



Aspergillus species identification in yerba mate from Itapúa Department, Paraguay

Identificación de especies de *Aspergillus* en yerba mate del Departamento de Itapúa, Paraguay

Arriola, M.¹; Bohn, D.¹; Jerke, G.²; Quintana, L.¹

¹Departamento de Posgrado, Facultad de Ciencias Agropecuarias y Forestales, Universidad Nacional de Itapúa. ²Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Misiones.

Recibido: 25/07/2020

Aceptado: 04/11/2020

ABSTRACT

Arriola, M.; Bohn, D.; Jerke, G.; Quintana, L. 2020. *Aspergillus* species identification in yerba mate from Itapúa department, Paraguay. *Horticultura Argentina* 39 (100): 96-112.

Internal commercialization and exportation of yerba mate represent an important economic incentive for yerba producers in the Itapúa department, in Paraguay. Favorable conditions for fungal development during the processing and storage of yerba mate can alter the bromatological and commercial quality of the product, with the consequent production of mycotoxins that are harmful to human health. The objectives were to determine the incidence of the genus *Aspergillus* and the frequency of species belonging to the *Nigri* and *Flavi* sections, with potential mycotoxigenic capacity, in Paraguayan yerba mate. Eleven commercial samples obtained from store shelves from Itapúa's department were processed. The fungal content was quantified in Fungi and Yeast culture media with chloramphenicol,

incubated 7 days at 25 ± 2 ° C. The isolates were identified at section and species level by their morphological phenotypic characteristics in three culture media at three different temperatures. The fungal strains of the *Aspergillus* genus were detected, obtaining 43 isolates, of which 95% belong to the *Nigri* section and 2.7% to the *Flavi* section. All the analyzed samples showed contamination by the *Aspergillus* genera, with 100% incidence of species from the *Nigri* section and 36% from other sections. A predominance of biseriate subspecies (66%) *A. niger* var *awamori*, *A. niger* var *niger*, *A. fetidus*, over uniseriate (34%) *A. japonicus* var. *japonicus* and *A. japonicus* var *aculeatus* was observed. These results highlight the importance of conducting independent studies on local products, given that each geographic region has its own mycological profile.

Additional keywords: *Ilex paraguariensis*, aflatoxins, ocratoxins, *Nigri* section, *Flavi* section.

RESUMEN

Arriola, M.; Bohn, D.; Jerke, G.; Quintana, L. 2020. Identificación de especies de *Aspergillus* en yerba mate del departamento de Itapúa, Paraguay. *Horticultura Argentina* 39 (100): 96-112.

La comercialización interna y la exportación de la yerba mate representan un incentivo económico importante para productores yerbateros del Departamento de Itapúa, Paraguay. Condiciones favorables para el desarrollo fúngico durante el procesamiento y almacenado de la yerba mate pueden alterar la calidad bromatológica y comercial del producto, con la consecuente producción de micotoxinas perjudiciales para la salud humana. Los objetivos fueron determinar la incidencia del género *Aspergillus* y la frecuencia de especies pertenecientes a las secciones *Nigri* y *Flavi*, con potencial capacidad micotoxicogénica, en yerba mate de origen paraguayo. Se procesaron 11 muestras comerciales obtenidas de comercios del departamento de Itapúa. El contenido fúngico fue cuantificado en medio de cultivo Hongos y Levaduras con

cloranfenicol, incubadas 7 días a 25 ± 2 °C. Los aislados fueron identificados a nivel secciones y especies por sus características fenotípicas morfológicas en tres medios de cultivo a tres temperaturas diferentes. Se detectan las cepas fúngicas del género *Aspergillus*, obteniéndose 43 aislados, de los cuales el 95% pertenece a la sección *Nigri* y 2,7% a la sección *Flavi*. Todas las muestras analizadas mostraron contaminación por el género *Aspergillus*, con 100% de incidencia de especies de la sección *Nigri* y 36% de otras secciones. Se observó predominio de subespecies biseriadas (66%) *A. niger* var *awamori*, *A. niger* var *niger*, *A. foetidus*, por sobre las uniseriadas (34%) *A. japonicus* var. *japonicus* y *A. japonicus* var *aculeatus*. Estos resultados resaltan la importancia de realizar estudios independientes en productos locales, dado que cada región posee un perfil micológico propio.

Palabras claves adicionales: *Ilex paraguariensis*, aflatoxinas, ocratoxinas, sección *Nigri*, sección *Flavi*.

1. Introducción

La yerba mate es un producto vegetal natural que forma parte del acervo cultural en Argentina, Uruguay, Paraguay y Brasil. El origen de esta planta se sitúa en una región de la Cuenca del Plata, que va desde el Este de Paraguay, pasando por el Norte de Misiones/Corrientes (Argentina), hasta los estados de Paraná y Santa Catarina en Brasil (Burtnik, 2006). En estas regiones se encuentran las condiciones propicias para su cultivo. Preferentemente vegeta a altitudes de 500 a 1500m, prefiere clima subtropical húmedo, sin estación seca, con temperaturas medias de 22 °C y precipitaciones anuales entre 1500 a 2000 mm (Prat Kricun, 2015; Castrillo 2016). El cultivo y desarrollo de la planta tiene lugar, a nivel global, únicamente en los tres países sudamericanos mencionados. La planta de yerba mate silvestre, cuya ubicación sistemática se presenta en la tabla 1, puede alcanzar una altura entre 10 a 15 m, pero es mantenida con alturas de 3 a 4 m por la poda anual.

Table 1. Taxonomic rank of yerba mate.

Tabla 1. Ubicación sistemática de la yerba mate.

| Reino | <i>Plantae</i> | Plantas |
|------------------|----------------------------|----------------------|
| Filo | <i>Traqueofita</i> | |
| Subreino | <i>Tracheobionta</i> | Plantas vasculares |
| Superdivision | <i>Spermatophyta</i> | Plantas con semillas |
| División | <i>Magnoliophyta</i> | Plantas con flores |
| Clase | <i>Magnoliopsida</i> | Dicotiledoneas |
| Orden | <i>Aquifoliales</i> | |
| Familia | <i>Aquifoliaceae</i> | |
| Género y especie | <i>Ilex paraguariensis</i> | |
| Nombre común | Yerba mate | |

Fuente: Burtnik, 2006, Carballido, 2020.

Source: Burtnik, 2006, Carballido, 2020.

Antes de la llegada de los europeos a América, la yerba mate era consumida por los indígenas, que habitaban las regiones de Paraguay, nordeste de Argentina y norte de Uruguay, como una infusión de hojas secas y trituradas, utilizando una bombilla rudimentaria confeccionada de tacuara y fibras vegetales. Con el tiempo se amplió la gama de opciones de consumo: infusión acuosa, mate, tereré o té, con propiedades estimulantes, nutritivas y hasta curativas, por su aporte de cafeína, vitaminas, aminoácidos, minerales, antioxidantes y taninos, que le confieren características comerciales muy atractivas (Núñez Zacarías, 2013). En la actualidad su consumo está ampliamente difundido y es utilizada en varios países sudamericanos, Europa y Estados Unidos. A nivel global, la yerba mate representa una gran importancia económica en tres países de la región: Argentina, Brasil y Paraguay (Jerke, 2010; Pérez Paiva *et al.*, 2013).

En países consumidores del mate, es habitual su consumo diario en diversas formas. El clásico “mate caliente” se sirve en un recipiente, que puede ser de vidrio, calabaza, madera u otros materiales, conteniendo entre 30 y 50 g de yerba mate molida, y se sorbe la infusión, habitualmente caliente, con una bombilla o tubo metálico. Se puede añadir hierbas medicinales o emplear otras formas comerciales que ya poseen incorporadas un coctel de sabores y hierbas con diversas finalidades: nutricionales, medicinales o estéticas (yerba mate compuesta).

La yerba mate es una planta rica en vitaminas, produce una sensación de bienestar, vigor y lucidez intelectual, basado en la presencia del alcaloide mateína (sinónimo de cafeína). Es diurética, digestiva y optimiza la absorción nutricional del organismo regulando en general todas sus funciones de asimilación. También posee propiedades laxantes debido a su contenido en colina (Jerke *et al.*, 2010).

Como es sabido, los vegetales se caracterizan por ser fuentes ricas en fibra, nutrientes minerales y vitaminas, considerados actualmente como compuestos bioactivos que apoyan significativamente la salud y nutrición humana al prevenir enfermedades (Donno & Turrini, 2020, Krishnananda *et al.*, 2017; Bernal Castro *et al.*, 2017). La yerba mate tiene tres grupos de compuestos bioactivos: a) xantinas, b) polifenoles y c) saponinas. Las xantinas presentes en la yerba mate son la cafeína (0,8 a 2%) y la teobromina (0,3 a 0,9%), a las que se les atribuyen las siguientes propiedades: energizantes, anticarcinogénicos, evita la obesidad y diurético. Los polifenoles presentes en la yerba mate son los derivados cafeoilquínicos (entre el 8 a 10%, principalmente el ácido clorogénico) y en menor proporción los flavonoides (principalmente la rutina). Se le atribuyen las siguientes propiedades: antioxidante, antibacteriano, antidiabético, diurético, colerético y anticarcinogénico. Las saponinas están en proporciones menores (0,3 a

0,4 %) y se les atribuyen de ser antiinflamatorias, hipocolesterolémica y de tener efecto protector contra el cáncer (Schmalko, 2013; Brumoski *et al.*, 2015; González Coria & Horiensky, 2018)

El mate se utiliza por sus propiedades estimulantes, diuréticas, hipoglucemiantes, adelgazantes y su efecto contra la fatiga. Nutricionalmente se destaca su contenido en vitaminas, tales como colina, riboflavina, piridoxina, ácido pantoténico y Vitamina C. Su contenido en alcaloides del tipo xantinas, la caféina, es el principio activo responsable del efecto estimulante y diurético de la infusión, mientras que el alcaloide trigonelina, ha demostrado efectos hipoglucemiantes e hipocolesterolémicos (Carballido, 2020; Servian & Jerke 2018; Brumovski *et al.*, 2015; Messina *et al.*, 2015; Schmalko, 2015)

En el Paraguay la yerba mate forma parte del consumo básico alimenticio de las familias, que la ingieren como té caliente llamado “cocido” (yerba molida y azúcar quemada) o en forma de saquitos que se comercializa en los comercios. Se lo prepara también con agua fría como una refrescante bebida llamada “tereré”, absorbido con una bombilla. Esta innovación en el consumo de la yerba mate molida infundada con agua fría tuvo su inicio en el Paraguay (Pérez Paiva *et al.*, 2012).

La calidad y el cuidado del procesamiento de la yerba mate son decisivos para que el producto mantenga inalterables sus cualidades organolépticas y microbiológicas. El proceso de elaboración de la yerba mate, comienza con la cosecha anual de hojas y ramas jóvenes. Comprende seis etapas fundamentales: sapecado, secado, canchado, estacionamiento, molienda y envasado. En el Sapecado el material cosechado es expuesto a la acción directa de la llama por 20 a 30 segundos, a temperaturas que oscilan entre 400 y 700 °C. Este golpe de calor súbito, provoca la detención de la actividad enzimática preservando así su característico color verde y, al mismo tiempo, elimina gran parte de la humedad perdiendo el 30% de masa, facilitando su posterior secado. En el Secado se realiza la eliminación de la humedad a través de calor seco (entre 80-120 °C) hasta obtener un contenido de humedad del 3% que garantiza la buena conservación por un lado y el acondicionamiento de la yerba mate para su estacionamiento. El Canchado es la trituración gruesa de la yerba mate seca en hoja. El Estacionamiento es una de las etapas más importantes en la cual la yerba mate adquiere su sabor, aroma y color característico. Dura entre 6 a 24 meses lo cual uniforma y evita variaciones en su calidad final. El estacionamiento se realiza a granel en depósitos especialmente acondicionados. En la Molienda diferentes lotes de yerba estacionada son mezclados en distintas proporciones con el objeto de determinar y mantener constante las características de los productos terminados (Jerke *et al.*, 2010; Castrillo *et al.*, 2013). Las tres primeras etapas se llevan a cabo en establecimientos denominados “secaderos” y las últimas tres en establecimientos industriales denominados “molinos” (Cañete *et al.*, 2017).

Durante su cultivo y almacenamiento, los productos agrícolas se ven expuestos al ataque de microorganismos, especialmente hongos. Si las condiciones de temperatura y humedad son favorables, predisponen al desarrollo de estos hongos, que no solo pueden alterar la calidad bromatológica y comercial del producto, sino además pueden ser potenciales productores de micotoxinas, consideradas perjudiciales para la salud humana y animal (Castrillo *et al.*, 2016). La taxonomía es una disciplina dinámica y esto conlleva la realización de revisiones constantes que devienen en cambios en la nomenclatura que no siempre son de fácil comprensión. Recientemente, se han incorporado importantes ajustes en la taxonomía de *Aspergillus* spp y sus teleomorfos (Houbraken *et al.*, 2020). Este género está encuadrado dentro del orden Eurotiales, y pertenece a la familia Trichocomaceae División *Ascomycota* (Piontelli, 2014; González Salgado, 2010; Cardoza Ipanaque, 2019). Desde 1965, el texto por excelencia sobre el género ha sido "The genus *Aspergillus*" de Raper y Fennell (1965).

El género *Aspergillus*, incluye 4 subgéneros (*Aspergillus*, *Fumigati*, *Circumdati*, *Nidulantes*), que a su vez se subdividen en 19 secciones (Tabla 2), que integran a varios complejos de

especies (Piontelli, 2014, Samson *et al.*, 2014; Houbraken *et al.*, 2020). El género está integrado actualmente por 338 especies según los autores (Samson *et al.*, 2014), de las cuales, las que se han reportado como productoras de micotoxinas (Tabla 3) están incluidas en las secciones, *Flavi*, *Circumdati*, *Nigri* y *Fumigati*, las cuales a su vez tienen gran relevancia en biotecnología. Las esporas aeronavegantes del género *Aspergillus* y otros géneros anemófilos, pueden asociarse al desarrollo de alergias en personas susceptibles y expuestas a su inhalación constante, constituyendo un riesgo adicional su presencia en niveles elevados en productos y el aire circundante (Elad & Segal, 2018).

Table 2. Representative subgenera, sections and species of the genus *Aspergillus*

Tabla 2. Subgéneros, secciones y especies representativos del género *Aspergillus*

| Subgénero | Secciones | Sinónimo | Especie tipo | Teleomorfo |
|--------------------|----------------------|----------------------------|---------------------------------------|--|
| <i>Aspergillus</i> | <i>Aspergillus</i> | Grupo <i>A. glaucus</i> | <i>A. glaucus</i> | <i>Eurotium</i> |
| | <i>Restricti</i> | Grupo <i>A. restrictus</i> | <i>A. restrictus</i> | <i>Eurotium</i> |
| <i>Fumigati</i> | <i>Fumigati</i> | Grupo <i>A. fumigatus</i> | <i>A. fumigatus</i> | <i>Neosartorya</i> |
| | <i>Clavati</i> | Grupo <i>A. clavatus</i> | <i>A. clavatus</i> | <i>Neocarpenteles</i> , <i>Dichotomomyces</i> |
| | <i>Cervini</i> | Grupo <i>A. cervini</i> | <i>A. cervini</i> | - |
| <i>Circumdati</i> | <i>Circumdati</i> | Grupo <i>A. ochraceus</i> | <i>A. ochraceus</i> | <i>Neopetromyces</i> |
| | <i>Nigri</i> | Grupo <i>A. niger</i> | <i>A. niger</i> | <i>Petromyces</i> |
| | <i>Flavi</i> | Grupo <i>A. flavus</i> | <i>A. flavus</i> <i>A. oryzae</i> | <i>Petromyces</i> |
| | <i>Candidi</i> | Grupo <i>A. candidus</i> | <i>A. candidus</i> | - |
| | <i>Terrei</i> | Grupo <i>A. terreus</i> | <i>A. terreus</i> <i>A. niveus</i> | <i>Fennelia</i> |
| | <i>Flavipedes</i> | Grupo <i>A. flavipes</i> | <i>A. flavipes</i> | <i>Fennelia</i> |
| <i>Nidulantes</i> | <i>Nidulantes</i> | Grupo <i>A. nidulans</i> | <i>A. nidulellus</i> | <i>Emericella</i> |
| | <i>Usti</i> | Grupo <i>A. ustus</i> | <i>A. ustus</i> | <i>Emericella</i> |
| | <i>Bispori</i> | Grupo <i>A. bisporus</i> | <i>A. bisporus</i> | - |
| | <i>Sparsi</i> | Grupo <i>A. sparsus</i> | <i>A. sparsus</i> | - |
| | <i>Aeni</i> | - | - | <i>Emericella</i> |
| | <i>Ochraceorosei</i> | - | <i>A. funiculosus</i> | |
| | <i>Cremei</i> | Grupo <i>A. cremeus</i> | <i>A. cremeus</i> | <i>Chaecosartorya</i> |
| | <i>Versicolores</i> | | <i>A. versicolor</i> | |

Fuente: Elaboración propia, en base a: Houbraken *et al.*, 2020 Piontelli, 2014.

Source: Own elaboration, based on: Houbraken *et al.*, 2020 Pionetlli 2014.

La taxonomía tradicional del género, se basa principalmente en sus caracteres fenotípicos y fisiológicos, los cuales han aportado satisfactorias delimitaciones de las especies; sin embargo, existen variaciones morfológicas en varias secciones que han llevado a controversias en sus esquemas taxonómicos. Actualmente en el siglo 21, *Aspergillus* y sus teleomorfos asociados han sido investigados con métodos polifásicos (morfológicos, fisiológicos, moleculares y ecológicos) para examinar la variabilidad entre sus especies (Houbraken *et al.*, 2020). El presente estudio, se limitó a la caracterización fenotípica macro micro morfológica de los aislados.

Table 3. Main species of *Aspergillus* with mycotoxic capacity, biosynthesized mycotoxin, related foods and toxic effects.

Tabla 3. Principales especies de *Aspergillus* con capacidad micotoxigénica, micotoxina biosintetizada, alimentos asociados y efectos tóxicos.

| Sección | Especie | Micotoxina | Alimentos asociados | Efectos tóxicos |
|-----------------------|---|--|---|---|
| Flavi | <i>A. flavus</i> (*) <i>A. parasiticus</i> <i>A. nomius</i> | Aflatoxinas B ₁ , B ₂ Aflatoxinas G ₁ , G ₂ Aflatoxina M | Cereales, maní, arroz, maíz, nueces, coco, trigo, sorgo, leche y quesos. | Altamente cancerígena. Carcinoma Hepático y Renal. Inmunosupresora. Teratogénica. |
| | <i>A. oryzae</i> | Ac ciclopiazonico Ac kojico | Productos fermentados orientales. | Afecta hígado, riñón y tejido gastrointestinal. |
| Circumdati | <i>A. terreus</i> | Tox. tremorgenica Citrinina Patulina | Maíz y otros alimentos | Baja toxicidad en humanos. Provoca temblores en ratones. |
| | <i>A. niveus</i> | Citrinina | Cereales (arroz, trigo, cebada, avena) y frutas | Efecto Nefrotóxico, Inmunosupresora. |
| | <i>A. ochraceus</i> <i>A. westerdijkiae</i> | Ocratoxina A | pescados y jamones secos, frutas secas, especias, granos (soja, cebada, arroz, trigo) y harinas | Efecto Nefrotóxico, necrosis hepática, cancerígena y teratogénica. Efecto Inmunosupresor. |
| <i>A. carbonarius</i> | Ocratoxina A | Uvas, vino, café, té negro, | | |
| Nigri | <i>A. niger</i> | Ocratoxina A | Alimentos secos: pasas de uva, pescado desecado, cacao y especias, yerba mate y te | Baja toxicidad en humanos |
| | <i>A. aculeatus</i> | Ácido Secalónico | - | |
| Fumigati | <i>A. clavatus</i> | Patulina | Jugos de frutas | Lesiones estomacales |
| | <i>A. fumigatus</i> | Fumitremorgenos, Gliotoxina | Alimentos para aves | Baja toxicidad en humanos Enfermedad invasiva en aves |

(*). Esta especie puede producir además esterigmatocistina, Ac. ciclopiazónico, kojico, aspergílico y Acido β-nitropropanoico; aspertoxina, aflatremos y glioxina entre otros metabolitos.

Fuente: Elaboración propia en base a Pitt&Hocking, 2009, Piontelli, 2014; Houbraken *et al.*, 2020.

Source: Own elaboration based on Pitt & Hocking 2009, Piontelli 2014; Houbraken *et al.*, 2020.

En estudios micológicos llevados a cabo en la provincia de Misiones (Argentina) se ha constatado la presencia de géneros de hongos micotoxigénicos como *Aspergillus*, en yerba mate elaborada y en diferentes formas comerciales del producto, como yerba mate canchada y compuesta (Jerke *et al.*, 2010; Castrillo *et al.*, 2016). Un considerable porcentaje de los aislados identificados pertenecen a la sección *Nigri*, considerados potenciales productores de ocratoxina. Esta toxina hidrosoluble puede ser biosintetizada por otras especies como *A. ochraceus* perteneciente a la sección *Circumdati*. La especie *A. flavus* se detectó con menor incidencia indicando una menor probabilidad de contaminación con aflatoxinas, contaminantes naturales

de elevada toxicidad y catalogadas como carcinógenos tipo 1 por la *International Association Research of Cancer* (Jerke *et al.*, 2010; Castrillo *et al.*, 2016; IARC, 2012, Londoño & Martínez, 2017). En otros sustratos alimenticios conteniendo elevada pigmentación y con similar actividad acuosa, tales como té negro (Jerke Schuster, 2015), café verde (Bessaire *et al.*, 2019; Khaneghah *et al.*, 2019) y cacao (Fonseca Maciel *et al.*, 2018; Novais Pires *et al.*, 2019) se han comunicado resultados similares, con predominio de *Aspergillus* como género fúngico y especies de la sección *Nigri*. No obstante, en té negro (en hebras y en saquitos) se presenció mayor incidencia de especies de la sección *Flavi* comparativamente a la obtenida en yerba mate en sus diversas formas de comercialización (Jerke *et al.*, 2009; Jerke *et al.*, 2010; Jerke Schuster, 2015). En sustratos coloreados como café verde, cacao y té negro se han detectado contaminación con micotoxinas, tales como ocratoxinas, fumonisinas y en menor grado, aflatoxinas, (Bessaire *et al.*, 2019, Jerke Schuster, 2015, Novais Pires *et al.*, 2019; Khaneghah *et al.*, 2019).

La ocratoxina A (OTA), producida principalmente por las especies de *Aspergillus*, constituye uno de los contaminantes más importantes de alimentación humana y animal. Produce disturbios nefrológicos y hepáticos, es carcinogénica y teratogénica (Wang *et al.*, 2016; Omotayo *et al.*, 2019). Las aflatoxinas son conocidas por producir cirrosis hepática, son oncogénicas, teratogénicas y se acumulan en los tejidos (Londoño & Martínez, 2017; Sakin *et al.*, 2018; Pal *et al.*, 2015).

El consumo de yerba mate contaminada con hongos productores de toxinas resulta sumamente peligroso para la población, sobre todo cuando los niveles de aflatoxinas y ocratoxinas son altos con el consecuente daño a la salud humana, factor preponderante para un país como Paraguay donde la yerba se consume de manera masiva, cotidiana y en todos los grupos etarios. Hasta el presente, no se cuentan con normativas que regulen la cuantificación de mohos micotoxigénicos ni los niveles de micotoxinas en yerba mate. Cuantificar las diferentes especies de *Aspergillus* provenientes de la yerba mate elaborada y determinar las cepas capaces de producir micotoxinas permitiría dimensionar el riesgo que existe para los consumidores de este alimento en Paraguay y otras regiones donde se comercializan estos productos. No existen trabajos previos publicados en este país sobre el tema, ya que por lo general los análisis microbiológicos se limitan a la identificación de géneros de hongos filamentosos.

Los objetivos del trabajo fueron determinar la incidencia del género *Aspergillus* y la frecuencia de especies pertenecientes a las secciones *Nigri* y *Flavi*, con potencial capacidad micotoxicogénica, en yerba mate de origen paraguayo.

2. Metodología

2.1. Muestras de yerba mate:

Se procesaron 11 muestras de yerba mate correspondientes a diferentes marcas comerciales provenientes de establecimientos yerbateros paraguayos del Departamento de Itapúa, Paraguay. Itapúa se caracteriza por ser el mayor productor de yerba mate llegando a exportar a otros países como Argentina, su producción se distribuye por todos los distritos del departamento de Itapúa brindando mano de obra a muchas personas, para la recolección de las muestras se optó por obtener las muestras de los distritos más representativos. El muestreo se realizó al azar en el periodo de marzo a agosto de 2015, a partir de góndolas de comercios céntricos y periféricos de los distritos de Alto Verá, Bella Vista, Encarnación, Carmen del Paraná y Coronel Bogado (Figura 1). Las muestras tomadas correspondían a presentaciones de 1 kg cada una. El procesamiento de las muestras se realizó en el Centro de Investigación en Microbiología Ambiental y de Alimentos (CIMAA) del Módulo de Bioquímica y Farmacia, Universidad Nacional de Misiones (UNaM), Posadas, Misiones, Argentina.

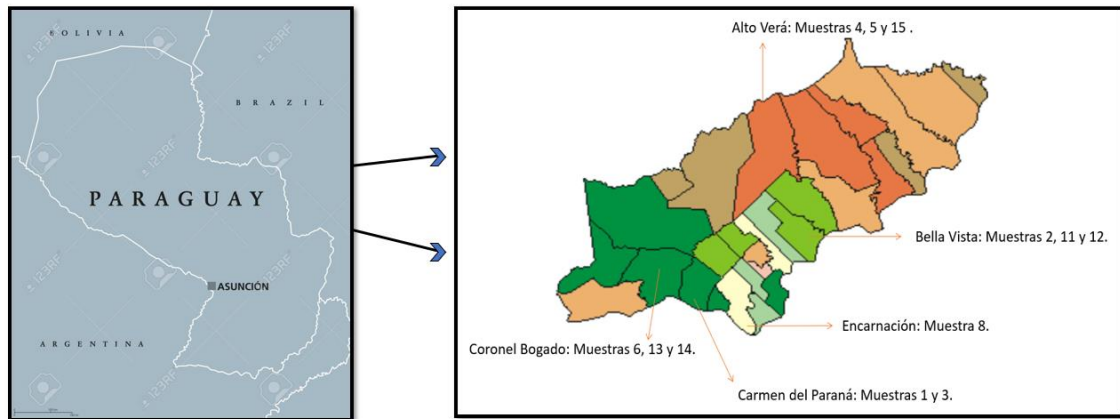


Figure 1. Sample of yerba mate collected by District in the Itapúa Department. Paraguay, 2015.

Figura 1. Muestras de yerba mate colectadas por Distrito en el Departamento de Itapúa. Paraguay, 2015.

2.2. Detección y cuantificación de *Aspergillus*:

Se realizó de acuerdo con la metodología propuesta en las Normas IRAM 20517: 2007, Argentina (IRAM, 2007). A partir de 10 g de cada muestra, convenientemente homogeneizados, se realizaron diluciones decimales y se sembraron por diseminación en superficie con espátula de Drigalsky, en medio de cultivo sólido de Hongos y Levaduras con Cloranfenicol (HYLC) de Britania®. Se realizaron dos réplicas de cada muestra. Luego de su incubación a 25 ± 2 °C durante 5 a 7 días, se procede a la cuantificación de las colonias cuya macro micromorfología pertenecen al género *Aspergillus* (Figura 2). Cada colonia aislada fue repicada a tubos conteniendo medio de cultivo HYLC para su posterior identificación.

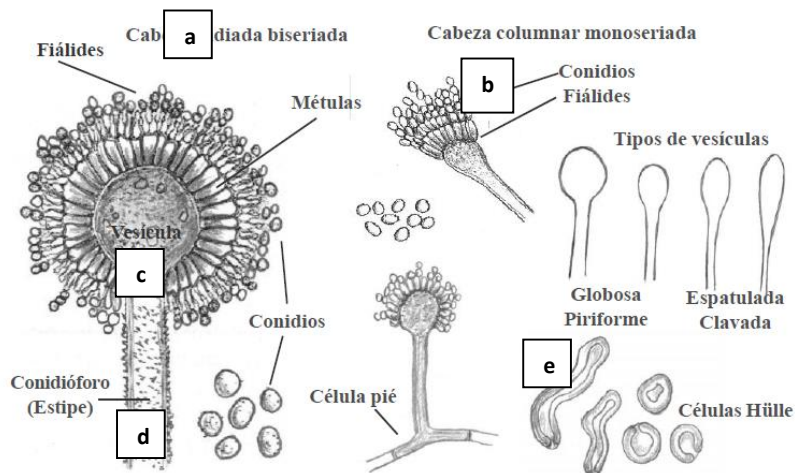


Figure 2. Morphologic structures in the genus *Aspergillus*: a) Radiated and columnar heads; b) Types of vesicles: globose, pear-shaped, spatula-shaped and clavate; c) conidia; d) foot cell; e) Hülle cells. Taken and adapted from Piontelli, 2014.

Figura 2. Estructuras morfológicas en el género *Aspergillus*. a) Cabezas radiadas y columnares; b) Tipos de vesículas: globosa, piriforme, espatulada y clavada; c) conidias; d) célula pie; e) células Hülle. Tomado y adaptado de Piontelli, 2014.

2.3. Identificación morfológica fenotípica de las especies de *Aspergillus*:

Se realizó en base a metodología propuesta por taxónomos mundialmente reconocidos (Klich & Pitt 2000; Pitt & Hocking, 2009; Samson *et al.*, 2014). La clave "*Identification of common*

Aspergillus species” de Klich (2002), emplea un esquema de siembra con la utilización tres medios de cultivo incubados a tres diferentes temperaturas: agar Czapeck extracto de levadura (CYA) a 25 °C, 37 °C y 5 °C, agar extracto de malta (MEA) a 25 °C y agar Czapeck extracto de levadura con 20% de sacarosa (CYA 20S) a 25 °C (Figura 3).

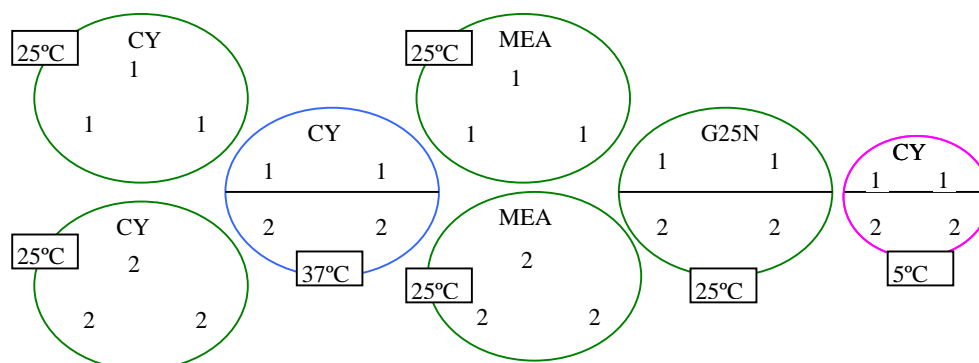


Figure 3. Culture media battery, incubation temperatures and sowing scheme for the identification of *Aspergillus* species. Adapted from Pitt & Hocking, 2009.

Figura 3. Batería de medios de cultivo, temperaturas de incubación y esquema de siembra para la identificación de especies de *Aspergillus*. Fuente: Adaptado de Pitt & Hocking, 2009.

En la Figura 4 se observa el esquema empleado en el reconocimiento morfológico fenotípico de especies de *Aspergillus*, el cual consiste en las etapas allí descritas y detalladas más abajo.

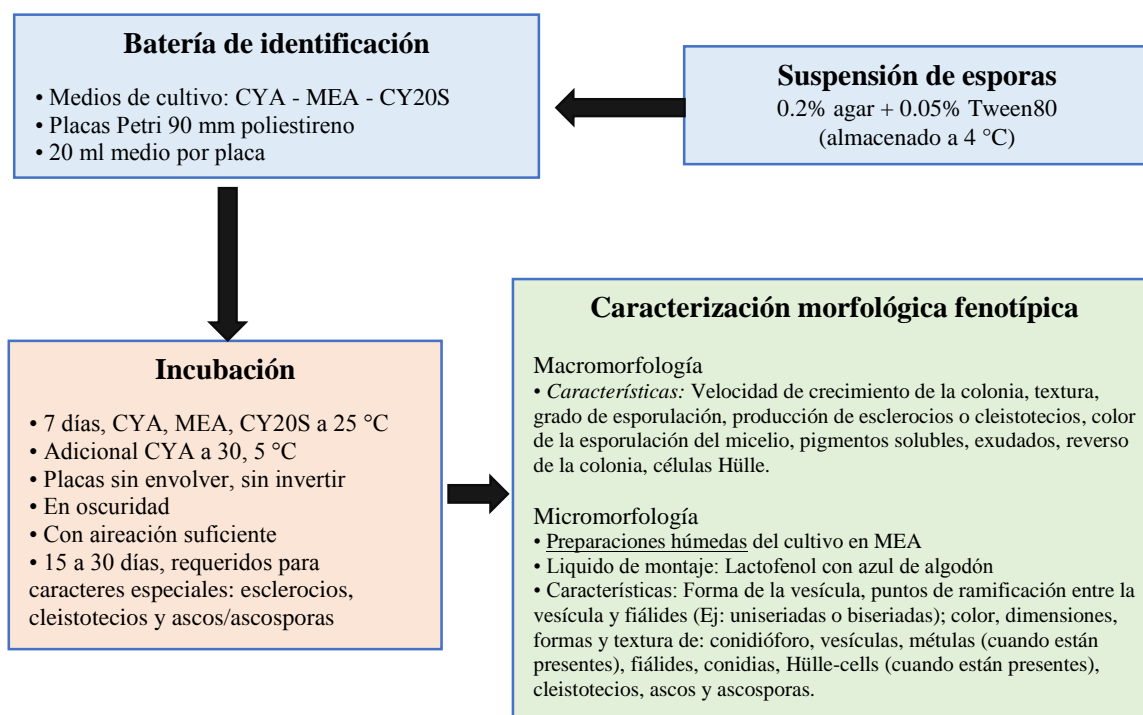


Figure 4. Identification scheme of *Aspergillus* species, from isolated strains. Source: adapted from Samson et al, 2014; Piontelli, 2014.

Figura 4. Esquema de identificación de especies de *Aspergillus* a partir de cepas aisladas. Fuente: Adaptado de Samson et al, 2014; Piontelli, 2014.

2.4. Reactivación de los aislados:

Las cepas aisladas, son activadas mediante siembra en placas conteniendo medio HYLC e incubadas a 25 °C, durante 7 días.

2.5. Batería de Identificación:

Los medios de cultivo se preparan según indicaciones del fabricante y son distribuidos, a razón de 20 ml por placa de Petri de 90 mm. Cada batería consiste en 4 placas de CYA, 2 de MEA y 1 de CY20S (Figura 3).

2.6. Inoculación de Batería de Identificación:

Se prepararon suspensiones de esporas en viales conteniendo una solución de 0,2% agar y 0,05% *Tween* 80 (Figura 4). Se inocula la batería de medios de cultivo para identificación (Figura 3), mediante punción con la placa invertida en tres puntos equidistantes empleando un asa aguja.

2.7. Incubación: Se incuban todas las placas durante 7 días, a las temperaturas indicadas. Las placas se disponen con la tapa hacia arriba, en oscuridad y con aireación suficiente.

2.8. Caracterización morfológica fenotípica:

En cada uno de los medios se describió la macro morfología de las colonias mediante observación a ojo desnudo, mediciones con reglas y volcando las anotaciones a planillas confeccionadas para tal fin. La micro morfología se establece a partir del desarrollo fúngico en MEA. El examen microscópico se realizó con microscopio óptico, empleando el método de la cinta adhesiva, apoyando el lado con pegamento sobre la colonia en estudio y extendiendo el micelio fúngico sobre una gota de lactofenol azul de algodón dispuesta sobre un portaobjetos.

2.9. Porcentaje de incidencia y densidad relativa de especies de *Aspergillus*:

Las especies de *Aspergillus* identificados se agruparon en función de su pertenencia a la sección *Nigri* o a otras secciones, estableciendo el porcentaje de incidencia de especies de *Aspergillus* de la sección *Nigri* (PIA.sn), que expresa el porcentaje de aparición de especies de *Aspergillus* sección *Nigri* (A.sn) en las muestras, aplicando la siguiente ecuación (Jerke Schuster, 2015)

$$PIA.sn = \frac{\text{Cantidad de muestras en que aparecen especies de A.sn}}{\text{Total de muestras analizadas}} \times 100$$

Las especies de *Aspergillus* pertenecientes a otras secciones, se agruparon estableciéndose el porcentaje de incidencia de especies de *Aspergillus* pertenecientes a otras secciones (PIA.os), que indica el porcentaje de aparición de especies de *Aspergillus* de otras secciones (A.os) en las muestras, aplicando la siguiente ecuación (Jerke Schuster, 2015):

$$PIA.os = \frac{\text{Cantidad de muestras en que aparecen especies de A.os}}{\text{Total de muestras analizadas}} \times 100$$

También se determinó la densidad relativa (DR) de las colonias (Jerke Schuster, 2015) evaluando la densidad relativa de especies de *Aspergillus* de la sección *Nigri* (DREA.sn), de la sección *Flavi* (DREA.sf) y de otras secciones (DREA.os) sobre el total de aislados de todas las especies de *Aspergillus* detectadas, empleando las siguientes formulas:

$$DREA.sn = \frac{UFC \text{ de especies de } A.sn}{UFC \text{ total de especies de } Aspergillus} \times 100$$

$$DREA.sf = \frac{UFC \text{ de especies de } A.os}{UFC \text{ total de especies de } Aspergillus} \times 100$$

$$DREA.os = \frac{UFC \text{ de especies de } A.os}{UFC \text{ total de especies de } Aspergillus} \times 100$$

3. Resultados y Discusión

Las cepas fúngicas de *Aspergillus* aisladas fueron clasificadas de acuerdo a su pertenencia a la sección *Nigri* (colonias con conidiación negra-marrón) o a otras secciones (conidiación de colores verde, azuladas, amarillas, por lo general). Los resultados del recuento fúngico se presentan en la Tabla 4.

Table 4. *Aspergillus* counting on yerba mate sample^z. Argentina, 2015

Tabla 4. Recuento de *Aspergillus* en muestras de yerba mate^z. Argentina, 2015.

| Numero Muestra | Recuento de <i>Aspergillus</i> sección <i>Nigri</i> (UFC.g) | Recuento de <i>Aspergillus</i> otras secciones (UFC.g) |
|-------------------|---|--|
| Muestra 1 | 631 | 45 |
| Muestra 2 | 450 | ausencia |
| Muestra 3 | 2.252 | ausencia |
| Muestra 4 | 1.532 | 180 |
| Muestra 5 | 1.261 | 225 |
| Muestra 6 | 45 | ausencia |
| Muestra 11 | 90 | ausencia |
| Muestra 12 | 90 | ausencia |
| Muestra 13 | 1.712 | ausencia |
| Muestra 14 | 901 | 45 |
| Muestra 15 | 901 | ausencia |
| Promedio | 897 | 124 |
| Mediana | 901 | 113 |
| Desv. estandar | 730 | 93 |
| Coef de variación | 1 | 1 |
| Valor máximo | 2.252 | 225 |
| Valor mínimo | 45 | 45 |

(z) se calculó sobre el total de muestras analizadas
(z) calculated on total number of analyzed samples

En análisis de yerba mate comercializada en Posadas, Misiones (Argentina), Jerke *et al.*, (2010) reportan que el 50% de las muestras superaron el umbral establecido por la norma Paraguaya para yerba tradicional (INTN, 1995). Similares valores se observaron en Asunción (Paraguay), donde el 45% de las muestras analizadas presentaron valores superiores a los criterios establecidos en la Norma Paraguaya (Pérez Paiva *et al.*, 2013). Estos resultados indican el riesgo potencial del consumo de yerba mate contaminada para la salud pública.

En esta investigación se ha confirmado la contaminación por el género *Aspergillus* en 100% de las muestras de yerba mate analizadas. El recuento total de *Aspergillus* registró un promedio de 782 UFC.g, un máximo de 2.252 y un mínimo de 45 UFC.g. Se identificaron 43 cepas del género *Aspergillus*, de las cuales 36 se ubican dentro de la sección *Nigri*, y 7 en otras secciones. Todas las muestras analizadas presentaron contaminación con cepas pertenecientes a la sección *Nigri* (PIA.sn=100%), mientras que solo en 4 de las 11 muestras, se detectaron aislados de *Aspergillus* de otras secciones (PIA.os: 36%). Esto concuerda con los hallazgos en yerba mate Argentina, donde se menciona que el género *Aspergillus* figura entre los principales mohos contaminantes con incidencia del 81%, de los cuales, 75% corresponde a especies de la sección *Nigri* (PIA.sn), que se caracteriza por su alta frecuencia en regiones de clima tropical y subtropical; (Castrillo *et al.*, 2013). El mismo grupo de investigadores de Argentina, ensayó la producción de ocratoxina A por cepas de *Aspergillus* en muestras de yerba mate en Misiones y sus hallazgos indican que entre las 1494 cepas de *Aspergillus* sección *Nigri* obtenidas, ninguna mostró capacidad ocratoxigénica *in vitro*, dentro del límite de detección del método empleado. Las cepas de *A. flavus* y *A. parasiticus* aisladas, fueron sometidas a ensayos micotoxicogénicos, estableciéndose la presencia de cepas con capacidad aflatoxicogénica (Castrillo *et al.*, 2013; Castrillo *et al.*, 2016).

En la Figura 5 se presentan la identificación de las cepas de *Aspergillus* pertenecientes a otras secciones.

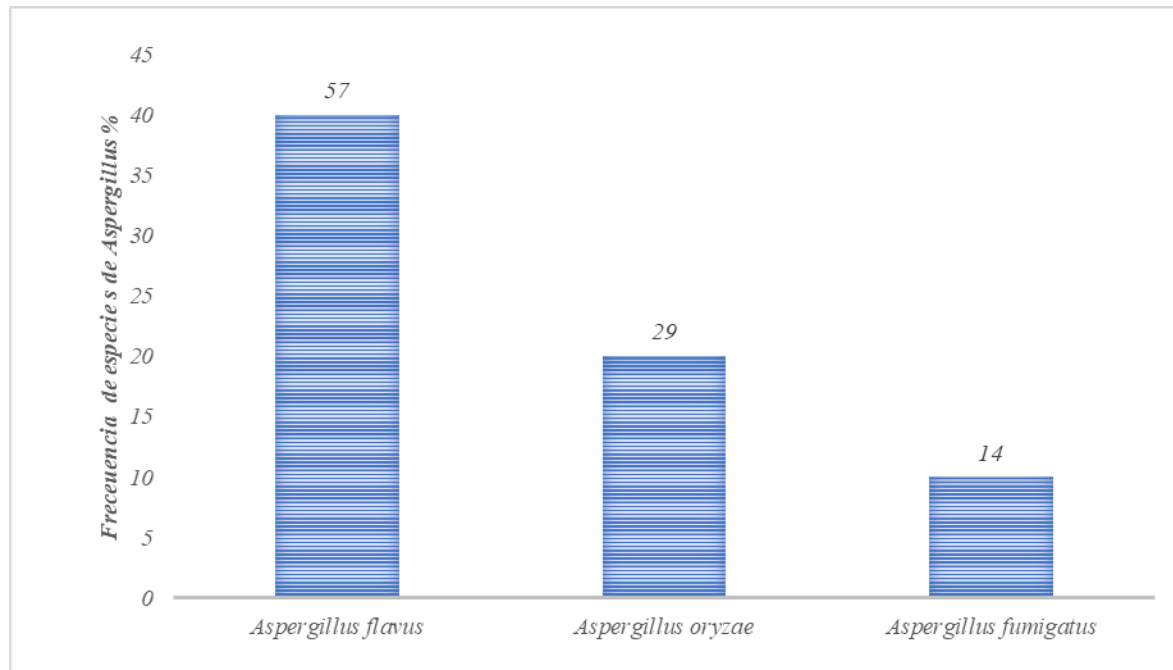


Figure 5. Frequency of *Aspergillus* species from other sections in yerba mate from Itapúa department, Paraguay. Argentina, 2015.

Figura 5. Frecuencia de especies de *Aspergillus* de otras secciones en yerba mate del departamento Itapúa, Paraguay. Argentina, 2015.

Se destaca la mayor incidencia (57%) de la especie *A. flavus* entre las cepas de *Aspergillus* correspondiente a otras secciones. En un estudio sobre la evaluación del perfil micológico de la yerba mate elaborada realizado en Asunción se reportó la presencia de *A. flavus* en muestras de yerba mate (Pérez Paiva *et al.*, 2013). Esta especie esta mencionada como importante productora de aflatoxinas en alimentos y puede tener efectos hepatocarcinogénicos provenientes del consumo periódico de productos contaminados (Fakruddin *et al.*, 2015, Pal *et al.*, 2015; Londoño & Martinez, 2017, Otomayo *et al.*, 2019).

Otro parámetro evaluado fue la densidad relativa de las especies de *Aspergillus*, registrando un 95% perteneciente a la sección *Nigri* (DREA.sn). Del 5% restante (DREA.os), el 2,7% pertenece a la sección *Flavi* (DREA.sf). Estos resultados son similares a los comunicados por Castrillo (2013) y Jerke (2010) en yerba mate Argentina, los que obtuvieron una DREA.sn del 93%, un DREA.sf del 1 %. Entre las especies pertenecientes a otras secciones, se identificaron *A. fumigatus* y *A. ustus*.

La distribución de las subespecies de *Aspergillus* de la sección *Nigri* identificadas se presenta en la Figura 6 y la estructura microscópica del hongo en la Figura 7.

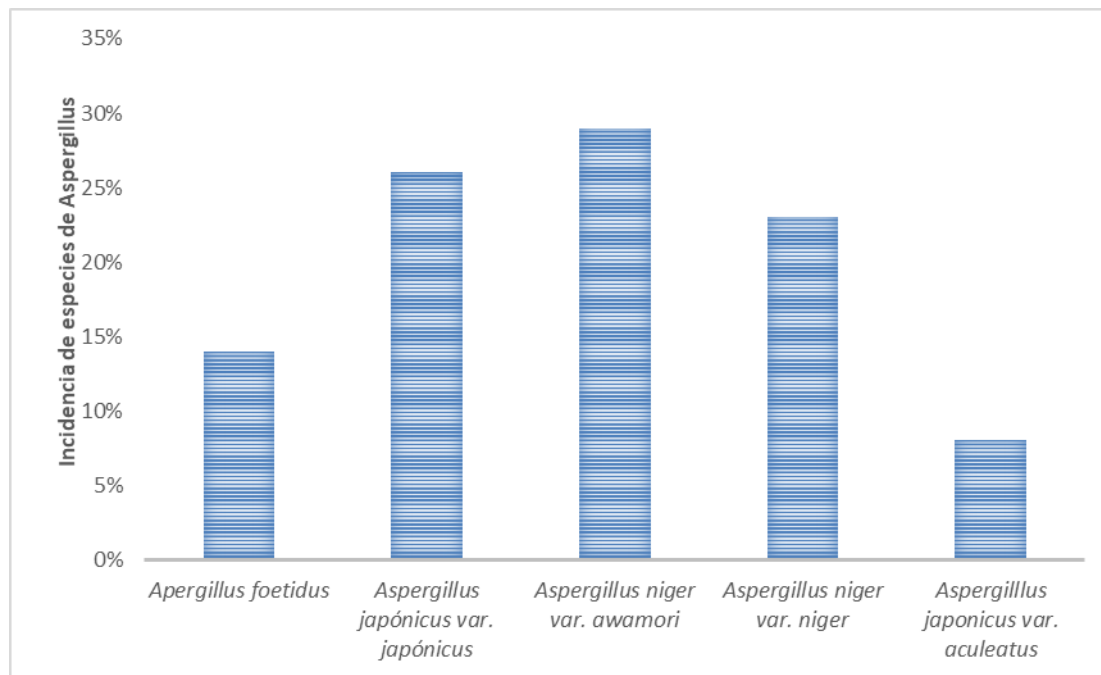


Figure 6. Incidence of subspecies of *Aspergillus* section *Nigri* in yerba mate from Itapúa department, Paraguay. Argentina, 2015.

Figura 6. Incidencia de subespecies de *Aspergillus* sección *Nigri* en yerba mate del departamento Itapúa, Paraguay. Argentina, 2015.

La subespecie de la sección *Nigri* que predomina en yerba mate paraguaya corresponde a *A. niger* var *awamori* (29%), seguido de *A. japonicus* var *japonicus* (26%) y *A. niger* var *niger* (23%). Se observa predominio de especies biseriadas (76%), por sobre las monoseriadas (34%). Estas especies de *Aspergillus* también fueron reportadas por otros investigadores en muestras de yerba mate argentina, no obstante, el predominio fue a especies monoseriadas y se detectaron además, *A. foetidus* y *A. carbonarius* (Castrillo *et al.*, 2013). Estos resultados resaltan la importancia de realizar estudios de incidencia de especies fúngicas en alimentos de comercialización local, debido a que la distribución de la contaminación fúngica, tanto de

géneros como la frecuencia de especies, varía dependiendo de la región geográfica, estando influenciada posiblemente por factores provenientes del suelo, el clima y el medio ambiente en general.

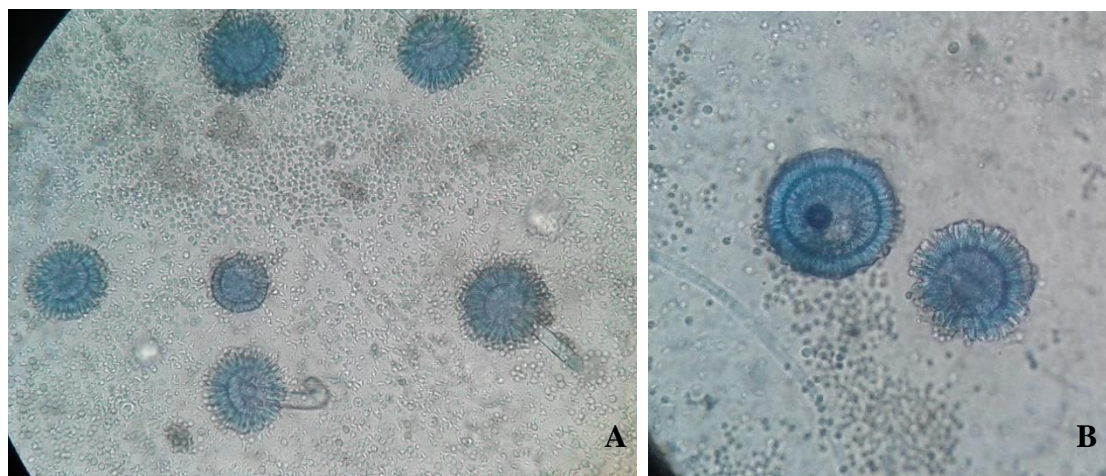


Figure 7. Structures of *Aspergillus* sp. Brightfield optical microscope. A: 10X, B: 40X. Argentina, 2015

Figura 7. Estructuras de *Aspergillus* sp. Microscopio óptico de campo claro. A: 10X, B: 40X. Argentina, 2015.

4. Conclusiones

Las muestras de yerba mate provenientes del departamento de Itapúa presentaron 100% de contaminación por el género *Aspergillus*. Se identificaron especies de la sección *Nigri* en todas las muestras analizadas, mientras que especies de otras secciones solo se detectó en el 36%. La densidad relativa de las especies de *Aspergillus*, registró un 95% perteneciente a la sección *Nigri* (DREA.sn). Del 5% restante (DREA.os), el 2,7% pertenece a la sección *Flavi* (DREA.sf). La subespecie de la sección *Nigri* que predomina en yerba mate paraguaya corresponde a *A. niger* var *awamori* (29%), seguido de *A. japonicus* var *japonicus* (26%) y *A. niger* var *niger* (23%). Se observa predominio de especies biseriadas (66%), por sobre las monoseriadas (34%). Cabe resaltar que los estudios sobre diversos aspectos relacionados al consumo de yerba mate, tanto los beneficios de su consumo como los relativos a su calidad bromatológica y comercial, es una responsabilidad que nos atañe de manera directa, por estar geográficamente ubicados en la única región productora de la misma a nivel global. Además, la formación de las autoras en las líneas de sanidad vegetal y tecnología alimentaria, llevara a continuar profundizando la actual investigación sobre la temática, de interés relevante para nuestros respectivas provincias y distritos departamentales y los habitantes de la región de Itapúa Paraguay y Misiones, Argentina.

5. Agradecimientos

A la Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Misiones (UNAM), y al Centro de Investigación en Microbiología Ambiental y de Alimentos (CIMAA) del Módulo de Bioquímica y Farmacia, por permitirnos utilizar sus instalaciones para la realización de este trabajo de investigación.

6. Bibliografía

- Bernal Castro, C. A.; Díaz-Moreno, C, & Gutiérrez-Cortés, C. 2017. Probióticos y prebióticos en matrices de origen vegetal: Avances en el desarrollo de bebidas de frutas. *Revista chilena de nutrición*, 44(4), 383-392.
- Bessaire, T.; Perrin I.; Tarres, A.; Bebius, A.; Reding F.; Theurillat, V. 2019. Mycotoxins in green coffee: Occurrence and risk assessment. *Food Control*. Vol 96: 59-67.
- Brumovsky, L. A.; Sanchez Boado, L. & Thea, A. E. 2015. Aportes Nutricionales y propiedades biológicas de la yerba mate en: *La Yerba mate. Tecnología de la producción y propiedades*. Editorial Universitaria. Universidad Nacional de Misiones. Cap 12: 271 – 313
- Burtnik, O. J. 2006. *Yerba mate: Manual de producción*. 3° ed. INTA. Agencia de Extensión Rural, Santo Tome, Corrientes. Argentina.
- Cañete, L.A.; Argüello, B. del V. & Pucciarelli Román, A. B. 2017. Estudio de la flora microbiana de la yerba mate durante las etapas de su elaboración. *Revista de Ciencia y Tecnología (RECyT)*. Año 19. N°27: 51-57
- Carballido, E. 2020. Usos del mate, Infusión. Disponible en: www.botanical-online.com
- Cardoza Ipanaque, J. A. 2019. Especies de *Aspergillus* de cepas aisladas del aire de la ciudad de Piura – Perú entre julio y octubre del 2017. Tesis de grado: Biólogo. Universidad Nacional de Piura. Perú. 102 p.
- Castrillo, M.L.; Horianski, M.A. & Jerke, G. 2013. Aislamiento de cepas de *Aspergillus* sección Nigri en la yerba mate comercializada en Posadas (Misiones, Argentina) y evaluación de su potencial ocratoxigénico. *Revista Argentina de Microbiología*. 45(2): 110–113.
- Castrillo, M. L.; Jerke, G.; Horianski, M. A. 2016. Hongos potencialmente ocratoxicogénicos en *Ilex paraguariensis*. Caracterización morfológica y confirmación molecular. Editorial Académica Española. OmniScriptum GmbH & Co. KG. Saarbrücken. Deutschland. Alemania
- Donno, D. & Turrini, F. 2020. Plant Foods and Underutilized Fruits as Source of Functional Food Ingredients: Chemical Composition, Quality Traits, and Biological Properties. *Foods*. Vol 9 (10), Article 1474.
- Elad, D; Segal, E. 2018. Diagnostic Aspects of veterinary and human Aspergillosis. *Frontiers in Microbiology*. Vol 9: Article 1303
- Fakruddin, M.; Chowdhury, A.; Hossain, M.N.; Ahmed, M.M. 2015. Characterization of aflatoxin producing *Aspergillus flavus* from food and feed samples. *SpringerPlus* 4, 159:1-6.
- Fonseca Maciel, L., de Souza Madureira Felício, A.L.; Caldeirão Rodrigues Miranda, L.; Cavalcante Pires, T.; da Silva Bispo, E & Yoko Hirooka, E. 2018. Aflatoxins and ochratoxin A in different cocoa clones (*Theobroma cacao* L.) developed in the southern region of Bahia, Brazil. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 35:1, 134-143.
- González Salgado, A. 2010. Diagnóstico y control de especies de *Aspergillus* productoras de ocratoxina A. Tesis doctoral. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Complutense de Madrid. 263 pag. ISBN: 978-84-693-2408-0
- González Coria, J.C. & Horianski, M.A. 2018. Actividad antimicrobiana in vitro de extracto hidroalcohólicos secos de yerba mate elaborada procedente de Paraguay. *Revista de Ciencia y Tecnología, (RECyT)*. (30), 12-20.
- Houbraken, J.; Kocsubé, S.; Visagie, C. M.; Yilmaz, N.; Wang, X. C.; Meijer M.; Kraak, B.; Hubka, V.; Bensch, K.; Samson, R. A. & Frisvad, J. C. 2020. Clasificación de *Aspergillus*, *Penicillium*, *Talaromyces* y géneros

- relacionados (Eurotiales): una descripción general de familias, géneros, subgéneros, secciones, series y especies. *Studies in Mycology*. 95:5-169.
- IARC (*International Agency for Research on Cancer*). 2012. Chemical agents and related occupations. IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risk to human. IARC Press, Lyon. France. 100F: 225-248.
- INTN (Instituto Nacional de Tecnología y Normalización). 1995. Norma Paraguaya 3500193: Yerba mate: especificaciones. 2 ed. Asunción, PY, INTN. 10 p.
- IRAM (Instituto Argentino de Normalización y Certificación). 2007. Norma IRAM 20517:2007: yerba mate canchada y yerba mate elaborada: análisis microbiológicos. AR, IRAM.
- Jerke, G.; Salvatierra, K.A. & Bargardi, S. 2009. Aislamiento de *Aspergillus* aflatoxigénicos en té negro durante las etapas de su elaboración tradicional. *Revista de Ciencia y Tecnología (RECyT)*. N°12: 58-64.
- Jerke, G., Horianski, M. A. & Salvatierra, K. A. 2010. Evaluación de géneros micotoxigénicos en yerba mate elaborada. *Revista de Ciencia Tecnología (RECyT)*. 12(1): 41-45.
- Jerke Schuster, G. & González Suarez, E. 2015. Impacto de buenas prácticas productivas en la calidad microbiológica de té negro. Editorial universitaria. Universidad Central de Las Villas "Marta Abreu". La Habana. Cuba. 163 p.
- Khaneghah, A. M.; Fakhri, Y.; Abdi, L.; Coppa, C. F. S. C.; Franco, L. T. & Fernandes de Oliveira, C. A. 2019. The concentration and prevalence of ochratoxin A in coffee and coffee-based products: A global systematic review, meta-analysis and meta-regression. *Fungal Biology*. Volume 123, Issue 8, August 2019, Pages 611-617
- Klich, M., & Pitt, J. 2000. Guía de laboratorio para las especies comunes de *Aspergillus* y sus teleomorfos. North Ryde, Australia.
- Klich, M. A. 2002. Identification of common *Aspergillus* species. Centraalbureau voor Schimmelcultures. Utrecht, The Netherlands.
- Krishnananda P. I.; Deshmukh, A. G.; Padole D.A.; Dudhare M.S.; Moharil M.P. & Khelurkar, V.C. 2017. Phytochemicals: Extraction methods, identification and detection of bioactive compounds from plant extracts. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*; 6(1): 32-36
- Londoño E. M. & Martínez M. M. 2017. Aflatoxinas en alimentos y exposición dietaria como factor de riesgo para el carcinoma hepatocelular. *Revista Biosalud*; 16(1): 53-66.
- Messina, D.; Soto, C.; Méndez, A.; Corte, C.; Kemnitz, M.; Avena, V.; Balzo, D.D. & Pérez Elizalde, R. 2015. Efecto hipolipemiente del consumo de mate en individuos dislipidémicos. *Nutrición Hospitalaria*, 31 (5), 2131-2139.
- Novais Pires, P.; Azevedo Vargas, E.; Batista Gomex, M.; Melo Vieira, C.B.; Alves dos Santos, E.; Cangussu Bicalho A. A.; de Carvalho Silva, S.; Rezende, R. P.; Santana de Oliveira, I.; Martins Newman, E. D. L & Trovatti Uetanabaro, A. P. 2019. Aflatoxins and ochratoxin A: occurrence and contamination levels in cocoa beans from Brazil. *Food Additives&Contaminants: Part A*, 36:5, 815-824,
- Núñez Zacarías, C. 2013. Producción de yerba mate con buenas prácticas agrícolas y buenas prácticas de manufactura, Asunción, Paraguay. 77p.
- Omotayo, O. P., Omotayo, A. O., Mwanza, M. & Babalola, O. O. 2019. Prevalence of Mycotoxins and Their Consequences on Human Health. *Toxicol Res*. 35, 1-7.

- Pal, M.; Gizaw, F.; Abera, F.; Shukla, P.K. & Hazarika, R.A. 2015. Mycotoxins: A Growing Concern to Human and Animal Health. *Beverage & Food World*. Vol 42. N° 5: 42-50
- Pérez Paiva, J.; Piris Morales, L.; Ulke Mayans, G.; Arias Villalba, M.; Mendoza de Arbo, L. & Sánchez Bernal, S. 2013. Evaluación del perfil micológico de la yerba mate durante el proceso productivo y producto final en establecimientos yerbateros. *Paraguay. Revista de Salud Pública* 3: 8–13.
- Piontelli, E. 2014. Agentes comunes en las aspergilosis humanas: conceptos primarios en la diferenciación de sus complejos de especies. *Boletín Micológico*. Vol. 29(2): 63-100
- Pitt, J. L. & Hocking, A. D. 2009. *Fungi and Food spoilage*. 3° Ed. London-Wienheim-New York-Tokyo-Melbourne-Madras: Blackie Academic & Professional.
- Prat Kricun S. D. 2015. “El Cultivo” Cap 1 del libro *La Yerba mate. Tecnología de la producción y propiedades*. Editorial Universitaria. Universidad Nacional de Misiones. Pag 15.
- Raper, K. B. & Fennell, D. I. 1965. *The Genus Aspergillus*. New York, Williams and Wilkins
- Samson, R. A.; Visagie, C. M.; Houbraken, J.; Hong, S. B.; Hubka, V.; Klaassen, C. H. W.; Perrone, G.; Seifert, K. A.; Susca, A.; Tanney, J. B.; Varga, J.; Kocsubé, S.; Szigeti, G.; Yaguchi, T. & Frisvad, J.C. 2014. Phylogeny, identification and nomenclature of the genus *Aspergillus*. *Studies in Mycology* 78:141-173.
- Sakin, F.; Tekeli, I. O.; Yipel, M.; Kürekci, Cemil. 2018. Occurrence and health risk assessment of aflatoxins and ochratoxin a in Sürk, a Turkish dairy food, as studied by HPLC. *Food Control*. Vol 90: 317-323.
- Schmalko, M.E. 2013. Avances en el conocimiento de las propiedades nutricionales y funcionales de la yerba mate. *Jornada de Divulgación Científica sobre Yerba Mate y Salud. Presentación de Resultados de Investigaciones Financiadas por el INYM. Posadas - Misiones*.
- Schmalko, M. E., Krikum, P., Sergio, D. & Kanzig, R. G. 2015. *La yerba mate Tecnología de la producción y propiedades*. Editorial Universitaria. UNaM. Misiones, Argentina.
- Servian, M.A. & Jerke, G. 2018. Yerba mate: ¿es solo una hierba que no tiene beneficios para la salud?. *Revista conexiones. Universidad de la Cuenca del Plata*. Ed. Fundación Jean Piaget. Pag 219- 223.
- Wang, Y.; Liuqing, W.; Fei, L.; Qi, W.; Selvaraj, J.; Xing, F.; Zhao, Y. & Liu, Y. 2016. Ochratoxin A producing fungi, Biosynthetic pathway and regulatory mechanisms. *Toxins*. 8(3), 83.

Horticultura Argentina es licenciado bajo Licencia Creative Commons Atribución-No Comercial 2.5 Argentina.