

Universidad Nacional de Misiones. Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales. Doctorado en Ciencias Aplicadas

Doctoranda
Mgter. Ana Eugenia Thea

“Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAPs) en yerba mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) de origen argentino: Influencia del procesamiento y contenido en las diferentes formas de consumo”

Tesis de Doctorado presentada para obtener el título de “Doctor en Ciencias Aplicadas”

Director
Dr. Miguel Eduardo SCHMALKO

Posadas, 2016



Esta obra está licenciada bajo Licencia Creative Commons (CC) Atribución-NoComercial-Compartir Igual 4.0 Internacional <https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>



Universidad Nacional de Misiones
Facultad de Ciencias Exactas,
Químicas y Naturales



Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAPs) en yerba mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) de origen argentino: Influencia del procesamiento y contenido en las diferentes formas de consumo

Por Mgter. Ana Eugenia THEA

Tesis presentada a la Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales de la Universidad Nacional de Misiones para optar al grado académico de

DOCTOR EN CIENCIAS APLICADAS

Posadas, República Argentina

2016

Director
Dr. Miguel Eduardo SCHMALKO

TRIBUNAL EXAMINADOR (Resolución Consejo Directivo N° 369-15)

Dra. Sandra Norma GUERRERO Universidad de Buenos Aires

Dra. Nelly Lidia JORGE Universidad Nacional del Nordeste

Dra. Beatriz del Valle ARGÜELLO Universidad Nacional de Misiones

DEFENSA ORAL Y PÚBLICA (Resolución Consejo Directivo N° 008-16)

Posadas, 25 de Febrero de 2016

Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAPs) en yerba mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) de origen argentino: Influencia del procesamiento y contenido en las diferentes formas de consumo

Mgter. Ana Eugenia THEA

**Laboratorio de Yerba Mate y Laboratorio Central
Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales
Universidad Nacional de Misiones**

**Laboratorio de la Fundación para el Desarrollo e Investigación Científica y
Tecnológica-DINCYT**

COMISIÓN DE SUPERVISIÓN (Resolución Consejo Directivo N° 056-13)

Dr. José Luis HERRERA Universidad Nacional de Misiones

Dr. David BRUSILOVSKY Universidad Nacional de Misiones

Dr. Marcos MAIOCCHI Universidad Nacional del Nordeste

CARRERA DE DOCTORADO EN CIENCIAS APLICADAS

Proyecto de Carrera N° 10933/11
Con reconocimiento de la Comisión Nacional de Evaluación y Acreditación Universitaria
(CONEAU) N° 344/11.

AGRADECIMIENTOS

Al Instituto Nacional de la Yerba Mate (INYM) y CONICET por el apoyo financiero brindado para la realización del presente Trabajo de Tesis.

A mi Director de Tesis, Dr. Miguel E. Schmalko y al Dr. Luis A. Brumovsky, Codirector de Beca, quienes me han orientado y motivado durante todos estos años. Gracias por su generosidad, dedicación, paciencia, por todo el tiempo invertido en solucionar mis planteos y por emprender, junto conmigo y con mucho entusiasmo, cada uno de los desafíos que se nos han presentado a lo largo de este tiempo juntos.

Es importante destacar que esta Tesis ha sido resultado del esfuerzo conjunto de personas que me han acompañado, de manera desinteresada, y han prestado su tiempo y su experiencia para la realización de la misma. Por este motivo, quiero agradecer muy especialmente al personal del Área Técnica del INYM, Ing. Raúl Escalada, Ing. Verónica Scalerandi e Ing. Matías Bazila, y a mi compañero de Laboratorio Ing. Santiago Holowaty por su ayuda e implicación con todas las actividades realizadas durante el desarrollo de la Tesis. Gracias a todo el personal del Laboratorio de la Fundación DINCyT, especialmente a la Bqca. Raquel Fretes, Paola Novo y Adriana Yagas por su colaboración incondicional. Gracias a todos los integrantes del Laboratorio Central de nuestra Facultad, especialmente al Ing. Darío Ferreyra, Ing. Nicolás Kolb y a la Lic. Agustina Le Vraux, por toda la ayuda brindada y todo el tiempo compartido.

RESUMEN

Durante las dos primeras etapas del procesamiento de la yerba mate (*I. paraguariensis* St. Hil.) (zapecado y secado, respectivamente), las ramas de *I. paraguariensis* entran en contacto directo con una mezcla de aire y gases de combustión provenientes del quemado de biomasa forestal. Si bien en la etapa de zapecado existe bastante uniformidad en los equipos utilizados, durante el secado, el tiempo de contacto entre el material y los gases de combustión varían de acuerdo al tipo de secadero. Muchos contaminantes químicos se forman durante la combustión incompleta de la materia orgánica utilizada como combustible en el procesado de los alimentos. Entre los ejemplos se encuentran los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs), agentes potencialmente mutagénicos y carcinogénicos para el hombre. Este hecho ha despertado un gran interés por estos compuestos como contaminantes alimentarios, y en el año 2008, la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) determinó que la caracterización del riesgo de exposición a los HAPs a través de los alimentos, puede realizarse en base a los 8 compuestos sobre los cuales existe información relativa a su carcinogenicidad por vía oral, denominados en conjunto, PAH8. Los HAPs que integran el grupo PAH8 son: benzo[a] antraceno (BaA), criseno (Chry), benzo[b] fluoranteno (BbF), benzo[k] fluoranteno (BkF), benzo[a] pireno (BaP), dibenzo[a,h] antraceno (DaA), benzo[g,h,i] perileno (BPe) e indeno[1,2,3-c] pireno (IcP). En el año 2011, la Comunidad Europea legisló los límites máximos permitidos para los HAPs en diversos alimentos. Estos requerimientos se expresan en términos de BaP, único HAP considerado carcinogénico para el hombre, y PAH4 (suma de BaA, Chry, BbF y BaP), marcador de presencia y toxicidad por HAPs en los alimentos. La presencia de HAPs en yerba mate ha sido reportada en algunos trabajos. Sin embargo, no existen estudios sobre los niveles de HAPs durante las diferentes etapas del proceso de elaboración de la yerba mate argentina, como tampoco reportes referentes al contenido de HAPs en las formas tradicionales de consumo del producto (mate caliente, mate frío y mate cocido).

Los principales objetivos del presente trabajo de tesis fueron: *a)* desarrollar y validar un método analítico para la detección y cuantificación de PAH8 en muestras de yerba mate y en las infusiones tradicionalmente preparadas con yerba mate; *b)* determinar la presencia de PAH8 en la yerba mate durante el proceso de manufactura e identificar la(s) etapa(s) donde se incorporan al producto; *c)* estudiar la ocurrencia de PAH8 en muestras comerciales de yerba mate elaborada y yerba mate envasada en saquitos y *d)* determinar el contenido de PAH8 en las principales formas de consumo de la yerba mate (mate caliente, mate frío y mate cocido).

Para la extracción de los compuestos de interés a partir de la yerba mate y de las infusiones se desarrollaron procedimientos de extracción asistida por ultrasonido (UAE) y extracción líquido-líquido (LLE), respectivamente, utilizando ciclohexano como disolvente de extracción, con una posterior etapa de purificación de los extractos por extracción en fase sólida (SPE) con cartuchos comerciales de sílica. Para la identificación y cuantificación de los HAPs extraídos de las muestras, se desarrolló y validó una metodología por cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa con detección de fluorescencia (RP-HPLC-FLD). La técnica analítica desarrollada fue evaluada teniendo en cuenta los siguientes parámetros de validación: linealidad, exactitud (ensayos de recuperación), precisión, límites de detección y límites de cuantificación.

El contenido de PAH8 de la yerba mate sin procesar osciló entre no detectable y 7,7 µg/kg de la materia seca, mientras que en la yerba mate zapecada y canchada (secada) los niveles de PAH8 variaron entre no cuantificable y 408,8 y 10,6 y 478,6 µg/kg de la materia seca, respectivamente. En los establecimientos en los que se utilizaron métodos de secado directo en la manufactura de la yerba mate, se observó que el producto fue incrementando el contenido de HAPs de manera significativa ($p < 0,05$) a lo largo del procesamiento (yerba mate sin procesar < yerba mate zapecada < yerba mate secada). Se estudiaron dos establecimientos en los que la yerba mate fue secada utilizando aire caliente (secado indirecto). En estos casos, se observó una reducción del contenido total de HAPs luego de la etapa de secado. Los resultados

indican que los tratamientos térmicos directos aplicados a la materia prima son los responsables de la incorporación de HAPs al producto.

Se analizó el contenido de PAH4 y BaP en 10 muestras comerciales de yerba mate elaborada (las 10 marcas más vendidas en Argentina). La concentración de PAH4 varió entre 27,6 y 231,6 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de la materia seca, mientras que el contenido de BaP, osciló entre 4,1 y 57,3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de la materia seca. Asimismo, se analizaron 5 muestras comerciales de yerba mate envasada en saquitos (las 5 marcas más vendidas en Argentina). Las muestras analizadas mostraron valores de PAH4 entre 74,0 y 251,0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de la materia seca, y contenidos de BaP que variaron entre 7,6 y 59,5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de la materia seca. La mayoría de los productos comerciales analizados (14/15) superaron los límites máximos de PAH4 y BaP establecidos por la Comunidad Europea para diversos alimentos.

Con respecto a las formas de consumo habituales, la concentración total de los ocho HAPs analizados varió entre 371,2 y 2.438,8 ng/L en las muestras de mate y entre 19,2 y 937,3 ng/L en las muestras de tereré. El contenido de BaP en las muestras de mate y tereré varió entre 37,0 y 373,9 ng/L y 7,0 y 92,1 ng/L , respectivamente. Los niveles de PAH8 hallados en las muestras de mate cocido variaron entre no cuantificable y 91,3 ng/L y los niveles de BaP oscilaron entre no cuantificable y 23,2 ng/L . Ninguna de las muestras analizadas superó el límite máximo sugerido por la Organización Mundial de la Salud para BaP en agua de consumo (700 ng/L).

ABSTRACT

During the first two stages of the manufacturing process of yerba maté (*I. paraguariensis* St. Hil.) (*zapecado* and drying, respectively), freshly harvested branches of *I. paraguariensis* come into direct contact with hot air and combustion gases from the burning of different types of forest biomass. While there is considerable uniformity in the equipment used for *zapecado*, during the drying step, the contact time between the material and the combustion gases according to the design of the drying device. Many pollutants are formed during the incomplete combustion of organic matter used as fuel during food processing, including the polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) that are characterized by their hazardous mutagenic and carcinogenic potential. This fact increased the interest of PAHs as food contaminants. In 2008, the CONTAM (Contaminants in the Food Chain) Panel of the European Food Safety Authority (EFSA) concluded that the risk characterization of dietary exposure to PAHs should be based upon the eight compounds for which oral carcinogenicity has been documented. Thereby, the experts defined a group of eight PAHs, named PAH8, as well as a subset of four PAHs, named PAH4, both suitable indicators for the occurrence and toxicity of PAHs, that should be monitored in food products. The PAH8 compounds are benz [a] anthracene (BaA), chrysene (Chry), benzo [b] fluoranthene (BbF), benzo [k] fluoranthene (BkF), benzo [a] pyrene (BaP), dibenz [a,h]anthracene (DaA), benzo [g,h,i] perylene (BgP) and indeno [1,2,3-c,d] pyrene (IcP). The PAH4 subset consists of BaA, Chry, BbF and BaP. In 2011, the European Communities fixed maximum values for PAHs in different types of food, expressed as BaP and PAH4. The presence of PAHs in yerba maté has been widely reported. However, there are no studies reporting the levels of PAHs throughout the processing stages of Argentinean yerba maté or studies concerning the content of PAHs in hot and cold traditional yerba maté infusions (hot *mate*, cold *mate* and *mate cocido*).

The main objectives of this thesis were: a) to develop and validate an analytical method for the detection and quantification of PAH8 in yerba maté samples and traditional yerba maté infusions; b) to determine the PAH8 content of yerba maté

samples throughout the processing stages of its manufacture, and to identify the stage (s) in which these compounds are incorporated into the product; c) to study the occurrence of PAH8 in commercial brands of Argentinian yerba maté and yerba maté packaged in bags; and d) to determine the content of PAH8 in hot and cold traditional infusions (hot *mate*, cold *mate* and *mate cocido*) prepared with commercial brands of yerba maté from Argentina.

A method using reverse phase high performance liquid chromatography with fluorescence detection (RP-HPLC-FLD) was developed and validated for the simultaneous determination of 8 PAHs in yerba maté and yerba maté infusions. The sample preparation included an ultrasound assisted extraction (UAE) for yerba maté samples and a liquid-liquid extraction (LLE) for the yerba maté infusions samples, using in both cases cyclohexane as extraction solvent, followed by a clean-up step with silica solid phase extraction (SPE) cartridges. The proposed method was validated for linearity, accuracy (recovery tests), precision, limits of detection and limits of quantification.

PAH8 content of fresh yerba maté ranged from non-detectable to 7.7 µg / kg of the dry matter, while PAH8 content of partially dried and dried yerba maté (*zapecada* and *canchada*, respectively) ranged between non-quantifiable and 408.8 µg / kg of the dry matter and 10.6 and 478.6 µg / kg of the dry matter, respectively. In industries where direct drying methods were used for yerba maté manufacture, it was found that PAHs content was increasing significantly ($p < 0.05$) throughout the processing stages of the product (fresh yerba maté < partially dried yerba maté < dried yerba maté). Two of the studied industries used hot air to dry the branches of yerba maté (indirect method). A reduction in total PAH content after the drying step was observed in dried yerba maté from these industries. These results indicate that the direct heat treatments applied to the raw material are responsible for the incorporation of PAHs into the product.

The PAHs contamination level of 10 commercial samples of yerba maté (the 10 leading brands in Argentina) and 5 commercial samples of yerba maté packaged in

bags (the 5 leading brands in Argentina) were determined. In yerba maté samples, PAH4 contents varied between 27.6 and 231.6 $\mu\text{g} / \text{kg}$ of the dry matter, while the BaP levels ranged from 4.1 to 57, 3 $\mu\text{g} / \text{kg}$ of the dry matter. The PAH4 contents of yerba maté packaged in bags were between 74.0 and 251.0 $\mu\text{g} / \text{kg}$ of the dry matter, while the BaP levels ranged between 7.6 and 59, 5 $\mu\text{g} / \text{kg}$ of the dry matter. Most of the commercial samples tested (14/15) exceeded the maximum limits for PAH4 and BaP established by the European Community for certain foods.

The concentration of PAH8 in yerba maté hot infusions (*mate*) analyzed ranged from 371.2 to 2438.8 ng / L. BaP was found in all mate samples at levels between 37.0 and 373.9 ng / L. For cold infusions (*tereré*), PAH8 levels varied from 19.2 to 937.3 ng / L, and BaP contents were between 7.0 and 92.1 ng / L. PAH8 found in hot infusions prepared using yerba maté packaged in bags (*mate cocido*) varied between non-quantifiable and 91.3 ng / L, while BaP levels ranged from non-quantifiable to 23.2 ng / L. Although, the eight PAHs studied were identified and quantified in most of the samples, the content of BaP, the most harmful PAH, did not exceed the maximum level suggested by the World Health Organization for drinking water (700 ng / L) in any of the infusions studied.

TABLA DE CONTENIDOS

Capítulo I	1
I.1. Introducción	2
I.2. Justificación	4
I.3. Objetivos.....	6
Capítulo II	8
II.1. Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAPs)	9
II.1.1. Generalidades y propiedades fisicoquímicas.....	9
II.1.2. Origen y formación de los HAPs	14
II.1.3. Toxicidad	14
II.1.4. HAPs y alimentos.....	17
II.1.5. Evaluación de la exposición a los HAPs por organismos internacionales.....	21
II.1.6. Aspectos normativos	26
II.2. Yerba mate	29
II.2.1. Generalidades	29
II.2.2. Proceso de manufactura de la yerba mate	31
II.2.3. Formas de consumo de la yerba mate.....	43
Capítulo III	46
III.1. Introducción.....	47
III.2. Materiales y Métodos	50
III.2.1. Materiales	50
III.2.2. Métodos.....	51
III.2.3. Validación del método propuesto	57
III.2.4. Análisis estadístico.....	59
III.3. Resultados y Discusión	60

III.3.1. Optimización de las condiciones de extracción y purificación de la muestra	60
III.3.2. Desarrollo y optimización del método HPLC-FLD	62
III.3.3. Validación del método analítico	65
III.4. Conclusiones	72
Capítulo IV	73
IV.1. Introducción	74
IV.2. Materiales y Métodos	76
IV.2.1. Materiales	76
IV.2.2. Métodos	81
IV.3. Resultados y Discusión	82
IV.3.3. Contenido de HAPs en la yerba mate a lo largo de las diferentes etapas del procesamiento primario	82
IV.3.4. Análisis de la contaminación de la yerba mate con PAH4 y BaP respecto al Reglamento 835/2011 de la Comunidad Europea	101
IV.3.5. Contenido de HAPs en yerba mate elaborada utilizando métodos alternativos de manufactura	103
IV.4. Conclusiones	105
Capítulo V	107
V.1. Introducción	108
V.2. Materiales y Métodos	110
V.2.3. Materiales	110
V.2.4. Métodos	111
V.3. Resultados y Discusión	113
V.3.1. Contenido de HAPs en muestras comerciales (yerba mate elaborada y yerba mate envasada en saquitos)	113
V.3.2. Análisis de la contaminación de la yerba mate elaborada y la yerba mate en saquitos respecto al Reglamento 835/2011 de la Comunidad Europea	116
V.3.3. Contenido de HAPs en las infusiones preparadas con yerba mate elaborada (<i>mate y tereré</i>) y yerba mate envasada en saquitos (<i>mate cocido</i>)	117

V.3.4. Análisis de la contaminación de las infusiones preparadas con yerba mate respecto a los estándares internacionales para el agua potable	126
V.4. Conclusiones.....	128
CONCLUSIONES GENERALES	129
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	132

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Propiedades fisicoquímicas de los HAPs estudiados.....	13
Tabla 2. Clasificación establecida por la IARC para algunos HAPs	24
Tabla 3. Contenidos máximos de BaP y PAH4 en diferentes productos alimenticios (Reglamento (CE) N° 835/2011).....	28
Tabla 4. Resumen de las condiciones cromatográficas.....	56
Tabla 5. Intervalos de concentración de cada HAP utilizados en la calibración	57
Tabla 6. Parámetros estadísticos de las curvas de calibración de cada HAP individual.....	66
Tabla 7. Porcentaje de la desviación estándar relativa (RSD%) para cada HAP .	68
Tabla 8. Límites de detección (LOD) y cuantificación (LOQ) de los HAPs estudiados	69
Tabla 9. Porcentajes de recuperación (R%) y desviaciones estándares relativas (R%) de los HAPs estudiados	71
Tabla 10. Características de los establecimientos yerbateros estudiados.....	77
Tabla 11. Contenido de HAPs en la yerba mate sin procesar en los diferentes establecimientos industriales estudiados.....	83
Tabla 12. Contenido de HAPs en la yerba mate zapecada en los diferentes establecimientos industriales estudiados.....	84
Tabla 13. Contenido de HAPs en la yerba mate canchada en los diferentes establecimientos industriales estudiados.....	85
Tabla 14. Contenido de PAH8 durante las diferentes etapas del procesamiento de la yerba mate en establecimientos que utilizan secado directo	90

Tabla 15. Contenido de BaP y PAH4 durante las diferentes etapas del procesamiento de la yerba mate en establecimientos que utilizan secado directo....	103
Tabla 16. Contenido de PAH8 en muestras de yerba mate obtenidas mediante procesos alternativos de manufactura	104
Tabla 17. Contenido de HAPs en yerba mate elaborada	114
Tabla 18. Comparación del contenido de HAPs en muestras de yerba mate elaborada reportada por diversos autores	115
Tabla 19. Contenido de HAPs en yerba mate en saquitos.....	116
Tabla 20. Contenido de HAPs en <i>mate</i>	118
Tabla 21. Contenido de HAPs en <i>tereré</i>	119
Tabla 22. Contenido de HAPs en <i>mate cocido</i>	120
Tabla 23. Comparación del contenido de HAPs en infusiones preparadas con yerba mate reportados en la literatura	125

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estructura química de los 8 Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos estudiados (PAH8).....	12
Figura 2. Mecanismo piro sintético por etapas propuesto para el benzo[a]pireno	15
Figura 3. Representación esquemática de los caminos metabólicos propuestos para el BaP en humanos.....	18
Figura 4. Esquema del dispositivo utilizado en la obtención del mate y el tereré	52
Figura 5. Cromatograma de la mezcla estándar de PAH8 (0,3 µg/mL)	63
Figura 6. Cromatograma de una muestra blanco de yerba mate	64
Figura 7. Cromatograma de la muestra blanco de yerba mate fortificada con PAH8 (15µg/kg).....	64
Figura 8. Curva de regresión del Benzo[a]pireno.....	66
Figura 9. Contenido de PAH8 a lo largo de las etapas de manufactura de la yerba mate	86
Figura 10. Contribución de los HAPs ambientales y del zapecado y el secado al contenido de PAH8 de la yerba mate canchada	92
Figura 11. Contenido de PAH8 a lo largo de las etapas del procesamiento primario de la yerba (establecimientos con secado indirecto)	95
Figura 12. Estructuras químicas de algunos de nitro-derivados y oxi-derivados de los HAPs.	98

NOMENCLATURA

PAH4_w: PAH4 agua potable (BbF + BkF + BPe + IcP)

BaA: benzo[a] antraceno

BaP: benzo [a] pireno

BbF: benzo[b] fluoranteno

BkF: benzo [k]fluorantento

BPe: benzo[g,h,i] perileno

Chry: criseno

DaA: dibenzo[a,h] antraceno

EC: *European Communities*

EFSA: *European Food Safety Authority*

EU: *European Union*

FAO: *Food and Agriculture Organization*

IARC: *International Agency for Research on Cancer*

IcP: indeno [1,2,3-c,d] pireno

JECFA: *Joint Expert Committee on Food Additives*

PAH8: benzo[a] antraceno + criseno+ benzo[b] fluoranteno + benzo [k]fluorantento + benzo [a] pireno + dibenzo[a,h] antraceno + benzo[g,h,i] perileno + indeno [1,2,3-c,d] pireno

HAPs: Hidrocarburos aromáticos policíclicos

USEPA: *United States Environmental Protection Agency*

WHO: *World Health Organization*

NC: no cuantificable

ND: no detectado

LOQ: límite de cuantificación

LOD: límite de detección

SECCIÓN I
INTRODUCCIÓN

Capítulo I

INTRODUCCIÓN

I.1. Introducción

El procesamiento primario de la yerba mate (*Ilex paraguariensis* St. Hilaire) incluye tres etapas: zapecado, secado y *canchado* o molienda gruesa, y es llevado a cabo en establecimientos denominados *secaderos*.

Una vez en la playa de recepción, las ramas de yerba mate son transportadas hasta la cinta de alimentación del zapecador dando inicio al proceso. El zapecador es un equipo donde la materia prima es expuesta a la acción de la llama directa y gases de combustión provenientes del quemado de leña, aserrín o chips de madera, a temperaturas que llegan a superar los 500 °C durante unos pocos minutos. Los principales objetivos del zapecado son reducir el contenido de humedad de las ramas e inactivar las enzimas responsables de los procesos biológicos de degradación, evitando el pardeamiento de las hojas. Luego del zapecado, el material es secado para reducir su contenido en humedad hasta un valor que oscila entre 3% y 6%. Esta operación se lleva a cabo poniendo el material en contacto con una mezcla de gases de combustión de biomasa forestal y aire. Las condiciones de secado y el tiempo de contacto entre el material y los gases de combustión varían de acuerdo al tipo de secadero (entre 15 minutos y 24 horas). Una vez secas, las ramas de yerba mate son sometidas a un proceso de trituración gruesa, conocido con el nombre de *canchado*. Tras el *canchado*, la yerba mate se coloca en bolsas de arpillera de 40-50 kg que son almacenadas en depósitos para su estacionamiento (Schmalko, 2005).

Muchos contaminantes químicos se forman durante la combustión de la materia orgánica utilizada como combustible, tanto en el procedimiento de ahumado como en el de secado directo de los alimentos. Entre los ejemplos se encuentran los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs), que son un grupo de contaminantes que constituyen una extensa clase de compuestos orgánicos que contienen dos o más anillos aromáticos fusionados formados por átomos de carbono e hidrógeno (EC, 2002;

EFSA, 2008). Durante el procesado y la preparación de alimentos, se pueden formar y liberar centenares de HAPs diferentes. La composición de los productos de la pirosíntesis depende del combustible, la temperatura y el tiempo de permanencia a altas temperaturas. Evidentemente, los HAPs se liberan de la zona de combustión en forma de vapores y condensan en el acto sobre los sólidos que entren en contacto con ellos (Mastandrea et al., 2005; Ma et al., 2010b).

El interés de los HAPs como contaminantes alimentarios se debe a sus probados efectos tóxicos demostrados en diversos estudios en animales de experimentación. Estos efectos incluyen toxicidad cardiovascular, hematológica y reproductiva, supresión del sistema inmune, hepatotoxicidad, efectos teratógenos, entre otros. A pesar de ello, ha sido su reconocido potencial carcinogénico y mutagénico el que ha atraído más la atención para numerosas investigaciones, siendo éste el efecto tóxico más trascendente, resultado de la exposición a los HAPs (EC, 2002; EFSA 2008; IARC, 2010).

En el año 2008, el Panel de Contaminantes de la Cadena Alimentaria (CONTAM Panel) de la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) revisó todos los documentos existentes sobre la presencia y toxicidad de diversos HAPs en los alimentos. Tras el análisis riguroso de toda la documentación, el CONTAM Panel concluyó que, la caracterización del riesgo de exposición y toxicidad a los HAPs a través de los alimentos puede realizarse en base a los 8 compuestos sobre los cuales existe información relativa a su carcinogenicidad por vía oral, denominados en conjunto, PAH8 (EFSA, 2008). Los compuestos que integran el grupo PAH8 son: benzo[a] antraceno (BaA), criseno (Chry), benzo[b] fluoranteno (BbF), benzo[k] fluoranteno (BkF), benzo[a] pireno (BaP), dibenzo[a,h] antraceno (DaA), benzo[g,h,i] perileno (BPe) e indeno[1,2,3-c,d] pireno (IcP).

I.2. Justificación

La presencia de HAPs en yerba mate ha sido reportada en diversos trabajos. Camargo et al. (2002), Zuin et al. (2005), Kamangar et al. (2008), Golozar et al. (2012) hallaron altos niveles de HAPs en yerba mate de origen brasilero. Ziegenhals et al. (2008) y Schulz et al. (2015) estudiaron el contenido de HAPs en muestras comerciales de yerba mate de origen no especificado y reportan altos niveles de contaminación. Asimismo, García Londoño et al. (2014) determinaron el contenido de 16 HAPs en yerba mate comercializada en la Ciudad Autónoma de Buenos Aires, y hallaron altas concentraciones de estos compuestos en todas las muestras analizadas. Según estos autores, el proceso de elaboración de la yerba mate contribuye significativamente a la formación y deposición de los HAPs en el producto. Durante el procesamiento primario de la yerba mate, las ramas de *I. paraguariensis* entran en contacto directo con la llama y gases de combustión provenientes del quemado de biomasa forestal. Así, los HAPs formados por combustión incompleta, se acumulan sobre las ramas de yerba mate que ofrecen una gran área superficial, contaminándolas. Vieira (2010) estudió los niveles de HAPs en muestras de yerba mate obtenidas a lo largo del proceso de elaboración del producto. El estudio se realizó en establecimientos yerbateros de Brasil y se hallaron altas concentraciones de HAPs en la yerba mate expuesta a los tratamientos térmicos involucrados en el proceso de elaboración (zapecado y secado) respecto de la yerba mate no procesada. Es de destacar que no existen estudios que reporten los niveles de HAPs durante las diferentes etapas del proceso de elaboración de la yerba mate argentina. El proceso de manufactura de la yerba mate de origen brasilero difiere en gran medida del proceso de elaboración utilizado en Argentina, especialmente, en la etapa de secado.

Argentina es el principal productor de yerba mate a nivel global, siendo responsable de aproximadamente el 65 % de la producción mundial. En nuestro país, la elaboración de yerba mate moviliza a los sectores productivo, industrial y comercial,

y es un cultivo regional estratégico desde el punto de vista de la ocupación de mano de obra. Además del importante mercado interno, Argentina exporta en promedio aproximadamente 35.000 toneladas anuales de yerba mate. Esta expansión a los mercados no tradicionales genera millones de dólares de ingresos a nuestro país (Parra, 2013).

La magnitud de las exigencias que imponen los mercados alimentarios del mundo está en crecimiento. Las estrategias de comercialización basadas en el precio y la calidad están perdiendo terreno frente a nuevas áreas como riesgos y funcionalidad del alimento para la salud. Cada vez son más los mercados que elevan las exigencias sobre los contenidos máximos permitidos de HAPs en matrices alimentarias, por lo que el ingreso de la yerba mate a sus destinos de exportación se encuentra en severo riesgo.

Todo lo expuesto pone en evidencia la necesidad del estudio de los niveles de HAPs en cada uno de los procesos involucrados en la elaboración de la yerba mate, desde el cultivo hasta la obtención del producto final, identificando los sitios probables de contaminación, con el fin de recomendar prácticas que reduzcan la concentración de HAPs en la yerba mate elaborada. Asimismo, es de suma importancia determinar el contenido de HAPs en la yerba mate elaborada de origen argentino y en las infusiones preparadas con yerba mate tradicionalmente consumidas (*mate, tereré y mate cocido*), para conocer la tasa de transferencia de estos compuestos a las formas de consumo y de esta forma, conocer los riesgos que esto implica para la salud de los consumidores.

La presente investigación posee un fuerte componente de servicio hacia el sector yerbatero, transformándola en un pilar importante en las futuras estrategias de desarrollo de esta industria, ya que, en caso de hallar altos niveles de HAPs en las muestras de yerba mate, se deberá modificar el proceso de elaboración de la misma, a fin de minimizar la contaminación del producto, para que éste se adecúe a los requerimientos del mercado internacional.

Sólo en la provincia de Misiones existen alrededor de 230 establecimientos industriales de yerba mate que utilizan gases de combustión provenientes del quemado de diversos combustibles (leña, aserrín, virutas y/o chips de madera), tanto en el zapeador como en el secadero, como fuente directa de calor, por lo que la modificación en el proceso de elaboración significará una gran inversión para el sector. Los costos que deberán asumir los establecimientos yerbateros para realizar las modificaciones pertinentes, deberán ser analizados conjuntamente con los beneficios que se obtendrán por el hecho de mantener el nivel de las exportaciones de la yerba mate a los mercados no tradicionales.

I.3. Objetivos

El objetivo general del trabajo consiste en detectar la presencia de 8 hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) (benzo[a]antraceno (BaA), criseno (Chry), benzo[b]fluorano (BbF), benzo[k]fluoranteno (BkF), benzo[a]pireno (BaP), dibenzo[a,h]antraceno (DaA), indeno[1,2,3-c,d]pireno (IcP) y benzo[g,h,i]perileno (BPe)) en la yerba mate procesada e identificar la(s) etapa(s) del procesamiento donde se incorporan al producto.

Son sus objetivos específicos:

1. Desarrollar y validar un método analítico para la determinación de HAPs en muestras de yerba mate y las infusiones preparadas con yerba mate.
2. Determinar la presencia de HAPs en muestras de yerba mate analizando cada etapa de los diferentes procesos de elaboración y considerando las restricciones del mercado destinatario.
3. Determinar el contenido de HAPs en las principales formas de consumo de la yerba mate: mate caliente (*mate*), mate frío (*tereré*) y *mate cocido*.

4. Determinar el contenido de HAPs en yerba mate zapecada utilizando métodos alternativos (inmersión en agua caliente, aplicación de vapor de agua y de energía de alta frecuencia) y secada con aire caliente.

Capítulo II

REVISIÓN DE LA BIBLIOGRAFÍA

II.1. Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAPs)

II.1.1. Generalidades y propiedades fisicoquímicas

Por definición los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) son un grupo de sustancias químicas formadas por la fusión de dos o más anillos aromáticos dispuestos de manera lineal, angular o en racimos, que no contienen heteroátomos ni sustituyentes. En general, los HAPs están formados por anillos bencénicos fusionados, aunque algunos de estos compuestos (acenafteno, acenaftileno, fluorenos y fluorantenos) contienen anillos de cinco eslabones en su estructura (Mastandrea et al., 2005; Wenzl et al., 2006; Purcaro et al., 2013).

Según el número de anillos fusionados, los HAPs pueden clasificarse en HAPs de bajo peso molecular (2-3 anillos) y HAPs de alto peso molecular (4-6 anillos). Entre los HAPs de bajo peso molecular se encuentra el naftaleno, cuya estructura química condensada es la más sencilla, formada sólo por dos anillos, y el acenafteno, el acenaftileno, el fluoreno, el fenantreno y el antraceno, todos con tres anillos en su estructura. Los HAPs de alto peso molecular están formados por 4 a 6 o incluso más anillos, siendo químicamente más estables que los de estructura más pequeña. Además de su gran estabilidad, los HAPs pesados muestran diferentes grados de toxicidad para el hombre (Purcaro et al., 2013), cuestión que trataremos más adelante.

A lo largo de la familia, a medida que aumenta el peso molecular, se producen cambios regulares en las propiedades fisicoquímicas de los HAPs. Sin embargo, existe otro factor importante que determina la variación de dichas propiedades que es la simetría molecular (Ma et al., 2010b).

Los HAPs se encuentran en estado sólido en condiciones ambientales, son incoloros o con coloraciones que van desde el blanco al amarillo pálido, poseen puntos de fusión y ebullición relativamente altos, bajas presiones de vapor, son poco solubles en agua y poseen una elevada solubilidad en disolventes orgánicos (Juhasz y Naidu,

2000; Mastandrea et al., 2005; Rubio et al., 2006; Ishisaki et al., 2010). Estas propiedades fisicoquímicas son las que determinan el comportamiento ambiental de estos compuestos. La persistencia y abundancia de los HAPs en el medio ambiente, junto con su toxicidad, los han convertido en compuestos de gran interés para su estudio y los han situado en las listas de contaminantes orgánicos prioritarios de diversos organismos internacionales.

Con respecto a los puntos de fusión, a pesar de que existe una tendencia general a que los HAPs de mayor tamaño fundan a temperaturas más altas, la relación entre el peso molecular y el punto de fusión de los HAPs, no es lineal. El punto de fusión de estos compuestos parece estar relacionado con la simetría molecular. Por este motivo, existen HAPs de igual masa molar que poseen puntos de fusión muy diferentes. Así, si dos HAPs tienen igual peso molecular, el que presente mayor número de planos de simetría, será el que tenga mayor punto de fusión (Ma et al., 2010b).

En condiciones ambientales, los HAPs pueden encontrarse en el aire en fase gaseosa y/o en fase sólida (asociados a material particulado), lo que depende principalmente de sus presiones de vapor y de la temperatura ambiente. Ha sido demostrado que a 25 °C, los HAPs con cinco o más anillos se encuentran casi exclusivamente en fase sólida asociados a partículas atmosféricas en suspensión (presiones de vapor $<10^{-9}$ kPa). Los HAPs de dos y tres anillos se encuentran principalmente en fase vapor (presiones de vapor $> 10^{-5}$ kPa), mientras que los de cuatro anillos se encuentran en una posición intermedia, distribuyéndose entre la fase sólida y gaseosa (EC, 2002).

Como hemos mencionado, los HAPs, son muy solubles en solventes orgánicos no próticos y muy poco solubles en agua. La solubilidad en agua de los HAPs decrece al ir aumentando el tamaño de la molécula, con el consecuente aumento del carácter lipófilo. La lipofilidad de los HAPs se refleja en los valores de los logaritmos de los

coeficientes de partición octanol-agua ($\log K_{ow}$). Los HAPs de bajo peso molecular, son relativamente solubles en agua con $\log K_{ow} < 5$. Los de peso molecular elevado, son generalmente insolubles en agua y poseen una gran afinidad para adsorberse en la superficie de las partículas sólidas en suspensión ($\log Kow > 5$) (Dabestami e Ivanov, 1999; Bishnoi et al., 2006).

Los compuestos estudiados en el presente trabajo incluyen al benzo[a]antraceno (BaA), criseno (Chry), benzo[b]fluoranteno (BbF), benzo[k]fluoranteno (BkF), benzo[a]pireno (BaP), dibenzo[a,h]antraceno (DaA), benzo[g,h,i]perileno (BPe) e Indeno [1,2,3-c,d]pireno (IcP), todos HAPs de alto peso molecular, formados por 4 a 6 anillos. Las estructuras químicas de estos compuestos se presentan en la Figura 1.

La Tabla 1 muestra algunas de las propiedades fisicoquímicas de los 8 HAPs estudiados, a saber: punto de fusión (P_f), presión de vapor (P_v), solubilidad en agua (S_w) y logaritmo del coeficiente de partición octanol-agua ($\log K_{ow}$). Asimismo se presentan las fórmulas moleculares, el peso molecular (PM) y el número de anillos para cada uno de los compuestos.

Debido a los sistemas de orbitales π conjugados de los anillos aromáticos fusionados de su estructura, los HAPs son compuestos químicamente estables, por lo que ofrecen una importante resistencia a los agentes químicos y a otro tipo de ataques. A pesar de esto, ha sido demostrado que los HAPs son susceptibles a la degradación fotoquímica y oxidativa, aunque es importante señalar que, durante estas reacciones las moléculas no pierden su carácter aromático, ya que la aromaticidad les confiere una gran estabilidad, convirtiéndose en compuestos poliaromáticos derivados (Ravindra et al., 2008). Debido a su carácter aromático, los HAPs absorben la luz ultravioleta y producen un espectro fluorescente característico (Mastandrea et al., 2005).

Figura 1. Estructura química de los 8 Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos estudiados (PAH8)

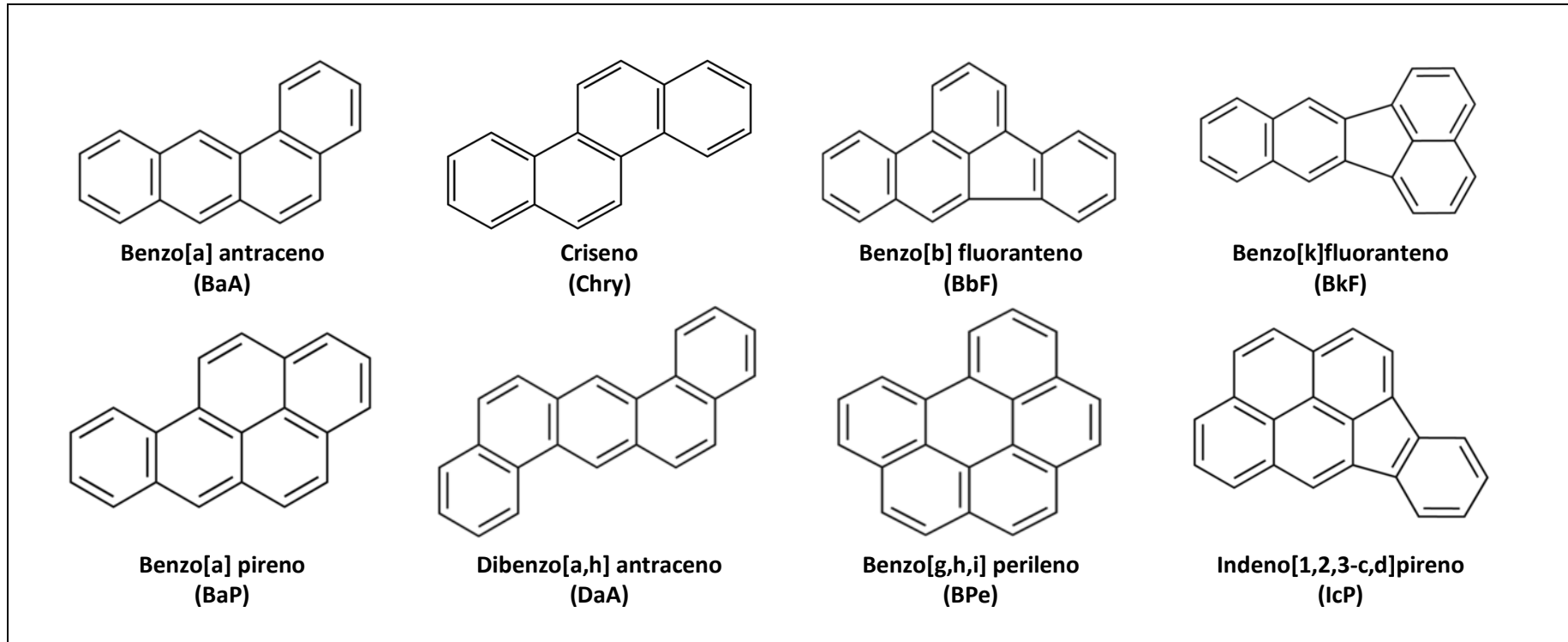


Tabla 1. Propiedades fisicoquímicas de los HAPs estudiados (Datos tomados de Ma et al., 2010b)

HAPs	Fórmula molecular	N° de anillos	PM (g/mol)	P_f (°C)	S_w , 25 °C (mg/L)	P_v , 25 °C (kPa)	$\text{Log } K_{ow}$, 25 °C
BaA	C ₁₈ H ₁₂	4	228,29	158,6	0,0120	3,3.10 ⁻⁸	5,83
Chry	C ₁₈ H ₁₂	4	228,29	256,8	0,0021	3,5.10 ⁻⁹	5,67
BbF	C ₂₀ H ₁₂	5	252,31	168,0	0,0019	5,1.10 ⁻¹⁰	5,86
BkF	C ₂₀ H ₁₂	5	252,31	212,2	0,0008	2,0.10 ⁻¹⁰	5,86
BaP	C ₂₀ H ₁₂	5	252,31	178,8	0,0042	1,3.10 ⁻⁹	6,05
DaA	C ₂₂ H ₁₄	5	278,35	266	0,0006 *	3,7.10 ⁻¹³ *	6,51
BPe	C ₂₂ H ₁₂	6	276,33	274,5	0,0004	5,8.10 ⁻¹¹	6,63
IcP	C ₂₂ H ₁₂	6	276,33	162,8	0,0003	5,7.10 ⁻¹¹	6,57

*Mackay et al. (1992)

Existen diversos trabajos que hacen un extensivo análisis de la reactividad de los HAPs, libres y asociados a material particulado, tanto frente a la acción fotoquímica (Kameda et al., 2011), como a las reacciones oxidativas asociadas a gases atmosféricos (Keyte et al., 2013). Cuando se exponen a la luz UV, tanto proveniente de la radiación solar como de fuentes artificiales, los HAPs sufren fotodescomposición, siendo esta la vía de degradación más común de estos compuestos. Asimismo, ha sido ampliamente demostrado que los HAPs son susceptibles a reaccionar con ciertas sustancias oxidantes y radicales libres presentes en el aire para formar, entre otros productos, compuestos denominados nitro-derivados (N-HAPs) y oxi-derivados (O-HAPs) de los HAPs. Estos mecanismos de degradación química afectan tanto a los HAPs en solución acuosa, como a los HAPs libres en fase gaseosa y a los HAPs en forma sólida asociados a material particulado (reacciones heterogéneas) (Mastandrea et al., 2005; Dąbrowska et al., 2008; Ravindra et al., 2008; Keyte et al., 2013).

II.1.2. Origen y formación de los HAPs

Los HAPs pueden ser originados por *a)* combustión incompleta o pirólisis de la materia orgánica a altas temperaturas (HAPs de origen pirolítico), *b)* procesos geoquímicos de la materia orgánica sedimentaria a bajas temperaturas (< 200 °C) durante períodos de tiempo en escala geológica, dando origen a los combustibles fósiles (origen geológico) y *c)* biosíntesis directa de HAPs por microorganismos y plantas (origen biológico) (Lee et al., 1981; Moret y Conte, 2000).

Los HAPs de origen pirolítico se forman mediante la incineración de cualquier tipo de materia orgánica (petróleo, gas, carbón, basura, madera, tabaco, etc.) y son contaminantes medioambientales ubicuos que han sido identificados en diversas matrices como el agua, el suelo, las partículas de polvo del aire y los alimentos (Badolato et al., 2006). Su presencia en el medio ambiente puede atribuirse a fenómenos naturales (incendios forestales, actividad volcánica, etc.), o bien a fuentes antropogénicas (combustión de automóviles, procesos industriales, calefacción doméstica, etc.) (Ishizaki et al., 2010).

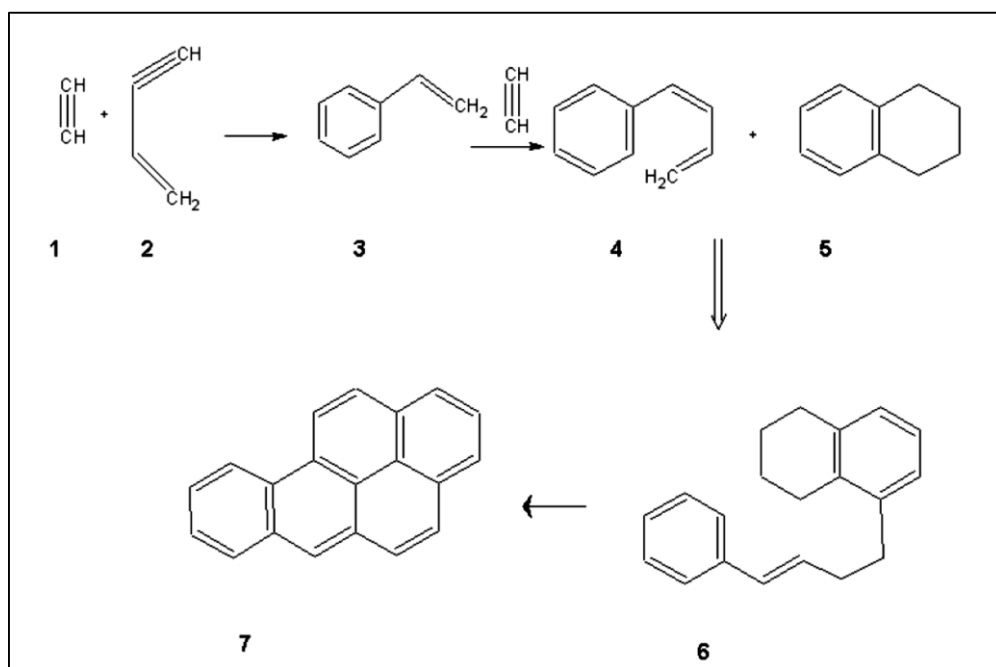
El proceso de formación de los HAPs de origen pirolítico implica una vía sintética del tipo radicalaria y tiene curso a altas temperaturas (500-700 °C) y en condiciones deficientes de oxígeno. A altas temperaturas, los enlaces C-H y C-C de las moléculas orgánicas se rompen y se generan moléculas más pequeñas y radicales libres, proceso denominado pirólisis. Estos fragmentos altamente reactivos solo existen como intermediarios por períodos de tiempo muy cortos, y terminan recombinándose para dar lugar a estructuras aromáticas más estables, los HAPs, a través del proceso denominado pirosíntesis (Lee et al., 1981) (Figura 2).

II.1.3. Toxicidad

El interés de los HAPs como contaminantes medioambientales y alimentarios se debe a sus probados efectos tóxicos demostrados en diversos estudios en animales de

experimentación. Estos efectos incluyen toxicidad cardiovascular, hematológica y reproductiva, supresión del sistema inmune, hepatotoxicidad, efectos teratógenos, entre otros (EC, 2002; Rubio et al., 2006; IARC, 2010). A pesar de ello, ha sido su reconocido potencial carcinogénico y mutagénico el que ha atraído más la atención para numerosas investigaciones, siendo éste el efecto tóxico más trascendente resultado de la exposición a los HAPs (Camargo et al., 2006; Soriano Sanz, 2009; IARC, 2010).

Figura 2. Mecanismo piro sintético por etapas propuesto para el benzo[a]pireno
(Tomada de Lee et al., 1981)



(1) Acetileno; (2) especie de 4 carbonos, por ejemplo vinilacetileno; (3) Estireno o etilbenceno; (4, 5, 6) intermediarios y (7) Benzo[a]pireno.

La fusión de dos o más anillos aromáticos causa una perturbación en la deslocalización de los electrones, es decir, los compuestos aromáticos polinucleares no están tan fuertemente estabilizados como el benceno. El aumento de la reactividad en

los HAPs se cree que es debido al aumento del carácter olefínico de algunos enlaces aromáticos en la molécula, lo que hace que presenten una reactividad similar a la de los alquenos y con frecuencia participan en reacciones de adición, más características de este grupo de compuestos (Dabestani e Ivanov, 1999). A pesar de esto, los HAPs son compuestos químicos muy estables y por lo tanto, incapaces de actuar por sí mismos como electrófilos. Para que los HAPs puedan generar un efecto cancerígeno en el organismo requieren de una activación metabólica que dé como resultado un derivado electrofílico. Así, la biotransformación metabólica de los HAPs involucra una serie de enzimas, distribuidas en todos los tejidos del organismo, que incluyen sistemas enzimáticos y enzimas que catalizan reacciones de oxidación, reducción e hidrólisis (enzimas del citocromo P450, epóxido hidrolasa, entre otras) y enzimas que catalizan reacciones de conjugación (glutathion-S-transferasa y UDP-glucuronil transferasa, entre otras). El metabolismo de los HAPs es muy complejo y no se conoce en profundidad. De manera general puede afirmarse que, estos compuestos altamente lipofílicos y químicamente estables, se convierten por acción enzimática y mediante epóxidos intermedios, en fenoles, dioles, tetroles, quinonas, entre otros, que son especies solubles en agua, y estos a su vez pueden conjugarse con el ácido glucurónico o con el glutatión, lo que genera la desintoxicación del organismo, ya que estas formas químicas pueden ser eliminadas por orina o por heces. Los caminos metabólicos involucrados en la biotransformación de los HAPs, pueden dar lugar a la formación de epóxidos secundarios que son especies químicas altamente inestables. La secuencia de este proceso es la siguiente: 1) epoxidación del HAP, 2) hidrólisis del epóxido primario a dihidrodiol, y 3) epoxidación del dihidrodiol a diol-epóxido. Los epóxidos secundarios formados (diol-epóxidos) representan las formas más reactivas producto de la biotransformación de los HAPs, capaces de formar aductos con las porciones nucleofílicas del ADN, y eventualmente, iniciar un proceso de mutagénesis con potenciales consecuencias carcinogénicas para el individuo expuesto (Figura 3) (Boström et al., 2002; Ramesh et al., 2004; Mastandrea et al., 2005; Moorthy et al.,

2015). La reactividad inherente de los óxidos y los epóxidos derivados de cada HAP en particular, y por lo tanto su potencial carcinogénico, están estrechamente relacionados con la topología del HAP precursor, ya que ha sido asociado al grado de no-planaridad de la molécula y a la existencia de regiones tipo bahía o tipo fiordo y la presencia de anillos de cinco carbonos en la estructura. Ha sido postulado que, la presencia de regiones bahía o fiordo, otorgan a la molécula propiedades electrofílicas elevadas que permiten interactuar con los enlaces covalentes, siendo el blanco directo de especies nucleofílicas como las bases amino presentes en el ADN (Dabestani e Ivanov, 1999; Boström et al., 2002) (véase la Figura 3).

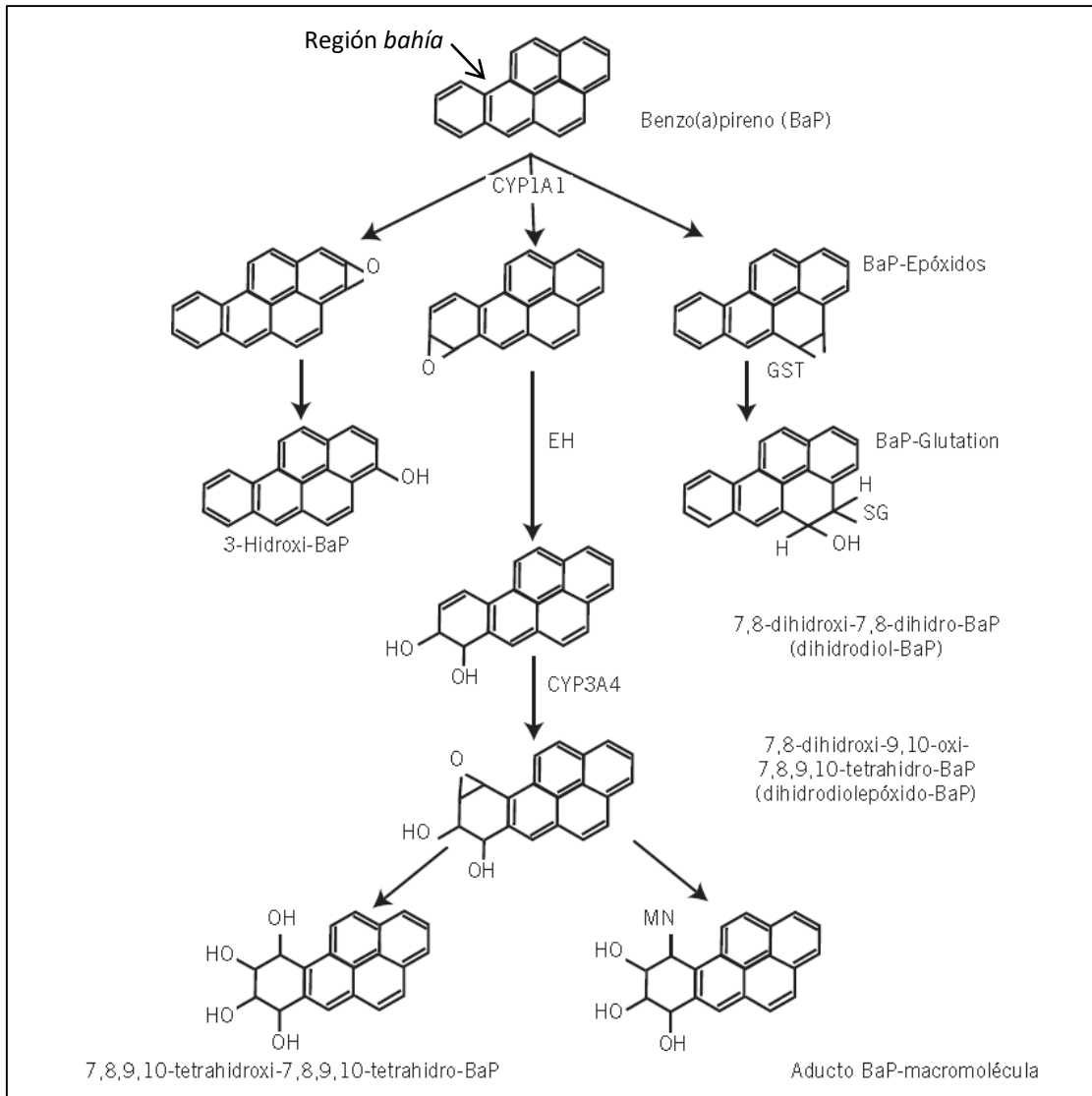
II.1.4. HAPs y alimentos

Los alimentos son una fuente importante de exposición a los HAPs. La ingesta de HAPs a partir de los alimentos varía ampliamente oscilando entre unos pocos nanogramos hasta el orden de los microgramos por persona por día (IARC, 2010). Es importante destacar que los alimentos son la principal fuente de exposición a los HAPs en personas no fumadoras y que no sufren exposición ocupacional a estos compuestos (IARC, 2010; Ishizaki et al., 2010).

Algunas de las fuentes de HAPs de la dieta incluyen a las carnes y pescados asados, grillados o ahumados; mariscos frescos y ahumados; otros alimentos tostados, asados o grillados (productos panificados y vegetales); aceites vegetales, cereales y granos (debido a su proceso industrial de secado); vegetales cultivados en ambientes contaminados con HAPs, entre otros (Rojo Camargo et al., 2003; Badolato et al., 2006; IARC, 2010).

Una de las posibles fuentes de contaminación de los alimentos con HAPs es el contacto de los mismos con los suelos, el agua y el aire contaminados (JECFA, 2005). Ha sido demostrado que la contaminación de origen ambiental es significativa en las especies vegetales que crecen en áreas industriales o de tráfico vehicular denso. La deposición atmosférica se considera la principal fuente de contaminación de los

Figura 3. Representación esquemática de los caminos metabólicos propuestos para el BaP en humanos (Tomada de Mastandrea et al., 2005). La región bahía del BaP está indicada con una flecha.



CYP1A1 y CYP3A4: monooxigenasas dependientes del Citocromo P450; EH: epóxido hidrolasa; GST: Glutatión-S- transferasa; MN: Macromolécula.

vegetales con HAPs. Evidencia de ello es que las plantas de hoja ancha, contienen mayores cantidades de HAPs que los vegetales de hoja estrecha, las verduras de tallo, o las hortalizas de fruto, debido a que ofrecen una mayor área superficial cerosa vulnerable a la deposición de estos compuestos. Asimismo, las verduras de raíz (papa,

batata, zanahoria) son muy propensas a la absorción de HAPs a partir de los suelos contaminados (Basal y Kim, 2015). En el caso de ciertos organismos marinos, especialmente los que habitan en los sedimentos y se alimentan mediante filtración (mejillones, ostras), pueden tomar a los HAPs a partir del agua y sedimentos marinos contaminados, ya sea con partículas en suspensión, o por contaminación debida a un vertido accidental de petróleo. Los HAPs incorporados al organismo se acumulan en los tejidos grasos del animal, debido a que éstos poseen una baja capacidad de metabolización de estos compuestos (EC, 2002; Rubio et al., 2006; Soriano Sáenz, 2009).

Además, los HAPs pueden formarse durante el ahumado, y particularmente, durante tratamientos térmicos a altas temperaturas (secado, tostado, asado, etc.), en los procesos de cocción o como resultado de los procesos de manufactura de los alimentos, o bien, ser añadidos a la matriz alimentaria mediante aditivos (Chung et al., 2011; Rose et al., 2015).

Con respecto a la forma de preparación y manufactura de los alimentos, la eficiencia de esta vía de contaminación depende de varios factores como la composición del alimento, principalmente su contenido graso; la naturaleza del proceso (directo o indirecto); la temperatura y la duración del proceso; la proximidad y el contacto entre el alimento y la fuente de calor; el diseño del dispositivo de cocción; el tipo de combustible utilizado (gas, madera, carbón, energía eléctrica); entre otros (Alomirah et al., 2011; Basal y Kim, 2015).

Cabe destacar que los tratamientos térmicos intensos utilizados durante el procesamiento de los alimentos, pueden ser aplicados de manera directa o indirecta, de forma que el agente térmico entre o no en contacto con el alimento. En el caso de los tratamientos térmicos directos, la contaminación se produce fundamentalmente por la deposición directa de los HAPs de los gases de combustión producidos por la combustión incompleta del combustible utilizado como fuente de calor. En el caso de los tratamientos térmicos indirectos, los HAPs pueden producirse por la pirólisis de los

nutrientes propios del alimento (especialmente hidratos de carbono y lípidos). Existen trabajos que demuestran la formación de HAPs tras someter a pirólisis lípidos, glúcidos y prótidos (Fazio y Howard, 1983). Es importante destacar que, la formación de HAPs se ve favorecida a temperaturas que superen los 500 °C, por lo que su síntesis a partir de los nutrientes del alimento durante su procesado es poco factible, más bien excepcional, ya que las temperaturas alcanzadas durante la elaboración y preparación de los alimentos no alcanzan estos valores (Rey Salgueiro et al., 2008). En muchas otras situaciones, la contaminación de los alimentos con HAPs puede producirse por la combinación de ambos mecanismos, deposición de los HAPs formados durante la combustión incompleta del agente térmico utilizado como combustible, y pirosíntesis a partir de los principios inmediatos de los alimentos (Rey-Salgueiro et al., 2008; Basal y Kim, 2015).

De los procesos industriales, el ahumado es la principal fuente de contaminación de los alimentos con HAPs. Asimismo, los procesos de tostado y torrado (café y cacao), y los procesos de deshidratación (semillas de oleaginosas, cereales, té, yerba mate, entre otros), ambos utilizando métodos directos, donde los gases de combustión entran en contacto con el alimento, representan otra fuente importante de contaminación con HAPs (EC, 2002; EFSA, 2008; Basal y Kim, 2015).

Entre las prácticas culinarias hogareñas, el asado (utilizando fuego de leña o carbón) y el grillado de las carnes, pescados y vegetales son las principales fuentes de contaminación de estos alimentos con HAPs. Otra práctica que puede generar la contaminación de ciertos productos, aunque en menor medida, es el tostado, fundamentalmente de los panificados (EC, 2002; EFSA, 2008; Rose et al., 2015).

Como se ha mencionado anteriormente, para que se produzca la formación de HAPs a partir de los nutrientes de los propios alimentos, especialmente la formación de los HAPs de alto peso molecular, éstos deben ser expuestos a temperaturas entre 500 y 900 °C. Esto puede ocurrir fundamentalmente en regiones del alimento donde

se producen elevaciones puntuales de la temperatura, lo que ocasiona calcinaciones parciales del producto. Otro mecanismo probable de contaminación a partir de los componentes del propio alimento es la pirólisis de la grasa que gotea directamente sobre la llama o la fuente de calor utilizada. Esta condición puede generar HAPs que se volatizan o son arrastrados con las partículas de humo generadas y finalmente se adhieren a la superficie del alimento contaminándolo. Este mecanismo es especialmente habitual en las prácticas culinarias de preparación de alimentos con alto contenido graso como las carnes y sus derivados, cuando la fuente de calor se encuentra debajo del alimento.

En la literatura científica existen trabajos que reportan sobre la presencia de HAPs en diversos alimentos, incluyendo frutas y hortalizas (Camargo y Toledo, 2003; Bishnoi et al., 2006), aceites vegetales (Camargo et al., 2012; Ciecierska and Obiedzinski, 2013; Tfouni et al., 2014), productos cárnicos (Chung et al., 2011; Roseiro et al., 2011; Alomirah et al., 2011), pescados y mariscos (Stołyhwo and Sikorski, 2005; Serpe et al., 2010; Zhang et al., 2010), café (Hischenhuber and Stijve, 1987; García-Falcón et al., 2005; Duedahl-Olesen et al., 2015) e infusiones preparadas con café (Orecchio et al., 2009; Tfouni et al., 2013), té (Lin and Zhu, 2004; Dravoba et al., 2012; Duedahl-Olesen et al., 2015; García Londoño et al., 2015) e infusiones preparadas con té (Lin et al., 2005; Lin and Zhu, 2006), entre otros. Asimismo, la presencia de HAPs en yerba mate ha sido reportada por diversos autores (Camargo y Toledo, 2002; Ziegenhals et al., 2008; Kamangar et al., 2008; Golozar et al., 2012; García Londoño et al., 2014; Schulz et al., 2015). Según estos autores, el proceso de elaboración de la yerba mate contribuye significativamente a la formación y deposición de los HAPs en el producto.

II.1.5. Evaluación de la exposición a los HAPs por organismos internacionales

Debido a que ciertos HAPs han demostrado ser carcinogénicos en estudios realizados con animales de experimentación y/o arrojaron resultados positivos en

pruebas de genotoxicidad y mutagenicidad *in vivo* e *in vitro*, han sido incluidos en las listas de contaminantes prioritarios de las asociaciones y los organismos internacionales gubernamentales e independientes más reconocidos.

De todos los HAPs, el benzo(a)pireno (BaP) fue el primero en ser identificado como carcinógeno humano, y por este motivo ha sido profundamente estudiado. Durante años, el BaP ha sido considerado marcador de la presencia de HAPs en alimentos ahumados, productos deshidratados con secado directo, muestras medioambientales y agua potable. A pesar de esto, organismos internacionales han concluido que su uso como marcador de contaminación de productos alimenticios por HAPs es inadecuado (EFSA, 2008).

La Agencia Internacional de Investigación en el Cáncer (IARC, del inglés *International Agency for Research on Cancer*) es una agencia perteneciente a la Organización Mundial de la Salud (WHO, del inglés *World Health Organization*) que en 1969 ha iniciado un programa de evaluación de riesgos asociados a la exposición de humanos a diferentes sustancias químicas, agentes físicos y biológicos. Dentro de este programa, la IARC ha evaluado el potencial carcinogénico de diferentes HAPs y actividades relacionadas con estos compuestos. En su último trabajo monográfico en la materia, la IARC catalogó 60 HAPs según el riesgo carcinogénico que revisten para los seres humanos. De acuerdo a esta última lista, el BaP, clasificado en el grupo 1, es una sustancia carcinogénica para los humanos (IARC, 2010). En la Tabla 2 se presenta la clasificación según la IARC para los HAPs considerados prioritarios para su análisis por las autoridades de seguridad medioambiental y/o alimentaria de los Estados Unidos y de la Comunidad Europea.

La Agencia Estadounidense para la Protección del Medio Ambiente (USEPA, del inglés *United States Environmental Protection Agency*), desde el año 1984, considera a 16 HAPs como contaminantes orgánicos prioritarios a controlar en el medio ambiente, en los alimentos y otras matrices. Este grupo de HAPs es conocido como los 16 EPA-

PAHs (véase la Tabla 2). En su base de datos denominado Sistema de Información Integrada de Riesgos (IRIS, del inglés *Integrated Risk Information System*), la USEPA clasifica a los diferentes HAPs según su carcinogenicidad. Los hidrocarburos aromáticos policíclicos benzo[a] antraceno (BaA), criseno (Chry), benzo[b] fluoranteno (BbF), benzo[k] fluoranteno (BkF), benzo[a] pireno (BaP), dibenzo[a,h] antraceno (DaA) e indeno[1,2,3-c,d] pireno (IcP) son considerados probables carcinógenos humanos (Grupo B2). El naftaleno (NA) es clasificado por la US EPA como posible carcinógeno humano integrando el grupo C, y el resto de los HAPs son considerados no clasificables como carcinógenos humanos por lo que integran el Grupo D (IRIS, 2013).

Posteriormente, la Agencia para Sustancia Tóxicas y el Registro de Enfermedades (ATS-DR, del inglés *Agency of Toxic Substances and Disease Register*) de los Estados Unidos, en el año 1995, publicó una reseña toxicológica de los HAPs donde se exponen los principales efectos adversos en la salud humana por exposición a estos compuestos. En dicha reseña se presenta una lista de 17 HAPs, sobre los cuales se ha basado el documento, que han sido considerados por el gran volumen de información científica existente sobre ellos, su mayor grado de toxicidad y mayor riesgo de exposición para los humanos. El inventario incluye a los 16 compuestos listados por la USEPA, con excepción del NA e introduce al benzo[j]fluoranteno (BjF) y al benzo[e]pireno (BeP) (ATS-DR, 1995).

Refiriéndonos específicamente a los alimentos, el Comité Científico de la Alimentación Humana (SCF, del inglés *Scientific Committee on Food*) de la Comunidad Europea, llevó a cabo una evaluación de riesgos sobre 33 HAPs originalmente evaluados por el Programa Internacional sobre Seguridad Química (IPCS, del inglés *International Programme on Chemical Safety*) en el año 1998. El SCF concluyó en su dictamen de diciembre de 2002 que 15 HAPs, poseedores de propiedades carcinogénicas, son contaminantes prioritarios para ser estudiados en los alimentos en

Tabla 2. Clasificación establecida por la IARC para algunos HAPs (IARC, 2010)

Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos		Grupo IARC/Descripción
		Grupo 1: Carcinogénico para los humanos
Benzo [a] pireno ^{ab}		Existe evidencia suficiente que demuestra la carcinogenicidad para humanos o excepcionalmente, si las pruebas en humanos no son suficientes (como en este caso), pero existen pruebas que demuestran la carcinogenicidad en animales de experimentación y evidencia contundente en humanos expuestos de que el agente actúa mediante mecanismos conexos de carcinogenicidad.
		Grupo 2A: Probablemente carcinogénico para los humanos
Ciclopental [c,d] pireno ^b		Existe evidencia limitada de la carcinogenicidad en humanos, pero suficiente evidencia de carcinogenicidad en experimentación animal.
Dibenzo [a,h] antraceno ^{ab}		
Dibenzo[a,l] pireno ^b		
		Grupo 2B: Posiblemente carcinogénico para los humanos
5-metilcriseno ^b	Criseno ^{ab}	Existen pruebas limitadas de carcinogenicidad en humanos y evidencia insuficiente de carcinogenicidad en animales de experimentación.
Benzo [a] antraceno ^{ab}	Dibenzo [a,i]pireno ^b	
Benzo [b] fluoranteno ^{ab}	Dibenzo[a,h] pireno ^b	
Benzo [j] fluoranteno ^b	Indeno [1,2,3-c,d]pireno ^{ab}	
Benzo [k] fluoranteno ^{ab}	Naftaleno ^a	
		Grupo 3: No clasificable como carcinogénico para los humanos
Acenafteno ^a	Fenantreno ^a	No existe evidencia adecuada de carcinogenicidad en humanos y pruebas limitadas o insuficientes de carcinogenicidad en animales de experimentación.
Antraceno ^a	Fluoranteno ^a	
Benzo [c] fluoreno ^b	Fluoreno ^a	
Benzo [g,h,i]perileno ^{ab}	Pireno ^a	
Dibenzo [a,e]pireno ^b		
Acenaftileno ^a		No clasificado

^a16 EPA PAHs

^b 15+1 EU priority PAHs

la Unión Europea, lista conocida como *15 EU Priority PAHs* (EC, 2002).

En el año 2005, el Comité Mixto de Expertos en Aditivos Alimentarios (JECFA, del inglés *Joint Expert Committee on Food Additives*), una articulación de la *Food and Agriculture Organization* (FAO) y la WHO, realizó una evaluación del riesgo de exposición a ciertos HAPs, incluyendo a los compuestos listados por la Unión Europea y los considerados prioritarios por la USEPA. En esta ocasión, el Comité propuso un nuevo compuesto para que su contenido sea monitoreado en los alimentos, el benzo[c]fluoreno (BcF), ya que en la evaluación de riesgo se observó que puede contribuir a la formación de tumores pulmonares en animales de experimentación tras su exposición por vía oral, pero los datos sobre su presencia en alimentos son escasos (JECFA, 2005).

En el año 2008, a petición de la Comunidad Europea, el Panel de Contaminantes de la Cadena Alimentaria (CONTAM Panel) de la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA, del inglés *European Food Safety Authority*) revisó todos los documentos existentes sobre la presencia y toxicidad de diversos HAPs en los alimentos. En total se analizaron los resultados de 10.000 análisis de niveles de HAPs en diferentes productos alimenticios. A falta de nuevos datos toxicológicos que sugieran la inclusión en el estudio de más compuestos, el CONTAM Panel analizó toda la información disponible sobre la toxicidad de los 15 HAPs identificados por la SCF en 2002 y la información existente sobre la toxicidad del BcF propuesto por la JECFA en el 2005 (*15 + 1 EU Priority PAHs*) (véase la Tabla 2).

El CONTAM Panel concluyó que, la caracterización del riesgo de exposición a los HAPs a través de los alimentos puede realizarse en base a los compuestos sobre los cuales existe información relativa a su carcinogenicidad por vía oral. Si bien los 15 +1 EU-PAHs son indiscutiblemente genotóxicos y carcinógenos para los humanos, solo ocho de estos compuestos, denominados en conjunto PAH8, presentan evidencia de

carcinogenicidad por vía oral. Los compuestos que integran el grupo PAH8 son: BaA, Chry, BbF, BkF, BaP, DaA, BPe e IcP.

Por lo expuesto anteriormente, la EFSA ha determinado que los PAH8 son los mejores indicadores de presencia y toxicidad de los HAPs en los alimentos. Asimismo, pueden utilizarse como indicadores de presencia de HAPs en alimentos a cuatro de estos ocho compuestos (BaA, BbF, Chry y BaP), denominados conjuntamente PAH4, sin afectar la evaluación del riesgo (EFSA, 2008).

II.1.6. Aspectos normativos

Debido a la toxicidad de los HAPs y a su amplia distribución en el medio ambiente, se han determinado límites restrictivos para su contenido en diferentes matrices. A continuación presentamos los niveles de HAPs establecidos para el agua potable y los alimentos.

Diversos organismos internacionales sugieren el monitoreo del contenido de BaP en agua de bebida. Así, la Organización Mundial de la Salud establece un límite máximo de BaP de 700 ng/L (WHO, 2011) y la Agencia de Protección Medioambiental de los Estados Unidos establece un contenido máximo de BaP de 200 ng/L (USEPA, 2009). La Unión Europea en la Directiva 98/83/EC de Noviembre de 1998 establece un límite máximo de BaP equivalente a 10 ng/L y de 100 ng/L para la suma de BbF, BkF, BPe e IcP (EU, 1998). El Código Alimentario Argentino, en el Capítulo XII, artículos 982 y 983 (2007) establece un límite máximo para BaP en agua potable y en agua de bebida de 10 ng/L.

Los límites máximos para HAPs en alimentos están establecidos por el Reglamento 835/2011 de la Comisión Europea de fecha 19 de Agosto de 2011 (Tabla 3). En este reglamento se fija el contenido máximo expresado en µg/kg de BaP y PAH4 en alimentos ricos en grasas y aceites, alimentos ahumados y en los cuales los procesos de secado puedan generar altos niveles de HAPs y en alimentos destinados a

lactantes y niños de corta edad. Se puede apreciar que existen categorías de alimentos que no están cubiertas por esta legislación (hierbas y especias; suplementos alimentarios; café, té y otras infusiones; bebidas a base de cereales, entre otros).

La administración de Alimentos y Medicamentos (FDA, del inglés Food and Drug Administration), agencia de los Estados Unidos responsable de la regulación en materia de alimentos, hasta la fecha, no ha establecido normas que regulen el contenido de HAPs en los alimentos.

Tabla 3. Contenidos máximos de BaP y PAH4 en diferentes productos alimenticios (Reglamento (CE) N° 835/2011)

Productos Alimenticios	Contenido máximo (µg/kg)	
	BaP	Suma BaP, BaA, BbF y Chry
1. Aceites y grasas (excluida la manteca de cacao y el aceite de coco) destinados al consumo humano directo o a ser usados como ingrediente de productos alimenticios	2,0	10,0
2. Granos de cacao y productos derivados	5,0 (de la grasa)	30,0 (de la grasa)
3. Aceite de coco destinado al consumo humano directo o a ser usado como ingrediente de productos alimenticios	2,0	20,0
4. Carnes ahumadas y productos cárnicos ahumados	2,0	12,0
5. Carne de pescado ahumado y productos pesqueros ahumados, excluidos los productos pesqueros enumerados en los puntos 6 y 7. El contenido máximo para los crustáceos ahumados se aplica a la carne de los apéndices y el abdomen. En el caso de los cangrejos ahumados y crustáceos similares ahumados (<i>Brachyura</i> y <i>Anomura</i>), se aplica a la carne de los apéndices.	2,0	12,0
6. Espadines ahumados y espadines ahumados en conserva (<i>Sprattussprattus</i>); moluscos bivalvos (frescos, refrigerados o congelados); carnes y productos cárnicos tratados térmicamente y vendidos al consumidor final	5,0	30,0
7. Moluscos bivalvos (ahumados).	6,0	35,0
8. Alimentos elaborados a base de cereales y alimentos infantiles para lactantes y niños de corta edad.	1,0	1,0
9. Preparados para lactantes y preparados de continuación, incluidas la leche para lactantes y la leche de continuación.	1,0	1,0
10. Alimentos dietéticos destinados a usos médicos especiales dirigidos específicamente a los lactantes.	1,0	1,0

II.2. Yerba mate

II.2.1. Generalidades

La especie arbórea *Ilex paraguariensis* St. Hil. (Aquifoliaceae), conocida comúnmente como yerba mate, es nativa de la región subtropical de América del Sur. Abunda en forma silvestre y en cultivo en un área geográfica muy restringida, que comprende una parte del Sur de Brasil, Paraguay, Noreste de Argentina y Norte de Uruguay, extendiéndose entre los 20 y 34 ° de latitud Sur y entre los 45 y 56 ° de longitud Oeste, sobre una superficie de aproximadamente 540.000 Km² (Oliveira y Rota, 1985).

A nivel global, la yerba mate se produce con importancia económica sólo en tres países (Argentina, Brasil y Paraguay). Argentina es el principal productor de yerba mate, con un promedio de producción, entre los años 2010 y 2014, de alrededor de 250.000 ton, siendo responsable del 65 % de la producción total anual. Brasil y Paraguay son los segundos y terceros mayores productores de yerba mate, respectivamente, aportando Brasil alrededor de 31 % y Paraguay 4 % a la producción total anual del producto (Parra, 2013; INYM, 2015).

En Argentina, el cultivo de *I. paraguariensis* se lleva a cabo estrictamente en las provincias de Corrientes y Misiones, siendo esta última la principal elaboradora con una participación del 86 % de la producción total del país (INYM, 2015).

La yerba mate es un cultivo de gran importancia económica en nuestro país, no sólo por el elevado índice de consumo doméstico local (85 % del volumen producido), sino porque genera ingresos de millones de dólares por ventas en el exterior. Entre el año 2010 y el año 2013 Argentina exportó en promedio alrededor de 34.500 ton, lo que generó el ingreso de 77 millones de dólares al país sólo en el año 2013. Cabe destacar que en los últimos años, el precio por tonelada de yerba mate en el mercado

internacional presentó una gran suba. El principal destino de exportación de la yerba mate de origen argentino es Siria, adquisidor de aproximadamente el 71% de las exportaciones de yerba mate de nuestro país, y es abastecido del producto en un 100% por Argentina. Le siguen en importancia Chile (14,4%), Líbano (3,8%), Estados Unidos (1,8%) y España (1,6%) (Parra, 2013).

Si bien las infusiones preparadas con yerba mate se consumen ampliamente en los países de la región, es de destacar la expansión de las exportaciones a una importante diversidad de países en los últimos años, 65 en total, presentando una penetración en los nuevos mercados por sus características de novedad (Lysiak, 2009).

La popularidad que ha ido ganando la yerba mate es debida no sólo al aroma y al sabor característicos de sus infusiones, que la convierten en un producto único, sino también a los beneficios potenciales para la salud que le han sido atribuidos. Entre las propiedades biológicas de la yerba mate y sus infusiones se destacan su actividad antioxidante, los efectos anticarcinogénicos, antidiabéticos, antiobesidad, hipocolesterolémicos, antihipertensivos, cardioprotectores, antiinflamatorios, antibacterianos, antifúngicos, antivirales y antiparasitarios, además de poseer propiedades protectoras contra la osteoporosis, diuréticas, y coleréticas, entre otras. La mayoría de las propiedades biológicas de la yerba mate han sido asociadas al alto contenido de componentes bioactivos de sus hojas, siendo los alcaloides derivados de la purina (metilxantinas), los flavonoides y ácidos fenólicos, y numerosas saponinas triterpénicas derivadas del ácido ursólico (metasaponinas), los más importantes (Filip et al., 2000; Heck y Mejía, 2007; Bastos et al., 2007; Burris et al., 2012).

Por otro lado, en las últimas 3 décadas también se han manifestado ciertas preocupaciones acerca de la seguridad para la salud humana del consumo de las infusiones preparadas con yerba mate. Ciertos estudios epidemiológicos reportan la asociación entre el consumo de mate caliente y un mayor riesgo de contraer diferentes tipos de cáncer, fundamentalmente cáncer de esófago (Vasallo et al., 1985; Muñoz et

al., 1987; De Stefani et al., 1990; Barros et al., 2000; Sewram et al., 2003; Ronco et al., 2004; Lubin et al., 2014), mientras que otros no hallaron evidencias que permitan relacionar el consumo de mate caliente con el desarrollo de esta patología (Victoria et al., 1987; Castelletto et al., 1994). Los resultados de estos estudios son verdaderamente controversiales y ampliamente cuestionables (Loria et al., 2009). Los primeros reportes publicados en la literatura científica en el tema, han llevado a la IARC a clasificar al mate caliente como probablemente carcinogénico para los humanos (Grupo 2A) (IARC, 1991). La totalidad de las investigaciones antes mencionadas señalan a la injuria térmica, resultante del consumo frecuente de mate a altas temperaturas, como mecanismo carcinogénico. Asimismo, algunos de estos estudios, mencionan que otro de los posibles mecanismos carcinogénicos del mate es la presencia en la infusión de sustancias tóxicas con potencial mutagénico y carcinogénico, que se generan durante la manufactura del producto, los HAPs.

II.2.2. Proceso de manufactura de la yerba mate

En general, el proceso de manufactura de la yerba mate comprende cinco etapas, a saber: *a)* zapecado, *b)* secado, *c)* molienda gruesa o canchado, *d)* estacionamiento y *e)* molienda fina. Dicho proceso suele dividirse en dos etapas bien diferenciadas: *1)* Procesamiento o transformación primaria y *2)* Estacionamiento y Molienda.

Se conoce como *procesamiento primario* de la yerba mate, a una serie de operaciones básicas que se realizan sobre la materia prima en establecimientos comúnmente denominados *secaderos*. Estas operaciones son: *a)* el zapecado, el *b)* secado y *c)* el canchado. En general, los equipos y las condiciones de operación utilizados durante la transformación primaria de la yerba mate varían ampliamente en los diferentes establecimientos industriales (Nuñez y Känzig, 1995).

En la etapa de zapecado, el material es sometido a un tratamiento térmico para inactivar las enzimas responsables de los procesos de degradación química del

producto; simultáneamente se produce una pérdida importante de agua, principalmente en las hojas (Schmalko y Alzamora, 2001). En la etapa de secado, se elimina la humedad restante, obteniéndose un producto de entre un 3 y un 6% de humedad. Finalmente, se realiza una molienda gruesa de material, operación conocida como canchado.

Tras el procesamiento primario, la yerba mate es almacenada en depósitos iniciándose la etapa de estacionamiento. Es durante el estacionamiento donde se producen cambios físicos y químicos que desarrollan los caracteres organolépticos del producto final (Schmalko, 2005). Finalmente, la yerba mate estacionada es sometida al proceso de molienda fina; conjunto de operaciones que comprenden la clasificación, trituración y mezclado del producto, con el fin de lograr la adecuación de la yerba mate elaborada a las preferencias de los consumidores de los diferentes mercados destinatarios (Kotik, 1994).

A continuación se presenta una breve descripción de las etapas de manufactura de la yerba mate.

II.2.2.1. Recepción de la materia prima

Las ramas cosechadas de yerba mate son transportadas en camiones, los que son descargados en la playa de recepción de materia prima de los *secaderos*. En la misma permanece cierto tiempo antes de ser procesadas, pudiendo variar entre 1 y 12 horas, tiempo que se trata de minimizar para que no se produzcan fermentaciones, principalmente en los meses cálidos. En algunos casos se realiza la aireación del material por volteo, ya sea en forma manual o mecánica.

En general estas playas de recepción son cubiertas, para evitar la radiación de la luz solar directa y la lluvia. En la misma se realiza un control visual de la materia prima, poniéndose especial atención al diámetro de las ramas (que no sean demasiado grandes), la presencia de tierra y el grado de pardeamiento que presentan las ramas,

que es indicativo del tiempo de cosecha transcurrido y del cuidado en el transporte. En algunos casos extremos, la misma es rechazada.

La materia prima es transportada hasta la cinta de alimentación del zapecador utilizándose retroexcavadoras y/o cintas transportadoras.

II.2.2.2. Zapecado

El zapecador es un equipo en donde las ramas de yerba mate se ponen en contacto con la llama y los gases de combustión provenientes del quemado de leña, aserrín o chips de madera. El objetivo de esta etapa es producir la inactivación de las enzimas polifenoloxidasas y peroxidasas presentes en las hojas de, con el fin de evitar el pardeamiento en la etapa de secado (Nabechima et al., 2014). En algunos establecimientos, donde no existe la etapa de presecado, el zapecado también tiene como objetivo reducir el contenido de humedad en las hojas, de tal forma que cuando las mismas se dispongan en el lecho de secado, éste tenga una porosidad alta para facilitar el flujo del gas de secado (Schmalko, 2005).

Durante el zapecado, se producen una serie de modificaciones en el material que afectan su estructura física y composición química y que influyen en gran medida en la calidad del producto final, ya que un tratamiento ineficiente, puede dar lugar a una actividad enzimática residual, y un tratamiento excesivo, puede causar el quemado del producto.

El equipo de zapecado consiste en un cilindro que gira por medio de un engranaje a bajas revoluciones (aproximadamente 10 *rpm*). Las ramas se introducen en el extremo del cilindro en que se produce el quemado del combustible (leña, chips, viruta y/o aserrín de madera), recibiendo calor por radiación de la llama y convección. Luego, el aire, los gases de combustión y las ramas se desplazan hacia el extremo opuesto en corrientes paralelas. El flujo de la mezcla de aire caliente y gases de combustión es producido por una chimenea ubicada en el extremo de salida. El

desplazamiento de las ramas de yerba mate en el zapecador es producido mecánicamente por una serie de aletas dispuestas en forma discontinua en el interior del cilindro rotatorio, por una ligera inclinación del equipo que favorece el avance de la materia prima y por el arrastre de los gases de combustión. Es de destacar la gran uniformidad de diseño y operación de los zapecadores que existen en los diferentes establecimientos industriales (Schmalko, 2005).

El contenido de humedad de las ramas de *I paraguariensis* cuando ingresan al proceso de zapecado es de aproximadamente 60% (mh, de la materia húmeda). A la salida del zapecador, las hojas exhiben un contenido de humedad que varía entre un 10 y 30% (mh), mientras que los palos reducen su contenido de humedad entre 5 y 10% (Schmalko et al., 2011).

La temperatura de los gases a la entrada y a la salida del proceso se estima entre 400 °C y 500 °C y entre 120 °C y 250 °C, respectivamente (Nuñez y Känzig, 1995; Peralta y Schmalko, 2007). En un trabajo de simulación del zapecador, se estimó que la temperatura de las hojas alcanza en la llama un valor de 135 °C, reduciéndose en forma lineal hasta alcanzar 88 °C a la salida del zapecador, mientras que la temperatura de los palos se incrementa en forma lineal desde su valor de entrada al proceso (alrededor de 25°C) hasta 75 °C a la salida (Peralta y Schmalko, 2007).

El control del proceso de zapecado es bastante deficiente y se basa en la experiencia de los operarios a cargo del mismo, denominados *foguistas*. Un foguista con experiencia controla que las ramas a la salida del zapecador tengan el tratamiento adecuado, es decir, que las hojas no estén *quemadas*, lo que indica un tratamiento excesivo, ni que estén demasiado húmedas, lo que en la jerga se denomina *yerba cruda*, señal de un tratamiento térmico defectuoso. Los criterios empíricos de control incluyen: *a)* la inspección visual en busca de puntos negros en las hojas, lo que indica un tratamiento térmico excesivo y *b)* la verificación mediante el tacto y el oído de la humedad de las hojas. El producto de un proceso de zapecado óptimo son ramas de

yerba mate con hojas crujientes y sin puntos negros. En caso de detectar que la yerba mate egresa de la operación de zapecado *cruda*, el foguista debe cargar más biomasa en la zona de combustión para elevar la temperatura, o bien, solicitar que se disminuya o se detenga la carga de yerba mate a la alimentación. En caso de detectar que la yerba mate egresa del proceso *quemada*, en general, el foguista disminuye la temperatura del proceso arrojando agua en la zona de combustión.

II.2.2.3. Secado

Esta etapa tiene por objetivo reducir el contenido de humedad de las ramas de yerba mate desde 29-34% (mh) hasta aproximadamente un contenido de humedad entre 3 y 6% (mh). Esta operación se lleva a cabo poniendo el material en contacto con una mezcla de gases de combustión proveniente del quemado de leña, aserrín y/o chips de madera y aire. El tiempo de contacto entre las ramas de yerba mate y los gases de combustión varía de acuerdo al tipo de secadero. Básicamente, en la industria se utilizan 3 tipos de secado (Prat Krikum, 1995):

1) Secado de tiempos largos (entre 6 y 24 h): Se lleva a cabo en secaderos discontinuos con flujo a través del lecho, denominados *secaderos de catre o barbacué*.

2) Secado de tiempos medios (entre 3 y 6 h): Se lleva a cabo en secaderos de flujo cruzado continuos, poniéndose el material sobre una malla, a los que se denomina *secaderos de cinta*.

3) Secado de tiempos cortos (menores a 1 h): Se lleva a cabo en *secaderos rotatorios o tubulares*.

Cabe mencionar que algunos establecimientos industriales incorporan una etapa de *presecado* al proceso (secado de tiempo corto) que se realiza en equipos rotatorios o de cinta y utilizando gases de combustión a menor temperatura que en el zapecador (aproximadamente 200 °C) (Schmalko, 2005).

Los *secaderos de catre* son secaderos discontinuos, que tienen paredes de mampostería y una malla metálica sobre la cual se colocan las ramas en un lecho con una altura que varía entre los 0,8 m y 1,2 m. El gas utilizado para el secado, que en la mayoría de los casos proviene del quemado de leña, se introduce por tubos, ubicados en la parte inferior y homogéneamente distribuidos. Los conductos de alimentación de los gases y la malla con el material están separados por una distancia vertical de entre 2 m y 3 m. El tiempo de secado puede variar entre 6 h y 24 h. A lo largo del proceso, la materia prima se remueve cada cierto tiempo por medio de horquillas manejadas por un operario.

Los *secaderos de cinta* son secaderos continuos construidos de mampostería que pueden alcanzar longitudes de hasta 30 m de largo y 5 m de ancho. En la industria existen secaderos de hasta 3 cintas superpuestas, o bien de hasta 3 cintas consecutivas. El gas de secado se introduce en la parte inferior por conductos uniformemente distribuidos, pasa a través del lecho de ramas de yerba mate y sale por chimeneas ubicadas en el techo. El tiro puede ser natural o inducido por ventiladores ubicados a la salida. En este tipo de secaderos, el lecho de ramas de yerba mate posee alturas que varían de 0,7 m a 1 m y el tiempo de residencia total del material oscila entre 3 h y 6 h (Schmalko, 2005).

El principal inconveniente asociado a los secaderos de cinta, es el diferente contenido de humedad que tienen las ramas a diferentes alturas del lecho. Esto se debe a que las ramas que están en contacto con la cinta (parte inferior del lecho) entran en contacto directo con los gases de combustión que están a temperaturas elevadas (cerca de 100 °C); mientras que las ramas que se encuentran ubicadas en la parte superior del lecho, entran en contacto con gases de combustión a temperaturas inferiores (cerca de 60 °C). Un trabajo de simulación realizado por Schmalko et al. (2011) reporta que el contenido de humedad de los palos varía entre 3% y 40 % (ms, de la materia seca), en los niveles inferior y superior del lecho, respectivamente. El hecho descrito, no sólo genera heterogeneidad en el contenido de humedad de las

ramas a las diferentes alturas del lecho, sino que genera diferentes grados de contaminación del material con HAPs, ya que el contacto directo con los gases de combustión en los diferentes niveles de lecho se da de manera desigual.

En la práctica, con el fin de evitar esta desuniformidad en cierto grado, en los secaderos que poseen cintas superpuestas, se realiza una especie de inversión de la ubicación de las ramas de yerba mate durante el paso de una cinta a la otra, es decir que las que estaban en la parte superior pasan a estar en la inferior y viceversa. En los establecimientos industriales que poseen cintas consecutivas, se realiza un mezclado del material al pasar de una cinta a la siguiente.

Los secaderos rotatorios o *tubulares* son cilindros que giran, muy similares a los zapecadores. Las ramas y los gases de combustión son alimentados por un mismo extremo (corrientes paralelas). Se caracterizan por trabajar a altas temperaturas y cortos tiempos de residencia (entre 10 y 30 min). Un diseño especial de estos secaderos, son los *secaderos neumáticos*, en los que se introduce una corriente de aire para favorecer el transporte de las ramas.

Las temperaturas de trabajo se encuentran alrededor de 80 °C en los secaderos de catre, entre 80°C y 120 °C en los secaderos de cinta, y mayores a 200 °C en los secaderos tubulares. Los combustibles utilizados son leña, chips, viruta y/o aserrín de madera (Schmalko, 2005).

Cabe destacar que las condiciones de trabajo en los diferentes establecimientos industriales difieren mucho entre sí, ya sea en el tipo de equipo utilizado, el combustible, la temperatura del aire y/o el tiempo de residencia. Sin embargo el contenido de humedad de las ramas de yerba mate a la salida del proceso es bastante uniforme, encontrándose valores entre el 2 % y el 4 % (mh), de acuerdo a lo determinado por Núñez y Känzig (1995).

II.2.2.4. Canchado

El canchado es la operación de molienda gruesa de las ramas de yerba mate que se realiza a la salida del proceso de secado. Para ello se utiliza un molino de martillo que posee una criba de salida. El objetivo de esta etapa es reducir el volumen del material ya seco, y aumentar la superficie de contacto entre éste y el aire durante la etapa de estacionamiento. Asimismo, durante esta etapa se realiza un tamizado utilizando tamices rotatorios, con el fin de eliminar los palos de gran tamaño. La yerba mate canchada es posteriormente colocada en bolsas de arpillera o polipropileno de 50 kg y almacenada en depósitos iniciándose la etapa de estacionamiento (Schmalko, 2005).

II.2.2.5. Estacionamiento

El estacionamiento es una operación en la que se mantiene la yerba mate durante cierto tiempo para que adquiera las características de sabor y color requeridas por los consumidores (IRAM 20515, 2012).

Existen tres tipos de estacionamiento: *a)* acelerado, *b)* natural y *c)* mixto. El estacionamiento acelerado se realiza en cámaras acondicionadas, por un período de tiempo de entre 30 y 60 días. Las condiciones ambientales en la cámara de estacionamiento acelerado son estrictamente controladas, con temperaturas que varían entre los 50 y los 60 °C y una humedad relativa de alrededor del 60 %. El estacionamiento natural, de una duración de 9 a 24 meses, se realiza en depósitos cerrados donde las condiciones ambientales no son estrictamente controladas. El estacionamiento mixto, en el cual se controla la temperatura del aire, la cual usualmente oscila entre los 40°C y los 45 °C, pero no se controla la humedad relativa de la cámara, se extiende por al menos 180 días (Holowaty et al., 2015).

II.2.2.6. Molienda y envasado

La molienda se lleva a cabo en establecimientos industriales denominados molinos de yerba mate. En general, los molinos adquieren materia prima procedente de varios secaderos, ya sean propios o de terceros. Cabe destacar que, la yerba mate estacionada procedente de diversos secaderos, presenta diferentes cualidades organolépticas, en especial gustos y tonalidades variados, diferentes contenidos de humedad y diferentes granulometrías. Esto es debido a las condiciones de zapeado, secado, canchado y estacionamiento a las que fue sometida durante su elaboración. Las variables anteriormente descritas son las consideradas por los productores de yerba mate al momento de obtener la mezcla adecuada, de acuerdo a las preferencias de los consumidores habituales del producto (Schmalko, 2005).

Se denomina molienda a una serie de operaciones que comprende la clasificación, trituración y mezclado de la yerba mate mediante las cuales los establecimientos adecuan el gusto del producto a los consumidores de diferentes regiones del país o países importadores (Kotik, 1994).

Una vez en el molino, la yerba mate estacionada se vuelca en una tolva de alimentación, donde se realiza la mezcla de las distintas partidas, las que son depositadas en una zaranda cilíndrica de limpieza, para eliminar materiales extraños como papeles, hilos, insectos y palos de yerba mate de gran tamaño. Posteriormente, el material pasa por diferentes electroimanes para retener los objetos metálicos que pueda contener.

Luego, se realiza una trituración gruesa del material, con el fin de uniformar los materiales mezclados durante la primera etapa y se realiza la separación de las hojas y los palos de yerba mate utilizando zarandas rotatorias cilíndricas. Finalmente, las fracciones obtenidas (hojas y palos) son molidas por separado en molinos de martillos y con diferentes tamices de salida.

Las diferentes fracciones de hojas (polvo, hojas de tamaño pequeño y hojas de tamaño grande) y los palos son almacenados en diferentes silos cilíndricos. Estos silos poseen un cuerpo inferior cónico que cuenta con un dosificador de descarga en el extremo, con el que se regulan las diferentes proporciones de polvo, hojas pequeñas, hojas grandes y palos para obtener la mezcla deseada. Las diferentes fracciones son volcadas en una rosca transportadora, donde se realiza la mezcla, y luego elevadas hasta una tolva que alimenta la sección de envasado (Kotik, 1994; Schmalko, 2005).

El fraccionamiento y empaquetado se realizan en máquinas volumétricas que presan o no el producto dentro de los paquetes. Los paquetes de yerba mate (generalmente de 0,5 kg y de 1 kg) son envasados en cajas, paquetes de polietileno o fardos con diferentes unidades para ser enviadas a los centros de comercialización (De Bernardi y Prat Krikum, 2001).

Para la obtención de la yerba mate en saquitos, popularmente conocida como *mate cocido en saquitos*, se utiliza únicamente la fracción de hojas de yerba mate de tamaño pequeño. Una pequeña porción de dicha fracción de hojas de yerba mate (aproximadamente 3 g) se envasa en una bolsita de papel de filtro tissue (saquito). Los saquitos pueden o no ser individualmente ensobrados con papel común. Las presentaciones comerciales constan de cajas de cartón envueltas en polietileno que poseen 25 o 50 unidades (saquitos).

II.2.2.7. *Procesos alternativos de manufactura de la yerba mate*

Debido a la contaminación de la yerba mate con HAPs, en los últimos años se ha trabajado en el desarrollo de modificaciones en el proceso de manufactura tradicional para evitar el contacto del producto con gases de combustión. Las alternativas ensayadas incluyen modificaciones en la etapa de zapeado y la utilización de secado indirecto utilizando aire caliente como agente térmico para secar la yerba mate.

En la etapa de zapecado resulta muy difícil alcanzar las altas temperaturas usualmente utilizadas en el proceso (400 °C – 500 °C) calentando aire en forma indirecta, no así en la etapa de secado, cuya temperatura de operación es cercana a los 100°C. Debido a esto, las modificaciones ensayadas comprenden el zapecado por inmersión en agua caliente (Xander et al., 2000; Galeano et al., 2006; Galeano, 2010), zapecado por aplicación de vapor de agua (Galeano et al., 2006; Galeano, 2010), zapecado utilizando ondas de alta frecuencia (Pasardi et al., 2006; Laube, 2008) y zapecado utilizando un horno eléctrico de cinta transportadora (Nabechima et al., 2014).

Los ensayos utilizando agua caliente para el zapecado de las ramas de yerba mate se llevaron a cabo tanto a escala de laboratorio (Xander et al., 2000; Galeano et al., 2006; Galeano, 2010), como a escala industrial, en un equipo desarrollado y patentado por el Ing. Víctor Hugo Lorenzo. En este método se requieren temperaturas relativamente bajas y tiempos cortos para la inactivación de las enzimas responsables del deterioro biológico de *I. paraguariensis*. Además de no entrar en contacto con humo, las ramas de yerba mate son sometidas a un proceso de limpieza simultáneo al zapecado. Otra ventaja de este método, es que se puede utilizar cualquier tipo de combustible para calentar el agua y que el proceso puede ser fácilmente estandarizado y controlado. A pesar de esto, zapecar la yerba mate con agua caliente también tiene sus desventajas, a saber: *a)* el exceso de humedad del material a la salida del proceso, lo que podría traer inconvenientes en la etapa de secado, y *b)* la pérdida de componentes hidrosolubles durante la inmersión en agua, específicamente compuestos los bioactivos de *I. paraguariensis* como polifenoles, metilxantinas, entre otros.

El zapecado por aplicación de vapor de agua tiene ventajas similares al método anterior, aunque posee un mayor consumo energético asociado. Un equipo que utiliza vapor de agua para zapecar yerba mate a escala piloto fue desarrollado por el Ing.

Martín Barrionuevo durante la ejecución de un proyecto financiado por el Instituto Nacional de la Yerba Mate (INYM) (Barrionuevo, 2007).

Un tercer método, también desarrollado a escala piloto por el Sr. Norberto H. Laube y financiado por el INYM, consiste en utilizar ondas de alta frecuencia para zapecar y secar las ramas de yerba mate de manera simultánea (Laube, 2008). En este método se utilizan tiempos muy cortos de procesamiento, y sus principales desventajas es que se necesita un sistema de protección y que utiliza energía eléctrica, cuyo costo es muy variable en nuestro país.

Nabechima et al. (2014) diseñaron un horno eléctrico de cinta transportadora para zapecar ramas de yerba mate. Ellos reportan que tras un tratamiento térmico a 255 °C por unos 20-24 s se consiguió la inactivación de las enzimas foliares polifenoloxidasas y peroxisadas. Sin embargo, el tratamiento generó el ardido de algunas de las hojas, por lo que ciertos compuestos de pirólisis, específicamente HAPs podrían tener origen durante el proceso. Esto, sumado al alto costo energético asociado al consumo de electricidad, indican que se requieren más estudios para comprobar la efectividad de este método en el zapecado de la yerba mate.

En los últimos años se comenzó a utilizar el secado indirecto para secar las ramas de yerba mate evitando el contacto de las mismas con los gases de combustión y la consecuente contaminación con HAPs. En este tipo de secado, el agua es eliminada del material vegetal sin entrar en contacto con los gases de combustión. Los secaderos indirectos utilizan aire caliente para secar las ramas de yerba mate. Dicho aire se calienta en intercambiadores de tubo aleteados utilizándose gases de combustión provenientes del quemado de madera, o bien vapor de agua proveniente de una caldera.

II.2.3. Formas de consumo de la yerba mate

El modo de consumo más ampliamente difundido de la yerba mate elaborada es como infusión, fundamentalmente en forma de *mate*, *tereré* y *mate cocido*. Asimismo, la infusión preparada a partir de los compuestos solubles de la yerba mate en forma sólida (yerba mate soluble) es consumida en menor medida. En los últimos años surgieron una serie de productos preparados con yerba mate que escapan a la manera tradicional del consumo de este producto. Ejemplos de ello son bebidas refrescantes y energizantes a base de yerba mate, o bien con la yerba mate como uno de sus ingredientes; suplementos dietarios; productos cosméticos; entre otros.

Como se mencionó anteriormente, las infusiones preparadas con yerba mate más difundidas son tres: *a)* el mate caliente (o simplemente *mate*), *b)* el mate frío (*tereré*) y *c)* el *mate cocido* (preparada en tazas, de manera similar a como se prepara el té) (Schmalko, 2005).

El *mate* se prepara colocando la yerba mate en un recipiente sobre el cual se vierten, sistemáticamente, porciones de agua que luego son succionadas utilizando una bombilla. Los recipientes utilizados (también denominados *mate*) varían mucho según las diferentes regiones de consumo. El recipiente tradicional es una calabaza; pero también se utilizan vasos de vidrio, tazas de cerámica, recipientes de metal, etc. De acuerdo al volumen del recipiente, la porción de consumo puede variar entre 20 y 100 g. Las bombillas utilizadas son en la mayoría de los casos de metal (acero inoxidable, alpaca, acero bañado en bronce, etc.) y pueden tener diferentes formas, desde lisas y rectas hasta curvadas y con muchos adornos. La temperatura del agua utilizada para cebar *mate* depende del gusto de cada consumidor, del recipiente utilizado, entre otros factores. En general, la temperatura del agua utilizada por los consumidores oscila entre los 65°C y los 95 °C, y la misma es mantenida a través del uso de termos durante el consumo.

El mate frío o *tereré*, que se consume generalmente en época estival y en zonas cálidas, durante todo el año, se preparara de manera similar al *mate*; pero utilizando agua fría (4-10°C). En el nordeste argentino y en Paraguay el consumo de *tereré* con la adición de hierbas “refrescantes” (cedrón, menta, entre otras) es muy habitual. Asimismo el consumo del *tereré* con jugos y bebidas carbonatadas se ha expandido mucho en las últimas décadas, principalmente entre la población juvenil.

El *mate cocido* puede ser preparado de dos maneras, *a*) utilizando yerba mate elaborada (forma tradicional) y *b*) utilizando yerba mate envasada en saquitos.

Para preparar el *mate cocido* de forma tradicional, una porción pequeña y variable (acorde al gusto del consumidor) de yerba mate elaborada es vertida sobre agua que está siendo calentada en un recipiente apto para tal fin. La mezcla se mantiene bajo la acción del calor hasta la ebullición y finalmente es filtrada para su consumo.

El *mate cocido* preparado con yerba mate envasada en saquitos o bolsitas se consume en tazas de forma similar al té. La bebida se prepara colocando en contacto 200-250 mL de agua caliente (a temperatura cercana a la ebullición) con un saquito de yerba mate (cada saquito contiene aproximadamente 3 g de yerba mate), y dejándolo infusionar por aproximadamente 5 minutos (Schmalko, 2005; Parra, 2013).

SECCIÓN II

PARTE EXPERIMENTAL

Capítulo III

DESARROLLO Y VALIDACIÓN DEL MÉTODO PARA LA DETERMINACIÓN DE HAPs EN YERBA MATE Y SUS INFUSIONES

III.1. Introducción

La determinación de HAPs en matrices alimentarias requiere generalmente de métodos muy laboriosos los cuales incluyen varias etapas, siendo esenciales el pretratamiento de las muestras y los procedimientos de purificación (Zuin et al., 2005; Rubio et al., 2006; Ishizaki, 2010; Plaza Bolaños et al., 2010). Esto es debido a que los HAPs están presentes en los alimentos a niveles traza, siendo su extracción, aislamiento y análisis dificultosos. Además, muchas impurezas pueden ser coextraídas junto con los HAPs presentes en los alimentos, las cuales pueden interferir en la subsecuente separación e identificación de los compuestos de interés. Otra razón que vuelve al análisis dificultoso, es que la mayoría de los HAPs son estructuralmente similares, lo que convierte al proceso de separación e identificación engorroso (Chen, 1997).

Para la extracción de HAPs de la matriz alimentaria se utilizan solventes orgánicos de baja polaridad. Las técnicas más sencillas y ampliamente utilizadas son la agitación mecánica o la extracción asistida por ultrasonido, ambas aumentan el contacto de la muestra con el disolvente lo que facilita el proceso extractivo (Nieva-Cano et al., 2001; Lin et al., 2004; Bishnoi et al., 2006; Rey-Salgueiro et al., 2008; Oluseyi et al., 2011). Actualmente, se están aplicando otras estrategias de extracción como ser la extracción con fluidos supercríticos (Lage-Yusty et al., 2009); la extracción asistida con microondas (Zhang et al., 2010; Li et al., 2011; Kamankesh et al., 2015); la extracción con líquidos presurizados (Kamangar et al., 2008; Lund et al., 2009); el método QuEChERS (acrónimo del inglés: *Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe*), sistema de extracción mediante partición utilizando pequeños volúmenes de solventes orgánicos y una mezcla de sales, con una posterior purificación en fase sólida dispersiva (Dravoba et al., 2012; Escarrone et al., 2014; Sadowska-Rociek et al., 2014; Yoo et al., 2014), entre otras. Algunos métodos incluyen un proceso de saponificación, previo a la extracción con solventes orgánicos, con el fin de obtener extractos más

puros principalmente cuando se analizan alimentos con alto contenido lipídico (Kayali-Sayadi et al., 1998; Stolyhwo y Sikorski, 2005).

Una vez obtenido el extracto es necesario concentrarlo y purificarlo antes de someterlo al análisis cromatográfico. La etapa de purificación asegura que el extracto esté lo suficientemente libre de interferencias para evitar problemas de identificación y cuantificación durante el análisis por cromatografía. En la determinación de HAPs la técnica de purificación más utilizada es el uso de cartuchos desechables de extracción en fase sólida (SPE), del inglés *solid phase extraction*, debido a la simplicidad y rapidez de la técnica. Además, mediante el uso de cartuchos desechables se disminuye el consumo de solventes, lo que reduce los costos de la extracción y ofrece mayor seguridad en la manipulación de la muestra (Kayadi-Sayadi et al., 1998; Peña et al., 2003; García-Falcón et al., 2005; Camargo et al., 2011).

Luego de la extracción y purificación de la muestra, una alícuota del extracto obtenido es analizada por cromatografía. Las dos técnicas analíticas más utilizadas para la determinación de HAPs son la cromatografía gaseosa con detección por espectrometría de masa (GC-MS) y la cromatografía líquida de alta performance con detección por fluorescencia (HPLC-FLD) o con detección en el UV (HPLC-UV). En general, la GC-MS es ampliamente utilizada en la identificación y cuantificación de HAPs en muestras medioambientales, mientras que la HPLC es extensamente aplicada a la detección de HAPs en matrices alimentarias (Wenzl et al., 2006).

Los métodos HPLC-FLD ofrecen una alta sensibilidad y son los más utilizados en el análisis de alimentos (Kayadi-Sayadi et al., 1998; Nieva-Cano et al., 2001; Camargo et al., 2003; Zuin et al., 2005; García-Falcón et al., 2005; Badolato et al., 2006; Camargo et al., 2006; Lin y Zhu, 2006; Wegrzyn et al., 2006; Tfouni, y Toledo, 2007; Rey-Salgueiro et al., 2008; Ishizaki, 2010; Serpe et al., 2010; Camargo et al., 2011). Además, hay en la bibliografía reportes de métodos HPLC validados para la detección y cuantificación de HAPs en matrices alimentarias que utilizan detección UV (Lin et al., 2004; Lin et al.,

2005; Bishnoi et al., 2006) o una combinación UV/FLD (Windal et al., 2008; Simon et al., 2007; Roseiro et al., 2011).

En la actualidad, aún no existen procedimientos oficiales para la determinación de HAPs en alimentos. La existencia de una metodología oficial resolvería las dificultades asociadas especialmente con el aislamiento de los compuestos a partir de las diferentes matrices alimentarias, la purificación y concentración de las muestras sin pérdidas significativas de los analitos, y la separación, identificación y cuantificación de los diferentes HAPs. Esto demuestra la necesidad del desarrollo y la validación de métodos analíticos rápidos y fidedignos que permitan el monitoreo de los niveles de HAPs en muestras de yerba mate y en las infusiones preparadas con el producto.

III.2. Materiales y Métodos

III.2.1. Materiales

III.2.1.1. *Patrones, disolventes y reactivos*

Se utilizó una mezcla patrón de los 8 HAPs (BaA, Chry, BbF, BkF, BaP, DaA, BPe, IcP) de concentración 10 ng/μL (Supelco, Bellefonte, PA, USA).

Los disolventes (ciclohexano y acetonitrilo) y el agua utilizados en la extracción y análisis cromatográfico de las muestras fueron grado HPLC (Merck Chemicals, Buenos Aires, Argentina).

El sulfato de sodio anhidro utilizado para eliminar restos de agua durante la extracción de los HAPs de las infusiones fue adquirido de Merck Chemicals (Buenos Aires, Argentina).

III.2.1.2. *Muestras*

Durante el desarrollo y validación del método analítico para la determinación de HAPs en muestras de yerba mate y sus infusiones se utilizaron dos tipos de muestras: 1) Dos muestras comerciales de yerba mate elaborada y 2) una muestra de yerba elaborada “libre de HAPs” utilizada como material de referencia en los ensayos de recuperación.

Las dos muestras de yerba mate comercial fueron adquiridas en mercados locales de la ciudad de Posadas (Argentina). Las mismas fueron sometidas a un proceso de cuarteo y posteriormente acondicionadas en bolsas con cierre hermético y mantenidas a -20°C hasta comenzar con los procedimientos analíticos.

La muestra de yerba mate libre de HAPs utilizada como material de referencia fue elaborada en el Laboratorio de Yerba Mate de la Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales de la Universidad Nacional de Misiones. Para ello, se cosecharon

ramas frescas de *I. paraguariensis* las cuales fueron transportadas inmediatamente al laboratorio donde fueron procesadas sin entrar en contacto con humo. Las ramas de yerba mate fueron zapecadas con vapor de agua (105 °C durante 10 min) utilizando un equipo a escala piloto construido a partir del desarrollo de un proyecto financiado por el Instituto Nacional de la Yerba Mate (INYM) y dirigido por el Ing. Martín Barionuevo (2007), y posteriormente fueron secadas en un secadero de planta piloto con aire caliente a 90°C, utilizando flujo cruzado hasta un contenido de humedad de aproximadamente 5 % de la materia seca. Finalmente, la muestra (aproximadamente 300 g) fue molida y se llevó a estacionamiento en una cámara construida para tal fin. La yerba mate fue estacionada durante 3 meses a 60 °C y 60% de humedad relativa y posteriormente acondicionadas en bolsas con cierre hermético y mantenidas a -20°C hasta comenzar con los procedimientos analíticos.

III.2.2. Métodos

III.2.2.1. Determinación de humedad de las muestras de yerba mate

El contenido de humedad de las muestras de yerba mate fue determinado en una estufa a 103 °C ± 2 °C procediendo según la norma IRAM 20503 (1995).

Una cantidad conocida de la muestra fue colocada en un pesafiltros debidamente acondicionado. Luego, el pesafiltros conteniendo la muestra de yerba mate fue llevado a una estufa a 103 °C ± 2 °C durante 6 h. Transcurrido el tiempo de secado, el pesafiltros fue retirado de la estufa y colocado en un desecador hasta enfriarse. Finalmente se pesó el pesafiltros.

El contenido de humedad expresado como porcentaje en masa (% base húmeda) fue calculado según la fórmula:

$$\text{Contenido de Humedad} = (m_0 - m_1) \cdot \frac{100}{m_0}$$

siendo:

m_0 , la masa inicial de la muestra antes de secar, en gramos.

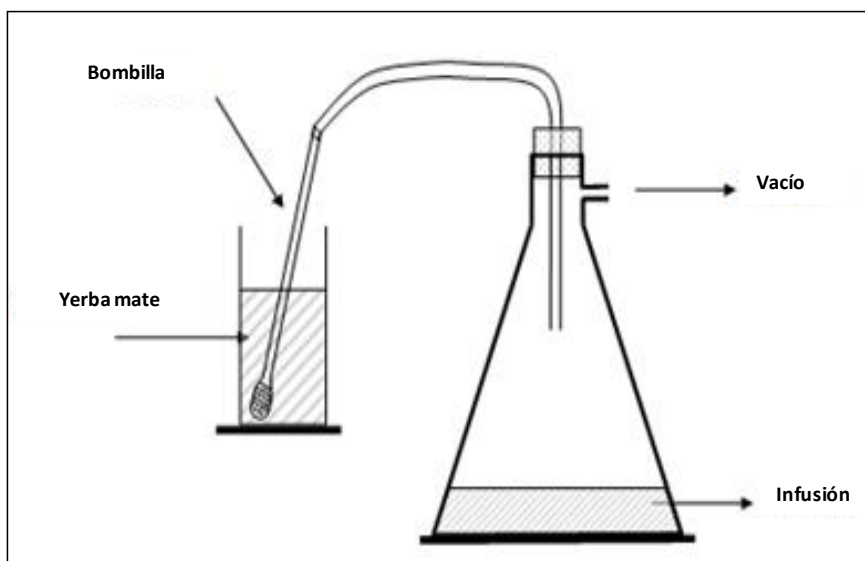
m_1 , la masa de la muestra seca, en gramos.

Cada muestra fue procesada por duplicado tomando como resultado la media aritmética de las dos determinaciones.

III.2.2.2. Preparación de las infusiones

Para el desarrollo y validación del método analítico para la determinación de HAPs en infusiones se prepararon infusiones calientes de yerba mate utilizando un dispositivo que simula el procedimiento real de tomar mate, según lo descrito por Ramallo et al. (1998) (Figura 4).

Figura 4. Esquema del dispositivo utilizado en la obtención del mate y el tereré
(Tomada de Hartwig et al., 2012)



Brevemente, $50 \text{ g} \pm 0,1 \text{ g}$ de yerba mate elaborada fueron dispuestos en un recipiente de vidrio de 250 mL de capacidad y una bombilla de acero inoxidable se insertó en el material. La bombilla fue conectada, a través de una manguera de

silicona, a un kitasato de 500 mL de capacidad, el que a su vez fue conectado a una trampa de vacío. Aproximadamente, 30 mL de agua destilada a 70 °C fueron vertidos sobre la yerba mate, y luego de 20 s de contacto se aplicó vacío durante otros 20 s. Luego de detenida la aplicación del vacío se vertieron otros 30 mL de agua destilada y el proceso se repitió sistemáticamente hasta que el volumen de infusión recuperado en el kitasato alcanzó los 500 mL (el proceso de infusión duro entre 10 y 15 min).

III.2.2.3. Método propuesto para la determinación del contenido de HAPs en muestras yerba mate e infusiones preparadas con yerba mate

Las técnicas de extracción y purificación aquí propuestas han sido optimizadas y se han basado en las metodologías de análisis de HAPs publicadas en la literatura científica tanto en yerba mate (Zuin et al., 2005; Kamangar et al., 2008; Vieira et al., 2009) como en matrices alimentarias similares: té (Kayali Sayadi et al., 1998; Lin y Zhu, 2004; Lin et al., 2005), café (García-Falcón et al., 2005; Orechio et al., 2009; Lee y Shin, 2010) y frutas y verduras (Dugay et al., 2002; Camargo y Toledo, 2003; Bishnoi et al., 2006).

Para la detección y cuantificación de los HAPs se ha utilizado la cromatografía líquida de alta performance con detección de fluorescencia (HPLC-FLD). Las condiciones cromatográficas utilizadas se han desarrollado en base a lo propuesto por Dionex (1994) en su Nota de Aplicación 95 disponible en la literatura, en la que se utilizó una columna HPLC de fase reversa y los HAPs fueron eluidos utilizando un gradiente acetonitrilo/agua.

(a) Extracción

Para muestras de yerba mate: La muestra de yerba mate (2 g) fue mezclada con 10 mL de ciclohexano y llevada a un baño de ultrasonido durante 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, el extracto fue centrifugado a 2.680 g durante 10 min. Se reservó el sobrenadante y la extracción se repitió dos veces más sobre el

sedimento. Los 3 extractos combinados se concentraron mediante el uso de un evaporador rotatorio, equipado con un baño de agua termostaticado a 39,5 °C, hasta un volumen aproximado de en 3 mL. La cantidad de yerba mate utilizada en la extracción fue diferente según el tipo de muestra.

Para infusiones: Un volumen de la infusión (250 mL) fue mezclado con 100 mL de ciclohexano y sometido a agitación en un agitador mecánico durante 90 min. Posteriormente, la mezcla fue dispuesta en una ampolla de decantación para su separación. La fase acuosa fue descartada y se recogió la fase orgánica. Finalmente, el extracto se secó utilizando sulfato de sodio anhidro y se concentró en un evaporador rotatorio a 39,5 °C hasta un volumen aproximado de 3 mL.

(b) Purificación por extracción en fase sólida (SPE)

Para la purificación de los extractos se utilizaron cartuchos comerciales de extracción en fase sólida (SPE) (Bond Elut SI, 3 mL, 500 mg) (Agilent Technologies, Lake Forest, CA, USA). Los cartuchos fueron previamente acondicionados con 3 mL de ciclohexano con el fin de solvatar las moléculas del adsorbente y de esta forma favorecer su interacción con los analitos que se desea retener. Luego, el extracto fue filtrado a través del cartucho y lavado con 9 mL adicionales de ciclohexano. El extracto purificado fue llevado a sequedad mediante el uso de un evaporador rotatorio, y finalmente redissuelto en 3 mL de acetonitrilo con asistencia del baño ultrasónico y pasado a través de un filtro para jeringa de nylon de 0,22 µm de poro (Agilent Technologies, Lake Forest, CA, USA) estando listo para su análisis cromatográfico.

(c) Cromatografía líquida de alta performance (HPLC)

Una porción del extracto purificado (5 µL para extractos de yerba mate elaborada y 25 µL para los extractos obtenidos a partir de las infusiones) fue inyectada en un cromatógrafo Shimadzu Prominence equipado con una bomba cuaternaria (LC-20AT), inyector automático (SIL-20 A HT) y detector de fluorescencia con longitud de onda programable en el tiempo (RF-10A XL).

Para la separación de los compuestos se utilizó una columna Supelcosil™ LC-PAH column (250 x 4,6 mm, 5 μm) (Supelco, Bellefonte, PA, USA), que fue mantenida a temperatura constante (30 °C) durante todo el análisis en un horno de termostización (CTO-20AC) con el fin de obtener tiempos de retención (t_R) reproducibles de los diferentes HAPs detectados. La fase móvil utilizada fue una mezcla acetonitrilo/agua en gradiente con una velocidad de flujo de 1 mL/min. La elución se realizó por gradiente comenzando con un 60% de acetonitrilo en agua (v/v) durante 5 min. A continuación, la concentración de acetonitrilo fue aumentando linealmente hasta alcanzar el 100% en el minuto 30 y fue mantenida en estas condiciones por los próximos 15 minutos (hasta el min 45). Finalmente, se regresó a las condiciones iniciales del sistema (60% acetonitrilo en agua v/v) en 5 min y se permitió que éste se equilibre durante 5 min adicionales. Los analitos fueron detectados y cuantificados mediante el monitoreo de la emisión de fluorescencia a 430 nm (BaA, Chy, BbF, BkF, BaP, DahA, BPe) y a 500 nm (IcP), con una longitud de onda de excitación (λ_{exc}) común de 270 nm. Los detalles de las condiciones cromatográficas utilizadas se resumen en la Tabla 4.

Al inicio de cada jornada de trabajo con el cromatógrafo se corrieron un blanco de solvente y una muestra patrón de 0,3 μg/mL. Asimismo, se procesó una muestra blanco de extracción por duplicado de manera simultánea a la extracción, purificación y análisis de cada serie de muestras reales. Periódicamente se construyeron nuevas curvas de calibración para cada HAP.

Tabla 4. Resumen de las condiciones cromatográficas

Parámetros instrumentales	Condiciones		
Columna	Supelcosil™ LC-PAH column (250 x 4,6 mm, 5 μm)		
Temperatura de la columna	30 °C		
Fase móvil	A: Agua B: Acetonitrilo		
Modo de elución	Gradiente		
	Tiempo (min)	A (%)	B(%)
	0	40	60
	5	40	60
	30	0	100
	45	0	100
	50	40	60
	55	40	60
Flujo de la fase móvil	1 mL/min		
Detector	Fluorimétrico con longitud de onda variable		
	Tiempo (min)	$\lambda_{excitación}$	$\lambda_{emisión}$
	0	270	430
	43	270	500
	50	270	430
Volumen de inyección	Yerba mate: 5 μL Infusiones: 25μL		

III.2.2.4. Identificación y cuantificación de los HAPs

La identificación de los HAPs se realizó comparando los tiempos de retención (t_R) de la muestra con los t_R correspondientes a los picos cromatográficos del patrón. La cuantificación se realizó utilizando el método del estándar externo, integrando las áreas bajo la curva de cada HAP detectado y aplicando la ecuación de regresión obtenida durante la calibración.

Para la construcción de las curvas de calibración se realizaron diluciones con acetonitrilo de la mezcla patrón comercial de los 8 HAPs (BaA, Chry, BbF, BkF, BaP, DahA, BPe, IcdP) de concentración 10 ng/μL. Las disoluciones se prepararon por

triplicado, a siete niveles de concentración cubriendo un amplio rango de concentraciones. En la Tabla 5 se muestran los rangos de concentración empleados en la construcción de las rectas de calibrado para cada HAP.

Tabla 5. Intervalos de concentración de cada HAP utilizados en la calibración

HAPs	Intervalo de calibración (µg/mL)	Intervalo de calibración (µg/kg)	Intervalo de calibración (ng/L)
BaA	0,0003 – 0,3	0,18 – 180,0	3,6 – 1.200,0
Chry	0,001 – 0,3	0,6 – 180,0	12,0 – 1.200,0
BbF	0,0003 – 0,3	0,18 – 180,0	3,6 – 1.200,0
BkF	0,0003 – 0,3	0,18 – 180,0	3,6 – 1.200,0
BaP	0,0001 – 0,3	0,006 – 180,0	0,0012 – 1.200,0
DaA	0,0007 – 0,3	0,42 – 180,0	8,4 – 1.200,0
Bpe	0,0005 – 0,3	0,3 – 180,0	6,0 – 1.200,0
IcP	0,005 – 0,3	6,0 – 180,0	60,0 – 1.200,0

III.2.3. Validación del método propuesto

La validación puede definirse como un proceso basado en estudios sistemáticos de laboratorio, mediante el cual se pone en manifiesto que un método analítico determinado es adecuado para la aplicación que se le quiere dar. Un nuevo método, desarrollado para un problema analítico específico, debe ser validado ya que es necesario verificar que sus parámetros de desempeño son apropiados para su uso en dicho problema analítico (Thompson et al., 2002; ICH, 2005; EURACHEM, 2014).

Los parámetros de validación considerados en este trabajo fueron linealidad, límites de detección (LOD, de sus siglas en inglés, *limit of detection*), límites de cuantificación (LOQ, de sus siglas en inglés, *limit of quantification*), exactitud y

precisión, de acuerdo con los procedimientos para la validación de métodos analíticos establecidos por la Conferencia Internacional de Armonización (ICH, 2005).

La linealidad del método se verificó a través de los coeficientes de determinación (R^2) de las curvas de calibración. El LOD y LOQ se determinaron en base a la desviación estándar de la respuesta y la pendiente de las curvas de calibración. La repetibilidad se evaluó mediante la desviación estándar relativa (RSD%) de las áreas de los picos cromatográficos correspondientes a los siete niveles que cubren el intervalo de concentraciones del procedimiento, medidas por triplicado durante el mismo día de análisis.

La exactitud del método se evaluó mediante la realización de pruebas de recuperación utilizando la muestra de yerba mate “libre de HAPs” (muestra blanco) como material de referencia. Para el caso de la yerba mate, se obtuvieron los extractos de las muestras blanco inoculadas con diferentes cantidades de la mezcla estándar de HAPs, a fin de conseguir 3 niveles de contaminación conocidos: 0,5 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ y 15 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Estos extractos fueron obtenidos siguiendo los procedimientos de extracción y purificación descritos anteriormente para yerba mate elaborada, y fueron analizados bajo las condiciones cromatográficas del método propuesto (véase la sección **III.2.2.3**). Para la realización de los ensayos de recuperación en las infusiones, se utilizó la yerba mate “libre de HAPs” para la preparación de las mismas siguiendo el procedimiento descrito previamente (véase la sección **III.2.2.2**). Una vez obtenidas las infusiones, se procedió a inocularlas con diferentes diluciones de la mezcla patrón de HAPs a fin de obtener 3 niveles de contaminación conocidos: 40 ng/L , 100 ng/L y 1000 ng/L . Las infusiones fortificadas con HAPs fueron sometidas a los procesos de extracción, purificación y análisis de la misma manera que lo descrito en la sección **III.2.2.3** para muestras de infusiones preparadas con yerba mate. Se analizaron duplicados independientes de cada una de las muestras fortificadas y los resultados obtenidos se informaron como porcentajes de recuperación (R%), que se calcularon según la siguiente ecuación:

$$R\% = \frac{C_{muestra\ fortificada}}{C_{adicionada}} \cdot 100$$

donde $C_{muestra\ fortificada}$ es el contenido del analito medido y $C_{adicionada}$ es la concentración conocida de analito que fue agregada a la muestra blanco.

III.2.4. Análisis estadístico

El análisis estadístico requerido para la validación del método analítico fue realizado utilizando el software Statgraphics Centurion XV (2009).

III.3. Resultados y Discusión

III.3.1. Optimización de las condiciones de extracción y purificación de la muestra

Las condiciones óptimas de extracción y purificación de las muestras de yerba mate (producto sólido) se ensayaron utilizando diferentes cantidades de muestra (2 y 5 g) mezcladas con diferentes volúmenes del solvente de extracción (10 y 20 mL). El método de elección fue extracción asistida por ultrasonido, evaluándose diferentes tiempos de extracción fraccionados en procesos extractivos, es decir 2, 3 y 4 extracciones de 30 minutos de duración cada una. Se obtuvieron buenas recuperaciones de los compuestos de interés utilizando 2 g de muestra y 10 mL de ciclohexano para cada proceso extractivo. Las condiciones de extracción óptimas se observaron al realizar 3 procesos de extracción asistida por ultrasonido de 30 min de duración cada uno. Cabe destacar que, la utilización de mayores cantidades de muestra (5 g), ocasionó problemas de atascamiento del extracto durante la etapa de purificación por SPE, probablemente por causa del alto contenido de sustancias lipofílicas (fundamentalmente carotenoides).

Para la optimización de la extracción y purificación de las muestras de infusiones (muestras líquidas), se ensayaron diferentes relaciones de volumen de infusión (100 y 250 mL)/ volumen de ciclohexano (100 y 50 mL). También se ensayaron métodos de extracción diferentes a saber, extracción asistida por ultrasonido y extracción por agitación mecánica, ambos, utilizando diferentes tiempos (60, 90 y 120 min). Se observaron porcentajes de recuperación superiores en los extractos obtenidos utilizando agitación mecánica respecto a los obtenidos utilizando el baño de ultrasonidos.

Con la utilización de ultrasonidos se busca dispersar el disolvente de extracción en la fase acuosa, facilitando el fenómeno de emulsificación y acelerando el proceso de transferencia de masa entre las fases inmiscibles, dando lugar a un notable

incremento en la eficiencia de la extracción líquido-líquido. Los sistemas de ultrasonidos más utilizados en el laboratorio del análisis químicos son los baños de ultrasonido y las sondas ultrasónicas. Es sabido que el uso de baños de ultrasonidos, como el que ha sido utilizado durante el desarrollo del presente trabajo, trae consigo ciertas limitaciones como *a)* la falta de uniformidad en la transmisión de la energía ultrasónica y *b)* la disminución de la potencia del baño a lo largo del tiempo y la falta de control de la misma. Esto, disminuye la utilidad de estos equipos para los procesos de extracción que involucran, por ejemplo, analitos enlazados químicamente con la matriz, o la mezcla de grandes volúmenes de líquidos inmiscibles, como el caso de la extracción líquido-líquido desarrollada en el presente trabajo. En estos casos, la potencia ha de ser suficiente para poder producir cavitación dentro del recipiente de extracción situado, a su vez, dentro del baño, situación que no siempre se consigue con los equipos comerciales, los que presentan falta de eficacia en la transferencia energética. El uso de sondas ultrasónicas aumenta esta eficacia, ya que la energía de los ultrasonidos se irradia directamente en el medio de extracción (Luque de Castro y Priego Capote, 2007; Ozcan et al., 2012).

Finalmente, las mejores condiciones de extracción fueron 250 mL de infusión con 100 mL de solvente extractivo, con agitación mecánica por 90 min. En la obtención de las muestras de *mate cocido*, por cuestiones propias del método tradicional de preparación de la bebida, el volumen final de la infusión obtenida fue de 200 mL. Por este motivo, tras obtener la infusión se procedió a traspasarla al recipiente de extracción y enjuagar el recipiente de preparación de la infusión con 50 mL de agua, que fueron vertidos al recipiente de extracción junto con la muestra, obteniendo así un volumen final de 250 mL para comenzar con los procedimientos analíticos.

Durante el desarrollo del método analítico, se pudo observar que tras los procedimientos de extracción, tanto los extractos provenientes de muestras de yerba mate como los extractos obtenidos a partir de las infusiones presentaban colores verdes de intensidad variable. Esto indica la presencia de pigmentos fotosintéticos, lo

que además sugiere que otros compuestos de carácter polar pueden estar presentes. Por este motivo, se incluyó una etapa de purificación por SPE sobre un soporte polar (silica) para atrapar las impurezas hidrofílicas que pudieran estar presentes en los extractos. Se observó que tras el pasaje del extracto a través del cartucho, el enjuague del mismo con 3 porciones de 3 mL de ciclohexano permitió una buena recuperación de los compuestos de interés.

III.3.2. Desarrollo y optimización del método HPLC-FLD

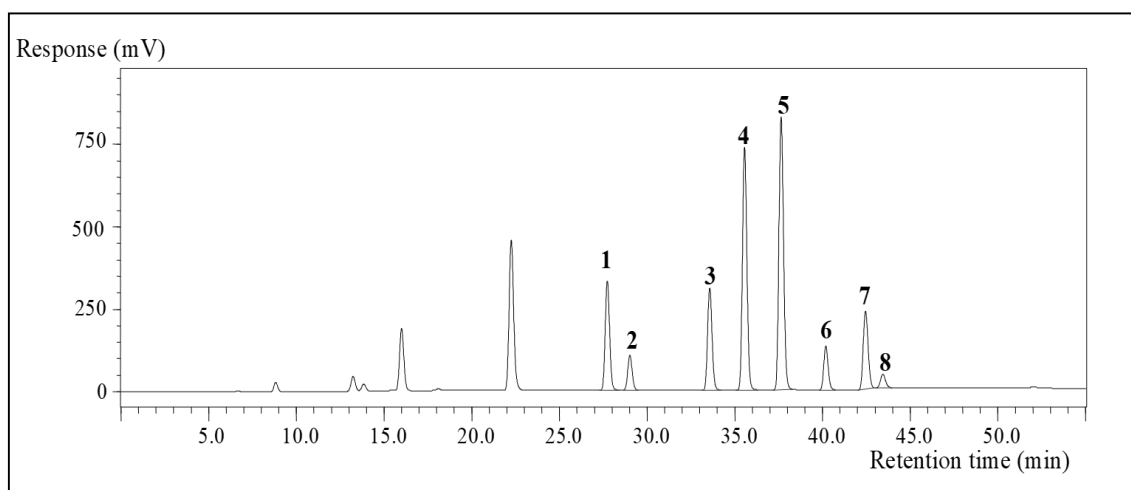
La separación y detección de HAPs ha sido ampliamente descrita en la literatura. En general, las separaciones se realizan utilizando columnas cromatográficas HPLC de fase reversa, fases móviles compuestas por acetonitrilo y agua en diferente proporción, y detección de fluorescencia (Camargo y Toledo, 2002; Lin et al., 2005; Stolyhwo y Sikorski, 2005; Badolato et al., 2006; Camargo et al., 2006; Kamangar et al., 2008; Serpe et al., 2010). Bajo estas condiciones de trabajo, la retención de los compuestos en la columna es proporcional a su peso molecular (Węgrzyn et al., 2006).

Los parámetros cromatográficos iniciales se tomaron del método publicado por Dionex (1994) en su Nota de Aplicación 95 disponible en la literatura, y fueron adaptados para separar y detectar los 8 HAPs de interés en el menor tiempo de ejecución posible. Se probaron diferentes programas de gradiente utilizando diferentes proporciones de acetonitrilo y agua. Utilizando las condiciones cromatográficas expuestas en la sección **III.2.2.3.c** se observaron cromatogramas con picos bien resueltos y en un tiempo de funcionamiento razonable. Asimismo, se evaluó la influencia de la temperatura sobre la resolución de los diferentes HAPs de interés mediante el ajuste del horno de termostatación a 28 °C, 30 °C y 32 °C y la mejor separación se logró a 30 °C. Se estudiaron dos velocidades de flujo (1,0 mL/min y 1,5 mL/min) y se observó que la velocidad de 1,0 mL/min fue apropiada para obtener una buena separación, manteniendo una buena calidad y tiempo de análisis. Se ensayaron diferentes programas de longitudes de onda de excitación y emisión (λ_{exc} y λ_{em}) para el

detector de fluorescencia publicados en la literatura, y se observó que bajo las condiciones descritas en la sección III.2.2.3.c se logró monitorear con una buena calidad cromatográfica a los 8 HAPs de interés.

En la Figura 5 se presenta el cromatograma típico de la mezcla patrón a una concentración 0,3 µg/mL, obtenido bajo las condiciones de elución descritas anteriormente.

Figura 5. Cromatograma de la mezcla estándar de PAH8 (0,3 µg/mL)



1) benzo[a]antraceno; **2)** criseno; **3)** benzo[b]fluoranteno; **4)** benzo[k]fluoranteno; **5)** benzo[a]pireno; **6)** dibenzo[a,h]antraceno; **7)** benzo[g,h,i]perileno y **8)** indeno[1,2,3-cd]pireno.

El cromatograma correspondiente a la muestra blanco de yerba mate (yerba mate “libre de HAPs”) es presentado en la Figura 6. En la Figura 7 se presenta el cromatograma de la muestra blanco fortificada con HAPs a una concentración de 1 µg/kg.

Figura 6. Cromatograma de una muestra blanco de yerba mate

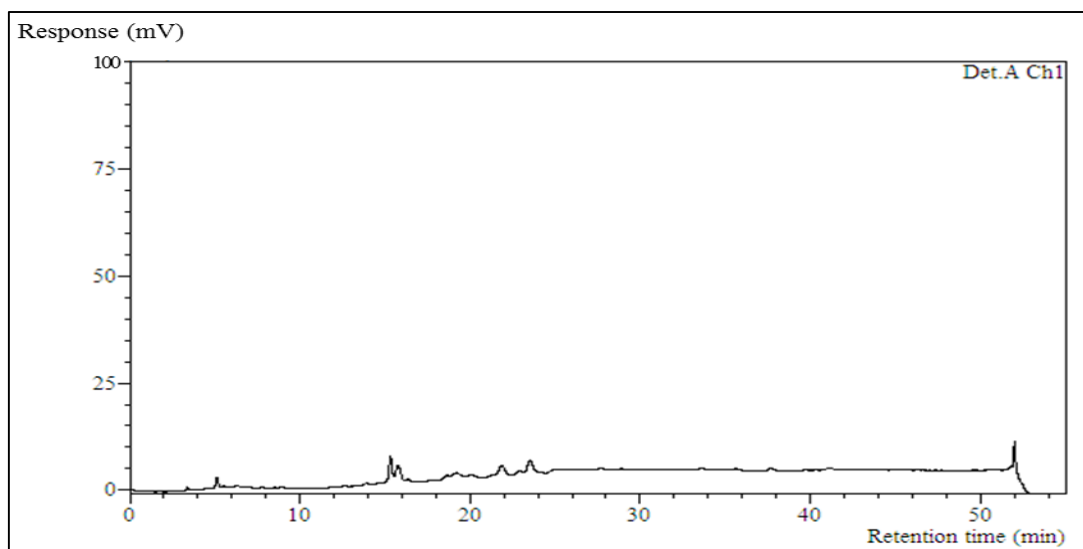
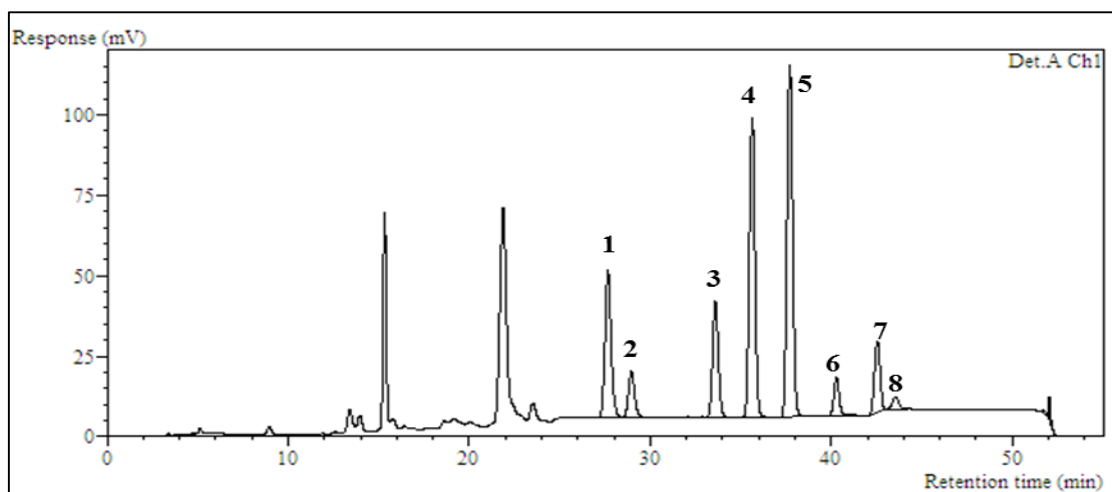


Figura 7. Cromatograma de la muestra blanco de yerba mate fortificada con PAH8 (15µg/kg)



1) benzo[a]antraceno; 2) criseno; 3) benzo[b]fluoranteno; 4) benzo[k]fluoranteno; 5) benzo[a]pireno; 6) dibenzo[a,h]antraceno; 7) benzo[g,h,i]perileno y 8) indeno[1,2,3-cd]pireno

III.3.3. Validación del método analítico

III.3.3.1. Linealidad

La linealidad de un método analítico se define como la capacidad para generar resultados que son directamente proporcionales a la concentración del analito dentro de un rango dado. Para la evaluación de la linealidad de un método analítico, en general, se calcula la recta de regresión por el método de cuadrados mínimos, de los resultados del método vs. la concentración del analito (ICH, 2005).

La linealidad del método cromatográfico fue evaluada en un amplio rango de concentraciones. Para ello, se prepararon soluciones estándares de calibración a siete niveles de concentración por triplicado (dentro de los intervalos presentados en la sección III.2.2.4) las que fueron analizadas por el método HPLC-FLD desarrollado. Una vez obtenidos los resultados (respuestas del detector para cada uno de los estándares), se realizó el análisis de regresión por mínimos cuadrados y se obtuvo la curva de calibración para cada HAP. En la Tabla 6 se presentan los parámetros de las ecuaciones de calibración de los 8 HAPs estudiados: pendiente (a), ordenada al origen (b) y el coeficiente de correlación (r) de la línea de regresión.

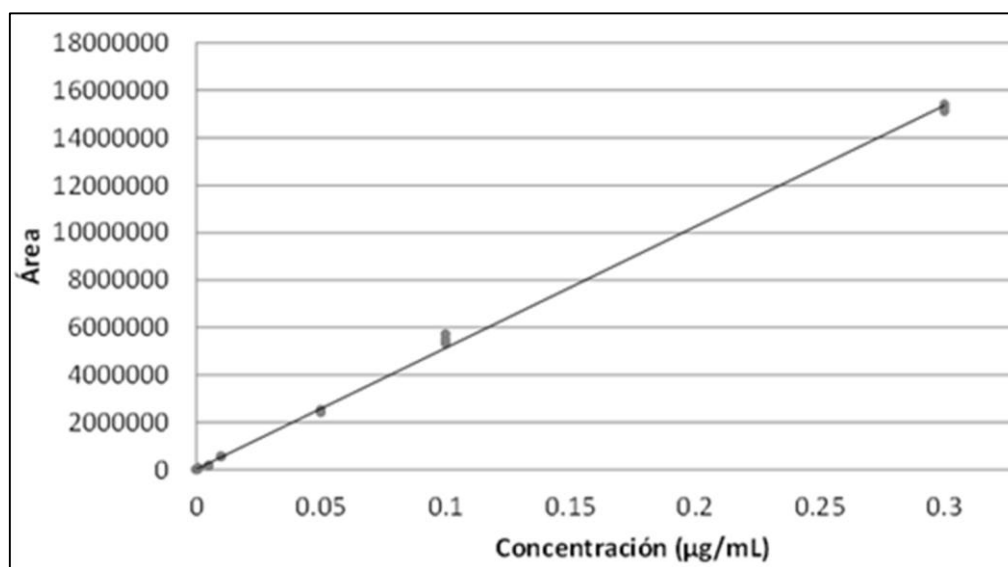
Los resultados obtenidos demuestran que el modelo ajustado explica la respuesta a partir de la variable concentración. Se pudo observar buena linealidad del método analítico dentro de los rangos de concentración estudiados para cada PAH, con valores de r superiores a 0,999.

Como ejemplo, en la Figura 8 se presenta la curva de calibración ajustada obtenida para el BaP.

Tabla 6. Parámetros estadísticos de las curvas de calibración de cada HAP individual.

HAPs	Intervalo de calibración ($\mu\text{g/mL}$)	Pendiente (a)	Ordenada al origen (b)	Coefficiente de correlación (r)
BaA	0,0003 – 0,3	$1,92 \times 10^7$	$-7,39 \times 10^3$	0,999945
Chry	0,001 – 0,3	$6,12 \times 10^6$	$-2,99 \times 10^3$	0,999904
BbF	0,0003 – 0,3	$1,81 \times 10^7$	$-8,40 \times 10^3$	0,999923
BkF	0,0003 – 0,3	$4,32 \times 10^7$	$-1,97 \times 10^4$	0,999932
BaP	0,0001 – 0,3	$5,12 \times 10^7$	$4,95 \times 10^3$	0,999455
DaA	0,0007 – 0,3	$7,86 \times 10^6$	$-5,92 \times 10^3$	0,999934
Bpe	0,0005 – 0,3	$1,52 \times 10^7$	$-7,69 \times 10^3$	0,999679
IcP	0,005 – 0,3	$2,73 \times 10^6$	$-4,69 \times 10^3$	0,999838

Figura 8. Curva de regresión del Benzo[a]pireno



III.3.3.2. Precisión

Según la IUPAC la precisión se define como “el grado de concordancia entre los resultados de ensayos independientes obtenidos en condiciones bien definidas” (Thompson et al., 2002). Al evaluar la precisión de un método analítico hay que saber distinguir entre: *a) la repetibilidad* que es la precisión evaluada bajo condiciones de mínima variación de los factores de influencia (mismo laboratorio, mismo analista, mismos reactivos, mismos equipos, intervalos de tiempo cortos); *b) la reproducibilidad*, que es la precisión evaluada bajo condiciones adversas, es decir, de máxima variación de los factores de influencia antes mencionados; y *c) la precisión intermedia* que es la precisión estimada cuando se obtienen los resultados de mediciones realizadas en mismo laboratorio, pero variando algún factor de influencia: diferentes días, diferente analista, diferentes equipos (ICH, 2005).

Debido a la imposibilidad de realizar los ensayos en condiciones de máxima variabilidad de los factores de influencia, ya que en la región no se cuenta con laboratorios con la infraestructura requerida para la ejecución del método analítico desarrollado, la precisión de dicho método fue evaluada en términos *precisión intermedia*. Se estudió la fluctuación de la señal analítica correspondiente a una serie de disoluciones a diferentes niveles de concentración dentro del rango lineal. Para ello, se analizaron estándares de cada HAP preparados por triplicado a diferentes concentraciones dentro de los intervalos de concentración descritos en la sección **III.2.2.4**. Los ensayos de precisión se llevaron a cabo durante 5 días (entre-días). Una vez obtenidos los resultados se calculó la desviación estándar relativa (%) (RSD, de sus siglas en inglés, *relative standard deviation*) para cada nivel (Tabla 7).

Como puede observarse en la Tabla 7 las RSD% a diferentes niveles de concentración para los HAPs estudiados se ubicaron por debajo del 13%, y las medias aritméticas de las RSD% fueron inferiores a 6% en todos los casos. Estos resultados

demuestran una precisión satisfactoria del método cromatográfico para la determinación de HAPs.

Tabla 7. Porcentaje de la desviación estándar relativa (RSD%) para cada HAP

HAP	Concentraciones (µg/mL)												RSD* (%)
	0,0001	0,0003	0,0005	0,0007	0,001	0,005	0,007	0,01	0,03	0,05	0,1	0,3	
BaA		3,60	3,06	4,73	4,52	6,24	4,58	0,26	1,00	0,73	1,19	0,30	2,99
Chry					12,05	6,87	7,33	0,34	1,46	0,87	1,85	0,82	4,39
BbF		4,78	2,31	1,35	4,33	8,75	9,72	1,77	0,89	0,95	1,28	0,77	3,61
BkF		1,70	3,01	3,70	5,15	7,44	8,30	0,35	0,81	0,63	1,34	0,54	3,24
BaP	8,4	6,70	1,74	0,28	2,54	6,23	8,68	3,54	0,96	2,41	3,59	1,00	4,10
DaA				5,72	7,62	6,09	7,58	2,69	1,17	1,53	0,82	0,83	4,15
Bpe			3,40	4,39	9,13	5,71	9,72	4,79	4,91	3,68	3,96	1,57	5,52
IcP						8,49	6,55	1,88	1,00	1,43	1,24	1,38	3,14

*Media aritmética de las RSD% a todos los niveles ensayados para cada HAP

Nótese que los valores de las RSD% para cada HAP decrecen y se estabilizan para altas concentraciones, este fenómeno se denomina *heterocedastidad* y se observa con frecuencia cuando los intervalos de concentración son amplios (Thompson et al., 2002). Por este motivo se decidió trabajar en tres órdenes diferentes de concentración en el caso de los HAPs con amplios rangos lineales, aumentando el número de niveles ensayados (más de siete).

III.3.3.3. Límites de detección y límites de cuantificación

El límite de detección (LOD) es la cantidad mínima de analito en la muestra de prueba que puede ser detectada más no cuantificada de manera confiable, es decir,

que puede distinguirse fiablemente de la señal que proporciona una muestra blanco (Thompson et al., 2002; ICH, 2005).

El límite de cuantificación (LOQ) de un método es la mínima cantidad de analito que puede ser cuantificada en forma confiable (con precisión y exactitud adecuadas) (Thompson et al., 2002; ICH, 2005).

Para evaluar los LODs y LOQs de cada HAP se utilizaron los datos obtenidos de la curva de calibración de cada compuesto, según lo establecido por la ICH (2005) para el cálculo de estos parámetros basándose en la desviación estándar de la respuesta y la pendiente de la curva de calibración.

Los LODs y LOQs obtenidos en este estudio para cada uno de los compuestos de interés se presentan en la Tabla 8.

Tabla 8. Límites de detección (LOD) y cuantificación (LOQ) de los HAPs estudiados

HAPs	YERBA MATE (µg/kg)		INFUSIONES (ng/L)	
	LOD	LOQ	LOD	LOQ
BaA	0,18	0,60	3,61	12,05
Chry	0,31	0,87	18,18	60,60
BbF	0,12	0,41	2,46	8,20
BkF	0,20	0,67	4,02	13,41
BaP	0,06	0,20	1,21	4,02
DaA	0,98	3,28	19,68	65,62
Bpe	0,25	0,85	5,07	16,90
IcP	1,25	4,17	25,05	83,50

Como puede observarse en la Tabla 8 el valor de LOQ obtenido para el BaP en el análisis de las infusiones (4,02 ng/mL) se encuentra por debajo del valor máximo permitido para este compuesto en agua potable por la Comunidad Europea (10 ng/mL), la regulación más exigente en este ámbito (EU, 1998). El valor de LOQ para el

BaP en el análisis de yerba mate (0,06 µg/kg) no superó el valor mínimo de los límites máximos establecidos para este compuesto en ciertos alimentos por la Comunidad Europea (1,0 µg/kg para alimentos formulados para lactantes y niños) (EC, 2011).

Los LODs y LOQs para BaA, Chry, BbF y BaP se adecuaron a los requerimientos establecidos en el Reglamento N° 836/2011 de la Comunidad Europea (CE, 2011), donde se fijan los criterios de funcionamiento con los que deben cumplir los métodos para el análisis de HAPs, en las matrices alimentarias estipuladas en el Reglamento N° 835/2011 de la misma organización. Los valores de LOD y LOQ para BaA, Chry, BbF y BaP requeridos por el reglamento anteriormente citado son 0,3 µg/kg y 0,9 µg/kg, respectivamente. Asimismo, el método de análisis desarrollado para la identificación y cuantificación de HAPs en infusiones, presentó LODs para el BaP, BbF, BkF, BPe e IcP que se ajustaron a lo requerido por la Comunidad Europea en la Directiva 98/83/EC (EU, 1998), donde se establecen los parámetros analíticos para los métodos de análisis en agua potable.

III.3.3.4. Exactitud

La exactitud del método analítico desarrollado se evaluó a través de ensayos de recuperación. Para ello, se calculó el porcentaje de recuperación (R%) obtenido de muestras de yerba mate elaborada “libre de HAPs” (obtenidas según lo descrito en la sección III.2.1.2) en las que se ha adicionado una cantidad conocida de los 8 HAPs estudiados (muestras fortificadas). De igual manera, se trabajó con infusiones preparadas con la yerba mate “libre de HAPs”.

Las muestras de yerba mate elaborada (n=3) e infusiones (n=3) libres de HAPs fueron enriquecidas con los 8 compuestos de interés a tres niveles de concentraciones diferentes, según lo descrito en la sección III.2.3. En la Tabla 9 se presentan los R% y sus desviaciones estándares relativas (RSD, %) obtenidos tras el análisis de las muestras de yerba mate elaborada e infusiones fortificadas.

Tabla 9. Porcentajes de recuperación (R%) y desviaciones estándares relativas (R%) de los HAPs estudiados

HAPs	Porcentajes de recuperación (R%)											
	YERBA MATE						INFUSIONES					
	0,50 ug/kg		1,0 ug/kg		15,0 ug/kg		40 ng/L		100 ng/L		1.000 ng/L	
	R%	RSD%	R%	RSD%	R%	RSD%	R%	RSD%	R%	RSD%	R%	RSD%
BaA	117,82	2,48	108,10	2,52	98,41	3,46	91,03	2,48	111,85	0,36	96,68	2,39
Chry	105,92	3,85	111,20	4,44	98,28	3,95	94,91	3,85	96,77	0,07	95,80	4,90
BbF	107,89	4,11	114,26	4,20	92,09	1,89	107,23	1,70	114,30	0,32	93,79	1,04
BkF	117,09	1,13	102,28	5,14	93,23	3,06	100,75	1,13	97,21	0,39	94,93	9,67
BaP	110,02	0,59	111,26	1,93	97,94	1,12	102,73	0,59	103,38	0,19	93,69	1,48
DaA	97,39	0,20	74,78	3,60	74,52	3,07	95,35	0,20	82,24	0,52	95,36	0,91
Bpe	93,80	4,11	97,24	3,69	78,93	3,88	104,63	4,11	117,72	1,13	80,21	1,96
IcP	ND	-	72,16	5,79	77,78	3,87	105,72	2,48	82,06	2,11	88,06	3,09

Los porcentajes de recuperación medios obtenidos oscilaron entre 72 % y 117% para las muestras de yerba mate y entre 80% y 117% para las muestras de infusiones, cumpliendo, en ambos casos, con los criterios de funcionamiento aplicables a los métodos de análisis para los HAPs establecidos en el Reglamento N° 836/2011 de la Comunidad Europea (50-120%) (CE, 2011).

III.4. Conclusiones

Se desarrolló un método analítico (SPE-HPLC-FLD) para la extracción, purificación y análisis cromatográfico simultáneo de 8 hidrocarburos aromáticos policíclicos (benzo[a]antraceno, criseno, benzo[b]fluoranteno, benzo[k]fluoranteno, benzo[a]pireno, dibenzo[a,h]antraceno, benzo[g,h,i]perileno e Indeno [1,2,3-c,d]pireno) en muestras de yerba mate y muestras de infusiones preparadas con yerba mate. Los 8 compuestos a determinar a través el método desarrollado son considerados los mejores indicadores de ocurrencia y toxicidad de hidrocarburos aromáticos policíclicos en alimentos, según la Agencia de Seguridad Alimentaria de la Comunidad Europea.

La linealidad del método fue comprobada dentro de amplios intervalos de concentración con coeficientes de determinación de las curvas de regresión superiores a 0,999. Las desviaciones estándares relativas determinadas en los ensayos de precisión intermedia no superaron el 6% para ninguno de los compuestos estudiados. Los límites de detección y cuantificación para las muestras de yerba mate oscilaron entre 0,06 y 1,25 $\mu\text{g}/\text{kg}$ y 0,20 y 4,17 $\mu\text{g}/\text{kg}$, respectivamente. En el caso de las infusiones, los límites de detección y cuantificación oscilaron entre 1,21 ng/mL y 25,05 ng/mL y 4,02 ng/mL y 83,50 ng/mL , respectivamente. Asimismo, en las pruebas de exactitud, se obtuvieron altos porcentajes de recuperación ($> 70\%$) con coeficientes de variación asociados aceptables ($< 10\%$).

El método analítico desarrollado cumple con los criterios mínimos de rendimiento establecidos en el Reglamento N° 836/2011 y la Directiva 98/83/EC de la Comunidad Europea para los métodos de determinación del contenido de hidrocarburos aromáticos policíclicos en ciertas matrices alimentarias y agua potable, respectivamente.

Capítulo IV

HIDROCARBUROS AROMÁTICOS POLICÍCLOS (HAPs) DURANTE LAS DIFERENTES ETAPAS DE PROCESAMIENTO DE LA YERBA MATE (*I. paraguariensis* St. Hil.)

IV.1. Introducción

El procesamiento primario de la yerba mate (*I. paraguariensis* St. Hil.) incluye tres etapas: el zapecado, el secado y la molienda gruesa o *canchado*, y se lleva a cabo en establecimientos industriales comúnmente denominados *secaderos*. En la sección II.2.2 del presente trabajo se realizó una descripción detallada del proceso de manufactura de la yerba mate. Brevemente, en la etapa de zapecado, las ramas de *I. paraguariensis* son expuestas a la acción directa de la llama y gases de combustión provenientes del quemado de leña, chips, virutas y/o aserrín de madera, a altas temperaturas (500 °C) durante unos pocos minutos (2-4 min). Luego del zapecado, el material es secado entrando en contacto con una mezcla de aire y gases de combustión producto del quemado de diversos tipos de biomasa forestal. Las condiciones de secado, principalmente la temperatura de entrada de los gases de combustión y el tiempo de contacto entre éstos y las ramas de yerba mate varían de acuerdo al tipo de secadero; *a)* en los secaderos rotatorios, la temperatura de entrada de los gases supera los 200 °C y el tiempo de residencia del material es menor a 1 h; *b)* en los secaderos de cinta, la temperatura de entrada de los gases varía entre 80 °C y 120 °C y los tiempos de residencia del material entre 3 h y 6 h; y *c)* en los secaderos de tipo barbacoá (de lecho fijo), las ramas se secan a temperaturas cercanas a los 80 °C, durante un período de tiempo que varía entre 6 y 24 h (Prat Kricun, 1994; Núñez y Känzig, 1995; Schmalko, 2005).

Durante las etapas de zapecado y secado, la exposición de las ramas de yerba mate al contacto directo con los gases de combustión provenientes de la quema de biomasa lignocelulósica, contribuye significativamente a la contaminación del material con hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs), compuestos potencialmente carcinogénicos para los humanos. La presencia de HAPs en yerba mate ha sido reportada en diversos estudios (Camargo y Toledo, 2002; Zuin et al., 2005; Kamangar

et al., 2008; Ziegenhals et al., 2008; Vieira et al., 2010; Golozar et al., 2012; García Londoño et al., 2014; Schulz et al., 2015).

Por lo anteriormente expuesto, durante los últimos años, se ha trabajado en el desarrollo de modificaciones en el proceso de manufactura tradicional de la yerba mate. Las alternativas ensayadas incluyen el zapecado por inmersión en agua caliente (Xander et al., 2000; Galeano et al., 2006; Galeano, 2010), zapecado por aplicación de vapor de agua (Galeano et al., 2006; Barrionuevo, 2007; Galeano et al., 2010), zapecado utilizando ondas de alta frecuencia (Pasardi et al., 2006; Laube, 2008), zapecado en un horno eléctrico de cinta transportadora (Nabechima et al., 2014) y la utilización de aire caliente con calentamiento indirecto en la etapa de secado.

Para evitar la contaminación de las ramas de *I. paraguariensis* con HAPs durante el proceso de elaboración de la yerba mate, las condiciones de procesamiento deben ser estrictamente controladas. Es por esto que, el estudio de cada uno de los procesos involucrados durante la manufactura, desde el cultivo hasta la obtención del producto final, es de suma importancia para identificar los sitios probables de contaminación, con el fin de recomendar prácticas que reduzcan la concentración de HAPs en la yerba mate elaborada.

IV.2. Materiales y Métodos

IV.2.1. Materiales

IV.2.1.1. Patrones, disolventes y reactivos

Los patrones y disolventes utilizados son los descriptos en la sección **III.2.1.1.**

IV.2.1.2. Muestreo y preparación de las muestras de yerba mate

(a) Selección de establecimientos industriales para la toma de muestra de yerba mate en las diferentes etapas de elaboración

Se realizó un relevamiento de los establecimientos yerbateros que cuentan con diferentes sistemas de procesamiento de la yerba mate ubicados en las provincias de Misiones y Corrientes (Argentina). De los 239 secaderos existentes, se seleccionaron 13 establecimientos modelo para ser estudiados de los cuales se obtuvieron las muestras de yerba mate a lo largo de las diferentes etapas de manufactura. Los mismos fueron clasificados acorde a ciertas variables de estudio (tipo de combustible, temperatura y tiempo de secado y tipo de equipamiento). Las características de los establecimientos industriales estudiados se resumen en la Tabla 10.

(b) Muestras de yerba mate en las diferentes etapas de elaboración

Las muestras de yerba mate durante las etapas de elaboración del producto fueron obtenidas de los diferentes establecimientos industriales descriptos en la sección precedente. Se tomaron muestras de hojas y tallos de *I. paraguariensis* a lo largo de las etapas de manufactura de la yerba mate, a saber: 1) yerba mate sin procesar, 2) yerba mate zapecada y 3) yerba mate canchada.

Tabla 10. Características de los establecimientos yerbateros estudiados

ESTABLECIMIENTO	ZAPECADO		SECADO					
	Combustible	Secadero	N° cintas	Disposición	Tiempo	Temperatura	Combustible	Presecado
A	Leña	De cinta	4	2 consecutivos de 2 niveles cada uno	4,5 horas	100-120 °C	Leña	Sí
B	Leña	De cinta	2	2 niveles	3 horas	80-100 °C	Leña	Sí
C	Leña	De cinta	2	2 niveles	4 horas	100-125 °C	Leña	Sí
D	Leña	De cinta	2	2 niveles	3 horas	80-100 °C	Leña	Sí
E	Chips	De cinta	4	2 consecutivos de 2 niveles cada uno	5,5 horas	90-120 °C	Chips	Sí
F	Chips	De cinta	4	2 consecutivos de 2 niveles cada uno	5 horas	100-140 °C	Chips	No
G	Chips	De cinta	2	2 niveles	3,25 horas	110-120 °C	Chips	Sí
H	Chips	De cinta	2	2 niveles	3,5 horas	110 °C	Chips	No
I	Viruta y aserrín	De cinta	4	2 consecutivos de 2 niveles cada uno	4,5 horas	110-115 °C	Aire caliente	Sí
J	Chips	De cinta	2	2 niveles	5 horas	90-100 °C	Aire caliente	No
K	Leña	De catre	-	1 catre (lecho fijo)	18 horas	90-100 °C	Leña	No
L	Chips	De catre	-	2 catres (2 niveles)	18 horas	85-100 °C	Chips	No
M	Viruta y aserrín	Rotatorio	-	3 Tamboras	<u>Tambora 1:</u> 15 min <u>Tambora 2:</u> 15 min <u>Tambora 3:</u> 20 min	<u>Tambora 1:</u> 90 °C <u>Tambora 2:</u> 90 °C <u>Tambora 3:</u> 120 °C	<u>Tambora 1:</u> Chips <u>Tambora 2:</u> Leña <u>Tambora 3:</u> Chips	No

Las muestras de yerba mate sin procesar, consistieron en dos submuestras conteniendo de 5 a 10 ramas cada una de *I. paraguariensis* fresca, provenientes de diferentes ubicaciones de la playa de recepción de la materia prima.

Las muestras de yerba mate zapecada consistieron en dos submuestras (5 a 10 ramas de yerba mate cada una), ambas obtenidas a la salida de cada una de las etapas de manufactura y espaciadas una de otra por 5 minutos.

En el caso de la yerba mate secada se obtuvo una muestra de entre 1-3 kg de yerba mate canchada a la salida del secadero. La muestra de yerba mate canchada fue tomada luego de transcurrido el tiempo de residencia del producto en cada secadero, a partir de la entrada al proceso de manufactura de la materia prima sin procesar muestreada en la playa de recepción.

Ya en el laboratorio, se determinó el contenido de humedad por separado de las hojas y los palos de las ramas de yerba mate sin procesar, las ramas yerba mate zapecada y yerba mate canchada (secada) para luego obtener una mezcla con una relación hojas/palos de 80/20 de la materia seca de cada una de las muestras.

Una vez obtenido el contenido de humedad en base húmeda de las hojas y los palos de cada una de las muestras, fue calculada la cantidad (en porcentaje) de palos y hojas húmedos que debían mezclarse para conformar una mezcla compuesta por un 80% de hojas y un 20% de palos en base seca siguiendo los siguientes pasos:

1. Cálculo del peso (en g) de palos y hojas húmedos para 100 g de una mezcla 80/20 (hojas/palos) en base seca:

$$\begin{array}{c} \text{PALOS} \\ P_{ph} = \frac{20}{\left(1 - \frac{X_{ph}}{100}\right)} \end{array}$$

$$\begin{array}{c} \text{HOJAS} \\ P_{hh} = \frac{80}{\left(1 - \frac{X_{hh}}{100}\right)} \end{array}$$

Donde P_{ph} y P_{hh} son el peso (en g) de palos y hojas húmedos, respectivamente, y X_{ph} y X_{hh} representan al contenido de humedad en base húmeda de los palos y las hojas húmedas respectivamente.

2. Cálculo del porcentaje de palos y hojas húmedos requeridos para obtener una mezcla 80/20 (hojas/palos) en base seca:

PALOS	HOJAS
$\%_{ph} = \frac{P_{ph} \cdot 100}{(P_{ph} - P_{hh})}$	$\%_{hh} = \frac{P_{hh} \cdot 100}{(P_{ph} - P_{hh})}$

Donde $\%_{ph}$ y $\%_{hh}$ representan al porcentaje de palos y de hojas con los que debo preparar una mezcla 80/20 (hojas/palos) en base seca.

Con los datos de los porcentajes de palos y hojas húmedos ($\%_{ph}$ y $\%_{hh}$) se calculó la cantidad (en g) de cada uno que debo mezclar para obtener 15 g de una muestra 80/20 (hojas/palos) en base seca. Los 15 g de muestra obtenidos fueron acondicionados en bolsas con cierre hermético, refrigerados y mantenidos al abrigo de la luz, hasta iniciar los procedimientos analíticos.

IV.2.1.3. Muestras de yerba mate elaboradas utilizando métodos alternativos de manufactura

Se obtuvieron muestras de yerba mate procesadas utilizando métodos alternativos de manufactura a partir de ramas de *I. paraguariensis* cosechadas para tal fin.

La yerba mate zapecada por aplicación de vapor de agua se obtuvo utilizando un equipo a escala piloto construido a partir del desarrollo de un proyecto financiado por el Instituto Nacional de la Yerba Mate (INYM) y dirigido por el Ing. Martín

Barionuevo (2007). Durante el proceso, las ramas de yerba mate fueron expuestas a la acción del vapor de agua a 105°C durante 10 min.

La yerba mate zapecada por inmersión en agua caliente se obtuvo utilizando un equipo industrial desarrollado por el Ing. Juan Carlos Lorenzo (equipo patentado). El equipo operó con agua a 95 °C y el tiempo de residencia de las ramas de *I. paraguariensis* fue de 4 min.

La yerba mate zapecada mediante ondas de alta frecuencia se obtuvo utilizando un equipo a escala piloto construido durante la ejecución de un proyecto financiado por el INYM y dirigido por el Sr. Norberto H. Laube (2008). Para obtener la yerba mate zapecada utilizando este método, se trabajó con una potencia de irradiación de 1 ghz durante 10 min. El contenido de humedad de la yerba mate tras el tratamiento, fue lo suficientemente bajo (< 5% de la materia seca), por lo que no fue necesario someter al producto a una etapa de secado posterior.

Tras el zapecado utilizando agua caliente y vapor de agua, la yerba mate fue secada en un secadero de planta piloto con aire caliente a 90 °C, utilizando flujo cruzado hasta alcanzar un contenido de humedad de 5 % de la materia seca.

Finalmente, la yerba mate fue molida y estacionada por 3 meses a 60 °C y 60 % de humedad relativa, en una cámara de estacionamiento acelerado de aproximadamente 5 kg de capacidad construida para este fin. Tras el estacionamiento, las muestras de yerba mate elaborada fueron dispuestas en bolsas con cierre hermético, y mantenidas a -20 °C y protegida de la luz hasta comenzar con los procedimientos analíticos.

IV.2.2. Métodos

IV.2.2.1. Determinación de la humedad

El contenido de humedad de las muestras de yerba mate fue determinado en una estufa a $103\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ procediendo según la norma IRAM 20503 (1995) (véase la sección **III.2.2.1**).

IV.2.2.2. Determinación del contenido de HAPs durante las diferentes etapas de elaboración de la yerba mate

La determinación de los HAPs fue realizada mediante cromatografía líquida de alta resolución con detección de fluorescencia (HPLC-FLD). Los procedimientos de extracción de los HAPs, purificación de las muestras por SPE y análisis cromatográfico de las mismas se realizaron acorde a lo descrito en la sección **III.2.2.3** del presente trabajo de Tesis. La identificación y cuantificación de los HAPs se realizó según lo detallado en la sección **III.2.2.4**.

IV.2.2.3. Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó utilizando el software Statgraphics Centurion XV (2009). Previo a la comparación estadística de los datos, se realizó la prueba de contraste de normalidad de Shapiro y Wilks para comprobar la normalidad de los mismos. Los niveles de HAPs en las diferentes etapas del procesamiento primario de la yerba mate fueron comparados utilizando el test no paramétrico de Wilcoxon para muestras relacionadas. La contribución de cada etapa a la contaminación total con HAPs se evaluó utilizando la Prueba de Kruskal-Wallis. Para evaluar la influencia de las condiciones de operación de cada etapa en la contaminación de la yerba mate con HAPs, se utilizó el test no paramétrico de Kruskal-Wallis. Todas las pruebas estadísticas se realizaron con un nivel de confianza del 95%.

IV.3. Resultados y Discusión

IV.3.3. Contenido de HAPs en la yerba mate a lo largo de las diferentes etapas del procesamiento primario

La presencia de 8 HAPs (BaA, Chry, BbF, BkF, BaP, DaA, BPe e IcP), en cada una de las etapas del procesamiento primario de la yerba mate, fue estudiada en muestras provenientes de 13 establecimientos industriales ubicados en las provincias de Corrientes y Misiones.

Los niveles de cada uno de los HAPs estudiados en la yerba mate sin procesar, yerba mate zapecada y yerba mate canchada se presentan en las Tablas 11, 12 y 13, respectivamente. Nótese que algunos de los HAPs estudiados fueron identificados en las muestras aunque a niveles inferiores a los límites de cuantificación del método analítico, por lo que su concentración no pudo ser determinada.

En la Figura 9 se presenta la variación en el contenido total de los 8 HAPs estudiados (PAH8) a lo largo de las etapas de procesamiento. Si bien la presencia de HAPs fue demostrada en las ramas de yerba mate sin procesar, la yerba mate fue incrementando el contenido de HAPs con el avance a través del proceso, excepto en los establecimientos I y J en los que se observó una reducción del contenido total de HAPs luego de la etapa de secado. Cabe destacar que en estos establecimientos la yerba mate fue secada utilizando aire caliente (método indirecto), sin entrar en contacto con gases de combustión.

Tabla 11. Contenido de HAPs($\mu\text{g}/\text{kg}$ de la materia seca) (media \pm desvío estándar, n = 2) en la yerba mate sin procesar en los diferentes establecimientos industriales estudiados

Establecimientos	HIDROCARBUROS AROMÁTICOS POLICÍCLICOS								
	BaA	Chry	BbF	BkF	BaP	DaA	Bpe	IcP	Σ HAPs
A	<LOQ \pm -	ND \pm -	<LOQ \pm -	<LOQ \pm -	<LOQ \pm -	ND \pm -	ND \pm -	ND \pm -	NC
B	ND \pm -	ND \pm -	ND \pm -	<LOQ \pm -	<LOQ \pm -	ND \pm -	ND \pm -	ND \pm -	NC
C	ND \pm -	ND \pm -	0,7 \pm 0,04	<LOQ \pm -	<LOQ \pm -	ND \pm -	ND \pm -	ND \pm -	0,7
D	ND \pm -	ND \pm -	ND \pm -	ND \pm -	ND \pm -	ND \pm -	ND \pm -	ND \pm -	ND
E	<LOQ \pm -	<LOQ \pm -	<LOQ \pm -	<LOQ \pm -	0,4 \pm 0,05	ND \pm -	ND \pm -	ND \pm -	0,4
F	ND \pm -	ND \pm -	ND \pm -	ND \pm -	ND \pm -	ND \pm -	ND \pm -	ND \pm -	ND
G	ND \pm -	ND \pm -	<LOQ \pm -	ND \pm -	<LOQ \pm -	ND \pm -	ND \pm -	ND \pm -	NC
H	ND \pm -	ND \pm -	<LOQ \pm -	<LOQ \pm -	ND \pm -	ND \pm -	ND \pm -	ND \pm -	NC
I	0,6 \pm -	<LOQ \pm -	1,3 \pm -	1,7 \pm 0,21	0,4 \pm 0,04	3,7 \pm 0,32	<LOQ \pm -	ND \pm -	7,7
J	ND \pm -	ND \pm -	ND \pm -	<LOQ \pm -	0,3 \pm 0,07	ND \pm -	<LOQ \pm -	ND \pm -	0,3
K	0,9 \pm 0,04	1,0 \pm 0,02	0,6 \pm 0,02	<LOQ \pm -	0,3 \pm 0,05	4,3 \pm 0,08	<LOQ \pm -	ND \pm -	7,1
L	<LOQ \pm -	<LOQ \pm -	1,4 \pm 0,06	0,9 \pm 0,02	ND \pm -	ND \pm -	ND \pm -	ND \pm -	2,3
M	<LOQ \pm -	ND \pm -	<LOQ \pm -	<LOQ \pm -	<LOQ \pm -	ND \pm -	ND \pm -	ND \pm -	NC

<LOQ: Menor al límite de cuantificación

ND: no detectado

NC: no cuantificable

Tabla 12. Contenido de HAPs($\mu\text{g}/\text{kg}$ de la materia seca) (media \pm desvío estándar, n = 2) en la yerba mate zapecada en los diferentes establecimientos industriales estudiados

Establecimientos		HIDROCARBUROS AROMÁTICOS POLICÍCLICOS								
Combustible		BaA	Chry	BbF	BkF	BaP	DaA	Bpe	IcP	Σ HAPs
A	Leña	<LOQ \pm -	<LOQ \pm -	<LOQ \pm -	<LOQ \pm -	<LOQ \pm -	ND \pm -	ND \pm -	ND \pm -	NC
B	Leña	16,9 \pm 2,88	32,5 \pm 4,77	21,6 \pm 3,52	7,9 \pm 1,51	23,3 \pm 3,83	17,5 \pm 3,26	23,8 \pm 3,47	13,4 \pm 0,10	156,9
C	Leña	1,0 \pm 0,08	10,3 \pm 0,13	4,0 \pm 0,07	1,6 \pm 0,01	2,7 \pm 0,25	<LOQ \pm -	5,2 \pm 0,21	ND \pm -	24,7
D	Leña	1,2 \pm 0,10	24,9 \pm 0,62	5,2 \pm 0,51	2,3 \pm 0,08	1,2 \pm 0,02	7,4 \pm 0,21	3,7 \pm 0,22	ND \pm -	46,0
E	Chips	0,7 \pm 0,00	<LOQ \pm -	0,8 \pm 0,04	<LOQ \pm -	0,9 \pm 0,12	<LOQ \pm -	ND \pm -	ND \pm -	2,4
F	Chips	2,4 \pm 0,43	2,0 \pm 0,08	2,5 \pm 0,47	2,0 \pm 0,08	2,8 \pm 0,20	<LOQ \pm -	2,2 \pm 0,25	<LOQ \pm -	14,0
G	Chips	4,9 \pm 0,07	9,2 \pm 0,22	8,5 \pm 0,21	3,9 \pm 0,04	13,8 \pm 0,24	14,3 \pm 0,19	17,8 \pm 0,78	6,5 \pm 0,36	78,9
H	Chips	<LOQ \pm -	<LOQ \pm -	<LOQ \pm -	<LOQ \pm -	<LOQ \pm -	<LOQ \pm -	ND \pm -	ND \pm -	NC
I	Viruta-Aserrín	2,3 \pm 0,31	4,0 \pm 0,21	2,0 \pm 0,24	2,4 \pm 0,35	1,5 \pm 0,11	4,5 \pm 0,65	1,1 \pm 0,07	<LOQ \pm -	17,9
J	Chips	40,1 \pm 4,73	50,6 \pm 4,09	53,7 \pm 6,61	26,4 \pm 3,30	77,6 \pm 9,92	66,5 \pm 8,68	58,9 \pm 3,87	35,0 \pm 3,76	408,8
K	Leña	0,9 \pm 0,04	1,0 \pm 0,02	0,6 \pm 0,02	<LOQ \pm -	0,3 \pm 0,05	4,3 \pm 0,08	<LOQ \pm -	ND \pm -	7,1
L	Chips	ND \pm -	1,4 \pm 0,03	0,9 \pm 0,07	<LOQ \pm -	ND \pm -	ND \pm -	ND \pm -	ND \pm -	2,3
M	Viruta-Aserrín	0,9 \pm 0,06	4,5 \pm 0,33	3,6 \pm 0,25	1,5 \pm 0,10	6,6 \pm 0,51	13,0 \pm 0,83	20,2 \pm 1,66	7,8 \pm 0,57	58,1

<LOQ: Menor al límite de cuantificación

ND: no detectado

NC: no cuantificable

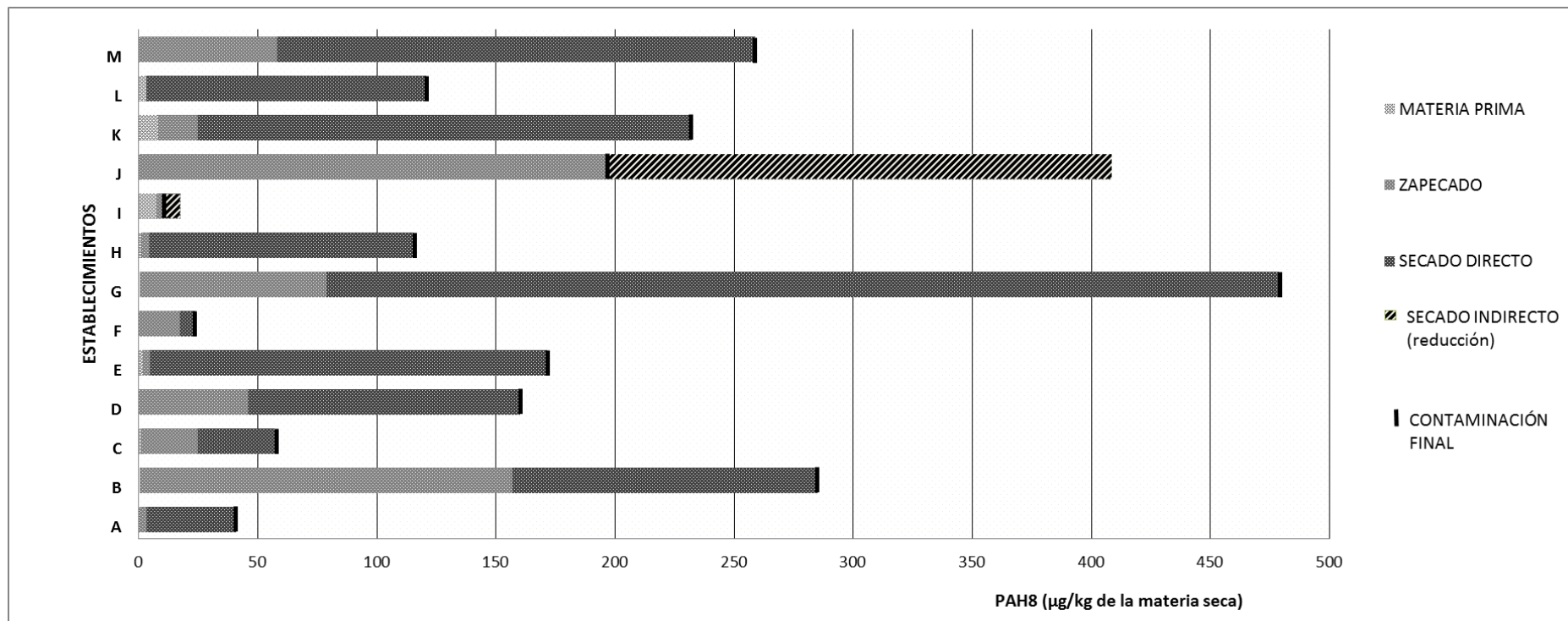
Tabla 13. Contenido de HAPs($\mu\text{g}/\text{kg}$ de la materia seca) (media \pm desvío estándar, n = 2) en la yerba mate canchada en los diferentes establecimientos industriales estudiados

Establecimientos					HIDROCARBUROS AROMÁTICOS POLICÍCLICOS								
Tipo	Combustible	Tiempo	Presecado	BaA	Chry	BbF	BkF	BaP	DaA	Bpe	IcP	Σ HAPs	
A	Cinta	Leña	4,5 h	Sí	12,3 \pm 1,70	6,5 \pm 0,43	9,1 \pm 1,40	2,3 \pm 0,27	3,8 \pm 0,58	4,0 \pm 0,13	2,1 \pm 0,38	<LOQ \pm -	40,0
B	Cinta	Leña	3 h	Sí	31,8 \pm 1,94	60,7 \pm 4,37	41,9 \pm 2,01	15,7 \pm 0,54	40,1 \pm 1,98	31,7 \pm 2,51	40,7 \pm 2,64	22,3 \pm 1,37	285,0
C	Cinta	Leña	4 h	Sí	7,3 \pm 0,06	16,9 \pm 0,28	8,0 \pm 0,02	2,4 \pm 0,07	6,7 \pm 0,02	6,3 \pm 0,17	6,6 \pm 0,01	<LOQ \pm -	54,3
D	Cinta	Leña	3 h	Sí	12,3 \pm 0,74	42,7 \pm 4,67	13,3 \pm 1,41	4,7 \pm 0,62	14,7 \pm 1,82	13,3 \pm 1,60	49,3 \pm 6,90	9,7 \pm 1,09	160,0
E	Cinta	Chips	5,5 h	Sí	20,0 \pm 1,67	14,4 \pm 2,98	15,3 \pm 0,62	10,0 \pm 0,38	23,6 \pm 1,10	23,3 \pm 1,91	23,4 \pm 0,36	41,6 \pm 0,33	171,7
F	Cinta	Chips	5 h	No	3,7 \pm 0,31	2,0 \pm 0,10	3,2 \pm 0,42	1,8 \pm 0,00	4,2 \pm 0,09	3,3 \pm 0,46	3,2 \pm 0,23	<LOQ \pm -	21,3
G	Cinta	Chips	3,25 h	Sí	44,4 \pm 2,96	47,5 \pm 2,06	58,3 \pm 2,14	31,8 \pm 1,74	77,3 \pm 1,53	103,3 \pm 3,88	65,8 \pm 1,86	50,2 \pm 2,41	478,6
H	Cinta	Chips	3,5 h	No	9,9 \pm 0,66	13,3 \pm 0,40	14,7 \pm 1,31	8,0 \pm 0,69	16,5 \pm 1,58	21,4 \pm 1,71	15,5 \pm 1,56	16,2 \pm 1,39	115,4
I	Cinta	Aire caliente	4,5 h	Sí	2,9 \pm 0,07	3,1 \pm 0,09	2,0 \pm 0,04	1,0 \pm 0,03	1,5 \pm 0,16	<LOQ \pm -	<LOQ \pm -	ND \pm -	10,6
J	Cinta	Aire caliente	5 h	No	21,8 \pm 0,60	30,0 \pm 0,30	31,5 \pm 0,05	11,7 \pm 0,36	33,1 \pm 0,42	25,1 \pm 0,01	28,8 \pm 0,29	15,0 \pm 1,66	197,0
K	Barbacuá	Leña	18 h	No	68,6 \pm 0,63	82,6 \pm 0,10	24,8 \pm 0,85	13,4 \pm 0,41	17,5 \pm 0,61	10,1 \pm 0,50	8,2 \pm 0,34	7,0 \pm 0,23	232,2
L	Barbacuá	Chips	18 h	No	8,4 \pm 0,41	44,1 \pm 3,04	16,9 \pm 0,27	6,7 \pm 0,01	11,3 \pm 0,11	20,4 \pm 0,53	6,0 \pm 0,64	6,6 \pm 1,12	120,3
M	Rotatorio	Chips	1 h	No	37,4 \pm 0,42	41,8 \pm 0,28	35,9 \pm 0,91	16,3 \pm 0,75	32,0 \pm 1,63	42,6 \pm 2,67	33,9 \pm 0,78	19,0 \pm 0,76	259,1

<LOQ: Menor al límite de cuantificación

ND: no detectado

Figura 9. Contenido de PAH8 a lo largo de las etapas de manufactura de la yerba mate



Según numerosos autores, las posibles fuentes de contaminación de los alimentos de origen vegetal con HAPs, son los HAPs medioambientales o los HAPs formados durante la manipulación y/o procesado de los mismos (EC, 2002; Rey-Salgueiro et al., 2008; Purcaro et al., 2013).

La contaminación de plantas y hortalizas con HAPs ha sido reportada en numerosos estudios (Larsson, 1986; Simonich y Hites, 1995; Camargo y Toledo, 2003; Bishnoi et al., 2006). La deposición atmosférica es considerada la mayor fuente de contaminación de los organismos vegetales con HAPs, puesto que éstos ofrecen una gran superficie de contacto (Simonich y Hites, 1995). Este hecho explica la presencia de HAPs en las ramas de yerba mate sin procesar. La contaminación de plantas con HAPs presentes en la atmósfera es más significativa en zonas industriales y regiones cercanas a caminos de abundante tránsito vehicular. Asimismo, la emisión de HAPs a la atmósfera puede ser debida a incendios forestales espontáneos o intencionales (Rey-Salgueiro et al., 2008). Cabe destacar que, durante el transporte de la yerba mate desde la plantación a los establecimientos industriales, las emisiones de los vehículos circulantes puede ser una fuente relevante de contaminación de la materia prima. Sumado a lo anterior, al arribar al secadero, las ramas de yerba mate son dispuestas en la playa de recepción donde permanecen por tiempos variables hasta su ingreso al procesamiento primario. La playa de recepción de la materia prima se encuentra a escasos metros del zapeador y el secadero, por lo que las ramas de yerba mate pueden absorber los HAPs presentes en el medio ambiente generados en el propio establecimiento elaborador. Las muestras de yerba mate sin procesar analizadas en el presente estudio consistieron en ramas de *I. paraguariensis* recientemente cosechadas, obtenidas tras arribar al establecimiento industrial, es decir, justo antes de su ingreso al proceso de elaboración, por lo que la contaminación de las mismas puede deberse a cualquiera de los factores antes mencionados o a una combinación de ellos.

Los procesos industriales de los alimentos de origen vegetal que incluyen una etapa de secado, contribuyen a la contaminación del producto final con HAPs,

específicamente procesamientos en los que se aplica el secado directo, donde el material vegetal entra en contacto con gases de combustión. Existen numerosos trabajos científicos que demuestran la presencia de altos niveles de HAPs en té (Lin et al., 2005; Li et al., 2011; Dravoba et al., 2012; Duedahl-Olesen et al., 2015; García Londoño et al., 2015; Schulz et al., 2015). Lin y Zhu (2004) compararon el contenido de HAPs en muestras de té negro obtenidas en las diferentes etapas de manufactura del producto, hallando mayores concentraciones en las hojas de té que fueron expuestas a altas temperaturas y al contacto con el humo proveniente de la quema de madera, utilizada en la etapa de secado. Asimismo, la presencia de HAPs en café ha sido reportada en diversos trabajos (Camargo y Toledo, 2002; García- Falcón et al., 2005; Orechio et al., 2009; Tfouni et al., 2013; Duedahl-Olesen et al., 2015; Pissinatti et al., 2015; Sadowska Rosiek et al., 2015) en los que se sugiere que la presencia de HAPs en café puede ser atribuida fundamentalmente a los procesos de secado y tostado del producto. La contaminación con HAPs de aceites comestibles de oliva, maíz, girasol, soja y aceites comestibles de fuentes vegetales no convencionales como semillas de zapallo, sésamo, mostaza, lino, amaranto, entre otras, ha sido demostrada en numerosas investigaciones (Pupin y Toledo, 1996; Camargo y Toledo, 1998; Pandey et al., 2004; Texeira et al., 2007; Camargo et al., 2012; Ciecierska y Obiedzinski, 2013). Todos los autores coinciden en que, si bien, los HAPs presentes en el aceite, en general son removidos del producto durante el proceso de refinación, la presencia en altas concentraciones de estos compuestos en el aceite crudo se debe a la contaminación del material vegetal durante el proceso de secado, previo a la extracción, donde los HAPs formados por el quemado de combustibles orgánicos entran en contacto directo con los frutos, granos o semillas oleaginosos. Veiga et al. (2014) investigaron la presencia de HAPs en semillas de guaraná tostada con cáscara y sin cáscara. Adicionalmente, estudiaron la contaminación de la cáscara de las semillas de guaraná tostada por separado. Ellos hallaron los mayores niveles de contaminación por HAPs en las muestras de cáscara de guaraná tostada, lo que demuestra que la contaminación se produce por la acumulación de HAPs por exposición de las plantas a

ambientes contaminados, y/o al contacto directo de las semillas de guaraná con el humo generado por combustión incompleta de los diversos agentes térmicos utilizados durante las etapas de secado y tostado del producto.

A lo largo de las diferentes etapas de elaboración, las ramas de yerba mate son expuestas a la acción directa de la llama y gases de combustión provenientes del quemado de diferentes tipos de biomasa forestal. Así, los HAPs formados por combustión incompleta de la materia orgánica, se acumulan sobre las ramas de yerba mate que ofrecen una gran área superficial, contaminándolas (Ziegenhals et al., 2008; Vieira et al., 2010; Golozar et al., 2012; García Londoño et al., 2014).

IV.3.3.1. Contenido de HAPs durante el procesamiento primario de la yerba mate en establecimientos que utilizan métodos de secado directo

En la Tabla 14 se presentan el valor mínimo, el valor máximo, la media aritmética, la desviación estándar y el error estándar para el contenido total de los 8 HAPs estudiados (PAH8) en las muestras yerba mate sin procesar, yerba mate zapecada y yerba mate canchada provenientes de los los 11 establecimientos industriales que utilizan métodos de secado directo en la manufactura del producto. Asimismo, se exponen dichas medidas estadísticas para el contenido de BaP, único HAP considerado carcinogénico para el hombre, y para el parámetro PAH4 (suma de BaA, Chry, BbF y BaP), marcador de presencia y toxicidad de HAPs en alimentos, ambos contemplados en la legislación vigente sobre la materia.

Tabla 14. Contenido de PAH8 ($\mu\text{g}/\text{kg}$ de la materia seca) durante las diferentes etapas del procesamiento de la yerba mate en establecimientos que utilizan secado directo

	Mínimo	Máximo	Media	Desvío estándar	Error estándar
YERBA MATE SIN PROCESAR	ND	7,1	1,7	2,37	0,71
YERBA MATE ZAPECADA	NC	156,9	38,4	46,60	14,0
YERBA MATE CANCHADA	21,3	478,6	176,8	132,65	40,0

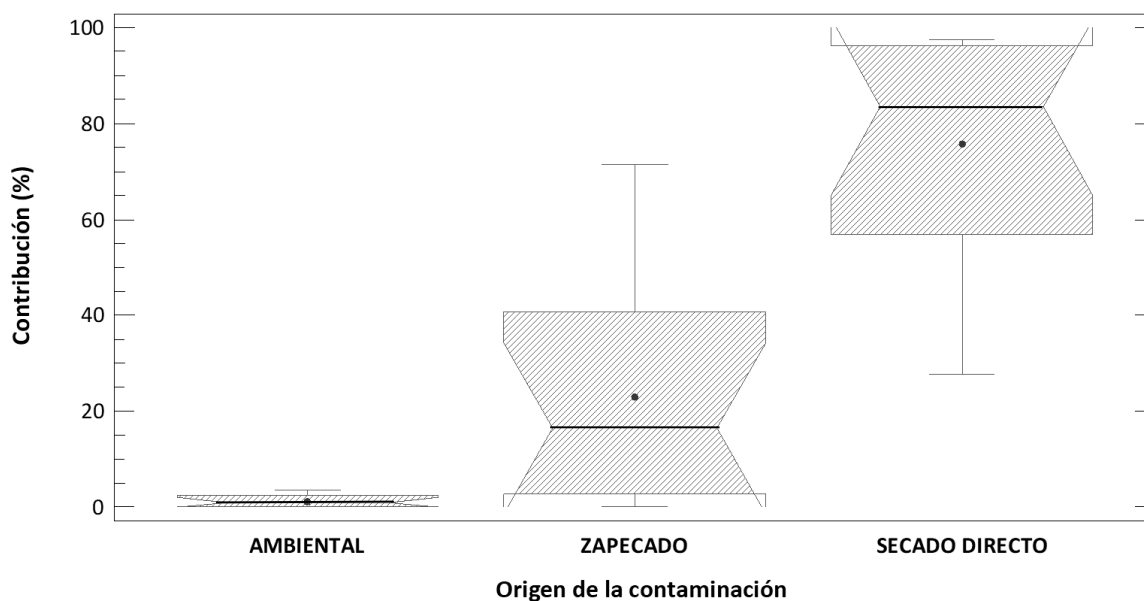
Como puede observarse, los niveles de contaminación en cada una de las etapas del procesamiento primario de *I. paraguariensis* fueron altamente variables. El contenido de PAH8 de las muestras de yerba mate sin procesar varió entre no detectable y $7,1 \mu\text{g}/\text{kg}$ de la materia seca, con una media de $1,7 \mu\text{g}/\text{kg}$ de la materia seca, indicando distintos niveles de contaminación de la materia prima utilizada en la elaboración de la yerba mate. Asimismo, el contenido de PAH8 de las muestras de yerba mate en cada una de las etapas de elaboración mostró una gran dispersión, indicando distintos niveles de contaminación del producto en los diferentes establecimientos industriales a lo largo del procesamiento primario. En las muestras de yerba mate zapecada, las concentraciones totales de los 8 HAPs estudiados se ubicaron entre no cuantificable y $156,9 \mu\text{g}/\text{kg}$ de la materia seca, con una media de $38,4 \mu\text{g}/\text{kg}$ de la materia seca. En el caso de la yerba mate canchada, el contenido de PAH8 varió entre 21,3 y $478,6 \mu\text{g}/\text{kg}$ de la materia seca, con una media de $176,8 \mu\text{g}/\text{kg}$ de la materia seca.

Con el objeto de establecer si la variación de PAH8 a lo largo de las etapas del procesamiento primario de la yerba mate fue significativa, se realizó un análisis estadístico de comparación de las muestras. Teniendo en cuenta los tamaños muestrales y tras demostrar que los datos no distribuían de manera normal a través de del test de normalidad de Shapiro y Wilk ($p < 0,05$), el análisis fue realizado utilizando la Prueba de

Wilcoxon. Este test no paramétrico de contraste, permite establecer si existen diferencias entre dos muestras, comparando las medianas de las poblaciones de las que fueron extraídas, cuando éstas corresponden a datos relacionados (muestras pareadas). Los resultados demostraron que existen diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) en los contenidos de PAH8 de la yerba mate antes del zapecado y después del zapecado y antes del secado y después del secado. Esto revela que los niveles de contaminación de la yerba mate zapecada y canchada de los 11 establecimientos que utilizan métodos de secado directo fueron aumentando a lo largo del proceso, siendo significativamente superiores luego de cada tratamiento sucesivo.

Asimismo se analizó el grado de contribución (en porcentaje) de los HAPs de origen ambiental, considerados responsables de la contaminación de la materia prima, y de los HAPs originados durante las etapas de zapecado y secado, al contenido total de PAH8 del producto final (yerba mate canchada). Una vez obtenidos los porcentajes de contribución para cada origen de contaminación, los datos fueron analizados mediante la Prueba de Kruskal-Wallis, con el fin de establecer si existen diferencias significativas en los aportes al contenido total de HAPs de la yerba mate canchada. Como puede observarse en la Figura 10, la contribución de la etapa de secado (aproximadamente 76%) fue significativamente superior ($p < 0,05$) al aporte de la etapa de zapecado (aproximadamente 23%), y este último a su vez, significativamente superior ($p < 0,05$) a lo contribuido por los HAPs de origen ambiental (aproximadamente 1%).

Figura 10. Contribución de los HAPs ambientales y del zapecado y el secado al contenido de PAH8 de la yerba mate canchada



(—) Mediana
(•) Media aritmética

Como se ha mencionado anteriormente, los niveles de contaminación detectados en las muestras de yerba mate zapecada y yerba mate canchada han sido ampliamente variables.

Si bien existe una gran uniformidad en los equipos utilizados en la etapa de zapecado en los 11 establecimientos estudiados (zapecadores con dimensiones que van de los 7 a los 10 m de longitud y que operan con tiempos de residencia entre 2 y 4 min), la biomasa forestal utilizada como combustible durante el proceso fue de diversos tipos (leña, chips, viruta y/o aserrín de madera) (véase la Tabla 12). Se estudió la influencia del tipo de combustible en el contenido de PAH8 de la yerba mate zapecada a través de la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis para la comparación de varias muestras independientes. No se observaron diferencias estadísticamente significativas en los niveles de contaminación con HAPs en las muestras de yerba mate zapecadas utilizando diferentes tipos de combustibles ($p > 0,05$).

En cuanto a los niveles de contaminación de la yerba mate canchada, los parámetros estudiados también presentaron un alto grado de dispersión. La alta variabilidad observada, puede ser debida a la heterogeneidad existente en los equipos de secado utilizados por la industria yerbatera (secaderos de cinta, de catre, rotatorios), a las condiciones de operación, principalmente, el tiempo de residencia y la temperatura de secado, los diferentes combustibles (chips, leña), y la inclusión o no de la etapa de presecado en el proceso global. Se estudió la influencia del tipo de secadero (cinta, catre, rotatorio), tiempo total de secado, combustible utilizado y la existencia o no de una etapa de presecado en el contenido de PAH8 de la yerba mate canchada. El análisis se realizó a través de la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis. Se comprobó que ninguno de los factores analizados influye de manera significativa en los niveles de contaminación con HAPs de la yerba mate canchada obtenida por secado directo ($p > 0,05$).

Vieira et al. (2010), estudiaron el contenido de HAPs en muestras de yerba mate a lo largo de las etapas de elaboración en tres establecimientos industriales de Brasil. El contenido medio de PAH8 hallado fue 4,91 $\mu\text{g}/\text{kg}$ en yerba mate sin procesar, 221,95 $\mu\text{g}/\text{kg}$ en yerba mate zapecada y 595,80 en yerba mate secada. Aunque los valores reportados por estos autores son superiores a los hallados en el presente estudio, demuestran que las etapas de zapecado y secado son las responsables de la contaminación de la yerba mate con HAPs. En Brasil, los establecimientos industriales utilizan zapecadores de características y condiciones de operación similares a los zapecadores utilizados en Argentina. Sin embargo, los equipos de secado son de tipo rotatorios, en los que el tiempo de residencia del material es corto (aproximadamente 30 min), aunque las temperaturas de operación son elevadas, siendo de alrededor de los 350 °C en la entrada y de unos 110 °C a la salida del tambor de secado (Esmerilindo et al., 2002).

Todo lo expuesto indica que la contaminación de la yerba mate durante las etapas de zapecado y secado estaría relacionada con la calidad del proceso de combustión que genera los gases que, mezclados con el aire, actúan como agentes térmicos de contacto

directo en ambos procesos. Una completa combustión de la materia orgánica, daría como resultado dióxido de carbono, vapor de agua, cenizas y la liberación de calor. Esto tiene lugar en condiciones de alta temperatura y en presencia de suficiente oxígeno. Si el proceso de combustión ocurre en condiciones deficitarias de oxígeno, la combustión será incompleta (pirólisis) y a temperaturas que superen los 500 °C, la situación se torna propicia para la formación de HAPs (Lee et al, 1981; Ramdahl, 1985).

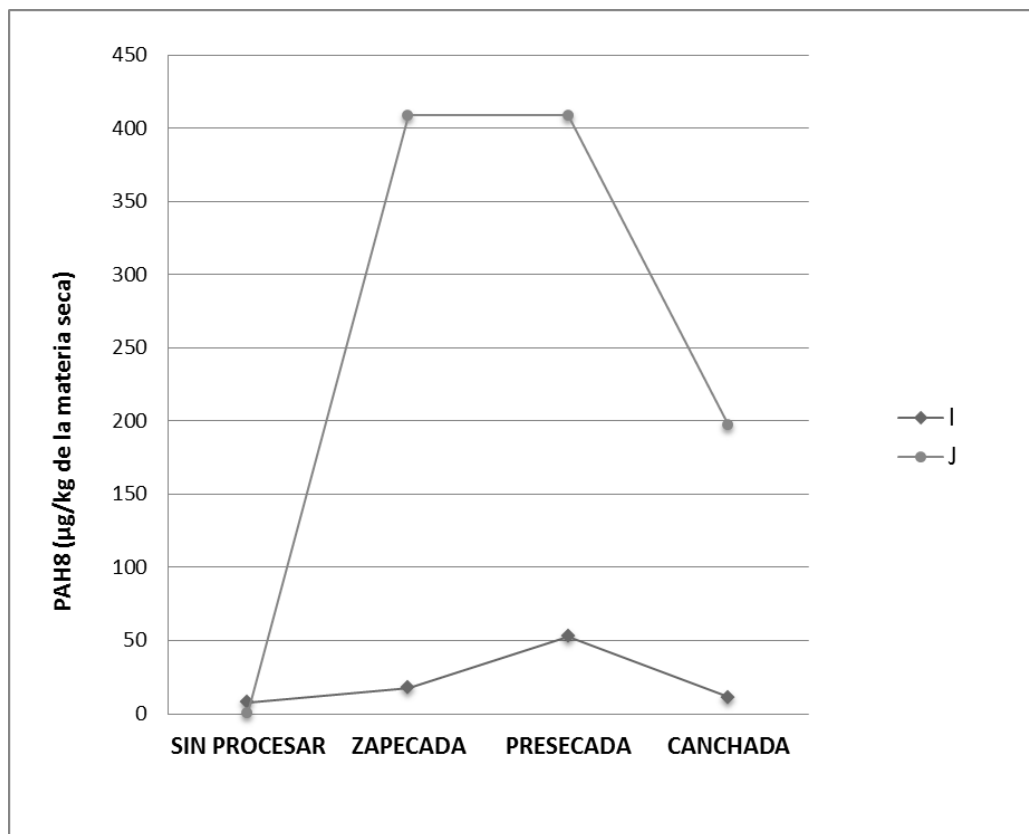
Jekins et al. (1998) definen a la combustión de biomasa como un fenómeno dinámico y complejo que implica simultáneamente la transferencia de calor y de masa a la vez que se producen diversas reacciones químicas, que dependen no sólo de la composición del combustible, si no también de la temperatura, la duración del proceso y de la accesibilidad al oxígeno (aire). En cualquier caso, la cantidad de aire es el principal factor de control en este tipo de procesos. Si el aire es insuficiente se produce la oxidación incompleta del combustible y se generan productos no deseados. Por el contrario, si se agrega aire en exceso al sistema, se produce un enfriamiento que disminuye la eficiencia del proceso de generación de calor (Oberberger y Thek, 2004). Debido a que el equilibrio justo es muy difícil de lograr, ambas, pirólisis y combustión van de la mano. Las condiciones de quemado dictan la calidad y la proporción de las emisiones generadas durante la pirólisis, aunque la formación de HAPs es un resultado inevitable del proceso de combustión incompleta de la madera como de otros tipos de biomasa, o de cualquier material carbonoso (Randahl, 1985; Oberberger y Thek, 2004).

IV.3.3.2. Contenido de HAPs durante el procesamiento primario de la yerba mate en establecimientos que utilizan métodos de secado indirecto

Se analizaron muestras de yerba mate sin procesar, yerba mate zapecada y yerba mate canchada provenientes de dos establecimientos, en los que se utiliza el método indirecto en la etapa de secado (establecimientos I y J). En estos establecimientos la yerba mate es secada utilizando aire caliente, sin entrar en contacto con gases de combustión. Se pudo observar un aumento en el contenido de PAH8 en la yerba mate tras la etapa de

zapecado y una reducción del contenido total de HAPs luego de la etapa de secado (Figura 11). Nótese que en la Figura 11 se incluyó la etapa de presecado, esto es debido a que el establecimiento I incluye este proceso previo al ingreso de la yerba mate a la etapa de secado indirecto. El contenido de PAH8 de la yerba mate presecada correspondiente a este establecimiento fue determinado (52,0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de la materia seca), comprobándose un aumento en el nivel de contaminación con HAPs tras la etapa de presecado. El establecimiento J no cuenta con una etapa de presecado en el proceso global, por lo que en la Figura 11 el contenido de PAH8 permanece invariable.

Figura 11. Contenido de PAH8 a lo largo de las etapas del procesamiento primario de la yerba (establecimientos con secado indirecto)



En el establecimiento I, el contenido total de los 8 HAPs estudiados cayó de 52,0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de la materia seca a 10,6 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de la materia seca. En el establecimiento J, el

contenido de PAH8 de la yerba mate al ingreso de la etapa de secado fue de 408,8 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de la materia seca y el contenido de PAH8 a la salida del secadero fue de 197,0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de la materia seca. Los porcentajes de reducción de PAH8 tras la etapa de secado indirecto en los establecimientos I y J fueron 78 % y 52 %, respectivamente.

La reducción observada pudo ser debida a la evaporación de los compuestos a las temperaturas del secado, a procesos de degradación térmica, procesos de degradación química (específicamente, oxidación), o una combinación entre ellos.

Las presiones de vapor de los compuestos orgánicos dependen directamente de la temperatura. Así, los HAPs que a temperatura ambiente poseen presiones de vapor menores a 10^{-9} kPa, lo que determina que se encuentren exclusivamente en fase sólida, a temperaturas cercanas a las del de secado de la yerba mate exhibirán presiones de vapor superiores. Como se ha expuesto en el Capítulo I, los 8 HAPs estudiados poseen presiones de vapor entre 10^{-8} y 10^{-9} kPa a 25 °C. Murray et al. (1974) reportan que la presión de vapor del BaA a 114 °C es de $4,26 \cdot 10^{-4}$ kPa. Asimismo, la presión de vapor del Chry a 110 °C es $4,5 \cdot 10^{-5}$ kPa. Goldfarb y Suuberg (2008) determinaron la presión de vapor del BaP 118 °C y reportaron un valor de $7,31 \cdot 10^{-5}$ kPa. Fu y Suuberg (2011) reportaron las presiones de vapor a diferentes temperaturas del BbF ($3,9 \cdot 10^{-5}$ kPa, 111°C), BkF ($1,63 \cdot 10^{-5}$ kPa, 111 °C), DaA ($5,11 \cdot 10^{-6}$ kPa, 125 °C), BPe ($4,16 \cdot 10^{-6}$ kPa, 125 °C) e IcP ($5,4 \cdot 10^{-6}$ kPa, 111 °C). Si bien, a temperaturas cercanas a las temperaturas de secado de la yerba mate, las presiones de vapor de los 8 HAPs estudiados aumentan de manera significativa, encontrándose en el orden de 10^{-5} - 10^{-6} kPa, la evaporación de estos compuestos en estas condiciones puede considerarse despreciable.

Los HAPs son sustancias químicas que exhiben una gran termoresistencia. A pesar de esto, se ha demostrado que los tratamientos térmicos controlados suelen ser medios eficaces para su degradación (Pakpahan et al., 2009). Chen y Chen (2001) estudiaron la estabilidad química de BaA, BaP y DaA en fase sólida, a diferentes temperaturas (100 °C y 200 °C) y a tiempos variables. Ellos observaron una reducción de los compuestos tras el

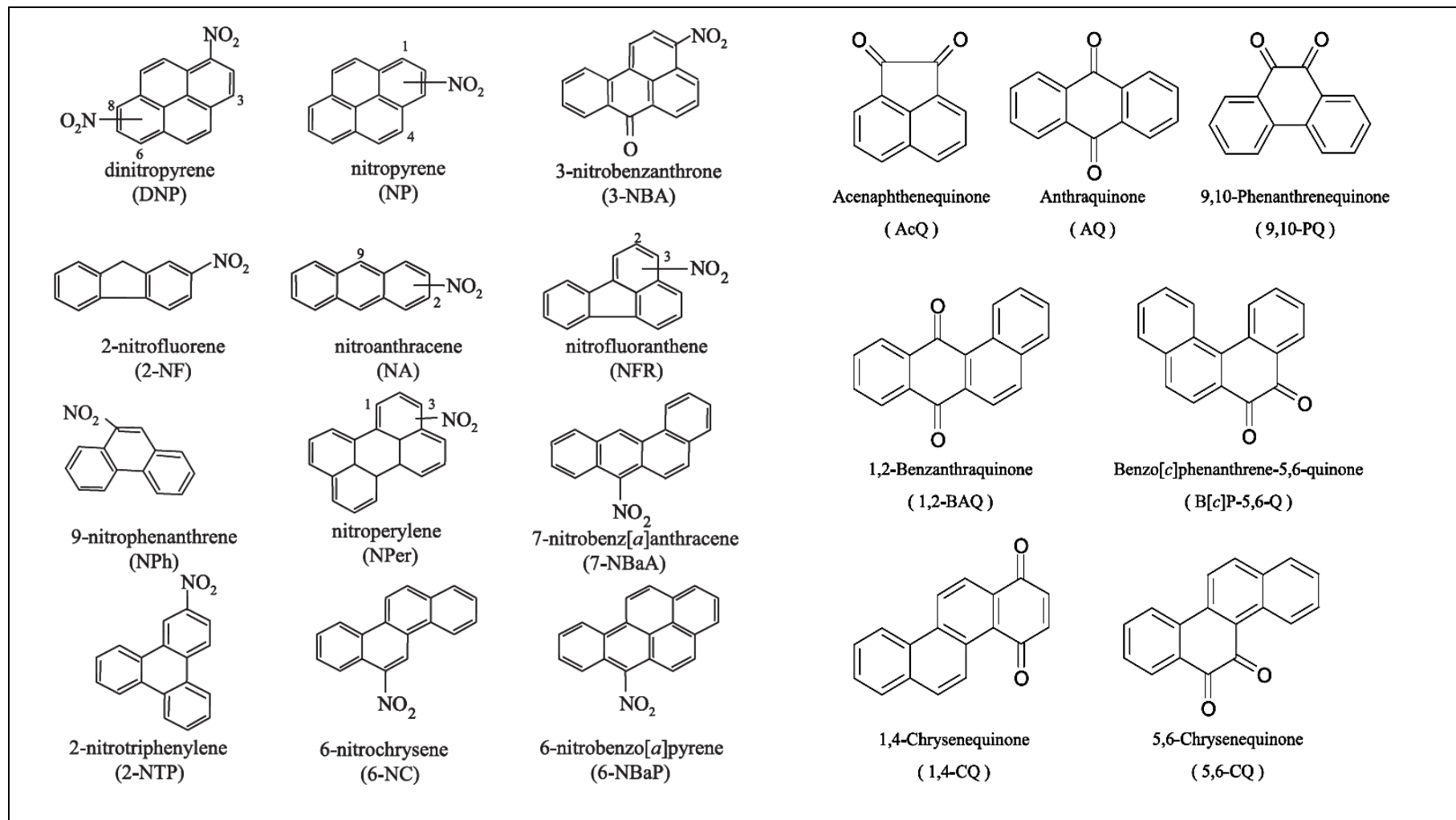
tratamiento térmico, y reportan que los porcentajes de disminución dependen en gran medida de la temperatura y del tiempo, aumentando a mayor temperatura y en tratamientos térmicos de mayor duración. Los porcentajes de reducción reportados tras 5 horas de tratamiento a 100 °C fueron 11 %, 5,26 % y 4,89 % para el BaA, BaP y DaA, respectivamente. Cabe destacar que los ensayos fueron realizados en sistemas cerrados, y que los productos de degradación de los HAPs no fueron estudiados. Los porcentajes de reducción reportados son muy inferiores a los valores hallados en el presente trabajo, indicando que el mecanismo de degradación térmica no sería el único responsable de la reducción del contenido de PAHs en la yerba mate secada utilizando aire caliente.

Ha sido ampliamente demostrado que los HAPs son susceptibles a reaccionar con ciertas sustancias oxidantes y radicales libres presentes en el aire para formar, entre otros productos, compuestos denominados nitro-derivados (N-HAPs) y oxi-derivados (O-HAPs) de los HAPs (Figura 12). Los mecanismos de degradación química afectan tanto a los HAPs en fase gaseosa, como a los HAPs asociados a material particulado (reacciones heterogéneas) (Ravindra et al., 2008; Keyte et al., 2013).

Los N-HAPs se forman por reacciones oxidativas en presencia de especies radicalarias como $\text{OH}\cdot$ y $\text{NO}_3\cdot$ y óxidos de nitrógeno en el aire. De igual manera, los O-PAHs, son formados vía oxidación en presencia de $\text{OH}\cdot$, $\text{NO}_3\cdot$ u O_3 (Kameda, 2011). La química de las reacciones de degradación de los HAPs está lejos de ser plenamente comprendida. Cuestiones inherentes a los mecanismos de reacción, los productos y los factores que influyen directamente en la cinética de reacción aún se desconocen.

La estructura química de cada HAP influye directamente en la susceptibilidad a reaccionar con cada una de las especies oxidantes y reactivas presentes en el aire. Esto es debido a que la distribución de los electrones sobre cada molécula en particular es diferente, y es esto lo que determina qué posiciones son más reactivas y qué especies son más afines a reaccionar con ellas. Es importante señalar que, en el caso de HAPs que se encuentran asociados a material particulado o a cualquier tipo de superficies (HAPs en

Figura 12. Estructuras químicas de algunos de nitro-derivados y oxi-derivados de los HAPs.



fase sólida), la naturaleza química del material al que estén asociados juega un papel fundamental en la reactividad heterogénea de los mismos, ya que la interacción sólido-HAP puede aumentar la estabilidad de estos compuestos. Asimismo, en el caso de los HAPs asociados a superficies, la concentración de los compuestos sobre el material es un factor determinante para la reacción. Ha sido reportado que a mayores concentraciones superficiales de HAPs, los coeficientes de velocidad de reacción son menores. La velocidad de reacción no sólo depende de la carga superficial de HAPs, sino también de la concentración atmosférica del reactivo (Keyte et al., 2013).

Todo indica que la reducción en el contenido de PAH8 de la yerba mate canchada obtenida por secado indirecto estaría relacionada con los mecanismos de degradación térmica y oxidativa expuestos. La diferencia en los porcentajes de reducción de ambos establecimientos pudo ser debida a las condiciones de operación de cada establecimiento durante la etapa de secado y a ciertos factores relacionados con la cinética de reacción antes presentados.

Diversos autores han descrito la degradación de los HAPs por reacciones heterogéneas utilizando cinética de reacción de primer orden (Esteve et al., 2004; Perraudin et al., 2005; Ma et al., 2010a). Se hallaron los valores de las constantes de velocidad de degradación de PAH8 (k) para los establecimientos I y J. Para ello, los valores de concentración inicial de PAH8 (C_0), concentración final de PAH8 (C), fueron ajustados a la ecuación cinética integrada de orden uno ($\ln C/C_0 = -k.t$) teniendo en cuenta el tiempo de secado de cada establecimiento (t). El valor de la constante de velocidad de degradación de PAH8 (k) fue mayor para el establecimiento I ($0,35 \text{ h}^{-1}$) que para el establecimiento J ($0,15 \text{ h}^{-1}$).

En el establecimiento I, la temperatura de secado fue mayor ($110\text{-}115 \text{ }^\circ\text{C}$) y el tiempo de residencia de la yerba mate en el secadero fue menor ($4,5 \text{ h}$) que en el establecimiento J ($90\text{-}100 \text{ }^\circ\text{C}$ y 5 h , respectivamente). Si bien los secaderos de establecimientos I y J son de cinta, estos presentan diferencias estructurales importantes

de destacar. El secadero del establecimiento I está constituido por 2 sistemas de cintas consecutivos con dos 2 niveles cada uno, esto quiere decir que, durante el secado, la yerba mate fue avanzando a lo largo de 4 cintas en total y, en este avance, es removida al caer o al ser elevada, según corresponda, en cada cambio de cinta a cinta (3 veces). El secadero del establecimiento J consta de un solo sistema de 2 cintas superpuestas. En secaderos de estas características, el material es removido solo una vez. Asimismo, cabe destacar que el contenido de PAH8 del material al ingreso del secadero fue significativamente mayor en el establecimiento J. Como hemos mencionado con anterioridad, mayores concentraciones superficiales de HAPs, afectan la cinética de degradación heterogénea disminuyendo la velocidad de reacción.

La mayor temperatura de secado y las condiciones de diseño del establecimiento I, sumadas a la concentración inicial de HAPs de la yerba mate, podrían justificar la mayor tasa de reducción en el contenido de PAH8 observado en este establecimiento, aunque no deben dejarse de lado otros factores que no han sido estudiados en el presente trabajo pero tendrían influencia directa en la degradación de los HAPs. Entre ellos podemos mencionar a los tipos de especies oxidativas y radicales libres presentes en el aire del secadero y sus concentraciones, cuestiones relacionadas a la composición química del material sólido asociado a los HAPs, la altura del lecho de secado, entre otros.

Es importante destacar que, en muchos casos, los compuestos poliaromáticos generados exhiben mayor potencial mutagénico y carcinogénico que los HAPs de los que derivan, especialmente los N-HAPs. Esto indica que, en términos toxicológicos, la reducción del contenido de HAPs por degradación química es ficticia.

IV.3.4. Análisis de la contaminación de la yerba mate con PAH4 y BaP respecto al Reglamento 835/2011 de la Comunidad Europea

Actualmente, la regulación más amplia que trata sobre el contenido de HAPs en matrices alimentarias es el Reglamento 835/2011 de la Comunidad Europea (CE, 2011). El mismo, establece los límites máximos para HAPs en ciertos alimentos (grasas y aceites, granos de cacao y derivados, carne y productos cárnicos ahumados, pescados y mariscos frescos y ahumados y alimentos destinados a niños y lactantes) aunque sin cubrir ciertas categorías como hierbas y especias, frutas y hortalizas, suplementos alimentarios, café, té y otras infusiones, entre otros. En esta normativa, los requerimientos se expresan en términos de BaP, único HAP considerado carcinogénico para el hombre, y PAH4 (suma de BaA, Chry, BbF y BaP), marcador de presencia y toxicidad por HAPs en los alimentos.

Como ha sido expuesto en el Capítulo II, los requisitos más rigurosos contemplados se establecen en la categoría de alimentos destinados a niños y lactantes a base de cereales y leche, cuyos límites máximos para BaP y PAH4 son 1 µg/kg en ambos casos. Los niveles máximos menos exigentes dentro del mismo reglamento corresponden a lo legislado para moluscos bivalvos ahumados. Según lo establecido, los contenidos de BaP y PAH4 en este tipo de alimentos no deben superar los 6,0 µg/kg y 35,0 µg/kg, respectivamente. El resto de las categorías incluyen alimentos ricos en grasas y productos ahumados, con contenidos máximos de BaP y PAH4 intermedios.

En la Tabla 15 se presentan el valor mínimo, el valor máximo, la media aritmética, la desviación estándar y el error estándar para los parámetros BaP y PAH4 en las muestras yerba mate sin procesar, yerba mate zapecada y yerba mate canchada provenientes de los los 13 establecimientos industriales estudiados.

En las muestras de yerba mate sin procesar, los niveles de PAH4, oscilaron entre no detectable y 2,8 µg/kg de la materia seca y las concentraciones de BaP, se ubicaron entre no detectable y 0,4 µg/kg de la materia seca. Si bien todas las muestras se ajustaron a los requerimientos más exigentes de la norma en cuanto al contenido de BaP, dos de

ellas (15%; establecimientos K y L), superaron lo establecido para el parámetro PAH4 en alimentos para lactantes y niños, con niveles mayores a 1,0 µg/kg, aunque ninguna de ellas si quiera se aproximó a los niveles establecidos para los moluscos bivalvos ahumados.

En las muestras de yerba mate zapecada, los niveles de PAH4 y BaP oscilaron entre no cuantificable y 222,0 µg/kg de la materia seca y no detectable y 77,6 µg/kg de la materia seca, respectivamente. Cuatro de las muestras de yerba mate zapecada analizadas (30%; establecimientos B, G J y M) superaron los límites máximos permitidos para moluscos bivalvos ahumados. Sólo dos de las muestras de yerba mate zapecada (15%; establecimientos A y H) se ajustaron a los requisitos más exigentes con niveles de PAH4 y BaP inferiores a 1 µg/kg, lo que indica que las restantes (85%) presentaron niveles intermedios de contaminación superando estos límites. Esto demuestra que, si bien la contribución del zapecado a la contaminación total con HAPs de las ramas de *I. paraguariensis* resultó ser significativamente inferior a lo aportado durante el proceso de secado directo del material, los niveles de BaP y PAH4 que adquiere el producto durante esta etapa, en muchos casos, superan los requerimientos exigidos por el mercado internacional.

En el caso de la yerba mate canchada, los niveles de PAH4 se ubicaron entre 9,6 y 227,5 µg/kg de la materia seca y las concentraciones de BaP oscilaron entre 1,5 y 77,3 µg/kg de la materia seca. Ninguna de las muestras se ajustó a los requisitos más exigentes de la normativa, superando los contenidos de 1 µg/kg establecidos tanto para BaP como para PAH4. Tres de las muestras analizadas (23%; establecimientos A, F e I) presentaron contenidos de BaP y PAH4 inferiores a los límites máximos establecidos para moluscos bivalvos ahumados.

Tabla 15. Contenido de BaP y PAH4 ($\mu\text{g}/\text{kg}$ de la materia seca) durante las diferentes etapas del procesamiento de la yerba mate en establecimientos que utilizan secado directo

	Parámetro	Mínimo	Máximo	Media	Desvío estándar	Error estándar
YERBA MATE SIN PROCESAR	BaP	ND	0,4	0,1	0,15	0,04
	PAH4	ND	2,8	1,0	0,99	0,28
YERBA MATE ZAPECADA	BaP	ND	77,6	10,1	21,39	5,93
	PAH4	NC	222,0	36,0	61,17	16,96
YERBA MATE CANCHADA	BaP	1,5	77,3	21,7	20,68	5,73
	PAH4	9,6	227,5	96,4	71,25	19,76

NC: no cuantificable

ND: no detectado

IV.3.5. Contenido de HAPs en yerba mate elaborada utilizando métodos alternativos de manufactura

Se analizó el contenido de HAPs de muestras de yerba mate elaborada obtenidas utilizando métodos alternativos de manufactura: una muestra de yerba mate zapecada por inmersión en agua caliente y secada de manera indirecta; una muestra de yerba mate zapecada por aplicación de vapor de agua y secada de manera indirecta; y una muestra de yerba mate zapecada y secada utilizando ondas de alta frecuencia. Los resultados se presentan en la Tabla 16.

Si bien, en dos de las muestras, algunos de los 8 HAPs estudiados fueron identificados, no pudieron ser cuantificados ya que se hallaron en niveles inferiores a los límites de cuantificación del método propuesto. La presencia de estas cantidades no cuantificables de HAPs en las muestras analizadas, puede deberse a la deposición ambiental de HAPs atmosféricos sobre las hojas y tallos de *I. paraguariensis* en la plantación.

Tabla 16. Contenido de PAH8 ($\mu\text{g}/\text{kg}$) en muestras de yerba mate obtenidas mediante procesos alternativos de manufactura

HAPs	Zapecado: agua caliente Secado: aire caliente	Zapecado: vapor de agua Secado: aire caliente	Zapecado y secado: Ondas de alta frecuencia
BaA	ND	ND	ND
Chry	ND	ND	ND
BbF	< LOQ	< LOQ	ND
BkF	< LOQ	< LOQ	ND
BaP	ND	< LOQ	ND
DaA	ND	ND	ND
BPe	ND	ND	ND
IcP	ND	ND	ND
PAH8	NC	NC	ND

<LOQ: Menor al límite de cuantificación

ND: no detectado

NC: no cuantificable

Los resultados obtenidos demuestran que la implementación de modificaciones en el proceso de manufactura tradicional de la yerba mate, específicamente la eliminación del quemado de combustibles orgánicos como fuente de calor el posterior contacto de los gases de combustión con el material, evita la contaminación con HAPs del producto final.

IV.4. Conclusiones

El procesamiento primario de la yerba mate consta de 3 etapas: *a)* zapecado, *b)* secado y *c)* canchado o molienda gruesa. Se estudió el contenido de 8 hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAH8; benzo[a] antraceno, criseno, benzo[b] fluoranteno, benzo [k]fluoranteno, benzo [a] pireno, dibenzo[a,h] antraceno, benzo[g,h,i] perileno, indeno [1,2,3-c,d] pireno) en muestras de yerba mate a lo largo del procesamiento primario del producto. Se encontró que la yerba mate fue incrementando el contenido de HAPs de manera significativa ($p < 0,05$) a lo largo de las etapas de procesamiento (yerba mate sin procesar < yerba mate zapecada < yerba mate canchada) en los establecimientos que utilizan métodos directos de secado. Esto indica que los tratamientos térmicos directos aplicados a la materia prima incorporan HAPs al producto. El fenómeno responsable de esta contaminación, es la utilización de la mezcla de aire y gases de combustión provenientes del quemado de diferentes combustibles orgánicos (leña, chips y /o aserrín de madera), como agente térmico en las etapas de zapecado y secado de la yerba mate. Asimismo, se analizó la contaminación de yerba mate obtenida por secado indirecto utilizando aire caliente como agente térmico, es decir, sin entrar en contacto con gases de combustión. Se observó una reducción en el contenido de PAH8 de la yerba mate tras la etapa de secado indirecto, respecto a la yerba mate antes de ingresar al proceso. Sin embargo, esta reducción podría ser a expensas de la degradación oxidativa de estos compuestos. Los productos de reacción de la degradación oxidativa son nitro-derivados y oxi-derivados de los HAPs que, en muchos casos, poseen mayor potencial mutagénico y carcinogénico que los HAPs que les dan origen.

La eliminación de los gases de combustión como fuente directa de calor en el proceso de manufactura de la yerba mate, evitaría la contaminación del producto con HAPs. Este hecho quedó demostrado tras el análisis de muestras de yerba mate obtenidas utilizando métodos alternativos de manufactura (sin entrar en contacto con gases de combustión), las que revelaron niveles de contaminación con HAPs despreciables. Esto

pone en evidencia la inminente necesidad del desarrollo e implementación a escala industrial de métodos de zapeado alternativos como la utilización de agua caliente, vapor de agua, ondas de alta frecuencia, y métodos de secado indirecto con intercambiadores de calor, lo que se traduciría en un mayor control de los procesos, permitiendo obtener un producto de mayor calidad desde el punto de vista de la seguridad alimentaria.

Argentina es el principal productor de yerba mate a nivel mundial y un gran consumidor del producto, por este motivo, la mejora del proceso industrial de manufactura de *I. paraguariensis* a fin de evitar la incorporación de contaminantes como los HAPs y obtener un producto seguro para la salud humana, está ampliamente justificada.

Capítulo V

HIDROCARBUROS AROMÁTICOS POLICÍCLICOS (HAPs) EN LA YERBA MATE ELABORADA Y SUS INFUSIONES

V.1. Introducción

Las hojas y tallos de yerba mate (*I. paraguariensis* St. Hil) son procesados industrialmente para obtener básicamente dos productos: *a)* yerba mate elaborada y *b)* yerba mate en saquitos. Tradicionalmente, la yerba mate es consumida bajo tres formas: mate caliente o simplemente *mate*, mate frío o *tereré* y *mate cocido*. El mate es una infusión que se prepara colocando entre 30 y 50 g de yerba mate en un recipiente en el cual se vierte agua caliente (70 - 85 °C) de manera sistemática, la que se succiona mediante una bombilla. El *tereré* es consumido de igual manera, pero cebando sobre la yerba mate, agua fría (4 - 8 °C). El *mate cocido* puede ser preparado utilizando yerba mate elaborada, o bien, utilizando yerba mate envasada en saquitos (forma de consumo más habitual). El mate cocido preparado con yerba mate envasada en saquitos o bolsitas se consume en tazas de forma similar al té. La bebida se prepara colocando en contacto 200-250 mL de agua caliente (a temperatura cercana a la ebullición) con un saquito de yerba mate (cada saquito contiene aproximadamente 3 g de yerba mate), y dejándolo infusionar por aproximadamente 5 minutos (Schmalko, 2005).

La presencia de hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) en yerba mate elaborada de diversos orígenes ha sido reportada en la literatura (Machado et al., 1997; Pereira et al., 1999; Camargo y Toledo, 2002; Kamangar et al., 2008; Ziegenhals et al., 2008; Vieira et al., 2010; Golozar et al., 2012; García Londoño et al., 2014). Según estos autores, el proceso de manufactura de la yerba mate contribuye significativamente a la formación y deposición de los HAPs en el producto.

Desde el punto de vista de la seguridad alimentaria, una evaluación realista de la significación del contenido de HAPs en la yerba mate y de los riesgos que esto representa para la salud humana, debe hacerse en base a la tasa de transferencia de los HAPs presentes en el producto hacia las infusiones preparadas con él (formas de

consumo), teniendo en cuenta tanto el modo de preparación como los hábitos de consumo de las mismas. Camargo and Toledo (2002), Zuin et al. (2005), Kamangar et al. (2008), Schulz et al. (2015) estudiaron el contenido de HAPs en infusiones frías y calientes preparadas con yerba mate. Sin embargo, el método de obtención de las infusiones utilizado por los investigadores no describe completamente la forma tradicional de preparación y consumo fundamentalmente del *mate* y el *tereré*, difiriendo principalmente en la relación de yerba mate / agua y el tiempo de infusión utilizados.

V.2. Materiales y Métodos

V.2.3. Materiales

V.2.3.1. *Yerba mate elaborada*

Las muestras de yerba mate elaborada fueron adquiridas en diferentes comercios de las ciudades de Posadas y Buenos Aires (Argentina). Se obtuvieron 10 muestras de yerba mate elaborada (las 10 marcas comerciales más consumidas en la Argentina) que consistieron en dos paquetes de 0,5 kg por muestra. Los contenidos de los dos paquetes de yerba mate elaborada de cada marca comercial fueron mezclados y la mezcla obtenida fue sometida a un proceso de cuarteo, hasta obtener aproximadamente 250 g de muestra. Posteriormente, la muestra fue dispuesta en bolsas con cierre hermético, y mantenida a -20°C y protegida de la luz hasta comenzar con los procedimientos analíticos.

V.2.3.2. *Yerba mate envasada en saquitos*

Las muestras de yerba mate envasada en saquitos fueron adquiridas en supermercados ubicados en la ciudad de Posadas (Argentina). Se obtuvieron 5 muestras (las 5 marcas comerciales más consumidas en Argentina) que consistieron en 2 cajas de 25 saquitos cada una. Se tomaron, al azar, 13 saquitos de cada una de las dos cajas que conformaron cada una de las muestras, cuyo contenido en conjunto (aproximadamente 75 g) fue debidamente homogeneizado y acondicionado en bolsas con cierre hermético, mantenidas a -20°C y protegidas de la luz hasta comenzar con los procedimientos analíticos. El resto de los saquitos de cada caja fueron reservados en una bolsa con cierre hermético y mantenidos a -20 °C al abrigo de la luz para su posterior utilización en la obtención de las muestras de mate cocido.

V.2.4. Métodos

V.2.4.1. *Determinación de la humedad*

El contenido de humedad de las muestras de yerba mate fue determinado en una estufa a $103\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ procediendo según la norma IRAM 20503 (1995) (véase la sección III.2.2.1).

V.2.4.2. *Preparación de las infusiones*

(a) Mate y tereré

Las infusiones frías y calientes de yerba mate (mate y tereré) fueron preparadas utilizando un dispositivo que simula el procedimiento real de tomar mate, según lo descrito por Ramallo et al.(1998) (véase la sección III.2.2.2). La temperatura del agua destilada utilizada en la preparación de mate fue de $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ y en la preparación de tereré fue de $4\text{ }^{\circ}\text{C}$.

(b) Mate cocido

Las muestras de mate cocido se obtuvieron simulando la preparación real de esta infusión, colocando en contacto con 200 mL de agua en ebullición un saquito de yerba mate durante 5 minutos.

V.2.4.3. *Determinación del contenido de HAPs en la yerba mate elaborada, yerba mate envasada en saquitos y sus infusiones (mate, tereré y mate cocido)*

La determinación de los HAPs fue realizada mediante cromatografía líquida de alta resolución con detección de fluorescencia (HPLC-FLD). Los procedimientos de extracción de los HAPs, purificación de las muestras por SPE y análisis cromatográfico de las mismas se realizaron acorde a lo descrito en la sección III.2.2.3 del presente trabajo de Tesis. La identificación y cuantificación de los HAPs se realizó según lo detallado en la sección III.2.2.4.

V.2.4.4. Cálculo de la tasa de transferencia de HAPs de la yerba mate a las infusiones preparadas con ella.

El porcentaje de transferencia de los HAPs estudiados desde la yerba mate elaborada y la yerba mate en saquitos a las diferentes infusiones preparadas con ellas (mate y tereré y mate cocido, respectivamente) se calculó a través de la siguiente fórmula:

$$\%TRANSFERENCIA = \frac{C_i \cdot V_i}{C_s \cdot PM} \cdot 100$$

Donde C_i es la concentración de HAPs ($\mu\text{g/L}$) en la infusión, V_i es el volumen de la infusión (L), C_s es el contenido de HAPs en la yerba mate elaborada ($\mu\text{g/kg}$) y PM es el peso seco de yerba mate elaborada utilizada para obtener la infusión (kg).

V.2.4.5. Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó utilizando el software Statgraphics Centurion XV (2009). Se realizaron de correlación de Pearson entre el contenido de HAPs de los productos comerciales (yerba mate elaborada y la yerba mate envasada en saquitos) y el contenido de HAPs de las infusiones preparadas utilizando dichos productos (formas de consumo). Se trabajó con un 95% de nivel de confianza.

V.3. Resultados y Discusión

V.3.1. Contenido de HAPs en muestras comerciales (yerba mate elaborada y yerba mate envasada en saquitos)

El contenido de HAPs fue determinado en diez muestras comerciales de yerba mate elaborada de origen argentino (las 10 marcas más vendidas en Argentina). Los resultados obtenidos se presentan en la Tabla 17.

Los niveles de los ocho HAPs estudiados variaron entre 54,7 y 548,0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de la materia seca. Los contenidos de PAH4 oscilaron entre 27,6 y 231,6 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de la materia seca, mientras que los contenidos de BaP se ubicaron entre 4,1 y 57,3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de la materia seca.

Durante el procesamiento primario de la yerba mate, las ramas de *I. paraguariensis* entran en contacto directo con la llama y gases de combustión provenientes del quemado de leña, virutas, aserrín y/o chips de madera. Así, los HAPs formados por combustión incompleta, se acumulan sobre las ramas de yerba mate que ofrecen un gran área superficial, contaminándolas (Ziegenhals et al., 2008; Vieira et al., 2010; Golozar et al., 2012; García Londoño et al., 2014; Schulz et al., 2015). La alta variabilidad en el contenido de HAPs de las diferentes muestras de yerba mate elaborada analizadas, está directamente relacionada con la cantidad y la calidad de los gases de combustión a los que es expuesta la materia prima a lo largo del proceso de elaboración del producto, cuestión que ha sido extensamente discutida en el Capítulo IV del presente trabajo.

Otros autores han determinado el contenido de HAPs en yerba mate elaborada producida en Brasil (Kamangar et al., 2008), Argentina (García Londoño et al., 2014) y yerba mate elaborada de origen no especificado (Ziegenhals et al., 2008), obteniendo resultados ampliamente de variables. En la Tabla 18 se muestra una comparación entre los resultados obtenidos por estos autores y los hallados en este trabajo.

Tabla 17. Contenido de HAPs ($\mu\text{g}/\text{kg}$, ms) (media \pm desvío estándar, n = 2) en yerba mate elaborada

HAPs	MARCAS									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
BaA	23,3 \pm 1,02	17,5 \pm 2,40	5,3 \pm 0,57	43,0 \pm 4,45	22,2 \pm 1,96	21,6 \pm 0,11	11,4 \pm 1,36	10,0 \pm 0,05	17,9 \pm 1,18	40,3 \pm 8,05
Chry	38,1 \pm 2,47	37,2 \pm 5,93	11,5 \pm 1,16	91,4 \pm 8,85	32,0 \pm 2,41	43,3 \pm 0,72	22,8 \pm 2,98	18,2 \pm 2,34	31,0 \pm 2,43	84,9 \pm 17,68
BbF	26,7 \pm 1,55	18,9 \pm 4,02	6,7 \pm 0,58	44,3 \pm 5,15	26,2 \pm 1,66	24,4 \pm 0,05	12,7 \pm 1,13	10,6 \pm 0,47	20,6 \pm 2,29	49,0 \pm 8,86
BkF	8,1 \pm 0,53	6,5 \pm 1,31	2,4 \pm 0,11	16,8 \pm 1,50	12,0 \pm 0,95	8,8 \pm 0,06	3,7 \pm 0,38	2,7 \pm 0,23	7,5 \pm 0,31	17,8 \pm 2,98
BaP	16,4\pm1,25	12,8\pm1,92	4,1\pm0,33	34,9\pm5,08	22,1\pm1,26	19,3\pm0,18	8,3\pm0,43	7,8\pm0,23	22,3\pm1,01	57,3\pm4,41
DaA	23,0 \pm 0,39	22,1 \pm 3,13	10,7 \pm 0,33	39,4 \pm 1,71	29,4 \pm 0,31	25,3 \pm 0,77	11,3 \pm 0,45	10,9 \pm 0,93	28,9 \pm 0,60	76,7 \pm 5,43
BPe	32,9 \pm 0,11	39,8 \pm 2,42	13,9 \pm 0,02	74,2 \pm 9,31	42,7 \pm 0,87	44,9 \pm 0,66	20,3 \pm 1,35	7,1 \pm 0,07	42,3 \pm 1,85	139,8 \pm 8,84
IcP	10,7 \pm 0,19	11,7 \pm 1,66	ND	40,0 \pm 2,75	24,8 \pm 0,93	22,3 \pm 0,57	5,0 \pm 0,81	3,5 \pm 0,38	27,4 \pm 0,41	82,2 \pm 4,46
PAH4	104,5	86,5	27,6	213,6	102,5	108,7	55,2	46,6	91,8	231,6
PAH8	179,2	166,6	54,7	384,0	211,5	210,1	96,3	70,9	198,0	548,0

Cabe destacar que, los contenidos de PAH8, PAH4 y BaP hallados en las muestras de yerba mate elaborada analizadas fueron similares a los observados en las muestras de yerba mate canchada de los diferentes establecimientos que utilizan métodos de secado directo analizados en el presente trabajo (Tabla 18).

Tabla 18. Comparación del contenido de HAPs ($\mu\text{g}/\text{kg}$) en muestras de yerba mate elaborada reportada por diversos autores

Estudio	PAH8			PAH4			BaP		
	Mín	Máx	Media	Mín	Máx	Media	Mín	Máx	Media
Este estudio									
Yerba mate elaborada (n=10)	54,7	548,0	211,9	27,6	231,6	106,86	4,1	57,3	20,5
Yerba mate canchada (n= 11)	21,3	478,6	176,8	9,6	227,5	96,4	1,5	77,3	21,7
Kamangar et al. (2008) ^a (n=8)	135,3	590,4	441,7	88,1	397,7	282,4	8,0	53,3	37,1
Ziegenhals et al. (2008) ^b (n=8)	264,4	2.121,8	871,5	184,6	1.615,5	635,0	24,8	236,5	106,5
García Londoño et al. (2014) ^c (n=50)	-	-	385,2	-	-	145,1	1,3	125,2	26,9
Schulz et al. (2015) (n=3)	1.255,0	2.142,0	1.647,3	810,0	1.360,0	1.036,7	200,0	380,0	273,3

a PAH8 y PAH4 + trifenileno, benzo[j]fluoranteno y dibenzo[a,c]antraceno

b PAH4 Y PAH8 + trifenileno

c PAH8 + pireno

El contenido de 8 HAPs fue determinado en cinco muestras de yerba mate envasada en saquitos de origen argentino (las 5 marcas más vendidas en Argentina). Los resultados obtenidos se presentan en la Tabla 19.

Las muestras de yerba mate envasada en saquitos analizadas mostraron valores de PAH8 entre 114,3 y 456,2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de la materia seca, mientras que el contenido de

PAH4 osciló entre 74,0 y 250,9 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de la materia seca. El contenido de BaP de las muestras varió entre 7,55 y 59,51 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de la materia seca. No se encontraron antecedentes en la literatura científica sobre el contenido de HAPs en muestras de yerba mate envasada en saquitos.

Tabla 19. Contenido de HAPs ($\mu\text{g}/\text{kg},\text{ms}$) (media \pm desvío estándar, n = 2) en yerba mate en saquitos

HAPs	MARCAS				
	1	2	3	4	5
BaA	16,7 \pm 0,05	45,7 \pm 4,70	42,5 \pm 1,30	12,1 \pm 0,25	19,0 \pm 1,07
Chry	28,9 \pm 0,33	82,7 \pm 9,61	46,1 \pm 4,34	40,2 \pm 1,67	36,8 \pm 2,03
BbF	24,3 \pm 0,09	63,0 \pm 4,85	53,6 \pm 4,56	14,2 \pm 1,72	21,8 \pm 2,84
BkF	7,6 \pm 0,68	23,4 \pm 3,58	23,6 \pm 1,23	3,7 \pm 0,58	6,7 \pm 0,59
BaP	13,8 \pm 1,73	59,5 \pm 8,46	41,9 \pm 2,66	7,5 \pm 0,24	16,3 \pm 1,30
DaA	28,9 \pm 0,20	68,7 \pm 7,92	52,8 \pm 3,01	12,4 \pm 0,46	15,6 \pm 1,01
BPe	16,7 \pm 0,70	73,5 \pm 7,67	49,8 \pm 2,84	18,5 \pm 0,82	13,4 \pm 1,41
IcP	9,17 \pm 0,39	39,7 \pm 4,77	33,8 \pm 1,56	5,6 \pm 0,36	7,2 \pm 0,95
PAH4	83,8	250,9	184,1	74,0	91,7
PAH8	146,0	456,2	344,1	114,3	134,6

V.3.2. Análisis de la contaminación de la yerba mate elaborada y la yerba mate en saquitos respecto al Reglamento 835/2011 de la Comunidad Europea

El Reglamento 835/2011 de la Comunidad Europea (CE, 2011) establece los límites máximos para HAPs en ciertos alimentos, en términos de BaP y PAH4. Esta normativa es, hasta hoy, la regulación más amplia en la materia. A pesar de esto, no

cubre ciertas categorías como hierbas y especias deshidratadas, suplementos alimentarios, café, té y yerba mate, entre otros.

Teniendo en cuenta todos los grupos de alimentos que abarca la legislación europea, la totalidad de las muestras de yerba mate elaborada analizadas superaron los valores máximos legislados para BaP y PAH4 (1 µg/kg para ambos parámetros) en alimentos destinados a niños y lactantes. Solamente una de las diez marcas estudiadas (marca 3) no superó los límites máximos establecido para BaP y PAH4 en la misma norma (6 µg/kg y 35,0 µg/kg, respectivamente) para moluscos bivalvos ahumados, lo que indica que el 90% de las muestras analizadas no se ajustan a los estándares internacionales respecto al contenido de HAPs, fijados para diversos alimentos.

Al igual que lo observado en la yerba mate elaborada, ninguna de las muestras de yerba mate envasada en saquitos analizadas logró adecuarse a lo establecido en el Reglamento 835/2011 de la Comunidad Europea (CE, 2011) para alimentos destinados a niños y lactantes a base de cereales y leche. Asimismo, la totalidad de las muestras analizadas superaron los límites máximos establecidos en la misma normativa para BaP y la suma de BaA, Chry, BbF y BaP (PAH4) en diversas matrices alimentarias, incluso productos ahumados de origen animal.

V.3.3. Contenido de HAPs en las infusiones preparadas con yerba mate elaborada (*mate* y *tereré*) y yerba mate envasada en saquitos (*mate cocido*)

Las Tablas 20 y 21 presentan los contenidos de HAPs hallados en las infusiones calientes (*mate*) y frías (*tereré*) preparadas con yerba mate elaborada, respectivamente. La Tabla 22 presenta los niveles de los 8 HAPs estudiados en las muestras de *mate cocido*.

Tabla 20. Contenido de HAPs (ng/L) (media±desvío estándar, n = 2) en mate

HAPs	MARCAS										Transferencia a la infusión (%)
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
BaA	164,7 ± 12,0	131,0 ± 10,6	60,1 ± 2,7	308,9 ± 4,2	156,6 ± 2,0	172,8 ± 8,8	65,3 ± 0,2	72,2 ± 2,8	176,3 ± 7,7	398,6 ± 13,3	8,9 ± 1,9
Chry	278,9 ± 16,4	262,2 ± 11,0	122,6 ± 7,4	541,5 ± 7,8	224,8 ± 1,9	343,7 ± 18,6	133,6 ± 0,4	132,5 ± 5,5	305,6 ± 11,3	78,9 ± 2,3	7,7 ± 2,9
BbF	167,1 ± 10,3	122,9 ± 8,6	71,6 ± 3,6	277,2 ± 1,3	190,2 ± 5,7	187,7 ± 11,0	72,3 ± 0,4	72,8 ± 5,6	201,9 ± 5,7	464,9 ± 13,6	8,4 ± 1,9
BkF	55,1 ± 1,4	37,5 ± 1,1	23,4 ± 1,1	89,9 ± 2,5	80,3 ± 2,8	57,2 ± 2,7	18,5 ± 0,1	19,3 ± 0,1	64,7 ± 2,1	163,5 ± 6,0	7,7 ± 1,7
BaP	106,5 ± 6,1	77,8 ± 5,8	38,5 ± 2,3	221,7 ± 2,4	128,8 ± 1,7	121,1 ± 6,7	40,5 ± 0,5	37,0 ± 3,1	135,0 ± 6,7	373,9 ± 15,7	6,9 ± 1,4
DaA	125,8 ± 4,8	99,4 ± 4,0	75,0 ± 2,8	258,4 ± 1,8	205,7 ± 1,5	174,6 ± 6,7	68,8 ± 1,0	<LOQ	196,8 ± 4,9	510,5 ± 14,5	6,9 ± 0,9
BPe	187,3 ± 5,0	143,5 ± 8,4	69,4 ± 3,6	358,6 ± 1,5	185,2 ± 1,4	202,8 ± 12,8	75,2 ± 1,2	37,3 ± 2,5	176,2 ± 6,1	72,9 ± 3,9	4,6 ± 1,6
IcP	<LOQ	<LOQ	ND	177,8 ± 1,6	112,3 ± 0,4	100,3 ± 4,4	<LOQ	<LOQ	118,6 ± 3,7	375,9 ± 11,4	5,4 ± 2,3
PAH4 _w	486,8	369,4	204,2	903,5	567,9	547,9	202,6	157,1	561,5	1076,8	6,2 ± 1,5
PAH8	1.085,4	874,4	460,7	2234,0	1.283,8	1.360,4	474,2	371,2	1375,3	2.438,8	7,0±1,4

<LOQ: Menor al límite de cuantificación

PAH4_w: BbF+BkF+BPe+IcP

Tabla 21. Contenido de HAPs (ng/L) (media±desvío estándar, n = 2) en tereré

HAPs	MARCAS										Transferencia a la infusión (%)
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
BaA	37,6 ± 2,1	22,3 ± 0,9	<LOQ	48,3 ± 1,5	36,6 ± 0,1	41,2 ± 2,2	24,0 ± 1,3	23,9 ± 1,1	39,6 ± 3,0	93,0 ± 3,4	2,0 ± 0,5
Chry	63,1 ± 2,8	<LOQ	<LOQ	83,0 ± 3,3	<LOQ	91,3 ± 8,7	<LOQ	<LOQ	70,2 ± 4,3	195,3 ± 6,3	2,0 ± 0,5
BbF	33,4 ± 3,2	20,4 ± 0,3	12,2 ± 0,5	48,8 ± 2,1	42,9 ± 0,3	47,9 ± 4,2	36,5 ± 1,6	23,6 ± 1,0	39,7 ± 2,2	123,1 ± 4,6	2,0 ± 0,6
BkF	<LOQ	<LOQ	<LOQ	14,0 ± 0,5	17,1 ± 0,1	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	35,3 ± 1,1	1,4 ± 0,9
BaP	20,2 ± 1,0	13,5 ± 0,3	7,0 ± 0,2	40,9 ± 1,6	30,7 ± 0,1	30,3 ± 1,9	16,5 ± 1,1	11,0 ± 0,4	29,8 ± 1,8	92,1 ± 2,2	1,6 ± 0,3
DaA	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	126,9 ± 3,1	1,6 ± 1,1
BPe	21,2 ± 1,3	26,0 ± 0,6	<LOQ	67,2 ± 3,4	42,7 ± 0,5	54,2 ± 3,8	46,7 ± 3,5	<LOQ	36,5 ± 2,2	175,9 ± 4,7	1,2 ± 0,5
IcP	<LOQ	ND	ND	<LOQ	<LOQ	ND	<LOQ	ND	<LOQ	95,1 ± 1,7	1,1 ± 1,7
PAH4 _w	54,6	46,5	12,2	130,1	102,6	102,1	83,2	23,6	76,2	429,4	1,4 ± 0,7
PAH8	175,5	82,3	19,2	302,2	170,0	265,0	123,7	58,6	215,8	937,3	1,6 ± 0,6

<LOQ: Menor al límite de cuantificación

ND: no detectado

PAH4_w: BbF+BkF+BPe+IcP

Tabla 22. Contenido de HAPs (ng/L) (media±desvío estándar, n = 2) en *mate cocido*

HAPs	MARCAS					% Transferencia a la infusión
	1	2	3	4	5	
BaA	< LOQ	17,2±0,65	15,2±1,11	< LOQ	13,0±1,02	2,8 ± 1,0
Chry	< LOQ	< LOQ	< LOQ	ND	< LOQ	-
BbF	< LOQ	24,6±0,94	23,0±1,50	< LOQ	12,2±0,62	2,9 ± 0,8
BkF	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	-
BaP	< LOQ	23,2±1,41	22,0±1,00	< LOQ	9,0±0,86	2,8 ± 1,0
DaA	< LOQ	< LOQ	< LOQ	ND	< LOQ	-
BPe	< LOQ	26,6±0,17	23,8±1,46	< LOQ	< LOQ	2,9 ± 1,3
IcP	ND	ND	ND	ND	ND	-
PAH4 _w	NC	51,2	46,9	NC	12,2	2,4 ± 0,8
PAH8	NC	91,6	84,1	NC	34,3	2,4 ± 1,0

< LOQ: Menor al límite de cuantificación

NC: no cuantificable

ND: no detectado

PAH4_w: BbF+BkF+BPe+IcP

Como puede observarse, algunos HAPs fueron detectados aunque no pudieron ser cuantificados ya que sus concentraciones fueron inferiores a los límites de cuantificación del método analítico.

Los niveles de PAH8 en las infusiones calientes preparadas con yerba mate elaborada (*mate*) variaron entre 371,2 y 2.438,8 ng/L. El BaP fue identificado en todas las muestras de mate en niveles que oscilaron entre 37,0 y 373,9 ng/L. En el caso de las infusiones frías (*tereré*), los niveles de PAH8 se ubicaron entre 19,2 y 937,3 ng/L y los de BaP entre 7,0 y 92,1 ng/L. Los niveles de PAH8 en las muestras de *mate cocido* oscilaron entre no cuantificable y 91,6 ng/L y los de BaP variaron entre no cuantificable y 23,2 ng/L.

En las Tablas 20, 21 y 22 también son presentados los porcentajes de transferencia de los HAPs desde el producto comercial (yerba mate elaborada o yerba mate envasada en saquitos, según corresponda) a las infusiones preparadas utilizando dichos productos. Los porcentajes de transferencia de los 8 HAPs estudiados fueron mayores en el caso del *mate*, con una media de 7,0 %, seguidos por los hallados en el *mate cocido* con un porcentaje medio de transferencia de 2,4 %, y los observados en el *tereré*, con un valor medio de 1,6 %.

Los contenidos de HAPs hallados en las infusiones frías y calientes preparadas con yerba mate fueron muy variables. La gran variabilidad observada se debe a los diferentes niveles de contaminación de la yerba mate elaborada utilizada en la preparación de las infusiones. Este hecho fue comprobado mediante la realización de un análisis de correlación entre el contenido de cada HAP estudiado en la yerba mate elaborada y el contenido de cada compuesto en las infusiones frías y calientes obtenidas utilizando el producto. Se verificó una correlación significativa ($p < 0,05$) con coeficientes de Pearson (r) superiores a 0,7727 en todos los casos.

Es fácil suponer que la presencia de HAPs, tanto en la yerba mate elaborada como en la yerba mate envasada en saquitos, no representa un riesgo para la salud, ya que estas sustancias poseen altos coeficientes de partición octanol-agua ($\log K_{ow}$) y bajas solubilidades en agua (Ma et al. 2010b), especialmente los HAPs de mayor peso molecular, como los incluidos en el presente estudio, por lo que se espera que su transferencia a las infusiones sea baja.

Lin et al. (2006) estudiaron los porcentajes de transferencia de ciertos HAPs hacia las infusiones preparadas con diferentes tipos de té. Ellos prepararon, utilizando el mismo método, infusiones de té negro, té verde y té oolong y encontraron diferentes tasas de transferencia de HAPs en las infusiones preparadas con las diferentes variedades de té. Este hecho indica que otros factores, más allá de las propiedades fisicoquímicas de los HAPs, están involucrados en el pasaje de estos

compuestos en la infusión. Lin et al. (2005), quienes también estudiaron el contenido de HAPs en infusiones preparadas con diferentes variedades de té, sugieren que la presencia de estos compuestos en las infusiones podría estar relacionada a la presencia de aceites esenciales, los que actúan como co-solventes para muchos tipos de sustancias lipofílicas, y por lo tanto aumentan la solubilidad de los HAPs en agua. Por otra parte, Hischenhuber y Stijve, (1987) y Tfouni et al. (2013) han sugerido que la cafeína presente en las infusiones preparadas con café (*Coffea spp.*), aumenta la solubilidad en agua de los HAPs a través de la formación de un complejo HAP-cafeína, facilitando su traslado a la infusión. Las infusiones preparadas con yerba mate no sólo contienen cantidades de cafeína comparables a las de las infusiones preparadas con café, si no que también son ricas en saponinas triterpénicas (Heck y Mejía, 2007; Burris et al., 2012), compuestos anfifílicos que podrían facilitar el pasaje de los HAPs a la bebida.

La solubilidad en agua de los HAPs, como la de muchos compuestos orgánicos hidrofóbicos, se incrementa con el aumento de la temperatura (Reza et al., 2002). Esto, explica las diferencias en el contenido de HAPs observadas entre las muestras de *mate* y *tereré* analizadas. A pesar de esto, el contenido de HAPs en las muestras de *mate cocido*, que fueron obtenidas utilizando agua a 100 °C, fue inferior a los contenidos de HAPs de las muestras de *mate* y *tereré*, las que se obtuvieron utilizando agua a menor temperatura (70 °C y 4 °C, respectivamente).

Además de la temperatura y el nivel de contaminación de la yerba mate utilizada en la preparación de la infusión, muchas otras variables influyen en la transferencia de los HAPs a la bebida. Lin et al. (2006) estudiaron el efecto de la relación sólido / agua (g / mL) en la transferencia de los HAPs durante la preparación de infusiones de té negro. Ellos demostraron que el porcentaje de transferencia de PAHs a la infusión aumenta con la disminución de la relación de sólido / agua, siendo este efecto más significativo para HAPs de bajo peso molecular. El tiempo de infusión también tiene una influencia directa en el grado de transferencia de HAP a las bebidas

(Lin et al., 2005; Lin et al., 2006; Kamangar et al., 2008). De acuerdo con Lin et al. (2005), la transferencia de HAPs desde las hojas de té hacia la bebida aumenta con el tiempo de infusión.

Durante la preparación del *mate* y el *teteré*, el tiempo de contacto entre la yerba mate y el agua fue de 20 segundos y la relación sólido /agua fue 50 g / 30 mL en cada cebada. En el caso del *mate cocido*, el tiempo de infusión fue superior (5min) y la relación sólido / agua inferior (3 g / 200 mL), por lo que se esperarían porcentajes de transferencia de los HAPs mayores en este último caso. Sin embargo, los porcentajes de transferencia observados en el *mate cocido* (2,4 %) fueron mucho menores que los hallados para el *mate* (7,0 %). Refiriéndonos específicamente al *mate* y al *tereré*, algunos autores sugieren que la presencia de HAPs en estas infusiones, puede ser justificada por el pasaje de polvo de yerba mate a la infusión, ya que la bombilla no dispone de un mecanismo de filtración apropiado (Camargo y Toledo, 2002). Los HAPs de peso molecular elevado, son generalmente insolubles en agua y poseen una gran afinidad para absorberse en la superficie de las partículas sólidas en suspensión (Dabestami e Ivanov, 1999; Bishnoi et al., 2006). Este hecho explicaría las diferencias observadas en los contenidos de HAPs del *mate* y el *tereré* y los niveles de HAPs del *mate cocido*. Si bien temperatura de infusión fue mayor en el caso del *mate cocido*, el papel tissue utilizado en la fabricación de los saquitos, pudo haber actuado como filtro, impidiendo el pasaje hacia la infusión de las partículas en suspensión que contienen a los HAPs.

Existen numerosos reportes sobre el contenido de HAPs en las infusiones preparadas con yerba mate (Camargo y Toledo, 2002; Zuin et al., 2005; Kamangar et al., 2008; Schulz et al., 2015). Sin embargo, los métodos de obtención de las infusiones utilizados en estas investigaciones no describen completamente la forma tradicional de preparación y consumo del *mate*, el *tereré* y el *mate cocido*. Los contenidos de HAPs en las infusiones preparadas con yerba mate reportados en la literatura varían ampliamente. Uno de los motivos de esta variación es la diferencia en los

procedimientos de infusión utilizados. Este hecho genera una restricción cuando se pretende discutir los resultados aquí obtenidos con los resultados publicados por otros autores. La Tabla 23 muestra una comparación entre los resultados obtenidos en el presente estudio, y los reportados en la literatura.

Contrariamente a lo observado en el presente trabajo, Kamangar et al. (2008) obtuvieron resultados similares en los contenidos de HAPs de las infusiones frías y calientes.

Es importante mencionar que, las condiciones de obtención de las muestras de mate analizadas en el presente estudio, se basaron estrictamente en lo establecido en la norma IRAM 20540-1 (1997). En la elaboración de esta norma participaron expertos catadores de la industria yerbatera y de organismos públicos, quienes estandarizaron las condiciones de obtención de la infusión para ser utilizada en la degustación de la yerba mate con fines comerciales. La misma sugiere la utilización de un recipiente de vidrio, 50 g de yerba mate, una bombilla lisa de acero inoxidable y agua de cebado a 70 °C, etc. Cabe destacar que estas son las condiciones utilizadas, por ejemplo, en la obtención de las muestras para la realización del rotulado nutricional del producto.

Teniendo en cuenta los diversos hábitos de consumo y prácticas de preparación de las infusiones preparadas con yerba mate, especialmente el mate y el tereré, ya que los recipientes utilizados, la cantidad de producto y la temperatura del agua de cebado varían acorde a los gustos de cada consumidor, se pone en evidencia la necesidad de estudios que permitan dilucidar por completo la influencia de la matriz y otros factores relacionados con los procedimientos de infusión (especialmente la temperatura del agua y la relación sólido/agua) en el mecanismo de migración de los HAPs de la yerba mate a las infusiones preparadas con el producto.

Tabla 23. Comparación del contenido de HAPs en infusiones preparadas con yerba mate reportados en la literatura

Estudio	Tipo de infusión	Cantidad de yerba mate	Volumen de agua	Temperatura del agua	Tiempo de infusión	BaP (ng/L)	PAH8 (ng/L)
Este estudio	Mate (n=10)	50 g	~500 mL	70 °C	Véase la sección V.2.4.2	37.0 - 373.9	371,2 – 2.438,8
	Tereré (n=10)	50 g	~500 mL	4 °C		7.0 - 92.1	19,2 – 937,3
	Mate cocido (n=5)	~3 g	200 mL	100 °C		< 4,0 - 23,2	<4,0 - 91,3
Kamangar <i>et al.</i> (2008)	Calientes (n=2)	5 g	360 mL	80 °C	12 procedimientos de infusión de 5 min de duración cada uno.	331,9 – 348,6	2.296,7 – 2.401,5 ^a
	Frías (n=2)	5 g	360 mL	5 °C		373,6 – 390,3	2.218,9 – 2.820,8 ^a
Camargo & Toledo (2002) (n=9)		25 g	500 mL	100 °C	5 min	3,5	19,5 ^b
Zuin <i>et al.</i> (2005) (n=11)		1 g	100 mL	100 °C	5 min	ND – 22,6	7,2 – 184,5
Schulz <i>et al.</i> (2015) (n=1)		20 g	2.000 mL	100 °C	30 min	< 5,0	< 5,0

^a PAH8 + Triphenylene + Benzo(j)fluoranthene

^b Excepto IcP

V.3.4. Análisis de la contaminación de las infusiones preparadas con yerba mate respecto a los estándares internacionales para el agua potable

Debido a que las infusiones se consumen en mayor cantidad que otros productos alimenticios, es apropiado analizar los niveles de HAPs hallados en las diferentes formas de consumo de la yerba mate, en base los límites máximos establecidos para estos compuestos en el agua potable.

Diversos organismos internacionales sugieren el monitoreo del contenido de BaP en agua de bebida. La WHO establece un límite máximo de BaP de 700 ng/L (WHO, 2011) y la USEPA establece un contenido máximo de BaP de 200 ng/L (USEPA, 2009). Teniendo en cuenta estos parámetros, podemos afirmar que las muestras de *mate*, *tereré* y *mate cocido* estudiadas no superaron el límite máximo establecido por la WHO para el agua potable, y que sólo dos de las muestras de *mate* (marcas 4 y 10) no lograron adecuarse a lo establecido por la USEPA. Sin embargo, la mayoría de las muestras analizadas, presentaron niveles de HAPs que superan los límites máximos establecidos para el agua potable por otros organismos de control. Este hecho se puede confirmar teniendo en cuenta los criterios de adecuación de la Unión Europea, que establece un nivel máximo para BaP de 10 ng/L, y de 100 ng/L para la suma de BbF, BkF, BPe e IcP (PAH4w) (EU, 1998), y lo expuesto en el Capítulo XII, artículos 982 y 983 del Código Alimentario Argentino (2007) que también fija un límite máximo para BaP en agua potable y en agua de bebida de 10 ng/L. La totalidad de las muestras de *mate* superaron estos estándares y sólo una muestra de *tereré* (marca 3) logró ajustarse a lo establecido por estos organismos. Con respecto a la adecuación de las muestras de *mate cocido*, tres de las muestras (marcas 1, 4 y 5) cumplieron con lo establecido en estas normativas, presentando valores de BaP inferiores a 10 ng/L y niveles de PAH4w inferiores a 100 ng/L.

El objetivo principal de los organismos mencionados anteriormente (WHO, USEPA y UE) es la protección de la salud humana. Para ello, establecen los valores

máximos admisibles que garanticen, en este caso, la calidad del agua destinada al consumo humano. Un valor de referencia (valor máximo admisible) representa la concentración de un componente que no ocasiona ningún riesgo significativo para la salud cuando se consume durante toda una vida (WHO, 2011). Como puede observarse, existe una gran diferencia en los límites fijados por los diferentes organismos. En muchos casos, los límites máximos son presentados sin hacer referencia a la justificación científica y toxicológica de la selección de los mismos.

En sus Guías para la Calidad del agua potable, la WHO, proporciona una base científica basada en los datos toxicológicos aportados por la Agencia Internacional de Investigación sobre el Cáncer. Asimismo, establece las condiciones en base a las cuales se realizan los cálculos de los valores de referencia establecidos, por ejemplo, se considera un consumo diario de agua de 2 L. Los valores de referencia establecidos representan “la concentración en el agua de consumo asociada a un valor máximo del riesgo adicional vitalicio de cáncer de 10^{-5} (un caso adicional de cáncer por cada 100.000 personas que ingieren agua de consumo con una concentración de la sustancia igual al valor de referencia durante 70 años)” (WHO, 2010). Cabe destacar que, el riesgo adicional vitalicio no equivale al número de casos que ocasionará la exposición a esta concentración de BaP en las condiciones establecidas, sino que se trata del riesgo potencial máximo. Teniendo en cuenta que los cálculos se realizan utilizando modelos matemáticos conservadores, es decir, que se inclinan hacia la cautela, podemos afirmar que los contenidos de BaP hallados en las infusiones preparadas con yerba mate no representan un riesgo para la salud humana.

V.4. Conclusiones

Se estudió el contenido de 8 hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) en muestras de yerba mate elaborada y yerba mate en saquitos de origen argentino, como en las infusiones tradicionalmente preparadas utilizando estos productos (*mate*, *tereré* y *mate cocido*). Los compuestos estudiados fueron benzo[a] antraceno, criseno, benzo[b] fluoranteno, benzo [k]fluoranteno, benzo [a] pireno, dibenzo[a,h] antraceno, benzo[g,h,i] perileno, indeno [1,2,3-c,d] pireno, denominados en conjunto PAH8, y considerados marcadores de presencia y toxicidad por HAPs en los alimentos.

Se observó que el contenido de HAPs de la yerba mate elaborada y la yerba mate envasada en saquitos superó los límites máximos establecidos para estos compuestos en diversos alimentos en el Reglamento 835/2011 de la Comunidad Europea, la regulación más amplia en la materia.

Con respecto al contenido de HAPs en las diferentes formas de consumo de la yerba mate, este es el primer estudio que se realiza en el tema, teniendo en cuenta que tanto las infusiones frías como calientes analizadas fueron obtenidas simulando la forma real de preparación y consumo de las mismas. Los ocho HAPs estudiados fueron identificados y cuantificados en la mayoría de las muestras. A pesar de esto, ninguna de las infusiones estudiadas (*mate*, *tereré* y *mate cocido*) superó el nivel máximo sugerido por la Organización Mundial de la Salud para el contenido de benzo [a] pireno, el único HAP considerado carcinógeno para el hombre, en el agua potable (700 ng / L).

CONCLUSIONES GENERALES

Se desarrolló y validó satisfactoriamente un método analítico de cromatografía líquida de alta performance para la identificación y cuantificación de 8 de hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) en yerba mate y en las infusiones preparadas con yerba mate. Los ocho HAPs incluidos en el presente estudio fueron: benzo[a] antraceno (BaA), criseno (Chry), benzo[b] fluoranteno (BbF), benzo[k] fluoranteno (BkF), benzo[a] pireno (BaP), dibenzo[a,h] antraceno (DaA), benzo[g,h,i] perileno (BPe) e indeno[c,d-1,2,3] pireno (IcP). Estos 8 compuestos son considerados los mejores indicadores de presencia y toxicidad por HAPs en los alimentos.

Se determinó el contenido de los 8 HAPs en muestras de yerba mate a lo largo del procesamiento primario del producto. Los resultados obtenidos demostraron que el contenido de HAPs fue incrementándose con el avance en el proceso de manufactura en los establecimientos industriales que utilizan métodos de secado directo, hallándose altos niveles de contaminación en la yerba mate al final del proceso.

Asimismo, se analizaron muestras de yerba mate obtenidas utilizando métodos alternativos de manufactura (yerba mate zapecada utilizando agua caliente, vapor de agua y ondas de alta frecuencia y secada con aire caliente). La mayoría de los HAPs estudiados no fueron detectados en estas muestras y los que fueron identificados no pudieron ser cuantificados ya que se encontraban a niveles inferiores a los límites de cuantificación del método analítico.

Estos resultados pusieron en maniesto que el contacto de las ramas de *I. paraguariensis* con los gases de combustión provenientes del quemado de leña, virutas, aserrín y /o chips de madera agregan HAPs al producto, siendo este hecho el causante de la contaminación de la yerba mate.

Se analizaron muestras comerciales de yerba mate elaborada y yerba mate envasada en saquitos hallándose niveles de contaminación con HAPs muy variables. En la mayoría de los casos el contenido de HAPs de las muestras comerciales superó los

niveles máximos admisibles para diversos alimentos establecidos en la normativa internacional vigente (Reglamento 835/2011 de la Comunidad Europea).

Se estudió el contenido de HAPs en las formas de consumo tradicionales de la yerba mate: *mate*, *tereré* y *mate cocido*. Las muestras de estas infusiones fueron obtenidas utilizando las técnicas habituales de preparación y consumo de las mismas. Los 8 HAPs estudiados pudieron ser cuantificados en la mayoría de las muestras analizadas. A pesar de esto, el contenido de BaP, el HAP más dañino, no superó el nivel máximo sugerido por la Organización Mundial de la Salud para agua potable (700 ng/L) en ninguna de las infusiones estudiadas.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alomirah, H., Al-Zenki, S., Al-Hooti, S., Zaghloul, S., Sawaya, W., Ahmedb, N. y Kannan, K. (2011). Concentrations and dietary exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) from grilled and smoked foods. *Food Control*, 22, 2028-2035.
- ATS-DR- Agency of Toxic Substances and Disease Register (1995). *Reseña Toxicológica de los Hidrocarburos Aromáticos policíclicos (HAP)*. Departamento de Salud y Servicios Humanos de los Estados Unidos, Servicio de Salud Pública. Disponible en: http://www.atsdr.cdc.gov/es/phs/es_phs69.pdf. Acceso el: 14/09/2012.
- Badolato E. S. G., Martins, M. S., Aued-Pimentel, S., Alaburda, J., Kumagai, E. E., Baptista, G. y Rosenthal, A. (2006). Systematic study of benzo[a]pyrene in coffee samples. *Journal of Brazilian Chemistry Society*, 17, pp. 989-93.
- Barrionuevo, M. E. (2007). Desarrollo de un sistema a escala piloto para zapeado con vapor. PRASY-INYM N° 009/07.
- Barros, S. S. de, Sörensen Ghisolfi, E., Perondi Luz, L., Guinsburg Barlem, G., Machado Vidal, R., Herz Wolff, F., Magno, V. A., Breyer, H. P., Dietz, J., Grüber, A. C., Krueel, C. D. P. y Prolla, J. C. (2000). Mate (chimarrão) é consumido em alta temperatura por população sob risco para o carcinoma epidermóide de esôfago. *Arq gastroenterol.*, 37, 25–30.
- Basal, V. y Kim, H-K. (2015). Review of PAH contamination in food products and their health hazards. *Environment International*, 84, 26–38.
- Bastos, D. H. M., de Oliveira, D. M., Matsumoto, R. L. T., Carvalho, P. de O. y Ribeiro, M L. (2007). *Yerba Mate: Pharmacological Properties, Research and Biotechnology*. *Medicinal and Aromatic Plant Science and Biotechnology*, 1, 37-46.

- Bishnoi, N. R., Mehta, U. y Pandit, G. G. (2006). Quantification of polycyclic aromatic hydrocarbons in fruits and vegetables using high performance liquid chromatography. *Indian J Chem Techn*, 13, 30-35.
- Boström, C. E., Gerde, P., Hanberg, A., Jernström, B., Johansson, C., Kyrklund, T., Rannug, A., Törnqvist, M., Victorin, K. y Westerholm, R. (2002). Cancer risk assessment, indicators, and guidelines for polycyclic aromatic hydrocarbons in the ambient air. *Environ Health Persp*, 110 (3), 451–488.
- Burris, K.P., Harte, F. M., Davidson, P. M., Stewart Jr., C. N. y Zivanovic, S. (2012). Composition and bioactive properties of yerba mate (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil.): A Review. *Chilean Journal of Agricultural Research*, 72 (2), 268-274.
- CAA- Código Alimentario Argentino (2007). Capítulo XII: Bebidas hídricas, agua y agua gasificada. Artículos 982 y 983. Disponible en: http://www.anmat.gov.ar/alimentos/codigoa/Capitulo_XII.pdf. Acceso el: 08-09-2015.
- Camargo, L. S. y Toledo, M. C. F. (2002). Chá mate e café como fontes de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) na dieta da população de Campinas. *Ciênc Tecnol Alimen*, 22, 49-53.
- Camargo, M. C. R. y Toledo, M. C. F. (2003). Polycyclic aromatic hydrocarbons in Brazilian vegetables and fruits. *Food Control*, 14, 49-53.
- Camargo, M. C. R., Antonioli, P. R. y Vicente, E. (2011). HPLC-FLD simultaneous determination of 13 polycyclic aromatic hydrocarbons: Validation of an analytical procedure for soybean oils. *Journal of Brazilian Chemistry Society* 7 (22), 1354-1361.
- Camargo, M. C. R., Antonioli, P. R. y Vicente, E. (2012). Evaluation of polycyclic aromatic hydrocarbons content in different stages of soybean oils processing. *Food Chem*, 135, 937-942.

- Camargo, M. S. F. O. y Toledo, M. C. F. (1998). Efeito do processamento na contaminação de óleo refinado de milho por benzo(a)pireno. *Braz J Food Tech*, 1, 97-106.
- Camargo, M., Tfouni, S., Vitorino, S., Menegario, T. y Toledo, M. C. (2006). Determinação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) em guaraná em pó (*Paullinia cupana*). *Ciênc Tecnol Alimen*, 26, 230-233.
- Castelletto, R., Castellsague, X., Muñoz, N., Iscovich, J., Chopita, N. y Jmelnitsky, A. (1994). Alcohol, tobacco, diet, mate drinking, and esophageal cancer in Argentina. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.*, 3, 7, 557-564.
- CE - Comunidad Europea. (2011). Reglamento (UE) No 836/2011 DE LA COMISIÓN de 19 de Agosto de 2011. *Diario Oficial de la Unión Europea*, L 215, 9-16.
- Chen, B. H. (1997). Analysis, Formation and Inhibition of polycyclic aromatic Hydrocarbons in Food: an overview. *Journal of Food and Drug Analysis*, 5 (1), 25-42.
- Chen, Y. C. y Chen, B. H. (2001). Stability of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons during Heating. *J Food Drug Anal*, 9 (1), 33-39.
- Chung, S. Y., Yettella, R. R., Kim, J. S., Kwon, K., Kim, M. C. y Min, D. B. (2011). Effects of grilling and roasting on the levels of polycyclic aromatic hydrocarbons in beef and pork. *Food Chem*, 129, 1420-1426.
- Ciecierska, M. y Obiedzinski, M. W. (2013). Polycyclic aromatic hydrocarbons in vegetable oils from unconventional sources. *Food Control*, 30, 556-562.
- Dabestani, R. e Ivanov, I. N. (1999). A Compilation of Physical, Spectroscopic and Photophysical Properties of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. *Photochem and Photobiol*, 70 (1), 10-34.
- Dąbrowska, D., Kot-Wasik, A. y Namieśnik, S. (2008). Stability Studies of Selected Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Different Organic Solvents and

Identification of Their Transformation Products. Polish J. of Environ. Stud., 17, 1, 17-24.

De Bernardi, L.A. y Prat Krikun, S.D. - Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentos. Dirección Nacional de Alimentación. Ministerio de Economía y Producción (2001). Cadena alimentaria de la yerba mate. Diagnóstico de la región yerbatera. Disponible en: [www.sagpya.mecon.gov.ar /0-3/inFusion/diagnostico/diagnosto_YM.htm](http://www.sagpya.mecon.gov.ar/0-3/inFusion/diagnostico/diagnosto_YM.htm), 2001. Acceso el: 25/07/2012.

De Stefani, E., Muñoz, N., Estève, J., Vasallo, A., Victora, C. G. y Teuchmann, S. (1990). Mate drinking, alcohol, tobacco, diet, and esophageal cancer in Uruguay. Cancer Res, 50, 426-431.

DIONEX (1994). Application Note 95: Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Determination by Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography. Dionex Corporation.

Drabova, L., Pulkrabova, J., Kalachova, K., Tomaniova, M., Kocourek, V., y Hajslova, J. (2012). Rapid determination of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in tea using two-dimensional gas chromatography coupled with time of flight mass spectrometry. Talanta, 100, 207-216.

Duedahl-Olesen, L., Navaratnam, M. A., Jewula, J. y Jensen, A. H. (2015). PAH in some Brands of Tea and Coffee. Polycycl Aromat Comp, 35 (1), 74-90.

Dugay, A., Herrenknecht, C., Czok, M., Guyon, F. y Pages, N. (2002). New procedure for selective extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons in plants for gas chromatographic-mass spectrometric analysis. J Chromatogr A, 958, 1-7.

EC - European Commission (2011). Commission Regulation (EU) No 835/2011 of 19 August 2011 amending Regulation (EC) No 1881/2006 as regards maximum levels for polycyclic aromatic hydrocarbons in foodstuffs. Off J Eur Comm. L215/5.

- EC- European Commission (2002). Opinion of the Scientific Committee on Food on the risks to human health of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons on Food. Document-SCF/CS/CNTM/PAH/29 ADD1 Final. Disponible en: http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scf/out153_en.pdf. Acceso el: 14/09/2012.
- EFSA- European Food Safety Authority (2008). Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Food. Scientific Opinion of the Panel on Contaminants in the Food Chain. EFSA J. 724, 1-114. Disponible en: <http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/doc/724.pdf>. Acceso el 30/05/2011.
- Escarrone, A.L.V., Caldas, S.S., Furlong, E.B., Meneghetti, V. L., Fagunde, C.A.A., Arias, J.L.O. y Primel, E. G. (2014). Polycyclic aromatic hydrocarbons in rice grain dried by different processes: Evaluation of a quick, easy, cheap, effective, rugged and safe extraction method. *Food Chem*, 146, 597–602.
- Esmerilindo, M. C., Toniazzo, G., Waczuk, A., Dariva, C. y de Oliveira, D. (2002). Caracterização físico-química da Erva-Mate: Influência das etapas do processamento industrial. *Ciênc. Tecnol. Aliment*, 22 (2), 193-204.
- Esteve, W., Budzinsky, H. y Villenave, E. (2004). Relative rate constants for the heterogeneous reactions of OH, NO₂ and NO radicals with polycyclic aromatic hydrocarbons adsorbed on carbonaceous particles. Part 1: PAHs adsorbed on 1–2 µm calibrated graphite particles. *Atmos Environ*, 38, 6063-6072.
- EU - European Union (1998). Council Directive 98/83/EC of 3 November 1998 on the quality of water intended for human consumption. *Off J Eur Comm*. L330/32.
- EURACHEM (2014). *Eurachem Guide: The Fitness for Purpose of Analytical Methods: A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics*. Segunda edición.

- Fazio, T. y Howard, J.W. (1983). Polycyclic aromatic hydrocarbons in foods. En: Bjorseth, A. (ed). Handbook of polycyclic aromatic hydrocarbons. Marcel Dekker, New York, 461–505.
- Filip, R., Lotito, S.B., Ferraro, G. y Fraga, G. C. (2000). Antioxidant activity of *Ilex paraguariensis* and related species. *Nutr Res*, 20 (10), 1437-1446.
- Fu, J. y Suuberg, E. M. (2011). Solid vapor pressure for five heavy PAHs via the Knudsen effusion method. *J. Chem. Thermodyn.*, 43 (11), 1660-1665.
- Galeano, C. E. (2010). Estudio de la degradación de la clorofila de yerba mate (*Ilex paraguariensis*) en procesos de sapecado en agua. Tesis de la Maestría en Tecnología de los Alimentos - Universidad Nacional de Misiones.
- Galeano, C. E., Barrionuevo, M. R. E.y Argüello, B. (2006). Métodos alternativos de procesamiento para sapecar hojas de yerba mate tendientes a mantener el color y las clorofilas. Actas del Congreso 4to Congreso Sudamericano de la Yerba Mate- 4ta Reunión Técnica de la Yerba Mate - 2da Exposición de Agronegocios de la Yerba Mate. Posadas, Argentina, 5-8/11/2006, 355-360.
- García Londoño, V. A., Reynoso, C. M. y Resnik, S. L. (2015). Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) survey on tea (*Camellia sinensis*) commercialized in Argentina. *Food Control* 50, 31-37.
- García Londoño, V. A., Reynoso, M. y Resnik, S. (2014). Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in yerba mate (*Ilex paraguariensis*) from the Argentinean market. *Food Addit Contam: Part B*. 7 (4), 1-7.
- García-Falcón, M. S., Cancho-Grande, B. y Simal-Gándara, J. (2005). Minimal clean-up and rapid determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in instant coffee. *Food Chem*, 90, 643-647.

- Goldfarb, J. L. y Suuberg, E. M. (2008). Vapor Pressures and Enthalpies of Sublimation of Ten Polycyclic Aromatic Hydrocarbons Determined via the Knudsen Effusion Method. *J. Chem. Eng. Data*, 53, 670–676.
- Golozar, A., Fagundes, R. B., Etemadi, A., Schantz, M. M., Kamangar F., Abnet, C. C. y Dawsey, S. M. (2012). Significant variation in the concentration of carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons in yerba maté samples by brand, batch and processing method. *Environ Sci Technol* 46, 13488-13493.
- Hartwig, V.G., Brumovsky, L. A. y Fretes, R. M. (2012). A total polyphenols content of Mate (*Ilex paraguariensis*) and other Plants-derived beverages. *Journal of Food Research* 1 (3), 58-67.
- Heck, C.I. y Mejía, E.G. (2007). Yerba Mate Tea (*Ilex paraguariensis*): A Comprehensive Review on Chemistry, Health Implications, and Technological Considerations. *J Food Sci.* 72 (9), R138-R151.
- Hischenhuber, C. y Stijve, T. (1987). Determination of benzo(a)pyrene in roasted coffee and coffee brews by HPLC with fluorescence detection. *Zeitschrift fur Lebensmittelkunde und Lebensmittelrecht*, 83, 1-4.
- Holowaty, S. A., Trela, V., Thea, A. E., Scipioni, G. P. y Schmalko, M. E. (2015). Yerba maté (*Ilex paraguariensis* St. Hil.): Chemical and physical changes under different aging conditions. *J Food Process Eng*, DOI: 10.1111/jfpe.12195.
- IARC- International Agency for Research on Cancer (1991). Coffee, Tea, Mate, Methylxanthines and Methylglyoxal. *Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans* 51, 273-287.
- IARC- International Agency for Research on Cancer (2010). Some Non-heterocyclic Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and Some Related Exposures. *Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans* 92, 1-853.

- ICH- International Conference on Harmonisation (2005). International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, Topic Q2 (R1): Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology. www.ich.org
- INYM- Instituto Nacional de la Yerba Mate (2015). Informe del Sector Yerbatero – Agosto de 2015. Disponible en www.inym.org.ar. Acceso el: 11-09-2015.
- IRAM - Instituto Argentino de Racionalización de Materiales (1997). Norma 20540-1: Yerba Mate: Materiales y procedimientos a utilizar en la determinación de los caracteres organolépticos de la yerba mate, bajo forma de mate.
- IRAM Instituto Argentino de Racionalización de Materiales (1995). Norma 20503: Yerba Mate- Determinación de la pérdida de masa a 103°C.
- IRAM Instituto Argentino de Racionalización de Materiales (2012). Norma 20515: Yerba Mate - Vocabulario
- IRIS- Integrated Risk Information System (2013). A-Z List of substances. Disponible en: http://cfpub.epa.gov/ncea/iris/index.cfm?fuseaction=iris.showSubstanceList&list_type=alpha&view=B#content. Acceso el: 05/02/2013.
- Ishizaki, A., Saito, K., Hanioka, N., Narimatsu, S. y Kataoka, H. (2010). Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in food samples by automated on-line-in-tube-solid-phase micro extraction coupled with high-performance liquid chromatography-fluorescence detection. *J Chromatogr A*, 1217, 5555-5563.
- JECFA- Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (2005). Summary and conclusions of the sixty-fourth meeting, Roma. Disponible en: http://www.who.int/foodsafety/chem/jecfa/summaries/summary_report_64_final.pdf. Acceso en: 18/08/2011.
- Jekins, B. M., Baxter, L. L., Miles Jr., T. L. y Miles, T. R. (1998). Combustion properties of biomass. *Fuel Process Technol*, 54, 17–46.

- Juhasz, A. L. y Naidu, R. (2000). Bioremediation of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons: a review of the microbial degradation of benzo[a]pyrene. *Int Biodeter Biodegr*, 45, 57-88.
- Kamangar, F., Schantz, M., Abnet, C., Fagundes, R. y Dawsey, S. (2008). High levels of carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons in mate drinks. *Cancer Epid Biomar*. 17 (5), 1262-1268.
- Kamankesh, M., Mohammadia, A., Hosseinia, H. y Modarres Tehranib, Z. (2015). Rapid determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in grilled meat using microwave-assisted extraction and dispersive liquid-liquid microextraction coupled to gas chromatography-mass spectrometry. *Meat Sci*, 103, 61-67.
- Kameda, T. (2011). Atmospheric Chemistry of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and Related Compounds. *J Health Sci*, 57 (6), 504-511.
- Kayali-Sayadi, M. N., Rubio-Barroso, S., Cuesta-Jimenez, M.P. y Polo-Díez, L. M. (1998). Rapid determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in tea infusion samples by high performance liquid chromatography and fluorometric detection based on solid phase extraction. *The Analyst*, 123, 2145-2148.
- Keyte, I. J., Harrison, R. M. y Lammel, G. (2013). Chemical reactivity and long-range transport potential of polycyclic aromatic hydrocarbons – a review. *Chem Soc Rev*, 42, 9333–9391.
- Kotik, B.E. (1994). 2° Curso de capacitación en Producción de Yerba Mate. Molinería de la Yerba Mate. INTA-Estación Agropecuaria Cerro Azul, 109-112.
- Lage-Yusty, M.A., Alvarez-Pérez, S. y Punín-Crespo, M.O. (2009). Supercritical fluid extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons from seaweed samples before and after the prestige oil spill. *Bull Environ Contam Toxicol*, 82 (2), 158-161.

- Larsson, B. (1986). Polycyclic aromatic hydrocarbons in Swedish foods—aspects on analysis, occurrence and intake. Tesis de Doctorado. Swedish University of Agricultural Sciences.
- Laube, N. H. (2008). Hornos Rotativos Continuo de Alta Frecuencia para zapecado y secado de yerba mate. PRASY-INYM Nº 023/08.
- Lee, K. y Shin, H-S. (2010). Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in commercial roasted coffee beans. *Food Science and Biotechnology*, 19 (6), 1435-1440.
- Lee, M.L., Novotny, M.V. y Bartle, K.D. (Eds.) (1981). *Analytical Chemistry of Polycyclic Aromatic Compounds*, Academic Press, New York. Capítulo 2, 21-25.
- Li, X.-Y., Li, N., Luo, H.-D., Lin, L.-R., Zou, Z.-X., Jia, Y.-Z. y Li, Y.-Q. (2011) A novel synchronous fluorescence spectroscopic approach for the rapid determination of three polycyclic aromatic hydrocarbons in tea with simple microwave-assisted pretreatment of sample. *J Agric Food Chem*, 11, 5899–5905.
- Lin D., Tu, Y. y Zhu, L. (2005). Concentrations and health risk of polycyclic aromatic hydrocarbons in tea. *Food Chem Toxicol*, 43, 41-48.
- Lin, D. y Zhu, L. (2004). Polycyclic Aromatic Hydrocarbons: Pollution and source. Analysis of black tea. *J Agr Food Chem*, 52, 8268-8271.
- Lin, D. y Zhu, L. (2006). Factors affecting transfer of polycyclic aromatic hydrocarbons from made tea to tea infusion. *J Agr Food Chem*, 54, 4350-4354.
- Loria, D., Barrios, E. y Zanetti, R. (2009). Cancer and yerba mate consumption: a review of possible associations. *Rev Panam Salud Pública*, 5 (6), 530–539.
- Lubin, J.H., De Stefani, E., Abnet, C.C., Acosta, G., Boffetta, P., Victora, C., Graubard, B.I., Muñoz, N., Deneo-Pellegrini, H., Franceschi, S., Castellsague, X., Ronco, A.L. y Dawsey, S.M. (2014). Maté drinking and esophageal squamous cell carcinoma

- in South America: pooled results from two large multicenter case-control studies. *Cancer Epidemiol Biomarkers*, 23 (1), 107-116.
- Lund, M., Duedahl-Olesen, L. y Christensen, J. H. (2009). Extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons from smoked fish using pressurized liquid extraction with integrated fat removal. *Talanta*, 79 (1), 10-15.
- Luque de Castro, M. D. y Priego Capote, F. (2007). Ultrasound assistance to liquid-liquid extraction: A debatable analytical tool. *Anal Chim Acta*, 583(1), 2-9.
- Lysiak, E. (2009). Mercado mundial de la yerba mate. INTA, EEA Cerro Azul, Misiones. (Boletín técnico N° 11).
- Ma, J., Liu, I. y He, H. (2010a). Degradation kinetics of anthracene by ozone on mineral oxides. *Atmos Environ*, 44, 4446-4453.
- Ma, Y. G., Lei, Y. D., Xiao, H., Wania, F. y Wang, W. H. (2010b). Critical Review and Recommended Values for the Physical-Chemical Property Data of 15 Polycyclic Aromatic Hydrocarbons at 25 °C. *J. Chem. Eng. Data*, 55, 818-825.
- Machado, L.S.; Bernasiuk, C.; Schenkel, E.; Noll, I.B. y Toledo, M.C.F. (1997). Determinação de hidrocarbonetos poliaromáticos em erva-mate. Libro de Actas del II Simpósio Latino Americano de Ciência de Alimentos: progresso e Ação para o Ano 2000. Campinas, SP, Brasil. 11-14 de Noviembre de 1997.
- Mackay D., Shiu W.Y. y Ma K.C. (1992). Illustrated handbook of physical-chemical properties and environmental fate for organic chemicals: Polynuclear aromatic hydrocarbons, polychlorinated dioxins and dibenzofurans. Lewis Publishers, Chelsea, Michigan, USA
- Mastandrea C., Chichizola C., Ludueña B., Sánchez H., Álvarez H. y Gutiérrez A. (2005). Hidrocarburos aromáticos policíclicos. Riesgos para la salud y marcadores biológicos. *Acta bioquím. Clín. Latinoam*, 39 (1), 27-36.

- Moorthy, B., Chun, C. y Carlin, D. J. (2015). Polycyclic Aromatic Hydrocarbons: From Metabolism to Lung Cancer. *Toxicol Sci*, 145 (1), 5-15.
- Moret, S. y Conte, L. S. (2000). Polycyclic aromatic hydrocarbons in edible fats and oils: occurrence and analytical methods. *J. Chromatogr. A*, 882, 245–253.
- Muñoz, N., Victora, C.G., Crespi, M., Saul, C., Braga, N.M. y Correa, P. (1987). Hot maté drinking and precancerous lesions of the esophagus: an endoscopic survey in southern Brazil. *Int J Cancer.*, 39, 708–709.
- Murray, J. J., Pottie, R. F. y Pupp, C. (1974). The Vapor Pressures and Enthalpies of Sublimation of Five Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. *Can. J. Chem.*, 52, 557–563.
- Nabechima, G. H., Provesi, J. G., Frescura, J de O., Mantelli, M. B. H., Vieira, M. A., Prudêncio, E. S. y Amante, E. R. (2014). Thermal inactivation of peroxidase and polyphenoloxidase enzymes in mate leaves (*Ilex paraguariensis*) in a conveyor belt oven. *CyTA - Journal of Food*, 12 (4), 399-406.
- Nieva-Cano, M.J., Rubio-Barroso, S. y Santos-Delgado, M. J. (2001). Determination of PAH in food samples by HPLC with fluorometric detection following sonication extraction without sample clean-up. *The Analyst*, 126, 1326-1331.
- Núñez, J.C. y Känzig, R.G. (1995). Secanza de la Yerba Mate. *Erva-Mate: Biología e Cultura no Cone Sul*, Editora da Universidade- Universidad Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, Brasil, 175-180.
- Obernberger, I. y Thek, G. (2004). Physical characterization and chemical composition of dandified biomass fuels with regard to their combustion behaviour. *Biomass and Bioenergy*, 27 (6), 653-669.
- Oliveira, Y. M. M. de y Rotta, E. (1985). Area de distribuição natural da erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.). En: *Anais X Seminario sobre Atualidades e*

Perspectivas Florestais - Silvicultura da erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.), 1983, Curitiba, Brasil. EMBRAPA-CNPQ, 15, 17-36.

Oluseyi, T., Olayinka, K., Alo, B. y Smith, R. M. (2011). Comparison of extraction and clean-up techniques for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in contaminated soil samples. *African Journal of Environmental Science and Technology*, 5 (7), 482-493.

Orecchio, S., Paradiso Ciotti, V. y Culotta, L. (2009). Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in coffee brew samples: Analytical method by GC–MS, profile, levels and sources. *Food Chem Toxicol*, 47, 819-826.

Ozcan, S., Tor, A. y Aydin, M. E. (2012). Ultrasound application in analyses of organic pollutants in environment. En: Chen, D., Sharma, S. K., Mudhoo, A. *Handbook on Applications of Ultrasound: Sonochemistry for Sustainability*. CRC Press. 345-368.

Pakpahan, E. N., Isa, M. H., Kutty, S. R. M. y Malakahmad, A. (2009). Effect of temperature on the formation and degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *International Conference on Emerging Technologies in Environmental Science and Engineering*, 26-27 de Octubre, Aligarh, India.

Pandey, M. K., Mishra, K. K., Khanna, S. K. y Das, M. (2004). Detection of polycyclic aromatic hydrocarbons in commonly consumed edible oils and their likely intake in the Indian population. *J Am Oil Chem Soc*, 81 (12), 1131-1136.

Parra, P. (2013). Overview of Yerba Mate (*Ilex paraguariensis*) chain in Argentina. Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca de la Nación. Disponible en: http://64.76.123.202/site/economias_regionales/producciones_regionales/01_origen_vegetal/05_infusiones/_informes/yerba_mate_chain_argentina_July_2013.pdf. Acceso el: 13/08/2013.

- Pasardi, L. R., Schvezov, C. E., Schmalko, M. E. y González, A. D. (2006). Drying of *Ilex paraguariensis* Saint Hilaire by Microwave Radiation. *Dry Technol* 24, 1437-1442.
- Peña, A., Morales, J., Labastida, C. y Capella, S. (2003). Extracción en fase sólida como una alternativa para el procedimiento de limpieza en la determinación de hidrocarburos aromáticos policíclicos por cromatografía de gases: aplicación a organismos marinos. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 19 (1), 13-23.
- Peralta, J. M. y Schmalko, M. E. (2007). Modeling heat and mass transfer in the heat treatment step of yerba maté processing. *Braz J Chem Eng* 24 (1), 73-82.
- Pereira C.P., Toledo M.C.F. y Noll I.B. (1999). B(a)P in mate (*Ilex paraguariensis* St. Hill) processed by liquefied petroleum gas. IFT Annual Meeting; Institute of Food Technologists; Chicago; Estados Unidos.
- Perraudin, E., Budzinsky, H. y Villenave, E. (2005). Kinetic study of the reactions of NO₂ with polycyclic aromatic hydrocarbons adsorbed on silica particles. *Atmos Environ*, 39, 6557-6567.
- Pissinatti, R., Nunes, C. M., Souza, A. G., Junqueira, R. G. y Souza, S. V. C. (2015). Simultaneous analysis of 10 polycyclic aromatic hydrocarbons in roasted coffee by isotope dilution gas chromatography-mass spectrometry: Optimization, in-house method validation and application to an exploratory study. *Food Control*, 51, 141-148.
- Plaza Bolaños, P., Garrido Frenich, A. y Martínez Vidal, J. L. (2010). Polycyclic aromatic hydrocarbons in food and beverages. *Analytical methods and trends. J Chromatogr A*, 1217, 6303-6326.
- Prat Krikun, S.D. (1995). 2° Curso de Capacitación en Producción de Yerba Mate. La Transformación Primaria. INTA-Estación Agropecuaria Cerro Azul, 99-107.

- Pupin, A. M. y Toledo, M. C. F. (1996). Benzo(a)pyrene in olive oils on the Brazilian market. *Food Chem*, 55 (2), 185-188.
- Purcaro, G., Moret, S. y Conte, L. S. (2013). Overview on polycyclic aromatic hydrocarbons: Occurrence, legislation and innovative determination in foods. *Talanta*, 105, 292-305.
- Ramallo, L.A., Smorczewski, M., Valdez, E.C., Paredes, A.M. y Schmalko, M.E. (1998). Contenido Nutricional del Extracto Acuoso de la Yerba Mate en Tres Formas Diferentes de Consumo. *La Alimentación Latinoamericana*, 225, 48-52.
- Ramdahl, T. (1985). PAH emissions from combustion of biomass. En: Bjorseth, A. (ed). *Handbook of polycyclic aromatic hydrocarbons*. Marcel Dekker, New York, 61-83.
- Ramesh, A., Walker, S.A., Hood, D. B., Guillén, M. D., Schneider, K. y Weyand, E.H. (2004). Bioavailability and risk assessment of orally ingested polycyclic aromatic hydrocarbons. *Int J Toxicol.*, 23 (5) 301-33.
- Ravindra, K., Sokhi, R. y Van Grieken, R. (2008). Atmospheric polycyclic aromatic hydrocarbons: Source attribution, emission factors and regulation. *Atmos Environ*, 42 (13) 2895-2921.
- Rey-Salgueiro, L., García-Falcón, M. S., Martínez- Carballo, E. y Simal-Gándara J. (2008). Effects of toasting procedures on the levels of polycyclic aromatic hydrocarbons in toasted bread. *Food Chem*, 108, 607-615.
- Reza, J., Trejo, A. y Vera-Ávila, L. E. (2002). Determination of the temperature dependence of water solubilities of polycyclic aromatic hydrocarbons by a generator column-on-line solid-phase extraction-liquid chromatographic method. *Chemosphere*, 47, 933-945.
- Rajo Camargo, M. C. y Toledo, M. C. F. (2003). Polycyclic aromatic hydrocarbons in Brazilian vegetables and fruits. *Food Control*, 14, 49-53.

- Rojo Camargo, M. C., Ramos Antonioli, P., Vicente, E. (2012). Evaluation of polycyclic aromatic hydrocarbons content in different stages of soybean oils processing. *Food Chem* 135, 937-942.
- Ronco, A. L., Barrios, E., Fierro, L., Balbi, J., Larrinaga, M. T. y De Stefani, E. (2004). Risk factors for esophageal cancer in non-smokers and nondrinkers: a case-control study in Uruguay. *Rev Bras Epidemiol.*, 7, 4, 383–389.
- Rose, M., Holland, J., Dowding, A., Petch, S.R., White, S., Fernandes, A. y Mortimer, D. (2015). Investigation into the formation of PAHs in foods prepared in the home to determine the effects of frying, grilling, barbecuing, toasting and roasting. *Food Chem Toxicol.*, 78, 1-9.
- Roseiro, L. C., Gomes, A. y Santos, C. (2011). Influence of processing in the prevalence of polycyclic aromatic hydrocarbons in a Portuguese traditional meat product. *Food Chem Toxicol*, 49, 1340-1345.
- Rubio, A.C., Álvarez, M. R. y Hardisson de la Torre, A. (2006). Hidrocarburos aromáticos policíclicos en productos de la pesca: revisión. *Revista de Toxicología*, 23 (1), 1-6.
- Sadowska Rosiek, A., Surma, M. y Cieślik, E. (2015). Determination of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Coffee and Coffee Substitutes using Dispersive SPE and Gas Chromatography-Mass Spectrometry. *Food Anal Methods*, 8, 109–121.
- Sadowska-Rociek, A., Surma, M. y Cieślik, E. (2014). Comparison of different modifications on QuEChERS sample preparation method for PAHs determination in black, green, red and white tea. *Environ Sci Pollut Res Int*, 21 (2), 1326–1338.
- Schmalko, M.E. (2005). Estudio del Procesamiento Primario del Procesamiento de la Yerba Mate. Tesis del Doctorado en Ciencias Químicas - Universidad de Buenos Aires.

- Schmalko, M.E. y Alzamora, S.M. (2001). Color, chlorophyll, caffeine and water content variation during Yerba Maté processing. *Dry Technol.* 19, 599-610.
- Schmalko, M.E.; Lovera, N.N. y Kolomiejec, G.C. (2011). Moisture migration during a tempering time after the heat treatment step in yerba maté processing. *Latin Am Appl Res*, 41, 153-156.
- Schulz, C.M., Fritz, H. y Ruthenschrör, A. (2015). Occurrence of 15 + 1 EU priority polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) in various types of tea (*Camellia sinensis*) and herbal infusions. *Food Addit Contam: Part A.* 31 (10), 1723-1735.
- Serpe F.P., Esposito M, Gallo P. y Serpe L (2010). Optimization and validation of an HPLC method for determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in mussels. *Food Chem*, 122, 920-925.
- Sewram, V., De Stefani, E., Brennan, P. y Boffetta, P. (2003). Maté Consumption and the risk of squamous cell esophageal cancer in Uruguay. *Cancer Epidemiol Biom Prev.*, 12, 508–513.
- Simon, R., Palme, S. y Anklam, E. (2007). Validation (in-house and collaborative) of a method based on liquid chromatography for the quantification of 15 European-priority polycyclic aromatic hydrocarbons in smoked flavourings: HPLC-method validation for 15 EU priority PAH in smoked condensates. *Food Chem*, 104, 876-887.
- Simonich, S. T. y Hites, R. A. (1995). Organic pollutant accumulation in vegetation. *Environmental Science and Technology*, 29 (12), 2905-2913.
- Soriano Sanz, J. A. (2009). Evaluación y seguimiento del contenido en hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs) en mejillón silvestre de la costa de Galicia y Cantábrico, antes y después del vertido del B/T Prestige. Tesis del Doctorado en Química – Universidade da Coruña (España).
- Statgraphics. (2009). Centurion XV. Statpoint Technologies, Inc. Warrenton VA, U.S.A.

- Stołyhwo A. y Sikorski Z.E. (2005). Polycyclic aromatic hydrocarbons in smoked fish- a critical review. *Food Chem*, 91, 303-311.
- Teixeira, V. H., Casal, S. y Oliveira, M. B. P. P. (2007). PAHs content in sunflower, soybean and virgin olive oils: evaluation in commercial samples and during refining process. *Food Chem*, 104, 106-112.
- Tfouni, S. A. V. y Toledo, M. C. F. (2007). Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in cane sugar. *Food Control*, 18, 948-952.
- Tfouni, S. A. V., Padovani, G. R., Reis, R. M., Furlani, R. P. Z. y Camargo, M. C. R. (2014). Incidence of polycyclic aromatic hydrocarbons in vegetable oil blends. *Food Control*, 46, 539-543.
- Tfouni, S.A.V., Serrate, C.S., Leme, F.M., Camargo, M.C.R, Teles, C.R.A, Cipolli, K.M.V.A.B., Regina, P.Z. y Furlani, R. P. Z (2013). Polycyclic aromatic hydrocarbons in coffee brew: Influence of roasting and brewing procedures in two *Coffea* cultivars. *LWT- Food Sci Technol*, 50, 526-530.
- Thompson, M., Ellison, S. L. R. y Wood, R. (2002). Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis (IUPAC Technical Report). *Pure Appl Chem*, 74 (5), 835–855.
- USEPA- United States Environmental Protection Agency (2009). National Primary Drinking Water Regulations. Disponible en: <http://water.epa.gov/drink/contaminants/upload/mcl-2.pdf>. Acceso el: 24/03/2013.
- Vassallo, A., Correa, P., De Stefani, E., Correa, P., Cendan. M., Zavala, D., Chen, V., Carzoglio, J. y Deneo-Pelegrini, H. (1985). Esophageal cancer in Uruguay: a case control study. *J Natl Cancer Inst.*, 75 (60), 1005–10009.

- Victora, C.G., Muñoz, N., Day, N.E., Barcelos, L.B., Peccin, D.A. y Braga, N.M. (1987). Hot beverages and esophageal cancer in Southern Brazil: a case control study. *Int J Cancer*, 39, 710–716.
- Vieira, M. A., Maraschin, M., Rovaris, A. A., Amboni, R. D. d. M. C., Pagliosa, C. M., Xavier, J. J. M. y Amante, E. R. (2010). Occurrence of polycyclic aromatic hydrocarbons throughout the processing stages of erva-mate (*Ilex paraguariensis*). *Food Addit Contam: Part A*. 27 (6), 776-782.
- Węgrzyn, E., Grzeskiewicz, S., Poplawska, W. y Glód, B. K. (2006). Modified analytical method for polycyclic aromatic hydrocarbons, using SEC for sampling preparation and RP-HPLC with fluorescence detection. Application to different food samples. *Acta Chromatographica*, 17, 233-249.
- Wenzl, T., Simon, R., Kleiner, J. y Anklam, E. (2006). Analytical methods for polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in food and the environment needed for new food legislation in the European Union. *Trend Anal Chem*, 7 (25), 716-725.
- WHO- World Health Organization (2011). Guidelines for drinking water quality. 4ta ed. WHO, Geneva, Switzerland. Disponible en: http://whqlibdoc.who.int/publications/2011/9789241548151_eng.pdf. Acceso el: 24/03/2013.
- Windal, I., Boxus, L. y Hanot, V. (2008). Validation of the analysis of the 15+1 European-priority polycyclic aromatic hydrocarbons by donor-acceptor complex chromatography and high performance liquid chromatography-ultraviolet/fluorescence detection. *J Chromatogr A*, 1212, 16-22.
- Xander, C.G.; Acosta, L.M.; Scipioni, G.P. y Argüello, B. Del V. (2000) Inactivación térmica de peroxidasas en *Ilex paraguariensis* St. Hil. y *dumosa*. Anales del 2° Congreso Sul-Americano da Erva-Mate, Encantado 19 al 23/11/00, Brasil, 366-369.

- Yoo, M., Lee, S., Kim, S., Kim S., Seo, H. y Shin, D. (2014). A comparative study of the analytical methods for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in seafood by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Int J Food Sci Tech*, 49, 1480-1489.
- Zhang, H., Xue, M., Dai, Z. (2010). Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in aquatic products by HPLC-fluorescence. *J Food Compos Anal*, 23, 469-474.
- Ziegenhals, K., Jira, W. y Speer K. (2008). Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) in various types of tea. *Eur Food Res Technol*. 228, 83-91.
- Zuin, V. G., Montero, L., Bauer, C. y Popp, P. (2005). Stir bar sorptive extraction and high-performance liquid chromatography–fluorescence detection for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in Mate teas. *J Chromatogr A* 1091, 2-10.

Listado de Proyectos Científico-Tecnológicos dentro de los cuales se desarrolló la presente Tesis Doctoral

- 1) PROYECTO de INVESTIGACIÓN: Influencia del procesamiento en el contenido de Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos en la Yerba Mate elaborada en Argentina.**

Responsable: Dr. Miguel E. Schmalko

Institución otorgante del subsidio: Instituto Nacional de la Yerba Mate

Código de Identificación del Proyecto: 16QINYM 062 SCHMALKO

Monto: \$ 141.500,00 (pesos ciento cuarenta y un mil quinientos)

Duración: 08/2011 – 08/2014

- 2) Beca Interna de Posgrado Tipo I COFINANCIADA** Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) - Comité Ejecutivo de Desarrollo e Innovación Tecnológica de la Provincia de Misiones (CEDIT).

PROYECTO: Influencia del procesamiento en el contenido de Benzo[a]pireno en la Yerba Mate elaborada en Argentina.

Director: Dr. Miguel E. Schmalko. Codirector: Dr. Luis A. Brumovsky.

Fecha de inicio: 01/04/2011

Fecha de finalización: 01/04/2014.

- 3) Beca Interna de Posgrado Tipo II** Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET).

PROYECTO: Influencia del Procesamiento en el contenido de Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAPs) en la Yerba Mate elaborada en la Argentina.

Director: Dr. Miguel E. Schmalko. Codirector: Dr. Luis A. Brumovsky.

Fecha de inicio: 01/04/2014

Fecha de finalización: 01/04/2016.