

Recuento y caracterización de hongos en yerba mate compuesta con hierbas aromáticas

Autores: González Claudia E.¹, Albrecht Mónica², Sapper Mayra³, Reckziegel Yessica³, Fretes Ruth, Samaniego Julie³, Paredes Carolina³.

Resumen

En Paraguay no existen datos oficiales sobre el contenido ni el tipo de hongos presentes en la yerba mate ni en las hierbas aromáticas utilizadas para la elaboración de las yerbas compuestas.

El objetivo de esta investigación consistió en cuantificar y caracterizar los géneros de hongos que se presentan en mayor frecuencia en el producto final y verificar si cumplen con los parámetros establecidos dentro de la norma vigente para certificación de calidad ISO-INTN 35002/01. Se analizó un total de 120 muestras de yerba mate compuesta, de cinco marcas comerciales extraídas de los comercios de Encarnación Paraguay.

Se determinó el contenido de humedad de cada muestra para verificar si se encuentran dentro de los parámetros normativos.

Los ensayos laboratoriales para determinación de UFC y humedad se realizaron de acuerdo a la norma INTN 35002/01 ensayos microbiológicos.

Se procesaron los datos con el programa Statgraphics plus. Se obtuvieron valores mínimos de 1000 UFC/g, máximos de 47.000 UFC/g, una media de 11.027 UFC/gr una mediana de 6.000 UFC/g. El 50 % de las muestras presentó valores medios de 10.000 UFC/g. superando el máximo permitido por norma de 5.000 UFC/g. La humedad promedio para las 5 marcas 9,1 %, se encontró dentro del rango establecido por la norma.

Palabras Claves:

Caracterización, hongos, yerba mate compuesta, hierbas.

Abstract

In Paraguay there are no official data on national-level research, concerning the content or the type of fungi present in yerba mate as herbs used for mixing. The objective of this research was to quantify and characterize the fungal genera present in greater frequency in the final product and check with the parameters set by the standard. It was analyzed a total of 120 composite samples of yerba mate, five different brands taken from the shelves of shops downtown and the outskirts of Encarnacion city in Paraguay. We recorded the moisture content of each sample to correlate with the content of fungi. Laboratory essays to determine the CFU and humidity were performed according to the technical specifications of the INTN 35002-01 standard (National Institute of Normalization and Technology) for microbiological essays. The values obtained were processed with the statistical program Statgraphics plus.

The statistical results indicated minimum values of 1000 CFU / g, maximum of 47,000 CFU / g, an average of 11,027 CFU / g and a median of 6,000 CFU / g. 50% of the samples showed values below 10,000 CFU / g of moisture. The average result was 9.1%, being within permitted by norm.

Key words:

Characterization, fungus. Ilex paraguariensis, herbs.

¹Docente Investigadora de la Universidad Nacional de Itapúa, claugongen@hotmail.com

²Docente a cargo del laboratorio de Microbiología

³Alumnas 5to curso Lic. en Tecnología de la Producción Aplicada a los Alimentos

Introducción

La yerba mate compuesta con hierbas aromáticas es muy utilizada en los países del Mercosur, Argentina Brasil, Uruguay y Paraguay para preparar mate caliente o frío. En Paraguay se consume generalmente como mate frío o tereré, ya sea con fines digestivos o refrescantes y de manera masiva por toda la población incluyendo niños, es parte de la cultura del país. En general el procesamiento de las hierbas naturales utilizadas en la elaboración de las yerbas compuestas es de forma artesanal, carecen de tratamientos tecnológicos físicos químicos o mecánicos y su higiene y calidad dependen específicamente de las buenas prácticas agrícolas y de manufactura que pudieran ser aplicadas. La norma ISO-INTN 35002/01, en su definición de yerba mate compuesta, establece como punto de corte un contenido del 15 % de hierbas adicionadas a la yerba mate elaborada a los efectos de minimizar el efecto negativo que las mismas podrían ocasionar sobre la salud.

La yerba se estaciona durante un año o más en depósitos, en condiciones de humedad y temperatura adecuadas que deben ser monitoreadas constantemente, debido a que durante este período se favorece el crecimiento fúngico.

La mayoría de estos microorganismos presentes en la yerba provienen fundamentalmente del ambiente donde se producen o se manipulan los mismos, como el suelo, aire, agua, superficies e instrumentos con los que entran en contacto.

El efecto perjudicial para la salud se conoce desde antiguo, y entre las prescripciones de la medicina clásica está la recomendación de evitar los alimentos enmohecidos. Las toxinas de los hongos son fundamentalmente producidas por mohos pertenecientes a los géneros *Aspergillus*, *Fusarium* y *Penicillium*, que por otra parte son los que agrupan al mayor número de especies productoras. Actualmente la norma que controla y establece los parámetros límites de carga microbiana y carga micológica en vigencia es una norma de certificación de calidad INTN, no existe en Paraguay a la fecha un código de alimentos que establezca los parámetros de inocuidad que debe tener el producto yerba mate elaborada y yerba mate compuesta, requisito necesario para la otorgación del registro sanitario del producto alimentario RSPA.

Teniendo en cuenta lo anterior, el objetivo de este trabajo fue; cuantificar y caracterizar los hongos más comunes presentes en la yerba mate compuesta con hierbas naturales, ya que en el área existe muy poca información al respecto y el producto en estudio es de consumo masivo y por todas las edades.

Materiales y Métodos

Materiales

Autoclave, estufa, baño maría, destilador, microscopios ópticos, balanza analítica y común.

Instrumentos para la preparación de las muestras: cuchillas, pinzas, tijeras, cucharas, espátulas, previamente esterilizadas, pro pipeta, pipetas milimetradas de 10 ml placas de Petri, Erlenmeyer, vasos precipitados, embudos.

Tubos de ensayo, mechero de Bunsen, probeta, papel de filtro, marcador para vidrio, algodón, porta y cubre objetos

Reactivos

a) Agua de peptona tamponada b) Medios Hongos y levaduras c) Agua destilada.
d) Alcohol e) Lugol f) Alcohol.

Recuento de Hongos (Mohos y Levaduras)

Se realizo según la norma INTN 35002/01 ensayos microbiológicos. Se determinaron UFC/g (Unidades formadores de Colonias/gramo

Determinación de humedad.

Se realizo según la norma INTN 35002/01. Ensayos físicos y químicos

Observación Macroscópica y Microscópica.

Las observaciones macroscópicas de colonias de hongos se realizaron a partir de diluciones 103 para las diferentes muestras. La observación microscópica se realizó con Microscopía óptica y aumento de 40X y 100 X.

M	Frec.	Media	Lim.inf.	Lim.Sup.
1	12	7,5	7,30	7,75
2	12	8,4	8,16	8,61
3	12	8,3	8,07	8,52
4	12	8,3	8,05	8,51
5	12	7,6	7,33	7,79
total	60	8		

Procesamiento de datos.

Los datos obtenidos fueron procesados y analizados con el programa estadístico Statgraphics plus y se realizaron estudios de ANOVA, correlación, histograma de frecuencias, tablas y gráficos de medias, tanto para valores de UFC como para humedad.

Resultados y Discusiones

Humedad: En la tabla 1, se observan los resultados en porcentaje correspondientes a 12 determinaciones de cada una de las 5 marcas comerciales

Det.	%HM1	%HM2	%HM3	%HM4	%HM5
1	7,2	8,4	9,1	8,3	7,3
2	8,4	8,3	9,1	8,5	6,8
3	6,9	8,2	8,3	8,4	6,96
4	7,8	8,7	7,7	7,9	8,54
5	7,6	8,7	8,8	8,3	8,03
6	8,4	7,8	8,6	8	6,5
7	7,54	7,74	8,63	8,64	8,68
8	7,95	8,91	8,51	7,99	8,5
9	6,76	8,26	7,49	8,3	7,17
10	7,73	9,05	8,58	8,6	8,1
11	6,7	8,3	7,6	8,13	7
12	7,35	8,3	7,17	8,35	7,19

Tabla1. Valores de humedad de las 5 marcas

Análisis estadístico:

Tabla 2: Medias % de Humedad según muestras
El ANOVA presentó un p-valor inferior al 0.05 % por lo tanto existe diferencia estadísticamente significativa entre los % de humedades medias de un nivel de muestras a otro para un nivel de confianza del 95%.

Medias y 95,0 Porcentajes Intervalos LSD

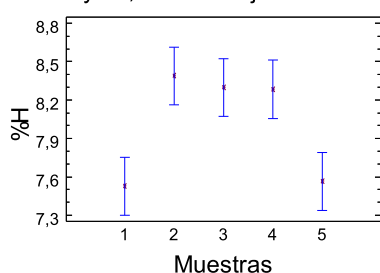


Gráfico 1: Medias de humedad según Marcas

Las determinaciones se realizaron por duplicado y se promediaron.

Se obtuvieron promedios de valores mínimos 6,5 % y máximo de 9,1 %, con una media de 8,01 % y una mediana de 8,23 %.

Las marcas comerciales 1 y 5 presentaron valores mínimos de 6,5 y máximos de 7,5 mientras que las marcas 2, 3 y 4 presentaron mínimos de 7,2 y máximos de 8,3. La marca 2 fue la que presentó el máximo valor de humedad de 8,6 %

Los promedios de humedad de las 5 marcas se ajustan a los parámetros establecidos por la norma paraguaya

M	Frec	Media	Lim.Inf	Lim.Sup
1	24	3104,2	644,39	5563,94
2	22	21.041	18471,8	23610,1
3	22	7354,6	4785,4	9923,69
4	20	4.715	2020,46	7409,54
5	24	18.400	15940,2	20589,8
Total	112	11.027		

INTN 35.002 que estipula un máximo de 10,3 para yerba mate compuesta con un 15 % de hierbas aromáticas y también al CCA (Código Argentino de Alimentos) y Norma IRAM 20503, de la Argentina que toleran hasta 9,5 %.Brasil y Uruguay no fijan valores para humedad. La diferencia de humedad entre las marcas puede deberse a la diferencia en el porcentaje de hierbas aromáticas utilizadas para la elaboración de la yerba mate compuesta que si bien no se especifica en los paquetes se logró evidenciar durante los ensayo diferencias organolépticas apreciables y considerables entre las marcas.

Recuento Fúngico :

Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3	Muestra 4	Muestra 5	Grupo
3000	133000	13000	2000	28000	A
7000	126000	17000	3000	10000	B
4000	25000	3000	6000	14000	A
6000	29000	2000	1000	4000	B
4000	21000	7000	4000	46000	A
6000	19000	13000	8000	38000	B
1000	32000	3000	6000	10000	A
5000	26000	4000	8000	10000	B
2000	31000	31000	13000	12000	A
2000	35000	22000	9000	11000	B

2000	10000	3000	3000	6000	A
3000	8000	6000	5000	11000	B
4000	6000	10000	4000	4000	A
3000	4000	11000	9000	6000	B
2000	31000	5000	23000	39000	A
1000	42000	8000	20000	40000	B
4000	27000	24000	48000	15000	A
2000	30000	35000	34000	23000	B
4000	10000	2000	1000	18000	A
4000	11000	1000	2000	14000	B
1000	24000	3000	4000	17000	A
2000	18000	2000	1000	47000	B
1200	12200	1400	3200	8000	A
1300	11700	1400	2100	9500	B

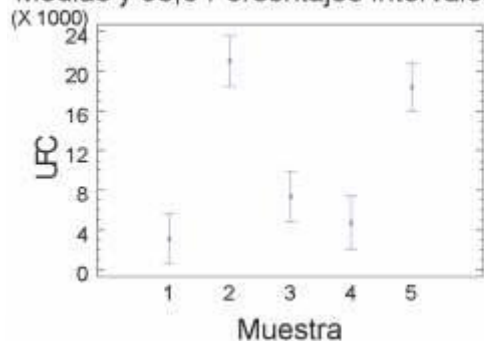
Tabla 3. Valores de hongos expresados en UFC/g de 5 marcas de yerba compuesta

Análisis estadístico:

Tabla 4 : Medias para hongos según marcas

El ANOVA presentó un p-valor inferior al alfa de 0.05 % por lo tanto existe una diferencia estadísticamente significativa entre las UFC medias de un nivel de muestras a otro para un nivel de confianza del 95%

Medias y 95,0 Porcentajes Intervalos LSD



Histograma

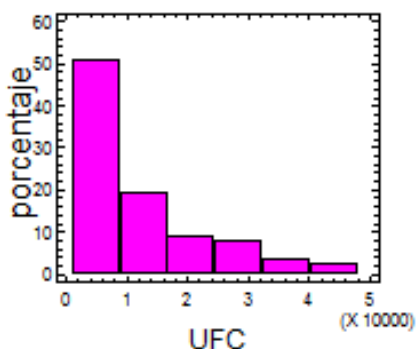


Grafico 3: Cantidad de Hongos según Marcas

El total de datos quedo comprendido dentro de los rangos 1000 UFC/g y 47.000.UFC/g Se observó que el 50 % de los datos, presentaron valores por debajo de 10.000 UFC, el 20 % entre 10.000 UFC y 16.000 UFC y un 30 % por arriba de 16.000 UFC. El porcentaje de determinaciones que supera los valores de 40.000 UFC/g es muy pequeño aproximadamente del 2 %.

Macroscopía y microscopía

Las observaciones realizadas bajo microscopio óptico han permitido identificar diferentes géneros de mohos los más comunes fueron: *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Mucor*, *Absidia*, *Rizophus*, *Alternaria*, *Cladosporium*.

Varios de los géneros encontrados en yerba mate presentan especies que son productoras de toxinas por lo que se recomiendan estudios futuros de caracterización.



Figura 1: Observación macroscópica de colonias de hongos en placas agar.



Figura 2: Observación microscópica de hifas de hongos y estructuras de reproducción. Aumento 100X

El alto contenido de mohos y levaduras puede deberse tanto a la contaminación de las hierbas medicinales utilizadas en la preparación de la yerba compuesta como a la yerba molida utilizada como base para la preparación ya que en Paraguay el sistema de cosecha, secado y canchado en un 90 % es sistema barbacuá y la tecnología solo se aplica en las industrias que se encargan de la molienda y preparación del producto

Conclusión:

El recuento fúngico realizado sobre las 120 determinaciones presentó valores mínimos de 1000 UFC/g y máximo de 47.000 UFC/g una media de 11.027 UFC/g y una mediana de 6.000 UFC/g.

Solo las marcas 1 y 4 presentaron valores promedios por debajo del límite máximo permitido por la norma INTN que es de 5000 UFC/g, las marcas 2,3 y 5 están fuera de norma.

Las diferencias entre las marcas puede deberse al contenido de hierbas utilizadas y al tipo de procesamiento utilizado durante la cosecha secado y almacenamiento de las hierbas

Los valores promedios de humedad para las 5 marcas analizadas están dentro de los parámetros permitidos por el INTN correspondiente a 10,3 %.

Estudios de investigación realizados en la U.Na.M. Misiones Argentina presentados en el 4to y 5to Congreso Internacional de la Yerba Mate han arrojado valores de UFC en yerba mate compuesta con hierbas aromáticas mínimos de 3.600 UFC/g ($3,6 \times 10^2$ UFC/g), un máximo de 500.000 UFC/g ($5,0 \times 10^5$ UFC/g) con una media de 54.000 UFC/g ($5,4 \times 10^4$ UFC/g), y una mediana de 6.100 UFC/g ($6,1 \times 10^3$ UFC/g.).

Bibliografía

- Claus EP, Tyler VE. Farmacognosia. La Habana: Editorial Ciencia y Técnica, 1970:533.
- Durand E, Miranda M, Cuéllar A. Manual de prácticas de laboratorio de farmacognosia. La Habana: Editorial Pueblo y Educación, 1986:105.
- Farnsworth NR. Biological and phytochemical screening of plants. J PharmSci 1966;55(3):243-76.
- Normas IRAM. Argentina. Yerba Mate.
- NRSP 309. Medicamentos de origen vegetal. Droga cruda. Métodos de ensayo. La Habana: MINSAP, 1992.