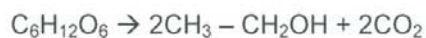


ANTECEDENTES

El vino

El vino es el producto final de la fermentación alcohólica total o parcial del jugo de uvas frescas (Prescott y Dunn, 1982) y se clasifica en tres tipos: vinos rojos, blancos y rosados que se diferencian por la variedad de la uva de la que provienen y el tipo de procesamiento que reciben (Vine y Col., 2002).

El término fermentación alcohólica se refiere a la transformación bioquímica de la glucosa y la fructosa a etanol y dióxido de carbono de acuerdo a la ecuación de Gay-Lussac (Delfini y Fórmica, 2001).



Las principales operaciones que se llevan a cabo en el proceso de elaboración de vino son el corte de uva o vendimia, despalillado, molienda, prensado, maceración y fermentación; esta última se lleva a cabo por medio de la adición de levaduras, siendo las principales variedades *Saccharomyces cerevisiae* y *Saccharomyces bayanus* (Ough, 1992).

Existen aproximadamente 500 compuestos conocidos presentes en el vino y la mayoría de sus componentes provienen de la uva y del proceso fermentativo; la composición química se muestra en la Tabla 1. Los principales constituyentes fenólicos del vino con capacidad antioxidante son derivados de ácidos fenólicos, ácidos cinámicos y tirosina; también se encuentran estilbenos, flavonoides y procianidas (Leighton y Urquiaga, 2000). El contenido de antioxidantes en el vino se muestra en la Tabla 2.

Los principales países consumidores de vino se encuentran en el continente europeo. México, en el año de 1997 ocupaba el lugar 49 (World Drink

Tabla 1. Composición química promedio del vino tinto de mesa.

Nutriente	Valor /100 gr
Componente	
Agua	88.50 g
Energía	72 kCal
Proteínas	0.20 g
Lípidos totales	0.00 g
Cenizas	0.30 g
Carbohidratos (por diferencia)	1.70 g
Minerales	
Calcio, Ca	8 mg
Fierro, Fe	0.43 mg
Magnesio, Mg	13 mg
Fósforo, P	14 mg
Potasio, K	112 mg
Sodio, Na	5 mg
Zinc, Zn	0.09 mg
Cobre, Cu	0.020 mg
Manganeso, Mn	0.597 mg
Selenio, Se	0.2 µg
Vitaminas	
Tiamina	0.005 mg
Riboflavina	0.028 mg
Niacina	0.081 mg
Ácido Pantoténico	0.035 mg
Vitamina B-6	0.034 mg
Folato total	2 µg
Ácido fólico	0 µg
Vitamina B-12	0.01 µg
Otros	
Etanol	9.3 g

Fuente: USDA (2004).

Tabla 2. Constituyentes polifenólicos del vino

Compuesto	Tinto (mg/L)	Blanco (mg/L)
Acido Gálico	95	7
Catequina	191	35
Epicatequina	82	21
Acido Cafeico	7.1	2.8
Cianidina	2.8	0.0
Malvidina 3-gluc.	23.5	1.0
Rutina	9.1	0.0
Miricetina	8.5	0.0
Quercetina	7.7	0.0
Resveratrol	1.5	0.03

Fuente: Frankel, 1995 (citado por Leighton y Urquiaga, 2000)

Trends, 1997) y la producción nacional de vino en el año 2000 fue de 3.14 millones de litros de vino rojo y 19.57 de vino blanco (INEGI, 2006).

Bondades del Vino

Es bien conocido que el vino posee algunos beneficios a la salud humana y descubrimientos recientes hechos por un grupo de investigadores del Boletín Ciencia Vino y Salud (BCVS) de Chile publican las siguientes líneas:

“...Se han publicado estudios epidemiológicos basados en el análisis de dietas ricas en frutas, verduras y vino, que asocian consumo de polifenoles, especialmente flavonoides (antioxidantes), con menor mortalidad en general y también menor mortalidad por enfermedad coronaria (Renaud, 1994; Criqui, 1994; Hertog, 1995; Knekt, 1996; Hertog, 1997).

El consumo moderado de vino protege la función endotelial de aquellos individuos alimentados con dieta hipergrasa y la mejora en individuos alimentados con dieta rica en frutas y verduras; el aporte de antioxidantes de dos copas de vino rojo al día en humanos protege al ácido desoxirribonucleico (ADN) del enorme daño que produce una dieta rica en grasas y confiere protección adicional en una dieta tipo mediterránea; es decir, la suplementación con vino rojo lleva a niveles de daño oxidativo del ADN muy bajos, no importando el tipo de dieta...”

Los beneficios del vino para la salud surgen sólo cuando esta bebida es consumida con moderación. Esto corresponde a un estilo de vida y a una cantidad recomendable por persona (Renaud y Col., 2004). En la Figura 1 se muestra la relación entre el riesgo de mortalidad y el número de copas semanales y se observa que el consumo de 2 a 3 copas de vino al día reduce de manera significativa el riesgo comparado con aquellas personas que no consumen esta bebida.

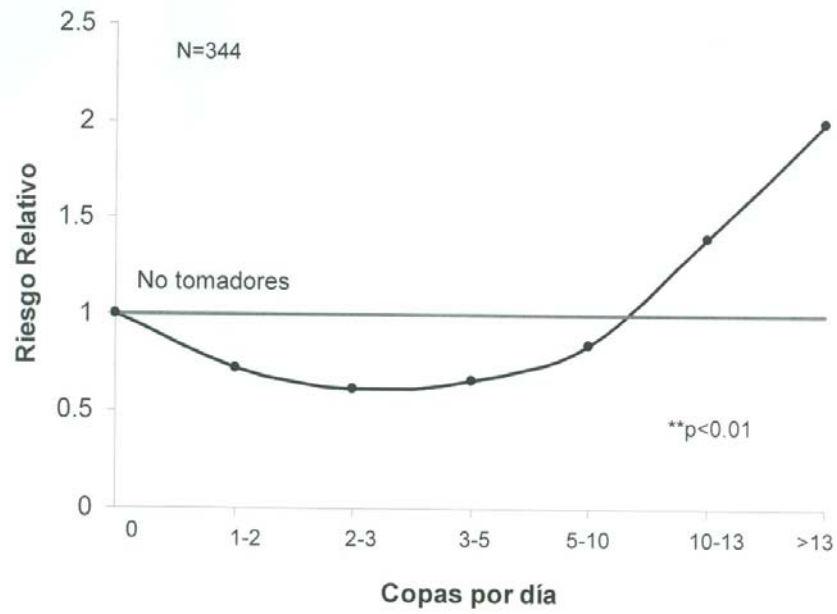


Figura 1. Riesgo relativo de mortalidad en relación a la ingesta de vino medido en copas diarias (Renaud y Col., 2004).

Toxicidad de bebidas alcohólicas

Algunos estudios epidemiológicos realizados por la Agencia Internacional para la Investigación en Cáncer (International Agency for Research on Cancer) (IARC) han indicado que el consumo de bebidas alcohólicas (entre las cuales se encuentran vino, cerveza y licores) está relacionado de manera causal con cáncer en la cavidad oral y en la laringe. Existe suficiente evidencia del poder cancerígeno de las bebidas alcohólicas en los seres humanos y por tanto se ha clasificado en el grupo I de la IARC; en esta categoría se encuentran los compuestos o mezclas que presentan suficiente evidencia de que el agente puede producir cáncer en seres humanos, o bien, que su potencial cancerígeno en seres humanos no es suficiente, pero existe suficiente evidencia de su poder en animales experimentales y evidencia fuerte en humanos expuestos al agente o mezcla, el cual, actúa a través de un mecanismo relevante de poder cancerígeno (IARC, 1988).

Las concentraciones de etanol retenidas en el tracto gastrointestinal superior de los seres humanos después del consumo de bebidas alcohólicas puede causar irritación local. Beber de manera excesiva puede provocar enfermedades a largo plazo, tales como: hígado graso, hepatitis alcohólica, necrosis celular, fibrosis y cirrosis hepática (IARC, 1988).

Toxicidad del vino

Se han reportado una gran cantidad de compuestos presentes en el vino, estos pueden venir directamente del campo en la materia prima, o bien, generados durante el proceso de fermentación. Para fines de este estudio se agruparon en cuatro categorías:

- **Arsénico y metales pesados:** Estos compuestos se encuentran distribuidos de manera natural en el medio ambiente, tienen tendencia a acumularse en ciertos

tejidos del cuerpo humano y pueden ser potencialmente tóxicos a niveles de exposición relativamente bajos (Hu, 2002).

- Metabolitos no alcohólicos: Son compuestos formados durante la fermentación bajo distintos mecanismos de reacción. También son conocidos como metabolitos secundarios (Delfini y Formica, 2001).
- Alcoholes: Son compuestos formados durante la fermentación alcohólica. Dentro de esta categoría se encuentra el metanol, etanol, isopropanol, entre otros.
- Micotoxinas: Son metabolitos secundarios de hongos que pueden estar presentes en los alimentos como consecuencia del crecimiento de los mismos y pueden causar daños a la salud de animales y/o humanos (Ramos, 2002), en esta categoría se encuentra la ocratoxina A.

Arsénico y Metales Pesados

Arsénico

Hasta el año de 1970, en muchos países alrededor del mundo, se utilizaba arsenato de plomo como fungicida en viñedos; tanto el plomo como el arsénico son compuestos tóxicos a ciertos niveles de concentración y estos dos elementos son considerados químicos persistentes, lo que quiere decir que permanecen en el suelo por muchos años aún después de que se ha dejado de utilizar (Chatt, 2004).

A través de investigaciones se han encontrado intoxicaciones por arsénico en productores de uvas para vinificación (Bates 1994) y se ha sugerido un riesgo incrementado en cáncer de piel y de pulmón para los trabajadores de viñedos (Lüchtrath, 1983). También, la ingestión de arsénico en subproductos del vino puede contribuir a este incremento. La intoxicación que ocasiona este compuesto es difícil de identificar por que la mayor parte es eliminado en un período de tres días y lo que se queda en el organismo es almacenado en el cerebro, huesos y tejidos provocando serios daños; pero algunas personas no presentan inmediatamente los síntomas, sin embargo, la exposición puede causar algunos

tipos de cáncer o diabetes; además puede provocar daños en el hígado, riñón y sistema nervioso central y de acuerdo a la IARC se encuentra en el grupo I (IARC 1987a).

Plomo

Se ha encontrado plomo en las uvas destinadas a la vinificación y esto se debe a la cercanía de los viñedos a la carretera (Ough, 1992). El plomo puede causar dolor abdominal, insuficiencia renal, alergias, anemia, ansiedad, artritis, enfermedades cardiovasculares, autismo, cólico, constipación, convulsiones, depresión, dislexia, epilepsia, fatiga, alucinaciones, dolores de cabeza, hipertensión, hipotiroidismo, impotencia, disfunción del hígado, problemas menstruales, esclerosis múltiple, náuseas, parkinson, disfunción renal, esquizofrenia, vértigo o pérdida de peso. También causa daños a los huesos y pérdida de energía (Hu, 2002). Está clasificado dentro del grupo 2B de la IARC; en este grupo se encuentran las mezclas o compuestos que tienen una evidencia limitada de su poder cancerígeno en humanos y menos que suficiente en animales experimentales; también se utiliza cuando hay evidencia inadecuada en humanos pero hay suficiente evidencia en animales experimentales.

Cadmio

A partir de la mitad del siglo pasado, la producción y el uso de cadmio a nivel industrial se ha extendido rápidamente, y su eliminación del medio ambiente se ha convertido en un serio problema. El cadmio que entra en el organismo se suele fijar rápidamente a los tejidos, combinándose de forma selectiva con la metalotioneína, una proteína compuesta de un alto número de residuos de cisteína. La mayor parte de la carga total de cadmio acumulada en el organismo se localiza en el hígado y riñones unido a dicha proteína. Cuando la capacidad de estos órganos para sintetizar la proteína se ve sobrepasada, el cadmio podrá ejercer su efecto tóxico, cuyas primeras manifestaciones son las propias de una nefropatía. En intoxicaciones crónicas son habituales las osteopatías que parecen estar relacionadas con una alteración del metabolismo del calcio. Algunos tipos de

cáncer relacionados con el aparato reproductor masculino también parece que pueden ser inducidos por el cadmio (Bernard y Lauwerys, 1984).

En 1972 la Organización de Alimentos y Agricultura (Food and Agriculture Organization) (FAO)/ Organización Mundial de la Salud (World Health Organization) (WHO) fijaron un rango de 400-500 μg como valor de cadmio que puede ingerir semanalmente un adulto (FAO/WHO, 1972).

Metabolitos no Alcohólicos

Etil Carbamato

Este compuesto también es llamado uretano (Winter, 2002; Herbert y Col., 2002) y es un éster incoloro, cristalino de fórmula molecular $\text{CO}(\text{NH}_2)\text{OC}_2\text{H}_5$, es un subproducto natural de la fermentación y es encontrado en muchos alimentos fermentados y bebidas donde la actividad microbiológica ha sido una parte integral del proceso de producción (Wool y Col., 2001); uno de estos productos es el vino donde se han reportado cantidades cuantificables de este tóxico (Whiton y Zoecklein, 2002). En 1943 se descubrió que el etil carbamato tiene efecto carcinogénico en animales; se ha mostrado que dosis de 0.1-12.5 mg de etil carbamato/kg de peso corporal, induce a la formación de tumores en ratas, ratones y hámster después de la administración tanto por vía oral como por inhalación (Schlatter y Lutz, 1990), por lo tanto, la IARC lo ha clasificado dentro del grupo 2B (IARC, 1974) y la industria del vino está interesada en reducir el contenido de este compuesto en sus productos (Butzke y Bisson, 1997).

La preocupación por el etil carbamato en Estados Unidos comenzó en noviembre del año 1985 cuando las autoridades canadienses reportaron haber detectado este compuesto en ciertos vinos y licores destilados (Segal, 1998).

El etil carbamato puede ser formado por dos mecanismos distintos, uno de ellos es a través de reacciones subsecuentes de descomposición de la arginina

(Herbert y Col., 2000), otro es el propuesto por Monteiro y Col. y Ough y Col. (citados por Wool y Col., 2001) que es la reacción espontánea entre la urea y el etanol en las bebidas alcohólicas fermentadas.

Acetaldehído

Según Arctander (citado por Miyake y Shibamoto, 1993) el acetaldehído es un líquido incoloro, volátil a temperatura y presión ambiente; el acetaldehído puro posee un olor irritante, pero a bajas concentraciones da un aroma agradable a frutas y se utiliza extensamente como sabor artificial de frutas. Además, es un compuesto que se genera en la fermentación de mosto de uva y crea alteraciones en la acidez volátil, la estabilización de la materia colorante y la degustación del vino.

En un estudio realizado para la IARC con trabajadores expuestos a varios aldehídos se encontró una frecuencia relativa de tumores bronquiales y en la cavidad oral en nueve casos de cáncer. Los tumores del esófago se han asociado con niveles metabólicos altos de acetaldehído después del consumo de alcohol; sin embargo, no hay suficientes datos para confirmar su poder cancerígeno en humanos, pero si en animales, por lo tanto este compuesto se encuentra en la categoría 2B (IARC, 1999).

Alcoholes

N-propanol

A partir de algunos estudios con animales, el efecto tóxico del n-propanol se puede caracterizar como causante de depresión del sistema nervioso central, y si la dosis es muy grande se pueden presentar fallas respiratorias y hasta la muerte. Al igual que en el caso del metanol y el etanol, la enzima involucrada en el metabolismo de este compuesto es la alcohol deshidrogenasa y el n-propanol se encuentra en niveles sanguíneos inferiores cuando es consumido junto con etanol o después de haber ingerido este último (Wimee y Col., 1983).

Isopropanol

El isopropanol tiene un efecto narcótico en el sistema nervioso central aproximadamente dos veces mayor que el del etanol; se ha publicado que la dosis letal es de 166 mL, pero es casi imposible que ocurra una muerte producida por este compuesto ya que no es consumido en grandes concentraciones. Los estudios con animales han demostrado que es menos tóxico que el metanol, el etanol y el sec-butanol pero es más tóxico que el n-butanol y el isobutanol (Wimee y Col., 1983).

Etanol

El etanol es el compuesto mayoritario de los alcoholes presentes en el vino, y es producido a través de la fermentación alcohólica de los azúcares simples presentes en el jugo de la uva (Delfini y Formica, 2001).

El etanol afecta dentro del cuerpo a todas las células, pero afecta de manera más dramática aquellas que se encuentran en el cerebro; se ha reportado que los alcohólicos tienen reducción del peso cerebral comparado con controles y el grado de atrofia cerebral está correlacionado con la cantidad de alcohol consumido durante toda la vida (Harper, 1998 citado por Harper y Matsumoto, 2005).

Después de una hora de que el alcohol es ingerido, la mayor parte es absorbida en el tracto gastrointestinal. El alcohol alcanza a llegar a la sangre de manera rápida y es distribuido de manera casi uniforme en todo el cuerpo; la solubilidad del etanol en agua juega un papel muy importante en esta distribución (Wimee y Col. 1983).

Metanol

El metanol (CH_3OH) es un líquido incoloro a temperatura ambiente con un olor suave (Gnekow y Col., 1976 citado por Cabaroglu, 2005). Siguiendo el camino

de la ingestión, éste es oxidado a ácido fórmico y formaldehído y ambos son tóxicos para el sistema nervioso central. Nawsholme y Leech (citados por Cabaroglu, 2005) reportaron que el metanol oxidado produce acidosis láctica, la cual es una enfermedad metabólica causada por un incremento en los niveles sanguíneos del ácido láctico.

Origen del Metanol en el Vino

La presencia del metanol está directamente ligada a la presencia de sustancias pécticas en la materia prima. Durante el proceso de fermentación éstas pasan por un proceso de degradación por acción enzimática la cual conduce a la formación de este compuesto (FAO Nutrition Meetings, 1970).

Uno de los estudios más antiguos con respecto a la síntesis del metanol en el vino fue el realizado por Flanz y Bouzigues (citados por Cabaroglu, 2005) quienes mostraron que en la maceración de la uva se produce una concentración más alta de metanol cuando hay un contacto más prolongado entre el jugo y los sólidos de la uva.

Otro estudio realizado con respecto a la producción de este compuesto es el de Montedoro (1968) quien reportó que el contenido de metanol en el producto terminado está relacionado con el contenido de pulpa presente en el mosto y además con la intensidad de presión que se aplique al fruto durante el prensado.

También se ha encontrado que la adición de enzimas pectolíticas inducen un incremento en los niveles de metanol en diferentes productos fermentados tales como las cidras o los vinos (Revilla y González, 1998). Este mismo efecto enzimático se reportó en el estudio realizado por Andraous y Col. (2004) quienes observaron que el contenido de metanol en destilados de frutas sobrepasaba los límites permitidos y que la presencia de enzimas pécticas provocaba un aumento en las concentraciones de este compuesto.

Se han realizado estudios para ver cual es el papel de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* en la producción de este compuesto, tal es el caso del realizado por Fachine y Col. (2005) quienes reportaron que durante la producción de “cachaça” (una bebida producto de la fermentación de caña de azúcar) a partir de esta levadura no se detectó la producción de metanol en el producto terminado, esto lo atribuyen a que la generación de este compuesto está asociado con la degradación de la pectina que se encuentra en cantidades muy bajas en la caña de azúcar y no a la fermentación alcohólica en sí. Sin embargo, se ha reportado que esta levadura tiene la capacidad de producir la enzima pectinesterasa (Gainvors y Col., 1994a) que es la que produce la degradación de la pectina y que se puede utilizar la presencia del microorganismo para degradar pectinas con diferentes niveles de esterificación en la clarificación de frutas (Gainvors y Col., 1994b).

Acción de la pectinesterasa (PE)

Las enzimas pectolíticas utilizadas durante la maceración en vinificación facilitan la liberación del contenido celular del fruto. El objetivo de este tratamiento es la obtención de vinos con más color, más rico en compuestos fenólicos e igualmente más fáciles de clarificar y filtrar (Palacios y Col., 2006). Las enzimas pécticas comerciales, contienen PE, poligalacturonasa y pectinliasa (Swi-Bea, 2005). Pero, a pesar de que la utilización de esta enzima ayuda a aumentar el rendimiento de etanol (Andraous y Col., 2004), no se recomiendan altas concentraciones de ella ya que ayuda a liberar altas cantidades de metanol (Palacios y Col., 2006).

La PE es una enzima que cataliza la desesterificación de la pectina a pectato y metanol (Goldberg, 1984 citado por Frenkel y Col., 1998); hidroliza la unión éster de las unidades de ácido galacturónico metilado produciendo un polímero cargado negativamente y metanol (Johansson y Col., 2002). Su sitio de acción en la molécula de pectina se muestra en la Figura 2.

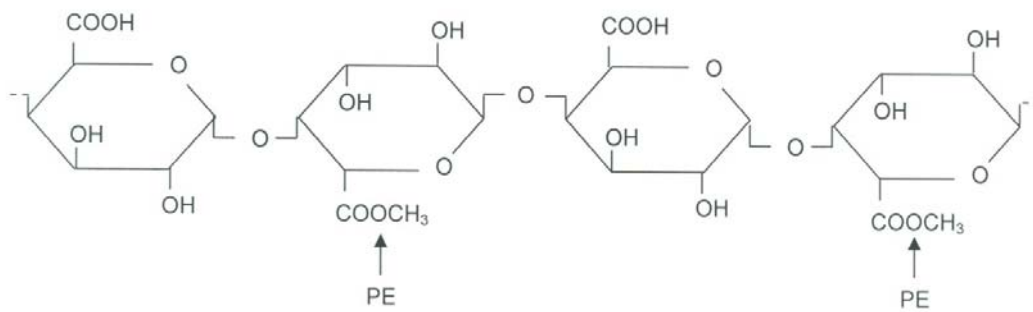


Figura 2. Lugares de acción de la enzima pectinesterasa en la molécula de pectina (Arvid, 2004).

Esta enzima es producida de manera natural por las plantas y también por algunos microorganismos. Se piensa que se encuentra relativamente inactiva en la mayoría de los tejidos intactos de plantas, pero cuando estos tejidos son macerados, la enzima comienza a trabajar rápidamente sobre la pectina (Lineweaver y Jensen, 1951 citado por Lee y Col. 1979), pero tal actividad es insuficiente para el proceso de maceración (Arvid, 2004).

Toxicidad del Metanol

A través de los años se han reportado muchos casos de envenenamiento por consumo de metanol presente en diferentes bebidas alcohólicas. Los síntomas por el consumo de metanol usualmente se presentan después de 12 a 48 horas de haberse ingerido, y en ocasiones antes de este período. Entre los síntomas más comunes se encuentran disturbios visuales, aberraciones cerebrales, acidosis severa, dolor abdominal, náuseas, vómito, debilidad, dificultad para respirar y vértigo, también se presenta una disminución del poder de combinación de dióxido de carbono en la sangre y las áreas del cuerpo que son más afectadas por el envenenamiento son los ojos, la piel, el sistema nervioso central y el sistema gastrointestinal (Wimee y Col. 1983). La toxicidad del metanol se debe a la propiedad que tienen sus metabolitos de precipitar proteínas de las vías nerviosas; estos compuestos son el ácido fórmico y el formaldehído y el daño que causan en el organismo es irreparable (Sánchez, 2002).

Su dosis letal es de 50 a 100 mL, sin embargo el consumo de 25 a 50 mL puede ser fatal si no se trata de manera inmediata. Se ha reportado que cuando se ingiere una solución que contiene etanol y metanol se produce un daño menor debido a que la enzima responsable de la conversión del metanol a formaldehído y ácido fórmico es la misma que se utiliza para metabolizar el etanol y la enzima tiene preferencia por este último (Wimee y Col., 1983).

Existen tres caminos por los cuales puede ser intoxicado el ser humano por este compuesto, que son ingestión, inhalación y absorción subcutánea, de los cuales, el camino que produce una respuesta más rápida es la ingestión directa (Wimee y Col. 1983), daño que se puede tener por el consumo de bebidas con un contenido de metanol mayor al recomendado. De acuerdo a la Norma Mexicana NMX-V-012-1986 el valor máximo permitido para metanol en vinos es de 300 mg de metanol por cada 100 mL de alcohol anhidro.

Estudios de la producción de metanol en el vino

En el año de 1979 Lee y Col. realizaron una investigación para observar la formación de metanol en vinos en relación con la variedad y el tratamiento de uva utilizados; estos investigadores encontraron que las uvas de la variedad Concord (una variedad de uvas rojas) presentaron contenido mucho menor de metanol cuando se fermentaron sin piel. Los autores reportaron que la diferencia en las concentraciones se puede deber a que parte de las pectinas presentes en el fruto se encuentran ubicadas en la piel y al quitarles esta fuente el contenido de metanol disminuye. Se sabe que las pectinas son las responsables de mantener la red para la retención de agua en todo el fruto, por lo tanto, se duda que esa sea la verdadera causa del incremento de la concentración, más bien se podría deber a la presencia de enzimas en la piel del fruto, éstas pueden ayudar a provocar la desmetilización de las pectinas de la uva.

Por otra parte, Ough y Crowell (1979) llevaron a cabo una investigación donde fermentaron dos tipos de uva a diferentes temperaturas, con y sin tratamiento enzimático para observar los cambios en el contenido de metanol y encontraron un claro efecto de la adición de enzima y el incremento de la temperatura ya que ambas variables provocaron el aumento en la concentración de metanol.

Revilla y González-San José (1998) realizaron una investigación para cuantificar la producción de metanol a partir de una fermentación con uvas rojas

tratadas con cuatro tipos diferentes de enzimas pécicas y encontraron que tres de ellas produjeron un incremento significativo en las concentraciones de este compuesto cuando se compararon con el nivel del vino control.

Se ha reportado que los vinos rojos tienen contenidos más altos de metanol que los vinos blancos y los rosados, esto parece deberse a que la actividad de la enzima PE en las uvas rojas es mucho mayor que en las uvas blancas. Lo anterior concuerda con los resultados obtenidos en la investigación de Ough y Crowell (1979). La razón por la que existe una mayor formación de metanol en mostos con piel es debido a la gran porción de la enzima PE y sustancias pécicas que se encuentran en la piel del fruto (Lee y Col. 1979).

La investigación realizada por Cabaroglu (2005) apoya también el hecho de que los vinos rojos presentan un contenido mayor de metanol que los vinos blancos y rosados; además de esto, en su estudio observó que el nivel de metanol de algunos vinos se encontraban muy cercanos a los niveles máximos cuando se hizo uso de enzimas pectolíticas.

Ocratoxina A (OTA)

Las ocratoxinas fueron aisladas por primera vez en Sudáfrica en el año de 1965 como metabolitos de una colonia de *Aspergillus ochraceus* de donde proviene su nombre (Merwe y Col., 1965; citado por Sage y Col., 2002). La OTA, que es un metabolito secundario de los hongos del género *Aspergillus* y *Penicillium* (Hayes, 1981); es el compuesto más tóxico de este grupo de micotoxinas, y por consiguiente, está recibiendo una atención cada vez mayor (Hayes, 1981). Su nombre químico es R-N-[(5-cloro-3,4-dihidro-8-hidroxi-3-metil-1-oxo-1H-2-benzopirán-7-il)carbonil]-fenilalanina, su fórmula empírica es $C_{20}H_{18}O_6NCl$, su peso molecular es de 403.82 y su estructura molecular se muestra en la Figura 3.

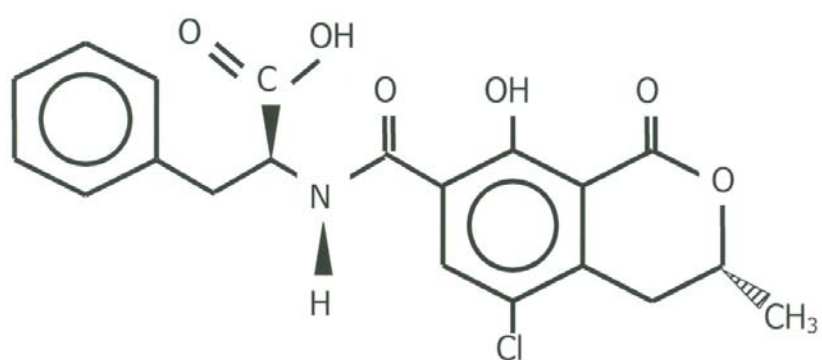


Figura 3. Estructura química de ocratoxina A (Castellari y Col., 2001).

La OTA es un compuesto blanco, cristalino, altamente soluble en solventes polares orgánicos, un poco soluble en agua y soluble en carbonato de sodio acuoso, los puntos de fusión son 90 y 171°C cuando es recristalizado de benceno (contiene 1 mol de benceno/mol) o xileno, respectivamente, tiene propiedades acídicas débiles y los valores de pK_a están en los rangos de 4.2-4.4 y 7.0-7.3 para el grupo carboxílico del anillo de fenilalanina y el grupo fenólico hidroxil de la parte de la isocumarina, respectivamente (Ringot y Col., 2006).

Se ha encontrado la presencia de esta micotoxina en muchos alimentos entre los cuales se encuentran cereales y sus productos, café, uvas, vino, frutas secas, especias, frijoles, jugo de uva, cocoa, chocolate, cerveza, carne, productos de cerdo, huevos de ave, leche y productos de leche (Benford y Col., 2001; Majerus y Col., 1993 y Höhlrt, 1998 citados por Soufleros y Col., 2003). La mayor preocupación con respecto a esta micotoxina es el hecho de que la exposición humana consiste en el consumo de diferentes alimentos con un bajo nivel de contaminación más que al consumo de una sola fuente con un alto nivel (Ratola y Col., 2005).

OTA fue encontrada por primera vez en vino en el año de 1995 por Zimmerli y Dick (citados por Benford y Col., 2001) y para el año de 1998 la Comisión del Codex Alimentarius, basada en datos límites, sugirió que el 15% del consumo total de OTA en humanos es debido al consumo de vino (Codex Alimentarius Commission, 1997).

A través de los años se ha estudiado la exposición de los humanos a OTA alrededor del mundo, esto se realiza midiendo las concentraciones de la micotoxina en el suero, la Figura 4 muestra el porcentaje de las muestras analizadas en donde se detectó la presencia de OTA en diferentes países (Dai y Col., 2004); se puede observar que en países como Canadá y Suiza todas las personas que fueron analizadas presentaron concentraciones de OTA por arriba del límite de detección y en Bulgaria y Polonia un porcentaje muy bajo de las

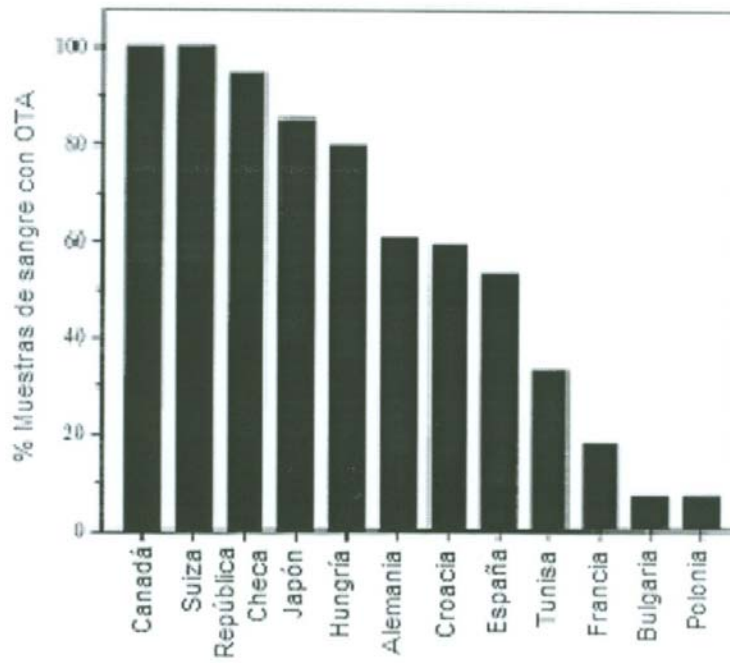


Figura 4. Exposición de humanos a OTA por la prevalencia de esta toxina en sangre de personas sanas a nivel mundial (Dai y Col., 2004).

personas que se sometieron al estudio se les detectó la micotoxina. A la fecha no se han reportado estudios similares en países de América a excepción del de Canadá.

Toxicología de Ocratoxina A

Desde hace ya más de una década se han estado investigando los padecimientos que produce el consumo de la micotoxina tanto en el ser humano como en animales experimentales y se han hecho algunos descubrimientos importantes. OTA ha sido detectada de manera común en la sangre humana en todos los países donde ha sido investigada, pero generalmente en niveles bajos en personas saludables (Cabañes y Col., 2002). OTA es la micotoxina que contamina más frecuentemente la sangre humana en Estados Unidos, la Unión Soviética, Canadá y en cualquier otro lugar donde ha sido investigada (Petzinger y Ziegler, 2000). La ingesta máxima diaria, de acuerdo al comité científico en alimentos de la comisión europea (Scientific Comité on Food of European Comision), es $5\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso corporal (Codex, 1999) y la legislación europea ha modificado recientemente los niveles máximos permitidos para una serie de productos, estos niveles están indicados en la Tabla 3 En el caso de vino, la Organización internacional de la viña y el vino (Organisation Internationale de la vigne et du vin) (OIV) establece un máximo de $2.0\mu\text{g}/\text{L}$ (OIV, 2005).

La OTA tiene un tiempo de vida media en la sangre humana de 35 días y es el humano, quien muestra el tiempo de eliminación más grande de todas las especies que han sido examinadas (Creppy, 1999); este tiempo de vida media depende de la presencia de la seroalbúmina en el suero (Dai y Col., 2004).

En 1993, la IARC clasificó a la OTA como una sustancia posiblemente cancerígena para el ser humano (grupo 2B), basándose en la investigación de laboratorio con animales; sin embargo, la evidencia con respecto a los humanos se encuentra aún inconclusa (IARC, 1993). Una hipótesis de la carcinogenicidad mediada por OTA está basada en las propiedades prooxidantes de la toxina que

Tabla 3. Niveles máximos permitidos de OTA de acuerdo a la legislación europea en productos alimenticios.

Producto	Límite ($\mu\text{g}/\text{kg}$)
Cereales y productos derivados de los cereales, granos de cereales	5
Todos los productos derivados de cereales, incluyendo los cereales transformados y los granos de cereales destinados al consumo humano	3
Pasas	10
Vino (rojo, blanco y rosado) y otros vinos y preparados a base de uvas o de mosto de uva	2
Jugo de uva e ingredientes concentrados a base de jugo de uva	2
Néctar de uva destinado al consumo	2

Fuente: <http://rbiopharm.insitoo.com/documents/R-BiopharmNEWS%20French%20II%2005%20lay%205.pdf>

llevan a una respuesta de estrés oxidativo y daño oxidativo del ADN (Dai y Col., 2004).

Además de lo anterior se sospecha que OTA se encuentra involucrada con la nefropatía endémica de los Balcanes (un padecimiento fatal del riñón que se ha presentado en algunas áreas del sureste de Europa) y con la alta frecuencia de tumores en el tracto urinario observado en algunas áreas de Balkan. También se dice que tiene un rol en la nefropatía intersticial cariomegálica crónica y nefropatía intersticial crónica en Tunisia (Maaroufi y Col., 1998 en Varga y Kozakiewicz, 2006), se le relaciona con tumores uroteliales en Egipto (Wafa y Col., 1998 en Varga y Kozakiewicz 2006) y cáncer testicular (Schwartz, 2002 en Varga y Kozakiewicz, 2006). La exposición humana ocurre principalmente a través del consumo de productos contaminados y la toxina es encontrada frecuentemente en sangre y leche materna debido a la extensa vida media de eliminación (Petzinger y Ziegler, 2000).

Plestina en el año de 1996 encontró que la OTA que circula en sangre tiende a acumularse en los riñones y puede provocar diferentes efectos tóxicos, por lo cual se dice que tiene efectos nefrotóxicos (Grosso, 2003), de hecho, se ha demostrado que a dosis que se presentan de manera natural en los alimentos se puede provocar un daño selectivo al riñón y a sus funciones (Krogh y Col., 1974 en Gekle y Col., 2005). Además de esto, OTA presenta propiedades hepatotóxicas, teratogénicas e inmunosupresivas. Estudios de población han mostrado la presencia de concentraciones cuantificables en el plasma de muchas personas aparentemente saludables (Ramos, 2002).

Características de los Hongos Productores de OTA

Como se ha mencionado anteriormente el vino es uno de los alimentos en los que se ha reportado la presencia de OTA, la cual, se debe al crecimiento de hongos productores de dicha micotoxina. Estos microorganismos han sido estudiados de manera amplia puesto que si se conocen las características de

cada uno de ellos se puede ayudar a controlar su presencia en el campo y por lo tanto, evitar que se encuentre la toxina en el producto final.

La presencia de OTA en el vino está ligada a la presencia de hongos en las uvas (Ramos, 2002) y se ha encontrado que la micotoxina es producida por una especie del género *Penicillium* que es *P. verrucosum*, y por algunas especies del género *Aspergillus* que son *A. ochraceus*, *A. carbonarius* y con un porcentaje pequeño *A. niger* y *A. aculeatus* (Benford y Col., 2001). Estas especies son muy invasivas y penetran los frutos aún cuando no haya daño en la piel (Battilani y Pietri, 2002). De acuerdo a la investigación realizada por Serra R. y Col. (2003) conforme avanza la maduración del fruto, la incidencia de los hongos de campo (por ejemplo *Alternaria*, *Epicoccum*, *Fusarium*, *Stemphylium* y *Ulocladium*) decrece, mientras que la de aquellas especies que producen daños, tales como *Aspergillus*, *Penicillium* y *Rhizopus* empieza a aumentar.

Penicillium verrucosum es una especie de crecimiento lento bajo cualquier clase de condiciones pero es capaz de crecer a actividades acuosas (a_w) bajas, por debajo de 0.80 (Pitt y Hocking, 1997 citado por Benford y Col., 2001), sólo crece a temperaturas bajas y esto da como resultado una distribución en la cual, aparentemente, se encuentra confinada en regiones de temperatura fría. Parece ser no conocido, o casi desconocido en climas cálidos (Benford y Col., 2001), de hecho es muy raro encontrar esta especie contaminando uva, sin embargo Battiliani y Col. (2002) identificaron especies de *Penicillium* productoras de OTA en uvas en las regiones del norte de Italia y Francia (Varga y Kozakiewicz, 2006).

Aspergillus ochraceus (también conocido como *A. allutaceus* var. *Allutaceus*) puede ser descrito como un hongo mesofílico; el crecimiento se puede presentar entre los 8 y 37°C, presenta una temperatura óptima en el rango de 24-31°C. Las condiciones óptimas para su crecimiento se dan a un a_w de 0.95-0.99, mientras que el límite inferior para su crecimiento es un a_w de 0.79 en un medio que contenga azúcares y debajo de 0.81 en medios basados en cloruro de sodio;

Tabla 4. Especies responsables de la contaminación de OTA de diferentes productos agrícolas

Producto	Especies	Referencia
Cereales	<i>P. verrucosum</i>	Lund y Frisvad (2003)
Carne, queso	<i>P. nordicum</i>	Larse, Svendsen y Smedsgaard (2001)
Uva, vino	<i>A. niger</i> , <i>A. carbonarius</i>	Battilani y Pietri (2002); Cabañes y Col. (2002)
Café, especias	<i>A. ochraceus</i> , <i>A. niger</i> , <i>A. carbonarius</i>	Bucheli y Taniwaki (2002) y Téren, Palágyi y Varga (1997)
Higo	<i>A. alliaceus</i>	Bayman, Baker, Doster, Michailides y Mahonay (2002)

Fuente: Varga y Kozakiewicz (2006)

A. ochraceus crece lentamente a pH de 2.2 y presenta un crecimiento óptimo en el rango de pH entre 3 y 10 (Pitt y Hocking, 1997 citado por Benford y Col., 2001).

En el caso de *Aspergillus carbonarius* se ha indicado en estudios preliminares que crece a temperaturas más bajas de lo que lo hace *A. niger*, con una temperatura máxima alrededor de los 40°C y con condiciones óptimas entre los 32-35°C, la habilidad de su crecimiento a a_w reducidos es también más restringida: La germinación ocurre por debajo de 0.82 de a_w a 25 y 30°C. A diferencia de *A. niger*, *A. carbonarius* no germina a a_w de 0.82 y 37 de temperatura (Benford y Col., 2001). La susceptibilidad de las uvas a la colonización por *A. carbonarius* difiere de acuerdo a la variedad de uva (Battilani y Col., 2004 en Vargas y Kozakiewicz, 2006) lo cual es importante debido a que abre la posibilidad de crear variedades de uvas resistentes a la colonización y acumulación de OTA.

Al igual que muchas especies de *Aspergillus*, *A. niger* crece de manera óptima a temperaturas relativamente altas; la temperatura mínima de crecimiento es 6-8°C y la máxima de 45-47°C, y condiciones óptimas de 35-37°C. *A. niger* es un xerófilo con germinación reportada a a_w de 0.77 a 35°C. Las tasas de crecimiento varían muy poco en medios basados en azúcar, cloruro de sodio o glicerol a pH de 4.0 y 6.5 y a varias actividades acuosas. Además, el crecimiento de *A. niger* parece ser afectado un poco por el alimento. *A. niger* puede crecer por debajo de un pH de 2.0 en condiciones elevadas de a_w (Pitt y Hocking, 1997 en Benford y Col., 2001).

Se han descubierto dos nuevas especies que son productoras de OTA: *A. alliceus* (también conocida como *Petromyces alliceus*) y *A. lacticoffeatus* (Ringot y Col., 2006).

Cada producto alimenticio tiene su especie característica productora de la toxina (Tabla 4) y se ha sugerido que las especies de *Aspergillus* son los principales contribuidores de la contaminación de OTA en café y productos de uva

y debido a la habilidad de estos hongos de producir la micotoxina en un amplio rango de temperaturas puede ser producida continuamente en el campo (Varga y Kozakiewicz, 2006), y se ha considerado que *Aspergillus carbonarius* es la principal especie productora de OTA en uvas y vino (Cabañes y Col., 2002 citado por Bellí y Col., 2004b).

Biosíntesis de ocratoxina A

No se ha podido establecer por completo el camino biosintético de la micotoxina, sin embargo se han realizado experimentos utilizando ^{14}C y ^{13}C como marcadores. Estos estudios muestran que el anillo de la fenilalanina se origina por la vía del ácido chiquímico y el grupo dihidroisocumarina por el camino de los pentacétidos (Ringot y Col., 2006). La ruta metabólica se muestra en la Figura 5.

Ocratoxina A en vinos

En los últimos años se han realizado una gran cantidad de investigaciones con respecto al contenido de OTA en vinos, y esto es debido a que el vino es un producto natural de gran importancia en la economía europea, con buenos beneficios a la salud y por lo tanto es importante asegurar que se encuentre libre de contaminantes que puedan dañar la salud del consumidor (Venancio y Col., 2004).

Hay casos en los que no se ha encontrado la micotoxina en vinos, como en el estudio de Brera y Col. (2005) en Hungría, en dicha investigación ninguna de las muestras analizadas de vino de este país se detectó contaminación con OTA pero, en el caso de vinos rojos italianos que fueron analizados en esta misma investigación, el 84% de las muestras presentaron resultados positivos en el rango de 0.01 a 4 ng/mL.

En cambio en todos los vinos analizados en el año 2003 en Sudáfrica, los niveles se encontraron por debajo del límite sugerido por la Unión Europea (UE)

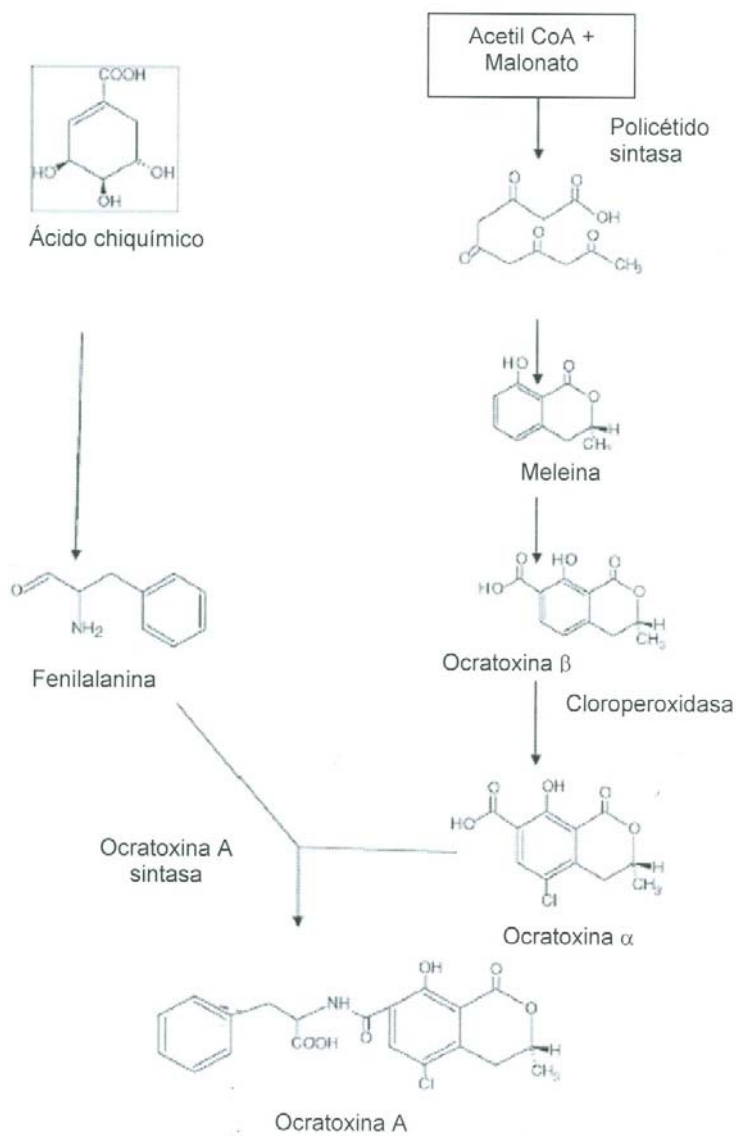


Figura 5. Camino metabólico de la generación de ocratoxina A (Rignot y Col., 2006).

de 0.5 ng/mL encontrándose en el rango de 0.04 a 0.39 ng/mL; también se analizaron vinos italianos durante el mismo estudio, de los cuales, sólo dos vinos rojos se encontraban contaminados por encima del nivel máximo sugerido por la UE (Shephard y Col., 2003).

Bellí y Col. (2004a) encontraron que de los mostos españoles analizados para este estudio el 15% contenía OTA en concentraciones de 0.091 a 0.813 ng/mL, mientras que en el caso de vinos el 17.9% de ellos contenían la micotoxina en concentraciones promedio de 0.18 y 0.30 ng/mL en vinos blancos y rojos, respectivamente. Además, el 18.7% de las muestras de vinos rojos presentó resultados positivos y solamente el 10% de los blancos.

Da Rocha-Rosa y Col. (2002) realizaron una investigación donde se analizaron jugos de pulpas en Río de Janeiro, Brasil. Se encontró que el 25% de las muestras presentaron resultados por arriba del límite de detección con una concentración media de 0.037 ng/mL y en el caso de vinos el 28.75% se reportaron por arriba del límite de detección.

También en el continente americano se realizó un estudio con vinos argentinos y chilenos y en ninguno de los vinos rojos producidos en ésta región presentaron contaminación por arriba del nivel de detección (Pacin y Col., 2005).

En otro estudio realizado con 116 muestras de vinos de los supermercados de la comunidad española de Valencia se encontraron niveles de OTA en el rango de <0.01 hasta 0.76 ng/mL. Las concentraciones más altas de la micotoxina las presentaron los vinos rojos, rosados y blancos de las producciones de los años más recientes. Además se encontró que dichas concentraciones fueron decreciendo de acuerdo con los años (Blesa y Col., 2004). López de Cerain y Col. (2002) demostraron que la micotoxina es estable en los vinos por cuando menos un año.

En el año 2004 se publicó una investigación acerca del potencial de los aislados de hongos para la producción de OTA en España y se encontró que el 100% de las 500 muestras de las regiones se encontraba contaminada con cepas productoras de OTA, observándose que entre más se encontraba el fruto en la viña se presentaba un mayor contenido del microorganismo *Aspergillus niger*, que fue el microorganismo estudiado en este experimento. La producción media de la micotoxina fue de 1.42 $\mu\text{g/g}$ para *A. niger* y 10.76 $\mu\text{g/g}$ para *A. circumdati* cuando se realizó el cultivo en el medio CYA con concentraciones máximas de 2.82 y 22.03 $\mu\text{g/g}$, respectivamente. Además de esto, se llevó a cabo el análisis de 40 muestras de mostos hechos a mano mostrando que 6 de ellos fueron contaminados con OTA (15% de las muestras) en un nivel bajo (Bellí y Col., 2004b).

Por otra parte, en un estudio realizado en vinos en Portugal, OTA fue detectada en 3 de 11 muestras en concentraciones dentro del rango de 0.035 a 0.061 ng/mL (Serra y Col., 2004).

Corroborando la importancia de la OTA a nivel mundial, OTA fue detectada en 62.8% de muestras analizadas en Grecia. El nivel máximo fue de 3.2 ng/mL y estas concentraciones se le atribuyeron a las condiciones climáticas de las islas, es decir, los vientos de la temporada que soplan en el mediterráneo e incrementan la humedad en relación con las áreas continentales. La mayor incidencia de OTA se encontró en las regiones de las islas (Soufleros y Col., 2003).

En un estudio realizado en los años 1997 y 1998 para vinos españoles se observó que 17 de 20 muestras de 1997 mostraron niveles de OTA mayores a 0.05 ng/mL (en un rango de 0.056-0.316 ng/mL). Además de esto, tres muestras analizadas del año 1998 mostraron niveles de OTA por arriba del límite de detección (con un rango de 0.074 – 0.193 ng/mL) (López de Cerain y Col., 2002).

Todas estas investigaciones que aquí se mencionan demuestran que hay un interés a nivel internacional por la presencia de OTA puesto que se han realizado investigaciones en diferentes continentes, y aunque la mayoría de los estudios se encuentran concentrados en la zona europea por los hábitos alimenticios de la región, en el mundo globalizado en el que nos encontramos, las empresas deben estar preocupadas por la inocuidad de sus productos para cumplir con las normas del país donde producen así como las normas internacionales para el caso de exportación.

Relación entre concentración de OTA y tipo de vino

Se ha reportado que existen diferencias en las concentraciones de OTA dependiendo del tipo de vino analizado, tal es el caso de la investigación realizada por Ottender y Majerus (2000), quienes encontraron que OTA es mucho más común en vinos rojos que en rosados y blancos y la concentración es mucho mayor en los rojos que en los últimos dos. Esto puede ser debido, entre otras cosas, a las diferentes condiciones en el proceso de elaboración de los vinos.

Este mismo efecto fue observado por Lo Curto y Col. (2004) quienes reportaron un mayor porcentaje de vinos rojos que blancos contaminados por OTA y, de hecho, todos los vinos rojos se encontraban contaminados. En el caso de vinos italianos se ha reportado que los vinos rojos tienen un contenido mayor de OTA que los rosados y éstos a su vez que los blancos (Battilani y Pietri, 2002).

Condiciones para la Producción de OTA

Se han presentado diferencias en las concentraciones de OTA de acuerdo a las concentraciones climáticas de donde proviene el vino. Esta variación se reporta en la investigación de Ottender y Majerus (2000) quienes reportaron que los cultivos del área del norte de Europa muestran una contaminación del 12% de las muestras, en contraste con aquellos de las áreas del sur que mostraron un porcentaje de contaminación de 95%.

Por otra parte, en el caso de vinos italianos, Pietri y Col. (2001) reportaron que la contribución del vino a la ingesta media diaria de OTA puede considerarse no dañina en el caso de las personas que beban vino manufacturado en Italia central e Italia del norte, y no sucede lo mismo para los consumidores de vinos de Italia del sur, esto es debido a la diferencia climática en estas regiones.

La presencia de los microorganismos no sólo depende del clima sino también de las prácticas que se siguieron durante el cultivo, como el uso de pesticidas, y las prácticas durante la elaboración del vino (Bau y Col., 2005). También es importante hacer notar que las condiciones óptimas para la producción de la micotoxina son generalmente muy diferentes a aquellas para su crecimiento (Mitchell y Col., 2004). Bellí y Col. (citado por Mitchell y Col., 2004) han sugerido que el tiempo óptimo para la producción de OTA por los microorganismos es de 5 a 10 días

Bellí y Col. (2004b) reporta que las altas actividades acuosas parecen favorecer la producción de la micotoxina y el crecimiento de los hongos; además de esto, sugieren que se deben elegir con mucho cuidado las fechas de cosecha de la uva y que el tiempo de transporte y cosecha se convierten en cruciales para la producción de la micotoxina, además, que cualquier daño en la piel del fruto durante la cosecha o el transporte puede activar la entrada del hongo que coloniza la superficie del fruto lo que puede provocar que aumente las cantidades de OTA. También es importante tener en cuenta que el riesgo de producción de la toxina incrementa junto con la madurez de la uva (Bau y Col., 2005).