

014 1222 3
6262

42544

INFORME PARCIAL:

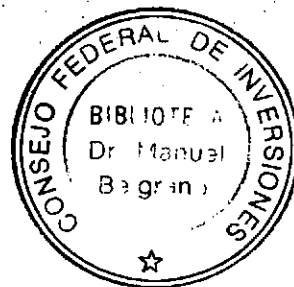
II

Estudio Microbilógico (Bacteriológico y Micológico) en Yerba Mate Canchada estacionada y Envasada.

Noviembre 1999

Anexos

- I Informe de la Cámara de Molineros de Yerba Mate de la Zona Productora 1998
- II Normas Técnicas de Brasil y Paraguay sobre Yerba Mate.
- III Intercambio de Notas con organismos argentinos:
 - Secretaria de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentación.
 - SENASA (Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria)
 - Dirección de Calidad Agroalimentaria
 - Coordinación Productos Vegetales y Microbiología Agrícola
 - Dirección de Mercosur (Ministerio de Relaciones Exteriores, Comercio Internacional y Culto)
- IV Actas de Intención (Laboratorio de Micotoxinas):
 - Establecimiento La Cachuera S.A.
 - Cooperativa Agrícola Montecarlo Ltda.
 - Yerba Mate Santo Pipó S.C.L
- V Primeros Antecedentes de Estudios Microbiológicos:
 - Dr. Carlos Spegazzini -
 - Dra Nilda Spedallieri de Nuñez
- VI- Reunión de Normalización Técnica IRAM

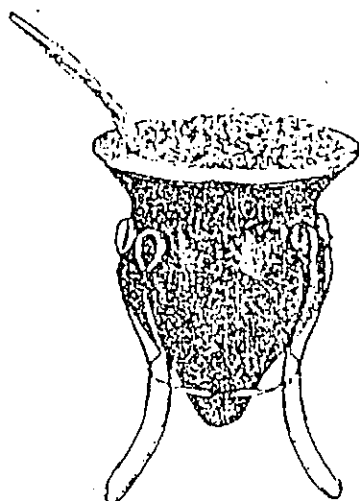


ANEXO I

**CAMARA DE MOLINEROS
DE YERBA MATE
DE LA
ZONA PRODUCTORA**



ESTADÍSTICAS DE INTERÉS



AÑO 1998

FUENTES C.M.Y.M.Z.P. REGISTROS AFIP - INDEC

**1. PROMEDIO MENSUAL QUE CIRCULÓ EN 1998 POR AMBOS PUESTOS
(FILADELFIA - CUAY)**

17.921.090 KILOGRAMOS

2. TOTAL ANUAL PONDERADO PARA 1998

215.053.150 KILOGRAMOS

3. VENTAS ESTIMADAS EN LA PROVINCIA DE MISIONES

5.530.000 KILOGRAMOS

4. EXPORTACIONES AL BRASIL ELABORADA Y CANCHADA

1.029.320 KILOGRAMOS DE Y.M. ELABORADA
14.330.250 KILOGRAMOS DE Y.M. CANCHADA

15.359.570 KILOGRAMOS TOTALES

5. EXPORTACIONES AL PARAGUAY ELABORADA Y CANCHADA

110.000 KILOGRAMOS DE Y.M. ELABORADA
587.150 KILOGRAMOS DE Y.M. CANCHADA

697.150 KILOGRAMOS TOTALES

6. EXPORTACIONES VIA PUERTO DE BUENOS AIRES

21.236.140 KILOGRAMOS

7. TOTAL GENERAL

236.639.870 KILOGRAMOS

CONSUMO NACIONAL APARENTE

(2) 215.053.150 KGS. + (3) 5.530.000 KGS. - (6) 21.236.140 KGS.

CONSUMO NACIONAL : 199.347.010 KILOGRAMOS

PER CAPITA AÑO : 5,700 KILOGRAMOS

UNIVERSO PRODUCTORES MISIONEROS DE YERBA MATE

HECTÁREAS	TOTAL DE HECTÁREAS	PRODUCTORES PRIMARIOS	PORCENTAJE
1 A 3	12.700	8.100	39%
3,1 A 5	17.800	3.900	19%
5,1 A 10	35.700	5.000	24%
10,1 A 15	22.500	1.700	8%
SUBTOTAL I	89.300	18.600	90%
15,1 A 25	23.400	1.200	5,5%
SUBTOTAL II	112.700	19.800	95,5%
25,1 A 50	22.000	650	3%
50,1 A 100	15.000	200	1%
MÁS DE 100	21.000	90	0,5%
TOTAL GENERAL	170.700	20.840	100%



Fuente MINISTERIO DE ASUNTOS AGRARIOS (1997)

ANEXO II

PHONE NO. :

DIRECC. CALIDAD. VEGETAL. SENASA



*Ministerio de Economía
y Obras y Servicios Públicos*

*Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentación
Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria*

JAN. 7.1991 11:46PM P 1

PHONE NO. : 311 5645

1999 Año de la Exportación

NOTA DICA N° 51 / 99

BUENOS AIRES, 19 AGO 1999

Señora
Subsecretaría de Comercio e Integración
Dra. Carmen Floridia de GROSS
Avda. Mitre N° 2180
Fax N° 03752-447512
Posadas - Misiones

Me es grato dirigirme a Ud. en relación a su nota del 5 de agosto ppdo. referente a los aspectos Micológicos y Bacteriológicos en Yerba Mate.

En el marco del SGT. N° 3 DEL MERCOSUR en el grupo ad-hoc. de Microbiología no se han fijado niveles de tolerancia para materias primas como la Yerba Mate y si para algunos productos en especial, por otra parte no hay antecedentes de ser considerada la Yerba Mate como alimento de riesgo epidemiológico.

Sin otro particular saludo a Ud. atentamente.

m.g.r.

Ing. Agr. JUAN C. BATISTA
DIRECTOR de C. REG. AGROALIMENTARIA
SENASA



SUBSECRETARIA
DE COMERCIO
E INTEGRACION

EXPORTAR
Misiones

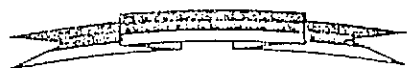
SUBSECRETARIO DE COMERCIO E INTEGRACION - Tel. (03752) 447513
ON GRAL. DE COMERCIO INTEGRAC. Y REL. INTERNAC. - TEL.-FAX - (03752) 447535
CION DE COMERCIO INTERIOR - DEF. AL CONSUMIDOR - TEL.-FAX - (03752) 447555
RECCION DE COMERCIO EXTERIOR - EXPORTAR - TEL.-FAX - (03752) 447511
ECCION DE INTEGRACION, COOP. Y REL. INTERNAC. - TEL.-FAX (03752) 447512

http://www.misiones.org.ar/comercio

E-mail: sucel@mail.misiones.org.ar

AV. Mitre 2180 - (3300) - Posadas - Provincia de Misiones
República Argentina

Posadas, 5 de Agosto de 1.999.-



Señor
Ing. JUAN CARLOS BATISTA
Director de Calidad Agroalimentaria
SENASA

S / D

FAX: 011-4342-8224

De nuestra consideración:

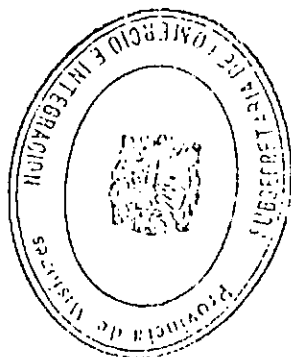
Nos es muy grato dirigir a Ud., con relación a nuestro Programa Eco-Mate: Reconocimiento de Calidad. Es interés desarrollar la Cuarta Etapa que contempla la realización de un Estudio sobre Aspectos Micológicos y Bacteriológicos en Yerba Mate.

Con tal motivo, y en virtud de las normativas vigentes en dos de los Estados Partes del Mercosur (Norma Técnica Paraguaya y Portaria Brasileira) que establecen valores al respecto, resulta de nuestro interés precisar la siguiente información:

- Si a nivel país, en la clasificación de alimentos según riesgo epidemiológico, clasifica la Yerba Mate. Si es así, ¿cómo clasifica?
- Si se han determinado niveles de tolerancia de microorganismos para Yerba Mate.

Nos sentiríamos muy gratificados poder contar con esa información, desde ya agradecemos vuestra gentileza y nos expresamos a su entera disposición.

Coordinación Prog. Olo. de Oest. de la Ca.
Dra. Carmen Ma. Floridia de Gross
Eco. Mate- Reg. de Ca.
Nota N° 16 / 99.-





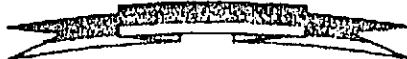
PROVINCIA DE MISIONES

SUBSECRETARIA DE COMERCIO E INTEGRACION

SUBSECRETARIO DE COMERCIO E INTEGRACION - TEL (03752) 447511
 DIRECCION GRAL. DE COMERCIO INTEGRAC. Y REL. INTERNAC. - TEL-FAX - (03752) 447535
 DIRECCION DE COMERCIO INTERIOR - DEF. AL CONSUMIDOR - TEL-FAX - (03752) 447535
 DIRECCION DE COMERCIO EXTERIOR - EXPORTAR - TEL-FAX - (03752) 447511
 DIRECCION DE INTEGRACION, COOP. Y REL. INTERNAC. - TEL-FAX (03752) 447512

http://www.misiones.org.ar/comercio
 E-mail: sucoi@mail.misiones.org.ar

AV. Mitre 2180 - (3300) - Posadas - Provincia de Misiones
 Republica Argentina



Posadas (Mnes), 18 de marzo de 1999

Señor
 Lic. MARIO GOMEZ
 Laboratorio Vegetal SENASA

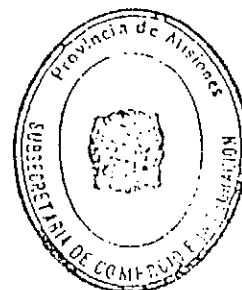
Huergo 1001
1107- BUENOS AIRES

De mi consideración:

De conformidad con lo conversado en el día de la fecha, me es muy grato dirigir a Ud., a fin de solicitar quiera tener a bien contemplar la posibilidad de remitirnos una copia de la Resolución Mercosur sobre Parámetros Microbiológicos. Como anticipara, estamos presentando un proyecto para continuar los estudios sobre aspectos micológicos y bacteriológicos en yerba mate, razón por la cual dicha información nos resulta de sumo interés.

Asimismo, informo a Ud. que vía correo, y de conformidad con lo prometido, estoy enviando un juego de las cartillas que sobre plaguicidas se elaboró recientemente como resultado del Estudio de la Degradación de Biocidas en Yerba Mate, encarado conjuntamente con la Dirección de Yerba Mate de la UNaM.

A tal fin notifico dirección y teléfono: Av. Mitre 2180 - CP.3300- Tel/fax (03752) 44 7511



Coordinación Progr. Global de
 Gestión de la Calidad. Eco-Mate: Rec. de Ca.
 Dra. Carmen M. Florida de Gross
 Nota N° 169/99

1999 Año de la Exportación



Ministerio de Economía
y Obras y Servicios Públicos
Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentación
Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria

BUENOS AIRES, 25 de marzo de 1999.-

DE: Coordinación Productos Vegetales y Microbiología Agrícola - SENASA -
Lic. Mario F. Gómez

A: Coordinación Prog. Global de Gestión de la Calidad Eco-Mate: Rec. de Ca
Dra. Carmen M. Floridia de Gross

De acuerdo a lo solicitado por Ud., remitimos copia de la
Resolución MERCOSUR sobre parámetros microbiológicos.

Saludo a Ud. atte.

MARIO F. GÓMEZ (M.F. 04)
COORDINADOR
Prod. Veg. y Micro. Agric.
SENASA

CODIGO ALIMENTARIO ARGENTINO
ANEXO MERCOSUR - "E-287-288"

293



DE LA CANAL Y ASOCIADOS SRL

RESOLUCIONES MERCOSUR SOBRE
PATRONES MICROBIOLOGICOSPRINCIPIOS GENERALES PARA EL ESTABLECIMIENTO DE CRITERIOS Y PATRONES MICROBIOLOGICOS
PARA ALIMENTOS

MERCOSUR - GMC - RES N° 059/93

Incorporada por Resolución MSyAS N° 003 del 11.01.95

Art 1°.- Aprobar los "Principios Generales para el Establecimiento de Criterios y Patrones Microbiológicos para Alimentos", que figura en el Anexo de la presente Resolución.

Art 2°.- Los Estados Partes pondrán en vigencia las disposiciones legislativas, reglamentarias y administrativas necesarias para dar cumplimiento a la presente Resolución y comunicarán el texto de las mismas al Grupo Mercado Común a través de la Secretaría Administrativa.

Art 3°.- La presente Resolución comenzará a regir a partir del 31 de diciembre de 1993.

ANEXO 1

PRINCIPIOS GENERALES PARA EL ESTABLECIMIENTO DE CRITERIOS Y PATRONES MICROBIOLOGICOS PARA
ALIMENTOS

Introducción

Los principios generales a ser aplicados para el establecimiento de criterios y patrones microbiológicos para alimentos tienen su justificación en los problemas de salud pública y en la necesidad de uniformizar los patrones para el comercio entre los países. Por esta razón, organismos internacionales tales como FAO, OMS, OPS, han demostrado preocupación creciente en el tema. Así, el CODEX ALIMENTARIUS y la I.C.M.S.F. continuamente han editado documentación normativa que reglamenta el tema. Considerando que los países que integran el MERCOSUR integran y participan activamente en la elaboración de los documentos del CODEX ALIMENTARIUS y de la I.C.M.S.F., estos últimos podrán ser tomados como referencia.

CRITERIOS Y PATRONES APLICABLES A LA MICROBIOLOGIA DE ALIMENTOS.

Principios generales para su establecimiento:

Definición de los criterios microbiológicos para los alimentos:

- 1.- Caracterización de los microorganismos y/o sus toxinas considerados de interés. Con esta finalidad los microorganismos comprenden bacterias, virus, hongos y levaduras.
- 2.- Clasificación de los alimentos según su riesgo epidemiológico.
- 3.- Métodos de análisis que permitan su determinación, así como establecimiento de un sistema de Garantía de Calidad Analítica.
- 4.- Plan de Muestreo para determinación del número y tamaño de unidades de muestra a ser analizadas.
- 5.- Tolerancias microbiológicas (normas y patrones) que deberán ser respetadas.
- 6.- Ajuste de tolerancias en función del número de unidades de muestra analizadas.



DE LA CANAL Y ASOCIADOS SRL

Categorías principales de los criterios para elaboración de patrones microbiológicos.

1.-Criterio obligatorio:

Se refiere a los microorganismos considerados patógenos y/o sus marcadores, de importancia en salud pública y de acuerdo con la clase de alimento.

2.2 Criterio complementario (recomendatorio):

2.2.1 Son los criterios relativos a la evaluación del proceso tecnológico utilizado para la obtención de un producto terminado.

2.2.2 Son los criterios que pueden orientar al fabricante pero que no se tiene la finalidad de inspección final.

3.-Finalidades de los criterios microbiológicos para alimentos

3.1 Protección de la salud del consumidor

3.2 Uniformidad de criterios para las prácticas de comercio.

4.- Consideraciones sobre los principios para el establecimiento y aplicación de las Normas y Patrones Microbiológicos.

4.1 Los principios son aquellos indicados en los documentos elaborados por el CODEX ALIMENTARIUS.

Estos principios deberán respaldar disposiciones establecidas en documentos que tratan de Buenas Prácticas de Elaboración y sus formas de evaluación, como Análisis de Riesgo y Control de Puntos Críticos.

4.2 En situaciones de riesgo epidemiológico que justifiquen un Alerta Sanitaria, deberán ser realizadas otras determinaciones microbiológicas no incluidas en las Normas y Patrones establecidos, en función del problema.

5.-Componentes de las normas y patrones microbiológicos.

5.1 Los microorganismos seleccionados para el producto considerado.

5.2 Los métodos recomendados para su determinación.

5.3 Las tolerancias relacionadas con los microorganismos seleccionados y su distribución en las muestras analizadas, de acuerdo con el plan de muestreo.

5.4 Plan de muestreo adecuado para el alimento considerado.

6.- Métodos de Muestreo y Manipulación de las Muestras

6.1 De acuerdo con CODEX ALIMENTARIUS, I.C.M.S.H. y otros organismos internacionalmente reconocidos

Alimentos que obligatoriamente deberán estar sujetos a controles microbiológicos

*Alimentos lácteos:

Leche (en todas sus formas)

Queso (todos los tipos)

Yogur

Crema

Mantequilla, etc.

*Productos cárnicos que se consumen sin tratamiento térmico:

Charnados

Embutidos

Flambres

Salados

Ahumados, etc.

*Alimentos refrigerados:

Aves

Vegetales

Pescados y mariscos, etc.

CODIGO ALIMENTARIO ARGENTINO
ANEXO MERCOSUR - "E-287-289"

295



DE LA CANAL Y ASOCIADOS SRL

*Alimentos congelados:

Platos preparados

Hielos

Pescados y mariscos

Vegetales

Hielo, etc.

*Pastas frescas (con y sin relleno)

*Bebidas analcohólicas:

Agua

Jugos de frutas, etc.

*Condimentos: salsas y aderezos

*Frutas secas: maní, etc.

*Conservas de productos vegetales y animales

*Otros alimentos que se juzguen necesarios —

7. Determinaciones Analíticas

Se tomará como referencia los criterios establecidos por CODEX ALIMENTARIUS ICMSE y otros organismos internacionalmente reconocidos.

1999 - Año de la Exportación



Ministerio de Relaciones Exteriores,
Comercio Internacional y Culto

FACSIMIL N° :
FAX NUMBER :

FECHA: 20 de mayo de 1999

PARA : Dra. Carmen M Florida de Gross
Dirección de Comercio Exterior

DE : Lic. Carlos Alonso
Dirección del MERCOSUR

Nº PÁGS. INCLUIDA ESTA CARATULA : cinco (5)

COMENTARIOS : De acuerdo a lo conversado adjunto RES. GMC 59/93
"Principios Generales para el Establecimiento de Criterios y Patrones
Microbiológicos para Alimentos."

Atentamente C.

[Firma]

MERCOSUR\GMC\RES Nº 59/93

VISTO : El Art 13 del Tratado de Asunción, el Art 10 de la Decisión Nº 4/91 del Consejo del Mercado Común y las Resoluciones Nº 18/92 del GMC, y la Recomendación No.41/93 del Subgrupo de Trabajo Nº 3 "Normas Técnicas".

CONSIDERANDO :

Que los Estados Partes acordaron establecer los "Principios Generales para el Establecimiento de Criterios y Patrones Microbiológicos para alimentos".

EL GRUPO MERCADO COMÚN
RESUELVE:

- Art. 1 - Aprobar los "Principios Generales para el Establecimiento de Criterios y Patrones Microbiológicos para Alimentos", que figura en el Anexo de la presente Resolución.
- Art. 2 - Los Estados Partes pondrán en vigencia las disposiciones legislativas, reglamentarias y administrativas necesarias para dar cumplimiento a la presente Resolución y comunicarán el texto de las mismas al Grupo Mercado Común, a través de la Secretaría Administrativa.
- Art. 3 - La presente Resolución comenzará a regir a partir del 31 de diciembre de 1993.

[Handwritten signatures and initials]

ANEXO III



Ministerio de Relaciones Exteriores,
Comercio Internacional y Culto

Nota OIMSU N° 100155/PP

Buenos Aires, 20 de abril de 1999

De mi consideración:

Tengo el agrado de dirigirme a usted para remitirle la legislación sobre yerba mate existente en Brasil y en Paraguay de acuerdo a lo solicitado oportunamente.

Sin otro particular saludo a usted atte.

ALBERTO J. DUMONT
MINISTRO
DIRECTOR DEL MERCOSUR

Sra. Coordinadora del Programa Eco Mate de la
Subsecretaría de Comercio e Integración de la Provincia de Misiones
Dra. Carmen M. F. de Gross

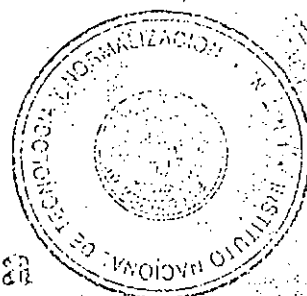
Instituto Nacional de Tecnología y Normalización



INTN

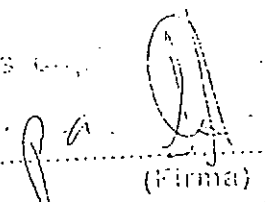
Norma Paraguaya

NP 35 001 93



YERBA MATE.

Especificaciones

DEPARTAMENTO	ASOCIACIÓN
Es	
	
(Firma)	

Marzo/95
Segunda Edición

NP 35 001 93

1

INDICE

- 1 OBJETO Y ALCANCE
- 2 DEFINICIONES
- 3 GENERALIDADES
- 4 REQUISITOS
- 5 MATERIALES Y APARATOS
- 6 MEDIOS DE CULTIVO, REACTIVOS Y SUEROS
- 7 MUESTREO
- 8 METODOS DE ENSAYO
- 9 ENVASADO Y ALMACENAMIENTO
- 10 MARCADO Y ROTULADO
- 11 REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

NP 35 001 93

2

1 OBJETO Y ALCANCE

Esta Norma tiene por objeto establecer los requisitos que debe reunir la YERBA MATE para ser considerada apta para el consumo humano, desde el punto de vista organoléptico, físico químico, histológico y microbiológico.

Esta norma establece un solo grado de calidad para la "Yerba Mate".

2 DEFINICIONES

2.1 Yerba o Yerba Mate. Es el producto formado exclusivamente por las hojas desecadas y ligeramente tostadas, desmenuzadas del *Ilex Paraguariensis Saint Hilaire* (Aquifoliaceae) mezcladas o no con fragmentos de ramas jóvenes, pecíolos, pedúnculos florales y semillas de la misma.

2.2 Yerba Mate Canchada. Es la yerba zapecada, secada y groseramente triturada.

2.3 Yerba Mate Elaborada. Es la yerba canchada que ha sido sometida a procesos de zarandeo, trituración y molienda.

2.4 Molino de Yerba. Es el establecimiento donde se practica la clasificación, trituración, molienda y/o tostado y envasamiento de este producto.

3 GENERALIDADES

3.1 Clasificación

De acuerdo al tratamiento al que haya sido sometido, se clasificará en:

3.1.1 Yerba Canchada: Es la Yerba zapecada, secada y groseramente triturada que ha pasado a través de un tamiz N° 8 que corresponde a un tamiz de 2,36 mm según norma ASTM y tamiz N° 40 que corresponde a un tamiz de 425 mm según norma ASTM para polvos.

3.1.2 Yerba Elaborada: Es la Yerba Canchada que ha sido sometida a proceso de zarandeo, trituración y molienda.

3.1.3 Yerba Mate Tostada: Es la Yerba Mate Elaborada sometida posteriormente a un proceso de tostación.

3.1.4 Yerba Soluble, Mate Instantáneo, Extracto de Mate en Polvo, Concentrado de Mate: Es el producto en polvo resultante de la deshidratación de los extractos acuosos obtenidos exclusivamente de la yerba mate.

NP 35 001 93

3

3.2 Morfología

3.2.1 Morfología macroscópica

La yerba mate o *Ilex Paraguariensis* St.-Hill (Aquifoliaceae) es un árbol pequeño a mediano que alcanza una altura de 2,5 a 15 metros.

Prefiere sitios bajos y húmedos, donde forma parte del soto-bosque o estrato mediano.

Está compuesto por:

- a. ramas jóvenes angulosas, glabras, raramente algo pubescentes; ramas mayores cilíndricas. Corteza pardo-oscuro, pardo-rojiza o pardo-grisácea, con lenticelas poco notables. Yemas glabras o algunas veces pubescente.
- b. hojas coriáceas, angostas o anchamente obovadas, raramente oblanceoladas o elípticas, nunca ovadas, de base aguda, retusas, con margen aserrado, revuelto y glabras. Pecíolos glabros, a veces algo pubescentes.
- c. inflorescencia cimosa, axilar, monoica. Flores masculinas y femeninas de corola blanca, lobuladas.
- d. fruto drupáceo, globoso, violáceo-oscuro cuando maduro, rugoso cuando seco.

3.2.2 Morfología microscópica

- a. Epidermis superior: Células poligonales de paredes sinuosas, con abundantes estomas.
- b. Estomas: Anomocíticos o ranunculáceos.
- c. Mesófilo: Dorsiventral. El parénquima en empalizada presenta dos estratos de células. A partir del segundo estrato de empalizadas se observan cristales en forma de drusas. El parénquima lagunar está formado por células basiformes. El haz vascular central es cerrado, el floema rodea totalmente al xilema.
- d. Tallo: La epidermis presenta cutícula. En el parénquima cortical se observa tejido colenquimático, debajo de él se encuentran cristales formando un anillo, se observan también fibras esclerenquimáticas.
- e. Pecíolos: El haz vascular central cerrado está rodeado por fibras esclerenquimáticas, presentando además dos haces laterales más pequeños.

4 REQUISITOS

4.1 Físico-Químicos

La yerba mate elaborada, deberá cumplir con las especificaciones que indica la Tabla 1:

NP 35 001 93

4

TABLA 1

Parámetros		Valores Porcentuales (%)	
		Mínimos	Máximos
Humedad a $105 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$		-	10,3
Ceniza a 550°C		-	9,00
Ceniza insoluble en HCl al 10% 1000°C		-	1,50
Extracto acuoso		25,0	-
Cafeína		0,60	-
Finura	Hojas desecadas y pulverizadas	65,0	-
	Ramas, palos	-	35,0
Impurezas		-	1,00
Semilla de yerba mate		-	1,00

La yerba mate elaborada no debe contener productos extraños o estar ardida, alterada, agotada o coloreada artificialmente, además la yerba que se tenga en depósito, exhiba o expendia que no se ajusten a estas especificaciones, se considerará como inepto para el consumo.

4.2 Organolépticos

La yerba mate elaborada deberá cumplir con las especificaciones que indica la Tabla 2:

TABLA 2

Parámetros	Observaciones
Olor	Característico
Color	Verde Mate
Sabor	Ligeramente Amargo

4.3 Microbiológicos

La yerba mate deberá cumplir con las especificaciones que indica la Tabla 3:

NP 35 001 93

5

TABLA 3
CRITERIOS MICROBIOLÓGICOS Y TOLERANCIAS

Microorganismos	Valores de referencia			
	n	c	m	M
Hongos y levaduras UFC/g	5	2	150	1500
Coliformes totales NMP/g	5	2	90	200
Coliformes NMP/g a $44 \pm 1^\circ\text{C}$	5	2	7	15
E. Coli/g	5	0	0	0
Salmonella sp 25 g	5	0	0	0

n = N° de muestras analizadas

c = N° de unidades que pueden presentar valores entre m - M

m = Valor mínimo aceptable

M = Valor máximo

g = gramo

UFC = Unidad Formadora de Colonia

NMP = Número Más Probable

4.4 Residuos tóxicos

TABLA 4

Determinaciones		Resultado (ausencia o presencia)
Plaguicidas	organoclorados	
	organofosforados	
Aflatoxinas	B ₁	
	B ₂	
	G ₁	
	G ₂	

NP 35 001 93

5 MATERIALES Y APARATOS

5.1 Ensayos microbiológicos

- Autoclave
- Homogeneizador mecánico
- Vasos de Homogeneizador de 1 lt de capacidad con tapas, resistentes a la temperatura de esterilización.
- Balanza con pesas de 0.1 g de sensibilidad.
- Instrumentos para la preparación de las muestras: cuchillas, pinzas, tenedores, tijeras, cucharas, espátulas, previamente esterilizadas.
- Baño con agua circulante a $44^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$ y $35-37^{\circ}\text{C}$ y estufas de incubación con termostato.
- Pipetas bacteriológicas de 1 ml.
- Pipetas milimetradas de 1, 5 y 10 ml.
- Asa de inoculación con alambre de platino-iridio
- Placas de Petri
- Tubos de ensayo
- Mechero de Bunsen
- Frascos de dilución y bolsas estériles.
- Contador de colonias

5.2 Ensayos Físico-químicos

- Pesa sustancia
- Estufa
- Desecador
- Crisol de porcelana y crisol de Gooch
- Mufla
- Balón de 500 ml
- Pizeta
- Probeta
- Papel de filtro
- Filtro de lienzo
- Balanza analítica
- Cristalizador
- Vaso de Berling
- Pipeta graduada de 5 ml
- Embudo de separación de 250 ml
- Bulón de fondo plano de 250 ml
- Tubo de sonda o calador
- Muestreador automático
- Recipiente de cierre hermético ó bolsas de polietileno de 150 m para transportar las muestras

NP 35 001 93

7

6 MEDIOS DE CULTIVO, REACTIVOS, Y SUEROS

6.1 Ensayos Microbiológicos

6.1.1 Medios de cultivo

- Caldo lactosado o Caldo MacConkey
- Agua de peptona tamponada
- Agua triptona
- Caldo bilis verde brillante al 2%
- Caldo selenito cystine
- Caldo tetrationato verde brillante
- Agar verde brillante
- Agar bismuto sulfito
- Salmonella-Shigella-Agar
- Agar nutritivo
- Oxitetraciclina glucosa yeast extract agar
- Agar Sabouraud dextrosa

6.1.2 Reactivos

- Reactivo de Kovacs
- Solución de verde brillante al 0,5%
- Solución de iodo

6.1.3 Sueros

- Sueros polivalentes para *Salmonella spp*

6.2 Ensayos Físico-químicos

6.2.1 Reactivos

- Acido Clorhídrico al 10%
- Agua Destilada
- Magnesia
- Acido Sulfúrico al 10%
- Acido Sulfúrico al 1%
- Cloroformo
- Hidróxido de Potasio al 1%

7 MUESTREO

7.1 **Objetivo.** El objetivo de la toma de muestras es el de obtener una muestra cuya composición represente lo más fielmente posible a la del lote de entrega.

Dadas las múltiples circunstancias que suelen presentarse (lotes compuestos de diferentes proveedores, distintos tiempos de estacionamiento, técnica de mezclado, etc.), se recurre al buen criterio y experiencia del operador para lograr el principio fundamental del muestreo.

NP 35 001 93

8

7.2 Procedimiento en la toma de muestra. La técnica varía de acuerdo a las facilidades con que cuenta la planta procesadora y la modalidad de entrega del producto, distinguiéndose las siguientes:

7.2.1 Muestreo de yerba mate a granel con muestreador automático. La toma de muestras se hará con un muestreador automático instalado antes del envasado, de tal manera que permita una extracción al azar de acuerdo al programa elaborado según la Tabla 5 para formar el lote de ensayo.

Debe tenerse cuidado que la cantidad retirada por vez sea aproximadamente del mismo tamaño para formar la muestra de ensayo.

7.2.2 Muestreo por partidas homogéneas, sin muestreador automático. Por cada unidad de molienda se tomarán tantas muestras de aproximadamente 100 g hasta lograr una muestra de ensayo según la Tabla 5.

7.2.3 Muestreo por lotes (bolsas o paquetes de yerba mate). Las muestras se tomarán directamente de las bolsas o paquetes utilizando el calador para formar la muestra de ensayo conforme a la Tabla 5. Se debe tomar especial cuidado para que la cantidad extraída de cada envase sea en todos los casos aproximadamente la misma y el conjunto lo suficientemente grande para conformar el tamaño de la muestra de ensayo.

TABLA 5

Lote de entrega Kg		Número mínimo de tomas de muestras g
Hasta	2500	5
2501	5000	10
5001	10000	15
10001	15000	20
15001	25000	30
25001	40000	40
40001	65000	55
65001	160000	75
160001	400000	120
400000	1000000	200

8 METODOS DE ENSAYO

8.1 Ensayos Microbiológicos

8.1.1 Serie de diluciones

Pesar la muestra a analizar y agregar los mililitros de diluyente estéril (peptona al 0,1%) de tal modo a obtener una primera dilución al décimo. Es importante mantener la proporción 1/10 de la

NP 35 001 93

9

muestra con respecto al diluyente elegido. Macerar la mezcla en un Atomix Blender o en un Stomacher Colworth. Utilizando una pipeta estéril se transfiere 1 ml de la dilución 10^{-1} a una botella o tubo conteniendo 9 ml de diluyente estéril, esto nos proporciona una dilución de 10^{-2} . Repitiendo el proceso se preparan diluciones de 10^{-3} , 10^{-4} y 10^{-5} .

8.1.2 Enumeración de coliformes

8.1.2.1 Determinación del Número Más Probable (NMP)

- a. Preparar la muestra como se describe en el apartado 4.1 de Métodos de ensayo.
- b. Pipetear 1 ml de cada dilución decimal en una serie de 3 tubos de caldo MacConkey o caldo lactosado provistas de campanas de Durham, (10^{-1} , 10^{-2} y 10^{-3}).
- c. Incubar los tubos a $35^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 24 y 48 horas.
- d. Después de 24 horas registrar los tubos que muestran reacción positiva. Se considerará como reacción positiva la producción de gas y/o viraje del indicador. Los tubos negativos incubarlos en estufa por 24 horas más.
- e. Calcular en la tabla el NMP de organismos coliformes por gramo de muestra.
- f. Registrar el número de tubos que fueron confirmados como positivos para organismos coliformes.

8.1.2.2 Enumeración de coliformes a $44^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$

8.1.2.2.1 Determinación del Número Más Probable (NMP)

- a. Seleccionar los tubos de caldo lactosado o caldo MacConkey, que fueron positivos.
- b. Inocular con un asa de platino, tomando inóculo de cada uno de los cultivos positivos y transferir, a tubos de caldo bilis verde brillante al 2% provistos de campanas de Durham.
- c. Anotar lecturas tomadas de los tubos de caldo bilis verde brillante al 2% después de 24 y 48 horas de incubación a $44^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$.
- d. Calcular en la Tabla 6 el NMP de organismos coliformes a $44^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por gramo de muestra.

8.1.2.2.2 Determinación de *Escherichia coli*

- a. A partir de los tubos positivos por la técnica del NMP de coliformes a $44^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$ se realizarán cultivos en medios sólidos selectivos como el agar E.M.B. (colonias con brillo metálico) o agar MacConkey (colonias rojas/rosadas).

NP 35 001 93

10

- b. Incubar a $44^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 24 horas.
- c. Las colonias características se someterán a pruebas bioquímicas de confirmación.
- d. Se informará presencia o ausencia de *Escherichia coli*.

TABLA 6
TABLA PARA DETERMINAR EL N.M.P.

Número de tubos positivos		NMP		Límites de confianza			
10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	por g %	99 %		95 %	
0	1	0	3	1	23	1	17
1	0	0	4	1	28	1	21
1	0	1	7	1	35	2	27
1	1	0	7	1	36	2	28
1	2	0	11	2	44	4	35
2	0	0	9	1	50	2	38
2	0	1	14	3	62	5	48
2	1	0	15	3	65	5	50
2	1	1	20	5	77	8	61
2	2	0	21	5	80	8	63
3	0	0	23	4	177	7	129
3	0	1	40	10	230	10	180
3	1	0	40	10	290	20	210
3	1	1	70	20	370	20	280
3	2	0	90	20	520	30	390
3	2	1	150	30	660	50	510
3	2	2	210	50	820	80	640
3	3	0	200	100	1900	100	1400
3	3	1	500	100	3200	200	2400
3	3	2	1100	200	6400	300	4800
3	3	3	>1600				

NP 35 001 93

11

Datos calculados por de Man (1975, The probability of most probable numbers. Eur. J. Appl. Microbiol. 1:67).

8.1.3 Determinación de *Salmonelas*

8.1.3.1 Aislamiento de *Salmonelas*

Agregar 25 g de muestra a un recipiente de boca ancha de 500 ml el cual contenga 225 ml de agua de peptona buller (BPW). Mézclese en una batidora y homogeneizadora mecánica. Incube durante 18-24 horas a $35^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$.

8.1.3.2 Enriquecimiento selectivo de *Salmonelas*

- 1 Pipetear 1 ml del cultivo de preenriquecimiento en 10 ml de caldo selenito cistina. Incúbase a $35^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 24 horas.
- 2 Pasar 1 ml del cultivo de preenriquecimiento a 10 ml de caldo tetrationato verde brillante. Incúbase a $35^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 24 horas.

8.1.3.3 Siembra en placa en medios de agar selectivo para *Salmonelas*

- 1 Pasar un asa de 5 mm de cada uno de los dos medios de enriquecimiento selectivo a la superficie de una placa de cada uno de los tres medios de agar selectivo señalados a continuación y extender de tal manera que se obtengan colonias aisladas.
- 2 Incubar las placas de agar verde brillante durante 24 horas a $35-37^{\circ}\text{C}$. Las colonias típicas de *Salmonella* son incoloras, rosa o fucsia o traslúcidas a opacas, con el medio que las rodea de color rosa a rojo.
- 3 Incubar las placas de agar sulfito de bismuto a $35-37^{\circ}\text{C}$ durante 48 horas. Las colonias típicas de *Salmonella* en agar sulfito de bismuto aparecen marrones o grises a negro, a veces con un brillo metálico.
- 4 Incubar e interpretar las "placas del medio elegido por el laboratorio" según las indicaciones del fabricante.

8.1.3.4 Identificación de *Salmonelas*

- 1 Comprobación de las colonias sospechosas mediante pruebas bioquímicas determinativas.
- 2 Identificación serológica de las cepas sospechosas mediante el uso del antisuero polivalente.

NP 35 001 93

12

8.1.4 Análisis o recuento de hongos y levaduras

8.1.4.1 Conteo directo en placa

- a. Proceder como se mencionó en el Apartado 4.1 de Métodos de ensayo.
- b. Transferir 1 ml de cada dilución de la muestra homogeneizada a placas de Petri.
- c. Agregar a cada placa de petri el medio de cultivo apropiado, oxitetraciclina glucosa yeast extract agar u otros medios específicos para hongos y levaduras.
- d. Mezclar el contenido de las cajas moviéndolas y rotándolas.
- e. Incubar sin invertir las placas de Petri de 3 a 5 días de $22^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$. Al cabo de cierto tiempo contar las UFC de hongos y levaduras. Multiplicar el número de colonias por la dilución que corresponda, para obtener el número de UFC/g de muestra.

8.2 Ensayos Físico-Químicos

8.2.1 Preparación de la muestra. Tomar 2 Kg de yerba y proceder a mezclarla de tal modo a lograr la máxima homogeneización. Luego de cuarteada tomar 500 g y moler por molino eléctrico hasta obtener un polvo que pase por un tamiz de 600 μm que corresponde a un tamiz N° 30 según Norma ASTM.

8.2.2 Ensayos realizados. Los ensayos realizados para la comprobación de las especificaciones del producto son los siguientes:

-
- Determinación de humedad
 - Determinación de cenizas
 - Determinación de cenizas insolubles en ácido clorhídrico
 - Determinación de extracto acuoso
 - Determinación de cafeína
 - Determinación de porcentaje de palos
-

8.2.2.1 Determinación de humedad

8.2.2.1.1 Procedimiento. En una cápsula de aluminio con tapa o equivalente, previamente desecada y tarada, pesar al centigramo 3 alícuotas de 10 g de la muestra tal cual. Colocar en una estufa y dejar durante 4 horas a una temperatura de $105^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$. Retirar las cápsulas de la estufa, tapar, enfriar en el desecador durante 20 minutos y pesar al centigramo.

8.2.2.1.2 Cálculo. Calcular la pérdida por calentamiento aplicando la siguiente ecuación:

NP 35 001 93

13

$$C = \frac{G - G_1}{G} \times 100 \quad (1)$$

Donde:

C	=	Pérdida por calentamiento, en por ciento
G	=	Peso de la muestra, en gramos
G ₁	=	Peso de la muestra, luego del calentamiento, en gramos

8.2.2.1.3 La pérdida por calentamiento se informa como el promedio de las dos determinaciones efectuadas, siempre que las mismas no difieran en más de 0,2 en valor absoluto, en caso contrario, repetir la determinación sobre otras dos muestras.

8.2.2.2 Determinación de cenizas

8.2.2.2.1 **Procedimiento.** Pesar alrededor de 2 a 3 g de muestra en un crisol previamente tarado. Colocar el crisol sobre una plancha caliente y aumentar paulatinamente la temperatura hasta que no desprenda más humo. Introducir el crisol en la mufla, aumentar la temperatura paulatinamente hasta alcanzar los 500°C y mantener esta temperatura durante 2 horas. No se debe pasar los 500°C, para evitar decrepitaciones y volatilizaciones, ya que cuando existen cloruros en el producto a analizar, pueden afectar los resultados. Agregar unas gotas de ácido nítrico y llevar a la mufla a 500°C durante una hora. Si todavía persiste materia orgánica en la ceniza, enfriar el crisol dentro de un desecador, añadir unas gotas de agua destilada, romper con una varilla los cristales que pudieran haberse formado, llevar a sequedad en la plancha caliente y luego a mufla durante 1 a 2 horas a 500°C hasta alcanzar la calcinación total.

8.2.2.2.2 Cálculo y resultados

Resultado expresado sobre base seca (s/h/s)

$$\%(Cenizas) = \frac{G - G_1}{G_1} \times 100 \quad (2)$$

Resultado expresado tal como ofrecido (t/c/o)

$$\%(Cenizas) = \frac{G - G_1}{G_2} \times 100 \quad (3)$$

Donde:

G	=	Peso del crisol más las cenizas, en peso constante
G ₁	=	Peso del crisol vacío y calcinado
G ₂	=	Peso de la muestra empleada para la determinación

NP 35 001 93

14

8.2.2.3 Determinación de cenizas insolubles en ácido clorhídrico concentrado.

8.2.2.3.1 Procedimiento. Pesar 1,5 g de la muestra en un vaso de Berling, agregar 25 cc de ácido clorhídrico concentrado y llevar a ebullición durante media hora. Enfriar, agregar agua caliente y filtrar con papel de filtro cuantitativo. Lavar con agua caliente hasta eliminación total de los cloruros lo cual se comprueba agregando una gota de solución de nitrato de plata al 2% en el filtrado. Secar en estufa, colocar el papel de filtro en un crisol previamente tarado y calcinar sobre plancha caliente hasta que no desprenda más humo. Luego introducir en la mufla a 1000°C durante 30 minutos. Sacar, enfriar en un desecador y pesar. El resultado no debe ser superior a 1,0%.

8.2.2.3.2 Cálculo

$$X = \frac{100 \times Pc}{Pm} \quad (4)$$

Donde:

Pc = Peso de la ceniza
Pm = Peso de la muestra

8.2.2.4 Determinación del extracto acuoso

8.2.2.4.1 Procedimiento. Pesar 10 g de yerba, pasar a un balón de 500 ml, agregar 200 ml de agua destilada y hervir durante una hora. Luego de enfriarse, filtrar con lienzo, lavar varias veces hasta completar 500 ml y volver a filtrar con papel de filtro en una probeta. Tomar de este filtrado 50 ml y pasarlo a un cristalizador previamente secado en la estufa a 105°C y tarado. Llevar a evaporación total en baño maría y luego a la estufa a 105°C por espacio de 3 horas. Secar en un desecador, enfriar y pesar en una balanza analítica.

8.2.2.4.2 Cálculo

$$\% \text{ Extracto acuoso} = (A - B) \times 100 \quad (5)$$

Donde:

A = Peso del cristalizador con extracto acuoso
B = Peso del cristalizador vacío

8.2.2.5 Determinación de cafeína

8.2.2.5.1 Método A. Método de Bailey-Andrew (modificado).

8.2.2.5.1.1 Procedimiento. Pesar 10 g de yerba y 10 g de magnesio calcinado grado industrial. Pasar a un balón de 500 ml, agregar 200 ml de agua destilada y llevar a ebullición a reflujo durante 1 hora. Luego de enfriarse, filtrar con lienzo, lavar varias veces hasta completar 500 ml y volver a filtrar con papel de filtro en una probeta. Tomar de este filtrado 200 ml y pasarlo a un vaso de Berling, acidificar con 20 ml de ácido sulfúrico al 10% y concentrar hasta 100 ml. Enfriar y filtrar

NF 35 001 93

15

con papel de filtro cuantitativo en un embudo de separación de 100 ml. Lavar el filtrado con 50 ml de ácido sulfúrico al 1% y realizar la extracción de la cafeína con cloroformo, en 6 porciones de 25, 20, 15, 10, 10 y 10 ml sucesivamente. Pasar las porciones a otro embudo de separación de 250 ml, agregar 5 ml de hidróxido de potasio al 1%, agitar y luego de decantado pasar a un vaso de precipitado de 100 ml previamente secado en la estufa a 105°C y tarado. Llevar a evaporación total en baño maría y luego a la estufa a 105°C por espacio de media hora. Secar en desecador, enfriar y pesar en una balanza analítica.

8.2.2.5.1.2 Cálculo

$$\% \text{ cafeína} = (A - B) \times 25 \quad (6)$$

Donde:

- A = Peso del cristizador con cafeína
B = Peso del cristizador vacío

8.2.2.5.2 Método B. Método cromatográfico-espectrofotométrico.

8.2.2.5.2.1 Reactivos y aparatos

- Soluciones patrones de cafeína de 10, 20 y 30 mg de cafeína/ml. Pesar exactamente 100 mg de cafeína (USP anhidro) en un matraz aforado de 100 ml, disolver en éter (CHCl_3) y llevar a volumen con éter. Diluir una alícuota de 10 ml de esta solución a 100 ml con éter. Luego diluir alícuotas de 10, 20 y 15 ml a 100, 100 y 50 ml respectivamente, con éter para obtener soluciones patrones de 10, 20 y 30 mg/ml.
- Espectrofotómetro de barrido. Para barrer entre 350-250 nm, con cubetas de 1 cm contrastada.

8.2.2.5.2.2 Preparación de la muestra

Pesar alrededor de 1 g de muestra molida y transferir a un vaso de precipitado de 100 ml, agregar 5 ml de hidróxido de amonio (NH_4OH) 1:2 y calentarlo en un baño de agua hirviendo durante 2 minutos. Enfriar, transferir a un matraz aforado de 100 ml y llevar a volumen con agua. Agregar a una alícuota de 5 ml de solución turbia 6 g de celite 545 o equivalente y mezclar cuidadosamente.

8.2.2.5.2.3 Preparación de columnas

- Columna ácida. Colocar una pequeña cantidad de lana de vidrio en el fondo de un tubo cromatográfico de 25 x 250 mm. Agregar 3 ml de ácido sulfúrico 4N a 3 g de celite 545 o equivalente y mezclar bien con una espátula. Transferir al tubo y empacarlo utilizando una suave presión hasta obtener una masa uniforme. Colocar una pequeña cantidad de lana de vidrio sobre la superficie del relleno.
- Columna básica. Capa I - Mezclar 3 g de celite 545 o equivalente y 2 ml de hidróxido de sodio 2N y colocar en un tubo cromatográfico de 25 x 250 mm sobre una pequeña cantidad de lana de vidrio como en (a). Capa II - Transferir la

NP 35 001 93

16

mezcla de muestra más celite que se obtuvo en (a) en porciones de aproximadamente 2 g al tubo directamente sobre la capa I, apisonando antes de agregar la siguiente porción de muestra, hasta obtener una capa compacta y homogénea. Enjuagar el vaso de precipitado de la mezcla con aproximadamente con 1 g de celite 545 o equivalente, transferir totalmente la misma al tubo y apisonar bien hasta obtener una masa uniforme. Limpiar el vaso de precipitado con una pequeña cantidad de lana de vidrio y colocar la misma sobre la parte superior de la columna básica.

8.2.2.5.2.4 Determinación

Montar la columna básica sobre la columna ácida. Pasar 150 ml de éter saturado con agua sucesivamente a través de la columna básica y la ácida desechando el éter. Luego pasar 50 ml de éter saturado con agua a través de la columna básica desechando el éter. Colocar un matraz aforado de 50 ml debajo de la columna ácida y pasar 48 ml de éter saturado con agua a través de la columna ácida, lavando la punta de la columna básica con las primeras porciones. Llevar a volumen los contenidos del matraz aforado con éter saturado con agua, mezclar y leer la absorbancia a 276 nm, contra éter saturado con agua como blanco, por barrido desde 350 a 250 nm.

Determinar las absorbancias de los patrones y calcular las concentraciones a 276 nm conforme al espectrofotómetro utilizado. Calcular el contenido de cafeína de las muestras a partir del promedio de las concentraciones.

8.2.2.5.3 Método C. Cromatografía Líquida de Alta Eficacia.

8.2.2.5.3.1 Equipos

a. Extracción

Equipos y elementos de vidrio de laboratorio incluyendo baño maría, bomba de vacío, molino, tubo cromatográfico con rodinete de teflón de aproximadamente 20 cm de largo por 2,5-2 cm de diámetro y un frasco de filtración de 250 ml.

b. Purificación de la muestra

Membrana de filtración tipo Milipore de 0,45 µm, jeringa de vidrio de 5-10 ml con punta Luer y tubos de micro ensayo.

c. Cromatografía

El sistema cromatográfico consiste básicamente en una bomba de alta presión, un sistema de filtración de solvente tipo Milipore con membrana de filtración de 0,45 µm para solvente orgánico o acuoso, un inyector tipo Rheodyne con loop (espiral) de 20 ml, una guarda columna de acero inoxidable de 40 mm x 4,6 mm con relleno pelicular de fase reversa C18, columna analítica de acero inoxidable de 150 mm x 3,9 mm tipo Novapak C18 de Waters o equivalente, un detector UV visible que permita una lectura de 270-280 nm, un procesador de datos (como mínimo registrador-integrador) y un baño ultrasónico.

NP 35 001 93

17

8.2.2.5.3.2 Reactivos

Todos los reactivos deben ser de grado analítico, salvo indicación contraria.

a. Extracción

- Oxido de Magnesio (grado industrial)
- Silica gel tipo Dicalite o equivalente para cromatografía en columna.

b. Cromatografía

Patrones: Cafeína, teobromina, teofilina (grado HPLC).

El agua debe ser destilada y desionizada, como mínimo en destilador de vidrio.

c. Solución Madre de Patrones

Preparar la solución madre de cafeína, teobromina y teofilina disolviendo 50 mg de cada uno en aproximadamente 50 ml de agua tibia, enfriar a temperatura ambiente, agregar 2 ml de propano-2-ol y llevar a volumen con agua en un matraz aforado de 100 ml.

Esta solución puede conservarse en heladera hasta 1 mes.

d. Solución de Trabajo de Patrones (10 ug ml^{-1})

Preparar la solución diluyendo 2 ml de la solución madre con agua en un matraz de 100 ml.

Esta solución puede conservarse en heladera hasta una semana.

e. Fase móvil

Metanol:agua:ácido acético glacial (20:79:1)

8.2.2.5.3.3 Técnica

a. Preparación de la muestra

Moler la muestra en un molino hasta obtener un polvo que pase a través de un tamiz de 18 mallas.

b. Extracción

Pesar 3 g de la muestra preparada dentro de un vaso de precipitado de 50 ml.

Agregar aproximadamente 5 g de óxido de magnesio y 15-20 ml de agua destilada caliente.

Calentar en un baño de agua caliente durante 30 minutos, agitando de tanto en tanto.

Montar la columna sobre el embudo de filtración de 250 ml, conectar el tubo lateral del frasco de filtración a una bomba de vacío a través de una trampa intermedia. Colocar una pequeña cantidad de algodón en el fondo del tubo suficiente para soportar el relleno de la columna.

Preparar una columna bien apisonada con 5 g de partes iguales de óxido de magnesio y silica gel mojando con agua en un vaso de precipitado de 200 ml y transferir el preparado a un embudo de filtración aplicando un ligero vacío. Evitar que la columna se seque dejando 5-10 ml de agua por encima del lecho de la columna. Desechar el líquido eluido en el embudo de Buchner.

NP 35 001 93

15

Transferir el contenido caliente del vaso de precipitado a la columna con agua caliente a no menos de 90°C, y continuar lavando bajo presión reducida con más agua caliente hasta obtener aproximadamente 150 ml de eluido.

Enfriar y transferir a un matraz aforado de 200 ml y completar el volumen con agua (solución A). Diluir 25 ml de solución A y llevar a 100 ml con agua (solución B).

c. Purificación del Extracto

Tomar con la jeringa aproximadamente 2 ml del extracto diluido (solución B). Luego, con la punta Luer conteniendo la membrana de filtración de 0,45 mm, filtrar presionando suavemente a través de la membrana en un microtubo de ensayo.

d. Desgasificación

Desgasificar el sistema de solvente para el cromatógrafo, filtrando a través del sistema de filtración al vacío, agitando constantemente. Si se dispone de un baño ultrasónico desgasificar durante 5 minutos junto con las muestras.

e. Cromatografía Líquida de Alta Eficacia

Utilizar una fase móvil metanol:agua:ácido acético glacial (20:79:1) y una velocidad de flujo de 1,5 ml min⁻¹. Fijar la longitud de onda del detector en 276 nm.

Injectar aproximadamente 20 µl tanto de las muestras como de las soluciones mezclas a través de la espira de inyección.

La cuantificación se llevó a cabo por comparación de las áreas de los picos de las muestras con las de los patrones.

8.2.2.6 Determinación de porcentaje de palos

8.2.2.6.1 Procedimiento. Pesar 50 g de yerba y pasar sucesivamente por tamices de 2,36 mm que corresponde a un tamiz N° 8 según norma ASTM y tamiz de 850 µm que corresponde a un tamiz N° 20 según norma ASTM. Luego separar los palillos de los peciolos y pedúnculos florales, pesar los palos y multiplicar por dos.

9 ENVASADO Y ALMACENAMIENTO

9.1 Envasado. La yerba mate deberá envasarse en sacos nuevos, sin roturas, de un material adecuado, cerrado de tal forma que garantice la conservación de las características del producto.

9.2 Almacenamiento. Se debe contar con locales con capacidad suficiente para el almacenamiento de la materia prima y depósito de los productos elaborados, deberán estar bien ventilados y secos, tener pisos impermeables, los molinos, zarandas y depósitos para las mezclas de yerba tendrán dispositivos protectores para evitar la dispersión de polvos.

NP 35 001 93

10 MARCADO Y ROTULADO

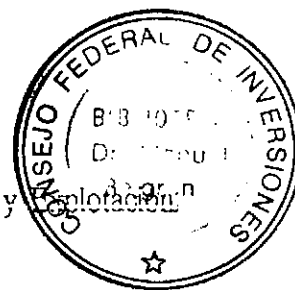
La yerba consignada en envases deberá identificarse mediante una etiqueta que contenga en forma clara y legible la siguiente información:

- Denominación de venta del producto.
- Nombre o marca comercial del producto.
- Nombre y Dirección del fabricante o fraccionador.
- Código de fabricación, N° de lote.
- Peso neto en Kg.
- Instrucciones de almacenamiento, preparación y uso del producto.
- La leyenda "Industria Paraguaya", o lugar de origen.
- Número o registro sanitario de la entidad competente.
- Fecha de envasado.

11 REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

Para la elaboración de la presente norma se tuvo en cuenta la bibliografía siguiente:

- Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists (A.O.A.C.). 1994.
- Código Latinoamericano de Alimentos. 2da Edición.
- Código Alimentario Argentino Actualizado. Tomo I-b 1994.
- Normas Sanitarias Bromatológicas del M.S.P Y B.S. 1987.
- Enciclopedia Agropecuaria Argentina - Yerba Mate. Su cultivo y explotación. Alberto Carlos Mancuello Ing. Agr.
- Yerba Mate - Ka... (text obscured by barcode)
- Microbiología de los Alimentos y sus Procesos de Elaboración. John T. Nickerson - Anthony J. Sinskey 1978.
- Microorganismos de los Alimentos. Técnicas de Análisis Microbiológico. Volumen 1. 2da Edición. International Specifications for Foods of the International Association of Microbiological Societies (I.C.M.S.F.).



NP 35 001 93

20

- Composición y Calidad de la Yerba Mate Paraguaya (Ilex Paraguariensis S.H.).
Rafael Vera García y Delina O. de Franco. Publicación Técnica del Instituto
Nacional de Tecnología y Normalización. 1989.

**Diário Oficial**

REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL

QUINTA-FEIRA, 26 DE MARÇO DE 1998

MINISTÉRIO DA SAÚDE**SECRETARIA DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA****PORTARIA Nº 233, DE 25 DE MARÇO DE 1998**

A Secretária de Vigilância Sanitária, do Ministério da Saúde, no uso de suas atribuições legais, resolve:

Art. 1º Aprovar o Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade para Composto de Erva-Mate constante do Anexo desta Portaria.

Art. 2º As empresas têm o prazo de 120 (cento e vinte) dias, a contar da data de publicação deste Regulamento para se adequarem ao mesmo.

Art. 3º O descumprimento aos termos desta Portaria constituem infração sanitária, sujeitando os infratores às penalidades da Lei nº 6.437, de 20 de agosto de 1977, e demais disposições aplicáveis.

Art. 4º Esta Portaria entra em vigor na data de sua publicação, revogadas as disposições em contrário.

MARTA NOBREGA MARTINEZ**ANEXO****Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade para COMPOSTO DE ERVA-MATE.****1. ÂMBITO DE APLICAÇÃO**

O presente Regulamento se aplica aos produtos classificados no item 5, que devem ser consumidos na forma tradicional da Erva-Mate, em suas alternativas quente ou frio, conforme previsto na legislação específica em vigor.

2. DEFINIÇÃO

Composto de Erva-Mate: é o produto constituído pela erva-mate processada conforme padrões estabelecidos em legislação específica em vigor, acrescida de outros produtos classificados no item 5.

Chimarrão: é a bebida preparada com erva-mate para consumo com água quente.

Erva-Mate: é o produto constituído exclusivamente pelas folhas e ramos, das variedades de *Ilex paraguariensis*, na forma inteira ou moída obtidos através de tecnologia apropriada.

Esgotado: é a retirada parcial ou total dos princípios ativos da erva-mate por qualquer processo tecnológico.

Tererê: é a bebida preparada com erva-mate para consumo com água fria.

3. REFERÊNCIAS

- Decreto - Lei n.º 986, de 21 de outubro de 1969.
- Resolução n.º 36/93 - Regulamento Técnico Mercosul para Rotulagem de Alimentos Embalados.
- Portaria SVS n.º 451, de 19 de setembro de 1997 - Ministério da Saúde.
- Portaria SVS n.º 550, de 31 de outubro de 1997 - Plantas destinadas a preparação de infusões e decocções (chás).
- Portaria SVS n.º 554, de 3 de novembro de 1997 - Uso de aditivos em chás.

- Portaria SVS n.º 540, de 27 de outubro de 1997 - Aditivos Alimentares.
- Portaria SVS n.º 1428, de 26 de novembro de 1993 - Regulamento Técnico para Estabelecimento de Identidade e Qualidade.
- Portaria n.º 118 - N de 12 de novembro de 1992 do IBAMA.
- Portaria SVS n.º 645, de 16 de dezembro de 1997 - Aditivos Aromatizantes/Saborizantes - Ministério da Saúde.
- Código de Defesa do Consumidor - Lei n.º 8.078, de 11 de setembro de 1990.
- Decreto Federal n.º 1.602, de 23 de agosto de 1990.
- Lei n.º 8.137 de 27 de dezembro de 1990.
- Norma Técnica Higiénico - Sanitária para Erva-Mate - Secretaria de Estado da Saúde - Instituto de Saúde do Paraná - 1993.
- Proposta de Norma Técnica para Erva-Mate - Secretaria de Saúde do Paraná - 1995
- Erva-Mate: Situação Sanitária No Paraná - Secretaria de Estado da Saúde do Paraná - 1997.
- Avaliação das Características Físico-Químicas e Microscópicas de Mate Queimado Comercializado no Município de São Paulo - Instituto Adolfo Lutz.
- Métodos de Microscopia de erva Mate do Instituto Adolfo Lutz.
- GONZAGA, (et al) Erva-Mate da Região Sul/Brasil - I - Aspectos Físico-Químicos e Embalagens - Universidade Federal de Santa Catarina - Centro de Ciências Agrárias - Departamento de Ciências e Tecnologia de Alimentos - Laboratório de Bromatologia.
- GONZAGA, (et al) Erva-Mate da Região Sul/Brasil Aspectos Microbiológicos, Universidade Federal de Santa Catarina - Centro de Ciências Agrárias - Departamento de Ciências e Tecnologia de Alimentos-Laboratório de Bromatologia.
- MAZZAFERA, P. Caffeine, Theobromine And Theophylline Distribution In Ilex paraguariensis - Rev Bras. Fisiol. Veg., 6 (2) : 149 - 151, 1994.
- Proposta de Portaria Técnico-Normativa Referente aos Produtos Compostos à Base de Erva-Mate - Câmara Setorial da erva-mate do Estado do Rio Grande do Sul - 1997
- Estudo da Associação Riograndense da Indústria do Mate (ARIM) para Produtos de Erva Mate com açúcar e/ou Composta - 1996
- Proposta de Portaria Técnico-Normativa Referente aos Produtos Compostos à Base de Erva-Mate - Comissão Nacional para Assuntos de Erva-Mate - PR/SC/RS - 1997.

4. DESIGNAÇÃO

O produto será designado COMPOSTO DE ERVA-MATE, seguido de sua composição e substâncias que o caracterize, conforme classificado no item 5 deste regulamento.

5. CLASSIFICAÇÃO

5.1. Erva-Mate adicionada de espécie(s) vegetal(ais): é o produto composto por no mínimo 90% (p/p) da erva-mate padronizada a ser usada adicionada de no máximo 10% (p/p) de uma ou mais espécies vegetais constantes do item 5.1.1.. O produto será designado "COMPOSTO DE ERVA-MATE COM...", seguido do(s) nome(s) da(s) espécie(s) vegetal(ais) que compõe(m) a mistura, em ordem decrescente das quantidades.

5.1.1. Espécies vegetais que podem ser utilizadas no Composto da Erva-Mate:

Ananas sativus Schult - Abacaxi (fruto)

Carica papaya L. - Papaya (fruto)

Cymbopogon citratus Stapf - Erva Cidreira/Capim Santo/Capim Limão/Chá de Estradada (folhas)

Foeniculum vulgare L. - Funcho/Erva-Doce Nacional (fruto)

Fragaria vesca L. - Morango (folhas e frutos)

Matricaria chamomilla L. - Camomila (capitulos florais)

Melissa officinalis L. - Melissa/Erva Cidreira (folhas)

Mentha arvensis L. - Hortelã/Menta (folhas e talos)

Mentha piperita L. - Hortelã/Menta (folhas e talos)

Passiflora sp - Maracujá (fruto)

Pimpinella anisum L. - Erva-Doce/Anis (fruto)

Prunus armeniaca L. - Apricot (fruto)

Prunus persica Stokes - Pêssego (fruto)

Prunus serotina Ehrl - Cereja (fruto)

Pyrus malus L. - Maçã (fruto)

Ribes nigrum L. - Groselha (fruto)

Ribes sp - Cassis (fruto)

Rosa canina L. - Rosa (fruto e flor)

Rubus idaeus L. - Framboesa (fruto)

Rubus sp - Amora (fruto)

Tamarindus indica L. - Tamarindo (fruto)

Vaccinium myrtillus L. - Mirtilo (fruto)

Stevia rebaudiana Bert - Stevia (folha)

Citrus aurantium L. var amara - Laranja Amarga (casca do fruto, folhas e flores)

Citrus limonum Risso - Limão (casca do fruto e flores)

Citrus sinensis Osbeck - Laranja doce (casca do fruto, folhas e flores)

Jasmin officinale L. - Jasmim (flor)

Vanilla aromatica Sw. - Baunilha (fruto)

Especiarias

5.1.2. A adição de outra(s) espécie(s) vegetal(ais) isolada(s) ou combinada(s) não prevista no item 5.1.1., poderá ser utilizada desde que apresente(m) a avaliação do risco à saúde do consumidor.

5.1.3. Será permitida a adição de especiaria(s) desde que o somatório das mesmas não ultrapasse o limite máximo de 0,5% do composto de Erva-Mate. Acima deste limite deverá ser apresentada a avaliação do risco à saúde do consumidor.

5.2. Erva-Mate adicionada de aroma(s) natural(ais) é o produto composto pela erva-mate padronizada a ser usada, adicionada de um ou mais aromas naturais em quantidades suficientes para obter o efeito desejado (q.s.p), conforme previsto em legislação específica em vigor. O produto será designado "COMPOSTO DE

ERVA-MATE COM..."

5.3. Erva-Mate adicionada de espécie(s) vegetal(ais) e aroma(s) natural(ais): é o produto composto por no mínimo 90% (p/p) da erva-mate padronizada e adicionada de no máximo 10% (p/p) de uma ou mais espécies vegetais de acordo com o item 5.1.1. e adicionada de um ou mais aromas naturais de acordo com o item 5.2.. O produto será designado "COMPOSTO DE ERVA-MATE" seguido das demais denominações que o compõem, obedecendo a sequência "COM...SABOR DE...". Quando o(s) aroma(s) natural(ais) for(em) idêntico(s) à(s) espécie(s) vegetal(ais) adicionadas será designado "COMPOSTO DE ERVA-MATE COM..."

6. CARACTERÍSTICAS DE COMPOSIÇÃO E QUALIDADE PARA COMPOSTO DE ERVA-MATE

6.1. Características Gerais

O Composto de Erva-Mate, a que se refere este Regulamento Técnico, é constituído de erva-mate padronizada, adicionada de espécie(s) vegetal(s) e/ou aroma(s) natural(ais) previamente autorizados pelo Ministério da Saúde.

Os produtos resultantes das associações acima referidas, não poderão ser artificialmente coloridos, esgotados no todo ou em parte, alterados ou adicionados de substâncias não previstas nesta Portaria.

6.2. Características sensoriais

Aspecto	próprio da mistura
Cor	próprio da mistura
Odor	próprio da mistura
Sabor	próprio da mistura

6.3. Características físico-químicas

Umidade	máximo 10g/100g
Resíduo mineral fixo	máximo 7g/100g
Resíduo mineral fixo insolúvel em solução de ácido clorídrico a 10%v/v	máximo 1,0g/100g
Extrato aquoso	mínimo 25g/100g
Cafeína	mínimo 0,45g/100g

6.4. Características microbiológicas

Atender legislação específica em vigor, sendo que:

6.4.1. Para o produto ser consumido com água quente, características microbiológicas são as definidas para produtos a serem consumidos após a adição de líquido com emprego do calor.

6.4.2. Para o produto ser consumido com água fria, as características microbiológicas são as definidas para produtos a serem consumidos após a adição de líquido sem emprego do calor

6.5. Características microscópicas

Fragmentos de insetos próprios da cultura	máximo 10 fragmentos/10g
Fragmentos de outros insetos	ausência em 10g
Insetos e ácaros inteiros, vivos ou mortos	ausência em 200g
Excrementos de animais	ausência em 10 g
Pêlos de animais	ausência em 10g
Elementos histológicos estranhos	ausência em 5g
Sujidades pesadas	máximo 150 mg/10g
Cristais de açúcar e de similares	ausência em 10g

7. ADITIVOS INTENCIONAIS, INGREDIENTES E COADJUVANTES DE TECNOLOGIA

É permitida a adição de aromas naturais e espécies vegetais, conforme item 5. Não será permitida a adição de outros aditivos intencionais, ingredientes e coadjuvantes de tecnologia no composto de Erva-Mate.

8. CONTAMINANTES

Os contaminantes orgânicos e inorgânicos não devem estar presentes em quantidades superiores aos limites estabelecidos pela legislação específica em vigor.

9. HIGIENE

O Composto de Erva-Mate deverá ser produzido, manipulado, processado, acondicionado, armazenado, conservado e transportado conforme Regulamento Técnico sobre as Condições Higiénico-Sanitárias e de Boas Práticas de Fabricação.

10. ACONDICIONAMENTO

O Composto de Erva-Mate deverá ser acondicionado em embalagens adequadas para as condições previstas de transporte, armazenamento e comercialização conferindo ao produto a devida proteção. Fica proibida a exposição à venda e a comercialização ao consumidor final do produto a granel.

11. PESOS E MEDIDAS

Atender legislação específica em vigor.

12. ROTULAGEM

Atender legislação específica em vigor, devendo constar ainda:

12.1. No painel frontal: A referência à padronização da erva-mate utilizada e a declaração do percentual mínimo de folhas e percentual máximo de outras partes do ramo.

12.1.1. Deve constar o(s) nome(s) científico(s) e popular(s) da(s) espécie(s).

12.1.2. Deve constar em destaque, de forma clara e legível, a instrução da forma de preparo.

12.2. Não poderá ser empregada para o Composto de Erva-Mate a mesma cor predominante utilizada nas embalagens para Chimarrão e Tererê, quando mantida a mesma marca.

12.3. Não será permitido o uso de expressões bem como desenhos e símbolos que induzam o consumidor de forma direta ou indireta a identificá-lo como Erva-Mate para Chimarrão ou Tererê.

12.4. Não será permitida qualquer informação que atribua indicações medicamentosas e/ou terapêuticas, de forma direta ou indireta.

13. AMOSTRAGEM E MÉTODOS DE ANÁLISE

A avaliação da identidade e qualidade deverá ser realizada de acordo com os planos de amostragem e métodos de análise adotados e/ou recomendados pela Association of Official Analytical Chemists (AOAC), pela Organização Internacional de Normalização (ISO), pelo Instituto Adolfo Lutz, pelo Food Chemicals Codex, pela American Public Health Association (APHA), pelo Bacteriological Analytical Manual (BAM) e pela Comissão do Codex Alimentarius e seus comitês específicos, até que venham a ser aprovados planos de amostragem e métodos de análises pelo Ministério da Saúde.

**Diário Oficial**

REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL

QUINTA-FEIRA, 26 DE MARÇO DE 1998

MINISTÉRIO DA SAÚDE**SECRETARIA DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA****PORTARIA Nº 234, DE 25 DE MARÇO DE 1998**

A Secretária de Vigilância Sanitária, do Ministério da Saúde, no uso de suas atribuições legais, resolve:

Art. 1º Aprovar o Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade para Erva-Mate constante do Anexo desta Portaria.

Art. 2º As empresas têm o prazo de 120 (cento e vinte) dias, a contar da data de publicação deste Regulamento para se adequarem ao mesmo.

Art. 3º O descumprimento aos termos desta Portaria constitui infração sanitária, sujeitando os infratores às penalidades da Lei nº 6.437, de 20 de agosto de 1977, e demais disposições aplicáveis.

Art. 4º Esta Portaria entra em vigor na data de sua publicação, revogadas as disposições em contrário em especial à Portaria nº 363, de 23 de julho de 1996, publicada no Diário Oficial da União de 24 de julho de 1996.

MARTA NOBREGA MARTINEZ**ANEXO****Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade para ERVA-MATE.****1. ÂMBITO DE APLICAÇÃO**

O presente Regulamento se aplica aos produtos classificados no item 5.

2. DEFINIÇÃO

Cancheamento: é a operação que consiste na fragmentação da erva-mate seca.

Chimarrão: é a bebida preparada com erva-mate para consumo com água quente.

Erva-Mate: é o produto constituído exclusivamente pelas folhas e ramos, das variedades de *Ilex paraguariensis*, na forma inteira ou moída obtidos através de tecnologia apropriada.

Erva-Mate Bruta Verde: quando "in natura" constituída por folhas e ramos, obtidos pela poda da erva.

Erva-Mate Cancheada não padronizada: quando a erva-mate bruta é submetida ao processo de sapeco, secagem, malhação, trituração e/ou cancheamento, a qual constitui matéria-prima para chimarrão e tererê.

Erva-Mate Cancheada padronizada: quando a erva-mate cancheada não padronizada é submetida ao processo de peneiramento separando as folhas, no todo ou em partes, de outras partes do ramo determinando o percentual de palitos, a qual constitui matéria-prima para chimarrão e tererê.

Folha(s): é a parte da planta de erva-mate formada pelo limbo e pecíolo, que após o processo industrial resulta em fragmentos, goma e pó.

Ramos: cada uma das divisões e subdivisões do galho.

Esgotamento: é a retirada parcial ou total dos princípios ativos da erva-mate por qualquer processo tecnológico.

Sapeco: é o ato de submeter a erva-mate recém podada (folhas e ramos) à ação das chamas de uma fogueira, ou outro processo tecnológico adequado, com a finalidade de eliminar o excesso de umidade (pré-desidratação) e evitar o enegrecimento das folhas.

Secagem: é o ato de desidratar a folha da erva-mate, efetuada logo após o sapeco.

Tererê: é a bebida preparada com erva-mate para consumo com água fria.

3. REFERÊNCIAS

- Decreto - Lei n.º 986, de 21/10/69.
- Resolução n.º 36/93 - Regulamento Técnico Mercosul para Rotulagem de Alimentos Embalados.
- Portaria SVS n.º 451 de 19/09/97 - Ministério da Saúde.
- Portaria n.º 118 - N.º de 12/11/92 do IBAMA.
- Código de Defesa do Consumidor - Lei n.º 8.078 de 11/09/90.
- Decreto Federal n.º 1.602 de 23/08/90.
- Lei n.º 8.137 de 27/12/90.
- Norma Técnica Higienico - Sanitária para a Erva-Mate - Secretaria de Estado da Saúde - Instituto de Saúde do Paraná - 1993.
- PROPOSTA DE NORMA TÉCNICA PARA ERVA-MATE - Secretaria de Saúde do Paraná - 1995
- ERVA-MATE: SITUAÇÃO SANITÁRIA NO PARANÁ - Secretaria de Estado da Saúde do Paraná - 1997.
- AVALIAÇÃO DAS CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS E MICROSCÓPICAS DE MATE QUEIMADO COMERCIALIZADO NO MUNICÍPIO DE SÃO PAULO - Instituto Adolfo Lutz.
- Métodos de Microscopia de erva Mate do Instituto Adolfo Lutz.
- GONZAGA, (et al) ERVA-MATE da Região Sul/Brasil - I - Aspectos Físico-Químicos e embalagens - Universidade Federal de Santa Catarina - Centro de Ciências Agrárias - Departamento de Ciências e Tecnologia de Alimentos - Laboratório de Bromatologia.
- GONZAGA, (et al) ERVA-MATE da Região Sul/Brasil Aspectos Microbiológicos, Universidade Federal de Santa Catarina - Centro de Ciências Agrárias - Departamento de Ciências e Tecnologia de Alimentos-Laboratório de Bromatologia.
- MAZZAFERA, P. Caffeine, THEobromine and THEophylline distribution in Ilex paraguariensis - Rev Bras. Fisiol. Veg., 6 (2) : 149 - 151, 1994.
- Decreto 315/994. Apruébase e Reglamento Bromatológico Nacional - Republica Oriental del Uruguay - 4/07/94.
- Diário Oficial de La Republica de Chile - 13/05/97 - páginas 17 e 28.
- Lebensmittel - Recht - Walter Zippel - Verlag C. H. Beck - 372. Diretrizes para Chá, Produtos Similares ao Chá, Extratos e Preparação - Alemanha - 1989.
- FOOD DEFECT ACTION LEVELS - Department of Health and Human Services, Public Health Service - 1995.
- CODIGO ALIMENTARIO ARGENTINO, CAPÍTULO XV - artigo 1181 - pag. 392.

4. DESIGNAÇÃO

O produto será designado Erva-Mate ou Mate, seguido de sua classificação.

5. CLASSIFICAÇÃO

A Erva-Mate quanto a sua forma de apresentação, tecnologia de obtenção e forma de preparo será classificada em:

5.1. Chimarrão: quando a erva-mate cancheada, padronizada ou não, é moída e preparada para consumo com água quente.

5.2. Tererê: quando a erva-mate cancheada, padronizada ou não, é moída e preparada para consumo com água fria.

6. PADRONIZAÇÃO

6.1. A erva-mate chimarrão, quanto à porcentagem de folhas, será padronizada em:

6.1.1. Padrão Nacional 1 (PN-1), quando no processamento a erva-mate é passada na peneira de malha de 10mm, resultando no mínimo em 70% de folhas e no máximo em 30% de outras partes do ramo.

6.1.2. Padrão Nacional 2 (PN-2), quando no processamento a erva-mate é passada na peneira de malha de 10mm, resultando no mínimo em 60% de folhas e no máximo em 40% de outras partes do ramo.

6.1.3. Padrão Nacional 3 (PN-3), quando no processamento a erva-mate é passada na peneira de malha de 10mm, resultando no mínimo em 50% de folhas e no máximo em 50% de outras partes do ramo.

6.2. A erva-mate tererê, quanto à porcentagem de folhas, será padronizada em:

6.2.1. Padrão Nacional Tererê 1 (PNT-1), quando no processamento a folha da erva-mate é passada na peneira de malha de 10mm, e as outras partes do ramo passadas na peneira de malha de 12, 5 mm, resultando no mínimo em 70% de folhas e no máximo em 30% de outras partes do ramo.

6.2.2. Padrão Nacional Tererê 2 (PNT-2), quando no processamento a folha da erva-mate é passada na peneira de malha de 10mm, e as outras partes do ramo passadas na peneira de malha de 12, 5 mm, resultando no mínimo em 60% de folhas e no máximo em 40% de outras partes do ramo.

6.2.3. Padrão Nacional Tererê 3 (PNT-3), quando no processamento a folha da erva-mate é passada na peneira de malha de 10mm, e as outras partes do ramo passadas na peneira de malha de 12, 5 mm, resultando no mínimo em 50% de folhas e no máximo em 50% de outras partes do ramo.

7. CARACTERÍSTICAS DE COMPOSIÇÃO E QUALIDADE PARA ERVA-MATE CANCHEADA, CHIMARRÃO E TERERÊ

7.1. Características gerais

A erva-mate é constituída pelas folhas e outras partes do ramo, adequadamente dessecados, ligeiramente tostados ou não, partidos ou moídos. A erva-mate não pode ser artificialmente colorida, esgotada no todo ou em parte, alterada, adicionada de ingredientes e misturada com outros vegetais.

7.2. Características sensoriais

Aspecto: folhas e outras partes do ramo fragmentadas e secas.

Cor: de verde e seus matizes à amarelo pardo

Odor: próprio

Sabor: próprio

7.3. Características físico-químicas

Umidade	máximo 10g/100g
Resíduo mineral fixo	máximo 7g/100g
Resíduo mineral fixo insolúvel	
em solução de ácido clorídrico a 10%v/v	máximo 1,0g/100g
Extrato aquoso	mínimo 25g/100g

Cafeína

mínimo 0,5g/100g

7.4. Características microbiológicas

Atender legislação específica em vigor.

7.4.1. Para Chimarrão utilizar-se-á as características microbiológicas definidas para produtos a serem consumidos após o emprego do calor

7.4.2. Para Tererê utilizar-se-á as características microbiológicas definidas para produtos a serem consumidos sem emprego do calor

7.5. Características microscópicas

Fragmentos de insetos próprios da cultura	máximo 10 fragmentos/10g
Fragmentos de outros insetos	ausência em 10g
Insetos e ácaros inteiros, vivos ou mortos	ausência em 200g
Excrementos de animais	ausência em 10g
Pêlos de animais	ausência em 10g
Elementos histológicos estranhos	ausência em 5g
Sujidades pesadas	máximo 150 mg/10g
Cristais de açúcar e de similares	ausência em 10g

8. ADITIVOS INTENCIONAIS, INGREDIENTES E COADJUVANTES DE TECNOLOGIA

Não será permitido o uso de aditivos intencionais; ingredientes e coadjuvantes de tecnologia no produto Erva-Mate.

9. CONTAMINANTES

Os contaminantes orgânicos e inorgânicos não devem estar presentes em quantidades superiores aos limites estabelecidos pela legislação específica em vigor.

10. HIGIENE

A erva-mate deverá ser produzida, manipulada, processada, acondicionada, armazenada, conservada e transportada conforme as Boas Práticas de Fabricação, atendendo a legislação específica em vigor.

11. ACONDICIONAMENTO

O produto deverá ser acondicionado em embalagens adequadas para as condições previstas de transporte, armazenamento e comercialização conferindo ao produto a proteção adequada. Fica proibida a exposição à venda e a comercialização do produto a granel ao consumo consumido

12. PESOS E MEDIDAS

Atender legislação específica em vigor.

13. ROTULAGEM

Atender Legislação específica em vigor, devendo ainda constar, obrigatoriamente:

13.1. No painel frontal:

O Padrão Nacional e a declaração do percentual mínimo de folhas e percentual máximo de outras partes do ramo.

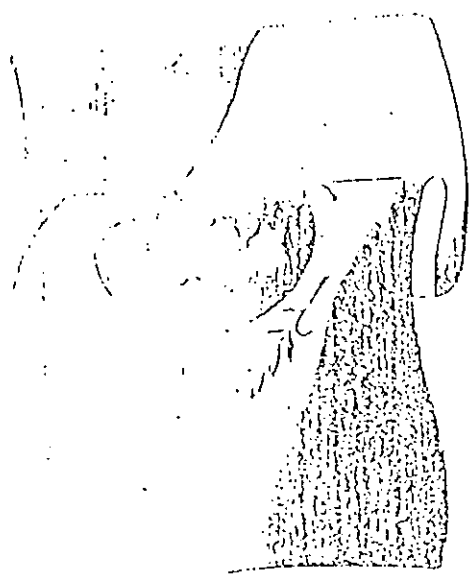
13.2. Deve constar em destaque, de forma clara e legível as instruções da forma de preparo.

13.3. Não será permitida qualquer informação que atribua indicações medicamentosas e/ou terapêuticas, de forma direta ou indireta.

14. AMOSTRAGEM E MÉTODOS DE ANÁLISE

A avaliação da identidade e qualidade deverá ser realizada de acordo com os planos de amostragem e métodos de análise adotados e/ou recomendados pela Association of Official Analytical Chemists (AOAC), pela Organização Internacional de Normalização (ISO), pelo Instituto Adolfo Lutz, pelo Food Chemicals Codex, pela American Public Health Association (APHA), pelo Bacteriological Analytical Manual (BAM) e pela Comissão do Codex Alimentarius e seus comitês específicos, até que venham a ser aprovados planos de amostragem e métodos de análises pelo Ministério da Saúde.

GOVERNO DO PARANÁ
SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE
INSTITUTO DE SAÚDE DO PARANÁ



NORMA TÉCNICA
HIGIÊNICO-SANITÁRIA
PARA A ERVA-MATE

1993

MESSAGEN AOS ERVA-MATEIROS

Desde a sua criação em 1988, a Associação dos Produtores e Industriais de Erva-Mate do Paraná - APIMATE vem lutando pela união dos produtores, visando a organização, produção e comercialização da erva-mate em bases de melhoria da produtividade e qualidade.

A implementação das Normas Técnicas Higiênico-Sanitárias de Erva-Mate pela Secretaria da Saúde do Paraná constitui na intervenção do Estado para estabelecer padrões mínimos de qualidade, aliado à eliminação de alterações no produto.

A APIMATE apoia essa medida patrocinando a publicação deste documento, visando a divulgação junto aos produtores, industriais e consumidores de erva-mate, além de recomendar sua aplicação junto aos países integrantes do MERCOSUL, bem como, junto aos novos mercados.

Almejamos que a busca da qualidade constitua na garantia de todos os setores da sociedade para o consumo da erva-mate, integrando produtores, industriais e consumidores, além do sucesso econômico no empreendimento.

ASSOCIAÇÃO DOS PRODUTORES E
INDUSTRIAIS DE ERVA-MATE DO
PARANÁ

NOVA GRÁFICA - 111 23 0510

== CARACTERÍSTICAS FÍSICAS E QUÍMICAS

- | | |
|---|----------|
| - Umidade, máximo, | 10% p/p |
| - Resíduo mineral fixo, máximo | 7% p/p |
| - Resíduo mineral fixo em solução de Ácido Clorídrico a 10% v/v, máximo | 0 p/p |
| - Extrato aquoso, mínimo | 25% p/p |
| - Cálcio, mínimo | 0,7% p/p |

1 - CARACTERÍSTICAS MICROBIOLÓGICAS

23:10 of 23:10

3 - CHARACTERISTICS MICROSCOPIC:

American Psychological Association

References

O rótulo deve fazer a denominação "Erva-Mate" ou "Mate", seguida da classificação.

44 BOLETIM Nº. 01/87 DO MINISTÉRIO DA SAÚDE

Estabelece os padrões microbiológicos para os produtos expostos à venda ou de alguma forma destinados ao consumo para as classes de alimentos.

Aerva-matei llex Paraguensis enquadrada-se na classe de alimentos do Anexo I, alínea "a" (produtos a serem consumidos após a adição de líquido com adição de calor - chá, café, mate e produtos de infusão).

Nesse sentido, os padrões microbiológicos estabelecidos na classe de alimentos X são:

දික්කරුවන්: අප්‍රේල් 25 ද.

Califormes Fecalis: 10/10/10

50.0 (deg e Love) 5 x 10⁻² / g
 50.0 (deg e Love) 5 x 10⁻² / g
 50.0 (deg e Love) 5 x 10⁻² / g

4.5. PORTARIA Nº. 118-N DE 12/11/92 DO IBAMA

O presidente substituído do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente dos Recursos Naturais Renováveis - IBAMA, no uso das atribuições previstas nos artigos 24, da Estrutura Regimental, anexa ao Decreto No. 76, de 5 de abril de 1991, e 83, Inciso XIV, do Regimento Interno do IBAMA, aprovado pela Portaria Ministerial No. 445, de 15 de agosto de 1989, e o disposto no Art. 12, da Lei 4771, de 15 de setembro de 1965, que instituiu o novo Código Florestal

RECEIVED

Art. 1º. - As pessoas físicas ou jurídicas envolvidas na exploração, beneficiamento e/ou comercialização de energia elétrica paraguaienses estão sujeitas ao que dispõe esta PORTARIA NORMATIVA, sem prejuízo de outras exigências legais.

Art. 2º. - A exploração da enzima deve ocorrer à adoção de técnicas de conservação e manejo, destinadas a maximizar a produção da massa total e a minimizar a ocorrência de O prováveis danos aos ervais, visando comercializar o rendimento sustentado com a preservação da espécie.

Parágrafo Único - O IBAMA poderá alterar, restringir ou suspender a exploração da que trata o caput deste artigo, caso verifique a ocorrência de danos ambientais.

Art. 30. - A comercialização de eventuais quotas semiparticipativas ou beneficiárias obedece os usos e costumes de Classificação de Produtos da Associação Nacional de Comércio Atacadista.

Paragaito Primeiro - A comunidade de Quilmea o

[illegible]

Art. 40. - As despesas relativas às atividades envolvidas no beneficiamento, armazenamento, comercialização, distribuição, manutenção dos circuitos, ocorrência de seus registros no IBAMA, foram consignadas à conta do IBAMA, atualmente, até o dia 15 de fevereiro, informações sobre consumo e produção, através de formulário específico e à disposição nas unidades do IBAMA.

Art. 5º. - Para fins de conversão, o volume de consumo de energia elétrica bruta verde destinado à produção do produto beneficiado entender-se-á para os efeitos contidos no Tabela de Conversão constante do Anexo 2.

Parágrafo Primeiro - Os parâmetros de que trata o caput deste Artigo tem caráter elucidativo, covendo a relação real entre o produto bruto e o beneficiado ser ajustada de acordo com o processo industrial de cada empresa, bem como pelas variações decorrentes da época da colheita e época dos envios.

Parágrafo Segundo - Admitir-se-á uma queda de até 5% no valor da avaliação para envia-mate bruta para envia-mate bruto (cinco por cento) no processo de conversão do envia-mate bruto para envia-mate líquido.

Art. 6º. - Cabe ao IBAMA exercer o controle e a fiscalização do disposto nesta PORTARIA NORMATIVA, isoladamente ou em conjunção com outras instituições, se for o caso.

Art. 70. - O não cumprimento das normas estabelecidas nesta PORTARIA NORMATIVA sujeitará os infratores às sanções previstas na legislação vigente.

Art. 5º. - Obedecidas as competências regimentais, os casos omissos serão resolvidos pela superintendência do IBAMA, onde houver ocorrência, e, em caso contrário, pelos demais Superintendentes do IBAMA e outras Instituições deventuamente envolvidas, bem como a Diretoria de Recursos Naturais Renováveis - DIREN/IBAMA, por o caso.

Parágrafo Único - Da ocasião tomada para o conhecimento às superintendências e à REN:

Art. 90. - Fica lizençado para integrante deste PORTAL

Art. 100. - Esta PORTARIA NORMATIVA entra em vigor na data de sua publicação, revogando-se os Ato(s) 100/F de No. 001/85 de 24 de janeiro de 1955, No. 002/85 de 13 de maio de 1986 e o Ato No. 003/85 de 15 de agosto de 1.986, assim como as demais disposições em contrário.

ANEXO IV



Acta de Intención

El Laboratorio de Micotoxinas del Centro de Investigación y Desarrollo Tecnológico (CIDET) dependiente de la Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales de la Universidad Nacional de Misiones por una parte; y por la otra La Cachuera S.A. con domicilio en la Avda. Rademacher N° 2653 de la localidad de Posadas en la provincia de Misiones establecen la siguiente Acta de Intención.

I. El Establecimiento La Cachuera S.A. permitirá la toma de muestras analíticas de yerba de sus establecimientos, en la etapa de yerba mate canchada, a los integrantes del Laboratorio ya mencionado.

II. El Establecimiento La Cachuera S.A. autoriza al Director del Laboratorio de Micotoxinas de la Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales de la Universidad Nacional de Misiones hacer uso de los resultados obtenidos del estudio de la Flora Fúngica Contaminante en Yerba Mate realizado en el marco del convenio con la Facultad.

III. A las muestras se le realizarán estudios microbiológicos (micológico y bacteriológico); con el fin de determinar los valores máximos de carga microbiana; en el marco del convenio entre la Subsecretaría de Comercio Exterior (*Programa Eco-Mate: Reconocimiento de Calidad*).

IV. Los resultados obtenidos de estas muestras más las de otros establecimientos, permitirán escribir la primera Norma de Aptitud Microbiológica de aplicación en el ámbito del Mercosur.

V. A los efectos de publicaciones científicas relacionadas con el presente estudio, las muestras se denominarán "*materia prima obtenida de la zona*". La inclusión de la procedencia específica de las muestras estará sujeta a la autorización por escrito del Establecimiento "La Cachuera S.A."

Rubrican el presente Acta de Intención

I Laboratorio de Micotoxinas

Lic. Raúl S. Marucci,
Director del Laboratorio

Establecimiento La Cachuera S.A

Juan A. Szychowski
Presidente

Posadas 21 de Junio de 1999



Acta de Intención

El Laboratorio de Micotoxinas del Centro de Investigación y Desarrollo Tecnológico (CIDET) dependiente de la Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales de la Universidad Nacional de Misiones por una parte; y por la otra la Cooperativa Agrícola Mixta de Montecarlo Limitada con domicilio en la Avda. El Libertador N° 2713 de la localidad de Montecarlo en la provincia de Misiones, establecen la siguiente Acta de Intención.

I. La Cooperativa Agrícola Mixta Montecarlo Limitada permitirá la toma de muestras analíticas de yerba de su establecimiento, en la etapa de yerba mate canchada, a los integrantes del Laboratorio ya mencionado.

II. A las muestras se le realizarán estudios microbiológicos (micológico y bacteriológico); con el fin de determinar los valores máximos de carga microbiana, en el marco del convenio con la Subsecretaría de Comercio Exterior (*Programa Eco-Mate: Reconocimiento de Calidad*).

III. Los resultados obtenidos de estas muestras más las de otros establecimientos, permitirán escribir la primera Norma de Aptitud Microbiológica de aplicación en el ámbito del Mercosur.

IV. A los efectos de publicaciones científicas relacionadas con el presente estudio, las muestras se denominarán "*materia prima obtenida de la zona*". La inclusión de la procedencia específica de las muestras estará sujeta a la autorización por escrito de la Cooperativa Agrícola Mixta de Montecarlo Limitada.

Rubrican el presente Acta de Intención

Por el Laboratorio de Micotoxinas

por la Cooperativa Agrícola Mixta
de Montecarlo Limitada

Lic. Raúl S. Marucci,
Director del Laboratorio

Sr. Carlos Beilharz
Gerente

Posadas, 15 de Junio 1999



Acta de Intención

El Laboratorio de Micotoxinas del Centro de Investigación y Desarrollo Tecnológico (CIDET) dependiente de la Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales de la Universidad Nacional de Misiones por una parte; y por la otra Productores de Yerba Mate de Santo Pipó S.C.L. con domicilio en la Avda. San Martín s/n de la localidad de Santo Pipó en la provincia de Misiones, establecen la siguiente Acta de Intención.

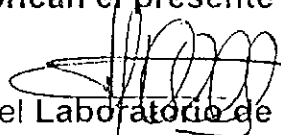
I. Productores de Yerba Mate de Santo Pipó S.C.L. permitirá la toma de muestras analíticas de yerba de sus establecimientos, en la etapa de yerba mate canchada estacionada, a los integrantes del Laboratorio ya mencionado.

II. A las muestras se le realizarán estudios microbiológicos (micológico y bacteriológico); con el fin de determinar los valores máximos de carga microbiana, en el marco del convenio con Subsecretaría de Comercio Exterior (*Programa Eco-Mate: Reconocimiento de Calidad*).

III. Los resultados obtenidos de estas muestras más las de otros establecimientos, permitirán escribir la primera Norma de Aptitud Microbiológica de aplicación en el ámbito del Mercosur.

IV. A los efectos de publicaciones científicas relacionadas con el presente estudio, las muestras se denominarán "*materia prima obtenida de la zona*". La inclusión de la procedencia específica de las muestras estará sujeta a la autorización por escrito del establecimiento Productores de Yerba Mate de Santo Pipó S.C.L.

Rubrican el presente Acta de Intención


por el Laboratorio de Micotoxinas
Lic. Raúl S. Marucci,

Director del Laboratorio

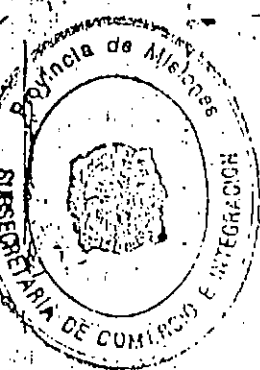
por Prod. De Yerba Mate de S. Pipó
Sr. Otto Ricardo Hamann


Presidente

ANEXO V

ANALES DEL MUSEO NACIONAL DE BUENOS AIRES.

Tomo XVII (Ser. B^a, t. X), p. 111 a 141.



BOTANICA, Public. No. 35

HONGOS

DE LA

YERBA MATE

FOR

CARLOS SPEGAZZINI.

BUENOS AIRES.

IMPRESA DE JUAN A. ALSINA, CALLE MEXICO, 1422.

1908.

(Apareció el 15 de Junio.)

ESTACION EXPERIMENTAL AGROPECUARIA	
BIBLIOTECA	
CERRO AZUL	(MISIONES)
TOPOGRAFICO:	
INVENTARIO:	



HONGOS DE LA YERBA MATE

por

CARLOS SPEGAZZINI.

En el mes de Enero de 1907 llevé á cabo, por orden del Ministerio de Agricultura, una visita á los Yerbales del Territorio Nacional de Misiones, al fin de estudiar su estado, sus condiciones de explotación y su porvenir. Como resultado parcial de mis investigaciones, tengo el agrado de publicar este corto capítulo sobre nosología del *Ilex paraguayensis*, haciéndolo seguir por la citación y descripción de todos los hongos que he tenido la suerte de hallar sobre esta especie de planta.

Los yerbales de Misiones se hallan en un estado de decaimiento muy marcado y en vía de una próxima desaparición si no se toman medidas severas para evitar la destrucción total de esta preciosa planta. La explotación constante oficial y clandestina en regiones donde la autoridad y la tutela del gobierno son un mito, hace que estas plantas, al poco tiempo de ser descubiertas, quedan mondadas, podadas, voltendas y por fin, cortados los retoños á medida que nacen de las cepas ó raigones. Las plantas, por lo tanto, una vez descubiertas, quedan totalmente inhabilitadas para multiplicarse ó reproducirse. Los pocos palos que milagrosamente se salvan del volteo quedan tan mal trechos por la vandálica brutalidad de los explotadores, especialmente clandestinos, que mueren con mayor ó menor rapidez.

Además de las persecuciones del hombre, las plantas de yerba están sujetas á una infinidad de afecciones de origen diferente, de las cuales hallo anotadas en mis libretas de viaje las que voy á indicar.

Entre las enfermedades debidas á causas físicas, observé las siguientes:

- 1.º *Quemadura de helada*, observada principalmente en el yerbal de Zamboni, en Santa Ana; las ramas perdían el brote terminal secándose de 3 á 5 cm en su parte tierna y jugosa.

- (2.º) *Quemadura de sol*, observada en la estancia Arrechen, sobre el Yabebuiry, donde se había desmontado un terreno, salvando tan sólo unos cuantos pies de yerba; estos individuos presentaban en las partes dirigidas al Noroeste las ramitas jóvenes y tiernas y sus hojas emnegrecidas y secas; las demás partes del vegetal se mantenían vivas pero habían tomado un color amarillento y la consistencia del pergamino.
- 3.º *Derriumbé*, observado en el yerbal de San Antonio, donde se había raleado el monte tal vez para preparar algún rogado; el viento había volteado la mayoría de los palos de yerba que habíanse dejado en pie.

Entre las enfermedades debidas á causas zoogénicas, me limitaré á enumerar las que siguen:

- 1.º *Ampollas*, que se observan en las hojas nuevas de los retoños, las cuales quedan dobladas sobre sí mismas formando en su parte superior como una vejiga coriácea; en esta vejiga anidan numerosos pequeños hemípteros pertenecientes al género *Pemphigus*. Es una enfermedad muy común y que echa á perder muchas hojas. Según datos que tengo, es también muy perjudicial en los yerbales cultivados.
- 2.º *Stigmonosis*, que se manifiesta en la cara superior con manchitas amarillas y en la inferior con manchas amarillas y puntitos negruzcos; es debido á la larva de pequeños hemípteros, especialmente *Cicadelideos*.
- 3.º *Empiojamiento*, debido á varias especies de hemípteros como *Aleurodes*, *Lecanium*, *Ceroplastes*, etc., son frecuentes pero no muy dañosos.
- 4.º *Taladrillo*, que se observa en los retoños jóvenes, los cuales crecen muy derechos, se engrosan y vuelven carnosos tomando un color más ó menos oscuro mientras sus hojas permanecen por lo general pequeñas; partiendo longitudinalmente la rama, se observa que la medula está totalmente devorada y en la cavidad se halla una larva que parece ser de un díptero.
- 5.º *Apolillamiento*, que se observa por lo general en los troncos adultos, cuya parte leñosa queda en su mayoría comida y pulverizada; esta enfermedad es debida especialmente á la acción de los termitos truncicolos.
- 6.º *Taladros*, que también se observa en los troncos viejos, manifestándose por gruesas galerías debidas á la larva de varios coleópteros especialmente longicórneos. (*Clytus guyanensis* Gr.).

Por último, recordaré los efectos destructores de la langosta, la cual, privando al árbol de hojas y cáscaras en la estación del verano, produce la muerte de cierto número de jóvenes.

Las enfermedades fitogénicas de mayor importancia que merecen ser citadas, son las siguientes:

- 1.º *Hollin*, muy común en todas partes, pero observado en mucha mayor cantidad en Matto Queimado, es debido á *Meliolas*, *Asterinas*, etc. Parece que sea poco dañoso y relativamente poco propagado, debiéndose este hecho á la poda constante que sufren las plantas y que impida el desarrollo demasiado abundante del hongo.
- 2.º *Viruela blanca*, que es ocasionada por el *Colletotrichum yerbae*. Es bastante común pero, relativamente escasa por la misma causa de las podas constantes.
- 3.º *Sarampión*, causada por la *Peckia mate* Spg. que aparece bajo la forma de una enorme cantidad de puntitos casi invisibles, especialmente en la cara inferior de las hojas, las cuales se acortachan secándose.
- 4.º *Gangrena seca*, por la cual las ramas y los troncos se secan parcialmente y la cáscara se hiende y arruga longitudinalmente, las heridas se cubren al poco tiempo de una gran cantidad de pequeños honguitos rojos que pertenecen al género *Stilbum* á los cuales más tarde sucede la *Megalonectria* como estado ascóforo.
- 5.º *Gangrena húmeda de las raíces*, que se manifiesta con una clorosis general de la planta, pobreza de hojas, ramas cortas, delgadas, raquílicas, ennegrecidas ó secas hacia las extremidades; estudiando los individuos enfermos se nota que sus raíces se hallan cubiertas por un ozonio grisáceo estuposo y del cual en algunos casos se levanta un enorme número de pequeños hongos (*Psathyrella disseminata* Prs).

3. *Psathyrella disseminata* Pers.

Hab. Ad radices languidas truncorum secus rivulum *Matto Queimado*, Febr.

4. *Corticium incarnatum* (Pers.) Fr.

Hab. Ad ramos emortuos in dumetis prope *San Pedro*, Febr.

Obs. Basidia omnia et semper sterigmatibus 2 ornata et sporae quam in typo nonnihil minores ($5-7 \mu = 3 \mu$) naviculares utrinque obtusiusculae ac minute uniguttulae hyalinae.

5. *Cyphella albo-violascens* (A. & S.) Karst.

Hab. Inter muscos ad ramos emortuos putrescentes, *Matto Queimado*, Febr.

6. *Solenia villosa* Fr. var. *subochracea* Speg.

Hab. Ad ramos emortuos putrescentes in silvis circa *San Pedro*, Febr.

Obs. Cupulae subcylindraceae confertae minutae albescentes puberulae, pilis mollibus cylindraccis ($30-40 \mu = 4-5 \mu$) simplicibus 2-3-septatis laevibus subhyalinis; basidia clavulata ($20 \mu = 5 \mu$) sterigmate unico tenui elongatulo ($10 \mu = 1 \mu$) monosporo coronata; sporae ex elliptico subovatae utrinque obtusiusculae ($6 \mu = 3-4 \mu$) laeves grosse 1-guttulae e hyalino subchlorinae.

Varietas eximia inter *S. villosam* Fr. et *S. ochraceum* Hoff. media.

7. *Odontia cristulata* Fr. var. *tropicalis* Speg.

Hab. Ad ramulos decorticatos putridos in dumetis circa *San Pedro*, Febr.

Obs. Haec varietas a typo recedit tenuitate, verrucis minoribus ambituque anguste albescente.

8. *Dimerosporium tropicale* Speg.

Hab. Frequens ad subiculum *Meliolae yerbae* ubique, Febr. et Martio.

Obs. Perithecia globosa (120μ diam.) astoma globosa; asci obclavatulati ($40-50 \mu = 8 \mu$) octospori paraphysati; sporae e cylindraceo subclavulatae ($10-12 \mu = 2,5-3 \mu$) 1-septatae non v. vix constrictae hyalinae.

9. *Meliola yerbae* Speg. (n. sp.)

Diag. *Amphigena*; *plagulae* suborbiculares tenues arcte adnatae ambitu effuso-eranescentes atrae glabrae, hyphopodiis clavulato-obpyriformibus nodulosis alternis; perithecia hypothallo scutiformi insidentia, hyphis paucis uncinulatis cincta; sporae 1-septatae rectae mediocres fuligineae.

FUNGI

IN

ILICE PARAGUARIENSI

VIGENTES

AUCTORE

CAROLO SPEGAZZINI.

1. *Volvaria ilicicola* Speg. (n. sp.)

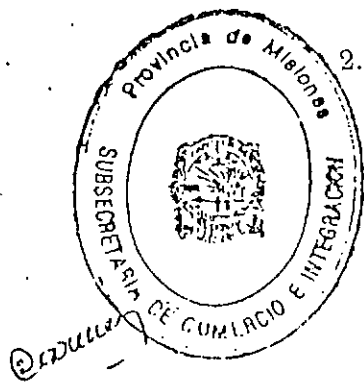
Diag. *Majuscula caespitosa; volva maxima tessellato-marmorata, pileo hemisphaerico-campanulato citrine villosa, lamellis primo candidis dein roseis amplis tenuibus confertis a stipite remotis, stipite subbrevis farto candido exannulato.*

Hab. Ad truncos cariosos adhuc erectos in silvis, Cerro de los Tigres, Martio.

Obs. Species eximia 2-3-caespitosa, basi connato-confluens, primo e globoso obpyriformis candida dein, volva disrupta, exerta. Volva membranaceo-carnosula ampla candida, superne late rotundata reticulato-rimosa, masculis (5-8 mm diam.) subhexagonis centro fusco-maculatis, per aetatem irregulariter rimoso-fissa (60-70 mm alt. = 45-55 mm diam.), inferne subattenuata pallide sordideque fuscescens; pilous initio subglobosus dein hemisphaerico-campanulatus (70-100 mm diam.), non umbonatus dense adpresseque villosa-subsquamosus albus, sed villosa citrino centro pallidiori ambitu floccoso-fimbriato vestitus. Caro alba tenuis rigidula immutabilis subexueta in pileo et stipite continua. Lamellae confertae latae (35-40 mm long. = 10-14 mm lat.) polymacrae utrinque rotundatae a stipite remotae a pileo facile secedentes, acio integrae. Stipes clavulatus subteres pro ratione breviusculus (70-90 mm long. = 7-9 mm crass. apic. = 15-20 mm crass. bas.) rigidus candidus laevis. Odor funginus gratus, sapor leniter acer. Sporae amissae.

2. *Hypholoma appendiculatum* Bull.

Hab. Ad truncos putrescentes in silvis circa Campo Grande, Martio.

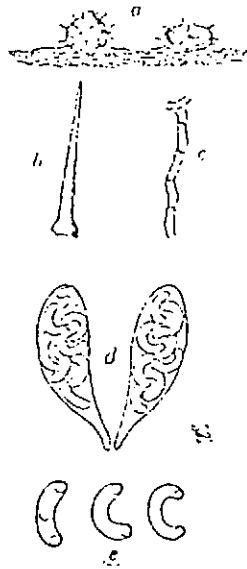


Hab. Vulgata ad folia viva, ubique.

Obs. Plagulae saepius epiphyllae dendritice rugulosae (4-8 mm diam.) ex hyphis dense alternè ramosis cylindraccis (5-6 μ) fuliginèis crebre septulatis laevibus v. rugulosis, hyphopodiis alternis antrorsum incurvato-adpressis 2-3-cellularibus grosse 1-guttulatis (25-30 μ = 15-16 μ) ornatis efformatae; perithecia centro plagularum laxè 3-8-gregaria, uda globosa (200 μ diam.) in sicco collabescentia ac caducissima, glabra minute denseque verruculosa, astoma; hypothalla peritheciolorum microthyriacea (120 μ diam.) ex hyphis confluentibus adnatisque constituta centro umbonata, circa umbonem setulis patentiusculis arcuato-adscendentibus apice obtusulis subuncinato-incurvulis (75-100 μ = 5-6 μ) opace fuliginèis simplicibus ornata; asci mox diffluentes elliptici brevissime pedicellati (50-60 μ = 35-40 μ) aparthysati bispori v. trispori; sporae rectae e latere non v. vix compressulae (40-50 μ = 16-22 μ) utrinque obtuse rotundatae ad septa leniter constrictae, loculis subopace fuliginèis grosse 1-guttulatis.

Acanthonitschkea Speg. (nov. gen.)

Char. *Perithecia* superficialia setulosa; *asci* aparthysati octospori; *sporae* botuliformes hyalinae.



10. *Acanthonitschkea argentinensis* Speg. (n. sp.)

Diag. *Perithecia* line inde caespitosa in sicco collabescentia nigra, setulis brevibus laevibus ornata; *ascis* clavulatis; *sporis* valde incurvatis utrinque minute guttulis.

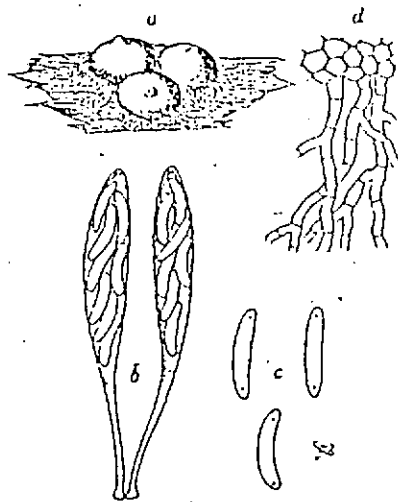
Hab. Ad ramos emortuos subputrescentes in *Campo das Cuias*, Febr.

Obs. Perithecia cortice insidentia sparsa v. saepius 3-20 constipata, e nigro subglaucescentia, uda globosa (200-250 μ diam.) minuto ostiolato-papillulata, in sicco cupulato-collabescentia, basi hyphis paucis radiantibus septulatis olivaceis (100 μ = 6-7 μ) caeterum setulis erectis rigidulis acutis opacis (50-200 μ = 10 μ) adspersa, coriaccio-membranacea, contextu indistincto opaco nigro; asci clavulati breviter attenuato-pedicellati (p. sp. 20 μ = 10 μ); sporae cylindraceae utrinque obtusae (6-8 μ = 2 μ) saepius hippocrepicae.

11. *Enclinoa yerbae* Speg. (n. sp.)

Diag. Perithecia hinc inde dense gregaria, subiculo atro abscondita, serius demodata ac grosse ostiolato-perforata; asci clavati longiuscule pedicellati aparthysati octospori; sporae cylindraceae subrectae hyalinae.

Hab. Ad ramos decorticatos putrescentes mucidos secus rivulum *Matto Queimado*, Febr.



Obs. Perithecia dense constipata e lenticulari hemisphaerica (150-180 μ diam.) subiculo pannoso ex hyphis flexuosis septulatis (50-150 μ = 5 μ) olivaceis vestita, primo minute papillulato-ostiolata dein, ostiolo deciduo, late perforata, atra subcarbonacea, contextu parenchymatico saepius indistincto; asci clavulati (long. tot. 100-110 μ = p. sp. 50-60 μ = 10 μ)

antico subacutiusculo rotundati, postice sensim attenuato-pedicellati; sporae e subnaviculari cylindraceae leniter inaequilaterales utrinque acutiusculo obtusatae ($16-18 \mu = 4-5,5 \mu$) ad minuto uni-guttulatae hyalinae.

12. *Valsa yerbae* Speg. (n. sp.)

Diag. *Euvalsa*; acervulis cortice innatis, peritheciis paucis, ostiolis conniventibus vix exertis, stromate nigro; ascis aparaphysatis clavulatis pedicello mox fluxili suffultis octosporis; sporis botuliformibus minutis subhyalinis.

Hab. Sat frequens ad ramulos emortuos, ubique.

Obs. Acervuli sparsi v. laxo gregarii, cortice innati, vix lenticulares, prominuli, centro nodulo nigro ostiolorum epidermidem perforante coronati; stroma lenticulare ($0,75-1,50$ mm diam.) atrum subcarbonaceum; perithecia 3-7 in quoquo stromate globosa ($350-400 \mu$ diam.) membranacea olivacea, ostiolis carbonaceis conniventibus laevibus breviusculis ornata; asci valde numerosi clavulati (p. sp. $12-15 \mu = 3-4 \mu$) pedicello longiore ($20-25 \mu$ long.) mox fatiscente primo suffulti octospori; sporae conglobatae cylindraceae ($3-4 \mu = 1 \mu$) utrinque obtusae ac minute uniguttulatae o hyalino subchlorinae.

13. *Endoxyla yerbae* Speg. (n. sp.)

Diag. *Perithecia* sparsa, ligno denudato immersa, stromate heterogeneo extus fuscescente, intus albescente linea nigra tenui limitato, cincta, ostiolo brevissimo vix manifesto coronata; asci aparaphysati, pedicello mox diffuente, octospori; sporae minutae botuliformes hyalinae.

Hab. Ad ramos emortuos decorticatos in silvis circa San Pedro, Febr.

Obs. Stroma matricem late ambiens extus sordido fuscescens parum manifestum intus linea sinuosa vaga fusca determinatum; perithecia omnino immersa globosa ($300-600 \mu$ diam.) tenui membranacea fusca, contextu minutissimo parum manifesto donata, ostiolo pusillo cylindraceo carbonaceo superficiem matricis vix attingente coronata; asci numerosi constipati antico clavulati ($14-16 \mu = 3-4 \mu$), pedicello duplo longiore mox fatiscente suffulti, octospori, paraphysibus destituti; sporae cylindraceae leniter curvulae utrinque obtusae ($4-5 \mu = 1 \mu$) atque minuto 1-guttulatae hyalinae.

14. *Eutypa ludibunda* Sacc.

Hab. Vulgata ad ramos emortuos subputrescentes, ubique.

Obs. Asci aparaphysati (100-120 μ long. tot.), parte sporifera subfusoides v. clavulata (35-50 μ = 3-5 μ); spores botuliformes leniter curvulae utrinque obtusiusculae (7-12 μ = 1,5-2,75 μ) ac minutissime uniguttulatae hyalinae.

15. *Diatrypella missionum* Speg. (n. sp.)

Diag. Stromata cortice innata erumpenti-prominula verruculosa nigra; perithecia constipata globosa, brevissime crasseque ostiolata; asci fusoides-clavulati antice acuti postice breviter pedicellati aparaphysati; spores conglobatae cylindraceae minutae chlorinulae.

Hab. Ad ramulos emortuos adhuc pendulos in silvis Campo das Cuías, Febr.

Obs. Stromata irregulariter ellipsoidea (4-5 mm long. = 2-3 mm lat. = 1,5 alt.), primo epidermide velata, dein nuda, carbonacea, intus extusque nigra; perithecia monosticha stromate omnino immersa, ostiolo ruguloso vix prominulo armata, membranacea, extus griseo-furfuracea, globosa (350-400 μ diam.); asci aparaphysati polyspori, parte sporifera fusoides (80-100 μ = 10-12 μ), pedicello dimidio breviori suffulta; spores tenues leniter curvulae utrinque obtusiusculae (4-8 μ = 1 μ) atque minute uniguttulatae.

Species *D. verruciformi* (Ehrh.) Nitz affinis sed ascis fusoides apice acutis breviter pedicellatis sporisque tenuioribus sat distincta.

16. *Cryptosphaerella mate* Speg. (n. sp.)

Diag. Stromata ligno denudato vix infuscato prominula; perithecia minuta stromate hinc inde gregaria vix papillulato-ostiolata; asci aparaphysati clavati longe pedicellati; spores conglobatae e cylindraceo naviculares mediocres chlorinae.

Hab. ad ramos aridos subputrescentes decorticatosque in dumetis prope San Pedro, Febr.

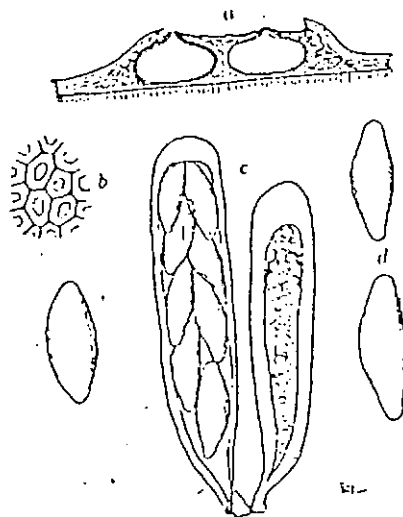
Obs. Stromata irregulariter linearia, longitudinalia, vix prominula, parum manifesta, colliculosa, extus sordido palléscentia intus ligno dealbato, linea fuscidula limitato, constituta; perithecia constipata v. laxa monosticha, stromate tota immersa nec extus manifesta, globosa (125-350 μ diam.), ostiolo superficiem stromatis vix attingente carbonaceo coronata; asci, in parte sporifera (75-80 μ = 12 μ) clavulato-fusoides, 32-48-spori, stipite longiusculo (75-100 μ long.) fulti, aparaphysati; spores leniter curvulae utrinque obtusiusculae (8-16 μ = 3 μ) atque minute 1-guttulatae chlorinae.

17. *Hypoxyton rubiginosum* (Pers.) Fr. var. *microcarpa* Speg.
Hab. Ad ramos dejectos subputrescentes in silvis circa San Pedro, Febr.

Obs. Specimina inventa habita externo eximie cum typo conveniunt sed peritheciis dense constipatis ac conspicue minoribus (100-110 μ diam.) recedunt; asci cylindracei antice rotundati postice breviuscule cuneato-pedicellati (75-100 μ = 8 μ) aparaphysati; sporae ellipticae vix inaequilaterales (10 μ = 6 μ) grosse biguttulatae pallido fuliginiae.

Phaeobotryosphaeria Speg. (n. gen.)

Char. Stromata et perithecia ut in *Botryosphaeria*; sporae rhomboideo-ellipticae continuae fuliginiae.



18. *Phaeobotryosphaeria yerbae* Speg. (n. sp.)

Diag. Perithecia sparsa gregaria v. stromatice consociata, lenticularia, papillato-ostiolata, coriacea atra albo-farcta; asci clavati crassissime tunicati aparaphysati; sporae distichae majusculae laeves.

Hab. Vulgata ad ramulos emortuos, ubique.

Obs. Perithecia cortico innata epidermide velata quandoque sparsa v. plus minusve laxe gregaria, quandoque in stromate varie evoluto consociata, parva (200 μ diam.) carnosulo-coriacea, contextu parum distincto grosse parenchymatico fuligineo donata, ostiolo carbonaceo minute papillulato coronata; asci clavati antice obtuse rotundati crassissime tunicati

postice breviter noduloseque pedicellati, paraphysibus nullis v. pseudoparaphysibus paucis obvallati ($150-180 \mu = 30-35 \mu$); sporae ellipticae v. saepius subrhomboideo-naviculares utrinque obtusiusculae ($30-40 \mu = 14-24 \mu$) eguttulatae, opaco fuligineae nudae.

19. *Apiospora yerbae* Speg. (n. sp.)

Diag. *Corticola, subepidermica, laxe gregaria, peritheciis minutis subcarbonaceis, ascis cylindraccis breviter pedicellatis aparaphysatis, sporis ovatis cauda triplo minore appendiculatis hyalinis.*

Hab. Ad ramulos languidos v. emortuos in silvis circa San Pedro, Febr.

Obs. Perithecia epidermide velata lenticulari-hemisphaerica (150μ diam.) glabra, ostiolo minuto carbonaceo coronata, contextu indistincto opaco; asci constipati antice truncato-rotundati postice cuneati ($100-120 \mu = 8-10 \mu$) octospori; sporae oblique monostichae, bicellulares, cellula infera quam supra triplo minore, loculo infero uniguttulato supero grosse biguttulato, prima aetate tunica mucosa tenui obovolutae ($14 \mu = 5-6 \mu$).

20. *Venturia missionum* Speg. (n. sp.)

Diag. *Superficialis dense gregaria minutissima nigra, setulis brevibus rigidis opacis non bulbosis, ascis clavulatis aparaphysatis, sporis ellipticis uniseptatis vix constrictis.*

Hab. Ad ramos languidos v. emortuos in dumetis circa San Pedro, Febr.

Obs. Subiculum nullum; perithecia globosa v. leniter depressa ($90-100 \mu$ diam.), anguste perforato-ostiolata, setulis laxis acutis ($30-50 \mu = 6-8 \mu$) adspersa, contextu coriaccello indistincto atro; asci antice obtuse rotundati postice cuneati atque breviter noduloseque pedicellati ($35-40 \mu = 8-9 \mu$) octospori; sporae oblique distichae ellipticae utrinque obtusiusculae ($10 \mu = 4 \mu$), loculis non v. vix coarctatis grosse biguttulatis.

21. *Melanopsamma yerbae* Speg. (n. sp.)

Diag. *Perithecia ligno dealbato-subinfusato immersa, sparsa v. laxe gregaria, parte supera v. ostiolo tantum exerta; asci clavulati paraphysati; sporae fusoidae leniter arcuatae utrinque acutiusculae, medio uniseptatae vix constrictae, hyalinae.*

Hab. Ad truncos emortuos cariosos circa San Pedro, Febr.

Obs. Perithecia glabra carbonacea, contextu indistincto,

subglobosa (200 μ diam.) saepius e latere plus minusve compressula, ostiolo minuto papillulato, oro rotundo perforato, ornata; asci antico obtusissimo rotundati crassiusculeque tunicati, postico brevissimo noduloseque pedicellati (80 μ = 10 μ) paraphysibus paucis filiformibus obvallati; sporae distichae mediocres (25-26 μ = 4 μ) loculis conoideis minutissime biguttulatis.

Species notis pluribus *Lophyostomatibus* accedens sed ostiolo semper rotundo donata; jodi opo nulla.

22. *Diaporthe mate* Speg. (n. sp.)

Tetrastaga; peritheciis lenticularibus sparsis v. laevis gregariis mediocribus albo-farctis; ascis fusoides-clavulatis paraphysatis; sporis majusculis subbiconicis hyalinis.

Hab. Ad ramulos aridos adhuc pendulos in silvis circa Campo das Cuías, Febr.

Obs. Perithecia epidermide velata, cortice innata (150-200 μ diam.), ostiolo minuto carbonaceo coronata, contextu membranaceo fuscido indistincto; asci utrinque acutiusculi (75-80 μ = 15-20 μ) octospori; sporae oblique distichae medio uni-septato-constrictae, utrinque subacutiuscule rotundatae (20-22 μ = 7 μ), loculis saepius grosse 1 v. 2-guttulatis.

Species *D. binoculatae* (Ell.) Sacc. vergens, sporis duplo angustioribus distincta.

23. *Diaporthe yerbae* Speg. (n. sp.)

Diag. *Euporthe*; dense gregaria, peritheciis minutis sublongiuscule ostiolatis; ascis clavulatis; sporis e cylindracco ellipticis minutis grosse 4-guttulatis hyalinis.

Hab. Ad ramos dejectos subputrescentes vulgatissima in dumetis ubique.

Obs. Ramuli, adhuc epidermide vestiti, dense minuteque pustulosi; perithecia ligno immersa (150 μ diam.) tenuiter membranacea contextu indistincto fuscido, nucleo mucoso hyalino farcta, ostiolo tenui carbonaceo corticem perforante epidermide lacerata cincto coronata; asci mox diffluentes (35-40 μ = 8 μ) octospori paraphysati; sporae oblique distichae medio uniseptatae leniter constrictae utrinque obtusae (10-11 μ = 3-4 μ) hyalinae.

24. *Didymosphaeria yerbae* Speg. (n. sp.)

Diag. *Ramulicola*; peritheciis minutis sparsis epidermide velatis; ascis cylindraccis breviter pedicellatis paraphysatis; sporis minutis subellipticis didymis fusco-fumosis.

Hab. Ad ramulos languidos v. emortuos in dumetis prope *Campo das Cuías*, Febr.

Obs. Perithecia lenticularia (90-100 μ diam.) coriacea nigra, contextu opaco indistincto, ostiolo minuto vix papillulato epidermidem perforante ornata; asci antice obtuse rotundati postice cuneati breviusculeque pedicellati (50-60 μ = 5-6 μ), paraphysibus longioribus filiformibus crebriusculis obvallati; sporae octonae, leniter subobovatae utrinque obtusae (8-9 μ = 3,5-4 μ) medio uniseptatae modiceque constrictae, loculis subaequalibus.

Species D. Sellae (Bgn.) Sacc. toto coelo diversa.

25. *Valsaria insitiva* Ces. & DNrs

Hab. Semel tantum ad ramulos emortuos circa *San Pedro*, Febr.

Obs. Asci cylindranei (100-140 μ = 10-12 μ) antice obtusissimi, postice brevissime cuneato-pedicellati, paraphysati; sporae ellipticae, oblique monostichae, utrinque obtusiusculae (17-19 μ = 8-9 μ) medio uniseptatae leniter constrictae, loculis grosse 1-guttulatis fuliginosis.

26. *Valsaria clavatasca* Speg. (n. sp.)

Diag. *Eutypa*; peritheciis ligno v. stromate immersis mediocribus crassiuscule breveque papillato-ostiolutis; ascis clavatis longiuscule attenuato-pedicellatis paraphysatis; sporis octonis distichis didymis grosse 4-guttulatis fuliginosis.

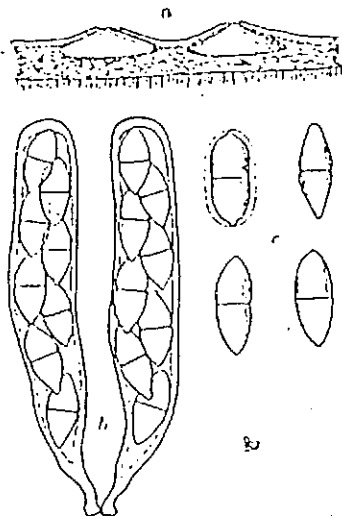
Hab. Vulgata ad ramos ramulosque in silvis, ubique.

Obs. Stromata ligno immersa applanata effusa extus fusca intus vix cinerascens linea limitante destituta; perithecia stromate omnino immersa sparsa v. laxe gregaria globosa (300-500 μ diam.) carnosulo-submembranacea, contextu nigro indistincto, ostiolo parvo, stromate vix exerto, armata; asci numerosi (120-140 μ long. tot.) parte sporifera elliptico-clavulata (60-75 μ = 15-18 μ) pedicello tenui aequilongo persistente suffulta, paraphysibus filiformibus longioribus obvallati; sporae e cylindraco ellipticae utrinque obtusae (16-18 μ = 6-9 μ) medio 1-septato-constrictae, loculis subaequilongis grosse 2-guttulatis, subopace fuliginis.

27. *Massariella yerbae* Speg. (n. sp.)

Diag. *Corticola*, epidermide velata, lenticularis, carbonacea; asci clavulato-cylindranei paraphysati; sporae majusculae elliptico-subbiconicae medio 1-septatae non v. vix constrictae opace fuliginis.

Hab. Vulgata ad ramos emortuos corticatos ubique, Feb. et Martio.



Obs. Perithecia saepius laxo gregaria cortico innata, epidermide arcto adnata vestita, lenticularia (400-750 μ diam.) submembranacea atra, contextu opaco indistincto, saepe subiculo olivaceo (an heterogeneo?) adspersa, ostiolo vix papillulato carbonaceo ornata; asci constipati antice obtuse rotundati crasseque tunicati postice breviter cuneato-pedicellati (long. tot. 150 μ = p. sp. 120 μ = 28 μ), muco plus minusve immersi; sporae subrecte distichae ellipticae v. saepius biconicae, primo tunica tenuissima mucosa hyalina vestitae dein nuda, utrinque plus minusve rotundatae sed saepius minute papillato-apiculatae (30-35 μ = 14-15 μ) ad septum medium non v. vix constrictae laeves fuligineae.

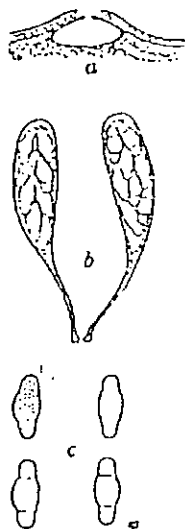
28. *Sphaerulina yerbae* Speg. (n. sp.)

Diag. Hypophylla, laxo gregaria minuta epidermide velata; asci clavulati modice tenuiterque pedicellati aparyphysati; sporae elliptico-cylindratae medio incrassatae utrinque obtusissime rotundatae per actatem 2-septatae.

Hab. Ad folia dejecta putrescentia, vulgata ubique, Feb. et Mart.

Obs. Perithecia lenticularia subepidermica (100-150 μ diam.) subcarbonacea, poro rotundo pertusa, contextu opaco indistincto; asci conglobati (80-90 μ long. tot. — parte sporifera

50-60 μ = 12-14 μ) antice obtuse rotundati crasseque tunicati postice abrupte cuneati ac in pedicello pro ratione valde tenui (30-40 μ = 1,5-2 μ) producti, aparaphysati octospori;



sporaq̃ conglobatae rectae, primo continuae intus non v. minute granulosae, serius 2-septatae, loculis subaequilongis, centrali crassiore, utrinque subtruncato-rotundatae (12-18 μ = 4-6 μ) semper hyalinae.

29. *Zignoëlla yerbae* Speg. (n. sp.)

Diag. *Sparsa v. laxe gregaria minuta ligno denudato infusato basi insculpta, papillato-ostiolata, carbonacea; asci fusoido-clarati modice attenuato-pedicellati paraphysati; spora subfusoidae 3-septatae lenissime constrictae hyalinae.*

Hab. In ligno decorticato cicatricum truncorum secus rivulum *Matto Queimado*, Febr.

Obs. Substratum sordide pallide irregulariterque fusconigrescens; perithecia lenticulari-subconoidea (150 μ diam.) atra glabra laevia opaca, quandoque superficialia quandoque ad medium usque immersa, contextu opaco indistincto, ostiolo valide papillato, poro minuto rotundo pertuso, coronata; asci conferti antice subtruncato-rotundati postice sat longiuscule tenueque cuneato-attenuati (100-120 μ = 14-15 μ) paraphysibus filiformibus longioribus confertis cinctis; spora octonae oblique distichae primo 4-blastes dein 3-septatae

ad septum medium tantum constrictulae utrinque subacutiuscule rotundatae ($24-25 \mu = 8 \mu$) saepius leniter inaequilaterales atque subcymbiformes.

30. *Metasphaeria mate* Speg. (n. sp.)

Diag. *Perithecia minuta subepidermica densiuscule gregaria; asci cylindracci breviuscule pedicellati; sporae elongato-ellipticae 3-septatae vix ad medium constrictulae hyalinae.*

Hab. Ad ramos languidos in silvosis circa Campo das Cuias, Febr.

Obs. *Perithecia* plus minusve conferta, epidermide semper velata, parvula (150μ diam.) lenticularia glabra nigra submembranacea, contextu indistincto, ostiolo papillulato epidermidem perforante subcarbonaceo ornata; asci numerosi antice obtusiusculi postice breviter cuneato-pedicellati ($120 \mu = 10 \mu$) pseudoparaphysibus paucis subfiliformibus granuloso-farctis commixti; sporae octonae, oblique monostichae utrinque obtusiusculae ($18 \mu = 5 \mu$) primo 4-blastes dein 3-septatae, ad septum medium tantum constrictulae diu hyalinae, dein subchlorinae, postremo corrugatae fulvellae.

31. *Melanomma mate* Speg. (n. sp.)

Diag. *Pusilla hemisphaerica nigra laxè gregaria, matrici sordide infuscata insidentia; asci clavulati breviter pedicellati paraphysati; sporae elliptico-subfusoidae 3-septatae fuligineae.*

Hab. In superficie interna truncorum cariosorum in silva circa San Pedro, Febr.

Obs. Substratum late irregulariterque sordido-infuscatum; perithecia hinc inde plus minusve laxè gregaria, subhemisphaerica ($75-100 \mu$ diam.), basi tantum matrici insculpta, ostiolo minutissimo impresso rotundo perforata, glabra laevia atra opaca subcarbonacea, contextu nigro indistincto; asci antice obtuse rotundati tunica crassiuscula vestiti, postice breviter cuneato-pedicellati ($60 \mu = 8-10 \mu$), paraphysibus filiformibus longioribus obvallati; sporae octonae oblique distichae utrinque subacutiuscule rotundatae ($12-15 \mu = 3-4 \mu$) rectae v. vix inaequilaterali-subcymbiformes, ad septa leniter constrictulae, loculis grosse 1-guttulatis, pellucidae.

32. *Leptosphaeria yerbae* Speg. (n. sp.)

Diag. *Perithecia corticola, epidermide velata, lenticularia subcarbonacea pusilla; asci clavulati densissime paraphysati; sporae elongato-ellipticae 3-septatae loculo secundo supero crassiore, chlorino-flavidae.*

Hab. Ad ramos languidos v. emortuos in dumetis circa *San Pedro*, Febr.

Obs. Substratum vix mutatum leniter sordideque fuscescens; perithecia sparsa v. hinc inde plus minusve conferta, cortice insculpta, epidermido persistente tecta, e globoso lenticularia ($90-150\ \mu$ diam.), ostiolo vix papillato perforata, contextu indistincto atro; asci numerosi sursum subtruncato-rotundati crasseque tunicati, deorsum breviter cuneato-pedicellati ($50-60\ \mu = 8-10\ \mu$), paraphysibus crebris filiformibus longioribus obvallati, octospori; sporae oblique distichae non v. obsolete subclavulatae ad septa, ad medium praecipue, constrictulae non v. lenissime inaequilaterales utrinque obtusiusculae ($10-14\ \mu = 3-4\ \mu$).

Loculus secundus superior semper nonnihil crassior quandoque septum verticale ostendit.

33. *Strickeria mate* Speg. (n. sp.)

Diag. Perithecia parva subhemisphaerica per aetatem saepe subcollabescentia vix papillato-ostiolata, basi leniter matrici infuscata insculpta, non v. vix subiculigera; asci cylindracei brevissime pedicellati; sporae elongato-ellipticae non v. vix subobovatae 3-septatae leniter constrictae, loculis duobus internis quandoque septo longitudinali divisis, olivaceae.

Hab. In superficie interna truncorum cariosorum in silva secus *Matto Queimado*, Febr.

Obs. Substratum late plus minusve obscure nigrefactum; perithecia sparsa v. saepe subseriata ($150-180\ \mu$ diam.) vix papillulato-ostiolata glabra laevia opaca nigra coriacea, contextu suberassiusculo indistincto atro fuligineo, basi matrici insculpta saepeque hyphis paucis radiantibus repentibus ramulosis ($3-5\ \mu$ crass.) cincta; asci apice obtusiuscule rotundati crassiusculeque tunicati postice brevissime noduloseque pedicellati octospori, paraphysibus filiformibus parum longioribus densis obvallati ($90-100\ \mu = 9-10\ \mu$); sporae octonae oblique monostichae superne obtusiusculae inferne acutiusculae 3-septatae, ad septum medium validius constrictae, loculis duobus centralibus saepius septo altero longitudinali divisis, ($13-19\ \mu = 7-8\ \mu$) pellucidae.

Jodi ope membrana ascorum leniter coerulescit.

34. *Thyridium yerbae* Speg. (n. sp.)

Diag. Perithecia majuscula ligno denudato cinerascente omnino immersa; asci cylindracei brevissime pedicellati denseque

paraphysati; sporae ellipticae 3-septatae, loculis mediis longitudinaliter divisis, fuligineae.

Hab. Ad truncos ramosque emortuos decorticatosque in silva circa *San Pedro*, Febr.

Obs. Substratum extus sordide cinereum opacum v. quandoque subargenteo-micans punctulis vix prominulis nigrescentibus (ostiolis) exornatum; perithecia globosa (250-500 μ diam.) matrici omnino sepulta, ostiolo carbonaceo nigro superficiem matricis attingente ornata, molliuscula submembranacea, extus cinerea, nucleo olivaceo mucoso farcta, contextu minuto densissimo olivaceo indistincto; asci cylindracci apice rotundati crasseque tunicati basi brevissime noduloseque pedicellati (150 μ = 10-12 μ) octospori, paraphysibus filiformibus longioribus densissimis cincti; sporae oblique monostichae subellipticae non v. vix obovatae v. inaequilaterales utrinque obtusiusculae (16-18 μ = 8-9 μ) ad septa, ad medium praecipue, constrictulae, subopace fuligineae.

35. *Winterella yerbæ* Speg. (n. sp.)

Diag. Perithecia ligno dealbato omnino immersa globosa majuscula; asci cylindracco-fusoidei laxè tenuissimeque paraphysati; sporae fasciculatae filiformes multiseptulatae hyalinae.

Hab. Ad ramos aridos decorticatos circa *S. Pedro*, Febr.

Obs. Substratum parum modificato dealbato v. extus vix cinerascens; perithecia sparsa v. laxè gregaria matrici totaliter immersa, ostiolo vix papillato ore rotundo superficiem ligni attingente donata, globosa (250-400 μ diam.) membranacea, contextu atro indistincto; asci antico acutiusculo rotundati crasseque tunicati postico sensim breviterque cuneato-pedicellati (120-150 μ = 10-12 μ) octospori, paraphysibus sat longioribus tenuissimis obvallati; sporae rectae utrinque acutiusculae (100-120 μ = 2-2,5 μ) primo multiguttulatae dein multiseptatae.

36. *Nectria sphaeriicola* Speg. (n. sp.)

Diag. *Diulonectria*; perithecia pusilla caespitosa miniata; asci fusoides aparamphysati; sporae ellipticae uniseptatae non constrictae laeves hyalinae.

Hab. In stromatibus pyrenomicetum plurimorum ad ramos sternatos putrescentes prope *Campo das Cuías*, Febr.

Obs. Perithecia dense caespitosa sed non confluentia, plangulas vix convexulas (0,5-2 mm diam.) superficiales efformantia, globosa (75-100 μ diam.) glabra nitidula vix papillulato-

ostiolata, contextu membranaceo-carnosulo minuto densissimeque parenchymatico succineo-rubro; asci apice truncati, tunica crassa bifoveolata donati basi breviter cuneato-pedicellati ($60\ \mu = 10-15\ \mu$); sporae utrinque subacutiusculae ($16\ \mu = 8\ \mu$) primo 2-3-guttulatae dein diblastes, postremo uniseptatae, ad septum non constrictae, laeves.

Species notis plurimis *N. episphaeriae* accedens, sed bene riteque distincta.

37. *Gibberella Saubinetii* (Mtgn.) Sacc. var. *mate* Speg.

Hab. Ad ramos dejectos putrescentes in silvis prope *Campo das Cuías*, Febr.

Obs. Specimina nunc inventa a typo recedunt peritheciis rigidioribus sporisque subcrassioribus ($20-22\ \mu = 5-6\ \mu$).

38. *Megalonectria yerbae* Speg. (n. sp.)

Diag. *Perithecia caespitosa glabra rubra collabescentia saepius stylba 1 v. 5 cingentia; asci cylindraceo-subclavati apapraphysati; sporae 3-8-septatae ad septum medium valide constrictae hyalinae.*

Hab. Vulgata ad ramos emortuos putrescentes ubique, Febr. et Mart.

Obs. Acervuli per epidermidem fissam caespitose erumpentes pulvinulos subparvos fusco-rubros (1-2,5 mm diam.) efficientes, stylbis sepiissime comitati; stylba erectiuscula pedicello cylindraceo succineo-rubro (1-5 mm long. = 0,1-0,2 mm crass.) glabro capituloque hemisphaerico v. subgloboso roseo-aurantio (0,5-0,75 mm diam.) furfurello constituta, conidiis obovatis ($6-8\ \mu = 2,5-4\ \mu$) catenulatis? non v. minute biguttulatis hyalinis; perithecia subglobosa sessilia (200-250 μ diam.) rubra carnosula glabra vix papillulato-ostiolata, contextu grosse parenchymatico aurantio-rubro parum distincto, in sicco saepius collabescentia; asci sursum obtusissime rotundati crassiusculeque tunicati postico breve crasse nodoseque pedicellati ($100-120\ \mu = 20-25\ \mu$) quandoque tetraspori quandoque octospori, apapraphysati v. rarissime pseudopapraphysibus crassis parvis obvallati; sporae polymorphae quandoque ellipticae 3-5-septatae ($25-40\ \mu = 10-14\ \mu$) quandoque elongato-clavulatae 7-9-septulatae ($30-45\ \mu = 10-12\ \mu$) ad septa, centralia validius constrictae, loculo uno alterove septo longitudinali diviso.

Species facile in duobus (altera ascis tetrasporis subpapraphysatis sporisque brevioribus 3-5-septatis, altera ascis oc-

tosporis aparaphysatis sporis longioribus dividenda) *Megalonectriae caespitosae* Speg. (Fungi Paigg. 310) affinis.

39. *Glonium microsporum* Sacc. var. *minor*.

Hab. Vulgatum in disco sectionum ramorum truncorumque in *Matto Queimado* et *San Pedro*, Febr.

Obs. Perithecia saepius dense constipata, matrico nigrefacta insidentia, elliptica obtusa pusilla (0,25-0,50 mm = 0,20-0,25 mm) rima vix conspicua dehiscentia carbonacea laevia nigra opaca; asci cylindracei brevissimo stipitati (40-50 μ = 4 μ), longiuscule paraphysati; sporae octonae oblique monostichae ellipticae non v. vix obovatulae (7-8 μ = 3-4 μ) valide 1-septato-constrictae hyalinae.

40. *Myiocopron yerbae* Speg. (n. sp.)

Diag. *Mediocre, laeae gregarium, stellatim dehiscens, subcarbonaceum; asci obclavatuli paraphysati; sporae majusculae ellipticae.*

Hab. Ad ramulos languidos v. emortuos in dumetis circa *San Pedro*, Febr.

Obs. Subiculum nullum; perithecia dimidiato-scutata (75-100 μ diam.) superficialia vix convexula, atra opaca, contextu indistincto, ambitu non fimbriata; asci crassi utrinque obtusi superne tunica incrassata vestiti basi brevissime nodoseque pedicellati (60-70 μ = 25-30 μ) paraphysibus filiformibus vix longioribus apice subincrassatulis obrvallati, octospori; sporae oblique distichae utrinque obtusae (26-28 μ = 12-14 μ) primo nubilosae hyalinae dein eguttulatae subchlorinae.

41. *Asterina mate* Speg. (n. sp.)

Diag. *Amphygena; plagulis mediocribus tenuissime reticulato-araneosis; peritheciis laeae gregariis pusillis centro parenchymaticis ambitu prosenchymaticis margine non v. vix fimbriatis; ascis ovatis v. subglobosis aparaphysatis; sporis majusculis didymis postremo fuliginis.*

Hab. Frequentissima ad folia viva ubique.

Obs. Maculae nullae; plagulae suborbiculares (2-10 mm diam.) glabrae saepius hypophyllae nigrescentes arcto matri-ci adnatae tenuissimae, vix sub vitro valido tenuiter reticulato-fibrillosae; hyphae rectiusculae radiantes (5-6 μ crass.) crebriuscule alterno-ramosae confertiuscule septulatae, hyphopodiis destitutae sed ramulis brevibus line inde armatae; perithecia saepius centro plagularum insidentia scutato-dimidiata (100-120 μ diam.) atra astoma radiatum rimose dehiscentia,

centro cellulis subglobosis (8-10 μ diam.) ambitu cellulis elongatis subflexuosis (10-15 μ = 5-6 μ) omnibus olivaceis efflorinata; asci per aetatem leniter subcoerulescentes octospori (50-90 μ diam.); sporae didymae utrinque obtusiusculae centro ad septum constrictae (30-35 μ = 14-18 μ), loculis subaequilongis, supero non v. vix crassiore, pulchre fuligincae.

42. *Tryblidium guaraniticum* Speg. var. *major*.

Hab. Vulgatum ad ramos dejectos putrescentes ubique, Febr.

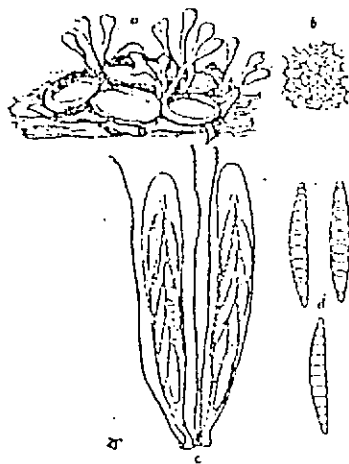
Obs. Asci cylindracci brevissime cuneato-stipitati (200 μ = 15-20 μ) densissime paraphysati; sporae octonae oblique monostichae elongatulo-ellipticae utrinque acutiuscule rotundatae (28-30 μ = 10-12 μ), ad medium vix v. non constrictae, loculis primo grosse 2-guttulatis serius eguttulatis subopace fuliginceis. Jodi ope nulla.

Stilbopeziza Speg. (n. sp.)

Char. *Cenangia*, *erumpens*, *minuta*, *caespitosa*, *cupulis atris stato conidioforo*, *Phaeostylbum* *sistente*, *commixtis*; *ascis fusoidis paraphysatis*; *sporis octonis fusoidis multiseptatis hyalinis*.

43. *Stilbopeziza yerbae* Speg. (n. sp.)

Diag. *Perithecia constipata sessilia obsolete subiculigera*, *hypothecio convexo sessilia*, *epithecio concolori planiusculo*, *marginè acutiusculo integro*; *asci parce paraphysati breviterque pedicellati*; *sporae utrinque acutae rectae*.



Hab. Ad ramos dejectos putrescentes in silvis secus rivulum Matto Queimado, Febr.

Obs. Acervuli innato-erumpentes convexuli minuti (0,5-2 mm diam.) saepe gregarii ac confluentes; stipites conidiophori basi confluentes atque subcylindracei sursum applanati crispuli v. subramulosi (0,5-2,5 mm alt. = 0,15-0,25 mm diam.) atrii subcarbonacei fibroso-prosenchymatici steriles; cupulae hemisphaerico-applanatae pusillae (150-200 μ diam.) circa basim stipitum constipatae saepe subiculo parco ex hyphis tenuibus septulatis olivaceis (4-5 μ crass.) cinctae, intus extusque atrae, coriaceae, contextu fuligineo grosse parenchymatico subindistincto; asci fusoides sursum obtusi tunica percrassa vestiti deorsum cuneati brevequo pedicellati (100-110 μ = 12-14 μ) octospori, paraphysibus filiformibus parvis obvallati; sporae oblique distichae utrinque acutiusculae (28-32 μ = 5-6 μ) leniter inaequilaterales primo 10-12-blastes serius 9-11-septulatae, ad septa non constrictae. Jodi ope nulla.

44. *Blitrydium mate* Speg. (n. sp.)

Diag. *Tryblidiaria*, minutissimum; matrice dealbata leniter insculptum; ascis subsessilibus paraphysatis; sporis didymis 3-septatis, loculis mediis longitudinaliter divisis, hyalinis.

Hab. Ad ramos decorticatos emortuos circa *San Pedro*, Febr.

Obs. Apothecia cupulata margine obtusa (90 μ diam.), epithecio carnosulo olivaceo concaviusculo, contextu minute indistincteque subprosenchymatico; asci constipati apice subtruncato-rotundati deorsum leniter incrassatuli basi abrupte rotundati, pedicello noduloso vix evoluto suffulti (35-40 μ = 8-10 μ), paraphysibus filiformibus longioribus confertis obvallati, octospori; sporae ellipticae subbiconicae non v. obsoletissime subclavulatae, ad septum medium sat constrictae, utrinque obtusiusculae (12-14 μ 5-6 μ), loculis primo guttulis dein granulosi.

45. *Coccomyces yerbae* Speg. (n. sp.)

Diag. Maculae suborbiculares subdefinitae; apothecia in maculis laevi gregaria ex orbiculari subquadrata; asci fusoides brevissime pedicellati, paraphysibus apice subcircinatis obvallati; sporae aciculares ascis vix breviores.

Hab. Ad folia dejecta subputrescentia in silvis prope *San Pedro*, Febr.

Obs. Maculae amphigenae (3-10 mm diam.); apothecia saepius epiphylla primo epidermide tecta dein erumpentia (150-

200 μ diam.) stellatum deliscentia; asci utrinque attenuati antice obtusiusculi crassiuscule tunicati postico breviter pedicellati (50 μ = 5-6 μ), paraphysibus filiformibus simplicibus apice vix incrassatulis plus minusve uncinatulis commixti; sporae octonae utrinque acutiusculae (40 μ = 1 μ) minute multi-guttulatae hyalinae.

46. *Arcyria incarnata* Saut.

Hab. Ad ramulos emortuos putrescentes in silvis prope *Campo das Cuias*, Febr.

47. *Phoma yerbae* Speg. (n. sp.)

Diag. *Maculae* nullae; *perithecia* subepidermica pusilla confertiuscula membranacea; *sterigmatibus* subcrassiusculis atque obtusiusculis monosporis; *sporulis* ellipticis minutissimis biguttulatis.

Hab. Ad ramulos aridos in silvis prope *San Pedro*, Febr.

Obs. *Perithecia* lenticularia (50-75 μ diam.), contextu fusco-fumoso minuto subindistincto parenchymatico, ostiolo rotundo parvo perforata; *sterigmata* fasciculata (10-15 μ = 15-2 μ) simplicia; *sporulae* utrinque obtusiusculae (2-3 μ = 1-1.5 μ) hyalinae.

48. *Phoma*? *matecola* Speg. (n. sp.)

Diag. *Perithecia* *matrici* denudata sordide cinerascens insculpta laeae gregaria subcarbonacea glabra; *sporulis* minutis e globoso ellipticis.

Hab. Ad ramos decorticatos putrescentes circa *San Pedro*, Febr.

Obs. *Perithecia* ultra medium exserta glabra astoma (?) e globoso lenticularia (100-120 μ diam.), contextu opaco indistincto; *sterigmata* non visa; *sporulae* utrinque obtusae (3-4 μ = 2-2.5 μ) primo hyalinae serius perdilute chlorinulae.

49. *Phyllosticta yerbae* Speg. (n. sp.)

Diag. *Maculae* *amphigenae* fusco-arescentes determinatae; *perithecia* lenticularia epiphylla obsolete ostiolata grosse parenchymatica; *sporulae* obovatae v. ellipticae saepius grosse guttulae hyalinae.

Hab. Vulgata ad folia languida in silvis prope *San Pedro*, Febr.

Obs. *Maculae* *amphigenae* quandoque minutae (2-3 mm diam.) orbiculares quandoque majusculae (5-20 mm diam.) diffformes; *perithecia* lenticularia (80-160 μ diam.) epidermide velata nigra; *sporulae* utrinque obtusissimae (10-12 μ = 5-7 μ) crassiusculo tunicatae mucosius plus minusve evolutae immersae.

50. *Phyllosticta mate* Speg. (n. sp.)

Diag. *Maculae amphigenae suborbiculares albescentes determinatae; perithecia epiphylla punctiformia ostiolata; sporulae pusillae subcylindratae biguttulatae.*

Hab. Ad folia languida in dumetis circa San Pedro, Febr.

Obs. *Maculae* superne subargenteae inferne pallescentes, primo orbiculares dein confluyendo difformes (1-5 mm diam.); perithecia epiphylla subgregaria submarginalia lenticularia (90-100 μ diam.) coriacea, contextu opaco indistincto nigro, ostiolo rotundo perforata; sporulae rectae v. leniter inaequilaterales utrinque acutiusculo obtusatae (3-4 μ = 1-1,5 μ) atque minute guttulae hyalinae.

50bis. *Peckia mate* Speg. = Speg., Myc. arg., n. 160

Hab. Vulgatissima ubique in silvis et in cultis, Jan., Mrt.

Macroplodiella Speg. (n. gen.)

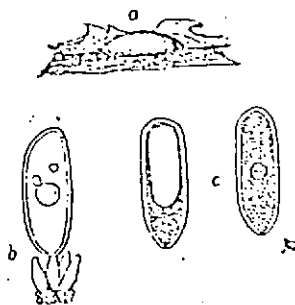
Charac. *Perithecia subepidermica lenticularia ostiolata subcarbonacea, sporulae maximae hyalinae continuae.*

A *Macroplodia* sporis semper hyalinis recedit.

51. *Macroplodiella maticola* Speg. (n. sp.)

Diag. *Perithecia mediocria laxe gregaria subiculo parco olivaceo cincta; sterigmata sublageniformia; sporulae subcylindratae intus dense granulosa nubilosae.*

Hab. Ad ramos defectos putrescentes in silvis circa San Pedro, Febr.



Obs. *Perithecia* cortice insidentia epidermide velata eaque arcte adnata nigra lenticularia (150 μ diam.), hyphis ramulosis tenuibus (2,5-3 μ crass.) septulatis intricatis olivaceis pellucidis vestita, ostiolo impresso perforata, contextu indistincto atro; sterigmata majuscula (15 μ = 5 μ) hyalina; sporulae superne recte v. oblique rotundatae postice subcuneatae (45-60 μ = 10-15 μ) crassiuscule tunicatae laeves semper hyalinae.

52. *Coniothyrium mate* Speg. (n. sp.)

Diag. *Perithecia submajuscula matrici dealbata insculpta carbonacea papillato-ostiolata nigra; sporulae ellipticae farrulae fuligineae.*

Hab. Ad truncos cariosos in silvis circa San Pedro, Febr.

Obs. Matrix saepius dealbata; perithecia subsparsa e matrice semiexerta nigra subconoidea (150-200 μ diam.) carbonacea glabra ostiolo valido papillato coronata, contextu opaco indistincto; sporulae non v. vix ovatae utrinque obtusiusculae non v. grosse 1-guttulatae (5-6 μ = 2,5-3 μ).

53. *Coniothyrium maticola* Speg. (n. sp.)

Diag. *Perithecia corticola subepidermica lenticularia parvula; sporulae elliptico-cylindratae olivaceae.*

Hab. Ad ramulos languidos in dumetis circa San Pedro, Febr.

Obs. Maculae nullae; perithecia laxo gregaria epidermide velata membranacea completa (80-100 μ diam.), ostiolo minuto rotundo impresso perforata; sporulae utrinque rotundato-subtruncatae (6-8 μ = 3-3,5 μ), eguttulatae laeves.

54. *Coniothyrium yerbae* Speg. (n. sp.)

Diag. *Maculae nullae v. obsoletae; perithecia subepidermica tenuissime membranacea ostiolata; sporulae elliptico-globosae fusco-fumosae.*

Hab. Ad ramulos languidos v. arescentes in dumetis prope Frazeran, Feb.

Obs. Matrix tota pallide cinerascens, circa perithecia saepius pallidior; perithecia punctulatim prominula (100-150 μ diam.) fusca, epidermide velata, circa ostiolum rotundum latiusculum parenchymatica nigra coriacea, caeterum tenuissima aegre perspicua (an incompleta?); sporulae utrinque obtusae (4-5 μ = 3-4 μ) non v. grosse uniguttulatae.

Species a praecedentibus longe recedens.

55. *Diplodia yerbae* Speg. (n. sp.)

Diag. *Perithecia carbonacea tecta v. nuda glabra valide papillato-ostiolata; sporulae elliptico-subobovatae saepius 1-septatae non v. vix constrictae fuligineae.*

Hab. Vulgata ubique ad ramulos emortuos subputrescentes, Febr.

Obs. Perithecia primo cortice tecta eaque dein secedente denudata atque in ligno superficialia, sparsa v. hinc inde glomerulata, subglobosa v. depressa (150-180 μ diam.) nigra,

ostiolo plus minusve evoluto armata, contextu opaco indistincto; sterigmata sublancoolata ($15\text{--}\mu = 5\mu$) paraphysibus filiformibus elongatis simplicibus concoloribus ($40\text{--}60\mu = 1\text{--}2\mu$) commixta; sporulae acrogenae utrinque obtusae ($24\text{--}30\mu = 10\text{--}15\mu$) quandoque ellipticae quandoque leniter subobovatae rectae v. modice inaequilaterales continuae vel saepius uniseptatae, ad septum non v. lenissime constrictae subopaco fuligineae eguttulatae.

44 56. *Hendersonia yerbae* Speg. (n. sp.)

Diag. *Perithecia subhemisphaerica pusilla perforato-ostiolata atra glabra submembranacea; sporulae fusoidae 5-7-septatae olivaceae.*

Hab. Ad ramulos emortuos aridos in dumetis circa *San Pedro*, Febr.

Obs. Substratum denudatum albescenti-cinereum; perithecia hinc inde laxe gregaria, basi matrici insculpta (100μ diam.), ostiolo non papillato, contextu minute denseque parenchymatico-olivaceo donata; sporulae rectae v. lenissime inaequilaterales apice supero acutiusculae, apice infero subtruncatae ($28\text{--}30\mu = 4\text{--}5\mu$), ad septa non v. vix constrictae.

45 57. *Hendersonia mate* Speg. (n. sp.)

Diag. *Perithecia subepidermica erumpentia sparsa mediocria lenticulari-conoidea submembranacea; sporulae ellipticae 2-3-4-blustes fuligineae.*

Hab. Ad ramulos aridos adhuc pendulos secus rivulum *Mato Queimado*, Febr.

Obs. Perithecia per epidermidem pustulatim disrupta subexortula, nigra glabra (150μ diam.), ostiolo non viso, contextu obsolete parenchymatico olivaceo subcarnosulo donata (an completa?); sterigmata conoidea ($10\text{--}15\mu = 5\mu$) hyalina monosperma; sporulae acrogenae utrinque obtusiusculae ($10\text{--}12\mu = 5\text{--}6\mu$) ad pseudosepta non constrictae.

58. *Staganospora yerbae* Speg. (n. sp.)

Diag. *Perithecia parva subepidermica nigra carbonacea; sporulae elongato-fusoidae primo continuae dein 5-9-septatae hyalinae.*

Hab. Ad ramos dejectos putrescentes in silvis circa *Campo das Cuias*, Febr.

Obs. Perithecia cortice insidentia primo epidermide velata serius saepe denudata subconoidea ($120\text{--}150\mu$ diam.), papillato-ostiolata, glabra, contextu indistincto; sporulae e strato

proligero tenui parenchymatico hyalino immediate oriundae constipatae erectae, sursum attenuatae truncatae, deorsum longius sensinque attenuato-subpedicellatae ($100-120 \mu = 8-9 \mu$), initio continuae nubilosae, serius 9-11-guttulatae, postremo septulatae ad septa non constrictae eguttulatae.

59. *Staganospora yerbae* Speg. var. *minor*.

Hab. Ad ramulos emortuos in dumetis circa San Pedro, Febr.

Obs. Varietas a typo recedit peritheciis minoribus ($90-100 \mu$ diam.) superne carbonaceis inferne membranaceis, contextu indistincto atro-subcyanescente, sporulis brevioribus ($70-85 \mu = 7-9 \mu$) validius fusoidis.

60. *Cytosporina yerbae* Speg. (n. sp.)

Diag. *Stromata corticola tuberculiformia, extus atra intus cinerea, gyrose loculigera; sporulae sigmoideae v. arcuatae utrinque acutae hyalinae.*

Hab. Vulgata ubique ad ramulos dejectos putrescentes, Febr. et Mart.

Obs. Stromata elliptico-diformia depressa ($2-6 \text{ mm}$ diam.) intus alba, loculis difformibus confertis minutis albo-farctis; sterigmata tenuissima filiformia hyalina ($20-30 \mu = 0,75-1 \mu$) monospora; sporulae acrogenae ($20-25 \mu = 0,75-1 \mu$) continuae.

61. *Dimerosporium decipiens* (DNtrs) Sacc. var. *yerbae*.

Hab. In disco truncorum excaesorum in silvis circa San Pedro, Febr.

Obs. Ascomata sparsa orbiculari-ellipsoidea ($0,5-1 \text{ mm}$ diam.) nigra margine setulis patulis continuis acutis v. obtusis atris subopacis ($50-150 \mu = 6-8 \mu$) ornata; sporulae subnaviculares ($5-8 \mu = 2-3 \mu$) utrinque setigerae, setula supera, quam infera sporulam aequante atque erecta duplo brevior, lateraliter patente.

62. *Colletotrichum yerbae* Speg. (n. sp.)

Diag. *Maculae amphigenae, limitatae albescentes; acervuli epiphylli erumpentes minuti, margine parce breviterque setuligeri atrii; sporulae e cylindraco elliptico-obovatae parvae hyalinae.*

Hab. Ad folia languida in dumetis prope San Pedro, Febr.

Obs. Maculae suborbiculares ($5-15 \text{ mm}$ diam.) superne albescentes v. cinerascetes inferne fusciscentes, margine undulato-repandulae, linea obscuriore angusta saepius limitatae; acervuli in maculis hinc inde laxè gregarii vix convexuli ($100-$

150 μ diam.), primo epidermide volati dein erumpentes margino tunica flexuose subprosenchymatica fumoso-subviolascendo vestiti, setulis paucis 1-2-cellularibus cylindracco-conoideis acutis (10-30 μ = 4-5 μ) concoloribus ornati; sterigmata cylindracea constipata (8-10 μ = 4-5 μ) hyalina monosperma σ strato prolifero fuscidulo oriunda; sporulae utrinque obtusae (10-12 μ = 5-7 μ) eguttulatae.

Phaeomarsonia Speg. (n. gen.)

Charac. *Omnibus notis cum Marsonia conveniens sed sporulis fuliginis distinctum.*

63. *Phaemarsonia yerbae* Speg. (n. sp.)

Diag. *Maculis amphigenis orbicularibus callosis superne per aetatem erosulo-denudatae; acervuli hypophylli gregarii minuti; sporulae elliptico-subobovatae 1-septato-constrictulae fuliginiae.*

Hab. Ad folia languida in silva circa Campo Grande, Feb.

Obs. Maculae orbiculares (1-5 mm diam.) utrinque callosio-elevatulae eximie definitae, superne mox epidermide erosula decidua orbatae, subcinerascens; acervuli in centro macularum 3-7-gregarii per epidermidem disruptam sporulas protrudentes, conoidei (80-100 μ diam.), pallide olivacei, aegro perspicui; sporulae utrinque obtusae (12 μ = 5-6 μ) loculis aequilongis non v. grosse uniguttulatis.

64. *Macrosporium yerbae* Speg. (n. sp.)

Diag. *Nigrum velutinum effusum; hyphae fasciculatae simplices multiseptulatae; conidia non catenulata clavulata olivacea 3-4 septulata.*

Hab. Ad ramos emortuos putrescentes in dumetis circa San Pedro, Febr.

Obs. Plagulae latiusculae (10-25 mm diam.) tenues, ambitu sensim evanescentes; hyphae erectiusculae flexuosulae 3-7-septatae apice denticulatae (40-80 μ = 5 μ) fuliginiae; conidia ex denticulis hypharum oriunda, parte supera elliptica, 3-4-locularia, loculis 1-3-mediis saepe longitudinaliter divis, ad septa constrictula, loculo infimo elongato attenuatoque pedicelliformi, (40-50 μ long. tot. = 8-10 μ) olivacea.

65. *Dictyosporium yerbae* Speg. (n. sp.)

Diag. *Conidia obovata multicellularia brevissime pedicellata, glomerulos subhemisphaericos pusillos nigros hinc inde efficientia.*

Hab. In schidiis ligneis subputrescentibus propo San Pedro, Feb.

Obs. Acervuli matrice sordide infusata insidentes, saepius

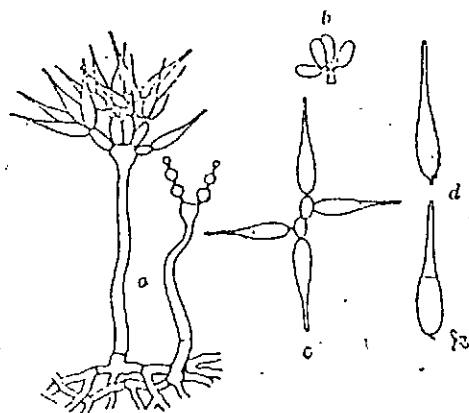
laxe gregarii globoso-depressi ($75-100\ \mu$ diam.) nigri; conidia 5-10 in quoque acervulo dense constipata ovata v. obovata utrinque obtusa ($20-30\ \mu = 20-25\ \mu$) saepe medio subconstrictata, subopace olivacea 24-32-celluligera, pedicello vix evoluto hyalino abrupte radicata.

Spermatoloncha Speg. (n. gen.)

Charac. *Hyphae* tenues hyalinae septulatae, steriles repentes, fertiles erectae apice subcapitatae sterigmatibus simplicibus v. duplicatis ornatae; conidiis in sterigmatibus pleurogenis alternis elongato-lanceolatis hyalinis.

66. **Spermatoloncha maticola** Speg. (n. sp.)

Diag. *Characteres generis, sterigmata globosa v. elliptica; conidia continua.*



Hab. In *Meliola* parasitans ad folia viva in dumetis secus rivulum Matto Queimado, Feb.

Obs. Plagulae *Meliolae* infectae leniter cinerascens; hyphae steriles, subiculo *meliolae* arcto adnatae, tenues ($4-5\ \mu$ diam.) obsolete septulatae flexuosae dense intertexto-intricatae; hyphae fertiles erectae ($80\ \mu = 4-6\ \mu$) subcontinuae apice modice incrassatae; sterigmata primaria elliptica ($10-15\ \mu = 4-5\ \mu$), secundaria subglobosa ($5-6\ \mu$ diam.); conidia sursum attenuato-acutissima postice rotundata ($35\ \mu \times 6\ \mu$) minute pedicellato, papillata.

67. **Haplographium yerbae** Speg. (n. sp.)

Diag. *Laxissime gregarium; stipites erecti crebre septulati simplices subopace nigri apice capitato-conidiiferi; conidia globosa parva laevia olivacea catenulata.*

Hab. In schidiis aridis subputrescentibus circa San Pedro, Febr.

Obs. Plagulae saepius centrum sectionum occupantes vage nubilosae aegre perspicuae olivascentes; stipites cylindracei inter se remotiusculi basi non bulbosi sursum sensim attenuati ($100-500\ \mu = 8-12\ \mu$) apice obsolete denticulati capitulum globosum ($30-50\ \mu$ diam.) fulcentes nigri; conidia e denticulis apicalibus stipitum catenulatim exsurgentia, catenulis saepe subdichotomis, globosa ($6-7\ \mu$ diam.) laevia saepius grosse 1-guttulata.

68. *Cercospora yerbae* Speg. (n. sp.)

Diag. Maculae amphigenae callosae determinatae; acervuli hyppophylli erumpentes, hyphis brevibus olivaceis, conidiis clavatis 1-3-septatis chlorinis.

Hab. Ad folia languida *Ilicis amarae* prope Villa Encarnacion, Jan. 1907.

Obs. Maculae fuscae orbiculares ($2-5\ \text{mm}$ diam.) obsolete determinatae centro fuscescentes depressae ambitu incrassato callosulae; acervuli centro macularum dense aggregati punctiformes ($90-120\ \mu$ diam.) fusco-olivacei compactiusculi; hyphae erectae simplices ($25-50\ \mu$ long. $= 5\ \mu$ crass.) 1-3-septatae apice denticulatae; conidia recta v. curvula ad septa non v. vix constricta, apice obtusiuscula deorsum attenuato-acutata ($30-60\ \mu = 5\ \mu$), laevia aerogena.

69. *Helminthosporium yerbae* Speg. (n. sp.)

Diag. Atrum velutinum late ambiens; hyphae confertae erectae rigidulae fuligincae multiseptatae; conidia quandoque vermicularia 10-15 septulata quandoque breviter 3-5-septata semper fuliginea.

Hab. Ad ramos dejectos putrescentes in silvis circa San Pedro, Febr.

Obs. Plagulae difformes effusae ($1-25\ \text{mm}$ diam.) saepe confluentes nigrae; hyphae erectae pellucidae apice acutiusculae basi non v. vix subbulbosulae ($150-400\ \mu = 8-10\ \mu$) 3-7-septatae; conidia aerogena quandoque cylindracco-elliptica utrinque obtusiuscula ($40-60\ \mu = 12-14\ \mu$) quandoque elongata subhirudiniformia ($180-200\ \mu = 14-15\ \mu$) pellucida ad septa non constricta.

70. *Stysanus yerbae* Speg. (n. sp.)

Diag. Stipites laxi gregarii erecti tenues atrii apice subincrassati pollescentes; conidia elliptico-obovata minuta hyalina.

Hab. In disco ramorum excaesorum in dumetis circa *Campodas Cuias*, Febr.

Obs. Stipites crecti rigiduli (500-2500 μ alt.) e basi subbulbosula (50-60 μ diam.) sensim attenuati (40-25 μ) fibrosi, hyphis indistinctis, apice lanceolato-subcapitati pallescentes furfurcelli (40-60 μ diam.); conidia ex denticulis hypharum apicalium relaxatarum exsurgentia subcatenulata apice supero obtusa infero acutiuscula (5-8 μ = 2-3 μ) non v. minute 2-guttulata.

71. *Harpographium yerbae* Speg. (n. sp.)

Diag. *Erumpens* v. *denudatum*, caespitosum rigidum fragile fusco-atrum, stipitibus compressis sursum acutis laciniatis pallidioribus, conidiis clavulatis parvulis hyalinis.

Hab. Ad ramos dejectos putrescentes in silvis circa *San Pedro*, Feb.

Obs. Acervuli saepius lineares (1-5 mm long. = 1-1,5 mm lat.) primo erumpentes dein, cortice secedente, nudi; stipites numerosi conferti e nodulo stromatico communi exsurgentes (250-1500 μ alt. = 30-60 μ lat.) ex hyphis tenuibus (2-3,5 μ crass.) deorsum olivaceis coalescentibus sursum hyalinis relaxatis denticulatis septulatis efformati; conidia apice supero obtusiuscula infero attenuato-acutata (10-20 μ = 2,5 μ), saepius leniter curvula, continua eguttulata.

72. *Sphaeromyces maticola* Speg. (n. sp.)

Diag. *Sporidochia sublenticularia* olivacea glabra ex hyphis apice gelatinoso-deliquestentibus atque endosporas globoso-subcuboideas superpositas liberantibus efformata.

Hab. Vulgatum ad ramos dejectos putrescentes ubique.

Obs. Maculae nullae; sporidochia primo hemisphaerica dein orbiculari-depressa erumpentia v. superficialia in vivo carnosula in sicco subcornea; sterigmata clavulata (20 μ = 2 μ) in catenula sporarum mucoso-vaginarum producta; conidia e globoso subcuboidea tunica mucosa non v. vix perspicua obovoluta chlorinula (2 μ diam.) eguttulata.

CONSEJO DIRECTIVO

Presidente:

Ing. Agr. ERNESTO JORGE LANUSSE
Representante del Ministerio de Agricultura
y Ganadería de la Nación

Vicepresidente:

Dr. JACQUES RENE PARRAUD
Representante del Ministerio de Agricultura
y Ganadería de la Nación

Vocales:

Sr. ALBERTO HOGG
Representante de los productores a propuesta de la
Sociedad Rural Argentina

Ing. Agr. WALTER F. KUGLER
Representante de los productores a propuesta
de la Confederación Interooperativa Agropecuaria
Cooperativa Limitada

Ing. Agr. ALFREDO M. OFFERMANN
Representante de las Facultades de Agronomía y Veterinaria

Ing. Agr. RALF VON SOUBIRON
Representante de los productores a propuesta de las
Confederaciones Rurales Argentinas

DIRECCION NACIONAL

Ing. Agr. UBALDO C. GARCIA, *Director Nacional.*

Ing. Agr. ANGEL MARZOCCA, *Director Nacional Asistente de Investigaciones Especiales.*

Ing. Agr. NOBERTO A. REICHAUT, *Director Nacional Asistente de Extensión y Fomento.*

Dr. José María R. QUEVEDO, *Director Nacional Asistente de Investigación.*

Dr. AUGUSTO L. DURLACH, *Director Nacional Asistente en Programación y Evaluación.*

Cont. Púb. Nac. GIACOMO J. SANVELLI, *Director General de Administración.*

COMISION ASESORA DE PUBLICACIONES

Presidente: Ing. Agr. ARTURO E. RAGONESE.

Vicepresidente: Dr. VICTORIO C. F. CERO.

Vocales: Ings. Agrs. ROBERTO G. MALLO, FRANCISCO H. SANTORO, ARGENTINO DANFI, AUGUSTO CERCO, ALFREDO VILLAR. Doctores JOSÉ DORSI, ROBERTO CARAVELLO y ANTONIO DIOGLIO.

Secretario ejecutivo: Sr. CARLOS E. EABELL.

Secretaría de Redacción: Sra. María José BORAGNI.

Estudio microbiológico de la yerba mate (*Ilex paraguariensis*) en las fases iniciales de su elaboración, desde la cosecha hasta el secado

NYDIA YOLANDA SPEDALIERI DE NÚÑEZ¹

RESUMEN

Se hizo un estudio de la flora microbiana de la yerba mate (*Ilex paraguariensis*) y de sus modificaciones a través de las fases iniciales de elaboración para el consumo.

Se investigó la presencia de bacterias mesófilas, termófilas, aerobias, anaerobias, esporuladas, productoras de ácidos, reductoras de sulfito, hongos filamentosos y levaduras.

Las operaciones de secado y secado produjeron un marcado descenso en el número total de microorganismos por gramo del orden de 10 a 200 veces para la primera y de 100 a 700 veces para la segunda.

En todas las etapas predominaron las bacterias mesófilas, aerobias, productoras de ácidos.

SUMMARY

Microflora of yerba mate (*Ilex paraguariensis*) during the initial stages of its processing, from harvesting to drying

Microbial populations on samples of "yerba mate" (*Ilex paraguariensis*) during its processing were investigated

Aerobic, anaerobic, spore-forming, acid-producing, sulfite-reducing, mesophilic and thermophilic bacteria, molds and yeasts were enumerated after each treatment.

There was a remarkable decrease in microbial counts after the "sapeado" and after drying, the microorganism numbers per gram being 10 to 200 and

¹ Centro de Investigaciones en Ciencias Agronómicas, INTA, Castellar, Prov. de Buenos Aires, Argentina.

Publicación Técnica Fis. 113. Ingresó para su publicación en julio de 1971.

² Sapeado: Step of the process during which the leaves are withered but not scorched by exposing to the direct flames for some seconds.

Introducción

El proceso de elaboración de yerba para el consumo implica una serie de transformaciones que involucran cambios químicos, físicos y orgánicos a través de un lapso cuya duración oscila generalmente entre seis meses y un año. El estudio de esos cambios hasta alcanzar la calidad óptima y la regulación de los factores que los proveen ha originado numerosos trabajos en los que se detallan especialmente la composición química de la yerba mate y los métodos analíticos empleados para su determinación. En general no se hace referencia a microorganismos presentes en las distintas fases del proceso y menos aún a su posible intervención en la transformación del substrato. Las escasas citas sugieren que en la adquisición de las cualidades características de una buena yerba, los mecanismos enzimáticos que actúan, especialmente durante el estacionamiento, son de origen foliar y no microbiano.

El primer interrogante que se plantea entonces es qué flora microbiana está presente normalmente en la yerba mate, cómo evoluciona en las distintas etapas de elaboración, y si su presencia incide en la calidad del producto.

En esta primera parte del trabajo se entera ese estudio desde la cosecha de la planta hasta el secado, es decir, durante las operaciones previas al estacionamiento.

Antecedentes

En la amplia bibliografía sobre yerba mate, que abarca los temas más variados (1, 14), los escasos trabajos que se ocupan del aspecto microbiológico lo hacen desde el punto de vista patógeno o taxonómico, o bien se refieren al efecto del extracto vegetal sobre los microorganismos (7, 2).

La primera cita que encontramos en el país sobre el tema que nos ocupa data del año 1908. Su autor, Carlos Spegazzini (15), realiza un estudio en los yerbales del entonces Territorio Nacional de Misiones, e identifica sobre *Ilex paraguariensis* 72 especies de hongos, 55 de ellas nuevas, en cuya nomenclatura utiliza frecuentemente términos autóctonos o típicos, tales como "yerbeng", "mate" o "maticón" para designar la especie. La

En trabajos posteriores (11, 13), efectuados en Brasil, se describen especies de hongos patógenos citando alguno de los estudiados por Spegazzini.

MUTINELLI (8, 9, 10) en investigaciones hechas en yerba mate estacionada, con 9 % de humedad, indica la presencia de un hongo, *Penicillium roseum* que confiere al substrato olor y sabor desagradables. Refiriéndose a trabajos hechos en la Estación Experimental de Loreto, Misiones, dice que los cambios producidos en el estacionamiento parecen deberse a fenómenos químicos y no a una fermentación microbiana.

Material y métodos

Como la yerba mate está incluida dentro de los productos de consumo alimenticio se encaró el estudio microbiológico de la misma bajo ese aspecto, utilizando técnicas corrientes en este tipo de análisis, modificando o adaptando algunas de ellas de acuerdo con las exigencias del trabajo.

Se seleccionaron medios de cultivo en los cuales se pudieran identificar rápidamente grupos amplios de microorganismos con alguna característica común. Se investigó así la presencia de aerobios y anaerobios mesófilos y termófilos, y dentro de cada uno de ellos los que son o no esporulados y los productores de ácido. Interesaba también averiguar la presencia de microorganismos que, si bien compartían algunas características con los grupos ya citados, ofrecían por sí mismos un interés especial: tal el caso de bacterias líticas, reductoras de sulfuro con producción de ácido sulfídrico o el de levaduras y hongos filamentosos cuyo metabolismo es causante de modificaciones en las propiedades gustativas de muchos productos alimenticios.

El extracto de yerba no fue un medio apto para detectar cuantitativamente ni cualitativamente los microorganismos normalmente presentes en ese substrato, además de presentar otros inconvenientes tales como precipitación, alteración de color o transparencia del medio e interferencia con los indicadores.

Muestras: fueron enviadas por dos establecimientos elaboradores de yerba mate de las provincias de Corrientes y Misiones *.

* Agradecemos la valiosa colaboración de los Sres. Arturo Narvaes Arzaya y Jorge Eccentioffer por haber facilitado las muestras e informaciones necesarias.

Del establecimiento I se recibió el material de dos elaboraciones efectuadas en distintas fechas, de 5 muestras cada una, correspondientes a las siguientes etapas sucesivas: yerba verde, sapeado, enfriado, presecado y secado **.

Del establecimiento II se recibió el material de tres elaboraciones efectuadas en distintas fechas, de tres muestras cada una correspondientes a yerba verde, sapeado y secado.

Las muestras fueron envasadas en origen al finalizar cada operación, en frascos esterilizados, de vidrio color caramelo con tapa a rosca, cerrados con cinta engomada y enviados de inmediato al laboratorio en conservadora con hielo.

Preparación de las muestras:

Observando constantemente las condiciones de esterilidad se pesaron 200 g de yerba en frascos tarados con tapa esmerilada y se llevó a 200 ml con agua destilada, agitando vigorosamente durante cinco minutos; sin dejar reposar se filtró por gasa recogiendo el líquido en un frasco Erlenmeyer, hasta completo escurrimiento, sin presionar el contenido de la gasa; se uniformó la suspensión dividiéndola luego en dos porciones alícuotas, una de las cuales fue sometida a temperatura uniforme de 85° C durante cinco minutos, para investigación de formas esporuladas. De ambas porciones se prepararon diluciones adecuadas que permitieran lecturas entre 50 y 300 colonias por placa, expresándolas luego en número de microorganismos por gramo de yerba seca.

Medios de cultivo:

Los medios agarizados de dextrosa-triptona, nutritivo, sulfuro y papa glucosado acidificado fueron preparados según FRAZIER y FOSTER (4).

** Yerba verde: ramas y hojas de *Ilex paraguariensis* recién cosechadas y apiladas en planchadas.

Sapeado: tratamiento en el cual la yerba verde es sometida a un brusco calentamiento, de aproximadamente 350-450° C durante dos minutos y medio.

Enfriado: etapa en la cual la yerba permanece a temperatura ambiente durante dos horas y media.

Presecado: esta operación consiste en exponer el producto a un nuevo calentamiento, hasta alcanzar en cuatro minutos la temperatura de 100-110° C.

Secado: la yerba extendida en capas se mantiene a 110° C por circulación de aire caliente durante cuatro horas y media.

El medio agar sulfuro fue ligeramente modificado en su contenido de agar, disminuyendo la proporción según lo aconsejado por ELLER y colaboradores (4), para evitar que la formación de gas y la movilidad de las bacterias dificultaran las lecturas (5).

En cuanto al medio para bacterias lácticas se adoptó al descrito por FAUPEL y colaboradores (3), pero ante la imposibilidad de obtener la fórmula exacta de un producto comercial extranjero utilizado en su preparación, se trató de reproducirlo. Esta fórmula resultó muy adecuada para caracterizar lácticos aun cuando no fue un medio muy selectivo pues limita relativamente el desarrollo de esporulados.

Previamente se prepara el jugo de vegetales con partes iguales en peso de tomate, zanahoria, apio, remolacha, lechuga, espinaca, berro y una tercera parte de perejil, lavados y cortados, agregando agua en cantidad igual al peso total de los vegetales empleados. Se autoclava 10 minutos a 10 lb de presión (115° C) y se filtra. El pH será aproximadamente de 5.7. En el momento de usarlo agregar por litro 5 g de ClNa, 0.4 g de ácido ascórbico y 5 g de glutamato monosódico *.

El medio definitivo se complementa según indican los autores citados.

Siembr y recuento:

Para aerobios mesófilos y termófilos las placas se hicieron por quintuplicado con 1 ml de muestra y 20 ml de medio de cultivo incubándose a 37° C y 55° C respectivamente.

Para el recuento de aerobios totales y esporulados se usó el medio dextrosa triptona agarizado, con bromo cresol púrpura como indicador de colonias acidificadoras; como tales se consideraron aquellas que en algún momento acidificaron el medio aun cuando después hubiera desaparecido la reacción por envejecimiento o se hubiera modificado por influencia de otro microorganismo. En cada placa se contaron también los no productores de ácidos.

Para bacterias lácticas se empleó el medio específico con verde de bromocresol como indicador, efectuando la reacción de catalasa en los casos presuntivos.

Hongos filamentosos y levaduras fueron contados en agar papa glucosado acidificado y en agar mosto de malta incubándose a 29° C.

Se efectuaron lecturas a las 24, 48 y 72 horas de incubación excepto en las placas para mohos y levaduras que se prolongaron hasta cinco días.

* Agradecemos a la firma AJIOLTO Co. Inc., el habernos suministrado sin cargo el Glutamato monosódico.

Como medio de comparación se hicieron siembras paralelas en agar nutritivo que por ser menos selectivo podría dar mayor número de colonias.

El recuento de anaerobios totales y esporulados, mesófilos y termófilos se hizo en tubos por sexuplicado con 1 ml de la dilución adecuada y 20 ml de medio agar sulfito con capa de vaselina estéril, incubando a 37° C y 55° C respectivamente.

Tanto en unos como en otros se efectuó el recuento total de colonias y el de las que reducen sulfito con producción de ácido sulfhídrico, claramente identificadas por su color negro. Se anotó también la presencia de gas. Se hicieron lecturas diarias durante cinco días.

Resultados y discusión

En el Cuadro 1 se anotan los recuentos del total de microorganismos por gramo, en las muestras de yerba tomadas en las fases iniciales del proceso, desde la cosecha hasta el secado. Los recuentos parciales se presentan gráficamente.

CUADRO 1

Recuentos del total de microorganismos en las fases de elaboración de yerba mate

Establecimiento	Elaboración	Microorganismos por gramo de yerba ¹				
		Verba verde	Superado	Enfriado	Prescaldado	Secado
I.....	A	11,3 x 10 ⁴	13,5 x 10 ⁴	15,6 x 10 ⁴	15,1 x 10 ⁴	2,0 x 10 ²
	B	23,0 x 10 ⁴	23,1 x 10 ⁴	77,2 x 10 ³	10,7 x 10 ⁴	10,7 x 10 ³
II.....	C	51,0 x 10 ⁴	8,0 x 10 ³	—	—	3,7 x 10 ²
	D	50,1 x 10 ⁴	1,5 x 10 ²	—	—	5,4 x 10 ²
	E	17,0 x 10 ⁴	7,5 x 10 ⁴	—	—	2,2 x 10 ³

¹ Datos promedio de cinco lecturas.

La figura 1 es un gráfico comparativo, en escala semilogarítmica, de los recuentos de los grupos de microorganismos estudiados en cada una de las etapas correspondientes a distintas elaboraciones en dos establecimientos diferentes. Las letras mayúsculas indican las elaboraciones. En esta

figura se incluyen los datos de humedad de cada muestra a los efectos de poder relacionarlos con el número de microorganismos¹.

En la figura 2 se representa la frecuencia relativa (%) de microorganismos en % de muestras) de mesófilos, termófilos y esporulados de unos y otros en relación con las etapas donde se aprecian los desniveles más marcados, es decir, en yerba verde, sapeado y secado.

En la figura 3 se muestra la distribución de los principales grupos con respecto a la flora total, y en la figura 4, la de grupos similares dentro de mesófilos y termófilos.

En todos los resultados, cada dato es el promedio de cinco lecturas en aerobios y de seis en anaerobios, expresado en número de microorganismos por gramo de yerba seca.

En las muestras analizadas el pH se mantuvo entre 6,0 y 6,3.

De la observación de los resultados se deduce que, durante la elaboración la flora microbiana, inicialmente presente, sufre cambios que responden evidentemente a los tratamientos aplicados al sustrato donde los factores temperatura y humedad tienen un papel preponderante.

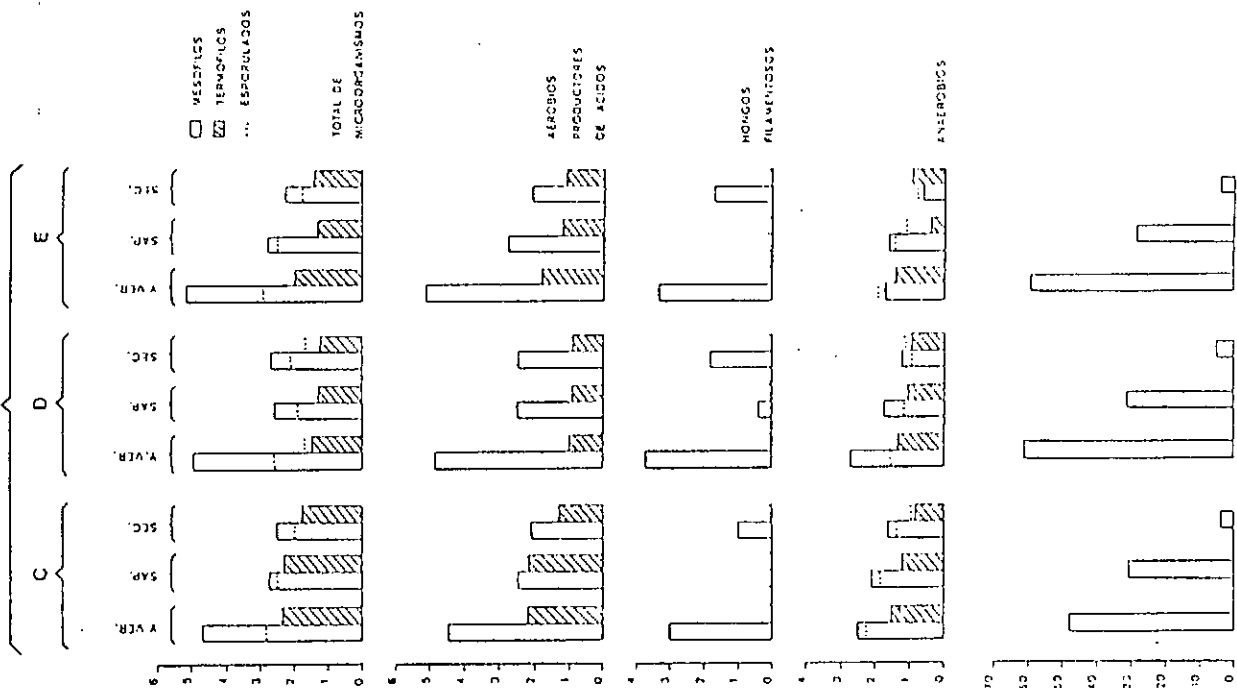
A partir de la yerba en planchada o yerba verde, es decir recién cortada de la planta, el número total de microorganismos, variable para cada establecimiento, sufre —como es lógico suponer— un brusco descenso en el sapeado, donde las altas temperaturas aun actuando durante muy breve tiempo destruyen gran parte de los mismos e impiden la proliferación de los sobrevivientes. El recuento total acusa una disminución de 10 a 200 veces con respecto al inicial de yerba verde (Figura 1). El sapeado equivale disminuyendo sólo de 1 a 4 veces por gramo y en algunos casos aumentando ligeramente (Figuras 1 y 2).

En el establecimiento I, en el enfriado, si bien el efecto drástico de la temperatura ha desaparecido y la humedad se mantiene dentro de límites tolerables, el número de microorganismos no varía notablemente.

Durante el prescaldado la yerba es sometida nuevamente a un calentamiento que supera los 100° C con su correspondiente pérdida de humedad; dada la brevedad de su duración el descenso del recuento total es poco apreciable, pero en la operación de secado en donde se mantiene esa temperatura cuatro horas y media, se produce una nueva disminución

¹ Agradecemos a la Dra. en Química Teresa Kotlan el habernos suministrado estos datos.

ESTABLECIMIENTO II



en muestras de yerba mate correspondientes a las sucesivas fases de elaboración. realizados por el Sr. Juan Carlos Giordano

ESTABLECIMIENTO I

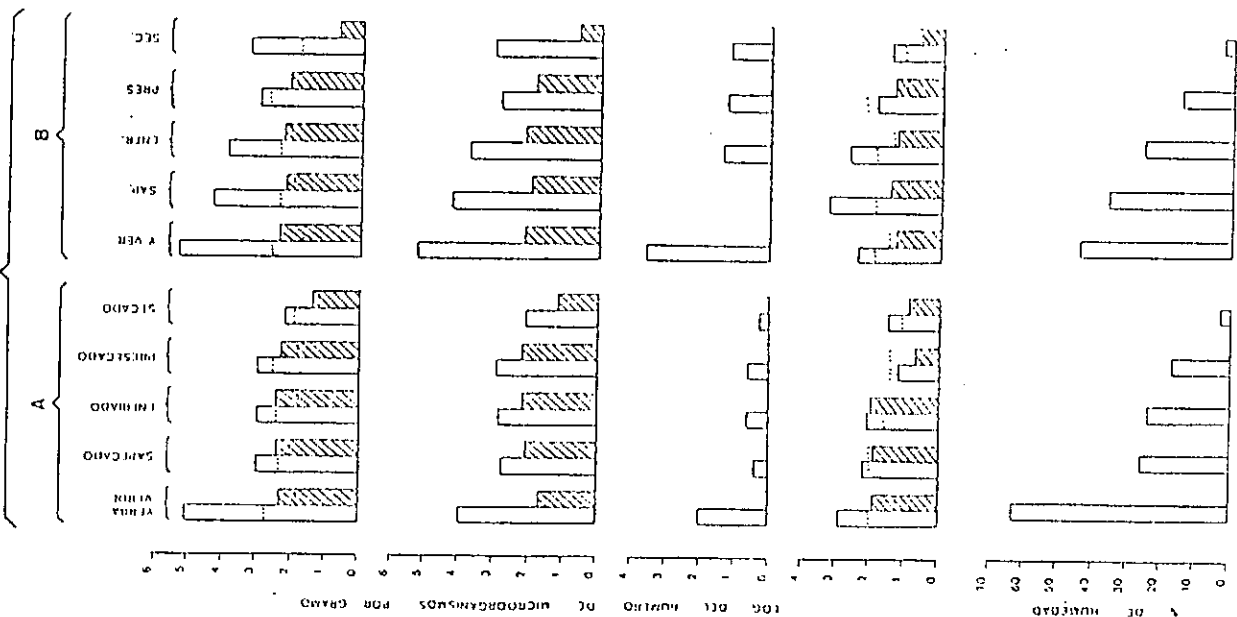


Fig. 1 — Recuentos de grupos de microorganismos y porcentaje de humedad en dos establecimientos. Los gráficos fueron

□ MESOFILOS
▨ ESPORULADOS
□ TERMOFILOS

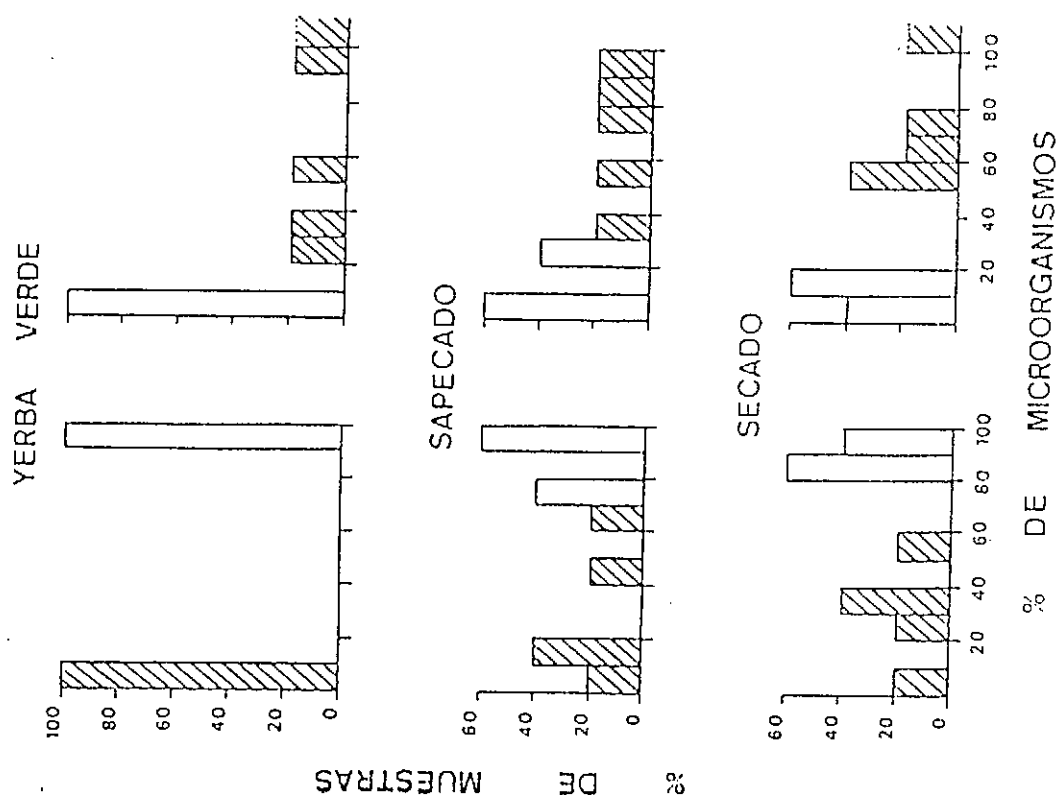


Fig. 2. — Frecuencia relativa de mesófilos, termófilos y esporulados respectivos en muestras de yerba verde, sapecado y secado

en la humedad que llega a sus valores más bajos (Fig. 1), creando un ambiente totalmente desfavorable al desarrollo microbiano, cuyas probabilidades de intervención en las transformaciones que pueda sufrir el subtrato son prácticamente nulas. El número total de microorganismos en esta fase es de 100 a 700 veces inferior al inicial, siendo los termófilos y esporulados los menos afectados (Figs. 1 y 2). El recuento total de mesófilos descendió de 100 a 800 veces con respecto al de yerba verde, pero los esporulados disminuyeron sólo de 3 a 12 veces por gramo. En termófilos la disminución fue de 1 a 8 veces con respecto a los iniciates y de 3 a 10 para los esporulados.

La flora anaerobia sufre fluctuaciones similares aunque menos marcadas. Desde el punto de vista cualitativo, la población microbiana que acompaña las fases de elaboración de yerba mate involucra una flora marcadamente mesófila y aerobia con predominio de microorganismos productores de ácidos (Figs. 3 y 4).

Los mesófilos constituyen en todas las muestras la mayor parte de la población. Su número es siempre superior al 70 % del total distribuyéndose los termófilos dentro del 30 % restante (Fig. 3).

Tanto en mesófilos como en termófilos predominan los aerobios productores de ácidos que superan en la mayoría de los casos el 50 % de los respectivos totales (Fig. 4).

Los esporulados totales aerobios y anaerobios están en menor proporción en mesófilos que en termófilos, agrupándose la mayor parte de los primeros por debajo del 50 % y los segundos desde el 20 % hasta más allá del 100 % en algunas muestras (Figs. 1 y 4); este hecho, aparentemente contradictorio se explicaría por el efecto estimulante que provoca la temperatura ("heat shock") en algunas esporas (⁶). El calor activaría ciertas enzimas que actúan en el metabolismo de glucosa y destruiría además sustancias inhibidoras de la germinación.

Dentro de los esporulados no hemos incluido a los hongos filamentosos debido a la mayor sensibilidad térmica de sus esporas que generalmente son menos resistentes que las de bacterias. Su presencia fue detectada en el 84 % de las muestras pero en proporción inferior al 30 % del total de mesófilos aerobios (Fig. 4). No se encontraron hongos termófilos.

En cuanto a los anaerobios presentes en todas las muestras, en mesófilos no alcanzan a superar el 30 %, pero en termófilos, si bien generalmente se mantienen en proporción similar, en algunos casos alcanzan hasta un 70 %. El recuento de anaerobios esporulados está dentro del 20 % en mesófilos, siendo superior en termófilos (Figs. 1 y 4).

FLORA TOTAL 7

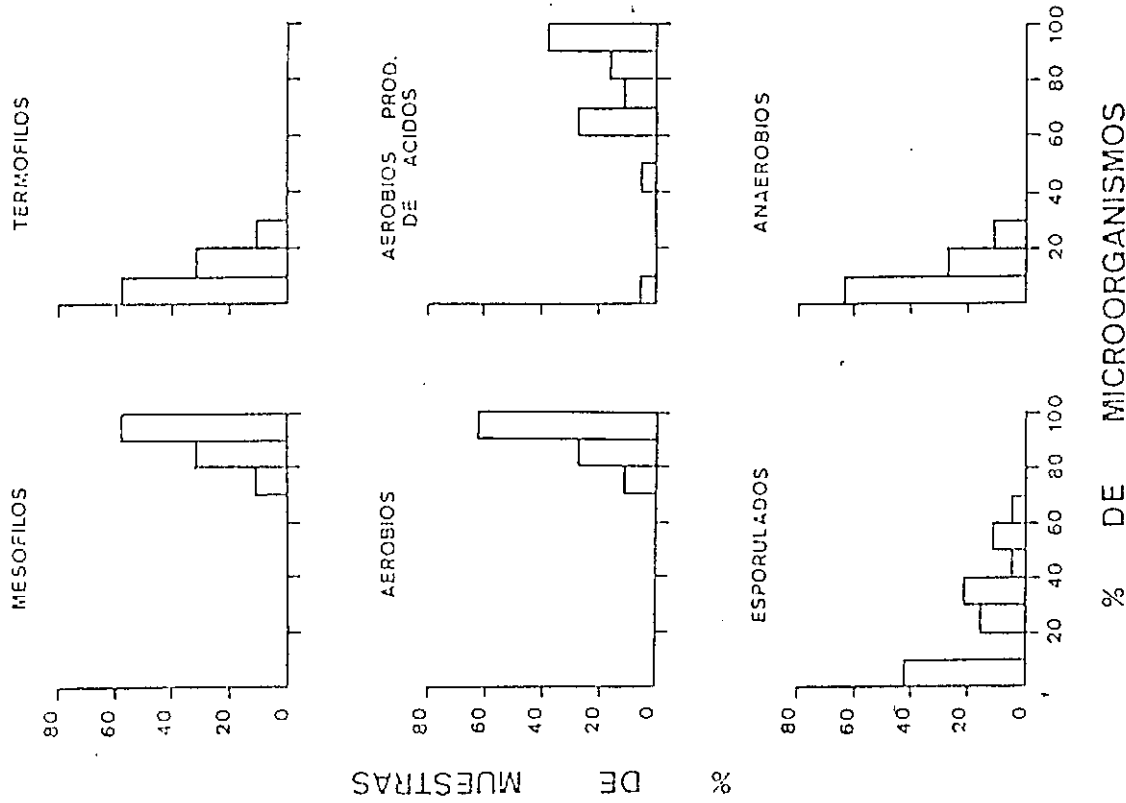


Fig. 3. — Frecuencia relativa de los grupos de microorganismos con respecto a la flora total en el total de muestras

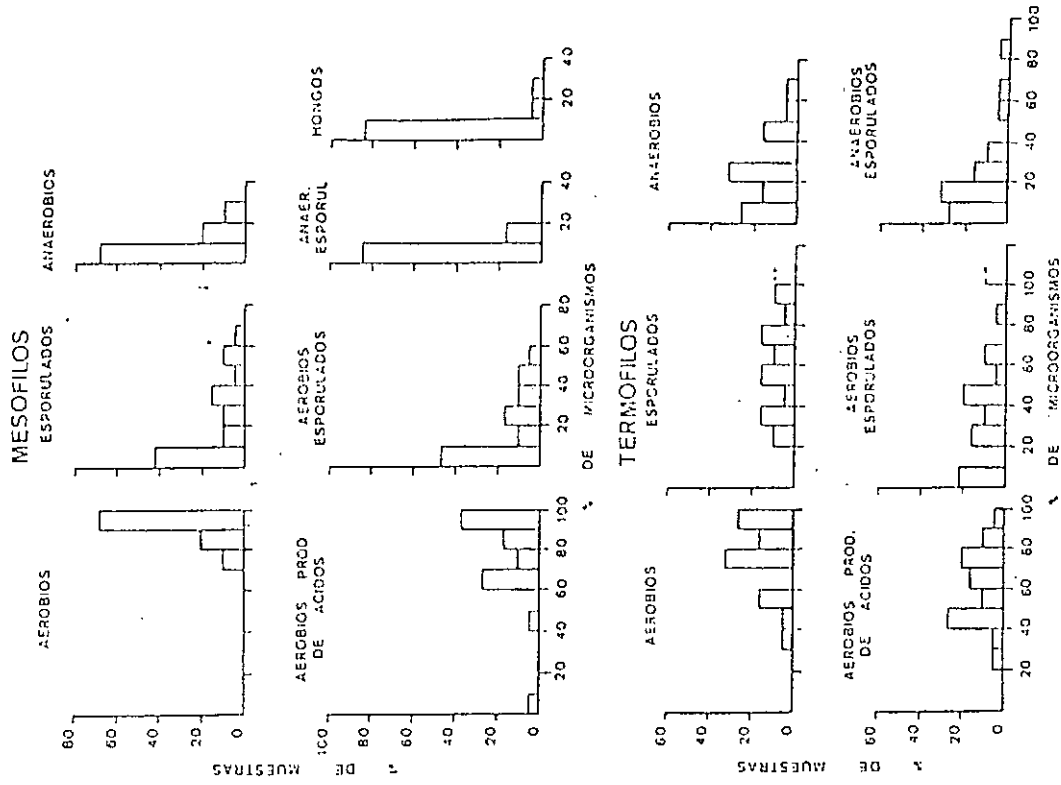


Fig. 4. — Frecuencia relativa de los grupos de microorganismos en mesófilos y termófilos en el total de muestras

1. En la flora microbiana inicialmente presente en yerba verde predominan los microorganismos mesófilos, aerobios, productores de ácidos.
2. Las sucesivas operaciones de elaboración afectan marcadamente la flora inicial, especialmente las de sapecado y secado por la elevada temperatura y reducida humedad que las caracterizan.
3. En las condiciones de elaboración de yerba mate previas al estacionamiento, es decir desde la cosecha hasta el secado, es poco probable una intervención microbiana activa en la modificación del substrato.

Bibliografía

1. CLOS, E. C. *Bibliografía anotada sobre yerba mate ("Ilex paraguayensis" Saint-Hilaire)*. — Boletín de la Cátedra de Agricultura, cultivos industriales, Fac. de Agron., Univ. Nac. La Plata, 1 (3), 1939. pp. 12-33.
2. ELLER, CH.; ROGERS, L. y WYNNE, E. S. *Agar Concentration in Counting Clostridium Coliforms*. — Appl. Microbiology, 15 (1), 1967. pp. 55-57.
3. FABIAN, F. W.; FULDE, R. C. y MERRICK, J. E. *A New V-S Medium for Determining Lactobacilli*. — Food Research, 18 (3), 1953. pp. 280-289.
4. FRAZIER, W. C. y FOSTER, E. M. *Laboratory Manual for Food Microbiology*. — Burgess Publ. Co., Minnesota, 1961. 131 pp.
5. GIBBS, B. M. y FREANE, B. *Methods for the Recovery of Clostridia from Foods*. — Jour. Appl. Bact., 28 (1), 1965. pp. 95-111.
6. HALVORSON, H. O. (Ed.) *Spores II. A Symposium Held at Allerton Park, Illinois, Oct. 22-23, 1960*. — Burgess Publishing Co., Minnesota, 1961. 296 pp.
7. LESAGE, J. *Acción del mate sobre los organismos inferiores*. — Rev. Centro Est. Agr. y Vet., Fac. Agron., Univ. de Buenos Aires, 1 (3), 1908, pp. 17-18.
8. MUTINELLI, A. *La yerba mate argentina, su composición química y características generales*. — Bol. Min. Agric., 36 (2), 1934. pp. 157-171.
9. — *El estacionamiento y la conservación de la yerba mate*. — Almanaque del Minist. de Agric., año 12, 1937. pp. 301-302.
10. — *Memorias de la Estación Experimental de Loreto*. (Misiones), 1957.
11. NOWACKI, M. J. *Algunos hongos parásitos de yerba mate ("Ilex" spp.) en Paraná*. — Archivos de Biología e Tecnología, IX (6), Estado do Paraná, Brasil, 1954. pp. 83-85.
12. OTERO, M. J. *Acción de la yerba mate ("Ilex paraguayensis") sobre la putrefacción intestinal*. — Anales del Instituto Medico de Clínica Médica, Fac. de Medicina, Univ. Nac. de Buenos Aires, XII, 1941. pp. 156-69.
13. PERSWAI, J. *As molestias e as Pragas mais comuns da Erva-mate no Pão Grande do Sul*. — Bol. 55, Secr. Agric. Ind. e Com., Rio Grande do Sul, Brasil, 1937. 30 pp.
14. SPAIN, E. *Bibliografía de la yerba mate ("Ilex paraguayensis" St. Hill)*. — Acad. Nac. de Ciencias, Miscelánea nº 22, Córdoba, 1937.
15. SPREGAZZINI, CARLOS. *Hongos de la yerba mate*. — An. Mus. Nac. de Hist. Nat., Buenos Aires, XVII, 1908, pp. 111-141.

Dentro de los anaerobios los reductores de sulfuro con producción de SH_2 , esporulados o no, aparecieron aisladamente en número prácticamente despreciable. Casi en su totalidad fueron observados en yerba verde del establecimiento II, desapareciendo después del sapecado.

En cuanto a levaduras sólo en 3 muestras fueron detectadas, en dos de ellas en forma aislada. En la tercera, correspondiente a la yerba verde —elaboración B del establecimiento II— el recuento alcanzó el 13 % del total de microorganismos.

En las condiciones ensayadas no se comprobó la presencia de bacterias lácticas. Prácticamente no se observaron colonias típicas y aun cuando en algún momento se hubieran encontrado, la reacción de catalasa fue positiva.

Resumiendo lo expuesto, diremos que el sapecado y secado son las operaciones más desfavorables no sólo al desarrollo sino también a la supervivencia microbiana. En el sapecado la brevedad de su duración, la falta de uniformidad en la temperatura del substrato, el contenido de humedad remanente y la presencia de formas resistentes impiden la eliminación total de la flora. En el secado, la temperatura excesiva aún para termófilos y la reducción en la humedad que llega a los valores más bajos registrados en todo el proceso, afectan por igual a toda la población.

El enfriado sería, entonces, la única etapa que permitiría un moderado desarrollo microbiano, por su duración y por las condiciones de humedad y temperatura. Contrariamente a lo esperado, los recuentos no fueron superiores a los del sapecado. Es posible que un mayor muestreo en el transcurso de esta operación permita valorar con más precisión su verdadera importancia.

En cuanto a las características de la flora, la predominancia de mesófilos aerobios es explicable por la naturaleza y origen del substrato donde no se dan condiciones para el desarrollo de termófilos y menos aún de anaerobios. A medida que transcurre el proceso se comprueba la menor resistencia de los mesófilos a los tratamientos; no obstante, mantienen su dominancia en la flora.

La contaminación ambiental, considerablemente alta en los lugares de elaboración, no parece jugar un papel muy importante ya que el gradiente marcado por la temperatura y humedad en el desarrollo microbiano no es significativamente alterado ni aún en las etapas donde las condiciones son más favorables.

Flora microbiana de la yerba mate (*Ilex paraguariensis*) durante el estacionamiento

NYDIA YOLANDA SPEDALIERI DE NÚÑEZ¹

RESUMEN

Se estudiaron las características y evolución de la flora microbiana en yerba estacionada en el lugar de origen durante nueve meses.

Las muestras provenientes de tres establecimientos de distintas zonas fueron analizadas mensualmente para investigar la presencia de bacterias mesófilas, termófilas, aerobias, anaerobias, esporuladas, productoras de ácidos, reductoras de sulfuro, hongos filamentosos, levaduras y actinomicetos. En todas ellas la flora presenta características similares con predominio de microorganismos mesófilos, aerobios, productores de ácidos y su número aumenta gradualmente con el tiempo de estacionamiento, siendo factores principales de esta distribución la composición del sustrato, el contenido de humedad y las condiciones ambientales.

SUMMARY

Microbial flora of stored yerba maté (*Ilex paraguariensis*.)

The characteristics and evolution of microbial groups on samples of yerba maté during its storage at three different factories were investigated.

Aerobic, anaerobic, spore-forming, acid-producing, sulfide-reducing, mesophilic and thermophilic bacteria, molds, yeasts and actinomycetes were enumerated monthly throughout a nine-month storage period.

A similar microflora was found on the product processed at different factories, the mesophilic aerobic acid-producing microorganisms being the predominant.

It is suggested that the principal factors influencing this distribution were the composition of the available nutrients, the moisture content and the environmental conditions.

¹ Centro de Investigaciones en Ciencias Agronómicas, INTA, Castelar, Prov. de Buenos Aires, Argentina.

Publicación Técnica Fis. 115. Ingresó para su publicación en julio de 1971.

Introducción

En la elaboración de la yerba mate se efectúan una serie de operaciones con el fin de lograr ciertas modificaciones que otorguen al substrato las cualidades requeridas para su consumo.

Cumplidas las etapas iniciales que finalizan con el secado, las hojas y ramas de yerba mate son fragmentadas en trozos más pequeños constituyendo la llamada "yerba canchada", en el lenguaje regional.

En la mayor parte de los establecimientos, la yerba mate canchada es envasada en bolsas no muy apretadamente, apiladas en amplios locales convenientemente aireados y protegidos de factores climáticos. En otros casos la yerba se almacena a granel en construcciones adecuadas o "noques". Se inicia entonces el llamado estacionamiento de la yerba mate, período en el cual adquiere gradualmente aroma, color y sabor característicos.

La naturaleza de los cambios que se producen durante este proceso ha sido enfocado en numerosos trabajos exclusivamente desde el punto de vista físico-químico, pero no microbiológico.

En un trabajo anterior (7) investigamos las características y evolución de la flora microbiana de la yerba mate en las fases iniciales de su elaboración desde la cosecha de la planta hasta la operación de secado. Continuando con él, realizamos un estudio similar durante el período de estacionamiento, analizando muestras mensuales desde el canchado hasta cumplido el noveno mes, con el fin de dilucidar la posible influencia de los microorganismos en la calidad del producto.

Antecedentes

No conocemos referencias sobre el tema que nos ocupa; las citas que anotamos a continuación describen fenómenos probablemente relacionados con la actividad microbiana en el proceso de elaboración de la yerba mate.

MUTINELLI (4, 6) en ensayos de laboratorio con varias muestras de yerba canchada y estacionada durante 6 meses, comprobó que: 1º) durante el estacionamiento se producía absorción de oxígeno y desprendimiento de anhídrido carbónico; 2º) en recipientes con yerba herméticamente cerrados se producía entrecimientamiento del aire y si se sometía el producto a una atmósfera de CO₂, no adquiría las características de un buen estacionado. También estudió la influencia de la temperatura sobre el proceso y llegó a la conclusión de que es activado por ésta. Sin embargo, ninguno de estos hechos lo relaciona con la presencia de microorganismos, atribuyendo el

estacionamiento a un fenómeno químico de oxidación y no a una fermentación microbiana; además, hace referencia a los agentes criptogámicos que desarrollan en yerbas con elevado contenido de humedad, alterando su calidad.

FANTI y KOHAN (1) comprueban también la absorción de oxígeno y el desprendimiento de anhídrido carbónico en yerba canchada y estacionada durante 29, 54 y 83 días a temperatura ambiente y a 47°C.

Material y métodos

Se utilizaron los mismos medios y técnicas descriptos en nuestro trabajo anterior (7).

El recuento de los diferentes grupos de microorganismos se hizo en forma análoga, completándolo con el de actinomicetes, que fue hecho en agar nutritivo, a 37°C y a 55°C.

Muestras: provienen de tres establecimientos, uno de la provincia de Corrientes, que envió mensualmente dos muestras de distintas elaboraciones y dos de la provincia de Misiones con una muestra mensual cada uno *. Estas fueron remitidas desde el lugar de origen, tomadas siempre de la misma bolsa ubicada en el local habitual de almacenado. Cada muestra fue remitida en bolsitas de lienzo protegidas por envoltura de plástico. El establecimiento III no envió yerba canchada. Las muestras correspondientes al cuarto y primer mes de estacionamiento, de los establecimientos I (elaboración a) y II, respectivamente, se extraviaron.

En cada muestra se determinó humedad y pH.

Resultados y discusión

En el cuadro I se anotan los recuentos totales de microorganismos en las muestras mensuales de cada establecimiento.

En las figuras 1 y 2 se representan gráficamente las fluctuaciones de los diferentes grupos microbianos y del contenido de humedad en función del tiempo de estacionamiento, y en la figura 3, la frecuencia relativa de los mismos en las muestras analizadas. En todos los resultados, cada dato es

* Agradecemos al Dr. Costa Paz y a los Sres. J. FERNANDEZ, A. NAVAJAS ARIZA, K. RANCIER y M. GARCIA por habernos enviado las muestras de yerba y posibilitado los análisis en sus establecimientos; al Ing. Agrón. JOSÉ ALBA POSE y a la Sra. LUISA Q. de GÓMEZ de la Agencia de Extensión de Obra. Misiones, por su valiosa colaboración.

Recuentos del total de microorganismos en yerba mate durante el período de estacionamiento

Etiología de la enfermedad	Muestra de estacionamiento								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1. <i>Aspergillus fumigatus</i>	17,4 × 10 ³	16,2 × 10 ³	32,1 × 10 ³	23,4 × 10 ³	18,8 × 10 ³	33,5 × 10 ³	33,4 × 10 ³	12,3 × 10 ³	23,8 × 10 ³
2. <i>Aspergillus niger</i>	7,8 × 10 ³	9,7 × 10 ³	90,1 × 10 ³	91,4 × 10 ³	19,5 × 10 ³	11,1 × 10 ³	27,8 × 10 ³	23,3 × 10 ³	41,0 × 10 ³
3. <i>Aspergillus terreus</i>	10,1 × 10 ³	—	6,9 × 10 ³	17,0 × 10 ³	5,7 × 10 ³	20,1 × 10 ³	17,8 × 10 ³	99,2 × 10 ³	41,5 × 10 ³
4. <i>Aspergillus nidulans</i>	—	—	—	—	—	—	—	—	—
5. <i>Aspergillus glaucus</i>	—	—	—	—	—	—	—	—	—
6. <i>Aspergillus oryzae</i>	—	—	—	—	—	—	—	—	—
7. <i>Aspergillus clavatus</i>	—	—	—	—	—	—	—	—	—
8. <i>Aspergillus versicolor</i>	—	—	—	—	—	—	—	—	—
9. <i>Aspergillus nidulans</i>	—	—	—	—	—	—	—	—	—

el promedio de las lecturas de cinco placas en aerobios y de seis tubos en anaerobios, expresado en número de microorganismos por gramo de yerba seca.

El pH en todas las muestras se mantuvo entre 6,0 y 6,3, con una excepción: establecimiento I, elaboración a, segundo mes de estacionamiento que dio 5,8.

Como puede verse en el cuadro I, a partir de la yerba canchada, el número total de microorganismos, que en general desciende en los primeros meses de estacionamiento, alcanza sus valores máximos en el quinto, sexto o noveno mes.

Considerando los grupos separadamente, los mesófilos y en especial los aerobios productores de ácidos responden casi exactamente a ese mismo esquema con valores máximos entre 10⁴ y 10⁵ por gramo (figura 1) mientras que los termófilos se mantienen más constantes, dentro de niveles más bajos, en general inferiores a 10³ (figura 2). Las variantes observadas en los mesófilos parecen estar estrechamente ligadas al factor humedad (figura 1).

Los esporulados y los anaerobios tanto en mesófilos como en termófilos están en menor número, y los cambios consignados a través de todo el período de estacionamiento no superan el nivel de 10³ por gramo de yerba (figuras 1 y 2). Los mesófilos anaerobios reductores de sulfito con producción de ácido sulfhídrico, totales o esporulados, se observaron sólo en un 36 % de las muestras; en general, fueron muy escasos con valores inferiores a 10² y su distribución, aleatoria. En termófilos prácticamente no se encontraron reductores de sulfito.

Hongos filamentosos mesófilos fueron detectados en todas las muestras y su número se eleva paulatinamente con el estacionamiento, alcanzando valores máximos de 10⁴ y 10⁵ por gramo (figura 1). En termófilos, en tres de las cuatro elaboraciones estudiadas, frecuentemente se observó la presencia de colonias de hongos que, si bien no desarrollaban normalmente debido a la alta temperatura de incubación, igualmente fueron cultivados en forma separada. Aislados e identificados se comprobó que la mayor parte pertenecía a una misma especie, *Aspergillus fumigatus*, precisamente la única del género que desarrolla bien a 45° C y aun a 50° C (19). Especies de *Mucor* y *Rhizopus* aparecieron esporádicamente, presentando un aspecto completamente anormal.

Las levaduras sólo aparecen en los meses finales pero su ascenso es rápido. En el establecimiento II su presencia fue registrada recién al octavo mes. Los más altos recuentos alcanzaron a 10⁵ con excepción de

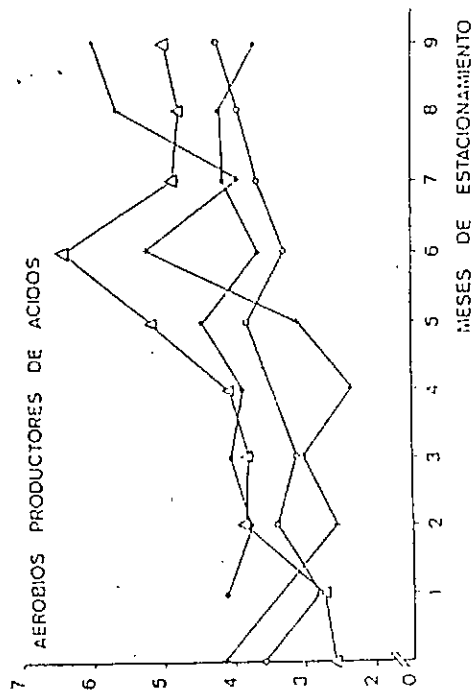
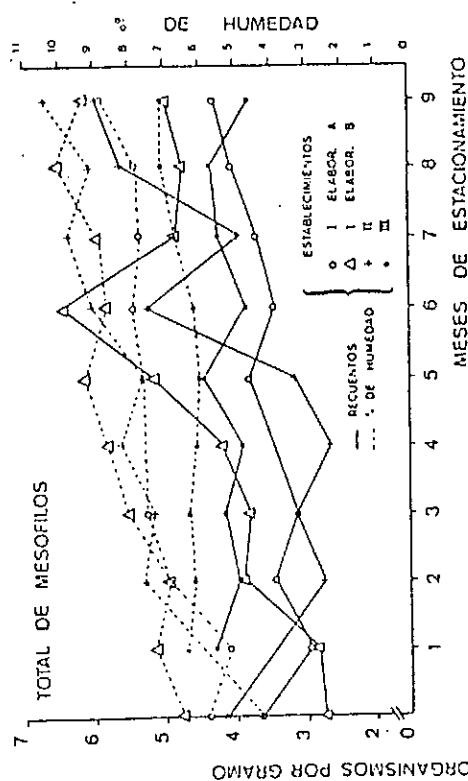


Fig. 1. — Recuentos de microorganismos mesófilos y contenido de humedad en muestras de yerba mate estacionada en tres establecimientos diferentes, (órdenes verticales por el Sr. J. C. Giordano).

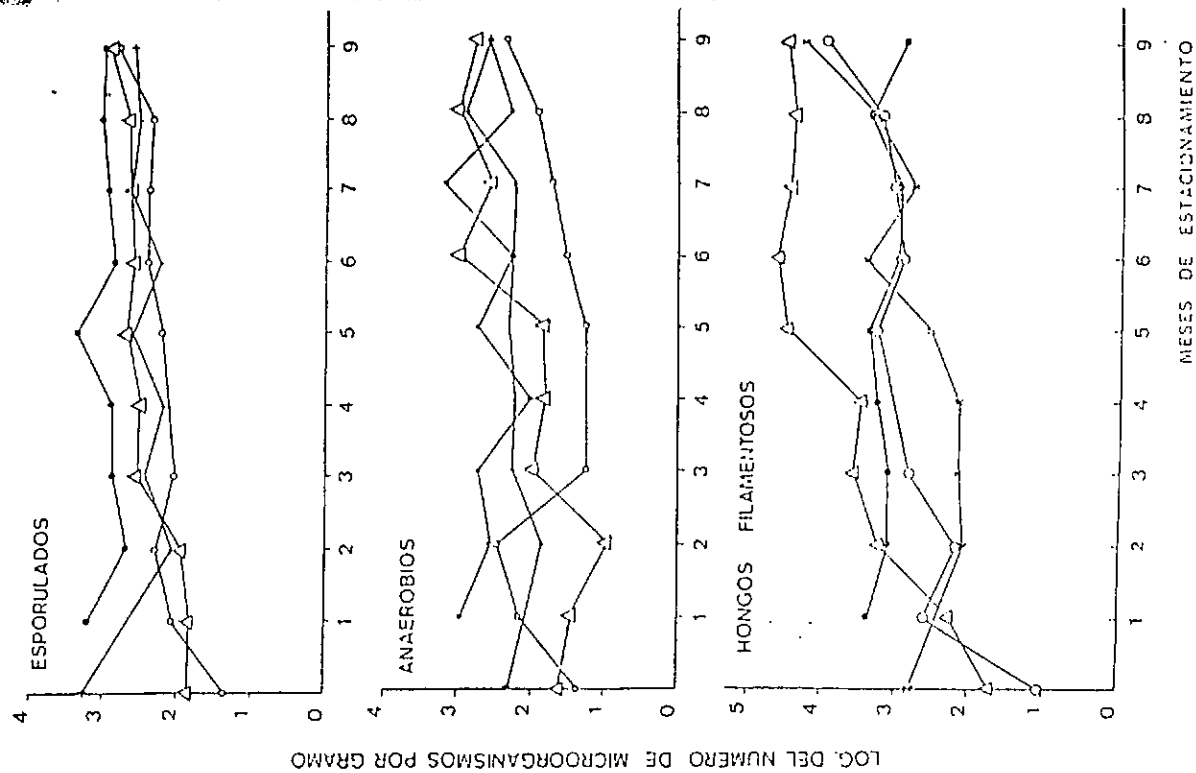


Fig. 1 (cont.)

cación b, establecimiento I, que llegó a 10^5 por gramo en el

anto a los actinomicetes mesófilos, representados por el género *Streptomyces*, contrariamente a lo que sucede con las levaduras, aparecen en los primeros meses de estacionamiento, aunque en forma discontinua en el octavo o noveno mes desaparecen. En el establecimiento II se observaron, en forma aislada, en el cuarto mes.

termo-resistentes de *Streptomyces* se presentaron en mayor frecuencia, si bien las colonias no llegaban a esporular o lo hacían pobremente, en el establecimiento II su aparición fue esporádica, quinto y noveno mes). Tanto en mesófilos como en termófilos los recuentos fueron superiores a 10^3 por gramo.

Respecto a la distribución de los diferentes grupos en el total de la flora predominante es mesófila y constituye entre 80 y 90% la flora total en el 82% de las muestras y de 50 a 80% antes (figura 3). En todos los casos, los termófilos están denotados inferiores al 50%.

de los mesófilos, los aerobios se distribuyen entre el 60 y el 100% los productores de ácidos entre el 50 y el 100%. La mayor parte de los esporulados está por debajo del 20%, al igual que los anaerobios filamentosos, en número bastante apreciable están distribuidos entre el 50% y las levaduras en su mayoría, se agrupan en proporción al 20%, aun cuando en algunas muestras superen el 50%.

La explicación de este hecho estaría en la especificidad de cada medio, que favorece el crecimiento de determinadas levaduras y en el medio donde se hizo el recuento total.

En la distribución de los mismos grupos en termófilos, vemos que es más variable y por lo tanto más irregular entre las muestras. Si bien la mayor parte de los microorganismos es aerobia, los aerobios varían de 0 a 90% en relación al total de los esporulados también abarcan diferentes porcentajes y en algunas llegan a superar el 100% del total, hecho ya explicado en el trabajo anterior (7).

Los termófilos están dentro de límites bajos, por lo general entre 10 y 40% del total respectivo.

En una flora similar en yerbas elaboradas en distintas fermentos establecimientos de diversa ubicación geográfica, importancia de factores comunes de decisiva importancia en su

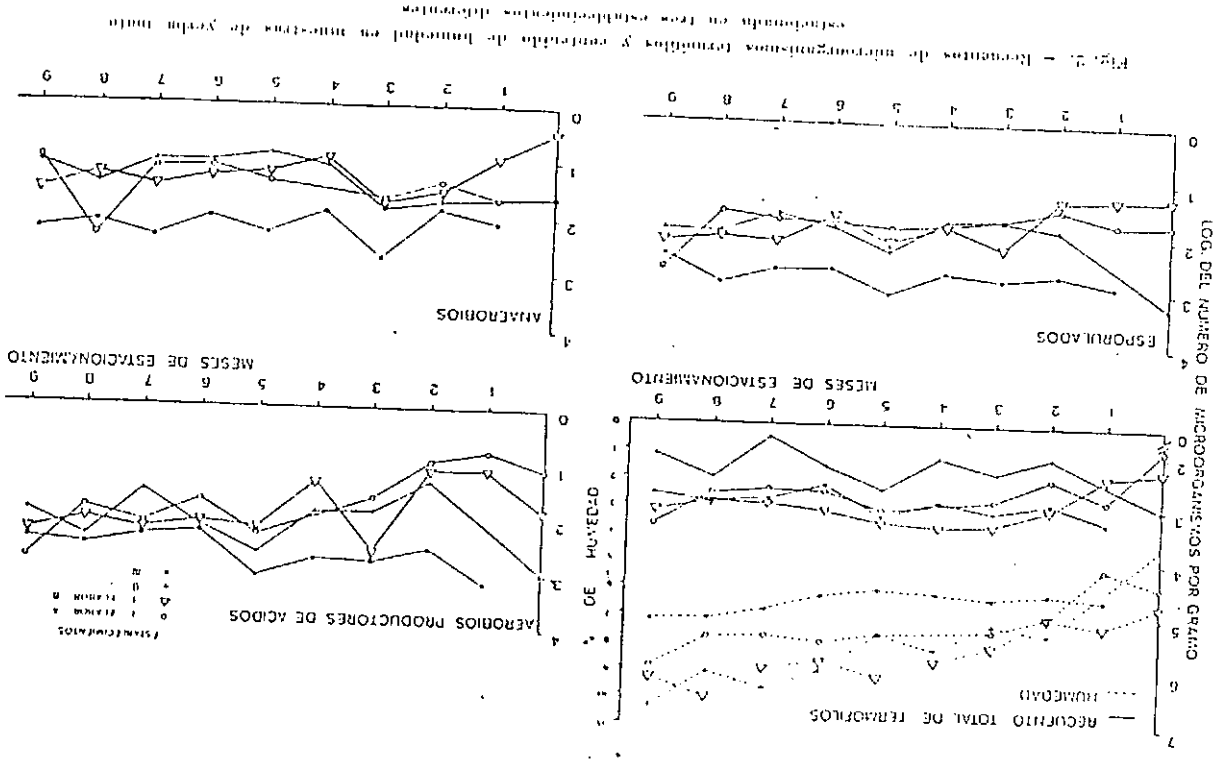


Fig. 2. - Distribución de microorganismos termófilos y mesófilos en muestras de yerba mate estacionada en tres establecimientos diferentes.

selectividad, entre los cuales deben considerarse como principales la composición química del sustrato, las condiciones de almacenamiento y la contaminación ambiental.

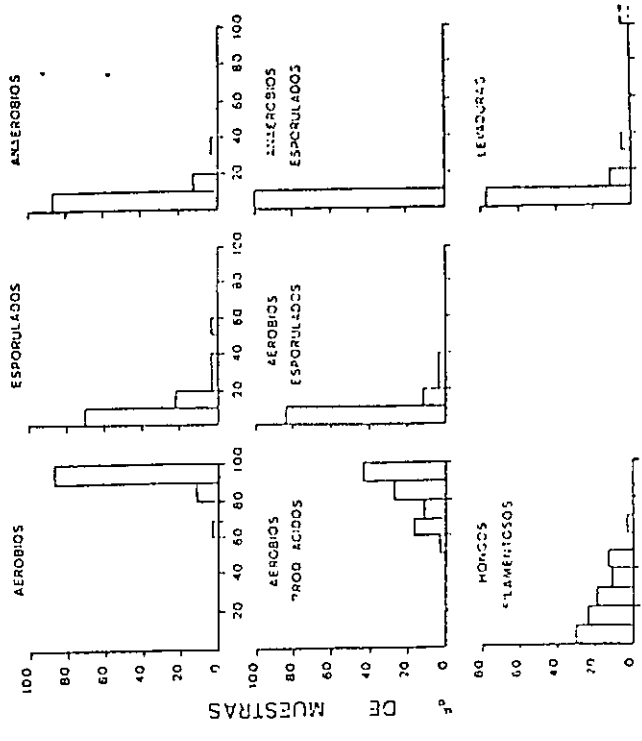
Composición química del sustrato: la yerba mate no constituye un medio ideal para el desarrollo microbiano, no tanto por falta de elementos nutritivos aprovechables como por su contenido de sustancias inhibidoras y por su escaso tenor de humedad. La proporción de hidratos de carbono, sustancias nitrogenadas, factores de crecimiento, elementos minerales, etc. (2, 3, 5, 8, 9) satisface las exigencias de grupos amplios de microorganismos pero la presencia de cafeína, fenoles y tanoides limita mucho sus posibilidades desde ese punto de vista. Por otra parte, el contenido de humedad, que en yerbas de consumo no debe superar el 11 %, es también un regulador de la flora que acompaña sus fluctuaciones en forma casi paralela. A partir de la yerba canchada hasta el fin del estacionamiento, la humedad absorbida por el sustrato y los recuentos de la flora total siguen una línea ascendente. En el caso de que por alguna razón, sea superado el límite de humedad impuesto por la calidad del producto, éste comienza a deteriorarse rápidamente adquiriendo sabor desagradable, índice de una mayor proliferación microbiana que incluye probablemente especies no deseables.

Estrechamente ligadas a este factor están las condiciones de almacenamiento existentes en los locales donde se estaciona la yerba. Aun cuando en la mayoría de los establecimientos no hay control estricto de temperatura y humedad, los locales contruidos con materiales apropiados mantienen el producto en condiciones adecuadas de tal modo que no se produce acumulación excesiva de calor, humedad o anhídrido carbónico. Lógicamente, un prolongado estacionamiento aumenta el riesgo para la calidad de la yerba.

En cuanto a la influencia de la contaminación ambiental, si bien ésta es inevitable, parecería que existiera una selectividad impuesta por el sustrato ya que su flora es menos variada y numerosa que la registrada en los análisis del aire de los locales.

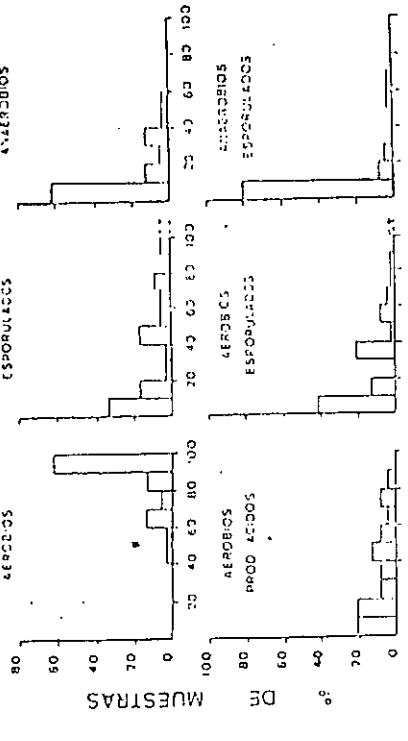
Puesto que es indispensable un mínimo período de estacionamiento para que la yerba adquiera el aroma, color y sabor adecuados, ello significa que durante ese lapso se producen reacciones físico-químicas de origen intrínseco y extrínseco. Además de las modificaciones organolépticas se ha comprobado una mayor absorción de oxígeno en la yerba estacionada en condiciones, así como una alteración de sus cualidades provocada experimentalmente por acción de excesivo anhídrido carbónico (4).

MESOFILOS



% DE MICROORGANISMOS

TERMOFILOS



% DE MICROORGANISMOS

Fig. 3. — Frecuencia relativa de los grupos de microorganismos mesófilos y termófilos en el total de muestras.

el momento que existe una flora característica que evoluciona el tiempo y que está regulada por factores estrechamente ligada al producto, es evidente que dicha flora vive a expensas de la cual debe necesariamente modificarse, pues aun cuando se permanezca sobre él, el mínimo metabolismo de subsistencia ocasiona cambios.

Si bien sean las transformaciones químicas que se producen durante el estacionamiento, parte de las mismas debe ser atribuida a la acción de la flora. Queda aún por definirse la magnitud de esa intervención y la forma de controlarla para mejorar o abreviar el proceso. La regulación de los grupos microbianos favorables, sea por inoculación de los mismos o por control de condiciones óptimas para su desarrollo, puede ser un rumbo en la industria de la yerba mate.

tes

Las muestras analizadas de yerba mate estacionada de tres estaciones de distintas zonas existe una flora microbiana similar, en la que predominan microorganismos mesófilos, aerobios productores de ácidos. A través del período de estacionamiento se producen fluctuaciones en el número de microorganismos, con aumentos más marcados a partir de los meses, en estrecha relación con el contenido de humedad.

En las fases finales del estacionamiento, la flora normalmente presente en la yerba mate difiere de la ambiental, siendo inferior en número y variedad de especies por lo que se deduce que existe una adaptación de determinados microorganismos por el sustrato.

La existencia activa de diversos grupos microbianos, así como la desaparición de otros durante el estacionamiento implica modificaciones en el sustrato que evidencian la intervención de los mismos en el producto.

Es interesante controlar la acción microbiana favoreciendo el desarrollo de grupos determinados o inoculando otros, con el fin de regular el proceso de estacionamiento.

3

O. D. y KOBAN, I. *Fijación de oxígeno en la yerba mate conchada sin estacionar*. — Rev. Invest. Agrop., 7 (3), 1970, pp. 185-196.

INSTITUTO NACIONAL DE LA NUTRICIÓN. *Composición química de la yerba mate*. — Revista de la Asociación Argentina de dietología, N° 5, 1944.

3. MONTES, A. L. *Bromatología*, t. I, Eudeba, Bs. As., 1966, 531 pp.
4. MICHINELLI, A. *Memorias de la Estación Experimental de Loreto, Misiones*, 1933, 1937.
5. — *La yerba mate argentina, su composición química y características generales*. — Bol. Min. Agr., 36 (2), 1934, pp. 137-171.
6. — *El estacionamiento y la conservación de la yerba mate*. — Almanaque del Ministerio de Agricultura, año 12, 1937, pp. 301-302.
7. NÚÑEZ, N. Y. S. DE. *Estudio microbiológico de la yerba mate ("Ilex paraguariensis") en las fases iniciales de su elaboración, desde la cosecha hasta el secado*. — 1971 (En Prensa).
8. ORTIZ, M. J. *Las vitaminas de la yerba mate*. — Congreso Internacional de Biología, 8 al 12 octubre de 1940, Montevideo, 1940.
9. — *Acción de la yerba mate ("Ilex paraguariensis") sobre la putrefacción intestinal*. — Anales del Instituto Modelo de Clínica Médica, Fac. de Medicina, Univ. Nac. de Buenos Aires, XII, 1941, pp. 156-169.
10. RAPER, K. B. y FENNELL, D. I. *The genus "Aspergillus"*. — The Williams & Wilkins Co., Baltimore, 1965, 686 pp.

ANEXO VI



INSTITUTO ARGENTINO DE NORMALIZACIÓN

Asociación Civil Sin Fines de Lucro

Perú 552/556 - (1068) Buenos Aires - Argentina ☎ + 54 11 4 345-6606
e-mail: iram3@vianetworks.net.ar / iram4@vianetworks.net.ar

Miembro de ISO
(International Organization for Standardization)
Miembro de COPANT
(Comisión Panamericana de Normas Técnicas)
Miembro del CMN
(Comité Mercosur de Normalización)

Fax: + 54 11 4 345-3468
<http://www.iram.com.ar>

INVITACIÓN PARA REUNIÓN DE NORMALIZACIÓN

Coordinador de los Subcomités de Yerba Maté y Té, tiene el agrado de invitar a Ud. la reunión que se realizará el día y hora que se indica a continuación, para considerar el orden del día previsto.

Fecha: Jueves 18 y Viernes 19 de Noviembre de 1999
hora: 10 h
Coordinador: Lic. Juan Carlos Troiano
Lugar: CLUB SOCIAL OBERÁ
Av. Sarmiento. OBERÁ - Pcia. de Misiones

ORDEN DEL DÍA

- 1) Acta de la reunión anterior (Acta 1-1999).
- 2) Asuntos entrados.
- 3) Esquema 1 de norma IRAM 20550-3. Yerba mate. Buenas prácticas de manufactura. Recomendaciones para la transformación primaria.
- 4) Antecedentes para el estudio de la norma IRAM 20550-4. Yerba mate. Buenas prácticas de manufactura. Recomendaciones para el estacionamiento y la molinería.
- 5) Esquema A1 de norma IRAM 20650-1. Té negro. Buenas prácticas de manufactura. Recomendaciones generales.
- 6) Esquema A1 de norma IRAM 20650-2. Té negro. Buenas prácticas de manufactura. Recomendaciones sobre la materia prima.
- 7) Esquema A1 de norma IRAM 20650-3. Té negro. Buenas prácticas de manufactura. Recomendaciones sobre la elaboración.
- 8) Esquema 1 de norma IRAM-ISO 3720. Té negro. Definición y requisitos básicos.

Adj.: Acta 1-1999.

D. Rogamos, por razones de organización, confirme su presencia hasta el 11 de Noviembre mediante llamada al (011) 43 45 66 06, internos 225 ó 226; fax al (011) 43 45 34 68, o al 43 45 66 06, interno 205; o e-mail a caa-las@sminter.com.ar.