

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: daniellderda@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.

OBJECTIVE: 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).

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 Aquifoliaceae^{1,2}. 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 antioxidante^{5,6}. 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 obesidad^{9,10,11}. 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 vesical^{15,16,17}. 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 encerado^{22,23}. 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 químicos^{25,26}, 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 químicos^{31,32}, y también por demostrar similitud satisfactoria con los resultados obtenidos con otros bioensayos como los realizados con animales y cultivos celulares^{33,36}. 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*.

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±1°C durante 5 a 7 días, luego se analizaron mohos, levaduras y caracterizaron los géneros fúngicos. De acuerdo a claves taxonómicas^{39,40,41} se 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 10³ UFC/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).

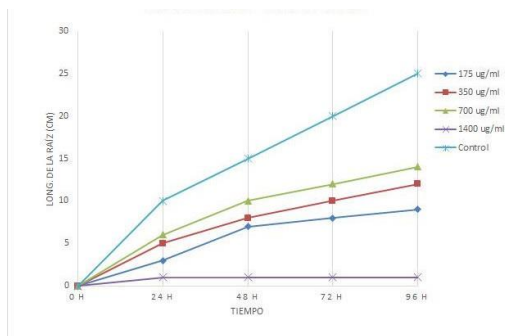


Figura 1. Efecto de la yerba mate sobre el crecimiento radicular

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)

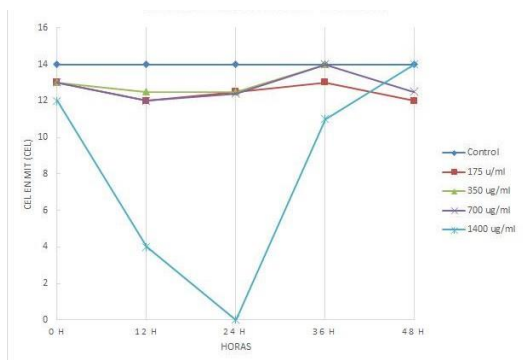


Figura 2. Efecto de la yerba mate sobre la actividad proliferativa en la región meristemática de la raíz

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.

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

Tratamiento	N° de células	Cél en división	Anormalidades				Frec de células aberrantes basales en		
			Rotura	Puentes	Unidos	Cél binuc	Total de células aberrantes	Total de células contadas	N° de células en div
Yerba mate									
175 µg/ml	4000	295	-	-	-	-	-	-	-
350 µg/ml	4000	300	-	-	-	-	-	-	-
700 µg/ml	4000	310	-	-	-	-	-	-	-
1400 µg/ml	4000	299	-	3	-	6	9*	0,22	3,01
Control Negativo	4000	320	-	-	-	-	-	-	-
Control Positivo a	4000	350	8	9	13	4	40	0,1	11,4

a Dimetilsulfóxido 0,2 %

*Z = 7,10 significativa 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*. Si 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, Wnuket *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 día^{45,46} 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 rápidamente⁴⁷⁻⁴⁹. 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.*²¹ con 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 alimentos⁵²⁻⁵⁴.

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.

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, Catling PM. 2001. Blossoming treasures of biodiversity: 3. Mate (*Ilex paraguariensis*) – better than Viagra, marijuana, and coffee? *Biodiversity* 2:26–7.
2. Grigioni G, Carduza F, Irueta M, Pensel N. 2004. Flavour characteristics of *Ilex paraguariensis* 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 of Uruguayan medicinal-plants. *J Ethnopharmacol* 39:217–20.
5. Filip R, Lotito SB, Ferraro G, Fraga CG. 2000. Antioxidant activity of *Ilex paraguariensis* and related species. *Nutr Res* 20:1437–46.
6. VanderJagt TJ, Ghattas R, VanderJagt DJ, Crossey M, Glew RH. 2002. Comparison of the total antioxidant content of 30 widely used medicinal plants of New Mexico. *LifeSci* 70:1035–40.
7. Schinella G, Fantinelli JC, Mosca SM. 2005. Cardioprotective effects of *Ilex paraguariensis* extract: evidence for a nitric oxide-dependent mechanism. *Clin Nutr* 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 South American herbal preparation in overweight patients. *J Hum Nutr Diet* 14:243–50.
10. Pittler MH, Ernst E. 2004. Dietary supplements for body-weight reduction: a systematic review. *Am J Clin Nutr* 79:529–36.
11. Opala T, Rzymyskip P, Pischel I, Wilczak M, Wozniak J. 2006. Efficacy of 12 weeks supplementation of a botanical extract-based weight loss formula on body weight, body composition and blood chemistry in healthy, overweight subjects – a randomized double-blind placebo-controlled clinical trial. *Eur J Med Res* 11:343–50.
12. Pomilio AB, Trajtemberg S, Vitale AA. 2002. High-performance capillary electrophoresis analysis of Mate infusions prepared from stems and leaves of *Ilex paraguariensis* using automated micellar electrokinetic capillary chromatography. *Phytochem Anal* 13:235–41.
13. Zaporozhets OA, Krushynska OA, Lipkovska NA, Barvinchenko VN. 2004. A new test method for the evaluation of total antioxidant activity of herbal products. *J Agric Food Chem* 52:21–5.
14. Ramirez-Mares MV, Chandra S, de Mejia EG. 2004. In vitro chemopreventive activity of *Camellia sinensis*, *Ilex paraguariensis* and *Ardisia compressa* tea extracts and selected polyphenols. *Mutat Res* 554:53–65.
15. Goldenberg D, Golz A, Joachims HZ. 2003. The beverage Mate: a risk factor for cancer of the head and neck. *Head Neck* 25:595–601.
16. Sewram V, De Stefani E, Brennan P, Boffetta P. 2003. Mate consumption and the risk of squamous cell esophageal cancer in Uruguay. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 12:508–13.
17. Bates MN, Hopenhayn C, Rey OA, Moore LE. 2007. Bladder cancer and Mate consumption in Argentina: a case-control study. *Cancer Lett* 246:268–73.
18. Goldenberg D. 2002. Mate: a risk factor for oral and oropharyngeal cancer. *Oral Oncol* 38:646–9.

19. Leitao AC, Braga RS. 1994. Mutagenic and genotoxic effects of Mate (*Ilex paraguariensis*) in prokaryotic organisms. *Braz J Med Biol Res* 27:1517-25.
20. Fonseca CA, Otto SS, Paumgarten FJ, Leitao AC. 2000. Nontoxic, mutagenic, and clastogenic activities of Mate-Chimarrao (*Ilex paraguariensis*). *J Environ Pathol Toxicol Oncol* 19:333-46.
21. Rafael Jose Vargas Alves, Geraldo Pereira Jotz, Viviane Souza do Amaral, Tiago Maeso Hermes Montes, Honorio Sampaio Menezes, Heloisa 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/diagnostico/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 germinação 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, Malagutti MIA, Dias AL, Fonseca IC, et al. (2006) Genotoxicity 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 tartrazine 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 assessment on river water using different biological systems. *Chemosphere* 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) Genotoxicity 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, Staffelt 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*

40. Larone DH *Medically Important Fungi: A guide to identification*. 3° ed. New York: Elsevier, 1995
41. Pitt, J. L. & Hocking, A. D. 2009. *Fungi and Food spoilage*. 3° 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* N° 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 cancer 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, Fonham E, Rivero S, Black Tobacco wine and mate in oropharyngeal cancer. 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 thermal 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 esophageal cancer 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., Gruber, A.C., Krueel, C.D.P., Prolla, J.C., 2000. High temperature “mate” infusion 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) Fumonisin 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.

