#  ARTICULO ORIGINAL Rev. Methodo 2024;9(1):49-56

#  [https://doi.org/10.22529/me.2024.9(1)06](https://doi.org/10.22529/me.2024.9%281%2906)

|  |  |
| --- | --- |
|  Recibido 10 Sep. 2023 | Aceptado. 30 Oct. 2023 |Publicado 05 Ene. 2024 |  |

**Evaluación de la toxicidad genética de la yerba mate (*Ilex paraguariensis*) en *Allium cepa***

**Evaluation of the genetic toxicity of yerba mate (*Ilex paraguariensis*) in *Allium cepa***

Daniel Lerda1 Pablo Gargantini1

1. Universidad Católica de Córdoba. Facultad de Ciencias de la Salud. Clínica Universitaria Reina Fabiola. Servicio de Biología Molecular.

Correspondencia: Daniel Lerda Email: daniellerda@curf.ucc.edu.ar

**Resumen**

INTRODUCCIÓN: La Yerba Mate, es una infusión hecha de las hojas del árbol *Ilex paraguariensis,* planta de la familia Aquifoliaceae. Es una bebida que se consume principalmente en los países de América del Sur como Argentina, Uruguay, Brasil, Paraguay y está logrando una mayor penetración en Estados Unidos como en otros países del mundo.

OBJETIVO: El presente estudio evalúa la genotoxicidad de la yerba mate *(Ilex paraguariensis),* previamente probado para la presencia de hongos toxigénicos en cultivos específicos.

MATERIAL Y METODOS: Se utilizó el sistema *Allium cepa* para el estudio de genotoxicidad, las células meristemáticas fueron tratadas con una infusión filtrada de mate, con agua destilada como control negativo y Dimetilsulfóxido (DMS) al 0,2 % como control positivo.

RESULTADOS: El crecimiento radicular fue reducido dependiendo de la concentración, y al estudiar la proliferación celular se observó que la frecuencia de células mitóticas se reducía progresivamente a medida que aumentaba la concentración de yerba mate. Por otra parte, se observó un aumento en la frecuencia de células aberrantes con la concentración de yerba mate más alta (1400 µg/ml).

CONCLUSIONES: Los hallazgos de este estudio muestran que la yerba mate induce efectos clastogénicos en las raíces meristemáticas de *Allium cepa.*

**Palabras clave:** yerba mate, hongos toxigénicos, genotoxicidad, *Allium cepa*.

**Abstract**

INTRODUCTION: Yerba Mate is an infusion made from the leaves of the (*Ilex paraguariensis*), a plant of the Aquifoliaceae family. It is a drink that is consumed mainly in South American countries such as Argentina, Uruguay, Brazil, and Paraguay; and is achieving greater penetration in the United States as in other countries of the world.

OBJETIVE: The present study evaluates the genotoxicity of yerba mate (*Ilex paraguariensis),* previously tested for the presence of toxigenic fungi in specific crops.

 MATERIAL AND METHODS: For genotoxicity study the *Allium cepa* test system was used and the meristematic cells were treated with mate infusion, with distilled water as negative control and dimethyl sulfoxide (DMS) at 0.2% as positive control.

RESULTS: Root growth was reduced depending on the concentration and the study cell proliferation, was observed that the frequency of mitotic cells was reduced progressively as the concentration of yerba mate increased. On the other hand, it was observed increase in the frequency of aberrant cells with the highest yerba mate concentration (1400 ug/ml).

**49**

CONCLUSIONS: The findings of this study show that yerba mate induces clastogenic effects in the roots. *Allium cepa* meristematic

**Keywords:** yerba mate, toxigenic fungi, genotoxicity, *Allium cepa.*

# Introducción

La Yerba Mate es una infusión hecha de las hojas del árbol *Ilex paraguariensis*, planta de la familia Aquifoliaceae1,2. Es una bebida que se consume principalmente en los países de América del Sur como Argentina, Uruguay, Brasil, Paraguay y está logrando una mayor penetración en Estados Unidos como en otros países del mundo.

El mate ha sido muy publicitado por sus beneficios para la salud, pero también ha habido controversias en la literatura científica. Por un lado, sus efectos saludables incluyen ser hipocolesterolémico, hepatoprotector3, estimulante del sistema nervioso central, diurético4 y antioxidante5,6. También beneficioso para el sistema cardiovascular7, *in vitro* es un protector de la oxidación del ADN y lipoperoxidación de las lipoproteínas de baja densidad (LDL)8. Además, algunos estudios han sugerido su eficacia en el manejo de la obesidad9,10,11. Se han detectado numerosos fitoquímicos activos en la yerba mate que pueden ser parte de sus beneficios para la salud, entre ellos se encuentran los polifenoles (ácido clorogénico), las xantinas (cafeína y teobromina), los alcaloides de purina (ácido cafeico, ácido 3,4-dicafeoilquínico, ácido 3,5-dicafeoilquínico), los flavonoides (quercetina, kaempferol y rutina), aminoácidos, minerales (P, Fe y Ca) y vitaminas (C, B1, y B2)12,13.

Sin embargo, se ha demostrado que la yerba mate no solo contiene compuestos bioactivos, sino que también puede ser citotóxica para células de hepatoma humano (HepG2), y puede actuar como un inhibidor de la topoisomerasa II14. Por otra parte, algunos estudios epidemiológicos han demostrado una asociación entre el consumo de yerba mate y un aumento de riesgo en varios tipos de cáncer, incluyendo oral, orofaríngeo, esofágico, laríngeo y vesical15,16,17. Sin embargo, estos datos se basan en estudios de casos llevados a cabo en poblaciones que también consumían alcohol y tabaco, de esta manera el mate como factor de riesgo podría estar enmascarado15. A pesar de que aún se desconoce el mecanismo exacto de la carcinogénesis, la información hasta el momento sugiere que la infusión de mate debería ser considerada como un factor de riesgo para el cáncer de cabeza y cuello18. Existen pocos datos sobre la toxicidad de la yerba mate y los ensayos *in vitro* son controvertidos. Resultados de la prueba de Ames mostró actividad mutagénica y genotóxico19. Por otra parte, extractos de mate aumentaron la frecuencia de aberraciones cromosómicas en cultivos de linfocitos humanos *in vitro*20. Sin embargo, usando el mismo modelo experimental se demostró que la infusión de mate no induce un aumento estadísticamente significativo en la formación de micronúcleos21. Otro factor a tener en cuenta es la contaminación fúngica de la mayoría de los productos agrícolas, que se produce principalmente durante el almacenamiento, donde las condiciones de humedad y temperatura favorecen el desarrollo de hongos contaminantes y la yerba mate no escapa a esta generalidad. Además, hay que considerar el impacto del envasado, que es de fundamental importancia ya que un envase más hermético evita posibles contaminaciones1 y conserva mejor las propiedades del producto, se emplean envases de papel o papel encerado22,23. El consumo de yerba mate contaminada con hongos productores de toxinas resulta peligroso para la población, que llega a todas las esferas sociales y a todas las edades, incluso a los más pequeños con el uso del llamado “tereré” (infusión fría)24.

Los bioensayos con plantas se consideran bastante sensibles y sencillos en el control de los efectos citotóxicos de compuestos químicos25,26, y la cebolla (*Allium cepa*) es un sistema eficiente para la evaluación de esta citotoxicidad27 debido a sus propiedades cinéticas de proliferación, a su pequeño número de cromosomas (2n=16) y otras características que facilitan su análisis para la detección de daños en la estructura de la molécula de ADN28-30 y cambios en el índice de división celular (índice mitótico), como el aumento o reducción de la proliferación de células tisulares expuestas a compuestos químicos31,32, y también por demostrar similitud satisfactoria con los resultados obtenidos con otros bioensayos como los realizados con animales y cultivos celulares33,36.En virtud de la ausencia de estudios genotóxicos de la yerba mate en células vegetales, el objetivo de este trabajo es determinar el efecto citotóxico de esta planta en células meristemáticas de *Allium cepa*.

**50**

# Materiales y métodos

**Preparación de la muestra**

Yerba mate (*Ilex paraguariensis*) envasada, de origen comercial obtenida en la ciudad de Córdoba - Argentina, fue hervida en agua destilada (200 g/l) durante 10 minutos utilizando un vaso de precipitado estéril. A continuación, la infusión se pasó por una membrana de poro 0,22 µm estéril y se utilizó inmediatamente para la preparación de las diferentes concentraciones a utilizar en los ensayos: 1400 µg/ml, 700 µg/ml, 350 µg/ml y 175 µg/ml.

**Ensayo de *Allium cepa***

Se utilizaron bulbos de cebolla, variedad perla, con un peso promedio de 20g. Las raíces adventicias se obtuvieron colocando la base de los bulbos en tubos cónicos con agua filtrada y un sistema de burbujeo de aire constante (10 – 20 ml/min). El ensayo se realizó en una estufa a 25± 0,5 °C en oscuridad. Los bulbos se incubaron en agua filtrada y cuando las raíces tenían de 3 a 5 cm de largo, se expusieron a las diferentes concentraciones de yerba mate. Para el control positivo se utilizó Dimetilsulfóxido (DMS) al 0,2 % y como control negativo agua destilada.

**Crecimiento radicular**

El crecimiento se determinó midiendo la longitud de 10-12 raíces previamente identificadas por bulbos y expuestas a las diferentes concentraciones de yerba mate. Se registró la medición cada 24 h durante 96 h.

**Actividad proliferativa**

La actividad proliferativa se cuantificó determinando la frecuencia de células mitóticas en el extremo de las raíces obtenidas 0, 12, 24 y 48 h después del inicio del ensayo. Luego se cortaron y fijaron en etanol-ácido acético (3:1) a 4 °C durante 24 h. Se colorearon las raíces con orceína-acética37 y luego se hicieron aplastados del área meristemática entre porta y cubre. Se determinó la frecuencia de células mitóticas en 1000 células.

**Aberraciones cromosómicas**

Cuando las raíces alcanzaron 3-5 cm de largo, se expusieron a las diferentes concentraciones de yerba mate durante 24 h. Posteriormente, fueron incubadas con colchicina al 0,1% durante 3 h. Luego se cortaron las raíces y se fijaron en etanol-ácido acético (3:1) a 4 °C por 24 h. Se tiñeron con orceína-acética y aproximadamente 5000 células fueron contadas para frecuencia y tipo de aberraciones cromosómicas. Se usó Dimetilsulfóxido (DMS) al 0,2% como control positivo. La frecuencia (porcentaje) de células aberrantes se determinó sobre la base del total de células calculadas y el número de células en división. Para determinar las diferencias significativas entre las raíces tratadas y las de control, se utilizó el ensayo Irwin-Fischer (Z) para la probabilidad exacta.

Detección de hongos en yerba mate

Se realizó el recuento fúngico total con la metodología propuesta por las Normas IRAM 20517: 2007, Argentina38. El método consiste en pesar 10gr de la muestra y diluirla en 90 ml de solución fisiológica peptonada (SFP) obteniéndose así la dilución 1/10 a partir de la cual se realizaron sucesivas diluciones decimales. Se inoculó 0.1 ml de cada una de las diluciones, en placas de Petri conteniendo medio de cultivo agar–cloranfenicol y se diseminó el inóculo empleando una espátula de Drigalsky. Las placas se incubaron a 25±1ºC durante 5 a 7 días, luego se analizaron mohos, levaduras y caracterizaron los géneros fúngicos. De acuerdo a claves taxonómicas39,40,41se identificaron genéricamente las cepas de hongos filamentosos sobre la base de la macro-micromorfología de las colonias. Se analizaron las cepas de levaduras aisladas, teniendo en cuenta el crecimiento, en distintos medios de cultivo de acuerdo a Pitt y Hocking41 y poniendo de manifiesto la importancia de la contaminación con hongos de los tres géneros micotoxigénicos: *Aspergillus, Penicillium y Fusarium.*

# Resultados

Los resultados del recuento fúngico total y de los géneros fúngicos caracterizados en la muestra de yerba mate elaborada fue RFT (recuento fúngico total) = 2,2 x 103UFC/g Dentro de los géneros de mohos micotoxigénicos el mayor porcentaje de incidencia le correspondió al género *Aspergillus spp* (80 %), seguido de *Penicillium spp* (21 %) y *Fusarium spp* (11 %).

Para el estudio de genotoxicidad se utilizó un rango de dosis similar al propuesto por Fonseca *et al*.20 pero por un diferente método de preparación de la muestra (infusión de mate), que es la ingesta habitual del consumo humano. Se analizó el efecto de diferentes concentraciones de yerba mate sobre el crecimiento longitudinal de la raíz y se observó que a la concentración de 1400 µg/ml se detiene el proceso de crecimiento a las 24 h, en comparación con las raíces control. Estos hallazgos confirman que la yerba mate provoca una inhibición del crecimiento de las raíces cuya intensidad depende de la concentración en un medio determinado (Figura1).

**51**



**Figura 1**. Efecto de la yerba mate sobre el crecimiento radicular

Al estudiar la proliferación celular de las muestras, se observó que la frecuencia de células mitóticas se reducía progresivamente a medida que aumentaba la concentración de yerba mate. Los valores mínimos se alcanzaron a las 24 h (Figura.2)



**Figura 2**. Efecto de la yerba mate sobre la actividad proliferativa en la región meristemática de la raíz

Esta inhibición fue transitoria, ya que se observó una recuperación de la actividad proliferativa a las 48 h de incubación de la muestra de yerba mate. Bulbos de cebolla expuestos a las concentraciones 700 µg/ml, 350 µg/ml y 175 µg/ml de yerba mate, tenían una frecuencia de células mitóticas similar a la de los bulbos de control.

Finalmente, en el análisis de si la yerba mate induciría efectos clastogénicos en las raíces meristemáticas de *Allium cepa,* los datos sobre la frecuencia de células aberrantes (Tabla.1) denotaron un aumento en la frecuencia de células aberrantes con la concentración más alta (1400 µg/ml) respecto al control negativo.

**52**

**Tabla 1**. Frecuencia y aberraciones citológicas inducidas por la yerba mate en el sistema *Allium cepa*



a Dimetilsulfóxido 0,2 %

\*Z = 7,10 significante a P < 0,05

Se realizó el ensayo de Irwin-Fischer (Z) para la probabilidad exacta con el total de células aberrantes, ya que a la concentración de 1400 µg/ml sólo se produjeron puentes y células binucleadas, diferenciándose así del control positivo. El resultado fue Z = 7,10 (> 1,94), significativo en P < 0,05.

# Discusión

Para esclarecer compuestos con potencial efectos genotóxicos investigamos la presencia de hongos toxigénicos en la yerba mate, detectándose mayoritariamente a las especies *Aspergillus, Penicillium y Fusarium.* S i bien este hallazgo es de solo una muestra investigada podemos inferir que, debido a motivos no investigados en este trabajo, existe el potencial del crecimiento de hongos toxigénicos en empaquetados comerciales de yerba mate. Es sabido que la incidencia de hongos en productos alimenticios comerciales puede variar debido a diferencias en el manejo durante el proceso de elaboración y empaquetado, como a condiciones de almacenamiento posteriores. Podemos afirmar que la yerba mate es un sustrato adecuado para el desarrollo de diferentes especies de hongos, incluyendo al género *Aspergillus spp.,* por lo tanto, es fundamental determinar el medio más adecuado para la captura y análisis de estos hongos, y que pueda indicar realmente la incidencia de los mismos en yerba mate dado su potencial riesgo a la salud humana. Además, debemos tener en cuenta que estos hongos según la sección son productores de Aflatoxinas, que son de las micotoxinas más estudiadas y controladas. Toxicológicamente se consideran toxinas potentes, relacionadas con la génesis del cáncer, mutaciones puntuales y múltiples alteraciones en el desarrollo fetal. Jerke *et al*.42, determinaron la presencia de 24 géneros de hongos filamentosos en muestras de yerba mate elaborada. Dentro de los géneros de mohos micotoxigénicos el mayor porcentaje de incidencia le correspondió al género *Aspergillus spp.,* seguido de *Penicillium spp*. y *Fusarium spp.* Resultados similares fueron encontrados en un estudio realizado por Marucci43 en el año 2003 con la totalidad de las muestras presentando contaminación. De acuerdo a estos resultados, es importante la realización de controles microbiológicos periódicos en el producto, debido a la posible presencia de especies aflatoxigénicas y aflatoxinas, así como los serios daños que pueden llegar a causar a la salud pública donde la población consume en forma masiva la yerba mate de diferentes formas. Es por tanto relevante evaluarlos de manera a permitir que el consumidor acceda a productos inocuos y de buena calidad.

Según lo encontrado en nuestro trabajo, la yerba mate induciría efectos clastogénicos en las raíces meristemáticas de *Allium cepa.* Esto sugiere que la infusión de mate inhibe el crecimiento longitudinal de la raíz en función de su concentración, quizás bloqueando el ciclo de división celular en una etapa anterior a la mitosis. Las aberraciones citológicas observadas en el ensayo de la raíz meristemática de *Allium,* a la concentración de 1400 µg/ml, mostró que la yerba mate podría inducir genotoxicidad a nivel cromosómico. Este fenómeno debe ser considerado como una de las principales alteraciones cromosómicas a nivel de células vegetales. Los resultados obtenidos en la presente investigación refuerzan la importancia de *Allium cepa*, ya que en este estudio los resultados son similares a los obtenidos con otros bioensayos. Por ejemplo, Leitao y Braga19 mostraron que los preparados de mate son mutagénicos y genotóxicos, y por lo tanto potencialmente cancerígenos, en ensayos con bacterias. Ellos manifiestan que las consecuencias nocivas del consumo de mate para la salud humana deben ser discutidas a la luz de estos resultados. De hecho, estudios epidemiológicos han demostrado que, en el sur de Brasil, donde el consumo de infusión de mate es alto, la incidencia de tumores esofágicos letales es mayor que en las otras regiones del país (Sistema de Información sobre Mortalidad/Ministerio da Salud, Brasil 1986).

Por otra parte, Wnuk*et al*.44 determinaron que, a pesar de su capacidad antioxidante y sus conocidos beneficios para la salud, el té de yerba mate (*Ilex paraguariensis*) ha demostrado poseer ciertas actividades genotóxicas y mutagénicas, aumentando la incidencia de algunos tipos de cáncer. El objetivo de su estudio fue estimar la citotoxicidad y genotoxicidad del té de yerba mate en linfocitos humanos *in vitro*. Encontraron que el extracto de yerba mate indujo una concentración dependiente, presentó un aumento estadísticamente significativo en el nivel de células apoptóticas, necróticas y una disminución en el índice de división nuclear (NDI).Además, dado que la cafeína es uno de los más abundantes compuestos encontrados en la masa seca del mate, realizaron experimentos adicionales con cafeína sola, demostrando que la cafeína utilizada en las mismas concentraciones manifestó un efecto citotóxico y genotóxico más potente. Efecto que puede explicar, al menos en parte, los efectos desventajosos observados para el extracto de yerba mate. Por último, la investigación de Fonseca, C *et al*.20 sugirieron, con el estudio en bacterias, que el alto consumo de yerba mate puede potenciar la carcinogénesis en faringe y esófago humano. Respecto a este último, se ha demostrado que los riesgos de cáncer se deben 1) a la cantidad de mate que se consume por día y la frecuencia, que a menudo es más de un litro por día45,46 y 2) el daño por la temperatura que puede potenciar la acción de las sustancias carcinogénicas. Es importante recordar que el mate es una infusión caliente de *Ilex paraguariensis* que se bebe a través de un tubo metálico que aplica el líquido caliente en la parte posterior de la lengua, desde donde se ingiere rápidamente 47-49 .Estos estudios sugieren una asociación entre la ingesta de bebidas calientes y el desarrollo de cáncer de esófago. Por otra parte, hay controversia en el estudio de Vargas Alves*et al.*21con respecto a los estudios antes mencionados. Ellos utilizaron la técnica de micronúcleos en linfocitos humanos y no detectaron efecto aneugénico ni clastogénico. También es importante señalar, como ha mencionado Lerda50-51, que, si bien el metabolismo de la planta es diferente, los resultados de *Allium cepa* son excelentes parámetros de análisis citotóxico, y que la observación de las alteraciones cromosómicas en el ciclo de la célula de esta especie se ha utilizado como indicador para advertir a las personas sobre el consumo de ciertos alimentos 52-54.

# Conclusión

Los resultados obtenidos en este estudio indican que el mate *Ilex paraguariensis* posee sustancias que producen efectos citotóxicos y daño genético en las células meristemáticas de la raíz de *Allium cepa.*

En base a los resultados obtenidos en nuestra investigación, se concluye que la yerba mate puede albergar hongos toxigénicos, principalmente del género *Aspergillus*, *Penicillium* y *Fusarium*, lo que plantea preocupaciones sobre la seguridad de los productos comerciales de yerba mate. La variabilidad en la incidencia de estos hongos resalta la importancia de implementar controles microbiológicos periódicos durante la producción y el almacenamiento de la yerba mate para garantizar su calidad y minimizar el riesgo para la salud pública. Además, la detección de efectos genotóxicos en las raíces meristemáticas de *Allium cepa* a partir de extractos de yerba mate sugiere la posibilidad de daño cromosómico, respaldando estudios previos que indican la mutagenicidad y genotoxicidad potencial de esta bebida.

**53**

Dado que la yerba mate, de uso común, es ampliamente utilizada y aún genera una serie de dudas sobre su toxicidad, se necesitan realizar investigaciones adicionales para determinar sus efectos mutagénicos, cancerígenos y genotóxicos.

# Bibliografía

1. Small E, CatlingPM. 2001.Blossoming treasures of biodiversity: 3. Mate (Ilex paraguariensis) – better than Viagra, marijuana, and coffee? Biodiversity 2:26–7.

2. Grigioni G, Carduza F, Irurueta M, Pensel N. 2004. Flavour characteristics of Ilexparaguariensis infusion, a typical Argentine product, assessed by sensory evaluation and electronic nose. J Sci Food Agric 84:427–32.

3. Filip R, Ferraro GE. 2003. Researching on new species of” Mate”: Ilex brevicuspis: phytochemical and pharmacology study. Eur J Nutr 42:50–4.

4. Gonzalez A, Ferreira F, Vazquez A, Moyna P, Paz EA. 1993. Biological screening ofUruguayan medicinal-plants. J Ethnopharmacol 39:217–20.

5. Filip R, Lotito SB, Ferraro G, Fraga CG. 2000. Antioxidant activity of Ilexparaguariensis and related species. Nutr Res 20:1437–46.

6. VanderJagt TJ, Ghattas R, VanderJagt DJ, Crossey M, Glew RH. 2002. Comparison ofthe total antioxidant content of 30 widely used medicinal plants of NewMexico. LifeSci 70:1035–40.

7. Schinella G, Fantinelli JC, Mosca SM. 2005. Cardioprotective effects of Ilex paraguariensis extract: evidence for a nitricoxide-dependentmechanism.ClinNutr 24:360–6.

8. Bracesco N, Dell M, Rocha A, Behtash S,Menini T, Gugliucci A, Nunes E. 2003. Antioxidant activity of a botanical extract preparation of Ilex paraguariensis: prevention of DNA double-strand breaks in Saccharomyces cerevisiae and human low-density lipoprotein oxidation. J Altern Complement Med 9:379–87.

9. Andersen T, Fogh J. 2001.Weight loss and delayed gastric emptying following a SouthAmerican herbal preparation in overweight patients. J Hum Nutr Diet 14:243–50.

10. Pittler MH,Ernst E. 2004.Dietary supplements forbody-weight reduction: a systematicreview. Am J Clin Nutr 79:529–36.

11. Opala T, Rzymskip P, Pischel I, Wilczak M, Wozniak J. 2006. Efficacy of 12 weeks supplementation of a botanical extract-basedweight loss formula on bodyweight, bodycomposition and blood chemistry in healthy, overweight subjects – a randomized double-blind placebo-controlled clinical trial. Eur JMed Res 11:343–50.

12. Pomilio AB, Trajtemberg S, Vitale AA. 2002.High-performance capillary electrophoresis analysis ofMate infusions prepared from stems and leaves of Ilex paraguariensis usingautomatedmicellar electrokinetic capillary chromatography.Phytochem Anal 13:235–41.

13. Zaporozhets OA, Krushynska OA, Lipkovska NA, Barvinchenk VN. 2004. A new testmethod for the evaluation of total antioxidant activity of herbal products. J AgricFood Chem 52:21–5.

14. Ramirez-Mares MV, Chandra S, de Mejia EG. 2004. In vitro chemopreventive activityof Camellia sinensis, Ilex paraguariensis and Ardisia compressa tea extracts andselected polyphenols.Mutat Res 554:53–65.

15. Goldenberg D, Golz A, Joachims HZ. 2003. The beverageMate: a risk factor for cancerof the head and neck. Head Neck 25:595–601.

16. SewramV,De Stefani E, Brennan P, Boffetta P. 2003.Mate consumption and the risk ofsquamous cell esophageal cancer in Uruguay. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev12:508–13.

17. BatesMN,Hopenhayn C,ReyOA,Moore LE. 2007.Bladder cancer andMate consumptionin Argentina: a case-control study. Cancer Lett 246:268–73.

18. Goldenberg D. 2002.Mate: a risk factor for oral and oropharyngeal cancer. Oral Oncol38:646–9.

**54**

19. Leitao AC, Braga RS. 1994.Mutagenic and genotoxic effects ofMate (Ilex paraguariensis) in prokaryotic organisms. Braz JMed Biol Res 27:1517–25.

20. Fonseca CA, Otto SS, Paumgartten FJ, Leitao AC. 2000.Nontoxic, mutagenic, and clastogenic activities ofMate-Chimarrao (Ilex paraguariensis). J Environ Pathol ToxicolOncol 19:333–46.

21.Rafael Jose Vargas Alves, Geraldo Pereira Jotz, Viviane Souza do Amaral,

Tiago Maeso Hermes Montes, Honorio Sampaio Menezes, Heloısa Helena Rodrigues de Andrade. The evaluation of mate´ (Ilex paraguariensis) genetic toxicity in

human lymphocytes by the cytokinesis-block in the micronucleus assay. Toxicology in Vitro 22 (2008) 695–698

22. Medin R, Medin S Yerba mate en Alimentos. Introducción, Técnica y Seguridad. 3ª Edición. Ediciones Turísticas. Pág 161. 2007.

23. Parra Patricia Té y Yerba mate: Perfiles productivos. Dirección Nacional de Alimentos. En <http://www.alimentosargentinos>. gov.ar. Julio 2008

24. De Bernardi LA, Prat Krikun SA Cadena alimentaria de la Yerba Mate. Diagnóstico de la región yerbatera. En www.sagpya.mecon.gov.ar /0–3/in Fusion/diagnóstico/diagnost\_YM.htm, 2001

25. Grant WF (1999) Chromosome aberration assays in Allium. A report of the U.S. environmental protection agency Gene-Tox program. Mutat Res 99: 273-291.

26. Iganci JRV, Bobrowski VL, Heiden G, Stein VC, Rocha BHG (2006) Efeito do extrato aquoso de diferentes espécies de boldo sobre a germinacao índice mitótico de Allium cepa L. Arq Inst Biol 73: 79-82

27. Leme DM, Marin-Morales MA (2008) Chromosome aberration and micronucleus frequencies in Allium cepa cells exposed to petroleum polluted water-a case study. Mutat Res 650: 80-86.

28. Matsumoto ST, Mantovani MS, Malaguttii MIA, Dias AL, Fonseca IC, et al. (2006) Genotoxixity and mutagenicity of water contaminated with tannery effluents, as evaluated by the micronucleus test and comet assay using the fish Oreochromis niloticus and chromosome aberration in onion root-tips. Genet Mol Biol 29: 148-158

29. Carita R, Marin-Morales MA (2008) Induction of chromosome aberrations in the Allium cepa test system caused by the exposure of seeds to industrial effluents contaminated with azo dyes. Chemosphere 72: 722-725.

30. Herrero O, Pérez Martín JM, Fernández Freire P, Carvajal López L, Peropadre A, et al. (2012) Toxicological evaluation of three contaminant of emerging concern by use of Allium cepa test. Mutat Res 743: 20-24.

31. Gadano A, Gurni A, López P, Ferraro G, Carballo M (2002) In vitro genotoxic evaluation of the medicinal plant Chenopodium ambrosioides L. J Ethnopharmacol: 81: 11-16.

32. Tabrez S, Shakil S, Urooj M, Damanhouri GA, Abuzenadah AM, et al. (2011) Genotoxicity testing and biomarker studies on surface water: an over view of the techniques and their efficacies. J Environ Sci Health C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev 29: 250-275.

33. Gomes KM, Oliveira MV, Carvalho FR, Menezes CC, Peron AP (2013) Cytotoxicity of food dyes sunset yellow (E-110), bordeaux red (E-123), and tatrazine yellow (E-102) on Allium cepa L. root meristematic cells. Food Sci Technol (Campinas) 33: 218-223.

34. Nunes EA, de Lemos CT, Gavronski L, Moreira TN, Oliveira NC, et al. (2011) Genotoxic assessmernt on river water using diferent biologycal systems. Chemophere 84: 47-53.

35. Arung ET, Furuta S, Ishikawa H, Tanaka H, Shimizu K, et al. (2011) Melanin biosynthesis inhibitory and antioxidant activities of quercetin-3’-O-beta-D-glucose isolated from Allium cepa. Z Naturforsch C 66: 209-214.

36. Geraskin S, Oudalova A, Michalik B, Dikareva N, Dikarev V (2011) Geno-toxicity assay of sediment and water samples from the Upper Silesia post-mining areas, Poland by means Allium test. Chemosphere 83: 1133-1146.

37. Tjio, JH, Levan A, Stalfelt MG (1950) The use of oxyquinoline in chromosome analysis. With appendix: The effect of oxyquinoline on protoplasmic viscosity. An Estac Exp Aula Dei 2: 21-64.

38. IRAM 20517: 2007 Yerba mate canchada y yerba mate elaborada: Análisis microbiológicos. Instituto Argentino de Normalización y certificación, 2007.

39. Koneman E.W, Roberts G.D. Micología. Práctica de Laboratorio. 3º ed. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana S. A. 1987

**55**

40. Larone DH Medically Important Fungi: A guide to identification. 3º ed. New York: Elsevier, 1995

41. Pitt, J. L. & Hocking, A. D. 2009. Fungi and Food spoilage. 3º Ed. LondonWienheim-New York-Tokyo-Melbourne-Madras: Blackie Academic &Professional

42. Jerke, G; Horianski, MA; Salvatierra, KA. 2009. Evaluación de génerosmicotoxigénicos en yerba mate elaborada. Revista de Ciencia y Tecnología 11(12):41-45.

43. Marucci R, Knass P. Flora fúngica en yerba mate envasada comercializada en Posadas. La Alimentación Latinoamericana Nº 247. Posada, Argentina: [sn], 2003: 54–58.

44. Maciej Wnuka, Anna Lewinska, Bernadetta Oklejewicza, Monika Bugno,

Ewa Slota, Grzegorz Bartosz. Evaluation of the cyto- and genotoxic activity of yerba mate (Ilex paraguariensis) in human lymphocytes in vitro. Mutation Research 679 (2009) 18–23

45. De Stefani E, Muñoz N, Esteve J, Vassalo A, Victoria CG, Teuchmann S. Mate drinking, alcohol, tobacco, diet, and esophageal cáncer in Uruguay. Cancer Res 1990; 50:426-431.

46. De StefaniE, correa P, Oreggia F, Deneo-Pellegrini H, Fernandez G, Zavala D, Carzoglio J, Leiva J, Fontham E, Rivero S, Black Tobacco wine and mate in oropharyngeal cáncer. A case control study from Uruguay. Rev.Epidemiol Santé Publ 1988; 36:389-394

47. Kligman LH, Kligman AM, Reflections on heat Br J Dermatol 1984; 110:369-375.

Yioris N, Ivankovic S, Lehnert T. effect of termal injury and oral administration of N-methyl-N-nitro-N-nitrosoguanidine on the development of esophageal tumors in wistar rats. Oncology 198; 41:36-38

48. Victora CG, Muñoz N, Day NE, Barcelos LB, Peccin DA, Braga NM. Hot beverages and oesophageal cáncer in southern Brazil: a case control study. In. J. Cancer, 1987; 39:710-716.

49. de Barros, S.G.S., Ghisolfi, E.S., Luz, L.P., Barlem, G.G., Vidal, R.M., Wolff, F.H., Magno, V.A., Breyer, H.P., Dietz, J., Gru¨ ber, A.C., Kruel, C.D.P., Prolla, J.C., 2000. High temperature ‘‘mate´” infusión drinking in a population at risk for squamous cell carcinoma of the esophagus in southern Brazil. Arq. Gastroenterol. 37 (1), 25–30.).

50. Lerda D (1992) The effect of lead on Allium cepa L. Mutat Res 281: 89-92.

51. Lerda D, Biagi Bistoni M, Pelliccioni P, Litterio N (2010) Allium cepa as a biomonitor of ochratoxin A toxicity and genotoxicity. Plant Biol (Stuttg) 12: 685-688.

52. Lerda D, Biaggi B, Peralta N, Ychari S, Vazquez M, et al. (2005) Fumonisins in food from Cordoba (Argentina), presence and genotoxicity. Food Chem Toxicol 43: 691-698.

53. Lerda D (2013) Roasting coffee beans (Coffea Arabica) artificially contaminated with ochratoxin A strongly reduces the analytical ochratoxin A content but not the genotoxic effects. Current Topics in Toxicology 9: 75-80.

54. Lerda D, Miotti E, Litterio N (2017) Detection and Genotoxicity of Ochratoxin A (OTA) in Raisins. European Scientific Journal 13:1-8.

**56**

**191**