

Laboratorio de Biología Celular y
Molecular-BioCyM-Universidad
Juan Agustín Maza

USO DE
EXTRACTOS DE
YERBA MATE
COMO
ANTIMICROBIANO



Perlbach, Agostina.
Romano, Mariana.
Quintero, Cristián.

Autores: Agostina Perlbach; Mariana Romano y Cristián Quintero

Uso de extractos de yerba mate como antimicrobiano

Agostina Perlbach; Mariana Romano y Cristián Quintero

Laboratorio de Biología Celular y Molecular-BioCyM-Universidad Juan Agustín Maza

Contacto: caquintero32@hotmail.com; cquintero@umaza.edu.ar

INTRODUCCIÓN

Ante el constante incremento de la resistencia a antibióticos por parte de las bacterias, surge la necesidad de proteger los cultivos de tales patógenos y de reemplazar conservantes de alimentos sintéticos por alguno natural, entre otros. En la actualidad se han realizado diversos trabajos de investigación que buscan encontrar la respuesta en moléculas bioactivas de distintos productos naturales como es el caso de la yerba mate en el que centraremos nuestra atención.

Yerba mate es una infusión popular, no alcohólica, que puede consumirse fría o caliente y se toma en una taza pequeña o "mate" y se bebe usando una pajita de metal o "bombilla". Es producida y consumida en Argentina, Brasil, Chile, Paraguay y Uruguay. Se define a la yerba mate elaborada como el producto formado por las hojas desecadas, ligeramente tostadas, y desmenuzadas de la especie *Ilex paraguariensis* (figura 1), un arbusto perenne de acebo nativo de América del Sur de la familia Aquifoliaceae, que pueden estar mezcladas o no, con fragmentos de ramas jóvenes, pecíolos, pedúnculos florales y semillas de la misma.



Figura 1. Planta de Yerba mate (*Ilex paraguariensis*) cultivada en invernadero, de 24 meses de edad y 1,2 m de altura. Extraída de: Burris, Kellie, Harte, Federico, Davidson, Neal Stewart Jr, & Zivanovic. (2012). "Composition and Bioactive Properties of Yerba Mate"

El procesamiento ocurre en seis etapas: recolección de hojas maduras y tallos pequeños, tostado por fuego directo, secado por aire caliente, molienda, envejecimiento (análisis de los atributos sensoriales requeridos), y embalaje final. Hay que tener en cuenta que tanto el procesamiento como la producción y los pasos específicos del cultivo

Autores: Agostina Perlbach; Mariana Romano y Cristián Quintero

varían según la región geográfica y con ellos puede variar la biosíntesis y degradación del contenido fitoquímico de *I. paraguariensis*, lo que influye en las propiedades farmacológicas.

Su composición incluye, xantinas, derivados de cafeilo, saponinas, minerales y polifenoles responsables de la actividad farmacológica. Estos últimos son muy conocidos por sus actividades biológicas y son los que principalmente se extraen en la maceración, el método fisicoquímico de extracción.

ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA

Yerba mate posee potenciales beneficios para la salud como antioxidante, acción contra la obesidad y diabetes, digestivo, estimulante, y en el que haremos hincapié aquí: como agente antimicrobiano.

ACTIVIDAD CONTRA BACTERIAS Y HONGOS

En el trabajo “*Actividad Antibacteriana in vitro de extractos Hidroalcohólicos secos de Yerba Mate elaborada procedente de Paraguay*” de González Coria, J. C., & Horianski, M. A. (2018): obtuvieron información acerca de la actividad antimicrobiana de la yerba mate frente a 6 tipos de especies bacterianas: *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Salmonella enteritidis* (cepa salvaje), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) y *Staphylococcus aureus* (cepa salvaje) y (ATCC 25923). Y además, en los casos en el que la actividad antimicrobiana fue positiva, se determinó la concentración inhibitoria mínima (CIM) y concentración bactericida mínima (CBM) de los extractos hidroalcohólicos.

El estudio consistió en una muestra de yerba mate que se obtuvo a partir de 5 marcas comerciales de yerba mate elaborada envasadas en sus paquetes tradicionales, las cuales fueron mezcladas y homogeneizadas, con el fin de disminuir el margen de variación en la composición química por diferencias en el procesamiento.

Trabajaron con una alícuota de 2,5 g de la muestra de yerba mate molida. Como solvente de extracción emplearon mezclas hidroalcohólicas de metanol: agua y etanol: agua. Así, obtuvieron 4 extractos con el objeto de evaluar el efecto del tipo de solvente y proporción hidroalcohólica: Extracto 1 (metanol: agua; 60:40), Extracto 2 (etanol: agua; 60:40), Extracto 3 (metanol: agua; 70:30) y Extracto 4 (etanol: agua; 70:30). Para la extracción emplearon una combinación de los métodos de maceración (durante 24 h a 40°C en estufa de aire a convección natural), evaporación de solvente y de sonicación (a 25° C utilizando un sonicador). La relación sólido (yerba mate): solvente de extracción fue de 1:5 (p/v).

Autores: Agostina Perlbach; Mariana Romano y Cristián Quintero

Los dos extractos hidroetanólicos y dos extractos hidrometanólicos a partir de yerba mate elaborada paraguaya presentaron ciertas características organolépticas peculiares de yerba mate, como su aroma, color y una consistencia espesa, con presencia de sedimentos.

Con los 4 extractos secos obtenidos se realizaron soluciones de trabajo, 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.

Trabajaron con cuatro concentraciones diferentes de soluciones de trabajo (ST) para cada extracto: 250 mg/mL, 200 mg/mL, 100 mg/mL y 50 mg/mL (Tabla 1).

Tabla 1: Cantidades de los extractos hidroalcohólicos secos de yerba mate elaborada en los discos de papel de filtro.

Concentración del extracto en la solución de trabajo (mg/mL)	Volumen cargado en el disco (µL)	Cantidad de extracto en el disco (mg)
50	40	2
100	40	4
200	40	8
250	40	10

Extraída de: González, Horianski, (2018). "Actividad Antibacteriana in vitro de extractos Hidroalcohólicos secos de Yerba Mate elaborada procedente de Paraguay"

Para el estudio de la actividad antimicrobiana de los extractos utilizaron el medio de cultivo agar Müller Hinton y la preparación del inóculo se realizó a partir de un cultivo de las bacterias en estudio, de 18 – 24 h de incubación a 35 ± 2°C en agar nutritivo.

Prepararon una suspensión de colonias aisladas en 5 mL de solución fisiológica estéril hasta obtener una turbidez equivalente a 0,5 de la escala de McFarland (1-2 x 10⁸ UFC/mL). Se efectuó la siembra en la superficie del agar MH con hisopo estéril. Se emplearon dos métodos: difusión en agar con discos estandarizados y en agar por pocillos.

- Método de difusión en agar con discos estandarizados: Uso de discos de papel de filtro de 6mm de diámetro, los cuales fueron esterilizados y posteriormente cargados con las diferentes concentraciones de ST y luego fueron secados en estufa a 35 ± 2° C (Tabla 1).
- Método de difusión en agar por pocillos: se realizaron pocillos en el agar de 6 mm de diámetro y se agregaron en cada pocillo 40 µL de las ST de los extractos secos de yerba mate. Como control negativo se empleó 40 µL del solvente utilizado para la preparación de la ST.

Como control positivo, para ambos métodos, emplearon discos de Ampicilina y Ceftazidima para *E. coli*, *S. aureus* y *S. Enteritidis* y discos de Imipenem para *P. aeruginosa*. Todas las placas se incubaron en estufa a 35 ± 2 °C durante 18-24h. Los ensayos los realizaron por duplicado.

Autores: Agostina Perlbach; Mariana Romano y Cristián Quintero

Para la interpretación de los resultados tuvieron en cuenta la formación o la ausencia de halo de inhibición de crecimiento, midiendo el diámetro del halo en milímetros. La ausencia de halo de inhibición de crecimiento se registró igual a 6 mm, que corresponde al tamaño del disco o pocillo. Determinaron la CIM y CBM de los extractos hidroalcohólicos, donde se observó mayor inhibición en el extracto 1 (metanol: agua; 60:40) y 2 (etanol: agua; 60:40). (Tabla 2). También se determinó el contenido de polifenoles totales.

De todas las cantidades ensayadas, la cantidad de 10 mg del extracto seco fue la que produjo halos de inhibición de crecimiento de mayor tamaño, o sea con concentración de 250 mg/mL.

Las cantidades de los extractos secos de yerba mate elaborada, en las condiciones ensayadas, presentaron actividad antibacteriana contra las cepas de *S. aureus* (salvaje), *S. aureus* (ATCC 25923) y *S. Enteritidis* (salvaje).

E. coli (ATCC 25922) y *P. aeruginosa* (ATCC 27853) no presentaron halos de inhibición de crecimiento.

Tabla 2: Porcentaje del efecto de inhibición de crecimiento de los extractos secos de yerba mate para la cantidad de 10 mg frente a *Salmonella Enteritidis* (salvaje), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) y *Staphylococcus aureus* (salvaje), por los métodos de difusión con discos y de difusión por pocillos.

Cepas	<i>Salmonella Enteritidis</i> (salvaje)		<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 25923)		<i>Staphylococcus aureus</i> (salvaje)	
	Disco	Pocillo	Disco	Pocillo	Disco	Pocillo
Extracto 1 (% EI)	35,00 ^a	44,07 ^a	131,11 ^{ab}	136,36 ^a	121,05 ^{ab}	136,11 ^a
Extracto 2 (% EI)	40,00 ^b	43,10 ^a	133,33 ^a	139,53 ^a	131,58 ^a	132,43 ^a
Extracto 3 (% EI)	30,51 ^c	46,55 ^a	131,82 ^{ab}	135,56 ^a	118,42 ^b	128,95 ^a
Extracto 4 (% EI)	20,00 ^d	20,69 ^b	123,91 ^b	139,53 ^a	110,53 ^b	121,62 ^b

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); % EI = porcentaje del efecto de inhibición de crecimiento. Los valores en una misma columna con diferentes supraíndice-sindican diferencias significativas (valor-p≤0,05).

Tabla 2. Extraída de: González, Horianski, (2018). "Actividad Antibacteriana in vitro de extractos Hidroalcohólicos secos de Yerba Mate elaborada procedente de Paraguay"

Las cepas de *S. aureus* presentaron halos de inhibición de crecimiento frente a todos los extractos ensayados, mientras que *S. Enteritidis* no presentó halo de inhibición de crecimiento frente al extracto 4 (etanol: agua; 70:30).

Las cepas de *S. aureus* arrojaron valores de CIM y CBM menores que *S. enteritidis*. La CIM y CBM hallados para *S. aureus* (ATCC 25923) es la misma en ambos extractos. Lo mismo ocurrió con *S. enteritidis*

Tabla 3: Concentración inhibitoria mínima y concentración bactericida mínima de los extractos hidroalcohólicos secos de yerba mate elaborada.

	<i>S. aureus</i> (ATCC 25923)		<i>S. aureus</i> (salvaje)		<i>S. Enteritidis</i> (salvaje)	
	E1	E2	E1	E2	E1	E2
CIM	0,78	0,78	1,56	0,78	6,25	6,25
CBM	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).

Extraída de: González, Horianski, (2018). "Actividad Antibacteriana in vitro de extractos Hidroalcohólicos secos de Yerba Mate elaborada procedente de Paraguay"

Autores: Agostina Perlbach; Mariana Romano y Cristián Quintero

(salvaje) con la diferencia que en este caso la CIM y CBM coincidieron (Tabla 3).

El contenido de polifenoles totales de los extractos secos preparados presentó un rango de 24,2724 g equivalentes a ácido gálico/100 g de extracto seco, mientras que, el contenido en la yerba mate elaborada fue de 11,16 g EAG/100 g muestra seca. De acuerdo con el análisis de varianza, no existen diferencias estadísticamente significativas del contenido de polifenoles totales entre los diferentes extractos, siendo estos significativamente mayores al de la yerba mate elaborada. El contenido de polifenoles en los extractos hidroalcohólicos secos duplica al valor hallado en la yerba mate elaborada.

Aún no se han verificado completamente los compuestos responsables de la actividad antimicrobiana que presenta 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 *S. aureus*. Los resultados de este trabajo podrían sugerir que, la presencia de otros componentes en los extractos junto a los polifenoles totales contribuiría al efecto antimicrobiano. Por lo tanto Los extractos hidroalcohólicos secos de yerba mate poseen compuestos con propiedades antibacterianas capaces de inhibir el crecimiento de *S.aureus* y *S. Enteritidis* cuando se utilizan soluciones hidroalcohólicas de etanol o metanol en una proporción 60:40.

EFFECTO ANTIBACTERIANO DE ÁCIDO GÁLICO Y CATEQUINA SOBRE *Helicobacter pylori* Y *E. coli*

Del informe “Efecto antibacteriano del ácido gálico y de la catequina sobre *Helicobacter pylori* y *Escherichia coli*” de Roberto Octavio Díaz Gómez, lo más relevante fue lo detallado a continuación.

Los polifenoles son compuestos que presentan, entre otras acciones, actividad antibacteriana. Entre los polifenoles se encuentra el ácido gálico (no flavonoide) y la catequina (flavonoide). *Helicobacter pylori* es una bacteria Gram negativa, de forma bacilar espiralada, microaerofílica, flagelada, neutrófila, que habita en la capa mucosa que recubre el epitelio del estómago humano. Se estima que el 50% de la población mundial está infectada con la bacteria.

Ésta está relacionada con enfermedades como gastritis, úlceras y es un factor de alto riesgo para adquirir cáncer gástrico. Las terapias de erradicación de *H. pylori* consisten en el uso de antibióticos que no siempre son exitosas. Por

Autores: Agostina Perlbach; Mariana Romano y Cristián Quintero

esta razón, existe la necesidad de investigar tratamientos alternativos contra la infección por *H. pylori*. El propósito de este trabajo fue estudiar el efecto antibacteriano del ácido gálico y de la catequina sobre *Helicobacter pylori* y *Escherichia coli*, como microorganismo control dados los diversos estudios que afirman que los polifenoles presentes en el vino tendrían efecto anti-*Escherichia coli*.

Utilizaron las cepas de *H. pylori* 26695 y ATCC43504, y la cepa de *E. coli* JM109. La metodología consistió en cultivar las bacterias en medio líquido o en medio sólido, suplementados con rangos de dosis de ácido gálico y/o catequina.

El efecto del ácido gálico o catequina sobre el crecimiento de cada una de las cepas bacterianas lo evaluaron mediante 9 ensayos independientes. A través de 6 ensayos independientes se estudió el efecto en conjunto de ambos compuestos por cada cepa bacteriana. Los ensayos se realizaron en duplicado y se repitieron 3 veces.

La actividad antibacteriana de los polifenoles en medio líquido se evaluó midiendo la DO_{600} de los cultivos y contabilizando las CFU/mL. Además, se midió el diámetro del halo de inhibición del crecimiento de las bacterias en medios sólidos, suplementados con los polifenoles en forma individual (Figuras 1, 2, 3 y 4) o en conjunto (Figuras 5 y 6). También se evaluó la cinética de inhibición por parte de estos compuestos sobre el crecimiento bacteriano.

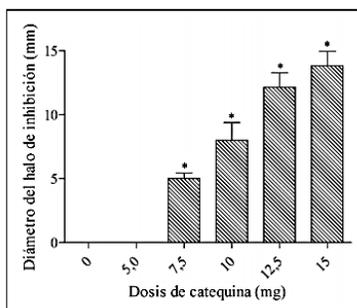


Figura 1. Medición del diámetro de los halos de inhibición de crecimiento del cultivo *E. coli*. (*) Indica diferencia estadísticamente significativa en relación con el tratamiento con 0 mg de catequina ($p < 0,05$).

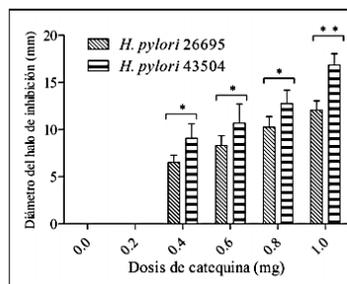


Figura 2. Medición del diámetro de los halos de inhibición del crecimiento del cultivo *H. pylori*. (*) Indica diferencia estadísticamente significativa en relación con el tratamiento con 0 mg de catequina ($p < 0,05$). (**) Indican diferencia estadísticamente significativa en relación con el tratamiento control y entre las dos cepas de *H. pylori*.

Figuras 1 y 2. Extraídas de: Díaz Gómez, R. (2012). "Efecto antibacteriano del ácido gálico y de la catequina sobre *Helicobacter pylori* y *Escherichia coli*"

Autores: Agostina Perlbach; Mariana Romano y Cristián Quintero

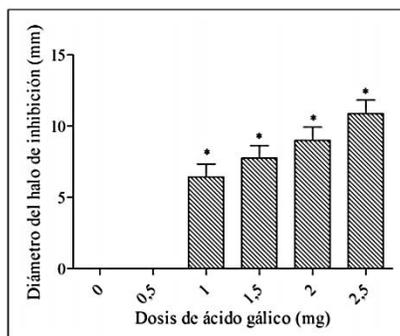


Figura 3. Diámetro de los halos de inhibición de crecimiento del cultivo de *E. coli*. * Indica diferencias estadísticamente significativas en relación con el tratamiento con 0 mg de ácido gálico ($p < 0,05$).

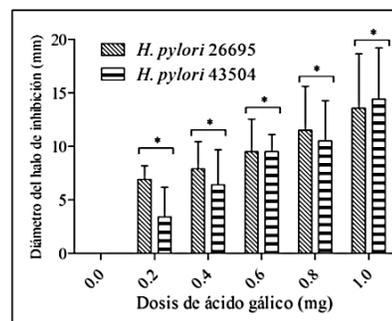


Figura 4. Diámetro de los halos de inhibición de crecimiento del cultivo de *H. pylori*. (*) Indica diferencias estadísticamente significativas en relación con el tratamiento con 0 mg de ácido gálico ($p < 0,05$).

Figuras 3 y 4. Extraídas de: Díaz Gómez, R. (2012). " Efecto antibacteriano del ácido gálico y de la catequina sobre *Helicobacter pylori*

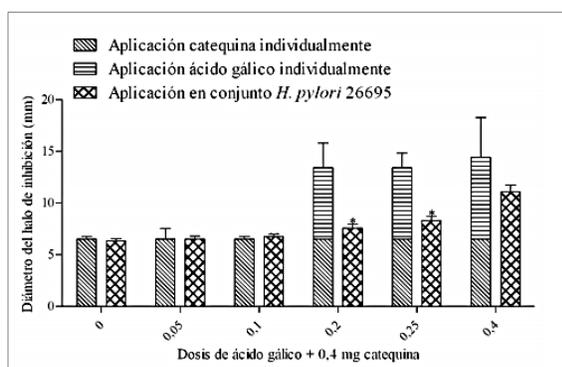


Figura 5. Diámetro de los halos de inhibición del crecimiento de *H. pylori* cepa 43504 (A) y 26695 (B). (*) Indica una diferencia estadísticamente significativa entre la aplicación en forma individual y en conjunto ($p < 0,05$).

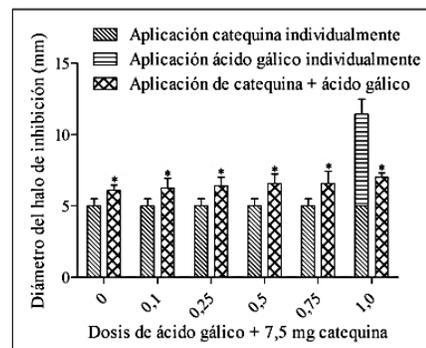


Figura 6. Diámetro de los halos de inhibición del crecimiento de *E. coli*. La bacteria fue tratada con dosis crecientes de ácido gálico + 7,5 mg de catequina. (*) Indica diferencia estadísticamente significativa entre la aplicación de forma individual de los polifenoles en relación a la aplicación en conjunto ($p < 0,05$).

Figuras 5 y 6. Extraídas de: Díaz Gómez, R. (2012). " Efecto antibacteriano del ácido gálico y de la catequina sobre *Helicobacter pylori*

Los resultados que obtuvieron indican que tanto ácido gálico como catequina presentan actividad bactericida sobre ambas bacterias, siendo más efectivo el ácido gálico (el cual inhibe el crecimiento con concentraciones, dosis y tiempos de exposición menores que la catequina). La bacteria más sensible a los dos polifenoles es *H. pylori*. El efecto sinérgico resultó ser variable, relacionado fuertemente con las dosis de ácido gálico y catequina.

Autores: Agostina Perlbach; Mariana Romano y Cristián Quintero

PROPIEDADES BIOACTIVAS E IMPLICACIONES: SALUD ANTIMICROBIANA Y ORAL

Del trabajo "*Composition and Bioactive Properties of Yerba Mate (Ilex paraguariensis A. St.-Hil.)*" de de Burris, Kellie P, Harte, Federico M, Michael Davidson, P, Neal Stewart Jr, C, & Zivanovic, Svetlana. (2012), se extrajo:

Los 10 compuestos principales identificados como componentes antimicrobianos potenciales fueron linalool, α -ionona, β -ionona, α -terpineol, ácido octanoico, geraniol, 1-octanol, nerolidol, geranilactona y eugenol.

Son activos contra un amplio espectro de bacterias. Las bacterias Gram-positivas, *Bacillus subtilis*, *Brevibacterium ammoniagenes*, *Propionibacterium acnes*, *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus mutans* y cinco hongos, *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida utilis*, *Pityrosporum ovale*, *Penicillium chrysogenum* y *Trichophyton mentagrophytes*, fueron inhibidos por al menos uno de los diez compuestos identificados probados. Ninguno de los extractos probados fue efectivo contra las bacterias Gram negativas, *Pseudomonas aeruginosa* o *Enterobacter aerogenes* y se encontró que solo eran débilmente activos contra *Escherichia coli*.

En contraposición, los extractos acuosos de yerba mate demostraron actividad antimicrobiana contra *S. aureus* y *E. coli* O157: H7, que indica inhibición e inactivación de bacterias Gram-positivas y Gram-negativas. Este hallazgo sugiere que hay un compuesto adicional presente en el extracto acuoso que proporciona actividad además de los 10 identificados.

Los polifenoles identificados en la yerba mate incluyen ácido cafeico, cafeína, derivados cafeoílicos, ácido cafeoilshikimico, ácido clorogénico, ácido feruloilquínico, kaempferol, quercetina, ácido quínico, rutina y todos que contribuyen a la actividad antimicrobiana contra los patógenos transmitidos por los alimentos. Los ácidos cafeico y clorogénico en su forma pura han demostrado actividad contra bacterias Gram negativas.

Es probable que una combinación de compuestos encontrados en los extractos de yerba mate esté contribuyendo a la actividad antimicrobiana contra las bacterias Gram-negativas y Gram-positivas, como lo demuestra la ineficacia de la actividad de algunos compuestos individuales.

Los extractos de N-hexano de la yerba mate son agentes antimicrobianos eficaces contra la bacteria oral, *Streptococcus mutans*

Autores: Agostina Perlbach; Mariana Romano y Cristián Quintero

CONCLUSIÓN

La yerba mate elaborada como antimicrobiano y su capacidad para conservar alimentos y bebidas, puede representar una alternativa prometedora capaz de complementar o de reemplazar a productos químicos sintéticos para la preservación microbiológica de alimentos.

FUENTES CONSULTADAS

- Burris, Kellie P, Harte, Federico M, Michael Davidson, P, Neal Stewart Jr, C, & Zivanovic, Svetlana. (2012). Composition and Bioactive Properties of Yerba Mate (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil.): A Review. Chilean journal of agricultural research, 72(2), 268-275. <https://dx.doi.org/10.4067/S0718-58392012000200016>
- Díaz Gómez, R. (2012). Efecto antibacteriano del ácido gálico y de la catequina sobre *Helicobacter pylori* y *Escherichia coli*. Disponible en <http://repositorio.uchile.cl/handle/2250/112192>
- González Coria, J. C., & Horianski, M. A. (2018). Actividad Antibacteriana in vitro de extractos Hidroalcohólicos secos de Yerba Mate elaborada procedente de Paraguay. *Revista De Ciencia Y Tecnología*, 30(1), 12 - 20. Recuperado a partir de <https://www.fceqyn.unam.edu.ar/recyt/index.php/recyt/article/view/251>