humedad relativa de hasta el 60 %. Las cámaras se componen de mampostería o chapa, pisos de mampostería o madera y techo de chapa. Deben contar con buena circulación de aire para que el oxígeno, el vapor de agua y el calor alcancen al producto. Esta circulación se realiza con ventiladores. Algunos añaden otros compuestos como anhídrido carbónico, etileno, entre otros. Se emplean además calderas de tipo humotubular para el calentamiento del aire y la incorporación de vapor. El estacionamiento mixto es un sistema en el que se controla únicamente la temperatura del depósito, la cual puede variar entre 40–45 °C. La temperatura de rocío es el sistema que evita las goteras en los depósitos. El estacionamiento es llevado a cabo entre 6–8 meses (Känzig *et al.*, 2015).

### 1.3.4. Molienda

Durante este procedimiento la yerba mate es clasificada, triturada y mezclada, adecuándola al gusto preferido por los consumidores. Las pequeñas yerbateras, por lo general, realizan la molienda de tipo integral, debido a su bajo costo. En esta no se realiza la separación y clasificación de hojas y de palos, sino que estos son triturados en forma conjunta en un molino del tamaño requerido por el industrial. Este sistema no permite controlar el porcentaje de polvo, hojas de distintos tamaños y palos. Las yerbateras más grandes realizan procesamientos más sofisticados. La yerba mate canchada es seleccionada, inspeccionada visualmente y colocada en una tolva de alimentación, en la cual se realiza la mezcla. Posteriormente, se efectúa una trituración gruesa en un molino de martillo (diabete). Las

hojas y los palos son separadas en zarandas rotatorias cilíndricas. Luego, los palos se separan en dos tamaños. Los palos de menor tamaño pasan por un molino cortador de engranajes (molinos picapalos), y los de mayor tamaño son molidos en molinos de estructura más robusta y con cuchillas de diferentes ángulos en los extremos. La molienda de hojas se realiza en un molino, con rotor con peines, que presenta un tamiz de salida, además se emplea otro equipo denominado trapiche para triturar las hojas. La hoja molida es separada en tres fracciones: polvo, hojas de tamaño pequeño y de tamaño grande, las cuales se almacenan en silos diferentes. Posteriormente, se vuelcan en una rosca transportadora que realiza la mezcla (Känzig *et al.*, 2015).

### 1.3.5. Envasado

En los comienzos de la industrialización, los envases consistían en papeles simples. Con el avance de la tecnología se fueron tornando a películas compuestas como bilaminado, trilaminado y *coating*. El laminado cumple una función específica de barrera, soporte, impresión, entre otras. El *coating*, por lo general, es el combinado de papel con polietileno. La función principal del envasado es la barrera al pasaje de humedad, debido a que esta puede influir en los cambios producidos en las características organolépticas, crecimiento bacteriano, deterioro de clorofila y pérdida de vitaminas de la yerba mate (Ramallo y Albani, 2015).

## 1.4. Composición química

La yerba mate presenta una diversidad de componentes, incluyendo nutrientes, minerales y vitaminas hidrosolubles. Se caracteriza por ser rica en fitoquímicos, en particular, polifenoles (ácidos fenólicos, flavonoides, taninos), alcaloides (metilxantinas, incluyendo cafeína, teobromina, teofilina) y terpenos (carotenoides, saponinas) (Cardozo Junior y Morand, 2016).

Los primeros estudios realizados para identificar la cantidad de compuestos presentes en la yerba mate establecieron la existencia de 172 compuestos, siendo 2-butoxietanol (9,5 %) y linalool (7,5 %) los principales componentes. Un estudio más recientes en, el que se analizó las fracciones volátiles del mate, mediante el uso de cromatografía de gases bidimensional acoplado a un espectrómetro de masas cuadrupolar (QMS), identificaron 241 compuestos (Polidoro *et al.*, 2016).

La composición química presente en *Ilex paraguariensis*, difiere según el tipo de material que se analice, como la hoja fresca o la yerba mate elaborada, contenga o no palos y de acuerdo al proceso de elaboración a la que se ha expuesto, debido a que el procesamiento puede alterar a través de reacciones de oxidación o reducción, la composición de las moléculas activas. Otro factor a tener en cuenta es la procedencia de la materia prima, es decir, los factores agronómicos, climáticos y las prácticas culturales, son variables que pueden alterar el contenido de metabolitos presentes en la yerba mate (Del Valle Agüello y Scipioni, 2015).

Se han reportado altos contenidos de saponinas en hojas de yerba mate y en frutas no maduras, siendo diferente el tipo de saponinas presentes en las mismas. El contenido de metilxantinas y polifenoles en hojas de mate es mayor en comparación con los frutos no maduros. Las saponinas de las frutas son más hidrófilas que las presentes en las hojas, además poseen un patrón de glicosilación más elevado, y contienen ácidos oleanólico y ursólico como agliconas, en cambio, las hojas tienen ácido pomólico y acetil ursólico como aglutinonas (Peixoto *et al.*, 2012).

#### **1.4.1. Compuestos polifenólicos**

Los metabolitos secundarios de plantas que presentan en su estructura química al menos un anillo aromático al que se une uno o más grupos hidroxilos son llamados compuestos polifenólicos, los que se clasifican como ácidos fenólicos, flavonoides y taninos (Mercado–Mercado *et al.*, 2013).

Se han identificado alrededor de 8000 compuestos polifenólicos. La mayoría presentan en su estructura tres anillos, dos aromáticos (anillos A y B) y uno heterocíclico oxigenado (anillo C). Los compuestos más sencillos poseen un solo anillo aromático y a medida que aumenta el número de sustituyentes, va aumentando la complejidad de su estructura. Estos compuestos se agrupan en 12 familias (Mercado–Mercado *et al.*, 2013).

Se han detectado 28 compuestos fenólicos diferentes en extractos de yerba mate, la mayoría compuestos por el grupo de ácidos hidoxicinámicos, principalmente derivados de ácidos hidoxicimanoilquínicos (Escalada *et al.*, 2011).

Los niveles de polifenoles en extractos de yerba mate son mayores que los que se encuentran en el té verde y son similares a los encontrados en el vino tinto. Existen factores que pueden afectar la cantidad de polifenoles extraídos de la yerba mate, tal como, el método

de consumo. La preparación de la infusión con agua fría, denominada tereré, ha demostrado la extracción de casi todos los fenoles. Se ha encontrado también que las hojas verdes contienen concentraciones más bajas de compuestos activos, derivados de cafeoil, metilxantinas y flavonoides, en comparación con las hojas sometidas al procesamiento de secado y de almacenado. Los extractos de yerba mate han demostrado ser ricos en ácidos clorogénicos y pobres en catequinas (Burris *et al.*, 2012). Los principales compuestos fenólicos encontrados en los extractos acuosos y etanólicos de yerba mate verde brasileña fueron: ácido cafeico, ácido quínico, cafeoil glucosa, ácido cafeoilquínico, ácido feruloilquínico, ácido dicafeoilquínico y rutina. Luego del tostado se forman otros dos compuestos: ácido cafeoilshikímico y ácido dicafeoilshikímico (Peres *et al.*, 2013)

#### **1.4.1.1. Ácido clorogénico**

Los ácidos cinámicos se encuentran libres en las plantas en muy bajas proporciones. Por lo general, unidos a azúcares, como glicósidos o ésteres. Asimismo, pueden presentarse como ésteres de fenoles con grupo carboxilo o con sustancias emparentadas, como el ácido cafeico, que unido al ácido quínico, mediante una función éster, forma ácido clorogénico (CGA) (Del Valle Agüello y Scipioni, 2015).

El CGA tiene propiedades potencialmente beneficiosas como actividades antioxidantes, hipoglucémicas, antivirales y hepatoprotectoras (Butiuk *et al.*, 2016).

Las sustancias que presentan dos unidades de fenilpropanos, esqueletos de 15 carbonos, con una secuencia de C6–C3–C6, son los llamados flavonoides, derivados del flavano. De acuerdo al grado de oxidación del heterociclo intermedio entre los anillos A y B, se pueden tener flavanonas, flavonas, flavonoles, antocianidinas y catequinas; si no se cierra el esqueleto de C3, se tienen las chalconas. Las estructuras que son del tipo de quercetina y kanferol son las más interesantes desde el punto de vista farmacéutico. Las antocianinas son las más importantes dentro de los pigmentos hidrosolubles. Son glicósidos de antocianidinas y se encuentran acumulados en las vacuolas de las células. Su estructura química, el pH, la concentración, la temperatura, la presencia de oxígeno y de ácido ascórbico, y la actividad de agua de la matriz celular son factores que determinan la estabilidad del pigmento (Del Valle Agüello y Scipioni, 2015).



### 1.4.2. Metilxantinas o alcaloides purínicos metilados

Las xantinas son alcaloides purínicos presentes en diversas plantas. Existen tres tipos en la yerba mate: la cafeína, la teobromina y la teofilina, las cuales aportan a la yerba mate su característico sabor amargo y efecto estimulante. La cafeína se encuentra presente en concentraciones más elevadas, entre 1–2 % del peso seco total, mientras que, la teobromina se halla en cantidades entre 0,3–0,9 %. El contenido de cafeína presente en una taza de infusión de yerba mate es de 78 mg, similar a una taza de café que es de 85 mg. Sin embargo, el consumo de la yerba como mate produce ingestas mayores a 260 mg por porción (Burris *et al.*, 2012a).

Existen diversos factores que pueden alterar el contenido de metilxantinas presente en las hojas de yerba mate, como el suelo, el clima, la época del año, la luminosidad, la edad y la genética de la planta, entre otros. Durante el procesamiento industrial, existe una pérdida de un 20 % de cafeína, siendo el secado, la etapa más destructiva. La yerba mate sapecada presenta un aumento en las concentraciones de metilxantinas y de cafeoilderivados, con respecto a la yerba verde (Bastos *et al.*, 2006; Isolabella *et al.*, 2010; Del Valle Agüello y Scipioni, 2015).

### 1.4.3. Saponinas

Las saponinas son glicósidos vegetales que presentan la capacidad de generar espuma tras la agitación. Poseen una parte lipídica esteroidea o triterpénica y una parte soluble en agua, los compuestos hidrocarbonados (Del Valle Agüello y Scipioni, 2015). Al principio, las saponinas identificadas en la yerba mate incluyeron las metasaponinas 1 a 5. Posteriormente, se hallaron tres saponinas más, metasaponinas 2 a 4. Las hojas de yerba mate presentan un contenido relativamente elevado de saponinas, del 5–10 % del peso seco total. Los beneficios que otorgan las saponinas son: efectos hipocolesterolémico, anticancerígeno, antiparasitario y antiinflamatorio (Burris *et al.*, 2012).

Pueden clasificarse en dos grupos, de acuerdo al esqueleto de la aglicona: a) saponinas esteroidales, halladas en las angiospermas monocotiledóneas; b) saponinas triterpénicas, presentes en las angiospermas dicotiledóneas, son las más comunes. El esqueleto esteroideal presenta 27 carbonos y el triterpénico 30. Se han identificado diversas saponinas en la yerba mate, que pertenecen al grupo de triterpenos, cuyas agliconas son, el ácido ursólico que son los más abundantes y su isómero, el ácido oleanólico. En los frutos, se han detectado

saponinas que no se encuentran en las hojas. Dentro del género *Ilex*, solamente se ha identificado la presencia de derivados del ácido ursólico en *Ilex paraguariensis* (Del Valle Agüello y Scipioni, 2015).

Los compuestos responsables del sabor amargo y de la espuma producida en la yerba mate son las saponinas. Estudios realizados sobre los ácidos ursólico y oleanólico referencian la capacidad hepatoprotectora, antiinflamatoria y antitumoral de esas estructuras (Del Valle Agüello y Scipioni, 2015).

Las propiedades químicas que presentan son de agente espumante. Son empleadas en la industria como aditivo para alimentos y para cosméticos, siendo además potenciales para otras aplicaciones industriales como conservantes y modificadores de sabor (Nunes y Menezes, 2015).

### **1.5. Adulterantes de la yerba mate elaborada**

Es posible encontrar adulterantes de la yerba mate elaborada con otras especies de *Ilex*. Las especies que generalmente son empleadas como adulterantes son: *I. dumosa*, *I. pseudobuxus*, *I. brevicuspis*, *I. theezans*, *I. microdonta* e *I. argentina*. Los estudios han demostrado que, estas especies contienen poca cantidad o no contienen los compuestos característicos de *I. paraguariensis* como lo son la teobromina, teofilina y cafeína. Únicamente se han detectado rastros de cafeína en *I. theezans*, *I. dumosa*, *I. microdonta* e *I. pseudobuxus*. Por otra parte, se detectaron rastros de teobromina en *I. argentina* e *I. microdonta*. En cambio, la teofilina solo se detectó cualitativamente en *I. pseudobuxus*. En el análisis de las variedades de *Ilex*, empleando cromatografía líquida de alta presión (HPLC) y resonancia magnética nuclear (RMN), se han encontrado cafeína y teobromina solamente en *I. paraguariensis*. Todas las especies adulterantes presentan una gran variación en el contenido de saponinas, las cuales aumentan el sabor amargo, muchas de ellas no se han encontrado en *I. paraguariensis* (Heck y De Mejia, 2007).

### **1.6. Influencia de la zona de cultivo y procesamiento de la yerba mate en sus características fisicoquímicas**

Al principio de la comercialización, las hojas de la yerba mate se obtenían exclusivamente de árboles nativos, lo cual, en la actualidad ha sido reemplazado por

monocultivo o por introducción de plantaciones de *I. paraguariensis* en el bosque nativo. La captura de la luz influye en las condiciones de crecimiento. Los cultivos sombreados presentan un sabor más suave comparando con los expuestos directamente al sol (Dartora *et al.*, 2011).

*I. paraguariensis* presenta baja selectividad en sus exigencias nutricionales, mientras que, su composición química puede variar significativamente debido a diversos factores como el tipo de suelo, el clima, la época del año, la edad de la planta y las hojas, el dimorfismo sexual y las características genéticas. En plantas de diferentes procedencias geográficas de Brasil, se han reportado diferencias significativas en el contenido de minerales en las hojas; también se ha informado mayores contenidos de polifenoles y menores contenidos de minerales en extractos de plantas que crecen expuestas al sol (condiciones típicas de yerbales), en comparación a los provenientes de plantas que crecen a la sombra (condiciones típicas de plantas nativas) (Escalada *et al.*, 2011).

Investigadores que han evaluado el efecto de la época de cosecha y de las regiones geográficas en las características fisicoquímicas de la yerba mate de procedencia brasileña, observaron que la época del año influye sobre el contenido de cafeína, siendo este más bajo en los meses de brotación, épocas en las que se produce un mayor crecimiento vegetativo, que corresponde a los meses de septiembre a diciembre; y aumenta a medida que las hojas maduran. Por otra parte, el efecto de la procedencia geográfica brasileña y de las prácticas culturales, yerbales nativos y plantaciones, sobre el contenido de metilxantinas, específicamente sobre la cafeína y teobromina, y sobre los ácidos clorogénicos y cafeico han sido reportados en varios estudios (Streit *et al.*, 2008; Cardozo Junior *et al.*, 2010).

Se producen cambios fisicoquímicos en la yerba mate durante su procesamiento. Estos se relacionan directamente con la calidad y el valor nutritivo del producto comercial, siendo las etapas de zapeado y secado las de mayor incidencia. El contenido total de derivados de cafeoil (ácido clorogénico, ácido cafeico, y ácidos mono y dicafeoilquínicos) en hojas frescas, es de aproximadamente 6 % en peso seco (determinado por HPLC) (Escalada *et al.*, 2011). El contenido de derivados cafeoílicos varía en cada una de las etapas del procesamiento de la yerba mate. De acuerdo con, Isolabella *et al.* (2010), se produce un aumento del contenido de metilxantinas (cafeína y teobromina) luego del zapeado y disminución luego del secado. Estas permanecen constantes durante el estacionamiento. La disminución más significativa de cafeína (alrededor del 20 %) sucede durante la etapa de secado (Schmalko y Alzamora, 2001).

Escalada *et al.* (2011), reportaron que no encontraron efecto en el contenido de polifenoles totales en el origen de la planta (ubicación geográfica o procedencia del material acopiado) ni en el tipo de secado. La época de cosecha influye en el contenido de polifenoles totales, independientemente del origen y el tipo de secado. En el inicio de la zafra, el contenido de polifenoles es 4,5 % mayor que al final de la zafra, lo cual podría producirse debido a la distribución de edades foliares en el material cosechado.

En un estudio realizado por Isolabella *et al.* (2010), en extractos acuosos liofilizados de yerba mate obtenidos por decocción, se investigó, por HPLC, el contenido de compuestos derivados de cafeoil (ácido cafeico, ácido clorogénico y ácido isoclorogénico), metilxantinas y flavonoides en las distintas etapas de su procesamiento industrial. Los resultados demostraron que las hojas verdes contenían una concentración significativamente más baja de estos principios activos en comparación con los extractos obtenidos después de las etapas del procesamiento de la yerba mate. Durante el zapecado, se observó un incremento en el contenido de rutina, cafeína, teobromina y derivados cafeoil, mientras que en el secado estos disminuyeron, a excepción de la rutina que aumentó significativamente en comparación con el zapecado. Durante el estacionamiento el valor se mantuvo. Los niveles de ácido cafeico permanecieron constantes a lo largo del procesamiento. La quercetina y kaempferol se encontraron en bajas concentraciones.

Como se mencionó anteriormente, durante el procesamiento industrial se pueden modificar tanto la composición química como el sabor del producto final. Las etapas de tostado, secado y trituration son las que más afectan. Durante el zapecado, las hojas y ramas son expuestas al fuego del horno para inactivar las enzimas, que causan oxidación del producto. El secado se realiza en dos secaderos, rotatorio y de cinta, en el primero, el humo del fuego hace contacto directo con la materia prima, mientras que, en el segundo no existe contacto, resultando en un daño menor. Para la obtención de yerba mate de color amarillo, esta es almacenada durante seis meses a un año, proporcionando un color y sabor maduro al producto (Zaions *et al.*, 2014). Para la obtención del chimarrão, el procesamiento es distinto, se obtiene por un proceso de escaldado, empleando altas temperaturas, entre 180–240 °C durante 5 minutos, con el objetivo de inactivar las enzimas y mejorar el sabor. Este proceso conduce a alteraciones en ciertos constituyentes químicos, promoviendo reacciones de reordenamiento, de oxidación o de reducción de moléculas bioactivas (Dartora *et al.* 2011).

Según el análisis comparativo realizado por Dartora *et al.* (2011), las hojas cultivadas al sol presentan mayor contenido de derivados de cafeoil, cafeína, teobromina y rutina, en

comparación con los cultivados en la sombra. Las hojas procesadas de chimarrão mostraron una disminución en la concentración de xantinas, mientras que las oxidadas tuvieron una menor concentración de fenólicos, en comparación con las hojas verdes. Sin embargo, las hojas sometidas a escaldado y secado (tipo chimarrão), contenían más compuestos fenólicos.

Se ha demostrado que, la exposición a la luz, el método de secado y la edad de las hojas, influyen en la concentración de los compuestos presentes en la yerba mate. Heck y De Mejia (2007) analizaron los cambios en las concentraciones de cafeína, teobromina, phytol, vitamina E, escualeno y estigmasterol. Los resultados mostraron que las muestras protegidas de la luz presentaron un aumento de las concentraciones de cafeína, teobromina, phytol y estigmasterol esteroide, particularmente la cafeína y la teobromina fueron tres veces más altas. En cuanto a la vitamina E, no presentó variación durante la exposición a la luz. Las hojas más jóvenes mostraron concentraciones más altas de compuestos bioactivos en relación a las hojas adultas. Con respecto al método de secado, el secado por microondas permitió mayor retención de compuestos en comparación con el secado al vacío.

### **1.7. Propiedades biológicas de la yerba mate**

La yerba mate se emplea por su propiedad estimulante del sistema nervioso central, la cual se debe a la presencia de metilxantinas (cafeína y teobromina). Asimismo, se la considera como un alimento funcional, puesto que presenta propiedades nutricionales y medicinales, tales como propiedades hipocolesterolémica, hepatoprotectora, diurética, antioxidante y antimicrobiana. Además, previene la aterosclerosis y la muerte coronaria. Dichos beneficios para la salud se han atribuido a los compuestos fenólicos que esta presenta, los cuales son los principales constituyentes del *Ilex paraguariensis* (Blum-Silva *et al.*, 2015). Varios trabajos de investigación han demostrado científicamente que la yerba mate contiene propiedades que producen efectos farmacológicos importantes, tales como efectos cardioprotectores, inhibición de la proliferación de células cancerosas, y efectos antiobesidad (Negrão-Murakami *et al.*, 2017). Adicionalmente, es capaz de proteger contra el efecto nocivo de los radicales libres, activando de esta manera el sistema inmune del organismo. Esta actividad antioxidante es atribuida principalmente a la presencia de compuestos polifenólicos, que deslocalizan electrones y forman enlaces de hidrógeno intramoleculares. No obstante, estos compuestos, también inhiben las reacciones en cadena y reparan las lesiones causadas por especies reactivas. Debido a ello, se ha sugerido que la ingestión de

mate es una manera efectiva y económica para aumentar las defensas antioxidantes de una persona (Colpo *et al.*, 2016).

La aplicación de la yerba mate como agente antimicrobiano en los alimentos y en la protección de cultivos es un concepto relativamente reciente, que aún no ha sido estudiado y revisado completamente. Se ha comprobado que extractos brutos como el té (infusión) y compuestos derivados de yerba mate, presentan un espectro de inhibición amplio contra bacterias Gram positivas y Gram negativas (Burriss *et al.*, 2012).

### **1.7.1. Propiedades antimicrobianas**

Aun no se han verificado completamente los compuestos responsables de la actividad antimicrobiana que presenta la yerba mate, ni los efectos sinérgicos o antagónicos que puedan tener. Los posibles compuestos que pueden contribuir a la actividad antimicrobiana son los ácidos cafeico y clorogénico, que actúan sobre bacterias Gram negativas; y el kaempferol y la quercetina que son flavonoles capaces de inhibir el crecimiento de *Staphylococcus aureus* (Burriss *et al.*, 2012).

Las investigaciones realizadas sobre el aislamiento y la identificación de compuestos que le confieren actividad antimicrobiana a la yerba mate son relativamente limitadas. Los diez principales compuestos identificados como componentes antimicrobianos potenciales son: linalol,  $\alpha$ -ionona,  $\beta$ -ionona,  $\alpha$ -terpineol, ácido octanoico, geraniol, 1-octanol, nerolidol, geranilactetona y eugenol, que han demostrado ser activos contra un amplio espectro de bacterias tanto Gram positivas como Gram negativas, con niveles efectivos entre 12,5 a 1600  $\mu\text{g/mL}$ . Los compuestos polifenólicos presentes en yerba mate incluyen el ácido cafeico, la cafeína, los derivados de cafeoil, el ácido cafeoilshikímico, el ácido clorogénico, el ácido feruloilquínico, el kaempferol, la quercetina, el ácido quínico, la rutina y la teobromina, los cuales contribuyen a la actividad antimicrobiana contra patógenos transmitidos por alimentos. Por otra parte, los derivados de ácido cafeoilquínico contribuyen a la actividad antimicrobiana en los extractos de plantas crudas (Burriss *et al.*, 2012).

### 1.7.1.1. Actividad antibacteriana

Para la comprensión de la actividad antibacteriana de *I. paraguariensis* contra bacterias Gram positivas se ha tenido en cuenta la pared celular menos compleja que estas presentan con menor contenido lipídico y ausencia de membrana externa comparando con las Gram negativas. Los terpenos presentes en las plantas de este género pueden generar permeabilidad en la membrana plasmática, que resultan en alteración de la membrana lipídica del microorganismo, la cual podría ser la razón por la que presentan esta propiedad antibacteriana (Oliveira *et al.*, 2016).

Varios estudios han demostrado la propiedad antimicrobiana de la yerba mate. Se han evaluado diferentes partes de la planta como hojas y ramas, así como diferentes productos comerciales de yerba mate elaborada y té (infusión), cuyo extractos fueron preparados empleando diferentes métodos y solventes como metanol, etanol, agua, N-metilformamida (DMF), hexano, acetona y dióxido de carbono, frente a diferentes bacterias tanto Gram positivas como Gram negativas (Sari *et al.*, 2007; De Biasi *et al.*, 2009; Girolometto *et al.*, 2009; Rodríguez Vaquero *et al.*, 2010; Burris *et al.*, 2011; Carelli *et al.*, 2011; Prado Martin *et al.* 2013 Rempe *et al.*, 2015; Oliveira *et al.*, 2016).

Estos hallazgos indican que la yerba mate contiene componentes que proporcionan actividad antimicrobiana frente a un amplio espectro de microorganismos Gram positivos y Gram negativos, muchos de ellos, transmitidos por los alimentos y patógenos para el hombre.

### 1.7.1.2. Actividad antifúngica

Existen escasos reportes sobre la actividad antifúngica de la yerba mate. De Biasi *et al.* (2009) reportaron sobre la acción antifúngica de extractos hidroalcohólicos de hojas y tallos de *I. paraguariensis* frente a *Candida albicans*. Asimismo, Filip *et al.* (2010) observaron que, los extractos acuosos de hojas de yerba mate, aunque en muy alta concentración, poseen actividad inhibitoria frente a *Malassezia furfur*, un hongo saprófito considerado agente causal de la pitiriasis versicolor, la caspa y otras dermatitis seborreicas en seres humanos.

Ha sido demostrado que el extracto de *I. paraguariensis* es capaz de inhibir el crecimiento de *Fusarium oxysporum in vitro*. *Fusarium oxysporum* forma parte de una extensa familia de hongos filamentosos de importancia agroindustrial debido a que la mayoría de las especies, son parásitas de las plantas y causantes de patologías muy severas que afectan a diversos cultivos (Falconi *et al.*, 2013).

### **1.7.2. Agentes antimicrobianos**

Un agente antimicrobiano es cualquier agente físico o químico que destruye los microorganismos o inhibe su crecimiento. Se utilizan términos como antibacteriano o antifúngico para denominar la capacidad del agente para inhibir o destruir un grupo específico de organismos (García-García y Palou-García, 2008).

Los agentes antimicrobianos pueden clasificarse según diversos criterios como estructura química, mecanismos de acción, espectro de acción, entre otros. De acuerdo a su mecanismo de acción se clasifican en: inhibidores de síntesis de la pared celular, de síntesis de proteínas, de síntesis de ácidos nucleicos y de la función de la membrana plasmática (Da Costa Borges, 2016).

## **2. EXTRACTOS VEGETALES**

### **2.1. Definición**

De acuerdo con la Farmacopea Argentina (2013), un extracto es una forma farmacéutica líquida, semisólida y plástica o sólida y pulverulenta, preparada con soluciones extractivas, obtenidas por agotamiento de drogas vegetales o animales con disolventes apropiados, que luego se evaporan parcial o totalmente, ajustando el residuo a tipos determinados para cada droga (Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica, 2013).

### **2.2. Tipos de extractos vegetales**

Los extractos pueden clasificarse de acuerdo a la naturaleza del disolvente empleado para su extracción en: acuosos, alcohólicos, hidroalcohólicos y etéreos. Estos disolventes pueden actuar solos, mezclados entre sí en proporciones determinadas, o uno tras otro. En ciertos casos, es posible facilitar la extracción mediante la adición de un ácido, un álcali o glicerina, de acuerdo a las características del principio a disolver (Gaitán y Vassia, 2015).

De acuerdo a su consistencia se clasifican en blandos, firmes, secos y fluidos (Lizcano y Vergara, 2008).

Los extractos blandos presentan una consistencia semisólida y espesa. En ciertas ocasiones, pueden presentar una consistencia menos densa debido a la absorción de la



humedad atmosférica (Lizcano y Vergara, 2008). El solvente de extracción suele ser el agua o mezclas hidroalcohólicas. Estos no son muy utilizados por ser poco estables y de difícil manipulación (Szulepa, 2016).

Los extractos firmes o de consistencia pilular, presentan una característica especial, no deben adherirse a los dedos. Este tipo de extracto presenta una semejanza con la masa de fabricación de píldoras, es sólido, pero plástico. Por desecación entre 105–110 °C, los extractos, pueden perder de 15–20 % de su peso (Gaitán y Vassia, 2015).

Los extractos secos no deben presentar un contenido de humedad mayor a 5 %. Son obtenidos por evaporación del solvente de extracción y desecación del residuo. Presentan una consistencia seca y son fácilmente pulverizables. Contienen una concentración muy alta del o los principio/s activo/s en comparación con la droga original, son bastante estables y de fácil manipulación. El solvente de extracción, por lo general, es alcohol y agua a diferentes concentraciones (Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica, 2013; Szulepa, 2016).

Los extractos fluidos son líquidos que encierran en un mililitro los principios activos contenidos en un gramo de la droga empleada (Gaitán y Vassia, 2015), es decir, son preparados de manera que el peso del extracto corresponde exactamente al peso de la sustancia o droga empleada como medicamento, desecada y pulverizada (Lizcano y Vergara, 2008).

### **2.3. Métodos para la obtención de extractos vegetales**

De acuerdo a la naturaleza química de las sustancias que se encuentran presentes en la planta y el propósito de la investigación existen diferentes tipos de solventes utilizados para la extracción. En caso de evaluar la actividad biológica, la extracción se puede realizar con agua o con solución isotónica (0,9 % de cloruro de sodio), por lo general, se emplean solventes orgánicos de baja reactividad y de bajo punto de ebullición como el alcohol y el acetato de etilo. En ciertas ocasiones, resulta necesario el lavado del material vegetal para desengrasar, para lo cual se utiliza éter de petróleo (extracto etéreo) o hexano. Generalmente, el alcohol es el solvente más eficaz para la recuperación de la mayoría de los metabolitos secundarios. Los extractos son evaporados bajo presión reducida o liofilizados, en caso de que la extracción se realice con agua. Para la extracción de sustancias de baja polaridad como los lípidos, se utilizan solventes como éter de petróleo y cloroformo. Las sustancias de mediana y de alta

polaridad, son extraídas generalmente mediante el empleo de acetato de etilo, etanol y acetona (Lizcano y Vergara, 2008).

Durante la percolación, el solvente atraviesa una columna de la planta pulverizada en estudio, arrastrando durante el proceso, concentraciones crecientes de los principios activos, se realiza en percoladores cilíndricos o cónicos, es posible obtener una extracción completa de principios activos. La maceración es el contacto prolongado durante cierto tiempo de la planta pulverizada con el solvente, constituyendo un conjunto homogéneo (Carrión y García, 2010).

Para la extracción y la purificación de los compuestos beneficiosos presentes en la yerba mate se han empleado varios métodos que pueden ser utilizados en la industria (Heck y De Mejia, 2007). La sonicación facilita la extracción de los compuestos bioactivos del material vegetal debido al uso de ondas de una frecuencia determinada (Rodríguez Riera *et al.*, 2014). Presenta desventajas como la polaridad del disolvente, el tiempo de extracción y la proporción de masa solvente/muestra. Este método requiere el uso de disolventes orgánicos como metanol y hexano, que resultan un problema cuando los extractos se emplearán para el consumo humano (Heck y De Mejia, 2007). Para estudiar la actividad antimicrobiana de la yerba mate, Oliveira *et al.* (2016) obtuvieron sus extractos por baño ultrasónico utilizando una frecuencia de 40 Khz por 20 minutos, posteriormente fueron filtrados y evaporados por liofilización al vacío. Para los ensayos los extractos se disolvieron en dimetilsulfóxido (DMSO). Los disolventes utilizados fueron hexano, metanol y agua.

En los últimos años se han empleado combinaciones de métodos ultrasónicos con otras tecnologías limpias para una mayor eficacia y eficiencia del proceso de extracción, entre ellos se encuentran los fluidos supercríticos y las microondas. La combinación de ultrasonido con microonda proporciona grandes cantidades de energía que se libera a través de los puntos calientes y facilitan la entrada de las radiaciones al material vegetal, rompiendo más fácilmente la pared vegetal y permite la elución de los componentes de interés con mayor rapidez. Por ende, sus ventajas radican en un corto periodo de tiempo de extracción, reducción del consumo de energía del proceso y mejor calidad y cantidad del compuesto de interés en fase líquida (Rodríguez Riera *et al.*, 2014).

Los fluidos supercríticos son sustancias que a una temperatura y presión sobre su punto crítico termodinámico no son líquidas o gaseosas, comparten ambas propiedades. Por tanto, poseen una habilidad única de difusión a través de los sólidos como un gas y de disolver materiales como un líquido. Este método presenta varias ventajas por las propiedades

que presentan los fluidos supercríticos: son totalmente miscibles en gases, generan disolventes de baja viscosidad, sin tensión superficial, inertes y no tóxicos. La utilización de este método para la extracción selectiva de diferentes compuestos resulta de gran interés debido a que se alcanza altas tasas de difusión en el material vegetal y un mejor transporte de masa con distintas presiones, siendo los más utilizados el dióxido de carbono y el agua por su bajo costo (Rodríguez Riera *et al.*, 2014).

Con el método de extracción de CO<sub>2</sub> supercrítico es posible obtener concentraciones más altas de metilxantinas, en comparación con otros métodos de extracción. Asimismo, con este método se ha obtenido cafeína con rendimientos del 98 %. También es posible extraer teobromina. El empleo de etanol ha mejorado la eficiencia de extracción disminuyendo los requerimientos de solvente y energía (Heck y De Mejia, 2007). Carelli *et al.* (2011) obtuvieron extractos de hojas de yerba mate exitosamente empleando este método, en el cual, utilizaron dióxido de carbono como solvente. Para obtener mayor número de constituyentes químicos, las condiciones del extracto fueron establecidas a una temperatura de 40 °C y 250 atm de presión.

Para la evaluación de la actividad antimicrobiana y la determinación del contenido de polifenoles, se emplearon extractos de yerba mate elaborada de origen brasileño (tipo chimarrão), obtenidos por percolación. Se extrajo con disoluciones hidroetanólicas e hidrometanólicas. Posteriormente se filtraron con papel de filtro y se evaporaron empleando un rotavapor a 45 °C (Prado Martin *et al.*, 2013). Este mismo método fue utilizado por Ramirez y Diaz (2007) para obtener extractos de hojas frescas de distintas especies vegetales, las mismas fueron picadas y depositadas en un recipiente con etanol al 97 % a temperatura ambiente. El extracto etanólico obtenido fue concentrado y posteriormente secado en rotavapor a presión reducida.

#### **2.4. Métodos para evaluar la composición química de los extractos vegetales**

Para la determinación de la composición química de plantas medicinales resulta necesario conocer los componentes biológicos activos que estas presentan. Para esto, existen diversas metodologías que van desde análisis fitoquímico preliminar hasta estudios químicos sistemáticos bioguiados, este último, requiere mayor tiempo y recursos para su ejecución, por tanto, resulta ideal iniciar con estudios fitoquímicos preliminares para que, de esta manera resulte más fácil clasificar y seleccionar las plantas que serán estudiadas de acuerdo a su

composición química. El objetivo del estudio fitoquímico preliminar es establecer la presencia o ausencia de los principales grupos de metabolitos en una especie vegetal como los alcaloides, antraquinonas y naftoquinonas, esteroides y triterpenos, flavonoides, taninos, saponinas, cumarinas, lactonas terpénicas y cardiotónicos. Partiendo de los resultados de un análisis fitoquímico resulta posible orientar investigaciones posteriores para determinar la actividad biológica de las especies en estudio y los principios activos involucrados, puesto que cada uno de los grupos estudiados se encuentra relacionado con actividades biológicas específicas (Carvajal Rojas *et al.*, 2009).

El contenido total de polifenoles puede ser evaluado por espectrometría utilizando el reactivo de Folin–Ciocalteu, método conocido por su baja especificidad. Se ha realizado la identificación de estos compuestos utilizando métodos más específicos, como cromatografía líquida – espectrometría de masas (LC–MS), cromatografía líquida ultravioleta – visible (LC–UV/VIS) y cromatografía líquida de alta presión con detector de diodos y espectrometría de masas (HPLC–PDA–MS) (Cardozo Junior y Morand, 2016). Estos compuestos también pueden determinarse por diferentes métodos de separación, por ejemplo, la electroforesis capilar (CE) que es una técnica de separación que se fundamenta en la diferencia de la velocidad de migración de las distintas especies químicas bajo la acción de un campo eléctrico. La separación se realiza en un capilar de sílice fundida de diámetro pequeño (10 a 200  $\mu\text{m}$ ) (Osatinsky, 2007). Sin embargo, la HPLC es la técnica más empleada para determinar compuestos fenólicos en extractos de yerba mate. Esta última presenta ventajas con respecto a la CE, es más reproducible y sensible. Sin embargo, hasta la fecha, las condiciones cromatográficas para la separación de estos compuestos no se han definido de manera estandarizada debido a que la optimización del método requiere mucho tiempo y un gran número de experimentos, lo que no permiten la aplicación estadística adecuada a los datos, comprometiendo de esta manera la fiabilidad de los resultados.

Para la cuantificación de xantinas y compuestos fenólicos se puede emplear tanto HPLC como cromatografía de fase inversa (RPC) (Valduga *et al.*, 2016). Según Bojić *et al.* (2013), la cromatografía en capa fina (TLC) es una técnica apropiada para el análisis e identificación de polifenoles individuales, así como de xantinas. Se ha determinado en dicho estudio que, el contenido de metilxantinas individuales corresponde a las xantinas totales determinadas por espectrofotometría.

Prado Martin *et al.* (2013) determinaron el contenido de polifenoles utilizando el reactivo de Folin–Ciocalteu. Posteriormente, analizaron los extractos hidroalcohólicos

mediante cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (GC–MS). Para purificar las muestras emplearon la técnica de extracción de fase sólida. Los resultados obtenidos se integraron utilizando el software LabSolutions–GCMS y se identificaron los compuestos de interés comparando los datos obtenidos con la biblioteca de Wiley 8.

Por lo tanto, los compuestos fenólicos se separan principalmente empleando HPLC y electroforesis capilar, debido a que se emplean temperaturas de análisis suaves, evitando la degradación de los compuestos. En la cromatografía líquida, los compuestos fenólicos se separan en sistemas de fase inversa. En cuanto a la electroforesis capilar, esta es la de mayor preferencia debido a las ventajas que presenta, como alta eficiencia de separación, bajo costo de reactivo, tiempo corto de análisis y baja producción de residuos, sin embargo, es aún poco empleada en el análisis de compuestos fenólicos en yerba mate (Schaper Bizzotto *et al.*, 2012).

## **2.5. Metodologías para evaluar *in vitro* la actividad antibacteriana de extractos vegetales o compuestos de origen vegetal**

Existen diferentes métodos para evaluar la actividad antimicrobiana *in vitro* de especies vegetales. No se basan en los mismos principios, por ende, los resultados dependen del método empleado, los microorganismos usados y el grado de solubilidad de cada compuesto o extracto evaluado. Algunos métodos son más sensibles que otros. Los cuatro métodos principales para evaluar la actividad antibacteriana son: método de difusión, método de dilución, bioautografía y análisis conductimétrico. Siendo las técnicas de difusión las más empleadas para evaluar extractos de plantas con actividad antimicrobiana. Generalmente, se emplean los métodos de difusión para estudiar compuestos polares y no polares. La concentración de microorganismos estandarizada para el estudio de susceptibilidad es en  $1-2 \times 10^8$  unidades formadoras de colonias (UFC)/mL, equivalente a un patrón de 0,5 en la escala de McFarland. Los medios de cultivo más utilizados son el agar Müeller Hinton (MH) y agar tripticosa soya (ATS), ya que sus componentes facilitan el crecimiento de diferentes cepas bacterianas y mayor difusión de las muestras (Ramirez y Marin, 2009).

### 2.5.1. Métodos de difusión

La prueba de difusión en agar o difusión en placas, es un método físico que consiste en posicionar al microorganismo en estudio contra una sustancia biológicamente activa en un medio de cultivo sólido, relacionando el tamaño de la zona de inhibición de crecimiento del microorganismo frente a la concentración de la sustancia ensayada. Se recomienda una incubación de 35–37 °C para bacterias durante 24–48 h y para hongos de 25–27 °C por 48–72 h (Ostrosky *et al.*, 2008).

La utilización del método se condiciona a microorganismos de crecimiento rápido, siendo estos los aerobios y anaerobios facultativos. La validación se realiza comparando frente a un patrón de referencia (control positivo) la zona del halo de inhibición del crecimiento, incluyendo el diámetro del disco o pocillo (Ostrosky *et al.*, 2008).

Las técnicas de difusión en agar pueden realizarse con discos, cilindros de acero inoxidable o vidrio y con perforación en agar. La técnica de difusión en agar con discos, se basa en el método descrito por Bauer *et al.* (1966) llamado método de Kirby–Bauer. Este relaciona la concentración de una sustancia necesaria para inhibir una cepa bacteriana y el halo de inhibición de crecimiento en la superficie de un medio de cultivo adecuado en el que se ha sembrado homogéneamente la cepa en estudio y sobre el cual se ha depositado un papel de filtro de 6 mm de diámetro conteniendo la sustancia a ensayar. El antimicrobiano se extiende a través del espesor del agar, formándose un gradiente de concentración. La sensibilidad de la cepa dependerá del tamaño del halo de inhibición del crecimiento, cuyo diámetro obtenido dependerá tanto de la sensibilidad del microorganismo como de la carga del disco. Otros factores que pueden afectar son el espesor del agar, el pH, la temperatura, la composición, la capacidad de difusión de la sustancia al medio, la velocidad de duplicación de la bacteria y el tamaño y fase de crecimiento del inóculo (Ramírez y Marin, 2009). Este ensayo de difusión es aceptado por la *Food and Drug Administration* (FDA) y establecido como estándar por la *Clinical Laboratory Standards Institute* (CLSI) (Ostrosky *et al.*, 2008).

En la técnica de cilindros de acero inoxidable, se emplean cilindros de acero inoxidable que contienen el compuesto en estudio. Estos se colocan sobre el medio de cultivo solidificado e inoculado. Por otra parte, la técnica de perforación en agar consiste en remover el medio de cultivo mediante la realización de un orificio con la ayuda de un sacabocados de 6–8 mm de diámetro, en la cual será colocada la sustancia en estudio (Ostrosky *et al.*, 2008).

## 2.5.2. Métodos de dilución

Los métodos de dilución proporcionan resultados cuantitativos (De la Fuente Salcido *et al.*, 2016), pueden realizarse en agar o en caldo. Son empleados para determinar la concentración inhibitoria mínima (CIM) y la concentración bactericida mínima (CBM) (Ramírez y Marin, 2009).

Se considera como CIM a la concentración más baja, expresada en mg/L requerida para inhibir el crecimiento de un microorganismo bajo condiciones específicas *in vitro* en un período de tiempo determinado. Por otra parte, la CBM es la concentración más baja de un agente antimicrobiano, expresado en mg/L, que en condiciones *in vitro* reduce el 99,9 % del número de microorganismos presentes en un medio de cultivo inoculado con un número conocido de bacterias en un determinado período de tiempo. La reducción se expresa como la proporción del inóculo o número de UFC vivas que son incapaces de reproducirse en las condiciones del subcultivo en cierto período de tiempo, y esta proporción se puede expresar gráficamente con las curvas de tiempo de muerte (De la Fuente Salcido *et al.*, 2016).

La técnica de microdilución en caldo resulta útil para determinar CIM en un gran número de muestras, cuya ventaja sobre los métodos de difusión radica en un aumento de la sensibilidad para cantidades pequeñas, lo cual resulta importante cuando se trabaja con productos naturales, y adicionalmente, permite diferenciar entre un efecto bactericida o bacteriostático (Ramírez y Marin, 2009).

Existen diversos factores que pueden afectar y producir variaciones en la determinación de la CIM, entre ellos se encuentran la técnica empleada, el microorganismo y la cepa utilizada, el origen y la época de colecta de la planta en estudio, si los extractos fueron preparados a partir de plantas frescas o secas, y la cantidad de extracto empleado para las pruebas. No existe un método estandarizado para expresar los resultados de las pruebas antimicrobianas de productos naturales (Ostrosky *et al.*, 2008).

### 2.5.2.1. Método de dilución en caldo

Las técnicas en caldo pueden realizarse tanto en tubos como en microplacas (microdilución) que contienen concentraciones crecientes del extracto vegetal al cual posteriormente se le agrega una concentración estandarizada del microorganismo en estudio, (Ramírez y Marin, 2009).

### 2.5.2.2. Método de dilución en agar

En la técnica de dilución en agar, se mezcla el medio de cultivo con diferentes concentraciones del extracto. Posteriormente, se inoculan con el microorganismo en estudio y se incuban durante 24 h. Luego se observa si se produce o no crecimiento del microorganismo. La principal desventaja de este método se basa en la cantidad requerida de muestra a evaluar (Ramírez y Marin, 2009).

### 2.5.3. Factores que intervienen en los métodos

Como se ha mencionado, existen diversos factores capaces de afectar la sensibilidad de los métodos tanto de difusión como de dilución, por lo tanto, resulta necesario conocer las condiciones de ensayo y de estandarización de los mismos para una correcta ejecución. Los aspectos importantes a ser considerados son: medio de cultivo, pH, disponibilidad de oxígeno, inóculo y las condiciones de incubación (Ostrosky *et al.*, 2008).

El medio de cultivo debe ser capaz de proporcionar el crecimiento adecuado de los microorganismos en estudio y no deben contener sustancias antagónicas a la actividad antimicrobiana. El medio de cultivo más empleado es MH. También son utilizados en bacterias ATS y caldo tripticasa de soya (CTS). En cuanto a los hongos, los medios más utilizados son caldo sabouraud dextrosa (CSD) y agar papa dextrosa (APD). Es importante recalcar que el espesor y la uniformidad del agar son esenciales para obtener mejores resultados. En cuando al pH, este debe ser compatible con el crecimiento microbiano, con la actividad y la estabilidad de la sustancia en estudio. El incremento de la acidez del medio puede disminuir la actividad antibacteriana de sustancias como la estreptomicina, y aumenta dicha actividad en sustancias ácidas como la penicilina. Una atmosfera con una elevada concentración de CO<sub>2</sub> puede alterar el pH de la superficie, así también, las condiciones de la disponibilidad de oxígeno pueden afectar en la multiplicación del microorganismo (Ostrosky *et al.*, 2008).

La cantidad del inóculo empleado también puede afectar la susceptibilidad de los agentes antimicrobianos en estudio, es por ello, que se requiere de una estandarización de la cantidad inoculada dependiendo del método utilizado. Para las técnicas de dilución es de 10<sup>4</sup> por "Spot" y para la técnica de difusión en agar, el estándar utilizado es de 1-2x10<sup>8</sup> UFC/mL equivalente a la lectura de 0,5 en la escala de McFarland. Para el método de microdilución se utiliza un inóculo de 5x10<sup>5</sup> UFC/mL en cada pocillo. En cuanto a las condiciones de



incubación, estos deben realizarse a 35–37 °C para el crecimiento de bacterias y 25–27 °C para hongos (Ostrosky *et al.*, 2008).

### 3. BACTERIAS DE IMPORTANCIA EN ALIMENTOS

#### 3.1. *Escherichia coli*

Es un bacilo Gram negativo, anaerobio facultativo, usualmente móvil debido a sus flagelos peritricos, cuyo hábitat es el intestino de animales de sangre caliente. Esta bacteria es utilizada como indicador de posible contaminación fecal y presencia de patógenos en agua y alimentos debido a que se encuentra abundantemente en heces de humanos y animales (Soto Varela *et al.*, 2016).

Es el agente causal más común de algunas infecciones bacterianas como las del tracto urinario, bacteriemia, meningitis neonatal además de neumonía. Algunos de sus tipos como *Escherichia coli* enteropatógena, *Escherichia coli* enterotoxigénica, *Escherichia coli* enteroinvasiva, *Escherichia coli* enterohemorrágica, *Escherichia coli* difusamente adherente y *Escherichia coli* enteroagregativa son importantes patógenos causantes de diarrea (Puig Peña *et al.*, 2011). Las cepas de *Escherichia coli* enteropatógenas se distinguen de las no patógenas por su capacidad de ocasionar graves enfermedades como consecuencia de su información genética para la producción de toxinas, capacidad de adhesión e invasión de células huéspedes, interferencia con el metabolismo celular y destrucción de tejidos (Food and Agriculture Organization (FAO), 2011).

*Escherichia coli* se transmite a través de contaminación fecal de los alimentos y agua, también puede ocurrir contaminación cruzada o por contacto humano durante el preparado de los alimentos. La principal vía de exposición son alimentos contaminados como carne molida o mal cocida, leche cruda y productos frescos. Los factores que influyen son: el control inadecuado de los parámetros de procesamiento como temperatura de cocción, pH, actividad de agua y almacenamiento a altas temperaturas que permiten el crecimiento bacteriano (Food and Agriculture Organization (FAO), 2011).

### **3.2. *Salmonella* spp.**

Es un bacilo Gram negativo, no esporulado y móvil, a excepción de los serotipos *Salmonella gallinarum* y *Salmonella pullorum*, que no poseen esta última característica. Pertenecen a la familia *Enterobacteriaceae* tribu *Salmonellae*. La *Salmonella enteritidis*, incluye las subespecies I, II, IIIa, IIIb, IV y VI (Soto Varela *et al.*, 2016).

Las bacterias de este género tienen un gran impacto en la salud pública debido a que son capaces de producir enfermedades como gastroenteritis, fiebre tifoidea, bacteremia e infecciones localizadas como meningitis y osteomielitis. La manifestación clínica depende de la susceptibilidad del huésped y de la capacidad patogénica de la bacteria (Riveros y Ochoa, 2015). Las salmonellas no tifoideas, principalmente los serotipos de *Salmonella enteritidis*, subespecie entérica, son las que se relacionan con gastroenteritis de origen alimentario. Se han detectado principalmente en alimentos como carne de pollo, de cerdo, de pavo, productos con carne cruda, huevos y jamón de cerdo. Actualmente, este patógeno resulta preocupante debido al aumento de su resistencia a los antibióticos (Soto Varela *et al.*, 2016).

### **3.3. *Pseudomonas aeruginosa***

Es un bacilo Gram negativo, oxidasa positiva, capaz de crecer a temperaturas superiores a 42 °C. Presenta un característico color verde brillante, debido a la producción de pigmentos piocianina, de color azul y pioverdina, de color amarillo, que en combinación le dan dicho color. Es un patógeno oportunista, responsable de infecciones, principalmente nosocomiales (Roca y Ángel, 2014).

Es intrínsecamente resistente a diversas clases de antibióticos, que no guardan relación entre sí, debido a la reducción de la permeabilidad de su membrana externa, a la expresión constitutiva de varias bombas de expulsión y a la producción de enzimas que inactivan a los antibióticos. Así también, posee la capacidad de adquirir nuevos mecanismos de resistencia vía mutaciones. Los factores de virulencia implicados en la patogénesis son multifactoriales, incluyen, flagelo, fimbrias (pili), matriz exopolisacárida, toxinas, exoenzimas y biopelículas (Roca y Ángel, 2014).

### 3.4. *Staphylococcus spp.*

En el género *Staphylococcus* se conocen 35 especies y 17 subespecies. Son cocos Gram positivos, cuyo diámetro oscila entre 0,5–1,5  $\mu\text{m}$ . Se dividen en agrupaciones semejantes a racimos de uva (Zendejas Manzo *et al.*, 2014).

El *Staphylococcus aureus* presenta un amplio grado de diseminación debido a que pertenece a la flora comensal del cuerpo humano, por tanto, los portadores juegan un papel esencial en la transmisión del patógeno. Es el principal causante de infecciones en el torrente circulatorio y agente causal de intoxicaciones ocasionadas por alimentos. La patogenicidad de las infecciones causadas por esta especie se encuentra relacionada con diversos componentes de su superficie bacteriana, estos componentes son peptidoglicanos y ácidos teicoicos, además de proteína A. La patogenia se produce cuando se combinan los factores de virulencia con la disminución de las defensas del huésped. Este patógeno ha desarrollado resistencia contra los antibióticos, siendo cada vez más difícil el tratamiento de las enfermedades ocasionadas por este. En cuanto a las enfermedades transmitidas por alimentos, estas son causadas por diversas acciones, incluyendo la capacidad del patógeno de producir toxinas. Las infecciones ocurren por la ingesta de alimentos contaminados con las toxinas, las cuales se pueden encontrar presentes en leche, agua potable, aguas residuales, y alimentos preparados o en los equipos de elaboración de los mismos (Zendejas Manzo *et al.*, 2014).

La contaminación de alimentos por lo general se debe al contacto del alimento con los manipuladores de la producción (contacto directo). No obstante, las enfermedades entéricas no solo se contagian de esta manera, sino que la gravedad se evidencia al considerar que los agentes patógenos potenciales se encuentran en diversos ambientes, incluyendo ambientes con presión osmótica elevada y humedad reducida. Además, la contaminación del alimento puede ser endógena o, puede ser producida en algún punto de su transformación (Zendejas Manzo *et al.*, 2014).

La mayoría de las intoxicaciones alimentarias son causadas por *Staphylococcus aureus* coagulasa positiva, debido a que muy pocas cepas coagulasa negativa son capaces de producir enterotoxinas (intoxicación alimentaria estafilocócica, IAE). Las enterotoxinas del estafilococo son una de las pocas toxinas de naturaleza proteica termorresistente. Diversos alimentos son capaces de albergar estafilococos, siendo los más susceptibles aquellos que pueden entrar en contacto con la piel del animal, como la leche y el huevo; y productos cárnicos como jamón, carne de pollo, chorizo, entre otros. Varios factores influyen en el

desarrollo de estas bacterias, uno de ellos es la temperatura inadecuada a la que pueden ser expuestos los productos o durante el almacenamiento de las materias primas de elaboración, como también ciertas características fisicoquímicas como el pH, el grado de humedad o la tensión atmosférica (Zendejas Manzo *et al.*, 2014).

En la Tabla 1 se presentan los principales microorganismos causantes de enfermedades transmitidas por alimentos.

**Tabla 1.** Principales microorganismos causantes de enfermedades transmitidas por alimentos en base a la severidad de la enfermedad o por el número de casos que produce.

<b>Microorganismo patógeno</b>	<b>Efecto y origen</b>
<i>Campylobacter jejuni</i>	Causa más común de diarrea. Origen: carnes y pollos crudos o mal cocidos, leche cruda y agua sin tratamiento.
<i>Clostridium botulinum</i>	Produce el botulismo, que es caracterizado por parálisis muscular. Origen: alimentos preparados en el hogar y aceite de hierbas
<i>Escherichia coli</i> O157:H7	Puede producir una toxina mortal. Origen: carnes mal cocidas, leche cruda y productos agrícolas.
<i>Listeria monocytogenes</i>	Causa listeriosis. Origen: suelo y agua. Se ha encontrado en productos lácteos, carne cruda y mal cocida, en pollos y productos del mar frescos o en conserva.
<i>Salmonella spp.</i>	Es la segunda causa más común de enfermedades transmitidas por alimentos. Es responsable de millones de casos al año de enfermedades transmitidas por alimentos. Origen: huevos crudos y mal cocidos, pollo y carnes mal cocidas, productos lácteos, mariscos, frutas y vegetales.
<i>Staphylococcus aureus</i>	Produce una toxina que causa vómitos al poco tiempo de ser ingerida. Origen: alimentos cocidos con alto contenido en proteínas (jamón cocido, ensaladas, pasteles, lácteos).
<i>Shigella spp.</i>	Ocasiona alrededor de 300.000 casos de enfermedades diarreicas. La falta de higiene hace que <i>Shigella spp.</i> sea fácilmente transmitida de persona a persona. Origen: ensaladas, leche, productos lácteos y agua sucia.
<i>Vibrio vulnificus</i>	Causa gastroenteritis (síndrome de septicemia primaria). Las personas con enfermedades en el hígado son de alto riesgo. Origen: mariscos crudos o mal cocidos.

---

<i>Yersinia enterocolitica</i>	Causa yersiniosis, una enfermedad caracterizada por diarrea y/o vómitos. Origen: cerdo, productos lácteos y agrícolas.
<i>Toxoplasma gondii</i>	Parásito que causa toxoplasmosis, una enfermedad muy severa que puede producir desórdenes del sistema nervioso central, particularmente retardo mental y deterioro visual en niños. Origen: carnes, principalmente de cerdo.

---

**Fuente:** Inocuidad y bioconservación de alimentos (De la Fuente Salcido y Barboza Corona, 2010).

#### 4. AGENTES ANTIMICROBIANOS USADOS EN LA CONSERVACIÓN DE ALIMENTOS

El empleo de antimicrobianos es una práctica común en la industria de los alimentos para extender la vida útil de los productos alimenticios. Durante muchos años se han utilizado antimicrobianos sintetizados químicamente. En los últimos años, se ha producido el rechazo de estos químicos por parte de los consumidores, por ello, la industria alimentaria busca reducir los aditivos químicos convencionales a través de propiedades conservantes que presentan las plantas (Rodríguez Saucedo, 2011; Aguilar González y López Malo, 2013).

Los antimicrobianos naturales se obtienen principalmente de hierbas, plantas y especias. Lo que resulta más difícil es la extracción, la purificación, la estabilización y la incorporación del antimicrobiano al alimento sin afectar sus características sensoriales y nutritivas y su garantía sanitaria (Rodríguez Saucedo, 2011).

Por lo general, la propiedad antimicrobiana que presentan los materiales vegetales se atribuye a la presencia de ciertos compuestos. Así también, se ha observado que la presencia de grasa, proteína, concentración de sal, pH y temperatura pueden afectar la actividad antimicrobiana de estos productos naturales. La mayoría de los antimicrobianos alimentarios son bacteriostáticos, es decir, impiden el desarrollo de gérmenes, o fungistáticos, en vez de bactericidas o fungicidas, que son los sistemas de conservación que destruyen los gérmenes, por ende, la efectividad sobre los alimentos resulta ser limitada. Algunos microorganismos pueden no ser inhibidos o destruidos por las dosis convencionales de antimicrobianos utilizados individualmente, por tanto, para ampliar el espectro de cobertura puede ser preferible utilizar una combinación de ellos (Rodríguez Saucedo, 2011).

Los antimicrobianos pueden tener al menos tres tipos de acción sobre los microorganismos: inhibición de la biosíntesis de los ácidos nucleicos o de la pared celular,

daño a la integridad de las membranas e interferencia con la gran variedad de procesos metabólicos esenciales. Algunos son capaces presentar un amplio espectro de inhibición, es decir, de afectar a muchos tipos de microorganismos, mientras que otros muestran un espectro de acción inhibitor más reducido (Rodríguez Saucedo, 2011).

Para que un agente antimicrobiano pueda ser empleado como aditivo de conservante en un alimento debe realizarse un balance entre los riesgos y beneficios, de manera que los aditivos benéficos sean los que tengan o cumplan con varias de las funciones en los alimentos (Rodríguez Saucedo, 2011).

Para la aplicación de los antimicrobianos de origen natural se requiere comprobar su eficacia *in vitro* (pruebas *in vitro*), en medios microbiológicos y en productos alimenticios (pruebas de aplicación). Las pruebas *in vitro* proporcionan información valiosa acerca de la efectividad de un compuesto. En las pruebas de aplicación, también denominadas métodos de barrido, pueden incluir cualquier prueba en la que el compuesto no se aplica de manera directa al sistema alimenticio, generalmente, este tipo de pruebas proveen información preliminar para determinar la eficacia del compuesto. Las pruebas *in vitro*, incluyen pruebas en las que el agente antimicrobiano se aplica directamente al producto. Para poder aplicar cualquiera de estos métodos resulta de suma importancia controlar los factores que puedan intervenir en la respuesta del microorganismo (temperatura, pH, actividad de agua, nutrientes), siendo el microorganismo en sí uno de los factores más importantes, ya que dependen del tipo, género, especie y cepa del organismo en estudio, así también, el tipo de pared celular resulta ser un factor importante a considerar. (Rodríguez Saucedo, 2011).

#### **4.1. Aplicación de extractos de yerba mate en productos alimenticios**

En la industria alimentaria, el empleo de extracto de yerba mate se ha explorado para la protección de la oxidación de lípidos y la rancidez, debido a la presencia de compuestos fenólicos en la yerba mate (Racanizzi *et al.*, 2009). Si bien existen pocos estudios que han evaluado la posible utilización del extracto de *I. paraguariensis* para su uso como conservante de alimentos, no se han registrado estudios de aplicación de los mismos, por lo general, se basan en pruebas *in vitro*. Las investigaciones son limitadas en cuanto a su eficacia como antimicrobiano y su capacidad para conservar alimentos y bebidas (Burris *et al.*, 2012).

Un factor negativo común asociado al uso de extractos de plantas como conservante de alimentos es su efecto sobre las propiedades sensoriales de los productos alimenticios. El

sabor de la yerba mate ha sido descrito como amargo, ácido, astringente, heno, verde, húmedo y tostado (Burriss *et al.*, 2012). Sin embargo, en el estudio realizado por Racanicci *et al.* (2009), el uso de extractos secos y acuosos de yerba mate no tuvo efecto sobre el sabor u olor de las albóndigas de carne de pollo precocidas, lo que indica su posible aceptación sensorial en los productos alimenticios. Sin embargo, no se han realizado pruebas de aceptación sensorial del uso de yerba mate como antimicrobiano (Burriss *et al.*, 2012).

Lima *et al.* (2012) desarrollaron una bebida fermentada innovadora, no láctea, funcional, probiótica, utilizando extracto de hojas y tallos tostados, molidos y tamizados de yerba mate comercial. La bebida formulada mantuvo la estabilidad microbiana durante la vida útil del producto. El análisis sensorial demostró que la bebida tuvo buena aceptación por parte del consumidor.

En un estudio realizado por Beal *et al.* (2011), evaluaron los efectos de la adición de extracto seco de hojas de yerba mate en la estabilidad oxidativa (lípidos y proteínas), características microbiológicas (bacterias lácticas y *micrococcaceas*) y atributos sensoriales de las formulaciones de embutidos de tipo italiano. Las diferentes formulaciones de salchichas de tipo italiano probadas en el trabajo estuvieron de acuerdo con la legislación en términos de parámetros químicos y microbiológicos. Las características sensoriales de sabor, textura y aceptación global no se vieron afectadas por la adición de extracto de yerba mate en comparación con la formulación con antioxidante artificial.

Faion *et al.* (2015) evaluaron los efectos de la adición de extracto seco de té de hojas de yerba mate (*I. paraguariensis*) sobre las características químicas, microbiológicas y sensoriales del queso prato. Para ello, prepararon seis formulaciones diferentes. La formulación de queso conteniendo 0,1 % en peso del extracto de té de hojas de yerba mate presentó aceptabilidad de aproximadamente un 80 % luego de 30 días de maduración. La evaluación sensorial mostró que solo la formulación a la que se añadió el cultivo de *Lactococcus lactis spp., lactis* y *ceremoris* y el 0,2 % en peso del extracto presentó valores más bajos para los atributos de aceptación global, textura y sabor, en comparación con el control. Las formulaciones añadidas de extracto de té presentaron sabor residual amargo después de 45 días.

# **CAPÍTULO II**

**MATERIALES Y MÉTODOS**



## MATERIALES Y MÉTODOS

Para el estudio de la actividad antibacteriana *in vitro*, previamente se obtuvieron los extractos hidroalcohólicos secos de yerba mate elaborada procedente de Paraguay utilizando como solvente soluciones hidroetanólicas e hidrometanólicas en proporciones 70:30 y 60:40. Posteriormente, se procedió a ensayar la actividad antibacteriana de los extractos secos obtenidos frente a bacilos Gram negativos: *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella enteritidis* cepa salvaje y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 y cocos Gram positivos: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y cepa salvaje, empleando los métodos de difusión con discos y de difusión por pocillos. Seguidamente, se procedió a determinar la CIM utilizando el método de microdilución en caldo y la CBM por el método en placa. Luego se realizó un análisis fitoquímico preliminar de los extractos secos que presentaron actividad antimicrobiana. Se cuantificó el contenido de polifenoles totales en todos los extractos.

Las actividades prácticas de obtención de los extractos secos y determinación del contenido de polifenoles totales se llevaron a cabo en el laboratorio de la Fundación para el Desarrollo e Investigación Científica y Tecnológica (DINCYT), mientras que los ensayos de actividad antibacteriana y estudio fitoquímico preliminar de los extractos fueron realizados en el laboratorio 101 de Microbiología del módulo de Bioquímica y Farmacia, de la Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales de la Universidad Nacional de Misiones, ambos laboratorios en la ciudad de Posadas, Misiones, Argentina.

### 1. Materiales

#### 1.1. Muestra

Se trabajó con muestras de yerba mate elaborada procedente de Paraguay. Las muestras de yerba mate fueron obtenidas de locales comerciales de la ciudad de Encarnación, Itapúa Paraguay. Se utilizaron 5 marcas comerciales de yerba mate elaborada envasadas en sus paquetes tradicionales de 1 Kg, procedentes de establecimientos yerbateros ubicados en el Departamento de Itapúa, Paraguay.

## 1.2. Microorganismos

- *Escherichia coli* ATCC 25922
- *Salmonella enteritidis* cepa salvaje
- *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853
- *Staphylococcus aureus* cepa salvaje y ATCC 25923

## 1.3. Antibióticos controles

- Monodiscos de ampicilina (10 µg) y ceftazidima (30 µg), Bio-Rad
- Monodiscos de imipenem (10 µg), Britania Lab
- Cefotaxima, Laboratorios Lasca

## 1.4. Materiales de Laboratorio

- Frascos de vidrio de 2 L
- Vasos de precipitado
- Probetas graduadas: 1000 mL, 500 mL, 100 mL
- Matraz Erlenmeyer
- Matraz Kitasato
- Embudo de Büchner
- Papel de filtro Whatman cualitativo N° 3
- Placas de Petri
- Tubos de ensayo
- Pipetas
- Micropipetas
- Tips
- Hisopos estériles
- Pesafiltros
- Tamiz malla N° 40 de 420 µ
- Saca bocados de 6 mm
- Microplacas estériles de 96 pocillos

### 1.5. Reactivos

- Metanol de grado analítico, Biopack
- Etanol 96 %
- Reactivo de Folin-Ciocalteu, Anedra
- Reactivo de Carbonato, Sigma-Aldrich
- Ácido gálico monohidratado, MP Biomedicals
- Acetonitrilo grado HPLC, Sintorgan
- Agar Mueller Hinton, Britania Lab
- Caldo nutritivo, Britania Lab
- Agar nutritivo, Britania Lab
- Resazurina, Sigma-Aldrich
- Carbonato de Sodio, Sigma-Aldrich
- Cloruro Férrico
- Yoduro de Potasio
- Yodo
- Cloruro de Mercurio

### 1.6. Equipos

- Estufa de secado a 100 °C, DALVO Instrumentos Modelo B.H.R/I
- Estufa de secado a 40 – 45 °C, ST automática
- Estufa de cultivo a 37 °C, IONOMEX
- Sonicador ultrasónico UC 150
- Rotavapor SENCO modelo R206B
- Agitador mecánico Vortex
- Molino modelo FW 100
- Balanza analítica, Sartorius
- Balanza analítica, OHAUS Scout Pro.
- Baño maría
- Espectrofotómetro, Spectrum SP-2100
- Autoclave tipo Chamberland VZ, carga superior, alimentación a gas

## 2. Métodos

### 2.1. Obtención de los extractos hidroalcohólicos secos

#### 2.1.1. Molienda de la muestra

Para la preparación de los extractos, se utilizó yerba mate molida. Para ello, se pesaron 500 g de cada una de las cinco marcas comerciales seleccionadas de yerba mate elaborada, obteniendo un total de 2.500 g. La muestra se homogeneizó y posteriormente se molió utilizando un molino modelo FW 100. Luego se tamizó utilizando un tamiz de malla N° 40 con apertura de 420 micras (Figura 1).



**Figura 1:** Tamiz de malla N° 40 con apertura de 420  $\mu$ . Molino modelo FW 100.

**Fuente:** Propia.

#### 2.1.2. Determinación del contenido de humedad (agua) de la yerba mate molida

Para determinar el contenido de humedad de la yerba mate se utilizó el método descrito en la Farmacopea Brasileña (2010) hasta pesada constante en estufa de aire de convección natural a  $100 \pm 2$  °C empleando 2 a 3 g de yerba mate molida. Los ensayos se realizaron por duplicado.

Se determinó el contenido de humedad porcentual mediante el empleo de la siguiente ecuación:

$$\% H = \frac{W1 - W2}{W1} \times 100$$

Donde:

% H: porcentaje de humedad

$W_1$ : peso de la muestra húmeda

$W_2$ : peso de la muestra seca

### 2.1.3. Preparación del extracto fluido

En la preparación del extracto fluido, se utilizó la combinación de dos métodos: de maceración y sonicación. Se utilizaron como solventes de extracción metanol y etanol en proporciones 60:40 y 70:30 (alcohol:agua). Los solventes se emplearon en una relación 1:5 (muestra:solvente de extracción). Se prepararon 4 extractos, de acuerdo a un diseño factorial completo  $2^2$  (Tabla 2), con el objeto de evaluar la influencia de los factores tipo de solvente y proporción hidroalcohólica en las determinaciones realizadas.

**Tabla 2.** Factores y niveles utilizados para el análisis factorial completo.

	<b>Factores</b>	<b>Nivel Superior</b>	<b>Nivel Inferior</b>
<b>A</b>	Solvente	Etanol	Metanol
<b>B</b>	Proporción	70:30	60:40

Para la maceración se colocaron 300 g (base seca) de yerba mate molida y tamizada en un recipiente adecuado, se adicionó el solvente de extracción y se homogeneizó. Para la preparación de los extractos en la proporción de solvente 60:40 se utilizaron 470 mL de agua destilada y 720 mL de alcohol y para la proporción de solvente 70:30 se emplearon 840 mL de alcohol y 360 mL de agua destilada. Los recipientes fueron llevados a estufa a 40 °C durante 24 h. En la Tabla 3 se detallan los extractos preparados.

**Tabla 3.** Extractos hidroalcohólicos preparados a partir de yerba mate elaborada.

<b>Extracto</b>	<b>Solvente</b>	<b>Proporción (alcohol:agua)</b>
<b>1</b>	Metanol	60:40
<b>2</b>	Etanol	60:40
<b>3</b>	Metanol	70:30
<b>4</b>	Etanol	70:30

Luego se llevó al macerado a un equipo sonicador modelo UC 150 con una frecuencia de 50 Hz y una potencia ultrasónica de 150 W con el fin de favorecer la extracción (Figura 2). Los extractos fueron sometidos a las ondas de ultrasonido en tres ciclos de media hora con intervalos de 10 minutos.

Posteriormente, se filtraron dos veces todos los extractos por el método de filtración al vacío utilizando embudo de Büchner con papel Whatman cualitativo N° 3 (Figura 3).



**Figura 2.** Sonicador modelo UC 150.

**Fuente:** Propia.



**Figura 3.** Filtración al vacío.

**Fuente:** Propia.

#### 2.1.4. Determinación del rendimiento de los extractos

El rendimiento de los extractos se determinó después del filtrado. Se colocaron 10 mL de los extractos obtenidos en pesafiltros previamente secados y tarados. Se llevaron a estufa de aire a convección natural a 40–50 °C por aproximadamente 48 h hasta pesada constante. Las determinaciones se realizaron por triplicado. Se calculó el rendimiento porcentual de cada extracto (% R) utilizando la siguiente ecuación (Carrillo *et al.*, 2011).

$$\% R = \frac{\text{Peso extracto seco}}{\text{Peso muestra seca}} \times 100$$

#### 2.1.5. Evaporación de los extractos hidroalcohólicos

Para concentrar los extractos y disminuir el tiempo de secado, se procedió a evaporar los solventes utilizando un rotavapor SENCO modelo R 206B, a 50 °C, con velocidad de rotación de 90 rpm y presión negativa de acuerdo a Farmacopea Argentina (2013) (Figura 4).



**Figura 4.** Rotavapor SENCO modelo R 206B.

**Fuente:** Propia.

#### 2.1.6. Secado de los extractos hidroalcohólicos

Los extractos concentrados obtenidos luego de la evaporación, se colocaron en placas de Petri y se secaron en estufa a  $50 \pm 2$  °C (DALVO instrumentos Modelo M.C.I/2) hasta obtención de un extracto seco. Luego con la ayuda de una espátula, se retiró todo el extracto seco que quedó adherido en las paredes de las placas de Petri, obteniéndose de esta manera un polvo fino y seco. Los extractos secos obtenidos se almacenaron en heladera en frascos color caramelo previamente esterilizados.

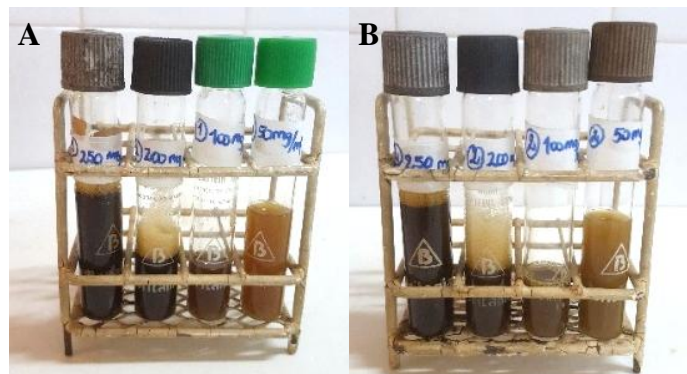
### 2.1.7. Determinación del contenido de humedad (agua) de los extractos hidroalcohólicos secos

La determinación del contenido de humedad de los extractos hidroalcohólicos secos obtenidos se realizaron por duplicado siguiendo la metodología descrita en el punto 2.1.2.

## 2.2. Ensayos de la actividad antimicrobiana de los extractos hidroalcohólicos secos de yerba mate por los métodos de difusión con discos y de difusión por pocillos

### 2.2.1. Preparación de las soluciones de trabajo de los extractos secos

Con los 4 extractos secos obtenidos, se realizaron las soluciones de trabajo (ST). Estas se prepararon disolviendo el extracto seco en 9 mL de agua destilada estéril y 1 mL del solvente de extracción utilizado en la preparación de cada extracto, como codisolvente. Se trabajaron con cuatro concentraciones diferentes de ST para cada extracto: 250 mg/mL, 200 mg/mL, 100 mg/mL y 50 mg/mL (Figura 5).



**Figura 5.** Soluciones de trabajo de los extractos obtenidos.

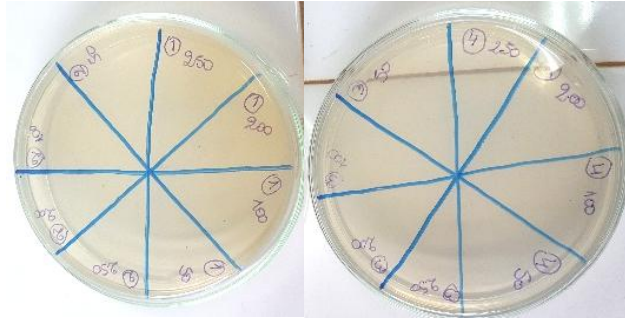
**Referencias:** A = extracto 1; B = extracto 2.

**Fuente:** Propia.

### 2.2.2. Evaluación de la contaminación de los extractos

Para la evaluación de la ausencia de contaminación de los extractos se sembraron las ST preparadas en placas de Petri conteniendo medio de cultivo agar MH y se incubaron en estufa a  $35 \pm 2$  °C durante 24 h. Esta experiencia se realizó por duplicado (Figura 6).





**Figura 6.** Evaluación de la contaminación de los extractos en agar Müller Hinton.

**Fuente:** Propia.

### 2.2.3. Preparación de los discos de papel de filtro

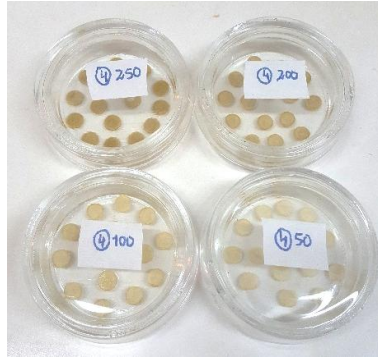
Los discos fueron efectuados utilizando papel de filtro Whatman N° 3, empleando una perforadora de 6 mm de diámetro, posteriormente fueron esterilizados en autoclave.

A continuación, los discos de papel fueron cargados con 40  $\mu$ L de las diferentes concentraciones de las ST de los extractos secos de yerba mate (Tabla 4) (Figura 7). Dicho proceso se realizó en etapas, cargando un volumen de 10  $\mu$ L/día durante cuatro días, utilizando una micropipeta. Cada carga se llevó a cabo en un lapso de 24 h para lograr que se absorba adecuadamente el volumen de extracto cargado en los discos de papel. Luego de cada carga se secaron los discos en estufa a 37 °C.

**Tabla 4.** Concentraciones de la solución de los extractos secos de yerba mate cargados en los discos de papel de filtro y cantidades de los extractos secos por disco.

Concentración del extracto (mg/mL)	Volumen cargado ( $\mu$ L)	Cantidad de extracto en el disco (mg)
50	40	2
100	40	4
200	40	8
250	40	10

**Fuente:** Propia.



**Figura 7.** Discos de papel de filtro Whatman cargados con 40  $\mu$ L de diferentes concentraciones del extracto 4 obtenido.

**Fuente:** Propia.

#### 2.2.4. Ensayos de los métodos de difusión con disco y de difusión por pocillos

Para el estudio de la actividad antimicrobiana de los extractos se empleó el método de difusión con discos, estandarizado por la CLSI (Documento M02-A12), y el método de difusión por pocillos (Prado Martin *et al.*, 2013). Para ambos métodos, se empleó el medio de cultivo MH. Las cepas estudiadas fueron las siguientes: *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella enteritidis* cepa salvaje, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 y *Staphylococcus aureus* cepa salvaje y ATCC 25923.

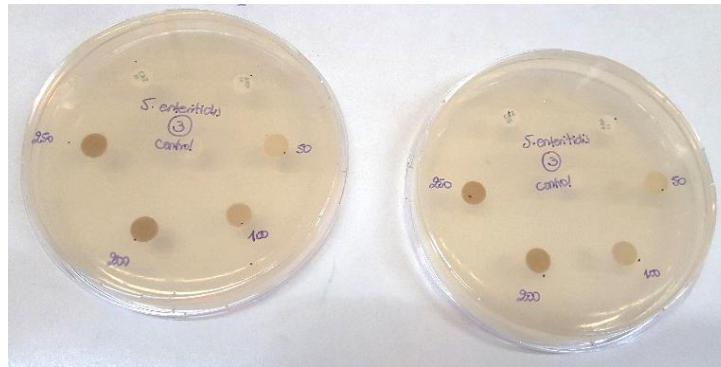
##### 2.2.4.1. Preparación del inóculo

La preparación del inóculo se realizó a partir del cultivo de las bacterias en estudio de 18 a 24 h de incubación a  $35 \pm 2$  °C, en agar nutritivo. Se tomaron 4 a 5 colonias aisladas y de igual morfología, con un ansa y se realizó una suspensión en 5 mL de solución fisiológica estéril, hasta obtener una turbidez equivalente al patrón 0,5 de la escala de McFarland, que corresponde a una concentración bacteriana de aproximadamente  $1-2 \times 10^8$  UFC/mL.

##### 2.2.4.2. Siembra

Para la siembra de las placas se empleó el método de siembra en superficie utilizando un hisopo de algodón estéril que fue sumergido en la suspensión del inóculo preparado, y se distribuyó uniformemente sobre la superficie del agar en las placas. Los ensayos se realizaron por duplicado.

**Para el método de difusión con discos** se colocaron sobre la superficie del agar inoculado los discos cargados con las diferentes concentraciones de los extractos y los controles. Para ello, se empleó una pinza estéril y se cuidó que tengan buen contacto con la superficie del agar. Se respetó las distancias entre discos y la pared de las placas para evitar que las zonas de inhibición se superpongan o se extiendan hasta el margen de la placa. Como control negativo se emplearon discos cargados con 40  $\mu$ L del solvente utilizado para la preparación de la ST (1 mL de la solución de alcohol:agua en la proporción empleada para la obtención del extracto + 9 mL de agua). Como control positivo se emplearon discos de ampicilina (10  $\mu$ g) y ceftazidima (30  $\mu$ g) para *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Salmonella enteritidis* y discos de imipenem (10  $\mu$ g) para *Pseudomonas aeruginosa* (Figura 8).

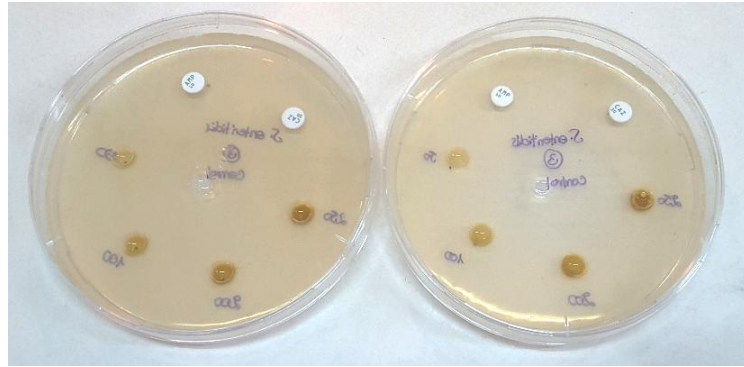


**Figura 8.** Método de difusión con discos.

**Fuente:** Propia.

**Para el método de difusión por pocillos** se realizaron pocillos en el agar con un sacabocados de 6 mm de diámetro y se agregaron en cada pocillo 40  $\mu$ L de cada una de las concentraciones de los extractos de yerba mate preparadas. Como control negativo se empleó 40  $\mu$ L del solvente utilizado para la preparación de la ST (1 mL de la solución de alcohol:agua en la proporción empleada para la obtención del extracto + 9 mL de agua). Como control positivo se emplearon discos de ampicilina (10  $\mu$ g) y ceftazidima (30  $\mu$ g) para *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Salmonella enteritidis* y discos de imipenem (10  $\mu$ g) para *Pseudomonas aeruginosa* (Figura 9).

Todas las placas se incubaron en estufa a  $35 \pm 2$  °C durante 24 h, posteriormente se procedió a la lectura de los halos de inhibición utilizando una regla milimetrada.



**Figura 9.** Método de difusión por pocillos.

**Fuente:** Propia.

Para la interpretación de los resultados se tuvo en cuenta la formación de halo de inhibición de crecimiento o la ausencia de halo de inhibición de crecimiento (AI). La lectura se realizó midiendo el diámetro del halo de inhibición del crecimiento en milímetros. La AI se consideró igual a 6 mm que corresponde al tamaño del disco o pocillo. Además se calculó el porcentaje del efecto inhibitorio relativo respecto al control positivo, utilizando la siguiente fórmula (Martínez *et al.*, 1997):

$$\% \text{ efecto de inhibición} = \frac{\bar{X} \text{ diámetro halo inhibición del extracto}}{\bar{X} \text{ diámetro halo inhibición control positivo}} \times 100$$

Donde:

$\bar{X}$  = Promedio del diámetro de inhibición

Para realizar los cálculos se utilizó el menor valor del halo de inhibición de crecimiento del antimicrobiano control.

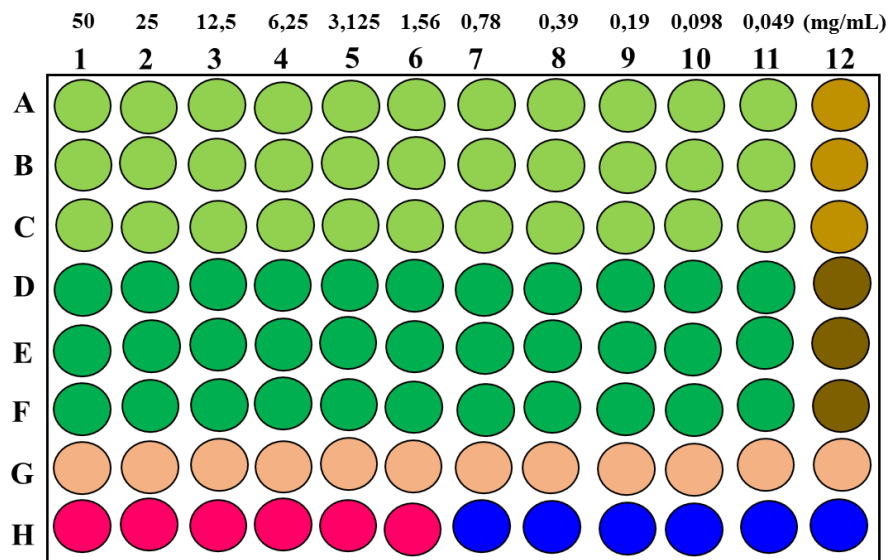
### **2.3. Determinación de la concentración inhibitoria mínima**

El método empleado para la determinación de la CIM fue el de microdilución en caldo siguiendo las indicaciones de la metodología descrita en el documento M07-A9 del manual CLSI (2012).

Para la realización de la CIM se seleccionaron los extractos que evidenciaron mejor actividad inhibitoria en los métodos de difusión en agar.

Se realizaron diluciones seriadas en caldo MH de concentraciones al doble, en tubos de ensayo, de los extractos secos 1, metanol:agua (60:40) y 2, etanol:agua (60:40) para la

obtención de diluciones finales de 50 mg/mL hasta 0,049 mg/mL. Posteriormente, se tomaron 50  $\mu$ L de las diluciones de los extractos y se colocaron en los pocillos de las microplacas estériles de 96 pocillos. Luego, se agregaron 50  $\mu$ L del inóculo bacteriano de  $1 \times 10^6$  UFC/mL para lograr un inóculo final de  $5 \times 10^5$  UFC/mL. Los ensayos fueron realizados por triplicado para cada concentración de extracto. Como control de crecimiento se utilizó el caldo MH más el microorganismo en estudio, como control negativo se utilizó el caldo MH, como control positivo se empleó cefotaxima (2  $\mu$ g/mL) y como control de extracto se utilizó la dilución del extracto de 50 mg/mL. Posteriormente se incubaron durante 24 horas a una temperatura de  $35 \pm 2$  °C. En la Figura 10 se presenta el esquema de trabajo para la determinación de la CIM.



**Figura 10.** Esquema de trabajo para la determinación de la CIM.

**Referencias:**

- Fila 1 – 11 (A, B, C) = Ensayo por triplicado: caldo MH + extracto 1 + inóculo bacteriano
- Fila 1 – 11 (D, E, F) = Ensayo por triplicado: caldo MH + extracto 2 + inóculo bacteriano
- Fila 1 – 12 (G) = Control positivo: Cefotaxima
- Fila 1 – 6 (H) = Control de crecimiento: caldo MH + inóculo bacteriano
- Fila 7 – 12 (H) = Control negativo: caldo MH
- Fila 12 (A, B, C) = Control del extracto 1
- Fila 12 (D, E, F) = Control del extracto 2

**Fuente:** Propia.

La CIM es considerada la menor concentración de antibiótico capaz de inhibir completamente el desarrollo bacteriano en el pocillo. Para la lectura de los resultados fue utilizado el parámetro de cambio de color obtenida por un test colorimétrico utilizando el colorante resazurina. Posteriormente a la incubación fue adicionado 15  $\mu\text{L}$  de resazurina al 0,01 % (p/v) en cada pocillo, se dejaron reposar durante 3 h a una temperatura de  $35 \pm 2$  °C para la reacción del colorante. El valor de la CIM fue establecido como la menor concentración que impidió el cambio de color total o parcial en los pocillos de la microplaca. La permanencia del color azul indica ausencia de crecimiento, mientras que el cambio de color a rosa indica crecimiento bacteriano.

#### **2.4. Determinación de la concentración bactericida mínima**

Para la determinación de la CBM se tomaron 10  $\mu\text{L}$  de cada pocillo de las microplacas en las que no se evidenció cambio de color luego del agregado de la resazurina y se sembraron en superficie en placas de Petri conteniendo agar MH. Se incubaron durante 24 h a  $35 \pm 2$  °C. Posteriormente, se observó si hubo crecimiento bacteriano. Todos los ensayos se realizaron por duplicado. La CBM fue determinada como la menor concentración que visualmente no presentó desarrollo bacteriano.

#### **2.5. Análisis fitoquímico preliminar de los extractos hidroalcohólicos secos de yerba mate elaborada**

Para el análisis fitoquímico preliminar se utilizaron los extractos: 1, metanol:agua (60:40) y 2, etanol:agua (60:40), en los cuales se evaluó la presencia de los principales grupos de metabolitos secundarios, mediante pruebas en tubos siguiendo las metodologías empleadas por (Sá Santos, 2016).

##### **2.5.1. Taninos**

Para determinar la presencia de taninos, se empleó el ensayo con cloruro férrico. Este ensayo realizado en un extracto etanólico reconoce tanto fenoles como taninos. Se utilizaron 2 mg de los extractos secos disueltos en 10 mL de agua destilada, posteriormente, se agregaron 3 gotas de cloruro férrico al 1 %. Un cambio en la coloración o la formación de precipitado

indica una reacción positiva. Una coloración rojo-vino indica la presencia de compuestos fenólicos, en cambio, una coloración verde-azul indica la presencia de taninos.

### **2.5.2. Flavonoides**

Para la determinación de flavonoides, por lo general, se emplea la reacción de cianidina, conocida también como Shinoda (Carvajal Rojas *et al.*, 2009). Para ello, se disolvieron 2 mg de los extractos en 3 mL de metanol. Posteriormente, se adicionaron 5 gotas de ácido clorhídrico y 0,5 g de polvo de magnesio. Para su interpretación se tuvo en cuenta la aparición de coloración rojiza, violeta o naranja, la que se considera como positivo para compuestos del tipo flavonas, flavonoles, flavanonas, flavanonoles, isoflavonoides y xantonas.

### **2.5.3. Saponinas**

Para determinar la presencia de saponinas se empleó el ensayo de generación de espuma. En un tubo de ensayo se disolvieron 2 mg de los extractos secos en 1 mL de etanol al 80 %. La disolución se diluyó 1:15 en agua destilada y se agitó vigorosamente durante 5-10 min. La formación de espuma que permanece estable durante 15 a 30 min indica una reacción positiva.

### **2.5.4. Alcaloides**

Para el análisis de alcaloides, se pesaron 2 mg de los extractos y se disolvieron en 4 mL de ácido clorhídrico al 5 %. Seguidamente, se fraccionaron en dos tubos de ensayo a razón de 1 mL por tubo. Luego, se agregaron gotas de los reactivos Bouchardat y de Mayer, previamente preparados. El reactivo de Bouchardat se preparó diluyendo 4 g de yoduro de potasio y 2 g de yodo en 100 mL de agua destilada (Sá Santos, 2016). Para la preparación del reactivo de Mayer, se mezclaron la solución A con la solución B. Para la solución A, se emplearon 1,36 g de cloruro de mercurio en 60 mL de agua destilada. Para la solución B, se utilizaron 5 g de yoduro de potasio en 10 mL de agua destilada (Arango, 2002). Con el reactivo de Bouchardat, la formación de precipitado naranja rojizo indica una reacción positiva. Con el reactivo de Mayer, la formación de precipitado blanco indica una reacción positiva.

## **2.6. Determinación del contenido de polifenoles totales**

Para la determinación del contenido de polifenoles totales de los extractos obtenidos y de la yerba mate elaborada se utilizó el método estandarizado por la ISO/FDIS 14502-1 (International Standard, 2005).

La concentración de fenoles totales en los extractos fue medida por espectrofotometría, en base a una reacción colorimétrica de óxido-reducción. El agente oxidante utilizado fue el reactivo de Folin-Ciocalteu.

### **2.6.1. Preparación de la curva de calibración**

Para realizar la curva de calibración se utilizó ácido gálico monohidratado. Se preparó una solución de trabajo a una concentración de 1000 µg/mL. A partir de la cual se realizaron cinco diluciones con agua destilada: 10 µg/mL, 20 µg/mL, 30 µg/mL, 40 µg/mL y 50 µg/mL. El ensayo se realizó por duplicado.

### **2.6.2. Determinación de polifenoles totales en los extractos hidroalcohólicos secos y en la yerba mate elaborada**

Se pesaron aproximadamente 0,5 g de cada extracto seco, se colocaron en vasos de precipitado y se agregaron 25 mL de agua destilada caliente (máximo 60 °C), luego se agregó 5 mL de acetonitrilo y se enrasó a 50 mL con agua destilada en un matraz. Posteriormente, de este se tomó 1 mL y se realizó una dilución 1:100 mL con agua destilada.

Para la determinación del contenido de polifenoles totales en la yerba mate elaborada, primeramente, se preparó un extracto. Para ello se molió la muestra en un molino y se tamizó con un tamiz de 500 µ. Luego se pesó 0,2 g de la muestra molida y tamizada y se colocó en tubos cónicos con 5 mL de solución de metanol al 70 % previamente calentado a 70 °C. Se mezcló en vortex unos segundos y se incubó en baño a 70 °C por 5 min (se repitió 2 veces). Luego se enfrió a temperatura ambiente y se centrifugó a 3500 rpm durante 10 min. El sobrenadante fue retirado y colocado en tubos cónicos de vidrio. Finalizada la extracción se enrasaron a 10 mL con metanol al 70 %. Para la reacción se tomó 1 mL del extracto y se enrasó con agua destilada en un matraz de 10 mL y se mezcló por inversión para evitar la formación de espuma.



Se colocaron en tubos, por duplicado, 1 mL de las diluciones de ácido gálico y de las muestras preparadas previamente, luego se adicionaron 5 mL del reactivo de Folin-Ciocalteu al 10 %, y 4 mL de carbonato de sodio al 7 %.

Se dejó reposar durante 60 minutos en la oscuridad y posteriormente la absorbancia fue medida a una longitud de onda de 765 nm utilizando un espectrofotómetro Spectrum SP 2100. Los resultados fueron expresados en gramos equivalentes de ácido gálico por 100 gramos de muestra seca (g EAG/100 g de muestra seca).

El contenido total de polifenoles ( $w_T$ ), expresado como porcentaje en masa, en base a la materia seca de la muestra, viene dado por la fórmula:

$$w_T = \frac{(D_{muestra} - D_{intercepto}) \times V_{muestra} \times d \times 100}{E_{estandar} \times m_{muestra} \times 10000 \times w_{DM, muestra}}$$

Donde:

$D_{muestra}$  = densidad óptica obtenida para la solución de ensayo de la muestra

$D_{intercepto}$  = densidad óptica en el punto en que la línea de calibración lineal de mejor ajuste intercepta el eje y

$E_{estandar}$  = pendiente obtenida de la calibración lineal de mejor ajuste

$m_{muestra}$  = masa, en gramos, de la porción de prueba de muestra

$V_{muestra}$  = volumen de extracción de la muestra, en mililitros (50 mL para el té instantáneo y 10 mL para el té de la hoja)

$d$  = factor de dilución utilizado antes de la determinación colorimétrica (típicamente 1,0 mL a 100 ml, por lo tanto, un factor de dilución de 100)

$w_{DM, muestra}$  = contenido de materia seca, expresado como una fracción en masa en porcentaje, de la muestra de ensayo

## 2.7. Análisis estadístico

Los resultados de la investigación fueron tratados estadísticamente mediante el programa *Statgraphics Centurion XV*, se realizaron análisis de diseño factorial, análisis de varianza y pruebas de hipótesis.

# CAPÍTULO III

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 1. Obtención de los extractos hidroalcohólicos secos

#### 1.1. Molienda de la muestra

La yerba mate elaborada fue molida y tamizada con el objetivo de disminuir el tamaño de las partículas para adecuarla al proceso de extracción, se obtuvo un polvo de color verde característico del producto (Figura 11). De acuerdo a la granulometría descrita por la Farmacopea de Estados Unidos (United States Pharmacopeial (USP), 2007), según la apertura nominal del tamiz utilizado, el polvo obtenido corresponde a la clasificación de grueso.



**Figura 11.** Yerba mate elaborada molida y tamizada.

**Fuente:** Propia.

En teoría, la efectividad del proceso extractivo es mayor cuanto menor sea el tamaño de las partículas del material vegetal en estudio, debido a que se produce mayor superficie de contacto entre el vegetal y el solvente, por ende, mayor acceso de los principios activos al medio. Sin embargo, en la práctica, las partículas muy pequeñas dificultan el proceso de extracción debido a que puede ocurrir taponamiento de cribas. Durante la maceración pueden producir aumento de la turbidez del extracto. Por el contrario, en partículas de mayor tamaño al ideal, dificulta la lixiviación, haciéndola más lenta. Por esta razón se recomienda la utilización de polvos moderadamente gruesos a gruesos para la mayoría de los extractos vegetales (Sharapin, 2000).

## 1.2. Determinación del contenido de humedad (agua) de la yerba mate elaborada molida

El contenido de humedad de la yerba mate elaborada molida y tamizada se presenta en la Tabla 5 y los valores detallados en el Anexo 1.

**Tabla 5.** Contenido de humedad de la yerba mate elaborada molida y tamizada.

Muestra	% H
Yerba mate elaborada molida	5,98 ± 0,08

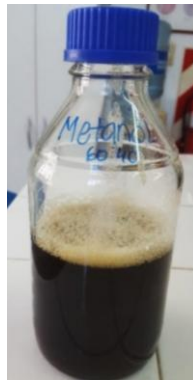
**Referencias:** H %= Humedad porcentual. El valor corresponde al promedio ± desvío estándar de dos determinaciones.

**Fuente:** Propia.

El contenido de humedad fue determinado para expresar los valores de los principios activos referidos a la materia seca. Para una óptima conservación debe ser inferior al 10 % para evitar procesos enzimáticos y proliferación de microorganismos (Bermúdez Cañete, 2010).

## 1.3. Preparación del extracto fluido

Los extractos fluidos obtenidos presentaron ciertas características organolépticas peculiares de la yerba mate, como su aroma particular a mate cocido, de color ámbar oscuro y una consistencia espesa, con presencia de sedimentos (Figura 12).



**Figura 12.** Extracto hidroalcohólico fluido de yerba mate preparado con solvente de extracción metanol:agua (60:40).

**Fuente:** Propia.

#### 1.4. Determinación del rendimiento de los extractos

En la Tabla 6 se muestra el porcentaje del rendimiento (residuo seco) obtenido para cada extracto preparado.

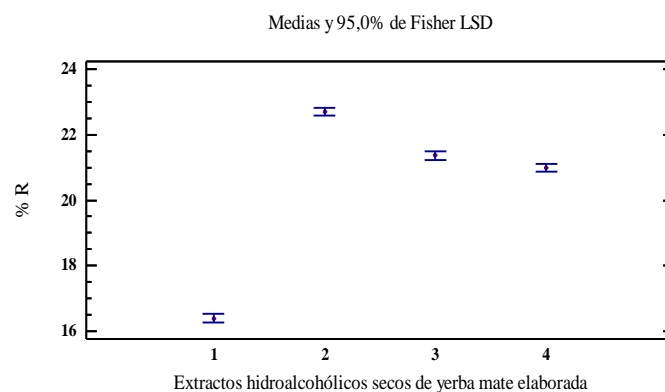
**Tabla 6.** Rendimiento de los extractos hidroalcohólicos de yerba mate elaborada.

Muestra	Rendimiento (%)
Extracto 1	16,41 ± 0,10
Extracto 2	22,69 ± 0,15
Extracto 3	21,36 ± 0,04
Extracto 4	20,98 ± 0,19

**Referencias:** Los valores del rendimiento corresponden al promedio ± desvío estándar de tres determinaciones.

**Fuente:** Propia.

El análisis factorial mostró que en las condiciones ensayadas ninguno de los factores estudiados tipo de solvente y proporción hidroalcohólica, ni su interacción resultan estadísticamente significativos en el porcentaje de rendimiento de los extractos para un nivel de confianza del 95 % (Anexo 2). Se comparó el % R de los diferentes extractos mediante un análisis de ANOVA simple (Anexo 3). Este mostró que el % R de cada uno de los extractos presentan diferencias significativas entre si ( $Valor-P \leq 0,05$ ). En la Figura 13 se presenta el grafico de medias con los intervalos de Fisher de mínima diferencia significativa.



**Figura 13.** Gráfico de medias del % del rendimiento de los extractos con intervalos de Fisher.

**Referencias:** Extracto 1 = metanol:agua (60:40); extracto 2 = etanol:agua (60:40); extracto 3 = metanol:agua (70:30); extracto 4 = etanol:agua (70:30).

**Fuente:** Propia.

Se observó que el extracto 2, en el que se empleó como solvente de extracción etanol:agua en la proporción 60:40, presentó un mayor % R, seguido del extracto 3 en el que se empleó como solvente de extracción metanol:agua en la proporción 70:30. El que presentó menor rendimiento fue el extracto 1 (metanol 60:40).

García *et al.*, 2016 observaron que el tipo de solvente influye en el rendimiento de los extractos de *Ricinus communis L.*; los que fueron preparados empleando solventes de diferentes polaridades. Sin embargo, en este trabajo el análisis factorial no evidenció dicho efecto probablemente a que se utilizaron dos tipos de alcoholes, los cuales difieren escasamente en su polaridad.

Otros factores que pueden influir en el rendimiento de los extractos son el tiempo de maceración, fundamentalmente si se realizan por largos periodos de tiempo; el método de extracción y grado de molienda la muestra (Castaño Castrillón *et al.*, 2000). En este trabajo no se evaluaron los mencionados factores. Así también, Triana Ramírez (2016) estableció que existe una relación entre el tipo de planta y las variedades de la misma, el método de extracción y el tipo de solvente utilizado en los valores de rendimiento.

Guntero *et al.* (2015), obtuvieron extractos utilizando como material vegetal hollejo de uva, por los métodos de ultrasonido y microondas, empleando agua destilada, alcohol etílico (99,5 %) y metanol (99,8 %) como solvente de extracción. Analizaron el efecto del tiempo, temperatura y solventes sobre el material vegetal. Los resultados mostraron que, utilizando el método ultrasónico, el agua como disolvente produjo un rendimiento considerablemente inferior al obtenido con etanol o metanol, puesto que, el metanol y el etanol son sustancias que incrementan la solubilidad del material orgánico con menor polaridad. El rendimiento más alto obtenido fue con etanol durante 40 min y 60 °C (10,59 g extracto/100 g de muestra), mientras que, el obtenido con metanol fue de 10,46 g extracto/ 100 g de muestra a 20 min y 50 °C. En cambio, utilizando el método de extracción asistida con microondas, el mayor rendimiento se obtuvo utilizando una mezcla de etanol-agua en relación 1:1 durante 6 min (58,22 g extracto/ 100 g de muestra), por tanto, concluyeron que este último método aumenta el rendimiento y reduce el tiempo de extracción.

### **1.5. Evaporación de los extractos hidroalcohólicos**

Luego de la evaporación de los extractos hidroalcohólicos se obtuvo un extracto con una consistencia fluida (Figura 14). No es posible la obtención de un extracto blando o pilular

durante la evaporación, debido a que resulta casi imposible retirar el producto del balón que se adhiere fácilmente a las paredes de este.

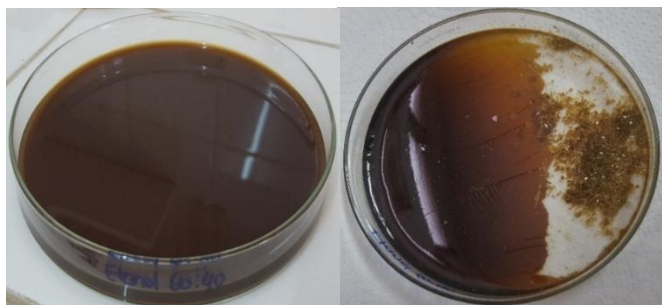


**Figura 14.** Extracto hidroalcohólico con solvente de extracción metanol:agua (60:40) concentrado obtenido mediante evaporación al vacío.

**Fuente:** Propia.

### 1.6. Secado de los extractos hidroalcohólicos

Posterior a la evaporación, el secado y la molienda, se obtuvieron extractos secos de tipo polvo fino de color marrón (Figura 15).



**Figura 15.** Extracto hidroalcohólico seco de yerba mate preparado con solvente de extracción etanol:agua (60:40) en placa de Petri.

**Fuente:** Propia.

### 1.7. Determinación del contenido de humedad (agua) de los extractos hidroalcohólicos secos

El contenido de humedad de los extractos hidroalcohólicos secos de la yerba mate elaborada se muestra en la Tabla 7 y se detalla en Anexo 4.

**Tabla 7.** Contenido de humedad de los extractos hidroalcohólicos secos de yerba mate elaborada.

Extracto seco	% Humedad
1	8,30 ± 0,01
2	7,46 ± 0,27
3	6,83 ± 0,21
4	6,55 ± 0,35

**Referencias:** Extracto 1 = metanol:agua (60:40); extracto 2 = etanol:agua (60:40); extracto 3 = metanol:agua (70:30); extracto 4 = etanol:agua (70:30). Los valores corresponden al promedio ± desvío estándar de dos determinaciones.

**Fuente:** Propia.

## 2. Ensayos de la actividad antimicrobiana de los extractos hidroalcohólicos secos

### 2.1. *Salmonella enteritidis* cepa salvaje

Los resultados de los ensayos de la actividad antibacteriana de las distintas cantidades de los extractos hidroalcohólicos secos de yerba mate elaborada por el método de difusión con discos frente a *Salmonella enteritidis* salvaje se evidencian en la Tabla 8, y los resultados de los ensayos por el método por pocillos se muestran en la Figura 16 y en la Tabla 9.

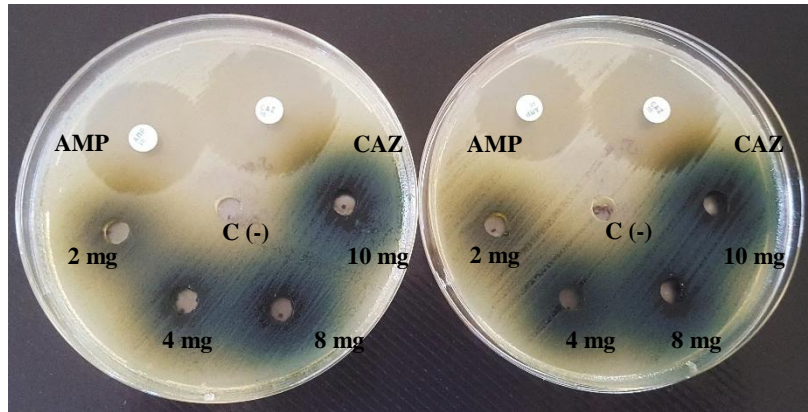
**Tabla 8.** Ensayo de actividad antibacteriana de diferentes cantidades de los extractos hidroalcohólicos secos de yerba mate frente a *Salmonella enteritidis* cepa salvaje, por el método de difusión con discos.

Cantidad de extracto (mg) Extracto	Halo de inhibición (mm)						
	10	8	4	2	Controles		
					C (-)	AMP (10 µg)	CAZ (30 µg)
1	10,50 ± 0,71	9,50 ± 0,71	9,00 ± 0,00	8,00 ± 0,00	6,00	30,00 ± 0,00	31,50 ± 0,71
2	12,00 ± 0,00	11,00 ± 0,00	10,00 ± 0,00	8,00 ± 0,00	6,00	30,00 ± 0,00	35,00 ± 0,00
3	9,00 ± 0,00	8,00 ± 0,00	8,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00	6,00	29,50 ± 0,71	31,00 ± 1,41
4	6,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00	6,00	30,00 ± 0,00	32,00 ± 0,00

**Referencias:** Extracto 1 = metanol:agua (60:40); extracto 2 = etanol:agua (60:40); extracto 3 = metanol:agua (70:30); extracto 4 = etanol:agua (70:30); AMP = ampicilina; CAZ = ceftazidima; C (-) = control negativo. Los valores corresponden al promedio ± desvío estándar de dos determinaciones.

**Fuente:** Propia.





**Figura 16.** Ensayo de actividad antibacteriana de los extractos de yerba mate elaborada frente a *Salmonella enteritidis* por el método de difusión por pocillos.

**Referencias:** C (-) = control negativo; 10 – 8 – 4 – 2 mg = cantidad del extracto; AMP = ampicilina; CAZ = ceftazidima.

**Fuente:** Propia.

**Tabla 9.** Ensayo de actividad antibacteriana de diferentes cantidades de los extractos hidroalcohólicos secos de yerba mate frente a *Salmonella enteritidis* cepa salvaje por el método de difusión por pocillos.

Cantidad de extracto (mg) Extracto	Halo de inhibición (mm)						
	10	8	4	2	Controles		
					C (-)	AMP (10 µg)	CAZ (30 µg)
1	13,00 ± 1,41	12,00 ± 0,00	9,50 ± 0,71	8,00 ± 0,00	6,00	29,50 ± 0,71	30,00 ± 0,00
2	12,50 ± 0,71	11,00 ± 0,00	8,50 ± 2,12	6,00 ± 0,00	6,00	29,00 ± 1,41	34,00 ± 2,83
3	13,50 ± 0,71	11,50 ± 0,71	9,50 ± 0,71	8,00 ± 0,00	6,00	29,00 ± 1,41	32,00 ± 0,00
4	6,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00	6,00	29,00 ± 0,00	32,00 ± 0,00

**Referencias:** Extracto 1 = metanol:agua (60:40); extracto 2 = etanol:agua (60:40); extracto 3 = metanol:agua (70:30); extracto 4 = etanol:agua (70:30); AMP = ampicilina; CAZ = ceftazidima; C (-) = control negativo. Los valores corresponden al promedio ± desvío estándar de dos determinaciones.

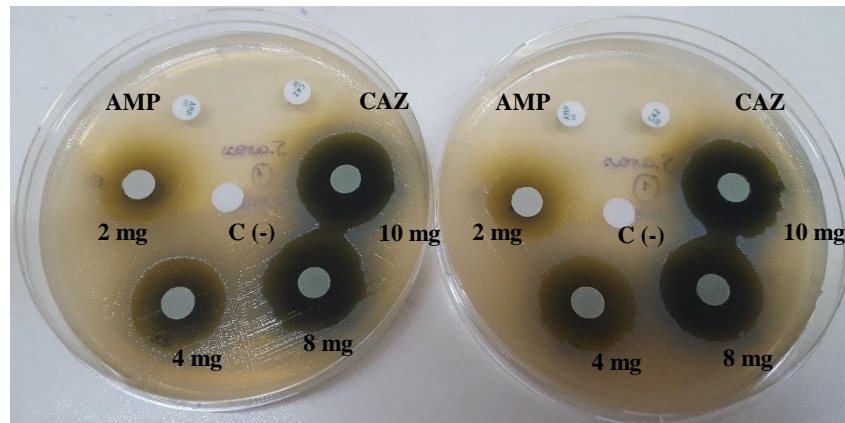
**Fuente:** Propia.

Como puede observarse en la Tabla 8, empleando el método de difusión con discos, el mayor tamaño de halo de inhibición, para *Salmonella enteritidis* se obtuvo con el extracto 2, con un contenido de extracto seco de 10 mg (12 mm). En cambio, utilizando el método por pocillos, se obtuvo un mayor halo de inhibición (13,5 mm) con el extracto 3 con la misma concentración (Tabla 9).

Para los análisis estadísticos se emplearon los resultados obtenidos con la cantidad de 10 mg de los extractos estudiados. Se realizó el análisis del diseño factorial a 2 niveles para los métodos de difusión con discos y de difusión por pocillos, y se observó que ninguno de los factores estudiados, tipo de solvente y proporción, ni su interacción tienen influencia estadísticamente significativa en el tamaño del halo de inhibición del crecimiento para un nivel de confianza del 95 % (Anexo 5). Se compararon los tamaños de los halos de inhibición de crecimiento producidos por los extractos por ambos métodos mediante un ANOVA simple (Anexo 6 y 7). Se observó que, por el método de difusión con discos, existen diferencias estadísticamente significativas siendo el extracto 2 el que produce mayor halo de inhibición, seguido por el extracto 1. Por el método de difusión por pocillos, los mayores halos de inhibición fueron producidos por los extractos 1, 2 y 3, los cuales no presentan diferencias significativas. Se realizó una comparación de los halos de inhibición de crecimiento obtenidos por los métodos de difusión con discos y por pocillos para los extractos 1 y 2 mediante el estadígrafo t de Student y se observó que no existen diferencias significativas (Anexo 8 y 9).

## **2.2. *Staphylococcus aureus* ATCC 25923**

Los resultados obtenidos de los ensayos por el método de difusión con discos realizados frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 se muestran en la Figura 17 y Tabla 10. Mientras que, en la Figura 18 y en la Tabla 11 se muestran los resultados obtenidos por el método de difusión por pocillos.



**Figura 17.** Ensayo de actividad antibacteriana de los extractos de yerba mate elaborada frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 por el método de difusión con discos.

**Referencias:** C (-) = control negativo; 10 – 8 – 4 – 2 mg = cantidad del extracto; AMP = ampicilina; CAZ = ceftazidima.

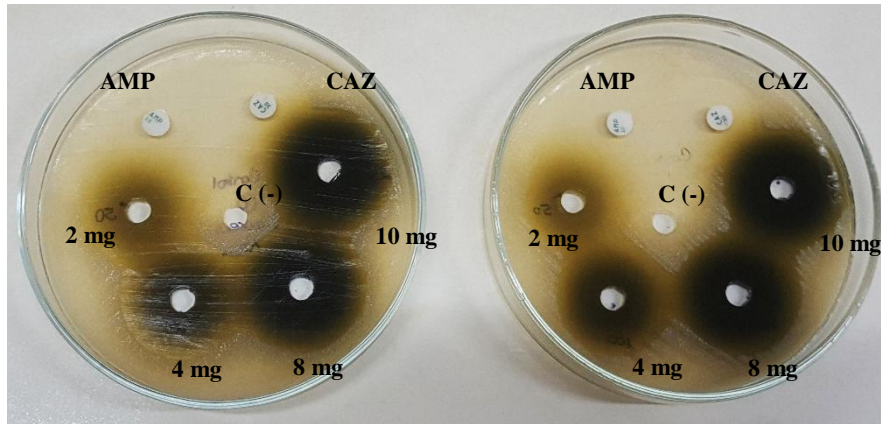
**Fuente:** Propia.

**Tabla 10.** Ensayo de actividad antibacteriana de diferentes cantidades de los extractos hidroalcohólicos secos de yerba mate frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 por el método de difusión con discos.

Cantidad de extracto (mg) → Extracto ↓	Halo de inhibición (mm)						
	10	8	4	2	Controles		
					C (-)	AMP (10 µg)	CAZ (30 µg)
1	29,50 ± 0,71	29,00 ± 1,41	27,00 ± 1,41	23,00 ± 1,41	6,00	37,00 ± 1,41	22,50 ± 0,71
2	30,00 ± 0,00	29,00 ± 0,00	25,50 ± 0,71	23,00 ± 1,41	6,00	40,00 ± 0,00	22,50 ± 0,71
3	29,00 ± 0,00	28,00 ± 1,41	26,00 ± 0,00	23,00 ± 1,41	6,00	40,00 ± 0,00	22,00 ± 0,00
4	28,50 ± 0,71	28,50 ± 0,71	25,50 ± 0,71	22,5 ± 0,71	6,00	40,00 ± 0,00	23,00 ± 0,00

**Referencias:** Extracto 1 = metanol:agua (60:40); extracto 2 = etanol:agua (60:40); extracto 3 = metanol:agua (70:30); extracto 4 = etanol:agua (70:30); AMP = ampicilina; CAZ = ceftazidima; C (-) = control negativo. Los valores corresponden al promedio ± desvío estándar de dos determinaciones.

**Fuente:** Propia.



**Figura 18.** Ensayo de actividad antibacteriana de los extractos de yerba mate elaborada frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 por el método de difusión por pocillos.

**Referencias:** C (-) = control negativo; 10 – 8 – 4 – 2 mg = cantidad del extracto; AMP = ampicilina; CAZ = ceftazidima.

**Fuente:** Propia.

**Tabla 11.** Ensayo de actividad antibacteriana de diferentes cantidades de los extractos hidroalcohólicos secos de yerba mate frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 por el método de difusión por pocillos.

Cantidad de extracto (mg) → Extracto ↓	Halo de inhibición (mm)						
	10	8	4	2	Controles		
					C (-)	AMP (10 µg)	CAZ (30 µg)
1	30,00 ± 0,00	30,00 ± 0,00	28,00 ± 0,00	25,00 ± 1,41	6,00	37,00 ± 1,41	22,00 ± 0,71
2	30,00 ± 0,00	30,50 ± 0,71	29,50 ± 0,71	27,00 ± 1,41	6,00	40,00 ± 0,00	21,50 ± 0,71
3	30,50 ± 0,71	31,00 ± 1,41	28,00 ± 1,41	25,00 ± 0,00	6,00	40,00 ± 0,00	22,50 ± 0,00
4	30,00 ± 0,00	29,50 ± 0,71	26,00 ± 0,00	24,00 ± 0,00	6,00	39,00 ± 1,41	21,50 ± 0,71

**Referencias:** Extracto 1 = metanol:agua (60:40); extracto 2 = etanol:agua (60:40); extracto 3 = metanol:agua (70:30); extracto 4 = etanol:agua (70:30); AMP = ampicilina; CAZ = ceftazidima; C (-) = control negativo. Los valores corresponden al promedio ± desvío estándar de dos determinaciones.

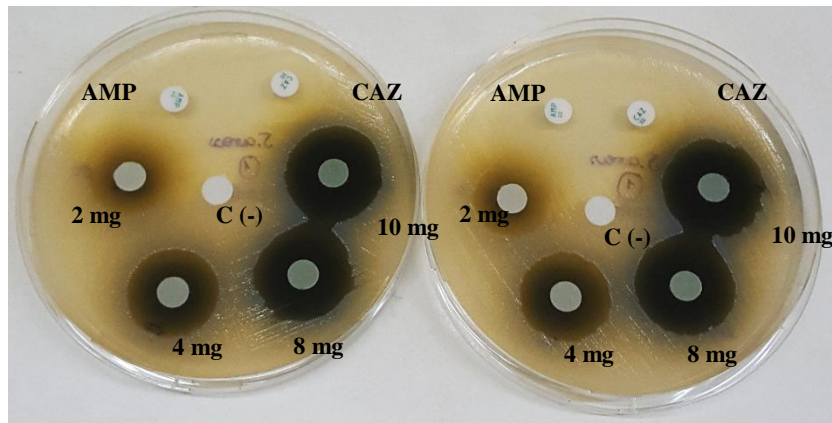
**Fuente:** Propia.

Como puede observarse, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 presentó mayor tamaño de halo de inhibición de crecimiento (30 mm) en comparación con *Salmonella enteritidis* (13,5 mm).

Para los análisis estadísticos, se emplearon los resultados obtenidos con la cantidad de 10 mg de los extractos estudiados. Se llevó a cabo el análisis factorial para los métodos de difusión con discos y de difusión por pocillos, y se observó que ninguno de los factores estudiados, tipo de solvente y proporción, ni su interacción tienen influencia estadísticamente significativa en el tamaño del halo de inhibición del crecimiento para un nivel de confianza del 95 % (Anexo 10). Se realizó un ANOVA simple para comparar los tamaños de los halos de inhibición de crecimiento producidos por los extractos para ambos métodos. Se observó que por el método difusión con discos, los halos de inhibición de crecimiento de los extractos 1, 2 y 3 no presentan diferencias significativas. En valores absolutos, el extracto 2 produjo mayor diámetro del halo de inhibición de crecimiento, seguido por el extracto 1 (Anexo 11). Mientras que, por el método de difusión por pocillos, se observó que ninguno de los halos de inhibición de crecimiento producidos por los extractos ensayados difiere significativamente con un nivel de confianza del 95 %. En valores absolutos, el mayor tamaño del halo se observó con el extracto 3 (Anexo 12). Se realizó una comparación de los halos de inhibición de crecimiento por ambos métodos para el extracto 1 mediante el estadígrafo t de Student y se observó que no existen diferencias significativas entre los métodos (Anexo 13).

### **2.3. *Staphylococcus aureus* cepa salvaje**

Los resultados de los ensayos de actividad antimicrobiana de los extractos hidroalcohólicos de yerba mate realizados con la cepa salvaje de *Staphylococcus aureus* empleando el método de difusión con discos se pueden observar en la Figura 19 y en la Tabla 12 y los resultados de los ensayos realizados con el método de difusión por pocillos se muestran en la Figura 20 y en la Tabla 13.



**Figura 19.** Ensayo de actividad antibacteriana de los extractos de yerba mate elaborada frente a *Staphylococcus aureus* cepa salvaje por el método de difusión con discos.

**Referencias:** C (-) = control negativo; 10 – 8 – 4 – 2 mg = cantidad del extracto; AMP = ampicilina; CAZ = ceftazidima.

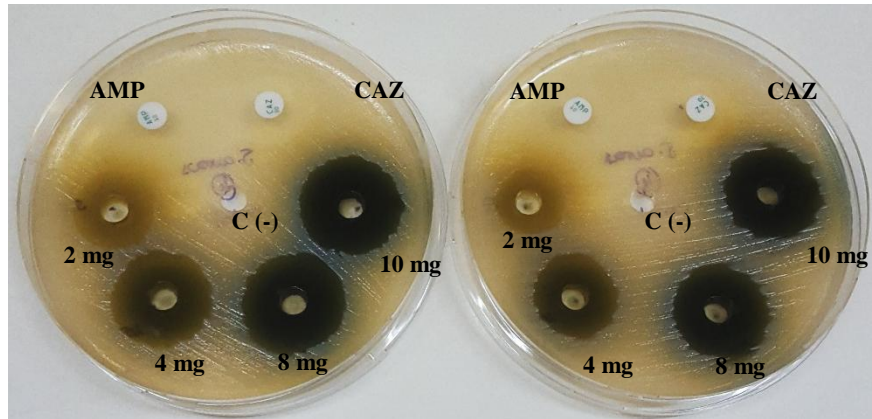
**Fuente:** Propia.

**Tabla 12.** Ensayo de actividad antibacteriana de diferentes cantidades de los extractos hidroalcohólicos secos de yerba mate frente a *Staphylococcus aureus* cepa salvaje por el método de difusión con discos.

Cantidad de extracto (mg) Extracto	Halo de inhibición (mm)						
	10	8	4	2	Controles		
					C (-)	AMP (10 µg)	CAZ (30 µg)
1	23,00 ± 0,00	22,00 ± 1,41	21,00 ± 0,00	18,00 ± 0,00	6,00	34,50 ± 0,71	19,00 ± 1,41
2	25,00 ± 0,00	23,50 ± 0,71	22,00 ± 1,41	19,50 ± 0,71	6,00	36,00 ± 0,00	19,00 ± 1,41
3	22,50 ± 0,71	22,00 ± 1,41	20,00 ± 0,00	17,50 ± 0,71	6,00	36,0 ± 0,00	19,00 ± 0,00
4	21,00 ± 1,41	20,50 ± 0,71	18,50 ± 0,71	15,50 ± 0,71	6,00	35,50 ± 0,71	19,00 ± 0,00

**Referencias:** Extracto 1 = metanol:agua (60:40); extracto 2 = etanol:agua (60:40); extracto 3 = metanol:agua (70:30); extracto 4 = etanol:agua (70:30); AMP = ampicilina; CAZ = ceftazidima; C (-) = control negativo. Los valores corresponden al promedio ± desvío estándar de dos determinaciones.

**Fuente:** Propia.



**Figura 20.** Ensayo de actividad antibacteriana de los extractos de yerba mate elaborada frente a *Staphylococcus aureus* cepa salvaje por el método de difusión por pocillos.

**Referencias:** C (-) = control negativo; 10 – 8 – 4 – 2 mg = cantidad del extracto; AMP = ampicilina; CAZ = ceftazidima.

**Fuente:** Propia.

**Tabla 13.** Ensayo de actividad antibacteriana de diferentes cantidades de los extractos hidroalcohólicos secos de yerba mate frente a *Staphylococcus aureus* cepa salvaje por el método de difusión por pocillos.

Cantidad de extracto (mg) → Extracto ↓	Halo de inhibición (mm)						
	10	8	4	2	Controles		
					C (-)	AMP (10 µg)	CAZ (30 µg)
1	24,50 ± 0,71	24,00 ± 1,41	21,50 ± 2,12	19,00 ± 1,41	6,00	34,00 ± 0,00	18,00 ± 0,00
2	24,50 ± 0,71	24,00 ± 0,00	22,50 ± 0,71	19,50 ± 0,71	6,00	34,00 ± 0,00	18,50 ± 0,71
3	24,50 ± 0,71	23,00 ± 0,00	21,00 ± 0,00	19,00 ± 0,00	6,00	35,00 ± 0,00	19,00 ± 0,00
4	22,50 ± 0,71	22,00 ± 1,41	20,50 ± 2,12	17,00 ± 1,41	6,00	34,50 ± 0,71	18,50 ± 0,00

**Referencias:** Extracto 1 = metanol:agua (60:40); extracto 2 = etanol:agua (60:40); extracto 3 = metanol:agua (70:30); extracto 4 = etanol:agua (70:30); AMP = ampicilina; CAZ = ceftazidima; C (-) = control negativo. Los valores corresponden al promedio ± desvío estándar de dos determinaciones.

**Fuente:** Propia.

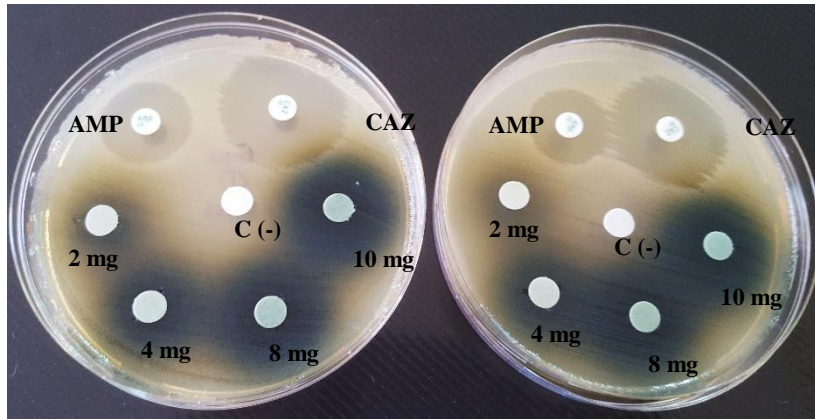
Se puede observar una ligera diferencia en el tamaño de los halos de inhibición de crecimiento de los ensayos realizados frente a *Staphylococcus aureus* cepa salvaje utilizando el método de difusión por pocillos. Los extractos 1, 2 y 3, en la mayor cantidad ensayada (10 mg), fueron los que presentaron mayor tamaño en el halo de inhibición de crecimiento.

Para los análisis estadísticos, se utilizaron los resultados obtenidos con la cantidad de 10 mg de los extractos estudiados. Se llevó a cabo el análisis factorial para los métodos de difusión con discos y de difusión por pocillos, y se observó que ninguno de los factores estudiados, tipo de solvente y proporción, ni su interacción tienen influencia estadísticamente significativa en el tamaño del halo de inhibición del crecimiento para un nivel de confianza del 95 % (Anexo 14). Se realizó un ANOVA simple para comparar los tamaños de los halos de inhibición de crecimiento producidos por los extractos por ambos métodos. El análisis mostró que, por el método de difusión con discos, el extracto 2 produjo mayor diámetro del halo de inhibición de crecimiento seguido por el extracto 1, los que no presentaron diferencias significativas (Anexo 15). Por el método de difusión por pocillos no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los extractos 1, 2 y 3 (Anexo 16), los que produjeron halos de inhibición del mismo tamaño. Se realizó una comparación de los métodos para los extractos 1 y 2 mediante el estadígrafo t de Student y se observó que no existen diferencias significativas (Anexo 17 y 18).

#### **2.4. *Escherichia coli* ATCC 25922**

En la Figura 21 y en la Tabla 14 se muestran los resultados de los ensayos de actividad antibacteriana realizados con los extractos hidroalcohólicos secos frente a *Escherichia coli* ATCC 25922 por el método de difusión con discos y en la Figura 22 y en la Tabla 15 se observan los resultados de los ensayos realizados por el método de difusión por pocillos. En todos los casos, la cepa *Escherichia coli* no presentó halo de inhibición de crecimiento, en las condiciones ensayadas.





**Figura 21.** Ensayo de actividad antibacteriana de los extractos de yerba mate elaborada frente a *Escherichia coli* ATCC 25922 por el método de difusión con discos.

**Referencias:** C (-) = control negativo; 10 – 8 – 4 – 2 mg = cantidad del extracto; AMP = ampicilina; CAZ = ceftazidima.

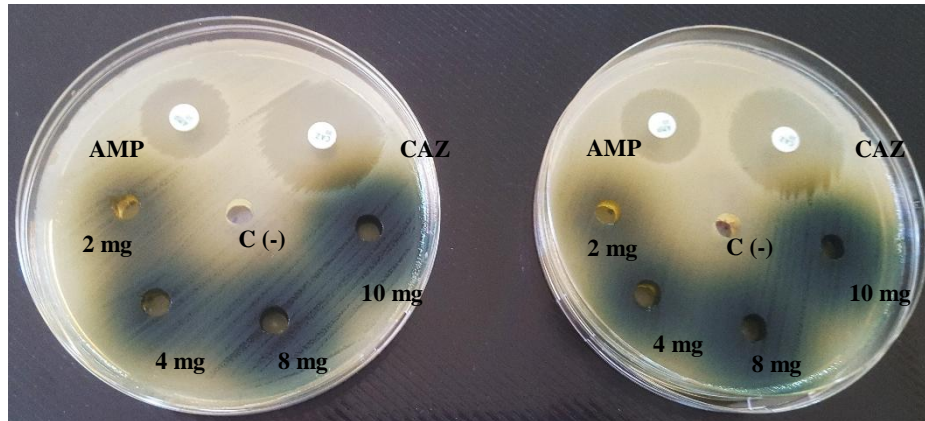
**Fuente:** Propia.

**Tabla 14.** Ensayo de actividad antibacteriana de diferentes cantidades de los extractos hidroalcohólicos secos de yerba mate frente a *Escherichia coli* ATCC 25922 por el método de difusión con discos.

Cantidad de extracto (mg) → Extracto ↓	Halo de inhibición (mm)						
	10	8	4	2	Controles		
					C (-)	AMP (10 µg)	CAZ (30 µg)
1	6,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00	6,00	37,00 ± 1,41	22,50 ± 0,71
2	6,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00	6,00	40,00 ± 0,00	22,50 ± 0,71
3	6,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00	6,00	40,00 ± 0,00	22,00 ± 0,00
4	6,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00	6,00	39,00 ± 1,41	21,50 ± 0,71

**Referencias:** Extracto 1 = metanol:agua (60:40); extracto 2 = etanol:agua (60:40); extracto 3 = metanol:agua (70:30); extracto 4 = etanol:agua (70:30); AMP = ampicilina; CAZ = ceftazidima; C (-) = control negativo. Los valores corresponden al promedio ± desvío estándar de dos determinaciones.

**Fuente:** Propia.



**Figura 22.** Ensayo de actividad antibacteriana de los extractos de yerba mate elaborada frente a *Escherichia coli* ATCC 25922 por el método de difusión por pocillos.

**Referencias:** C (-) = control negativo; 10 – 8 – 4 – 2 mg = cantidad del extracto; AMP = ampicilina; CAZ = ceftazidima.

**Fuente:** Propia.

**Tabla 15.** Ensayo de actividad antibacteriana de diferentes cantidades de los extractos hidroalcohólicos secos de yerba mate frente a *Escherichia coli* ATCC 25922 por el método de difusión por pocillos.

Cantidad de extracto (mg) → Extracto ↓	Halo de inhibición (mm)						
	10	8	4	2	Controles		
					C (-)	AMP (10 µg)	CAZ (30 µg)
1	6,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00	6,00	37,00 ± 1,41	22,50 ± 0,71
2	6,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00	6,00	40,00 ± 0,00	22,50 ± 0,71
3	6,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00	6,00	40,00 ± 0,00	22,00 ± 0,00
4	6,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00	6,00	39,00 ± 1,41	21,50 ± 0,71

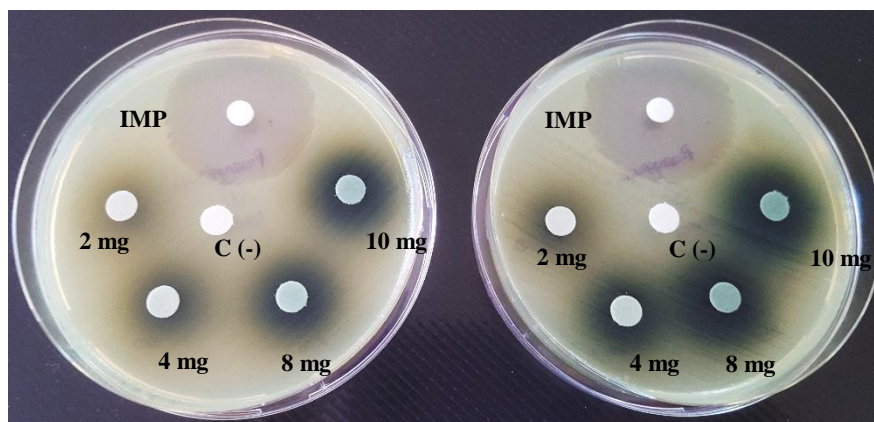
**Referencias:** Extracto 1 = metanol:agua (60:40); extracto 2 = etanol:agua (60:40); extracto 3 = metanol:agua (70:30); extracto 4 = etanol:agua (70:30); AMP = ampicilina; CAZ = ceftazidima; C (-) = control negativo. Los valores corresponden al promedio ± desvío estándar de dos determinaciones.

**Fuente:** Propia.

#### 2.4. *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853

En la Figura 23 y en la Tabla 16 se muestran los resultados de los ensayos de actividad antibacteriana realizados de los extractos secos frente a *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 por el método de difusión con discos y en la Figura 24 y en la Tabla 17 se observan los

resultados por el método de difusión por pocillos. En todos los casos, la cepa *Pseudomonas aeruginosa* presentó ausencia de halo de inhibición de crecimiento, en las condiciones ensayadas.



**Figura 23.** Ensayo de actividad antibacteriana de los extractos de yerba mate elaborada frente a *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 por el método de difusión con discos.

**Referencias:** C (-) = control negativo; 10 – 8 – 4 – 2 mg = cantidad del extracto; IMP = imipenem.

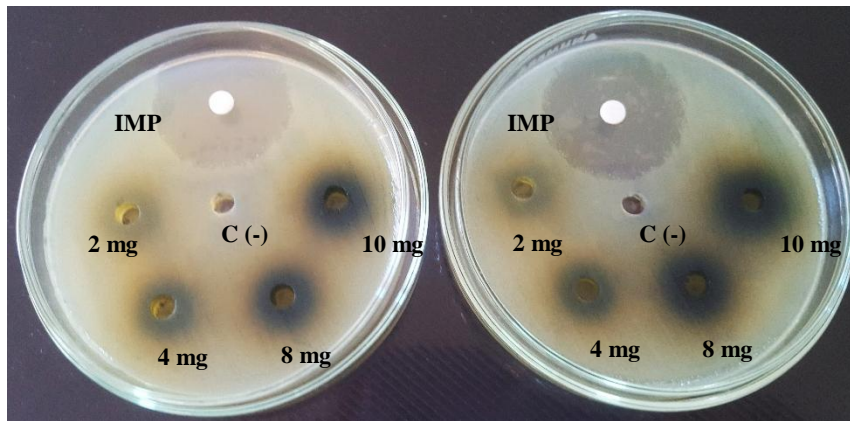
**Fuente:** Propia.

**Tabla 16.** Ensayo de actividad antibacteriana de diferentes cantidades de los extractos hidroalcohólicos secos de yerba mate frente a *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 por el método de difusión con discos.

Cantidad de extracto (mg) Extracto	Halo de inhibición (mm)					
	10	8	4	2	Controles	
					C (-)	Imipenem (10 µg)
1	6,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00	6,00	33,5 ± 0,71
2	6,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00	6,00	30,5 ± 0,71
3	6,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00	6,00	31,5 ± 0,71
4	6,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00	6,00	32,5 ± 0,71

**Referencias:** Extracto 1 = metanol:agua (60:40); extracto 2 = etanol:agua (60:40); extracto 3 = metanol:agua (70:30); extracto 4 = etanol:agua (70:30); C (-) = control negativo. Los valores corresponden al promedio ± desvío estándar de dos determinaciones.

**Fuente:** Propia.



**Figura 24.** Ensayo de actividad antibacteriana de los extractos de yerba mate elaborada frente a *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 por el método de difusión por pocillos.

**Referencias:** C (-) = control negativo; 10 – 8 – 4 – 2 mg = cantidad del extracto; IMP = imipenem.

**Fuente:** Propia.

**Tabla 17.** Ensayo de actividad antibacteriana de diferentes cantidades de los extractos hidroalcohólicos secos de yerba mate frente a *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 por el método de difusión por pocillos.

Cantidad de extracto (mg) Extracto	Halo de inhibición (mm)					
	10	8	4	2	Controles	
					C (-)	Imipenem (10 µg)
1	6,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00	6,00	32,00 ± 1,41
2	6,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00	6,00	30,00 ± 0,00
3	6,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00	6,00	30,50 ± 0,71
4	6,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00	6,00	31,00 ± 0,00

**Referencias:** Extracto 1 = metanol:agua (60:40); extracto 2 = etanol:agua (60:40); extracto 3 = metanol:agua (70:30); extracto 4 = etanol:agua (70:30); C (-) = control negativo. Los valores corresponden al promedio ± desvío estándar de dos determinaciones.

**Fuente:** Propia.

En general, el extracto 2 (hidroetanólico 60:40) mostró mayor efecto inhibitorio que los demás extractos, siendo las cepas de *Staphylococcus aureus* las que presentaron mayores tamaños de halos de inhibición de crecimiento en comparación con la cepa de *Salmonella enteritidis* estudiada. En cambio, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa* presentaron

ausencia de halo de inhibición frente a todas las cantidades de los extractos en las condiciones ensayadas. Por otra parte, *Salmonella enteritidis* no presentó halo de inhibición de crecimiento frente al extracto 4 (hidrometanólico 70:30). No se encontró diferencia entre los métodos empleados, de difusión con discos y de difusión por pocillos, para detectar la capacidad inhibitoria de los extractos frente a los microorganismos estudiados.

Estos hallazgos coinciden con el estudio realizado por Sari *et al.* (2007) en el que se evaluó la actividad antibacteriana de extractos de té de *I. paraguariensis*, preparados con soluciones acuosas al 50 % de metanol, etanol, DMF y acetona, donde observaron que todos los extractos ensayados fueron activos frente a *Staphylococcus aureus* y otras bacterias como *Listeria monocytogenes*, *Hafnia alvei*, *Yersinia enterocolítica* y *Bacillus cereus*, pero no frente a *Escherichia coli* O157:H7.

La ausencia de halo de inhibición de crecimiento de *Escherichia coli* frente a extractos hidroalcohólicos en proporciones de 100 mg/mL y 50 mg/mL a partir de hojas y de tallos por separado de *I. paraguariensis* también fue reportada por De Biasi *et al.* (2009). Los que además de hallar sensibilidad de *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* y *Proteus mirabilis*, también informaron sensibilidad de *Pseudomonas aeruginosa*, a diferencia de los resultados obtenidos en este estudio. Observaron mayor efectividad en los extractos obtenidos a partir de tallos, hecho destacable ya que estos son pobres en metilxantinas, saponinas y polifenoles, compuestos a los que se les atribuye actividad antimicrobiana.

Girolometto *et al.* (2009) ensayaron la actividad bactericida de extractos alcohólicos, hidroalcohólicos y acuosos de hojas y tallos de *I. paraguariensis* frente a *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Salmonella enteritidis* y *Escherichia coli*. Si bien, todas las formas de extracción mostraron capacidad para inhibir o inactivar selectivamente a los microorganismos ensayados, los extractos alcohólicos fueron los más efectivos, sugiriendo que los compuestos responsables de la actividad antimicrobiana serían volátiles y se perderían en el proceso de decocción.

Para el estudio de actividad antibacteriana, Rodríguez Vaquero *et al.* (2010), emplearon infusiones de hierbas comerciales de origen argentino. Los extractos acuosos de *Lippia integrifolia*, *Mentha piperita*, *Lippia turbinata*, *Wendtia calysina*, *Chenopodium ambrosioides*, *Minthostachys verticillata*, *Peumus boldus*, *Aloysia citriodora* e *Ilex paraguayensis*, fueron evaluados frente a *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*. Los resultados mostraron inhibición de crecimiento de *Escherichia coli* utilizando los extractos de

*Ilex paraguariensis*, *Lippia integrifolia*, *Mentha piperita* y *Peumus boldus*. Los extractos más eficaces contra *Staphylococcus aureus* fueron de *Ilex paraguariensis* y *Peumus boldus*. La infusión de *I. paraguariensis* fue la más eficaz para reducir la viabilidad de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*.

Así también, Burris *et al.* (2011) reportaron actividad antimicrobiana de extractos acuosos de yerba mate frente a *Staphylococcus aureus*. Cogo *et al.* (2010) observaron que extractos etanólicos de hojas de *I. paraguariensis* fueron capaces de inhibir el crecimiento *in vitro* de *Helicobacter pylori*, bacteria asociada con la etiopatogenia de diversas enfermedades del sistema digestivo; mientras que Tsai *et al.* (2010) demostraron los efectos antimicrobianos de extractos metanólicos de yerba mate frente a *Propionibacterium acnes*, microorganismo que, junto con *Staphylococcus epidermidis*, participa en la patogénesis del acné a través de la inducción de ciertos medidores inflamatorios y la comedogénesis.

Carelli *et al.* (2011) estudiaron el potencial antimicrobiano de extractos de hojas de *I. paraguariensis* obtenidos por extracción con CO<sub>2</sub> supercrítico. Las concentraciones de los extractos estudiados fueron de 1 mg a 0,06 mg. Observaron que los mismos presentaron actividad antibacteriana frente a *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*, mientras que las cepas ensayadas de *Acinetobacter baumannii*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* presentaron resistencia a la acción de dichos extractos.

Para la evaluación de la actividad antimicrobiana, Prado Martin *et al.* (2013), emplearon extractos de yerba mate elaborada de origen brasileño. Los extractos secos se obtuvieron utilizando el método de percolación, utilizando disoluciones hidroetanólicas e hidrometanólicas. Las cepas en estudio fueron *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enteritidis* y *Escherichia coli*. Los resultados mostraron que todos los extractos inhibieron el crecimiento de los microorganismos en estudio, a excepción de *Escherichia coli* coincidiendo con los hallazgos de este trabajo.

Estudios recientes han demostrado que el extracto acuoso de yerba mate es bactericida y presenta capacidad inhibitoria del crecimiento de patógenos bacterianos debido a que contiene compuestos fenólicos que le confieren actividad antimicrobiana (Burris *et al.*, 2011), aunque podría contener también otros compuestos que le confieren dicha propiedad (Rempe *et al.*, 2015).

En la investigación realizada por Rempe *et al.* (2015) se analizaron los extractos acuosos liofilizados de hojas secas de la yerba mate elaborada de procedencia argentina. El

extracto liofilizado se extrajo posteriormente con disolvente (metanol o acetonitrilo). La actividad antimicrobiana se ensayó empleando el método de difusión con discos frente a *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (MRSA) y *Staphylococcus aureus* sensible a la meticilina. A través de la incorporación de herramientas existentes como la GC-MS para análisis automatizado, se ha obtenido una lista clasificada de compuestos capaces de conferir actividad antimicrobiana al extracto acuoso de yerba mate contra MRSA. A través de los resultados obtenidos del análisis, se determinó la actividad antimicrobiana de compuestos puros en una concentración farmacológicamente relevante. Se determinó que el ácido 5-hidroxi-pipecólico, quercetina, ácido quínico y un compuesto no identificado podrían ser los que contribuyen a la propiedad antimicrobiana contra MRSA.

Para evaluar la actividad antimicrobiana *in vitro*, Oliveira *et al.* (2016) obtuvieron sus extractos a partir de yerba mate elaborada brasileña por medio de baño ultrasónico, los que posteriormente fueron filtrados y evaporados por liofilización a vacío. Se obtuvieron extractos hexánicos, metanólicos y acuosos de *I. paraguariensis*. Para el ensayo emplearon la técnica de microdilución en caldo frente a cepas de *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii* y *Pseudomonas aeruginosa*. Todos los extractos inhibieron el crecimiento tanto de bacterias Gram positivas como Gram negativas. Siendo el extracto acuoso el que presentó mejor inhibición frente a las cepas estudiadas (CIM = 25 µg/ml). Por otro lado, la cepa que mejor inhibió este extracto acuoso fue *Staphylococcus aureus* comparada con las otras especies.

Para entender la acción antibacteriana de *I. paraguariensis* contra bacterias Gram positivas, se ha tenido en cuenta la pared celular menos compleja que estas presentan, con menor contenido lipídico y ausencia de membrana externa comparadas con las Gram negativas. Los terpenos (carotenoides y saponinas) presentes en las plantas de este género pueden generar permeabilidad en la membrana plasmática, que resultan en alteración de la membrana lipídica del microorganismo, la cual podría ser la razón por la que presentan esta propiedad antibacteriana (Oliveira *et al.*, 2016). Se ha propuesto que la acción antimicrobiana de los extractos de plantas sobre las bacterias, tanto Gram positivas como Gram negativas, se encuentra asociada a las peculiaridades de la composición química de los extractos que actúan sobre la composición celular de los microorganismos (Carelli *et al.*, 2011).

Por otra parte, con respecto a los métodos empleados para determinar la actividad antimicrobiana, Rojas *et al.* (2005) evaluaron los métodos de pozos en agar modificado y el método de Kirby-Bauer. Estos investigadores determinaron la actividad antimicrobiana de

extractos acetónico, acuoso y etanólico de *Spilantes americana* contra *Staphylococcus aureus* ATCC 29737, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 25619, *Escherichia coli* ATCC 10536, *Streptococcus  $\beta$  hemolítico* ATCC 10389 y *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 2601. Sus resultados mostraron una correlación entre ambos métodos ( $\text{Valor-}P < 0,01$ ), siendo el método de pozos más sensible ( $\alpha = 0,05$ ) que el método de Kirby-Bauer para determinar actividad antimicrobiana. En este trabajo, en las condiciones estudiadas, no se observaron diferencias entre los métodos de difusión ensayados.

En los últimos años, se ha evaluado la acción antimicrobiana que presentan diversas plantas medicinales con el fin de darle diferentes aplicaciones, en la industria alimentaria como conservantes naturales de alimentos y bebidas, en la industria farmacéutica como cremas, cosméticos, entre otros usos.

En el estudio realizado por García Rico y Herrera Arias (2007) para evaluar la actividad antimicrobiana en extractos acuosos de *Allium sativum*, *Allium fistulosum* y *Allium cepa* frente a las cepas de *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Salmonella spp.*, hallaron que el extracto de *Allium cepa* demostró ser el más efectivo contra *Escherichia coli* y *Salmonella spp.* con halos de inhibición de 15 mm y 13 mm, respectivamente. También presentó efecto inhibitorio sobre *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*. Los extractos de *Allium sativum* y de *Allium fistulosum* no presentaron actividad inhibitoria contra *Salmonella spp.* *Allium fistulosum* exhibió el mayor potencial antibacteriano contra *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus* (8 mm), incluso presentó efecto inhibitorio contra *Bacillus cereus* y *Escherichia coli*, en este último con una baja acción antibacteriana. El extracto acuoso con menor potencial antibacteriano fue el del ajo (*Allium sativum*), siendo muy pobre su acción inhibitoria frente a *Pseudomonas aeruginosa* y no presentó actividad antibacteriana contra *Salmonella spp.* El mayor potencial inhibitorio se observó frente a *Staphylococcus aureus*, además presentó pequeños halos de inhibición contra *Escherichia coli* y *Bacillus cereus*.

Naveda González (2010) preparó los extractos crudos de tallos y de hojas-flores de ruda (*Ruta graveolens*) utilizando el método de maceración con solventes de extracción: etanol al 96 %, etanol al 48 % y agua destilada. La actividad antimicrobiana fue ensayada frente a las cepas de *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* y *Aspergillus niger*. El extracto de ruda seleccionado con mayor contenido de polifenoles presentó acción antimicrobiana frente a *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa* siendo el diámetro del halo de inhibición de 8,67 y 6 mm, respectivamente, a la mayor



concentración estudiada (22,85 mg/mL). No se encontró actividad antimicrobiana contra *Escherichia coli* y *Aspergillus niger*.

Vivot *et al.* (2012) evaluaron la actividad antibacteriana de los extractos de *Acacia bonariensis*, *Baccharis articulata*, *Blepharocalyx salicifolius*, *Castela tweedii*, *Eichhornia azurea*, *Eichhornia crassipes*, *Erythrina crista-galli*, *Gaillardia megapotamica* var. *scabiosoides*, *Hydrocotyle bonariensis*, *Ludwigia peploides*, *Pistia stratiotes*, *Phytolacca dioica*, *Porlieria microphylla*, *Senna scabriuscula*, *Schinus fasciculatus* y *Typha latifolia*. Se prepararon extractos metanólicos, hidroetanólicos y acuosos, los que fueron ensayados frente a *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina y *Escherichia coli*. Ninguno de los extractos ensayados mostró actividad frente a las bacterias Gram negativas en estudio, en cambio, siete de las especies estudiadas fueron activas frente a MRSA.

Musmeci y Lezcano (2013) ensayaron la actividad antimicrobiana de extractos de gel de aloe vera por el método de Kirby-Bauer utilizando soluciones acuosas y etanólicas al 50 y 70 % frente a cepas de *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* y *Candida albicans*. Los resultados mostraron que los extractos obtenidos utilizando como solvente etanol al 50 y 70 % presentaron acción inhibitoria *in vitro* del crecimiento de todas las cepas estudiadas, sin embargo, los halos de inhibición no superan a los 11 mm de diámetro, no obstante, a diferencia del presente trabajo, encontraron sensibilidad frente a *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*.

En la investigación realizada por Mora *et al.* (2013) prepararon extractos de té verde comercial (*Camellia sinensis*) utilizando como solventes de extracción metanol, acetona y etanol al 50 % (v/v) en agua. La evaluación de la actividad antimicrobiana se llevó a cabo mediante el método de dilución en microplacas, los extractos se evaluaron frente a *Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Aspergillus niger* y *Candida albicans*. Los resultados mostraron un efecto inhibitorio sobre *Listeria monocytogenes*, mientras que, el efecto de las muestras de té verde fue nulo frente a las demás cepas en estudio.

### 3. Porcentaje del efecto de inhibición de los extractos hidroalcohólicos secos de yerba mate elaborada

El porcentaje del efecto de inhibición (% EI) producido por los extractos ensayados contra *Salmonella enteritidis* cepa salvaje, utilizando el método de difusión con discos se puede observar en la Tabla 18 y por el método de difusión por pocillos se puede observar en las Tabla 19 y Anexo 19. Para el cálculo del porcentaje de inhibición para ambos métodos, se utilizó como control positivo ampicilina.

**Tabla 18.** Porcentaje del efecto de inhibición de crecimiento de los distintos extractos frente a *Salmonella enteritidis* cepa salvaje por el método de difusión con discos.

Cantidad de extracto (mg) Extracto ↓	Porcentaje del efecto de inhibición			
	10	8	4	2
1 ↓	35,00	31,66	30,00	26,66
2	40,00	36,66	33,33	26,66
3	30,51	27,11	27,11	20,34
4	20,00	20,00	20,00	20,00

**Referencias:** Extracto 1 = metanol:agua (60:40); extracto 2 = etanol:agua (60:40); extracto 3 = metanol:agua (70:30); extracto 4 = etanol:agua (70:30).

**Fuente:** Propia.

**Tabla 19.** Porcentaje del efecto de inhibición de crecimiento de los distintos extractos frente a *Salmonella enteritidis* cepa salvaje por el método de difusión por pocillos.

Cantidad de extracto (mg) Extracto ↓	Porcentaje del efecto de inhibición			
	10	8	4	2
1 ↓	44,07	40,68	32,20	27,11
2	43,10	37,93	29,31	20,69
3	46,55	39,66	32,76	27,59
4	20,69	20,69	20,69	20,69

**Referencias:** Extracto 1 = metanol:agua (60:40); extracto 2 = etanol:agua (60:40); extracto 3 = metanol:agua (70:30); extracto 4 = etanol:agua (70:30).

**Fuente:** Propia.

Los análisis estadísticos se realizaron teniendo en cuenta la mayor cantidad de extracto ensayado (10 mg). En el análisis de varianza realizado para el método de difusión con discos se observó que existen diferencias estadísticamente significativas entre los distintos extractos (*Valor-P* = 0,0003). El extracto 2 fue el que produjo un mayor porcentaje del efecto de inhibición, seguido por el extracto 1. Por el método de difusión por pocillos también se observaron diferencias estadísticamente significativas de los extractos 1, 2 y 3 en comparación con el extracto 4, siendo el extracto 3 el que produjo mayor porcentaje de efecto de inhibición (Anexo 22).

Los resultados de los porcentajes del efecto de inhibición producidos por los extractos hidroalcohólicos secos para *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 por el método de difusión con discos se muestran en la Tabla 20 y por el método de difusión por pocillos en la Tabla 21. Los detalles se muestran en el Anexo 20. Para el cálculo del porcentaje de inhibición para ambos métodos, se utilizó como control positivo ceftazidima.

**Tabla 20.** Porcentaje del efecto de inhibición de crecimiento de los distintos extractos frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 por el método de difusión con discos.

Cantidad de extracto (mg) ↓	Porcentaje del efecto de inhibición			
	10	8	4	2
Extracto 1 ↓	131,11	128,89	120,00	102,22
2	133,33	128,89	113,33	102,22
3	131,82	127,27	118,18	104,55
4	123,91	123,91	110,87	97,83

**Referencias:** Extracto 1 = metanol:agua (60:40); extracto 2 = etanol:agua (60:40); extracto 3 = metanol:agua (70:30); extracto 4 = etanol:agua (70:30).

**Fuente:** Propia.

**Tabla 21.** Porcentaje del efecto de inhibición de los distintos extractos frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 por el método de difusión por pocillos.

Cantidad de extracto (mg) ↓ Extracto →	Porcentaje del efecto de inhibición			
	10	8	4	2
1	136,36	136,36	127,27	113,64
2	139,53	141,86	137,21	125,58
3	135,56	137,78	124,44	111,11
4	139,53	137,21	120,93	111,63

**Referencias:** Extracto 1 = metanol:agua (60:40); extracto 2 = etanol:agua (60:40); extracto 3 = metanol:agua (70:30); extracto 4 = etanol:agua (70:30).

**Fuente:** Propia.

En el análisis de varianza no se evidenció diferencias estadísticamente significativas entre los distintos extractos utilizando el método de difusión con discos ( $Valor-P = 0,1376$ ). El extracto 2 fue el que produjo un mayor porcentaje del efecto de inhibición, seguido por el extracto 1. Por el método de difusión por pocillos, se puede observar que ninguno de los extractos difiere entre sí, siendo el extracto 3 el que presentó mayor porcentaje de halo de inhibición (Anexo 23).

En la Tabla 22 se muestran los resultados del porcentaje de efecto de inhibición obtenidos de *Staphylococcus aureus* salvaje utilizando el método de difusión con discos y en la Tabla 23 se pueden observar los resultados obtenidos con el método de difusión por pocillos (Anexo 21). Para el cálculo del porcentaje del efecto de inhibición para ambos métodos, se utilizó como control positivo ceftazidima.

**Tabla 22.** Porcentaje del efecto de inhibición de crecimiento de los distintos extractos frente a *Staphylococcus aureus* cepa salvaje por el método de difusión con discos.

Cantidad de extracto (mg) ↓ Extracto →	Porcentaje del efecto de inhibición			
	10	8	4	2
1	121,05	115,79	110,53	94,74
2	131,58	123,68	115,79	102,63
3	118,42	115,79	105,26	92,11
4	110,53	107,89	97,37	81,58

**Referencias:** Extracto 1 = metanol:agua (60:40); extracto 2 = etanol:agua (60:40); extracto 3 = metanol:agua (70:30); extracto 4 = etanol:agua (70:30).

**Fuente:** Propia.

**Tabla 23.** Porcentaje del efecto de inhibición de crecimiento de los distintos extractos frente a *Staphylococcus aureus* cepa salvaje por el método de difusión por pocillos.

Cantidad de extracto (mg) ↓ Extracto →	Porcentaje del efecto de inhibición			
	10	8	4	2
1	136,11	133,33	119,44	105,56
2	132,43	129,73	121,62	105,41
3	128,95	121,05	110,53	100,00
4	121,62	118,92	110,81	91,89

**Referencias:** Extracto 1 = metanol:agua (60:40); extracto 2 = etanol:agua (60:40); extracto 3 = metanol:agua (70:30); extracto 4 = etanol:agua (70:30).

**Fuente:** Propia.

En el análisis de varianza se pudo observar que existen diferencias estadísticamente significativas entre los distintos extractos utilizando el método de difusión con discos ( $Valor-P = 0,0314$ ). El extracto 2 produjo un porcentaje del efecto de inhibición mucho mayor que los demás extractos, seguido por el extracto 1. En cambio, con el método de difusión por pocillos, se pudo observar que los extractos 1, 2 y 3 no difieren unos de otros, y tuvieron valores superiores al extracto 4 (Anexo 24).

Ambas cepas de *Staphylococcus aureus* presentaron un mayor porcentaje de efecto de inhibición en comparación con *Salmonella enteritidis* cepa salvaje. Siendo los extractos 1 y 2 los que en general produjeron un mayor efecto inhibitorio.

#### 4. Determinación de la concentración inhibitoria mínima y concentración bactericida mínima

Los resultados obtenidos de la concentración inhibitoria mínima y concentración bactericida mínima de los extractos hidroalcohólicos secos 1 y 2 se observan en la Tabla 24 y en las figuras 25, 26, 27, 28, 29 y 30.

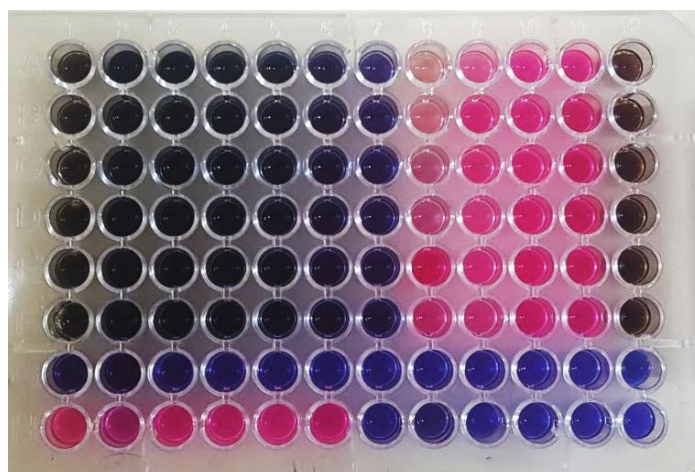
**Tabla 24.** Concentración inhibitoria mínima (CIM) y concentración bactericida mínima (CBM) de los extractos hidroalcohólicos secos de yerba mate elaborada.

	<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 25923)		<i>Staphylococcus aureus</i> (salvaje)		<i>Salmonella enteritidis</i> (salvaje)	
	E1	E2	E1	E2	E1	E2
<b>CIM</b>	0,78	0,78	1,56	0,78	6,25	6,25
<b>CBM</b>	0,78	0,78	1,56	1,56	6,25	6,25

**Referencias:** CIM = concentración inhibitoria mínima (mg/mL); CBM = concentración bactericida mínima (mg/mL); E1 = extracto 1 (metanol 60:40); E2 = extracto 2 (etanol 60:40).

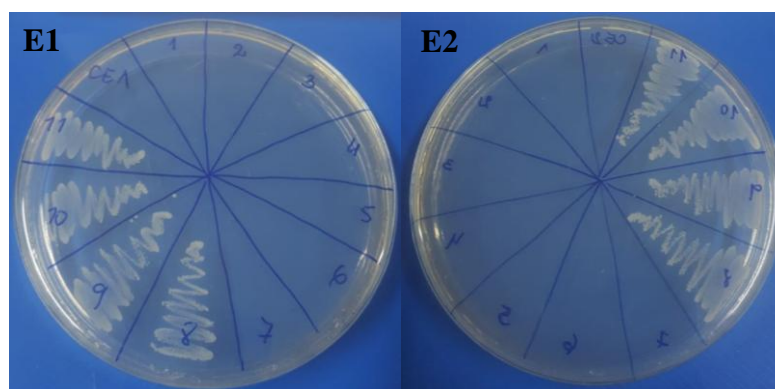
**Fuente:** Propia.

La CIM obtenida para las cepas de *Staphylococcus aureus* y *Salmonella enteritidis* coinciden con los resultados obtenidos por Prado Martin *et al.* (2013) empleando extractos hidroetanólicos (40:60) e hidrometanólicos (30:70) de yerba mate elaborada brasileña utilizando microdilución en caldo para la determinación de la CIM y el método en placas para la CBM. Por otra parte, Burriss *et al.* (2011), obtuvieron CIM y CBM más bajos para *Staphylococcus aureus* (0,025–0,05 mg/mL) con extractos acuosos de yerba mate elaborada de origen argentino. En estudios realizados en extractos hexánicos, metanólicos y acuosos de yerba mate elaborada de origen brasileño se obtuvieron similares resultados, siendo el extracto acuoso el que presentó mejor actividad antibacteriana contra *Staphylococcus aureus*, con una CIM de 0,025 mg/mL (Oliveira *et al.*, 2016).



**Figura 25.** Concentración inhibitoria mínima para *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 utilizando como revelador resazurina.

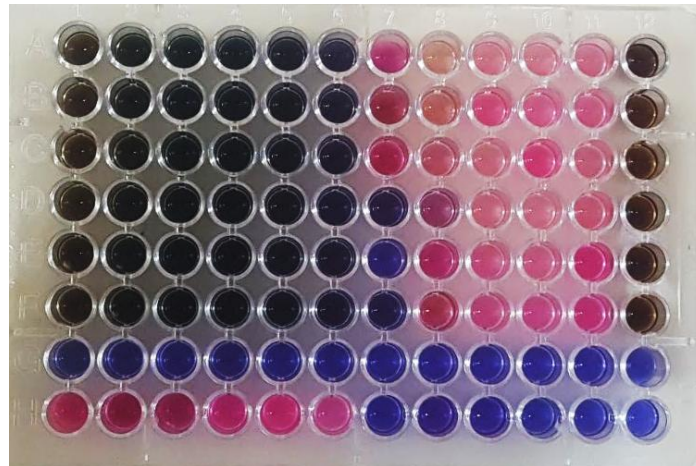
**Fuente:** Propia.



**Figura 26.** Concentración bactericida mínima para *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

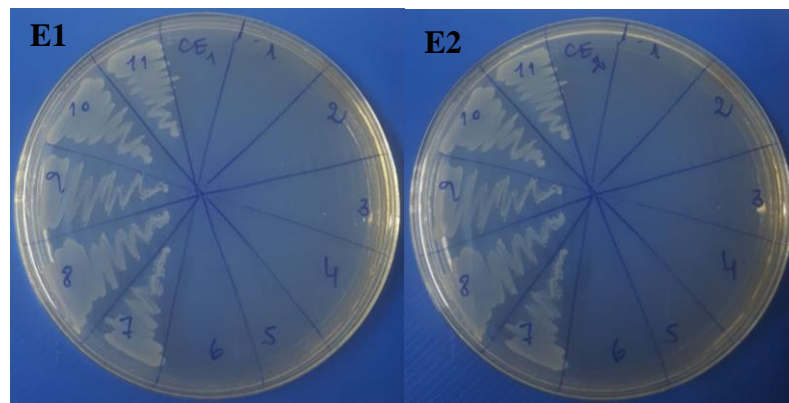
**Referencias:** E1 = extracto 1; E 2 = Extracto 2; CE1 = control de extracto 1; CE2 = control de extracto 2; 1-11 = siembra de los pocillos de las concentraciones de los extractos de 50 – 0,049 mg/mL.

**Fuente:** Propia.



**Figura 27.** Concentración inhibitoria mínima para *Staphylococcus aureus* cepa salvaje utilizando como revelador resazurina.

**Fuente:** Propia.

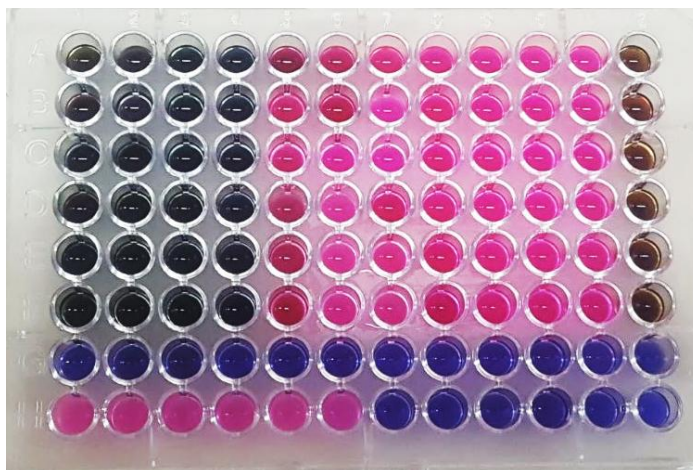


**Figura 28.** Concentración bactericida mínima para *Staphylococcus aureus* cepa salvaje.

**Referencias:** E1 = extracto 1; E= Extracto 2; CE1 = control de extracto 1; CE2 = control de extracto 2; 1-11 = siembra de los pocillos de las concentraciones de los extractos de 50 – 0,049 mg/mL.

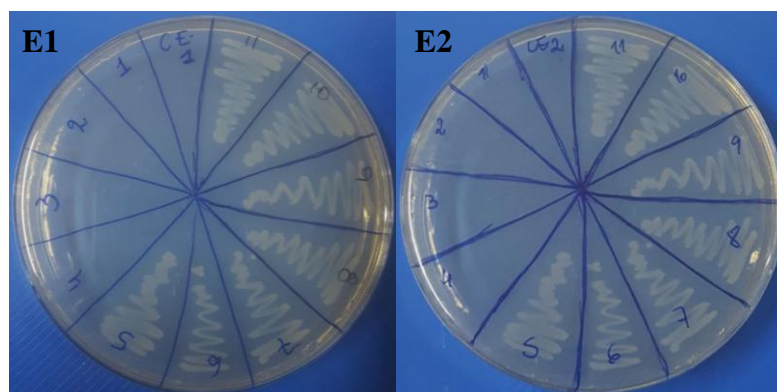
**Fuente:** Propia.





**Figura 29.** Concentración inhibitoria mínima para *Salmonella enteritidis* cepa salvaje utilizando como revelador resazurina.

**Fuente:** Propia.



**Figura 30.** Concentración bactericida mínima para *Salmonella enteritidis* cepa salvaje.

**Referencias:** E1 = extracto 1; E= Extracto 2; CE1 = control de extracto 1; CE2 = control de extracto 2; 1-11 = siembra de los pocillos de las concentraciones de los extractos de 50 – 0,049 mg/mL.

**Fuente:** Propia.

## 5. Análisis fitoquímico preliminar de los extractos hidroalcohólicos secos de yerba mate elaborada

El análisis fitoquímico permite evaluar cualitativamente la composición de los extractos en estudio. Partiendo de estos resultados, resulta posible la orientación de investigaciones posteriores para determinar la actividad biológica de las especies en estudio y los principios activos involucrados, puesto que cada uno de ellos se encuentra relacionado con actividades biológicas específicas (Carvajal Rojas *et al.*, 2009). En este trabajo de investigación, se realizó un análisis fitoquímico preliminar de los extractos hidroalcohólicos secos 1 y 2, metanol en proporción 60:40 y etanol 60:40, respectivamente. Como puede observarse en la Tabla 25, en el extracto 1 se detectó, en las condiciones ensayadas, mayor concentración de taninos y saponinas, mientras que en el extracto 2, se detectó mayor cantidad de flavonoides. Por otra parte, en ninguno de ellos se pudo corroborar la presencia de alcaloides.

**Tabla 25.** Análisis fitoquímico preliminar de extractos hidroalcohólicos secos de yerba mate elaborada.

Metabolitos secundarios	Extracto 1	Extracto 2
Taninos	++	+
Flavonoides	+	++
Saponinas	++	+
Alcaloides	-	-

**Referencias:** (+) = presencia escasa; (++) = presencia relativamente abundante; (+++) = presencia abundante; (-) = no detectado; extracto 1 = metanol:agua (60:40); extracto 2 = etanol:agua (60:40).

**Fuente:** Propia.

Como ya se mencionó anteriormente, dependiendo del método de extracción, los extractos pueden presentar diferentes actividades inhibitorias contra los microorganismos en estudio debido a la capacidad de los solventes de extraer los diferentes componentes (Oliveira *et al.*, 2016).

La composición química de la yerba mate puede ser influenciada cualitativa como cuantitativamente, de acuerdo al tipo de material que se analice, como la hoja fresca o bien la yerba mate elaborada, contenga o no palos y de acuerdo al proceso de elaboración a la que se ha expuesto, debido a que, en ciertas ocasiones, el procesamiento puede alterar a través de reacciones de oxidación o reducción la composición de las moléculas activas. Otros factores

que influyen son: la procedencia de la materia prima, es decir, factores agronómicos, climáticos y prácticas culturales, son variables que pueden alterar el contenido de metabolitos presentes en la yerba mate (Del Valle Argüello y Scipioni, 2015).

Por tanto, durante el procesamiento industrial se pueden modificar tanto la composición química como el sabor del producto final. Las etapas de tostado, secado y trituración son las que más afectan (Zaions *et al.*, 2014). Para la obtención del chimarrão, el procesamiento es distinto, se obtiene por un proceso de escaldado, empleando altas temperaturas, entre 180 a 240 °C durante 5 minutos, con el objetivo de inactivar las enzimas y mejorar el sabor. Este proceso conduce a alteraciones en ciertos constituyentes químicos, promoviendo reacciones de reordenamiento, de oxidación o de reducción de moléculas bioactivas (Dartora *et al.*, 2011). Algunos autores han reportado una pérdida de hasta un 20 % de cafeína durante el procesamiento industrial, siendo el secado la etapa más destructiva. Sin embargo, en otros trabajos se han reportado un aumento en las concentraciones de metilxantinas y de cafeoil derivados en yerba sapecada, respecto de la yerba verde (Bastos *et al.*, 2006; Isolabella *et al.*, 2010; Del Valle Argüello y Scipioni, 2015).

En la investigación realizada por De Biasi *et al.* (2009) estudiaron extractos hidroalcohólicos preparados a partir de las hojas y de las ramas de *I. paraguariensis* con y sin exposición al sol. Los extractos de las ramas sin exposición al sol produjeron mayores halos de inhibición de crecimiento de los diferentes microorganismos ensayados. *Staphylococcus aureus* fue el microorganismo más sensible a los extractos con exposición al sol, mientras que, *Proteus mirabilis* fue el más sensible a los extractos sin exposición al sol. *Escherichia coli* fue resistente para todos los extractos preparados. Los extractos de las hojas sin exposición al sol presentaron menor tamaño en el diámetro del halo de inhibición. Estos extractos fueron los únicos que mostraron resistencia frente a todos los microorganismos en estudio, en su menor concentración ensayada; lo que se podría atribuir a que los compuestos químicos responsables de la acción antimicrobiana se encuentran ausentes o presentes en bajas concentraciones en este caso. Los resultados obtenidos por dichos investigadores indicaron que la actividad antimicrobiana de *I. paraguariensis* sufre interferencia durante la exposición al sol.

Según el análisis comparativo realizado por Dartora *et al.* (2011), las hojas cultivadas al sol presentan mayor contenido de derivados de cafeoil, cafeína, teobromina y rutina, en comparación con los cultivados a la sombra. Además, observaron que las hojas procesadas de chimarrão sufren una disminución en la concentración de xantinas, mientras que, las oxidadas

tienen una menor concentración de fenólicos, en comparación con las hojas verdes. Sin embargo, las hojas sometidas a escaldado y secado (tipo chimarrão), presentan más compuestos fenólicos.

Se ha demostrado que, durante la exposición a la luz, el método de secado y la edad de las hojas influyen en la concentración de los compuestos presentes en la yerba mate. Heck y De Mejia (2007) analizaron los cambios en las concentraciones de cafeína, teobromina, phytol, vitamina E, escualeno y estigmasterol. Los resultados mostraron que las muestras protegidas de la luz contenían un aumento de las concentraciones de cafeína, teobromina, phytol y estigmasterol esteroide, haciendo hincapié que la cafeína y la teobromina fueron tres veces más altas. En cuanto a la vitamina E, esta no presentó variación durante la exposición a la luz. Las hojas más jóvenes mostraron concentraciones altas de compuestos. En relación al método de secado, el secado por microondas permitió mayor retención de compuestos en comparación con el secado al vacío.

## **6. Determinación del contenido de polifenoles totales**

### **6.1. Curva de calibración**

La curva de calibración utilizando como patrón ácido gálico fue realizada representando la absorbancia leída (valor medio) en función de la concentración de ácido gálico. Los valores de absorbancias de las diluciones de ácido gálico y la curva de calibración se presentan en el Anexo 25.

### **6.2. Determinación de polifenoles totales en los extractos hidroalcohólicos secos y en la yerba mate elaborada**

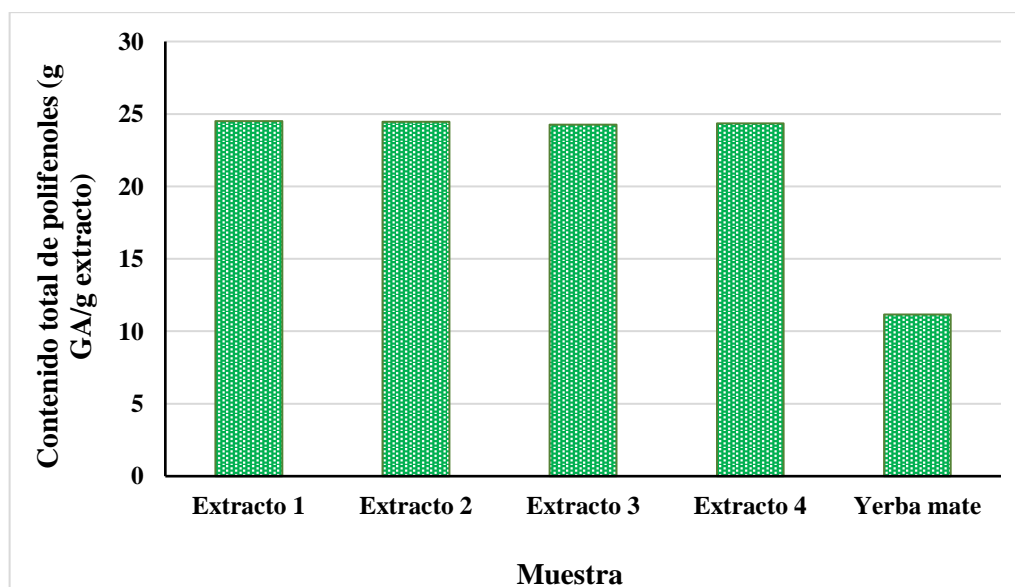
En la Tabla 26 y Figura 31 se muestran los valores obtenidos del contenido de polifenoles totales de los extractos hidroalcohólicos secos preparados y de la yerba mate elaborada. En todos los extractos se hallaron compuestos polifenólicos en cantidades significativas.

**Tabla 26.** Contenido de polifenoles totales en los extractos hidroalcohólicos secos y en la yerba mate elaborada.

M	Peso (g)	Abs	MS (g %)	Pendiente	D intercepto	WT	$\bar{X}$	DS	CV %	EE
E1	0,5174	0,245	91,70	0,0101	0,0082	24,71	24,50	0,30	1,20	0,15
	0,5174	0,241	91,70	0,0101	0,0082	24,29				
E2	0,5102	0,241	92,50	0,0101	0,0082	24,42	24,47	0,07	0,30	0,04
	0,5102	0,242	92,50	0,0101	0,0082	24,53				
E3	0,5085	0,244	93,20	0,0101	0,0082	24,63	24,27	0,52	2,13	0,26
	0,5085	0,237	93,20	0,0101	0,0082	23,90				
E4	0,5106	0,243	93,50	0,0101	0,0082	24,35	24,35	0,00	0,00	0,00
	0,5106	0,243	93,50	0,0101	0,0082	24,35				
YM	0,2041	0,250	92,70	0,0108	0,0152	11,49	11,16	0,46	4,11	0,23
	0,2041	0,248	92,70	0,0108	0,0152	11,39				
	0,2056	0,231	92,70	0,0108	0,0152	10,48				
	0,2056	0,247	92,70	0,0108	0,0152	11,26				

**Referencias:** M = muestra; Abs = absorbancia; MS = materia seca; WT = contenido total de polifenoles en g EAG/100 g de muestra seca;  $\bar{X}$  = promedio general; DS = desvío estándar; CV = coeficiente de variación; EE = error estándar; E1 = extracto 1; E2 = extracto 2; E3 = extracto 3; E4 = extracto 4; YM = yerba mate elaborada.

**Fuente:** Propia.



**Figura 31.** Contenido de polifenoles totales de los extractos hidroalcohólicos secos y de yerba mate elaborada.

**Fuente:** Propia.

El contenido de polifenoles totales de los extractos secos fue de 24,27–24,5 g EAG/100 g de extracto seco, mientras que el contenido en la yerba mate elaborada fue de 11,16 g EAG/100 g muestra seca. En la Tabla 26 se puede observar que en el extracto 1 se obtuvo una mayor cantidad de polifenoles totales (24,5 g EGA/g extracto), sin embargo, de acuerdo con el análisis de varianza, no existen diferencias estadísticamente significativas entre los extractos con respecto al contenido de polifenoles totales, pero si en comparación con el contenido de yerba mate elaborada (Anexo 26). El contenido de polifenoles en los extractos hidroalcohólicos secos duplica al de la yerba mate elaborada.

Los valores de polifenoles totales, en este estudio, superan a los obtenidos por Prado Martin *et al.* (2013). Estos investigadores encontraron contenidos de polifenoles en los extractos hidroetanólicos e hidrometanólicos secos de yerba mate de 19,39–17,30 g EAG/100 g, respectivamente, empleando como método de extracción la percolación. Por lo que se podría inferir que la combinación de los métodos de maceración y sonicación favorecerían la extracción de los compuestos fenólicos cuando se realizan extracciones hidroalcohólicas o bien las diferencias se podrían deber al tipo de muestra utilizada. Por otro lado, Sari *et al.* (2007), obtuvieron a partir de té de yerba mate extractos acuosos al 50 % de DMF, etanol, metanol y acetona, en los que el contenido de polifenoles varió entre 11,93–97,01 g EAG/100 g, dependiendo del solvente y el tiempo de extracción.

Los niveles de polifenoles en extractos de yerba mate son mayores que los que se encuentran en el té verde y son similares a los encontrados en el vino tinto. Existen factores que pueden afectar la cantidad de polifenoles extraídos de la yerba mate, tales como, el método de consumo. La preparación de la infusión con agua fría, denominada tereré, ha demostrado la extracción de casi todos los fenoles. Se ha encontrado también que las hojas verdes contienen concentraciones significativas más bajas de compuestos activos, derivados de cafeoil, metilxantinas y flavonoides, en comparación con las hojas sometidas al procesamiento de secado y almacenado. Los extractos de yerba mate han demostrado ser ricos en ácidos clorogénicos y pobres en catequinas (Burris *et al.*, 2012). Los principales compuestos fenólicos encontrados en los extractos acuosos y etanólicos de yerba mate verde brasileña fueron: ácido cafeico, ácido quínico, cafeoil glucosa, ácido cafeoilquínico, ácido feruloilquínico, ácido dicafeoilquínico y rutina. Luego del tostado se forman otros dos compuestos: ácido cafeoilshikímico y ácido dicafeoilshikímico (Peres *et al.*, 2013).

Rodríguez Vaquero *et al.* (2010), emplearon infusiones de hierbas comerciales de origen argentino. Se determinó el contenido de polifenoles totales de extractos acuosos de *Lippia integrifolia*, *Mentha piperita*, *Lippia turbinata*, *Wendtia calysina*, *Chenopodioum ambrosioides*, *Minthostachys verticillata*, *Peumus boldus*, *Aloysia citriodora* e *Ilex paraguaiensis*, mediante el método de Folin-Ciocalteu. El contenido de polifenoles totales en *Ilex paraguariensis* fue mayor que en las demás hierbas, seguido por *Lippia integrifolia* y *Mentha piperita* (0,925, 0,916 y 0,910 g EAG/ L, respectivamente).

Naveda González (2010) preparó extractos crudos de tallos y de hojas–flores de ruda (*Ruta graveolens*) utilizando el método de maceración con solventes de extracción: etanol al 96 %, etanol al 48 % y agua destilada. El contenido de polifenoles totales se determinó mediante el método de Folin–Ciocalteu. Los resultados mostraron valores de polifenoles totales en un rango de 0,072–0,217 g EAG/ 100 mL, siendo el mayor valor obtenido con el extracto etanólico al 48 %.

En la investigación realizada por Mora *et al.* (2013), prepararon extractos de té verde comercial (*Camellia sinensis*) utilizando como solventes de extracción metanol, acetona y etanol al 50 % (v/v) en agua. Determinaron el contenido de polifenoles totales utilizando el método de Folin–Ciocalteu, el ácido gálico fue el material de referencia. Los resultados mostraron que, con metanol, el contenido de polifenoles totales fue de 18,1 g EAG/ 100 g, con acetona 23,4 g EAG/ 100 g y con etanol 33,4 g EAG/ 100 g. El etanol fue el solvente que mostró mayor eficiencia en la extracción de polifenoles a partir de las muestras de té verde.

En este trabajo se encontró actividad antimicrobiana *in vitro* de los extractos hidroalcohólicos secos de yerba mate elaborada como otros autores contra cepas de bacterias de importancia en alimentos. Por lo que se puede inferir que posiblemente contienen compuestos que podrían inhibir el desarrollo de microorganismos cuando se hallan presentes en alimentos. La aplicación de la yerba mate como agente antimicrobiano en los alimentos es un concepto relativamente reciente, que aún no ha sido estudiado y revisado completamente. Se ha comprobado que extractos brutos como el té (infusión) y compuestos derivados de yerba mate, presentan un amplio espectro de inhibición contra bacterias Gram positivas y Gram negativas (Burriss *et al.*, 2012).

Aun no se han verificado completamente los compuestos responsables de la actividad antimicrobiana presentes en la yerba mate, ni los efectos sinérgicos que puedan tener. Los posibles compuestos que pueden contribuir a la actividad antimicrobiana son los ácidos cafeico y clorogénico, que actúan sobre bacterias Gram negativas; y el kaempferol y la quercetina que son flavonoles capaces de inhibir el crecimiento de *Staphylococcus aureus* (Burris *et al.*, 2012).

Las investigaciones realizadas sobre el aislamiento y la identificación de compuestos que le confieren actividad antimicrobiana a la yerba mate son relativamente limitadas.



# **CAPÍTULO IV**

## **CONCLUSIONES**

## CONCLUSIONES

Se obtuvieron dos extractos hidroetanólicos y dos extractos hidrometanólicos a partir de yerba mate elaborada procedente de Paraguay. El secado de los extractos hidroalcohólicos de la yerba mate elaborada permitió la obtención de extractos de consistencia de polvo seco.

El tipo de solvente y proporción alcohol:agua no influyeron en los rendimientos de los extractos cuyos valores variaron entre 16,41 y 22,69 %.

Las distintas cantidades de los extractos secos de yerba mate elaborada, en las condiciones ensayadas, presentaron actividad antibacteriana contra *Staphylococcus aureus* cepa salvaje, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Salmonella enteritidis* cepa salvaje. En cambio, para *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 no presentaron halos de inhibición de crecimiento para ninguna de las cantidades de los extractos ensayados.

Todos los extractos ensayados fueron activos frente a las cepas de *Staphylococcus aureus*, mientras que, con el extracto 4 (etanol:agua; 70:30) no mostraron actividad frente la cepa de *Salmonella enteritidis*, tanto por el método de difusión con discos como por el método de difusión por pocillos, en las condiciones ensayadas.

Los extractos 1 y 2 tuvieron mayor poder inhibitorio de las cepas:

- *Staphylococcus aureus* cepa salvaje y ATCC 25923, presentaron halos de inhibición de crecimiento de mayor tamaño con porcentajes inhibitorios mayores al 100 %, CIM y CBM entre 0,78 y 1,56 mg/mL.
- *Salmonella enteritidis* cepa salvaje presentaron porcentajes inhibitorios por debajo del 50 % con CIM y CBM de 6,25 mg/mL.

Ambos métodos de difusión con discos y difusión por pocillos resultaron adecuados para la detección de la actividad antibacteriana *in vitro* de los extractos hidroalcohólicos secos de yerba mate.

Los resultados del análisis fitoquímico preliminar efectuado sobre los extractos hidroalcohólicos secos evidencian la presencia de taninos, saponinas y flavonoides, mientras que no se observó presencia de alcaloides.

Los extractos hidroalcohólicos secos de yerba mate elaborada presentan un mayor contenido de polifenoles totales que la yerba mate elaborada.

Los hallazgos en este estudio sugieren que los extractos hidroalcohólicos secos de yerba mate elaborada procedente de Paraguay poseen compuestos que contienen propiedades antibacterianas capaces de inhibir el crecimiento de *Staphylococcus aureus* y *Salmonella enteritidis* cuando se utilizan soluciones hidroalcohólicas de etanol o metanol en una proporción 60:40.

Actualmente, no se han reportado estudios de actividad antibacteriana *in vitro* realizados a la yerba mate elaborada procedente de Paraguay, convirtiéndose este en el primer reporte de actividad antibacteriana para este producto.

Si bien, las investigaciones son limitadas en cuanto a la eficacia de la yerba mate elaborada como antimicrobiano y su capacidad para conservar alimentos y bebidas, los hallazgos de esta investigación podrían contribuir a su potencial uso como conservante natural en la industria alimenticia, situándola como una alternativa prometedora capaz de complementar o de reemplazar a productos químicos sintéticos para la preservación microbiológica de alimentos.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica (2013) *Farmacopea Argentina*. 7<sup>a</sup> ed. Buenos Aires: ANMAT.

Agencia Nacional de Vigilancia Sanitaria (2010) *Farmacopea Brasileña*. 5<sup>a</sup> ed. Brasilia: ANVISA.

Aguilar González, A. E. y López Malo, A. (2013) “Extractos y aceite esencial del clavo de olor (*Syzygium aromaticum*) y su potencial aplicación como agentes antimicrobianos en alimentos”, *Departamento de Ingeniería Química, Alimentos y Ambiental*, 7, pp. 35-39. Disponible en: <http://web.udlap.mx/tsia/files/2014/12/TSIA-72-Aguilar-Gonzalez-et-al-2013.pdf> (consultado 20-12-17)

Arango, G. J. (2002) *Alcaloides y compuestos nitrogenados*. Universidad de Antioquia. Disponible en: <http://farmacia.udea.edu.co/~ff/alcaloides2001.pdf> (consultado 19-12-17).

Bermúdez Cañete, M. P. (2010) *Uso industrial de plantas aromáticas y medicinales*. Universidad Politécnica de Madrid. Disponible en: <http://ocw.upm.es/ingenieria-agroforestal/uso-industrial-de-plantas-aromaticas-y-medicinales/material-de-clase> (consultado 13-02-18).

Bauer, A. W., Kirby, W. M. M., Sherris, J. C. y Turck, M. (1966) “Antibiotic susceptibility testing by standardized single disk method”, *The American Journal of Clinical Pathology*, 45(4), pp. 493-496.

Bastos, D. H. M., Fornari, A. C, Queiroz, Y. S. y Torres E. A. F. S. (2006) “Bioactive compounds content of chimarrão infusions related to the moisture of yerba mate (*Ilex paraguariensis*) leaves”, *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 49(3), pp. 399-404.

Bastos, D. H. M., Moura de Oliveira, D., Teixeira Matsumoto, R. L., Oliveira Carvalho, P. y Lima Ribeiro, M. (2007) “Yerba mate: pharmacological properties, research and biotechnology”, *Medicinal and Aromatic Plant Science and Biotechnology*, 1(1), pp.37-46.

Beal, P., Faion, A. M, Cichoski, A. J, Cansian, R. L, Valduga, A. T, De Oliveira, D. y Valduga, E. (2011) “Oxidative stability of fermented Italian-type sausages using mate leaves (*Ilex paraguariensis* St. Hil) extract as natural antioxidant”, *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 62(7), pp. 703-710.

Bergottini, V. M., Hervé, V., Sosa, D. A., Otegui, M. B., Zapata, P. D. y Junier, P. (2017) “Exploring the diversity of the root-associated microbiome of *Ilex paraguariensis* St. Hil. (Yerba Mate)”, *Applied Soil Ecology*, 109, pp. 23-31.

Burris, K. P., Davidson, P. M., Stewart, C. N y Harte, F. M. (2011) “Antimicrobial activity of yerba mate (*Ilex paraguariensis*) aqueous extracts against *Escherichia coli* O157:H7 and *Staphylococcus aureus*”, *Journal of Food Science*, 76(6), pp. 456-463.

Burris, K. P., Harte, F. M., Davidson, P. M. y Stewart, C. N. (2012a) “Composition and bioactive properties of yerba mate (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil.): a review”, *Chilean Journal of Agricultural Research*, 72(2), pp. 268-275.

Burris, K. P., Davidson, P. M., Stewart, C. N., Zivanovic, S. y Harte, F. M. (2012b) “Aqueous extracts of yerba mate (*Ilex paraguariensis*) as a natural antimicrobial against *Escherichia coli* O157:H7 in a microbiological medium and pH 6.0 apple juice”, *Journal of Food Protection*, 75(4), pp. 753-757.

Butiuk, A. P., Martos, M. A., Adachi, O. y Hours, R. A. (2016) “Study of the chlorogenic acid content in yerba mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.): Effect of plant fraction, processing step and harvesting season”, *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*, 3(1), pp. 27-33.

Blum-Silva, C. H., Chaves, V. C., Schenkel, E. P., Coelho, G. C. y Reginatto, F. H. (2015) “The influence of leaf age on methylxanthines, total phenolic content, and free radical scavenging capacity of *Ilex paraguariensis* aqueous extracts”, *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 25(1), pp. 1-6.

Bojić, M., Haas V. S., Šarić, D. y Maleš, Z. (2013) “Determination of flavonoids, phenolic acids, and xanthines in mate tea (*Ilex paraguariensis* St.-Hil.)”, *Journal of Analytical Methods in Chemistry*, article ID 658596, pp. 1-6.

Carvajal Rojas, L.C., Hata Uribe, Y. H., Sierra Martínez, N. S. y Rueda Niño, D. (2009) “Análisis fitoquímico preliminar de hojas, tallos y semillas de cupatá (*Strychnos schultesiana* Krukoff)”, *Revista Colombia Forestal*, 12, pp. 161-170.

Cardozo Junior, E. L., Donaduzzi, C. M., Ferrarese-Filho, O., Friedrich, J. C., Gonela, A. y Sturion, J. A. (2010) “Quantitative genetic analysis of methylxanthines and phenolic compounds in mate progenies”, *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 45(2), pp. 171-177.

Cardozo Junior, E. L. y Morand, C. (2016) “Interest of mate (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil.) as a new natural functional food to preserve human cardiovascular health - a review”, *Journal of Functional Foods*, 21, pp. 440-454.

Carelli, G., Macedo, S. M. D., Valduga, A. T., Corazza, M. L., Oliveira, J. V, Franceschi, E., Vidal, R. y Jaskulski, M. R. (2011) “Avaliação preliminar da atividade antimicrobiana do extrato de erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil.) obtido por extração com CO<sub>2</sub> supercrítico”, *Revista Brasileira de Plantas Medicinai*s, 13(1), pp. 110-115.

Carrillo, M. L., Castillo, L. N. y Mauricio, R. (2011) “Evaluación de la actividad antimicrobiana de extractos de propóleos de la Huasteca Potosina (México)”, *Información Tecnológica*, 22(5), pp. 21-28.

Carrión Jara, A. V. y García Gómez, C. R. (2010) *Preparación de extractos vegetales: determinación de eficiencia de metódica*. Tesis de Grado. Universidad de Cuenca. Disponible en: <http://dspace.ucuenca.edu.ec/bitstream/123456789/2483/1/tq1005.pdf> (consultado: 17-11-17).

Cascales, J., Bracco, M., Poggio, L. y Gottlieb, A. M. (2014) “Genetic diversity of wild germplasm of yerba mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) from Uruguay”, *Genética*, 142(6), pp. 563-573.

Castaño Castrillón, J. J., Quintero, G. P. y Vargas, R. L. (2000) “Caracterización del rendimiento de extracción y del contenido de sólidos solubles de la bebida de café”, *Cenicafé*, 51 (3), pp. 185-195.

Clinical and Laboratory Standards Institute (2015), *M02-A12: Performance standards for antimicrobial disk susceptibility-approved standard*. 12<sup>a</sup> ed. 35(1), Pennsylvania, CLSI.

Clinical and Laboratory Standards Institute (2012), *M07-A9: Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically-approved standard*. 9<sup>a</sup> ed. 32(2), Pennsylvania, CLSI.

Cogo, L. L., Bastos Monteiro, C. L., Dallarmi Miguel, M., Gomes Miguel, O., Machado Cunico, M., Lima Ribeiro, M., Ramalho de Camargo, E., Botão Kussen, G. M., Da Silva Nogueira, K. y Dalla Costa, L. M. (2010) “Anti-*Helicobacter pylori* activity of plant extracts traditionally used for the treatment of gastrointestinal disorders”, *Brazilian Journal of Microbiology*, 41, pp. 304-309.

Colpo, A. C., Hemerson, R., Lima, M. E., Pazzini, C. E. F., Camargo, V. B., Bassante, F. E. M., Puntel, R., Silva Ávila, D., Mendez, A. y Folmer, V. (2016) “Yerba mate (*Ilex paraguariensis* St. Hill.)-based beverages: How successive extraction influences the extract composition and its capacity to chelate iron and scavenge free radicals”, *Food Chemistry*, 209, pp. 185-195.

Da Costa Borges, J. (2016) *Atividade antimicrobiana de extrato de Brosimum gaudichaudii Trécul. contra bacterias isoladas de lesões de pés diabéticos*. Tesis de Maestría. Universidade Federal do Tocantins. Disponible en: <http://repositorio.uft.edu.br> (consultado 18-12-17).

Dartora, N., De Souza, L. M., Santana-Filho, A. P., Iacomini, M., Valduga, A. T., Gorin, P. A. J. y Sasaki, G. L. (2011) “UPLC-PDA-MS evaluation of bioactive compounds from leaves of *Ilex paraguariensis* with different growth conditions, treatments and ageing”, *Food Chemistry*, 129(4), pp. 1453-1461.

De Biasi, B., Grazziotin, N.A. y Hofmann, A. E. (2009) “Atividade antimicrobiana dos extratos de folhas e ramos da *Ilex paraguariensis* A. St.-Hil., Aquifoliaceae”, *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 19(2 B), pp. 582-585.

De la Fuente Salcido, N. M. de la y Barboza Corona, J. E. (2010) “Inocuidad y bioconservación de alimentos”, *Acta Universitaria*, 20(1), pp. 43-52.

De la Fuente Salcido, N. M, Villareal Prieto, J. M., Díaz León, M. A. y García Pérez, A. P. (2016) “Evaluación de la actividad de los agentes antimicrobianos ante el desafío de la resistencia bacteriana”, *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 46(2), pp. 7-16.

Del Valle Argüello B. y Scipioni, G. P. (2015) “Composición química I: polifenoles y metilxantinas” en Schmalko, M., Prat, S. y Kanzi, R. *La yerba mate: tecnología de la producción y propiedades*. Posadas, Misiones: Editorial Universitaria, pp. 205-220.

Del Valle Argüello B. y Scipioni, G. P. (2015) “Composición química II: Saponinas, compuestos responsables del aroma y del sabor, pigmentos, compuestos aromáticos policíclicos y otros compuestos orgánicos” en Schmalko, M., Prat, S. y Kanzi, R. *La yerba mate: tecnología de la producción y propiedades*. Posadas, Misiones: Editorial Universitaria, pp. 229-234.

Degen de Arrúa, R., González, Y. y González de García, M. (2011) “Análisis de la yerba mate elaborada compuesta, comercializada en Asunción y Gran Asunción, Paraguay”, *Rojasiana*, 10(2), pp. 81-91.

Escalada, G., Brumovsky, L. A. y Hartwig V. G. (2011) “Influencia de la zona de cultivo y procesamiento de la yerba mate sobre su contenido de polifenoles totales y capacidad antioxidante”, *Revista de Ciencia y Tecnología*, 15, pp. 66-74.

Faion, A. M., Beal, P., Ril, F. T., Cichoski, A. J., Cansian, R. L., Valduga, A. T., De Oliveira, D. y Valduga, E. (2015) “Influence of the addition of natural antioxidant from mate leaves (*Ilex paraguariensis* St. Hill) on the chemical, microbiological and sensory characteristics of different formulations of Prato cheese”, *Journal of Food Science and Technology*, 52(3), pp. 1516-1524.

Falconi, A., Gutiérrez, M., Benedetto, L., Albin-Carriquiry, J. A., Bracesco, N. y Torterolo, P. (2013) “Waking-promoting action of yerba mate (*Ilex paraguariensis*)”, *Sleep Science*, 6(1), pp. 9-15.

Fernandes, E. S., De Oliveira Machado, M., Minuzzi Becker, A. Andrade, F. Maraschin, M. y Da Silva, E. L. (2012) “Yerba mate (*Ilex paraguariensis*) enhances the gene modulation and activity of paraoxonase-2: In vitro and in vivo studies”, *Nutrition*, 28(11-12), pp. 1157-1164.

Filip, R., Davicino, R. y Anesini, C. (2010) “Antifungal activity of the aqueous extract of *Ilex paraguariensis* against *Malassezia furfur*”, *Phytotherapy Research*, 24, pp. 715-719.

Food and Agriculture Organization (FAO) (2011) “Prevención de la *E. coli* en los alimentos. El marco de gestión de crisis para la cadena alimentaria (FCC)”, pp. 4-13. Disponible en: <http://www.fao.org/> (consultado 14-12-17).

Gaitán, A. y Vassia, A. (2015) *Desarrollo de caramelos duros expectorantes, antisépticos y analgésicos a base de plantas medicinales*. Tesis de grado. Universidad Católica de Córdoba. Disponible en: <http://pa.bibdigital.uccor.edu.ar/> (consultado 16-11-17).

García-García, R. M. y Palou-García, E. (2008) “Mecanismo de acción antimicrobiana de timol y carvacrol sobre microorganismos de interés en alimentos”, *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos*, 2, pp. 41-51.



García, T. E., Uribe García, A., Díaz Ramos, S. G. y García López, P. M. (2016) “Evaluación del rendimiento de extractos en hojas de *Ricinus communis L.*”, *Conciencia Tecnológica*, (52), pp. 12-18.

García Rico, R. O. y Herrera Arias, F. C. (2007) “Evaluación de la inhibición del crecimiento de cinco cepas bacterianas patógenas por extractos acuosos de *Allium sativum*, *Allium fistulosum* y *Allium cepa*: estudio preliminar *in vitro*”, *Bistua: Revista de la Facultad de Ciencias Básicas*, 5(2), pp. 68-79

Girolometto, G., Avancini, C. A. M., Carvalho, H. H. C y Wiest, J. M. (2009) “Antibacterial activity of yerba mate (*Ilex paraguariensis* A.St.-Hil.)” *Revista Brasileira de Plantas Medicinai*s, 11(1), pp. 49-55.

Guerrero, J. A. (2016) *Protocolo de vigilancia en salud pública: enfermedades transmitidas por alimentos*. Colombia: Instituto Nacional De Salud.

Guntero, V. A., Longo, M. B., Ciparicci, S. A., Martini, R. E. y Andreatta, A. E. “Comparación de métodos de extracción de polifenoles a partir de residuos de la industria vitivinícola”, *VIII Congreso de Ingeniería Química – Tercera Jornadas Argentinas de Seguridad de Procesos*. Buenos Aires, Argentina 2 al 5 de agosto de 2015. Buenos Aires: Asociación Argentina de Ingenieros Químicos.

Heck, C. I. y De Mejia, E. G. (2007) “Yerba mate tea (*Ilex paraguariensis*): A comprehensive review on chemistry, health implications, and technological considerations”, *Journal of Food Science*, 72(9), pp. 138-151.

International Organization for Standardization (2005), *ISO 14502-1: Determination of substances characteristic of green and black tea - Content of total polyphenols in tea - Colorimetric method using Folin- Ciocalteu reagent*. Switzerland: ISO.

Isolabella, S., Cogoi, L., López, P., Anesini, C., Ferraro, G. y Filip, R. (2010) “Study of the bioactive compounds variation during yerba mate (*Ilex paraguariensis*) processing”, *Food Chemistry*, 122(3), pp. 695-699.

Känzig, R. G., Schamlko, M. E y Núñez, J. C. (2015) “El procesamiento primario” en Schamlko, M., Prat, S. y Kanzi, R. *La yerba mate: tecnología de la producción y propiedades*. Posadas, Misiones: Editorial Universitaria, pp. 91-104.

Känzig, R. G., Kotik, B. y Núñez, J. C. (2015) “El estacionamiento y la molienda” en Schmalko, M., Prat, S. y Kanzi, R. *La yerba mate: tecnología de la producción y propiedades*. Posadas, Misiones: Editorial Universitaria, pp. 109-116.

Lima, I. F. P., De Dea Lindner, J., Soccol, V. T., Parada, J. L. y Soccol, C. R. (2012) “Development of an innovative nutraceutical fermented beverage from herbal mate (*Ilex paraguariensis* A.St.-Hil.) extract”, *International Journal of Molecular Sciences*, 13(1), pp. 788-800.

Lizcano, A. y Vergara, J. (2008) *Evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos etanólicos y/o aceites esenciales de las especies vegetales Valeriana pilosa, Hesperomeles ferruginea, Myrcianthes rhopaloides y Passiflora manicata frente a microorganismos patógenos y fitopatógenos*. Tesis de grado. Pontificia Universidad Javeriana. Disponible en: <http://www.javeriana.edu> (consultado: 19-11-17).

Martínez, M. J., Molina, N. y Boucourt, E. (1997) “Evaluación de la actividad antimicrobiana del *Psidium guajava* L. (Guayaba)”, *Revista Cubana de Plantas Medicas*, 2(1), pp. 12-14.

Mercado-Mercado, G., Carrillo, L., Wall-Medrano, A., López Díaz, J. A. y Álvarez-Parrilla, E. (2013) “Compuestos polifenólicos y capacidad antioxidante de especias típicas consumidas en México”, *Nutrición Hospitalaria*, 28(1), pp. 36-46.

Mora, A., Parra, J., Chaverri, J. M. y Arias, M. L. (2013) “Determinación de la capacidad antimicrobiana de té verde (*Camellia sinensis*) contra los agentes potencialmente patógenos *Escherichia coli*, *Salmonella enterica*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Candida albicans* y *Aspergillus niger*”, *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 63(3), pp. 247-253.

Musmeci, R. y Lezcano, M. T. (2013) “Acción antimicrobiana del gel de aloe vera sobre *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Candida albicans*”, *Revista sobre Estudios e Investigaciones del Saber Académico*, 7, pp. 23-27.

Naveda González, G. F. (2010) *Establecimiento de un proceso de obtención de extracto de ruda (*Ruta graveolens*), con alto contenido de polifenoles*. Tesis de Grado. Escuela Politécnica Nacional.

Negrão-Murakami, A. N., Nunes, G. L., Pinto, S. S., Murakami, F. S., Amante, E. R., Cunha Petrus, J. C., Prudencio, E. S. y Amboni, R. D. M. C. (2017) “Influence of DE-value of

maltodextrin on the physicochemical properties, antioxidant activity, and storage stability of spray dried concentrated mate (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil.)”, *LWT Food Science and Technology*, 79, pp. 561-567.

Nunes, G. L. y Menezes, C. R. (2015) “Microencapsulação por *spray drying* dos compostos bioativos do extrato aquoso de erva mate (*Ilex paraguariensis*) crioconcentrado”, *Ciência e Natura*, 37, pp. 18-29.

Oliveira Penteado, J., Martins Volcão, L., Fernandes Ramos, D., Da Silva-Junior, F. M. y Muccillo-Baisch A. L. (2016) “Actividade antimicrobiana de extractos de *Ilex paraguariensis*”, *Revista de Epidemiologia e controle de infecção*, 1(1), pp. 136-146.

Osatinsky, R. (2007) “¿Qué es la electroforesis capilar?”, *Bioquímica y Patología Clínica*, 71(2), pp. 60-66.

Ostrosky, E. A., Mizumoto, M. K., Lima, M. E. L., Kaneko, T. M., Nishikawa, S. O. y Freitas, B. R. (2008) “Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais”, *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 18(2), pp. 301-307.

Peixoto, M. P. G., Kaiser, S., Gasparin Verza, S., De Resende, P. E., Treter, J., Pavei, C., Borré, G. L. y González Ortega, G. (2012) “LC-UV assay method and UPLC/Q-TOF-MS characterisation of saponins from *Ilex paraguariensis* A. St. Hil. (Mate) unripe fruits”, *Phytochemical Analysis*, 23(4), pp. 415-420.

Peres, R. G., Tonin, F. G., Tavares, M. F. M. y Rodríguez-Amaya, D. B. (2013) “HPLC-DAD-ESI/MS identification and quantification of phenolic compounds in *Ilex paraguariensis* beverages and on-line evaluation of individual antioxidant activity”, *Molecules*, 18(4), pp. 3859-3871.

Polidoro, A., Scapin, E., Malmann, M., Carmo, J., Machado, M. E., Caramão, E. y Jacques, R. A. (2016) “Characterization of volatile fractions in green mate and mate leaves (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil.) by comprehensive two-dimensional gas chromatography coupled to time-of-flight mass spectrometry (GC × GC/TOFMS)”, *Microchemical Journal*, 128, pp. 118-127.

Prado Martin, J. G., Porto, E., De Alencar, S. M., Da Glória, E. M., Corrêa, C. B. y Ribeiro Cabral, I. S. (2013) “Antimicrobial activity of yerba mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) against food pathogens”, *Revista Argentina de Microbiología*, 45(2), pp. 93-8.

Prat Krikum, S. D. (2015) “El cultivo” en Schmalko, M., Prat, S. y Kanzi, R. *La yerba mate: tecnología de la producción y propiedades*. Posadas, Misiones: Editorial Universitaria, pp. 15-16.

Puig Peña, Y., Espino Hernández, M. y Leyva Castillo, V. (2011) “Resistencia antimicrobiana en *Salmonella* y *E. coli* aisladas de alimentos: revisión de la literatura”, *Panorama Cuba y Salud*, 6(1), pp. 30-38.

Racanicci, A. M. C., Allesen-Holm, B. H. y Skibsted, L. H. (2009) “Sensory evaluation of precooked chicken meat with mate (*Ilex paraguariensis*) added as antioxidant”, *European Food Research and Technology*, 229(2), pp. 277-280.

Ramallo, L. A. y Albani, O. A. (2015) “Envases y vida útil” en Schmalko, M., Prat, S. y Kanzi, R. *La yerba mate: tecnología de la producción y propiedades*. Posadas, Misiones: Editorial Universitaria, pp. 121.

Ramirez, L. y Marin, D. (2009) “Metodologías para evaluar *in vitro* la actividad antibacteriana de compuestos de origen vegetal”, *Scientia et Technica*, (42), pp. 263-268.

Ramírez, L. S. y Diaz, H. E. (2007) “Actividad antibacteriana de extractos y fracciones del ruibarbo (*Rumex conglomeratus*)”, *Scientia et Technica*, 1(33), pp. 397-400.

Rempe, C. S., Burris, K. P., Woo, H. L., Goodrich, B., Gosnell, D. K., Tschaplinski, T. J., y Stewart Jr, C. N. (2015) “Computational ranking of yerba mate small molecules based on their predicted contribution to antibacterial activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*”, *PLoS One*, 10(5), pp. 1-18.

Riveros, M. y Ochoa, T. J. (2015) “Enteropatógenos de importancia en salud pública”, *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 32(1), pp. 135-142.

Roca, L. y Ángel, D. (2014) “*Pseudomonas aeruginosa*: un adversario peligroso”, *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*, 48(4), pp. 465-474.

Rodríguez Saucedo, E. N. (2011) “Uso de agentes naturales antimicrobianos naturales en la conservación de frutas y hortalizas”, *Ra Ximhai*, 7(1), pp. 153-170.

Rodríguez Riera, Z., Robaina Mesa, M., Jáuregui Haza, U., Blanco González, A. y Rodríguez Chanfrau, J. E. (2014) “Empleo de la radiación ultrasónica para la extracción de compuestos bioactivos provenientes de fuentes naturales. Estado actual y perspectivas”, *Revista CENIC Ciencias Químicas*, 45, pp. 139-147.

Rodríguez Vaquero, M. J., Tomassini Serravalle, L. R., Manca de Nadra, M. C. y Strasser de Saad, A. M. (2010) “Antioxidant capacity and antibacterial activity of phenolic compounds from argentinean herbs infusions”, *Food Control*, 21(5), pp. 779-785.

Rojas, J. J., García, A. M. y López, A. J. (2005) “Evaluación de dos metodologías para determinar la actividad antimicrobiana de plantas medicinales”, *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 4(2), pp. 28-32.

Sá Santos, M. M. (2016) *Actividade antimicrobiana in vitro de extractos de plantas medicinais sobre patógenos de origem alimentario (Escherichia coli, Staphylococcus aureus e Salmonella typhimurium)*. Tesis de Maestría. Universidade Federal do Tocantins.

Sari, F., Turkmen, N., Polat, G. y Velioglu, Y. S. (2007) “Total polyphenol, antioxidant and antibacterial activities of black mate tea”, *Food Science and Technology Research*, 13 (3), pp. 265-269.

Schaper Bizzotto, C., Dillenburg Meinhart, A., Poloni Rybka, A. C., Sobrinho, M. R., Bogusz Junior, S., Ballus, C. A. y Teixeira Godoy, H. (2012) “Quantification of phenolic compounds by capillary zone electrophoresis in extracts of four commercial types of mate herb before and after acid hydrolysis”, *Food Research International*, 48(2), pp. 763-768.

Schmalko, M. y Alzamora, S. M. (2001) “Color, chlorophyll, caffeine and water content variation during yerba mate processing”, *Drying Technology*, 19(3), pp. 599-610.

Sharapin, N. (2000) *Fundamentos de tecnología de productos fitoterapéuticos*. Bogotá, Colombia: Roberto Pinzón S.

Soto Varela, Z., Pérez Lavalle, L. y Estrada Alvarado, D. (2016) “Bacterias causantes de enfermedades transmitidas por alimentos: Una mirada en Colombia”, *Salud Uninorte*, 32(1), pp. 105-122.

Streit, N. M., Rychecki Hecktheuer, L. H., Weber do Canto, M. y Pedrolo Canterle, L. (2008) “Erratum to relation among taste-related compounds (phenolics and caffeine) and sensory profile of erva-mate (*Ilex paraguariensis*)”, *Food Chemistry*, 107(3), pp. 560-564.

Szulepa, V. D. (2016) *Búsqueda de actividad antibacteriana en extracto seco de hojas pulverizadas de Psidium guajava L. por los métodos de difusión en discos y en pocillos*. Tesis de Grado. Universidad Nacional de Misiones.

Triana Ramírez, E. E. (2016) *Selección del método de extracción en base al rendimiento y los resultados del tamizaje fitoquímico en extractos de las hojas de Mangifera indica L.* Tesis de Grado. Universidad de Guayaquil.

Tsai, T. H., Tsai, T. H., Wu, W. H., Tseng, J. T. P. y Tsai, P. J. (2010) “*In vitro* antimicrobial and anti-inflammatory effects of herbs against *Propionibacterium acnes*”, *Food Chemistry*, 119(3), pp. 964-968.

United States Pharmacopeial Convention (2007) *United States Pharmacopeia*. 30<sup>a</sup> ed. Rockville, Maryland: USP.

Valduga, A.T., Gonçalves, I. L., Dartora, N., Mielniczki Pereira, A. A. y De Souza, L. M. (2016) “Phytochemical profile of morphologically selected yerba-mate progenies”, *Ciência e Agrotecnologia*, 40(1), pp. 114-120.

Vivot, E. P., Sánchez, C., Cacik, F. y Sequin, C. (2012) “Actividad antibacteriana en plantas medicinales de la flora de Entre Ríos (Argentina)”, *Ciencias, Docencia y Tecnología*, 45, pp. 165-185.

Zaions, I., Picolo, A. P., Gonçalves, I. L., Piovezan Borges, A. C. y Valduga, A. T. (2014) “Physico-chemical characterization of *Ilex paraguariensis* St. Hil. during the maturation”, *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 57(5), pp. 663-667.

Zendejas Manzo, G. S., Avalos Flores, H. y Soto Padilla, M. Y. (2014) “Microbiología general de *Staphylococcus aureus*: generalidades de patogenicidad, métodos de identificación”, *Revista Biomed*, 25(3), pp. 129-143.

## ANEXOS

**Anexo 1:** Contenido de humedad de la yerba mate elaborada molida y tamizada.

Muestra	Peso PF	Peso PF + MH	Peso PF + MS	W1	W2	% H
Yerba mate	29,1468	32,3736	32,1788	3,2268	3,032	6,03
Molida	27,6659	29,728	29,6058	2,0621	1,9399	5,92
					$\bar{X}$	5,975
					DE	0,078

**Referencias:** PF =Pesa filtros; MH = muestra húmeda; MS = muestra seca; W1 = diferencia de pesos de la muestra húmeda y pesa filtros; W2 = diferencia de pesos de muestra seca y pesa filtros; H % = Humedad porcentual;  $\bar{X}$  = promedio; DE= desvío estándar.

**Anexo 2:** Análisis de Cribado para el diseño factorial 2<sup>2</sup> para el porcentaje de rendimiento de los extractos hidroalcohólicos secos.

Factores: Tipo de solvente y proporción hidroalcohólica

Variable respuesta: % R

El primer análisis a priori indicó que ninguno de los factores estudiados ni sus interacciones presentan efectos significativos en el % R. Se retiran los factores que causan menor efecto en el % R con el objeto de aumentar los grados de libertad y se realiza nuevamente el análisis.

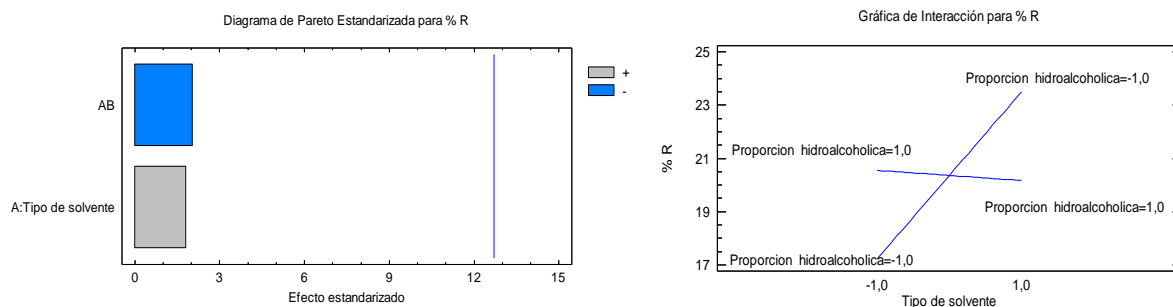
**Efectos estimados para % R**

Efecto	Estimado	Error Estándar	V.I.F.
Promedio	20,36	0,81	
A: Tipo de solvente	2,95	1,62	1,0
AB	-3,33	1,62	1,0

Errores estándar basados en el error total con 1 g.l.

**Análisis de varianza para % R**

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A: Tipo de solvente	8,7025	1	8,7025	3,32	0,3197
AB	11,0889	1	11,0889	4,23	0,2882
Error total	2,6244	1	2,6244		
Total (corr.)	22,4158	3			



Conclusión: Ninguno de los factores estudiados ni sus interacciones presentan efectos significativos en el % R para un nivel de confianza de 95%.

### Anexo 3: Análisis de varianza simple para % de rendimiento por extracto.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	67,3046	3	22,4349	1321,10	0,0000
Intra grupos	0,135855	8	0,0169819		
Total (Corr.)	67,4405	11			

### Prueba de múltiples rangos para el porcentaje de rendimiento de los extractos hidroalcohólicos secos

Método: 95,0 porcentaje LSD

Extracto	Casos	Media	Grupos Homogéneos
1	3	16,4053	X
4	3	20,978	X
3	3	21,3593	X
2	3	22,687	X

### Anexo 4: Contenido de humedad de los extractos secos de yerba mate elaborada.

E	Nº PF	Peso PF	Peso PF + MH	Peso PF + MS	W1	W2	% H	$\bar{X}$	DE	EE
1	24	13,5118	13,7537	13,7336	0,2419	0,2218	8,3	8,3	0	0
	25	19,0522	19,5435	19,5027	0,4913	0,4505	8,3			
2	30	18,7901	19,2272	19,1954	0,4371	0,4053	7,27	7,46	0,269	0,19
	22	19,04	19,4868	19,4526	0,4468	0,4126	7,65			
3	11	12,3913	12,6945	12,6742	0,3032	0,2829	6,69	6,83	0,205	0,145
	33	27,665	28,245	28,2045	0,58	0,5395	6,98			
4	23	19,2204	19,6581	19,6305	0,4377	0,4101	6,3	6,55	0,354	0,25
	10	12,3379	12,8187	12,7859	0,4808	0,448	6,8			

**Referencias:** E = extracto; PF = pesa filtros; MH = muestra húmeda; MS = muestra seca; W1 = diferencia de pesos de la muestra húmeda y pesa filtros; W2 = diferencia de pesos de muestra seca y pesa filtros; H % = Humedad porcentual;  $\bar{X}$  = promedio.



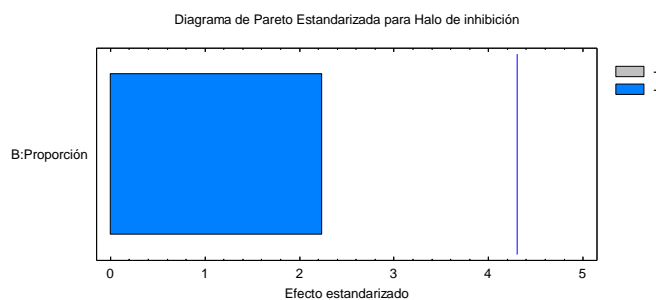
**Anexo 5:** Análisis de diseño factorial de los métodos de difusión con discos y de difusión por pocillos para *Salmonella enteritidis* cepa salvaje.

El análisis factorial a priori para los métodos de difusión con discos y de difusión por pocillos para *Salmonella enteritidis* mostró que ninguno de los factores presenta influencia estadísticamente significativa. Se retiran los factores que tienen menor influencia para aumentar los grados de libertad. Se concluye que ninguno de los factores estudiados tipo de solvente y proporción, ni su interacción influyen en el tamaño del halo de inhibición con un nivel de confianza del 95 % como se observa en las tablas de análisis de varianza y los gráficos de Pareto, respectivamente.

#### A. Método de difusión con discos

##### Análisis de varianza para halo de inhibición

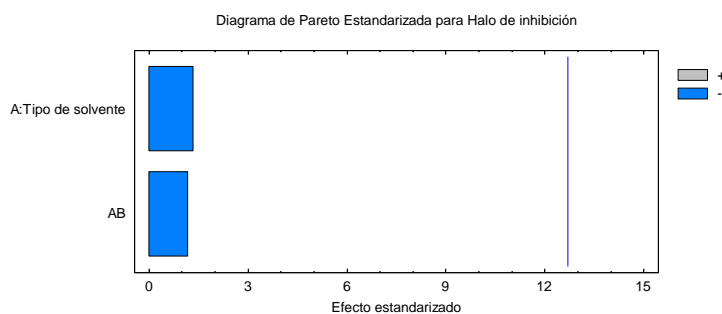
Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
B: Proporción	14,0625	1	14,0625	5,00	0,1548
Error total	5,625	2	2,8125		
Total (corr.)	19,6875	3			



#### B. Método de difusión por pocillos

##### Análisis de varianza para halo de inhibición

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A: Tipo de solvente	16,0	1	16,0	1,78	0,4097
AB	12,25	1	12,25	1,36	0,4511
Error total	9,0	1	9,0		
Total (corr.)	37,25	3			



**Anexo 6:** Análisis de varianza simple para el halo de inhibición de crecimiento de los extractos de yerba mate (10 mg) por el método de difusión con discos para *Salmonella enteritidis* cepa salvaje.

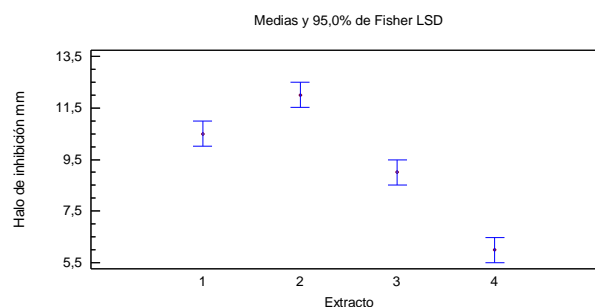
**Tabla ANOVA para halo de inhibición mm por extracto**

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	39,375	3	13,125	105,00	0,0003
Intra grupos	0,5	4	0,125		
Total (Corr.)	39,875	7			

**Prueba de múltiples rangos para halo de inhibición mm por extracto**

Método: 95,0 porcentaje LSD

Extracto	Casos	Media	Grupos Homogéneos
4	2	6,0	X
3	2	9,0	X
1	2	10,5	X
2	2	12,0	X



**Anexo 7:** Análisis de varianza simple para el halo de inhibición de crecimiento de los extractos de yerba mate (10 mg) por el método de difusión por pocillos para *Salmonella enteritidis* cepa salvaje.

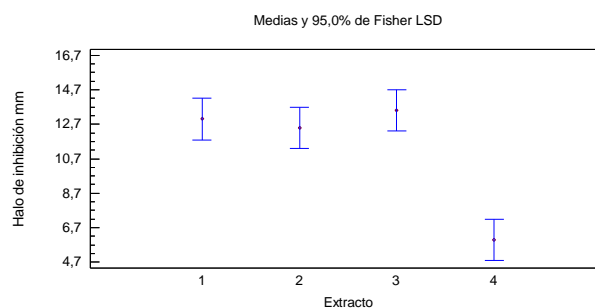
**Tabla ANOVA para halo de inhibición mm por extracto**

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	74,5	3	24,8333	33,11	0,0028
Intra grupos	3,0	4	0,75		
Total (Corr.)	77,5	7			

**Pruebas de múltiples rangos para halo de inhibición mm por extracto**

Método: 95,0 porcentaje LSD

Extracto	Casos	Media	Grupos Homogéneos
4	2	6,0	X
2	2	12,5	X
1	2	13,0	X
3	2	13,5	X



**Anexo 8:** Comparación de medias del halo de inhibición del crecimiento de *Salmonella enteritidis* cepa salvaje de los métodos de difusión para la concentración de 10 mg del extracto 1.

#### Comparación de desviaciones estándar

	<i>Pocillo</i>	<i>Disco</i>
Desviación Estándar	1,41421	0,707107
Varianza	2,0	0,5
Gl	1	1

Razón de Varianzas= 4,0

Intervalos de confianza del 95,0%

Desviación Estándar de Pocillo: [0,630963; 45,1278]

Desviación Estándar de Disco: [0,315481; 22,5639]

Razones de Varianzas: [0,00617485; 2591,16]

Prueba-F para comparar Desviaciones Estándar

Hipótesis Nula:  $\sigma_1 = \sigma_2$

Hipótesis Alt.:  $\sigma_1 < \sigma_2$

F = 4,0 valor-P = 0,590334

No se rechaza la hipótesis nula para alfa = 0,05.

#### Comparación de medias

Intervalos de confianza del 95,0% para la media de Pocillo: 13,0 +/- 12,7062 [0,293795; 25,7062]

Intervalos de confianza del 95,0% para la media de Disco: 10,5 +/- 6,3531 [4,1469; 16,8531]

Intervalos de confianza del 95,0% intervalo de confianza para la diferencia de medias  
suponiendo varianzas iguales: 2,5 +/- 4,81051 [-2,31051; 7,31051]

#### Prueba t para comparar medias

Hipótesis nula:  $\mu_1 = \mu_2$

Hipótesis Alt.:  $\mu_1 < \mu_2$

suponiendo varianzas iguales: t = 2,23607 valor-P = 0,154846

No se rechaza la hipótesis nula para alfa = 0,05.

**Anexo 9:** Comparación de medias del halo de inhibición del crecimiento de *Salmonella enteritidis* cepa salvaje de los métodos de difusión para la concentración de 10 mg del extracto 2.

#### Comparación de desviaciones estándar

	<i>Pocillos</i>	<i>Discos</i>
Desviación Estándar	0,707107	0,0
Varianza	0,5	0,0
Gl	1	1

Razón de Varianzas= 1,#INF

Intervalos de confianza del 95,0%

Desviación Estándar de Pocillos: [0,315481; 22,5639]

Desviación Estándar de Discos: [0,0; 0,0]

Razones de Varianzas: [1,#INF; 1,#INF]

Prueba-F para comparar Desviaciones Estándar

Hipótesis Nula:  $\sigma_1 = \sigma_2$

Hipótesis Alt.:  $\sigma_1 < \sigma_2$

F = 1,#INF valor-P = 0,0

Se rechaza la hipótesis nula para alfa = 0,05.

### Comparación de medias

Intervalos de confianza del 95,0% para la media de Pocillos: 12,5 +/- 6,3531 [6,1469; 18,8531]

Intervalos de confianza del 95,0% para la media de Discos: 12,0 +/- 0,0 [12,0; 12,0]

Intervalos de confianza del 95,0% intervalo de confianza para la diferencia de medias  
sin suponer varianzas iguales: 0,5 +/- 6,3531 [-5,8531; 6,8531]

#### Prueba t para comparar medias

Hipótesis nula: media1 = media2

Hipótesis Alt.: media1 <> media2

sin suponer varianzas iguales: t = 1,0 valor-P = 0,5

No se rechaza la hipótesis nula para alfa = 0,05.

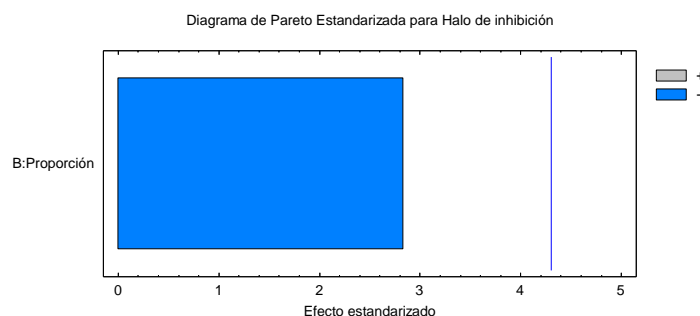
### Anexo 10: Análisis de diseño factorial de los métodos de difusión con discos y de difusión por pocillos para *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

El análisis factorial a priori para los métodos por difusión con discos y de difusión por pocillos para *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 mostró que ninguno de los factores presenta influencia estadísticamente significativa. Se retiran los factores que tienen menor influencia para aumentar los grados de libertad. Se concluye que ninguno de los factores estudiados tipo de solvente y proporción, ni su interacción influyen en el tamaño del halo de inhibición de crecimiento con un nivel de confianza del 95 % como se observa en las tablas de análisis de varianza y los gráficos de Pareto, respectivamente.

#### A. Método de difusión con discos:

##### Análisis de varianza para halo de inhibición

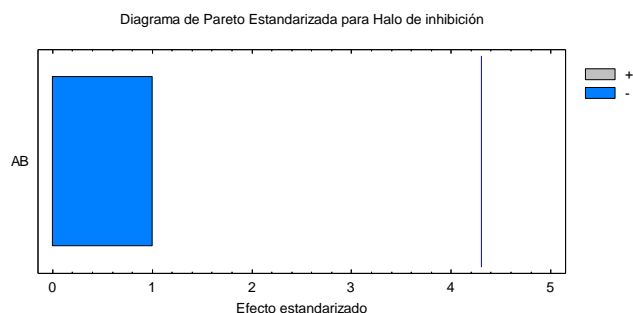
Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
B: Proporción	1,0	1	1,0	8,00	0,1056
Error total	0,25	2	0,125		
Total (corr.)	1,25	3			



## B. Método de difusión por pocillos:

### Análisis de varianza para halo de inhibición

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
AB	0,0625	1	0,0625	1,00	0,4226
Error total	0,125	2	0,0625		
Total (corr.)	0,1875	3			



**Anexo 11:** Análisis de varianza simple para el halo de inhibición de crecimiento de los extractos de yerba mate (10 mg) por el método de difusión con discos para *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

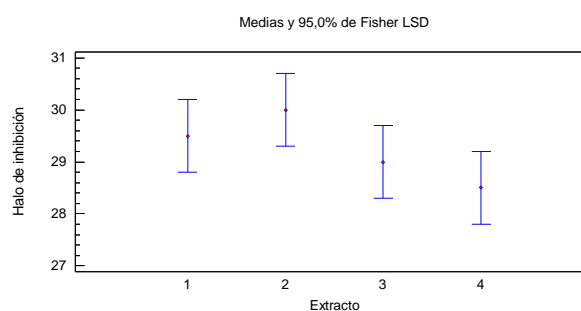
Tabla ANOVA para halo de inhibición por extracto

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	2,5	3	0,833333	3,33	0,1376
Intra grupos	1,0	4	0,25		
Total (Corr.)	3,5	7			

### Pruebas de múltiples rangos para halo de inhibición por extracto

Método: 95,0 porcentaje LSD

Extracto	Casos	Media	Grupos Homogéneos
4	2	28,5	X
3	2	29,0	XX
1	2	29,5	XX
2	2	30,0	X



**Anexo 12:** Análisis de varianza simple para el halo de inhibición de crecimiento de los extractos de yerba mate (10 mg) por el método de difusión por pocillos para *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

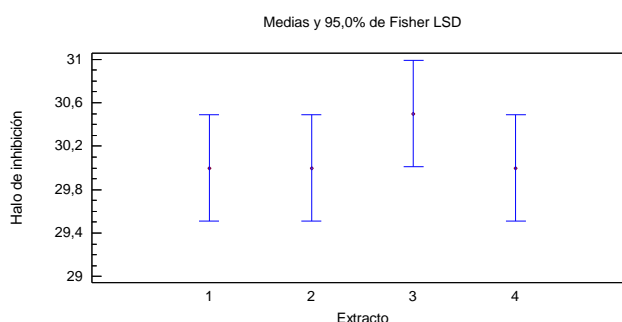
**Tabla ANOVA para halo de inhibición por extracto**

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	0,375	3	0,125	1,00	0,4789
Intra grupos	0,5	4	0,125		
Total (Corr.)	0,875	7			

### Pruebas de múltiples rangos para halo de inhibición por extracto

Método: 95,0 porcentaje LSD

Extracto	Casos	Media	Grupos Homogéneos
2	2	30,0	X
1	2	30,0	X
4	2	30,0	X
3	2	30,5	X



**Anexo 13:** Comparación de medias del halo de inhibición del crecimiento de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 de los métodos de difusión para la concentración de 10 mg del extracto 1.

### Comparación de desviaciones estándar

	Pocillo	Disco
Desviación Estándar	0,0	0,707107
Varianza	0,0	0,5
Gl	1	1

Razón de Varianzas= 0,0

Intervalos de confianza del 95,0%

Desviación Estándar de Pocillos: [0,0; 0,0]

Desviación Estándar de Discos: [0,315481; 22,5639]

Razones de Varianzas: [0,0; 0,0]

Prueba-F para comparar Desviaciones Estándar

Hipótesis Nula:  $\sigma_1 = \sigma_2$

Hipótesis Alt.:  $\sigma_1 < \sigma_2$

F = 0,0 valor-P = 0,0

Se rechaza la hipótesis nula para alfa = 0,05.

### Comparación de medias

Intervalos de confianza del 95,0% para la media de Pocillos: 30,0 +/- 0,0 [30,0; 30,0]  
 Intervalos de confianza del 95,0% para la media de Discos: 29,5 +/- 6,3531 [23,1469; 35,8531]  
 Intervalos de confianza del 95,0% intervalo de confianza para la diferencia de medias  
 sin suponer varianzas iguales: 0,5 +/- 6,3531 [-5,8531; 6,8531]

#### Prueba t para comparar medias

Hipótesis nula: media1 = media2

Hipótesis Alt.: media1 <> media2

sin suponer varianzas iguales: t = 1,0 valor-P = 0,5

No se rechaza la hipótesis nula para alfa = 0,05.

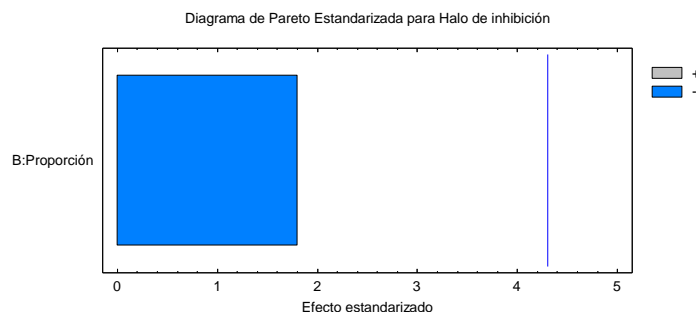
**Anexo 14:** Análisis de diseño factorial de los métodos de difusión con discos y de difusión por pocillos para *Staphylococcus aureus* cepa salvaje.

El análisis factorial a priori para los métodos por difusión con discos y de difusión por pocillos para *Staphylococcus aureus* cepa salvaje mostró que ninguno de los factores presenta influencia estadísticamente significativa. Se retiran los factores que tienen menor influencia para aumentar los grados de libertad. Se concluye que ninguno de los factores estudiados tipo de solvente y proporción, ni su interacción influyen en el tamaño del halo de inhibición de crecimiento con un nivel de confianza del 95 % como se observa en las tablas de análisis de varianza y los gráficos de Pareto, respectivamente.

#### A. Método de difusión con discos

##### Análisis de varianza para halo de inhibición

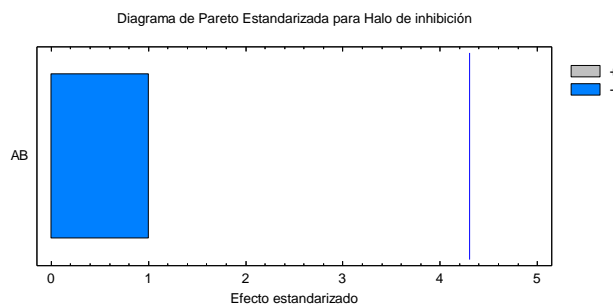
Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
B: Proporción	5,0625	1	5,0625	3,24	0,2137
Error total	3,125	2	1,5625		
Total (corr.)	8,1875	3			



## B. Método de difusión por pocillos

### Análisis de varianza para halo de inhibición

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
AB	1,0	1	1,0	1,00	0,4226
Error total	2,0	2	1,0		
Total (corr.)	3,0	3			



**Anexo 15:** Análisis de varianza simple para el halo de inhibición de crecimiento de los extractos de yerba mate (10 mg) por el método de difusión con discos para *Staphylococcus aureus* cepa salvaje.

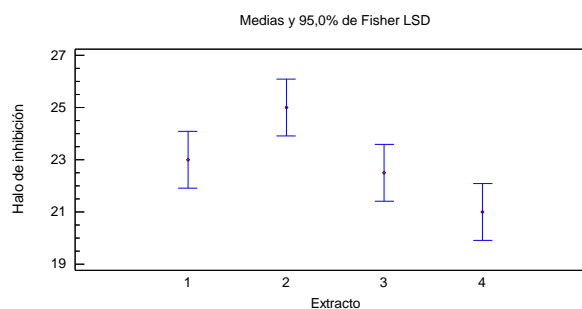
Tabla ANOVA para halo de inhibición por extracto

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	16,375	3	5,45833	8,73	0,0314
Intra grupos	2,5	4	0,625		
Total (Corr.)	18,875	7			

### Pruebas de múltiples rangos para halo de inhibición por extracto

Método: 95,0 porcentaje LSD

Extracto	Casos	Media	Grupos Homogéneos
4	2	21,0	X
3	2	22,5	X
1	2	23,0	XX
2	2	25,0	X





**Anexo 16:** Análisis de varianza simple para el halo de inhibición de crecimiento de los extractos de yerba mate (10 mg) por el método de difusión por pocillo para *Staphylococcus aureus* cepa salvaje.

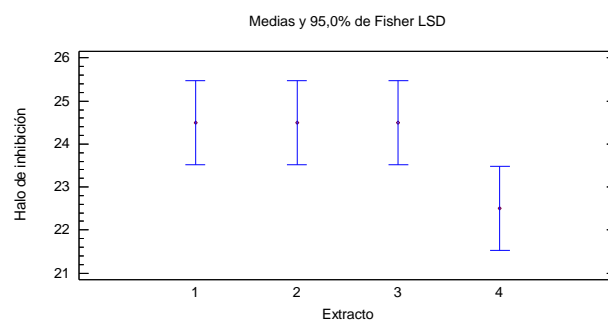
**Tabla ANOVA para halo de inhibición por extracto**

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	6,0	3	2,0	4,00	0,1069
Intra grupos	2,0	4	0,5		
Total (Corr.)	8,0	7			

### Pruebas de múltiples rangos para halo de inhibición por extracto

Método: 95,0 porcentaje LSD

Extracto	Casos	Media	Grupos Homogéneos
4	2	22,5	X
3	2	24,5	X
2	2	24,5	X
1	2	24,5	X



**Anexo 17:** Comparación de medias del halo de inhibición del crecimiento de *Staphylococcus aureus* cepa salvaje de los métodos de difusión para la concentración de 10 mg del extracto 1.

### Comparación de desviaciones estándar

	<i>Pocillo</i>	<i>Disco</i>
Desviación Estándar	0,707107	0,0
Varianza	0,5	0,0
Gl	1	1

Razón de Varianzas= 1,#INF

Intervalos de confianza del 95,0%

Desviación Estándar de Pocillos: [0,315481; 22,5639]

Desviación Estándar de Discos: [0,0; 0,0]

Razones de Varianzas: [1,#INF; 1,#INF]

Prueba-F para comparar Desviaciones Estándar

Hipótesis Nula:  $\sigma_1 = \sigma_2$

Hipótesis Alt.:  $\sigma_1 < \sigma_2$

F = 1,#INF valor-P = 0,0

Se rechaza la hipótesis nula para alfa = 0,05.

### Comparación de medias

Intervalos de confianza del 95,0% para la media de Pocillos: 24,5 +/- 6,3531 [18,1469; 30,8531]

Intervalos de confianza del 95,0% para la media de Discos: 23,0 +/- 0,0 [23,0; 23,0]

Intervalos de confianza del 95,0% intervalo de confianza para la diferencia de medias  
sin suponer varianzas iguales: 1,5 +/- 6,3531 [-4,8531; 7,8531]

#### Prueba t para comparar medias

Hipótesis nula: media1 = media2

Hipótesis Alt.: media1 <> media2

sin suponer varianzas iguales: t = 3,0 valor-P = 0,204833

No se rechaza la hipótesis nula para alfa = 0,05.

**Anexo 18:** Comparación de medias del halo de inhibición del crecimiento de *Staphylococcus aureus* cepa salvaje de los métodos de difusión para la concentración de 10 mg del extracto 2.

### Comparación de desviaciones estándar

	<i>Pocillo</i>	<i>Disco</i>
Desviación Estándar	0,707107	0,0
Varianza	0,5	0,0
Gl	1	1

Razón de Varianzas= 1,#INF

Intervalos de confianza del 95,0%

Desviación Estándar de Pocillos: [0,315481; 22,5639]

Desviación Estándar de Discos: [0,0; 0,0]

Razones de Varianzas: [1,#INF; 1,#INF]

Prueba-F para comparar Desviaciones Estándar

Hipótesis Nula: sigma1 = sigma2

Hipótesis Alt.: sigma1 <> sigma2

F = 1,#INF valor-P = 0,0

Se rechaza la hipótesis nula para alfa = 0,05.

### Comparación de medias

Intervalos de confianza del 95,0% para la media de Pocillos: 24,5 +/- 6,3531 [18,1469; 30,8531]

Intervalos de confianza del 95,0% para la media de Discos: 25,0 +/- 0,0 [25,0; 25,0]

Intervalos de confianza del 95,0% intervalo de confianza para la diferencia de medias  
sin suponer varianzas iguales: -0,5 +/- 6,3531 [-6,8531; 5,8531]

#### Prueba t para comparar medias

Hipótesis nula: media1 = media2

Hipótesis Alt.: media1 <> media2

sin suponer varianzas iguales: t = -1,0 valor-P = 0,5

No se rechaza la hipótesis nula para alfa = 0,05.

**Anexo 19:** Porcentaje del efecto de inhibición de los distintos extractos frente a *Salmonella enteritidis* cepa salvaje.

Método	Extracto	Cantidad de Extracto (mg)	$\bar{X}$ halo (mm)	% EI	$\bar{X}$ AMP (mm)
<b>Discos</b>	1	10	10,50	35,00	30,00
		8	9,50	31,66	
		4	9,00	30,00	
		2	8,00	26,66	
	2	10	12,00	40,00	30,00
		8	11,00	36,66	
		4	10,00	33,33	
		2	8,00	26,66	
	3	10	9,00	30,51	29,50
		8	8,00	27,11	
		4	8,00	27,11	
		2	6,00	20,34	
	4	10	6,00	20,00	30,00
		8	6,00	20,00	
		4	6,00	20,00	
		2	6,00	20,00	
<b>Pocillos</b>	1	10	13,00	44,07	29,50
		8	12,00	40,68	
		4	9,50	32,20	
		2	8,00	27,11	
	2	10	12,50	43,10	29,00
		8	11,00	37,93	
		4	8,50	29,31	
		2	6,00	20,69	
	3	10	13,50	46,55	29,00
		8	11,50	39,66	
		4	9,50	32,76	
		2	8,00	27,59	
	4	10	6,00	20,69	29,00
		8	6,00	20,69	
		4	6,00	20,69	
		2	6,00	20,69	

**Referencias:** Extracto 1 = metanol 60:40; extracto 2 = etanol 60:40; extracto 3 = metanol 70:30; extracto 4 = etanol 70:30;  $\bar{X}$  halo= promedio del diámetro del halo de inhibición expresado en mm del extracto;  $\bar{X}$  AMP = promedio del diámetro del halo de inhibición del control positivo (ampicilina); % EI = porcentaje del efecto inhibitorio.

**Anexo 20:** Porcentaje del efecto de inhibición de los distintos extractos frente a *Staphylococcus aureus* cepa ATCC 25923.

Método	Extracto	Cantidad de Extracto (mg)	$\bar{X}$ halo (mm)	% efec. De inhi.	$\bar{X}$ CAZ (mm)
<b>Discos</b>	1	10	29,50	131,11	22,50
		8	29,00	128,89	
		4	27,00	120,00	
		2	23,00	102,22	
	2	10	30,00	133,33	22,50
		8	29,00	128,89	
		4	25,50	113,33	
		2	23,00	102,22	
	3	10	29,00	131,82	22,00
		8	28,00	127,27	
		4	26,00	118,18	
		2	23,00	104,55	
	4	10	28,50	123,91	23,00
		8	28,50	123,91	
		4	25,50	110,87	
		2	22,50	97,83	
<b>Pocillos</b>	1	10	30,00	136,36	22,00
		8	30,00	136,36	
		4	28,00	127,27	
		2	25,00	113,64	
	2	10	30,00	139,53	21,50
		8	30,50	141,86	
		4	29,50	137,21	
		2	27,00	125,58	
	3	10	30,50	135,56	22,50
		8	31,00	137,78	
		4	28,00	124,44	
		2	25,00	111,11	
	4	10	30,00	139,53	21,50
		8	29,50	137,21	
		4	26,00	120,93	
		2	24,00	111,63	

**Referencias:** Extracto 1 = metanol 60:40; extracto 2 = etanol 60:40; extracto 3 = metanol 70:30; extracto 4 = etanol 70:30;  $\bar{X}$  halo= promedio del diámetro del halo de inhibición expresado en mm del extracto;  $\bar{X}$  CAZ = promedio del diámetro del halo de inhibición del control positivo (ceftazidima); % EI = porcentaje del efecto inhibitorio.

**Anexo 21:** Porcentaje del efecto de inhibición de los distintos extractos frente a *Staphylococcus aureus* cepa salvaje.

Método	Extracto	Cantidad de Extracto (mg)	$\bar{X}$ halo (mm)	% efec. De inhi.	$\bar{X}$ CAZ (mm)
<b>Discos</b>	1	10	23,00	121,05	19,00
		8	22,00	115,79	
		4	21,00	110,53	
		2	18,00	94,74	
	2	10	25,00	131,58	19,00
		8	23,50	123,68	
		4	22,00	115,79	
		2	19,50	102,63	
	3	10	22,50	118,42	19,00
		8	22,00	115,79	
		4	20,00	105,26	
		2	17,50	92,11	
	4	10	21,00	110,53	19,00
		8	20,50	107,89	
		4	18,50	97,37	
		2	15,50	81,58	
<b>Pocillos</b>	1	10	24,50	136,11	18,00
		8	24,00	133,33	
		4	21,50	119,44	
		2	19,00	105,56	
	2	10	24,50	132,43	18,50
		8	24,00	129,73	
		4	22,50	121,62	
		2	19,50	105,41	
	3	10	24,50	128,95	19,00
		8	23,00	121,05	
		4	21,00	110,53	
		2	19,00	100	
	4	10	22,50	121,62	18,50
		8	22,00	118,92	
		4	20,50	110,81	
		2	17,00	91,89	

**Referencias:** Extracto 1 = metanol 60:40; extracto 2 = etanol 60:40; extracto 3 = metanol 70:30; extracto 4 = etanol 70:30;  $\bar{X}$  halo= promedio del diámetro del halo de inhibición expresado en mm del extracto;  $\bar{X}$  CAZ= promedio del diámetro del halo de inhibición del control positivo (ceftazidima); % EI = porcentaje del efecto inhibitorio.

**Anexo 22:** Análisis de varianza simple para el porcentaje del efecto de inhibición de los extractos de yerba mate (10 mg) por los métodos de difusión para *Salmonella enteritidis* cepa salvaje.

### A. Método de difusión con discos

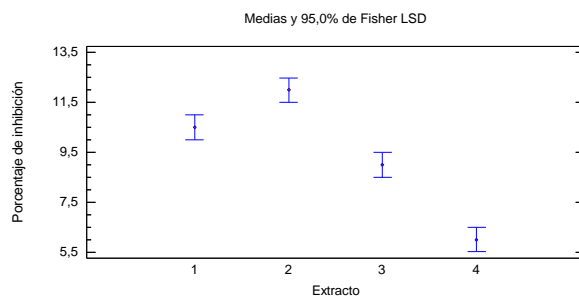
Tabla ANOVA para porcentaje de inhibición por extracto

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	39,375	3	13,125	105,00	0,0003
Intra grupos	0,5	4	0,125		
Total (Corr.)	39,875	7			

### Pruebas de múltiples rangos para porcentaje de inhibición por extracto

Método: 95,0 porcentaje LSD

Extracto	Casos	Media	Grupos Homogéneos
4	2	6,0	X
3	2	9,0	X
1	2	10,5	X
2	2	12,0	X



### B. Método de difusión por pocillos

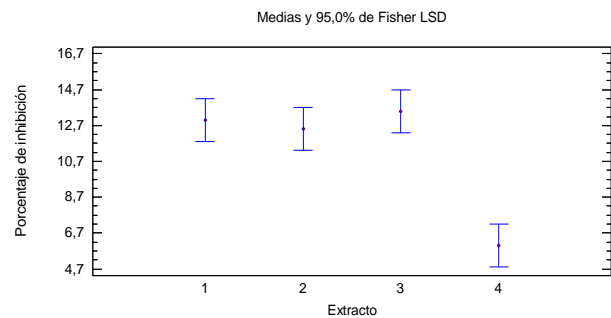
Tabla ANOVA para porcentaje de inhibición por extracto

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	74,5	3	24,8333	33,11	0,0028
Intra grupos	3,0	4	0,75		
Total (Corr.)	77,5	7			

### Pruebas de múltiples rangos para porcentaje de inhibición por extracto

Método: 95,0 porcentaje LSD

Extracto	Casos	Media	Grupos Homogéneos
4	2	6,0	X
2	2	12,5	X
1	2	13,0	X
3	2	13,5	X



**Anexo 23:** Análisis de varianza simple para el porcentaje del efecto de inhibición de los extractos de yerba mate (10 mg) por los métodos de difusión para *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

**A. Método de difusión con discos:**

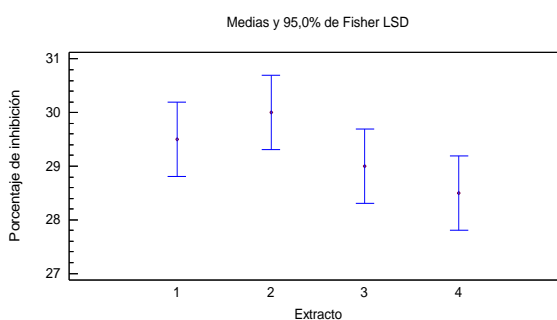
**Tabla ANOVA para porcentaje de inhibición por extracto**

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	2,5	3	0,833333	3,33	0,1376
Intra grupos	1,0	4	0,25		
Total (Corr.)	3,5	7			

**Pruebas de múltiples rangos para porcentaje de inhibición por extracto**

Método: 95,0 porcentaje LSD

Extracto	Casos	Media	Grupos Homogéneos
4	2	28,5	X
3	2	29,0	XX
1	2	29,5	XX
2	2	30,0	X



**B. Método de difusión por pocillos:**

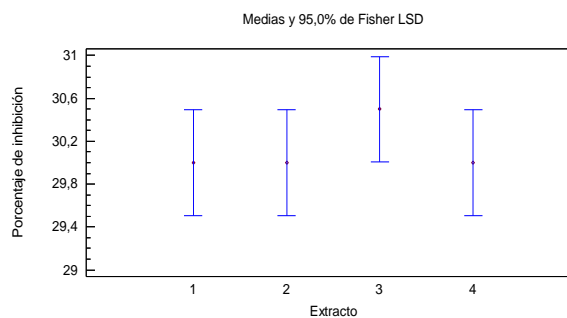
**Tabla ANOVA para porcentaje de inhibición por extracto**

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	0,375	3	0,125	1,00	0,4789
Intra grupos	0,5	4	0,125		
Total (Corr.)	0,875	7			

**Pruebas de múltiples rangos para porcentaje de inhibición por extracto**

Método: 95,0 porcentaje LSD

Extracto	Casos	Media	Grupos Homogéneos
2	2	30,0	X
1	2	30,0	X
4	2	30,0	X
3	2	30,5	X



**Anexo 24:** Análisis de varianza simple para el porcentaje del efecto de inhibición de los extractos de yerba mate (10 mg) por los métodos de difusión para *Staphylococcus aureus* cepa salvaje.

**A. Método de difusión con discos:**

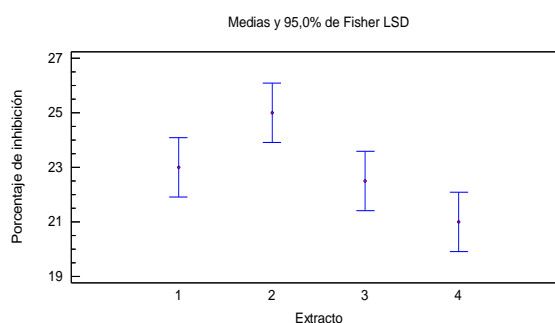
**Tabla ANOVA para porcentaje de inhibición por extracto**

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	16,375	3	5,45833	8,73	0,0314
Intra grupos	2,5	4	0,625		
Total (Corr.)	18,875	7			

**Pruebas de múltiples rangos para porcentaje de inhibición por extracto**

Método: 95,0 porcentaje LSD

Extracto	Casos	Media	Grupos Homogéneos
4	2	21,0	X
3	2	22,5	X
1	2	23,0	XX
2	2	25,0	X



**B. Método de difusión por pocillos:**

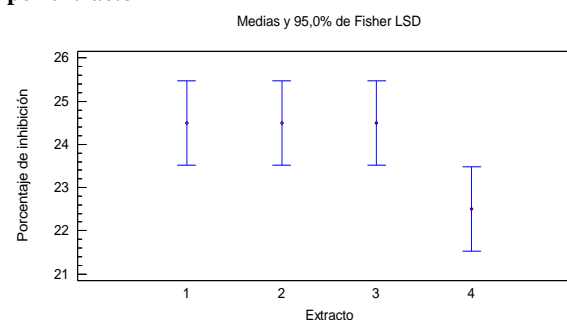
**Tabla ANOVA para porcentaje de inhibición por extracto**

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	6,0	3	2,0	4,00	0,1069
Intra grupos	2,0	4	0,5		
Total (Corr.)	8,0	7			

**Pruebas de múltiples rangos para porcentaje de inhibición por extracto**

Método: 95,0 porcentaje LSD

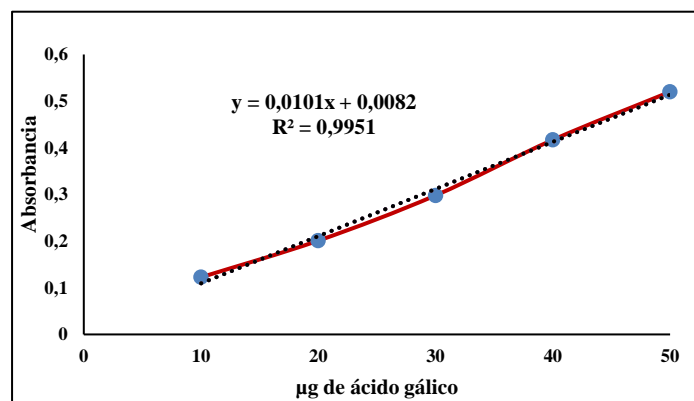
Extracto	Casos	Media	Grupos Homogéneos
4	2	22,5	X
3	2	24,5	X
2	2	24,5	X
1	2	24,5	X





**Anexo 25:** Valores experimentales de absorbancia de las diluciones de ácido gálico para realizar la curva de calibración.

Concentración de ácido gálico ( $\mu\text{g/mL}$ )	Absorbancia 1	Absorbancia 2	Absorbancia promedio
10	0,12	0,125	0,1225
20	0,2	0,202	0,201
30	0,298	0,298	0,298
40	0,418	0,416	0,417
50	0,521	0,519	0,52



**Anexo 26:** Análisis de varianza simple para polifenoles totales por extractos hidroalcohólicos secos.

Tabla ANOVA para polifenoles totales por muestra

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	467,709	4	116,927	822,77	0,0000
Intra grupos	0,9948	7	0,142114		
Total (Corr.)	468,704	11			

#### Pruebas de múltiples rangos para polifenoles totales por muestra

Método: 95,0 porcentaje LSD

Muestra	Casos	Media	Grupos Homogéneos
YM	4	11,155	X
E3	2	24,265	X
E4	2	24,35	X
E2	2	24,475	X
E1	2	24,5	X

