



EL SABER DE MIS HIJOS
HARÁ MI GRANDEZA

UNIVERSIDAD DE SONORA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
Departamento de Investigación y Posgrado en Alimentos
Programa de Maestría en Ciencias y Tecnología de Alimentos

Especialidad en Almacenamiento y Procesamiento de Granos

Estudio de la Generación de Metanol y la presencia de
Ocratoxina A Durante el Proceso de Elaboración de
Vino con Uvas (*Vitis vinifera*) Carignane de Sonora.

TESIS

Que para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS

Presenta:

I.Q. Carmen María López Saiz

Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



"El saber de mis hijos
hará mi grandeza"



Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

CONTENIDO

	Página
DEL AUTOR.....	ii
AGRADECIMIENTOS.....	iii
DEDICATORIA.....	v
ÍNDICE DE TABLAS.....	viii
ÍNDICE DE FIGURAS	ix
RESUMEN.....	xi
INTRODUCCIÓN.....	1
OBJETIVOS.....	3
ANTECEDENTES.....	4
El vino.....	4
Bondades del vino.....	7
Toxicidad de bebidas alcohólicas.....	9
Toxicidad del vino.....	9
Arsénico y metales pesados.....	10
Arsénico.....	10
Plomo.....	11
Cadmio.....	11
Metabolitos no alcohólicos.....	12
Etil carbamato.....	12
Acetaldehído.....	13
Alcoholes.....	13
N-propanol.....	13
Isopropanol.....	14
Etanol.....	14
Metanol.....	14
Origen del metanol en el vino.....	15
Acción de la pectinesterasa (PE).....	16
Toxicidad del metanol.....	17
Estudios de la producción de metanol en vino.....	19
Ocratoxina A (OTA).....	20
Toxicología de OTA.....	24

	Página
Características de los hongos productores de OTA.....	26
Biosíntesis de OTA.....	30
OTA en vinos.....	30
Relación entre el tipo vino y la concentración de OTA	34
Condiciones para la producción de OTA.....	34
MATERIALES Y METODOS.....	36
Selección y preparación de la muestra.....	36
Diseño de fermentadores.....	37
Diseño experimental.....	39
Determinación de grado Brix.....	39
Determinación de porcentaje alcohol-volumen.....	41
Determinación de metanol.....	41
Determinación de OTA.....	42
Identificación de hongos.....	43
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	44
Control de temperaturas y toma de muestras.....	44
Consumo de azúcares fermentables.....	44
Producción de alcohol en la fermentación.....	47
Rendimiento de producción de etanol.....	48
Metanol.....	51
Producción de metanol por temperatura de fermentación.....	51
Producción de metanol con respecto a la concentración de enzimas.....	52
Producción de metanol durante el proceso de fermentación.....	55
Ocratoxina A.....	60
Validación del método.....	60
Presencia de OTA durante el proceso de fermentación.....	60
Identificación de hongos.....	68
CONCLUSIONES.....	71
RECOMENDACIONES.....	73
REFERENCIAS.....	74

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla		Página
1	Composición química promedio del vino tinto de mesa.....	5
2	Constituyentes polifenólicos del vino.....	6
3	Niveles máximos permitidos de OTA de acuerdo a la legislación europea en productos alimenticios.....	25
4	Especies responsables de la contaminación de OTA de diferentes productos agrícolas.....	29
5	Efecto de la temperatura y la concentración de enzima péctica en la producción de etanol por °Bx.....	50
6	Efecto de la temperatura y la concentración de enzima péctica en la concentración de metanol en el vino.....	54
7	Presencia de OTA durante la fermentación a 20, 30 y 35°C.....	63

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Riesgo relativo de mortalidad en relación a la ingesta de vino medido en copas diarias.....	8
2	Lugares de acción de la enzima pectinesterasa en la molécula de pectina.....	17
3	Estructura química de ocratoxina A.....	21
4	Exposición de humanos a OTA por la prevalencia de esta toxina en sangre de personas sanas a nivel mundial.....	23
5	Camino metabólico de la generación de ocratoxina A.....	31
6	Diseño y dimensiones de los fermentadores experimentales.....	38
7	Operaciones para la preparación de la muestra y toma de alícuotas seguidas durante el proceso de fermentación.....	40
8	Efecto de la temperatura y el tiempo sobre la cantidad de azúcares (expresado en °Bx) durante el proceso de fermentación.....	46
9	Efecto de la temperatura y el tiempo de fermentación en el contenido de etanol, expresado en %Alc. Vol., durante el proceso de fermentación.....	49
10	Efecto de la temperatura en la producción de metanol en el vino al final de la fermentación, incluyendo todas las concentraciones de enzimas pécticas utilizadas en este estudio	53
11	Efecto de la temperatura sobre la producción de metanol durante el proceso de fermentación sin adición de enzimas pécticas.....	55
12	Efecto de la temperatura sobre la producción de metanol durante el proceso de fermentación con adición de enzimas pécticas a una concentración de 9 μ L/kg de uva.....	58
13	Efecto de la temperatura sobre la producción de metanol durante el proceso de fermentación con adición de enzimas pécticas a una concentración de μ L/kg de uva.....	59

Figura		Página
14	Tiempo de retención en estándares de OTA en cromatografía líquida.....	61
15	Curva de calibración para la técnica de determinación de OTA..	62
16	Cromatograma para OTA en la fermentación a 20°C en cromatografía líquida.....	64
17	Cromatograma para OTA en la fermentación a 30°C en cromatografía líquida.....	65
18	Cromatograma para OTA en la fermentación a 35°C en cromatografía líquida.....	66
19	Observación microscópica de las estructuras reproductoras de <i>Aspergillus</i>	70

RESUMEN

A pesar de que el consumo de vino se ha relacionado con ciertos beneficios a la salud, se han detectado algunos compuestos que pueden perjudicar la salud de los consumidores y entre ellos se encuentra el metanol y la ocratoxina A. En el trabajo que aquí se presenta se realizaron fermentaciones a temperaturas de 20, 30 y 35°C, con concentraciones de enzimas pécicas de 0, 9 y 18 $\mu\text{L}/\text{kg}$ de uva, para determinar el efecto que tienen sobre la generación de los tóxicos mencionados. En el caso de la concentración de metanol se observó que la variable temperatura tiene un efecto significativo, y se obtuvo una concentración máxima a los 25°C y una mínima en la de 35°C. La concentración de enzimas pécicas solo fue significativa en el caso de la fermentación a 35°C. Los modelos de generación de metanol tuvieron un comportamiento de crecimiento exponencial a un máximo y las concentraciones finales se encontraron en el rango de 17.158 a 27.239 mM, las cuales se encuentran por debajo del límite máximo establecido por las normas mexicanas. Para ocratoxina A se observó que la cantidad de la micotoxina al inicio de la fermentación era igual a la que se cuantificaba al final de la misma y la cantidad más alta detectada fue de 0.3423 ng/mL; esta concentración se encuentra por debajo de los límites máximos recomendados por la Organización Internacional de la Viña y el Vino. De acuerdo a pruebas microbiológicas presuntivas el productor de Ocratoxina A es *Aspergillus niger*.

INTRODUCCIÓN

El vino es una bebida que se origina por la fermentación del jugo de uva; es una solución formada principalmente por agua, 88% en peso aproximadamente, alcohol, 9%, minerales (fósforo, magnesio, calcio, hierro, zinc, sodio, potasio y yodo) y otras sustancias orgánicas complejas en cantidades menores (USDA, 2004). Además de los compuestos mencionados, también contiene compuestos volátiles que sólo contando los que imparten aroma al vino, suman entre 400 y 600 (Prescott y Dunn, 1982). Uno de estos volátiles es el metanol, el cual se sabe que es un compuesto tóxico para el ser humano, cuya ingestión o inhalación puede causar ceguera y hasta la muerte (Gnekow y Ough, 1976 citado por Cabaroglu, 2005).

El metanol se encuentra presente en casi todas las bebidas alcohólicas, en algunos casos en concentraciones muy bajas como es el caso de la cerveza, pero se han reportado cantidades muy elevadas de este compuesto en vinos y bebidas destiladas (Nykanen y Suomalainen, 1983 citado por Cabaroglu, 2005).

Además del metanol, en algunas bebidas alcohólicas, tales como la cerveza, los vinos y los destilados, existen muchos componentes en común pero en diferentes concentraciones y se sospecha que algunos de éstos son cancerígenos (IARC, 1988).

En el caso del vino se ha detectado la presencia de ocratoxina A (OTA) (Zimmerli y Dick, 1995 citado por Benford y Col., 2001) que, además de ser considerada como un compuesto posiblemente cancerígeno para el ser humano (IARC, 1993), es considerado como un agente nefrotóxico (Grosso, 2003), hepatotóxico, teratogénico e inmunosupresivo (Ramos, 2002). Se ha reportado la contaminación de alimentos con esta micotoxina, incluyendo vinos, en muchas partes del mundo (Pacin y Col., 2005), sin embargo, no se había realizado un estudio similar en vinos mexicanos.

Por lo anterior, en este estudio se planteó investigar la presencia de los tóxicos mencionados en los vinos producidos en la zona vitivinicultora de Hermosillo, y en caso de que se encontraran, estudiar las condiciones de procesamiento que pueden afectar sus concentraciones en el producto terminado.

OBJETIVOS

Objetivo General

Evaluar el comportamiento de la generación de metanol y la presencia de ocratoxina A (OTA) en el proceso de elaboración de vinos de uva Carignane de la costa de Hermosillo a nivel laboratorio.

Objetivos Específicos

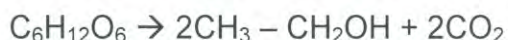
1. Definir el comportamiento de la fermentación del mosto de uva Carignane en lo concerniente a etanol y azúcares fermentables.
2. Determinar el efecto de las variables temperatura y concentración de enzimas del proceso de fermentación que afectan la concentración de metanol y OTA en el producto terminado.
3. Determinar las concentraciones de metanol y OTA en diferentes condiciones del proceso de fermentación de uva Carignane a nivel laboratorio.

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.

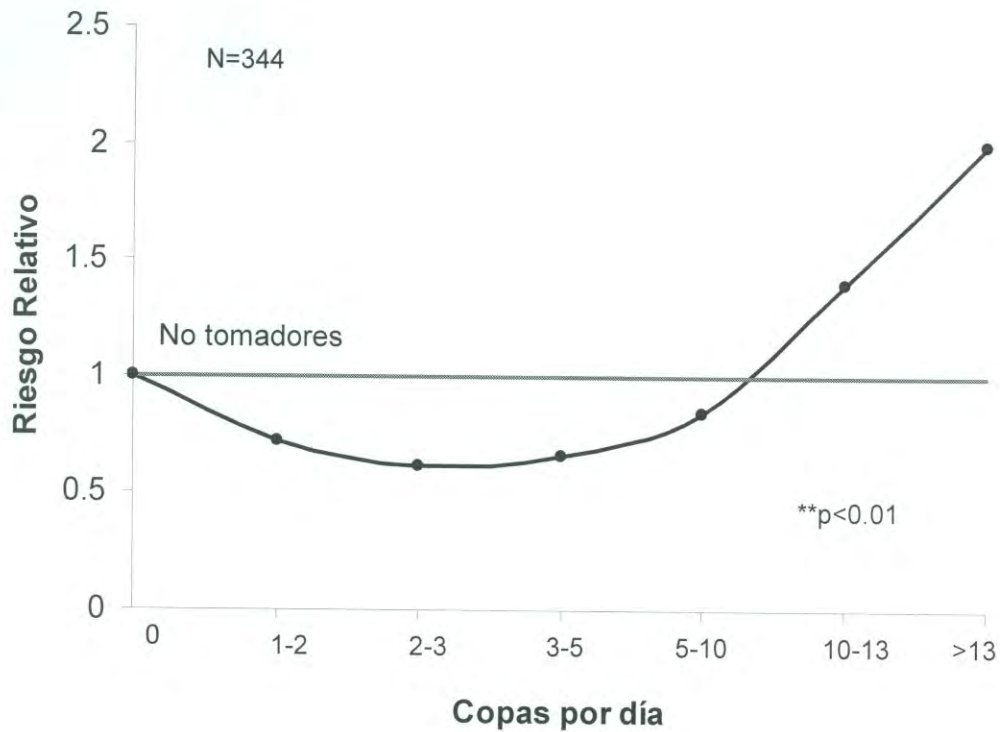


Figura 1. Riesgo relativo de mortalidad en relación a la ingesta de vino medido en copas diarias (Renaud y Col., 2004).

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 Flanzly 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.

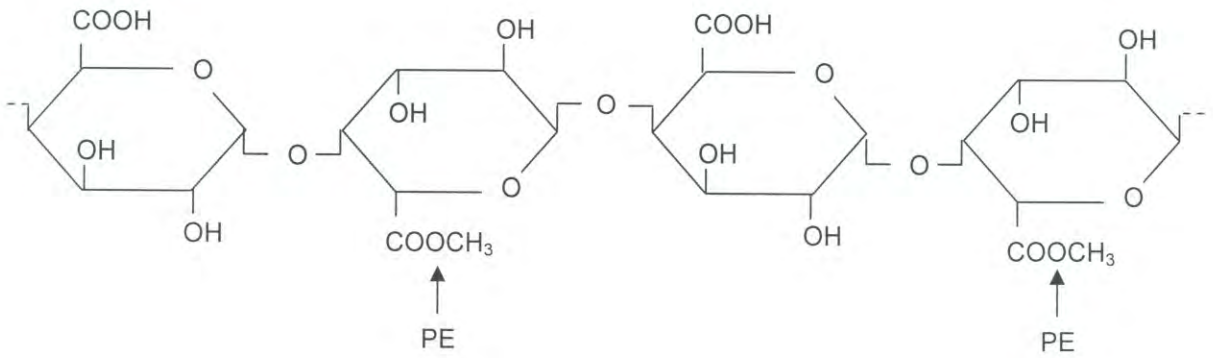


Figura 2. Lugares de acción de la enzima pectinesterasa en la molécula de pectina (Arvid, 2004).

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 cuáles, 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 pécticas 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 pécticas 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-benzopiran-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.

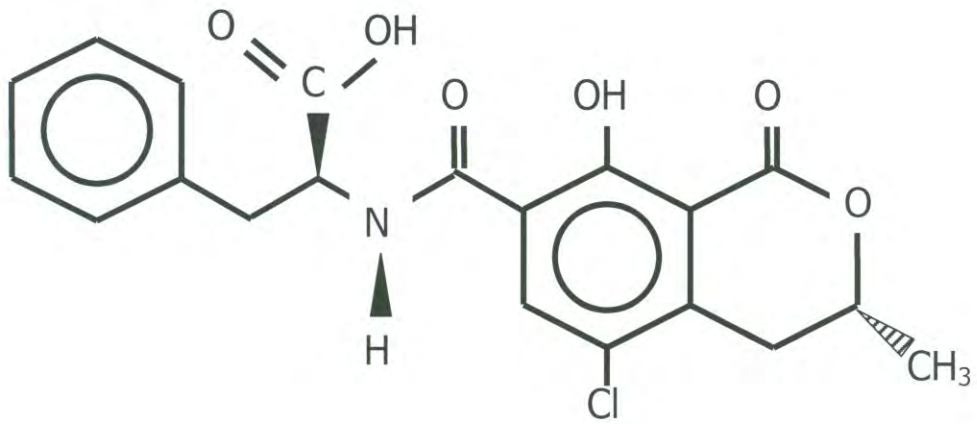


Figura 3. Estructura química de ocratoxina A (Castellari y Col., 2001).

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 ácidas 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

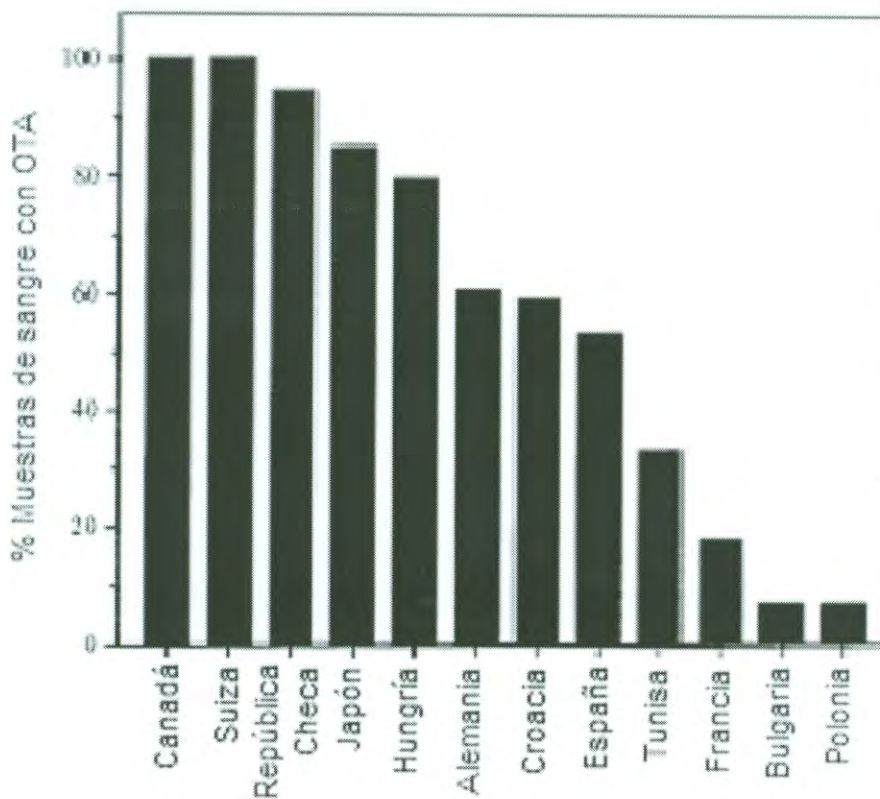


Figura 4. Exposición de humanos a OTA por la prevalencia de esta toxina en sangre de personas sanas a nivel mundial (Dai y Col., 2004).

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%2011%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)

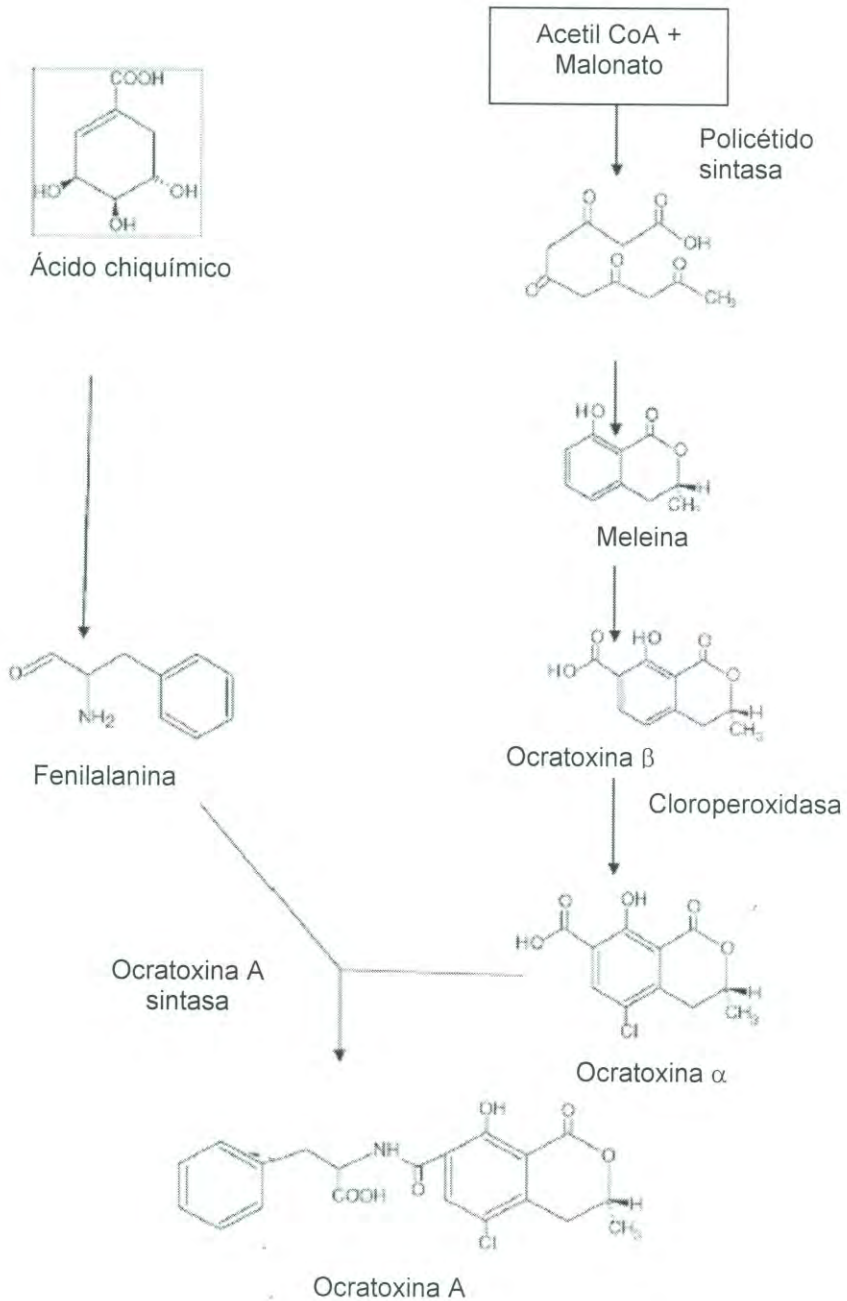


Figura 5. Camino metabólico de la generación de ochratoxina A (Rignot y Col., 2006).

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 nigri*, que fue el microorganismo estudiado en este experimento. La producción media de la micotoxina fue de 1.42 $\mu\text{g/g}$ para *A. nigri* 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).

MATERIALES Y MÉTODOS

Selección y Preparación de la Muestra

La planta vitivinificadora de Hermosillo, donde se realizó el estudio recibe 5 variedades de uva, de las cuales el 75% corresponde a la uva Carignane, por lo tanto, se seleccionó esta uva para llevar a cabo el estudio. Se eligió el viñedo "La Esperanza" para tomar la muestra del fruto es el que aporta la mayor cantidad de esta variedad de uva en la planta y se encuentra ubicado en la costa del municipio de Hermosillo, Sonora.

La uva se transportó del viñedo a la planta en tolvas metálicas y siguió el proceso de recepción de la misma. El criterio de rechazo es el mismo utilizado por la industria vinificadora el cual consiste en un valor de °Bx mínimo de 17.0 y un máximo de 22.0. Una vez que la uva fue colocada en el área de descarga, transportada por un tornillo sin fin, se tomó la muestra al azar en cubetas y fue pesada. Se utilizaron muestras de 20 kg por cada fermentación y con ellas se realizaron un total de 45 fermentaciones en bloques de 9 de acuerdo al diseño experimental.

La uva pesada fue procesada en un molino experimental de rodillos y después despalillada manualmente. Del jugo procedente de la uva se tomaron 200 mL de jugo y se añadió 0.16 mg de levadura comercial (para obtener una concentración de $8\mu\text{g}/\text{kg}$ de uva en el mosto) y 0.40 mg de fosfato de sodio (para obtener la concentración de $20\mu\text{g}/\text{kg}$ de uva) como compuestos enológicos, a esto se le conoce como caldo iniciador. Por otra parte se agregaron diferentes concentraciones de enzima péctica comercial a la uva molida de acuerdo al diseño experimental y se dejó en un período de reposo de 4 horas (maceración) a condiciones ambientales (aproximadamente 30°C) para dejar actuar a la enzima.

Una vez transcurrido el tiempo de maceración se agregó todo el caldo iniciador a los 20 kg de uva molida y se agitó manualmente durante 2 minutos para homogenizar. Después de esto se procesó el jugo en un semiprensado en un colador casero, aquí se separó la fase sólida de la líquida y la primera se sometió a un proceso de prensado en una prensa hidráulica experimental para extraer el jugo restante. Se desechó la parte sólida (orujo) y la fase líquida se mezcló con el resto del jugo para ser pasado a través de una manta a manera de filtrado. El jugo filtrado (mosto) fue colocado en un fermentador experimental cuyo diseño será explicado mas adelante.

En el fermentador, el mosto se sometió a las condiciones de temperatura especificadas en el diseño experimental para dar inicio a la fermentación. Se tomaron alícuotas periódicas de acuerdo al diseño y se procedió al análisis de la muestra.

Diseño de Fermentadores

Se construyeron 9 fermentadores para seguir el diseño de experimentos que se explicará más adelante. Estos fueron construidos con placas de acero inoxidable, ya que de acuerdo a las referencias se deben utilizar fermentadores limpios de este material para la fermentación, el procesamiento y el almacenamiento de vinos (Vine y Col. 2002). El fermentador consistió de un cilindro de 35 cm de altura, 28 cm de diámetro. Las tapas se construyeron del mismo material y eran ajustadas con ayuda de tuercas tipo mariposa. Sobre las tapas se colocó un agitador conformado por una propela de 25 cm de longitud con una paleta de 15 cm de longitud y 5 cm de altura conectados a un motoreductor de 80 rpm (Fig. 6).

Además de la propela, se hizo un orificio de ventilación sobre la tapa ya que de acuerdo a Vine y Col. (2002) si el recipiente de fermentación no se le retiran los gases de fermentación de manera apropiado, el contenedor puede explotar.

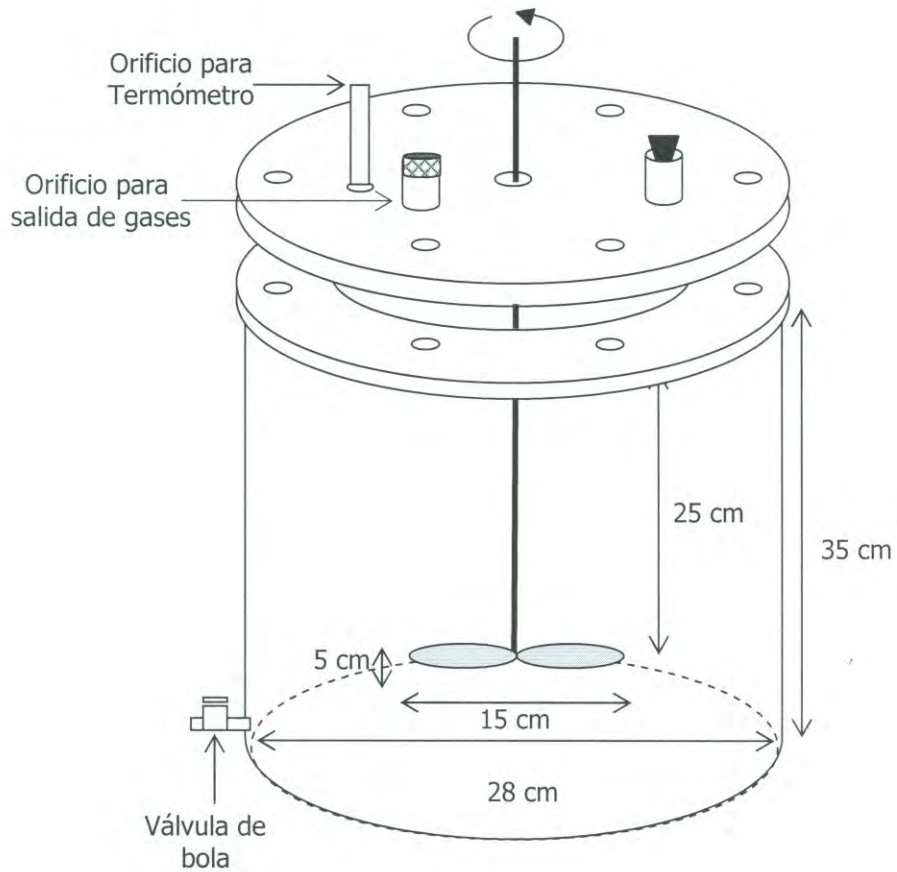


Figura 6. Diseño y dimensiones de los fermentadores experimentales

También se le hizo un agujero para introducir un termómetro con el fin de monitorear la temperatura de fermentación y uno más para introducir un embudo con el fin de introducir por éste parte de la muestra que es extraída del fermentador para la toma de las alícuotas.

Diseño Experimental

Se seleccionaron 3 temperaturas de fermentación de acuerdo a las condiciones que podían ser controladas en el laboratorio y se eligieron temperaturas de 20, 30 y 35°C. Las concentraciones de enzima pécica comercial utilizadas fueron 0, 9 y 18 μL enzima/kg de uva, la primera como control y la tercera es la concentración recomendada por el proveedor de la enzima; estas concentraciones fueron seleccionadas para observar el efecto de la adición de la enzima comparada con la uva control (Figura 7) y se realizaron 3 repeticiones de cada tratamiento.

Se utilizó un diseño de parcelas divididas, donde el tiempo de fermentación y la temperatura no fueron aleatorizados, solo la concentración de enzimas pécicas y repeticiones para cada una de las temperaturas del experimento. Todos los análisis estadísticos se realizaron utilizando los paquetes estadísticos JMP versión 4.0 y Sigma Plot 2001.

Las alícuotas se tomaron de acuerdo al tiempo que duró la fermentación. En el caso de la fermentación de 35°C se tomaron cada 4 horas, para los 30°C cada 6 horas y para los 20°C cada 12 horas. Por especificaciones de la columna cromatográfica para el cromatógrafo de gases, las destilaciones se comenzaron a hacer cuando el mosto llegara a 4 %Alcohol – Volumen (% Alc. Vol.).

Determinación de Grado Brix (°Bx)

Se realizó por medio de un hidrómetro, el cual trabaja bajo el principio de

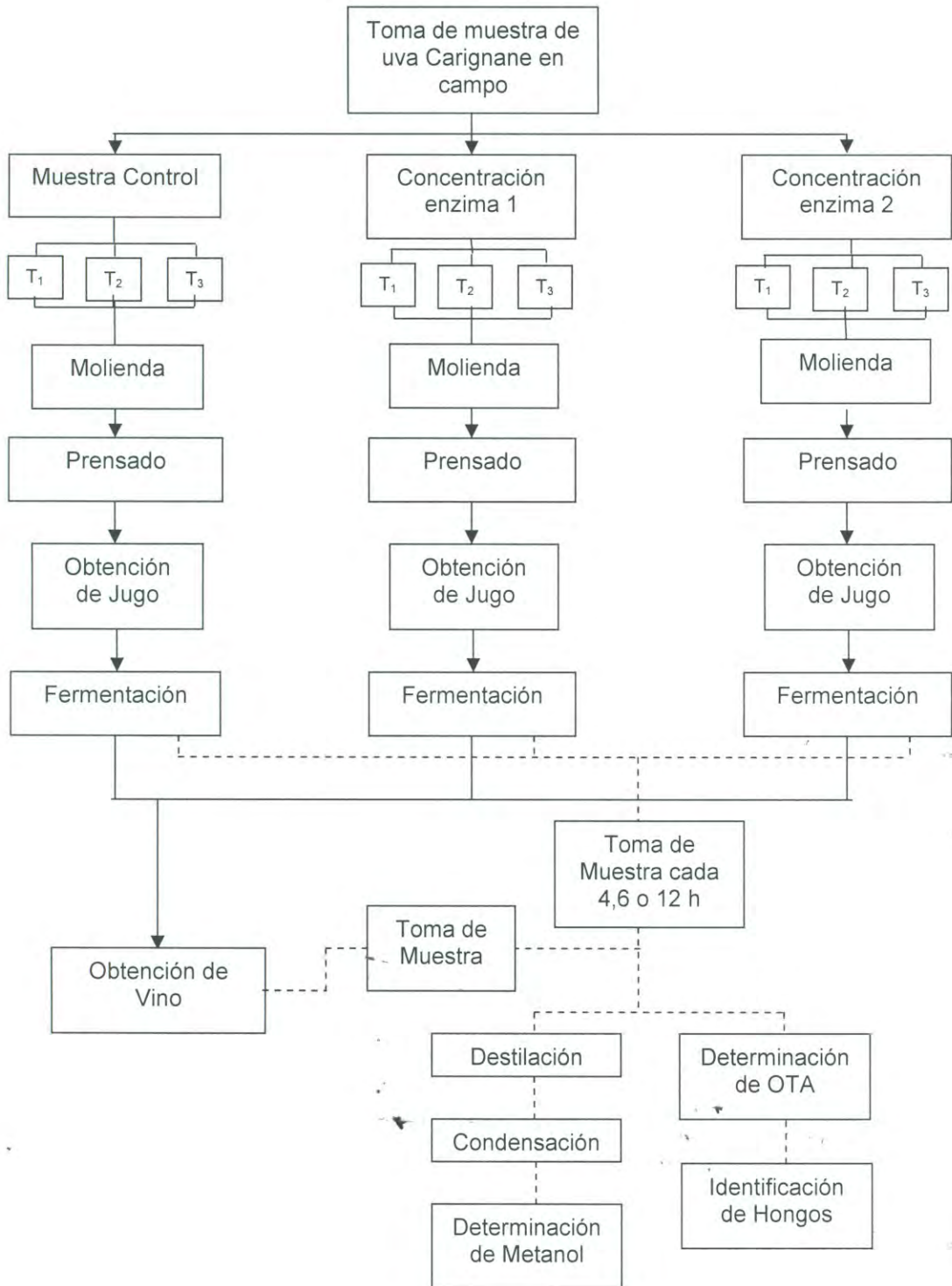


Figura 7. Operaciones para la preparación de la muestra y toma de alícuotas seguidas durante el proceso de fermentación.

gravedad específica; los °Bx son el peso en gramos de materia seca contenido en 100 g de una solución de agua destilada, y es una manera indirecta de medir la cantidad de azúcares presentes en la solución (Paltrinieri y Figuerola, 1993).

La medición se realizó a 20°C y cuando hubo variación de la temperatura se llevó a cabo una corrección de la medición con la ayuda de tablas de ICUMSA (1998).

Determinación del Porcentaje Alcohol-Volumen

Se realizó de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana NOM-142-SSA1-1995. En este análisis se determina el porcentaje de alcohol en volumen en vinos y aguardientes por medio de una destilación de la muestra; es decir, la cantidad de alcohol etílico puro contenido en 100 volúmenes en una mezcla hidroalcohólica.

La lectura se llevó a cabo a 20°C por medio de un juego de alcoholímetros calibrados y/o verificados con escala de % en volumen graduados en % Alc. Vol.; en caso de que la muestra no se encontrara a la temperatura indicada se hizo un ajuste de la lectura por temperatura con la ayuda de tablas especiales.

Determinación de Metanol

Se realizó por medio de cromatografía de gas de acuerdo a la NOM-142-SSA1-1995 en un cromatógrafo de gases HP 5890 series II con una columna capilar carbowax HP de 0.25mm de diámetro interno. Se utilizó un detector de ionización de flama y nitrógeno como gas acarreador. Además, se utilizó un estándar interno de 2-pentanol. La muestra utilizada fue la descrita en la determinación de grado alcohólico. Además de esto se utilizó una rampa o subida de temperatura para llevarla de 34 a 150°C en el horno del cromatógrafo durante la corrida. La rampa siguió las siguientes condiciones: 34°C por 12.5 min seguido

con incrementos de temperatura de 19°C/min hasta llegar a 100°C y se mantiene así por 1 min. Finalmente la temperatura se incrementó a una velocidad de 4°C/min hasta llegar a los 150°C manteniéndose por 2 min.

Determinación de Ocratoxina A

Se realizó de acuerdo a la técnica propuesta por Bezzo y Col. (2000) la cual consiste en una extracción y concentración de la micotoxina por medio de la utilización de columnas de inmunoafinidad ochraprep (de la compañía r-biopharm).

El proceso de preparación del vino consistió en una centrifugación a 12,765 xg por 5 min para separar la mayor cantidad posible de sólidos, después se ajustó el pH a 7.4 con la ayuda de soluciones de hidróxido de sodio 1N y ácido fosfórico 2M. Una vez que la muestra estaba lista se hicieron pasar lentamente 30 mL de ésta por la columna de inmunoafinidad. Posteriormente se pasaron 5 mL de agua para lavar la columna y por último 6 mL de una solución de metanol- ácido acético (98:2 v/v) para eluir la OTA.

Una vez que la micotoxina fue extraída se evaporó la solución de metanol-ácido acético por medio de un baño maría y la OTA seca se disolvió en 3 mL de una solución de fases móviles en proporción 50:50 y se homogenizó. Ya obtenida la solución concentrada se hizo pasar a través de un acrodisco de 0.45 nm para eliminar las impurezas que pudieran haber quedado en la muestra y se inyectó al HPLC.

En el equipo de cromatografía líquida se utilizó una columna Hypersil marca Thermo de 2.1 mm de diámetro interno y 25 cm de longitud; como fases móviles se utilizaron acetato de sodio 4 mM-ácido acético (19:1) y acetonitrilo con un flujo isocrático de 0.4 mL/min y una proporción de fases de 48:52 (v/v), respectivamente. El detector utilizado fue de fluorescencia y se utilizaron $\lambda_{exc}=230\text{nm}$ y $\lambda_{emiss}=458\text{nm}$ como ondas de excitación y emisión, respectivamente.

Identificación de Hongos

Primero se realizó un estudio preliminar en mosto de uva para observar las especies presentes que podrían ser productoras de OTA en una siembra en placa vaciada con medio agar papa dextrosa a 22°C por 5 días de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana NOM-111-SSA1-1994 y se identificaron colonias de *Aspergillus*. Debido a esto se optó por realizar una siembra en agar czapek para identificar la especie productora de la micotoxina de acuerdo a la metodología descrita por Klich (2002). Esta técnica consiste en una siembra en superficie en el agar mencionado por 5 días, después de esto se hace un frotis en un portaobjetos y una tinción para observar las características del hongo. Además, se aisló el hongo en un microcultivo para observar sus estructuras morfológicas en los primeros estadios de desarrollo.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se realizó el análisis de los datos para describir el comportamiento de la fermentación en el tiempo a través de la variación de la concentración de azúcares fermentables y la producción de etanol, además, se obtuvieron relaciones matemáticas para expresar la generación del metanol en el tiempo y como es afectada esta producción por la temperatura de fermentación y la concentración de enzimas pécticas. Además, se estudió el efecto que tienen el tiempo y la temperatura en la concentración de OTA en el vino.

Control de Temperaturas y Toma de Muestras

Se realizaron mediciones periódicas de la temperatura de los mostos durante el proceso de fermentación. Se manejaron temperaturas de 20 ± 1 , 30 ± 1.73 y $35\pm 2.2^{\circ}\text{C}$.

Los tiempos de fermentación variaron de acuerdo a la temperatura utilizada, para 35°C se tuvo un tiempo de 28 h, para 30°C de 42 h y para 20°C de 117 h. Con base en lo anterior se eligieron los tiempos de toma de muestra de 4, 6 y 12 h para 35, 30 y 20°C , respectivamente; esto con el fin de obtener suficientes puntos para describir el comportamiento de la fermentación.

Consumo de Azúcares Fermentables

Se observó el consumo de azúcares fermentables mediante la determinación de $^{\circ}\text{Bx}$ de cada una de las muestras tomadas en el transcurso de la fermentación y se observó su comportamiento en los distintos tratamientos que se les dio a los mostos. El valor de $^{\circ}\text{Bx}$ inicial de las fermentaciones de las diferentes temperaturas varió debido al avance del período de la vendimia; es decir, cuanto más pasa el tiempo de maduración el valor de $^{\circ}\text{Bx}$ es mayor; el menor utilizado fue

de 17.0 y el mayor de 17.8; estos valores se encuentran dentro del rango de °Bx propuesto por Vine (2002) que va de 14 a 23°.

Se realizaron ajustes para describir matemáticamente el comportamiento de la variación de los °Bx durante el proceso de fermentación a distintas temperaturas. En el caso de la temperatura de 20°C la regresión obtenida fue:

$$^{\circ}Bx_{20} = 34.06 - 7.19Ln(t)$$

donde °Bx representa los grados Bx y t el tiempo de fermentación; el coeficiente de determinación (R^2) obtenido fue de 0.9888.

La ecuación que representa la variación de °Bx para la fermentación a 30°C es:

$$^{\circ}Bx_{30} = 40.59 - 10.95Ln(t)$$

para la cual se obtuvo una R^2 de 0.9980. Y en el caso de la fermentación a 35°C la ecuación obtenida fue:

$$^{\circ}Bx_{35} = 36.15 - 10.93Ln(t)$$

con una R^2 de 0.9979.

En la Figura 8 se muestra el efecto que tiene la temperatura en el valor de °Bx durante el proceso de fermentación y se puede observar claramente el efecto de la temperatura en la velocidad de la fermentación, a 35°C se obtuvo un menor tiempo que a 30°C y esta a su vez uno menor que el de 20°C.

La variación de estos tiempos se debe a la actividad y reproducción de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* que se ve afectada por la temperatura a la que se somete; Mensonides y Col. (2002) reportó que la temperatura óptima de crecimiento de la levadura es de 37°C y en temperaturas mayores y menores a ésta, la actividad de la levadura se ve disminuida.

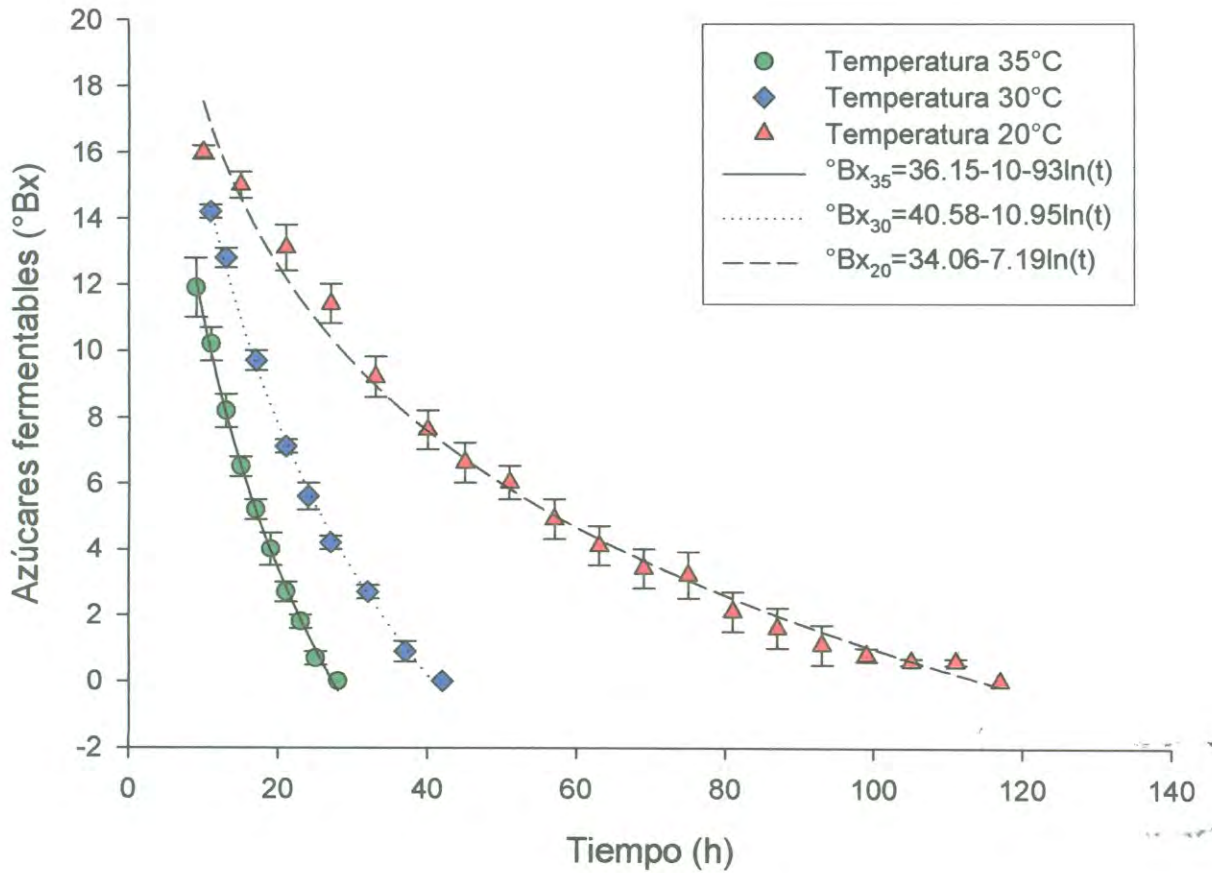


Figura 8. Efecto de la temperatura y el tiempo sobre la cantidad de azúcares (expresado en °Bx) durante el proceso de fermentación

Producción de alcohol en la fermentación

La producción de etanol es expresada en %Alc.Vol. ya que aún cuando en el valor de esta medición están incluidos todos los alcoholes presentes en el vino, el alcohol mayoritario de una fermentación alcohólica es el etanol ya que este es el propósito de realizar este proceso (Delfini y Fórmica, 2001).

Se obtuvieron diferentes contenidos finales de etanol de acuerdo al contenido inicial de azúcar (expresado en °Bx) de los frutos. El menor porcentaje obtenido fue de 8.6 al inicio de la vendimia y un máximo de 9.3 en las últimas pruebas; nuevamente, estas diferencias se deben a que las fermentaciones fueron llevadas a cabo por bloques de 9 y al avanzar el tiempo de la vendimia los °Bx iniciales iban aumentando por la maduración del fruto.

Se realizaron regresiones para describir matemáticamente el comportamiento de generación del alcohol etílico durante el proceso de fermentación de acuerdo a la temperatura utilizada. Las tres ecuaciones obtenidas se ajustaron a un modelo cuadrático. La ecuación obtenida para el comportamiento de la generación de etanol a 20°C es:

$$AV_{20} = 3.2 \times 10^{-3} + 0.16t - 7.0 \times 10^{-3} t^2$$

donde AV representa el % Alc. Vol. y t el tiempo de fermentación. Para esta regresión se obtuvo una R^2 de 0.9993.

En el caso de la fermentación a 30°C la ecuación obtenida fue:

$$AV_{30} = 2.9 \times 10^{-2} + 0.28t - 1.3 \times 10^{-3} t^2$$

con una R^2 de 0.9986.

Para la fermentación a 35°C la regresión elegida es expresada por la siguiente ecuación:

$$AV_{35} = 7.8 \times 10^{-2} + 0.38t - 2.3 \times 10^{-3} t^2$$

para la cual se obtuvo una R^2 de 0.9913.

Nuevamente se observa de manera muy clara el efecto de la temperatura en el tiempo de fermentación (Fig. 9), el cual se debe a que la actividad de la levadura utilizada se ve afectada por la temperatura de fermentación (Mensonides y Col. 2002), en el rango de temperaturas utilizado se observa que a 35°C, la temperatura más elevada en esta investigación, se tiene una mayor velocidad de producción de etanol que a las temperaturas de 30 y que a 20°C.

Rendimiento de la Producción de etanol

De acuerdo a Dharmadhikari (1999) y de manera ideal a partir de 1 mol de glucosa se producen 2 moles de etanol y 2 moles de dióxido de carbono; pero en la práctica esta relación no se cumple exactamente, por lo tanto es necesario calcular el rendimiento de la producción de etanol, que es expresado como la cantidad de azúcar (expresada en °Bx) necesaria para incrementar el 1 % Alc. Vol. en la fermentación.

Teóricamente, la producción de etanol en la fermentación debe ser 51.1% en peso de la glucosa presente, pero en la práctica es un poco menor, aproximadamente 47 a 48% en peso del azúcar fermentada (Dharmadhikari 1999).

Se realizaron los cálculos para obtener el efecto de la temperatura y la concentración de enzimas pécticas sobre el rendimiento de producción de etanol, expresado a través de la relación entre la cantidad de °Bx necesarios para aumentar 1 % Alc. Vol. y los resultados se muestran en la Tabla 5. Se realizó un análisis de comparación de medias de todos los tratamientos y se encontró que no había diferencia significativa entre los mismos; los valores de rendimiento son similares a los manejados por la industria de aproximadamente 1.9°Brix por cada 1% Alc. Vol.. La razón por la que no hay diferencia significativa puede ser debido a que la cantidad de azúcar que es fermentada por los microorganismos es la

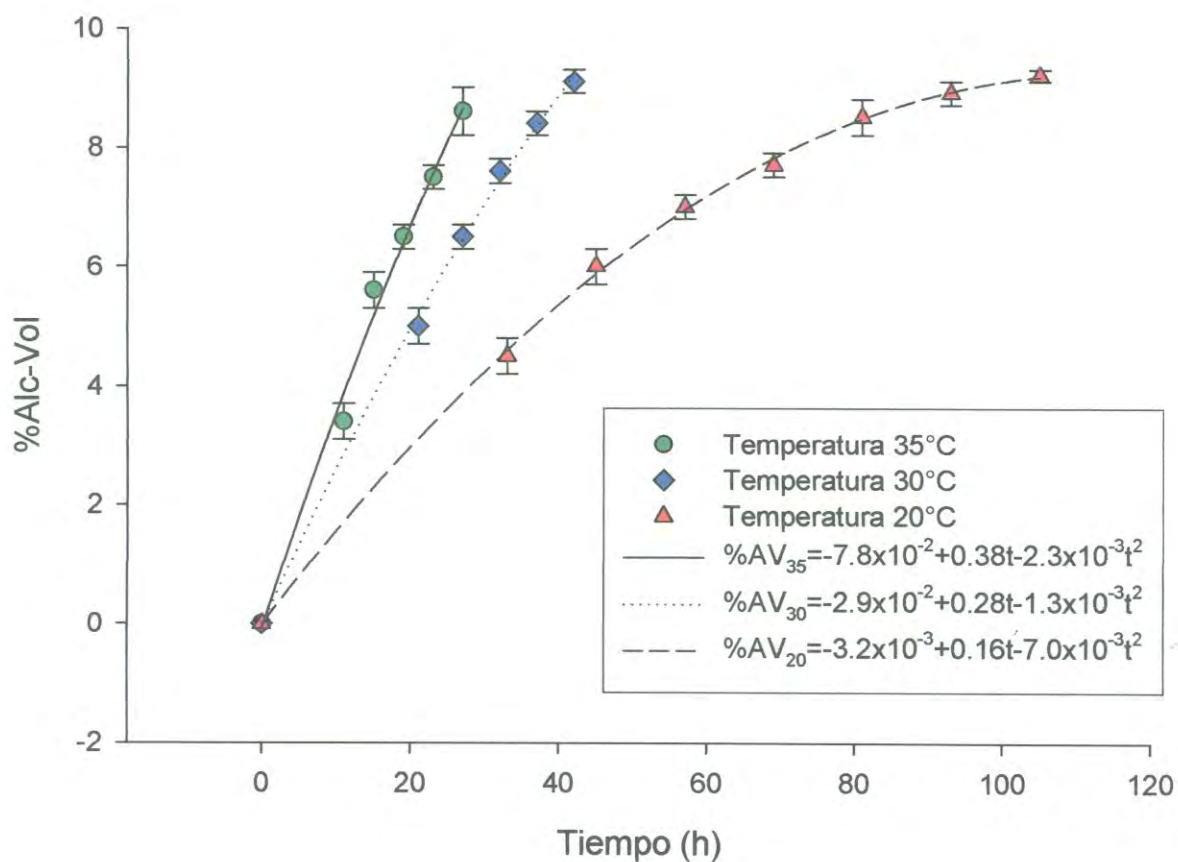


Figura 9. Efecto de la temperatura y el tiempo de fermentación en el contenido de etanol, expresado en % Alc. Vol., durante el proceso de fermentación.

R12 T. 964

Tabla 5. Efecto de la temperatura y la concentración de enzima pécica en la producción de etanol por °Bx.

Temperatura (°C)	Concentración de enzima (μL/kg de uva)	°Brix para producir 1% Alc. Vol.*
20	0	1.906±0.012 ^a
	9	1.906±0.012 ^a
	18	1.941±0.012 ^a
30	0	1.918±0.065 ^a
	9	1.896±0.051 ^a
	18	1.945±0.043 ^a
35	0	1.943±0.038 ^a
	9	1.943±0.022 ^a
	18	1.928±0.033 ^a

* Cada valor es el promedio de tres determinaciones
Letras iguales no hay diferencia significativa (p<0.05)

misma, es decir, un cierto porcentaje de el azúcar presente es convertido a etanol y este porcentaje no se ve afectado por la concentración de enzimas pécticas ni por la temperatura de fermentación, sin embargo, como se mostró en las secciones anteriores, las velocidades de formación de etanol a partir del azúcar si se ve afectada por la temperatura.

De acuerdo al Equipo de Viticultura y Enología (Viticulture and Enology Team) de la Universidad Estatal de Washington (WSU) (2004) se puede obtener una ecuación lineal para estimar la cantidad de alcohol que se formará durante la fermentación a partir de la cantidad de azúcar detectada en el fruto. En el caso de este estudio, como no se encontró diferencia en la cantidad de alcohol obtenida por los diferentes tratamientos, se calculó una sola expresión matemática; ésta es:

$$\%AV = -0.0198 + 0.52^\circ Bx$$

Donde %AV es el % Alc. Vol.; la ecuación tiene un coeficiente de determinación de 0.9909.

Se ha reportado que el rendimiento de la producción de etanol varía entre las áreas de cultivo de la uva y el año de producción (Jones y Ough, 1985) por lo cual se recomienda comprobar que la ecuación utilizada es válida en otros años de cosecha.

Metanol

Producción de Metanol por Temperatura de Fermentación

Se llevó a cabo la comparación entre las concentraciones finales de metanol en el vino con respecto a la temperatura de fermentación; en este caso se realizó una fermentación más con el fin de observar el comportamiento del metanol en el rango de 20 a 30°C

Se realizó un análisis de comparación de medias de Tukey para observar el efecto de la temperatura en la concentración final de metanol en el vino y se

obtuvo que la temperatura de 25°C presentó una concentración significativamente más elevada que las demás temperaturas mientras que la fermentación a 35°C una significativamente inferior (Fig. 10).

El incremento en la primera parte se presenta debido a que, al igual que cualquier reacción no enzimática, cuando se eleva la temperatura la velocidad de reacción también incrementa, pero en el caso de las reacciones enzimáticas el fenómeno alcanza rápidamente su límite porque el calor desnaturaliza las proteínas, como es el caso de las enzimas, provocando la disminución de la velocidad de reacción (Karlson, 1975).

En este caso la enzima presentó una mayor actividad a los 25°C lo cual concuerda con la hoja de seguridad del proveedor de la enzima comercial; este tipo de comportamiento fue reportado también por Magashi (citado por Arvid, 2004), pero la temperatura óptima de actividad de la enzima fue de aproximadamente 60°C y por Dahodwala y Col. (1974) con una de 40°C, aunque, de acuerdo al estudio realizado por Kuldiloke (2002) la actividad de la PE va disminuyendo gradualmente con el aumento de temperatura en el rango de 40 a 90°C.

A pesar del efecto de la temperatura sobre la concentración de metanol, los valores más altos se encuentran por debajo de los límites establecidos por la OIV (2004); aún cuando se han encontrado niveles de metanol en bebidas alcohólicas mexicanas, tales como bacanora y tequila, por arriba de los niveles máximos permitidos para este país (Lachenmeier y Col., 2006).

Producción de Metanol con respecto a la concentración de enzima.

Se ha reportado que la concentración de metanol en el vino es afectada por el tratamiento con enzimas pécticas (Lao y Col., 1997) por lo que se realizó un análisis de comparación de medias para observar el efecto de la concentración de enzimas en la generación de este tóxico (Tabla 6)

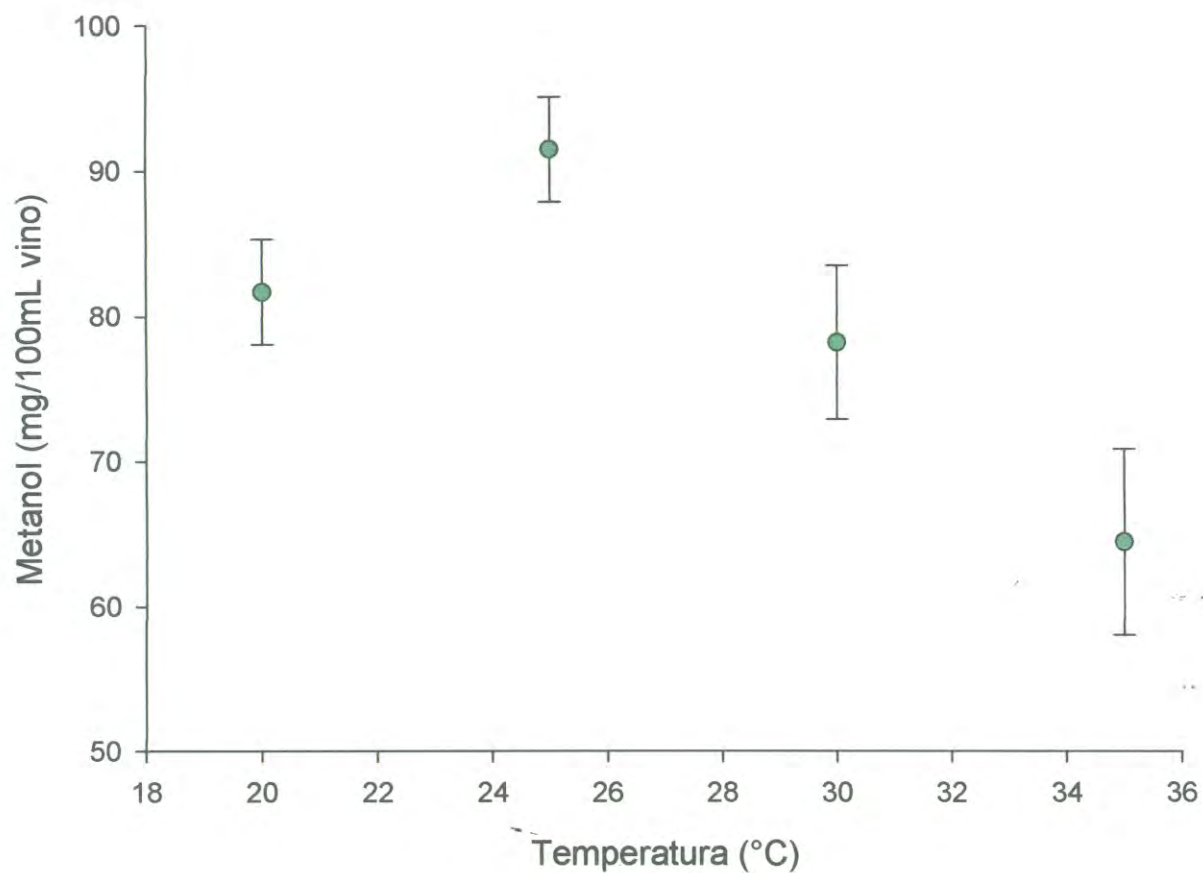


Figura 10. Efecto de la temperatura en la producción de metanol en el vino al final de la fermentación, incluyendo todas las concentraciones de enzimas pécticas utilizadas en este estudio.

Tabla 6. Efecto de la temperatura y la concentración de enzima péctica en la concentración de metanol en el vino.

Temperatura (°C)	Enzima ($\mu\text{L}/\text{kg}$ de uva)	Metanol (mg/100 mL vino)*
20	0	80.596 \pm 4.050 ^{bc}
	9	83.192 \pm 4.952 ^{abc}
	18	81.150 \pm 2.394 ^{bc}
25	0	90.860 \pm 1.177 ^{ab}
	9	95.866 \pm 3.387 ^a
	18	88.763 \pm 1.402 ^{abc}
30	0	80.143 \pm 3.052 ^{bc}
	9	78.001 \pm 9.030 ^{bc}
	18	76.170 \pm 3.247 ^c
35	0	63.543 \pm 3.267 ^e
	9	58.065 \pm 3.431 ^{de}
	18	71.538 \pm 1.783 ^{cd}

* Cada valor es el promedio de tres determinaciones

abcde Valores con misma letra no presentaron diferencias significativas ($p < 0.05$)

No se observaron diferencias significativas en la concentración de metanol a las diferentes concentraciones de enzima por temperatura a 20, 25 y 30°C, solo en el caso de 35°C donde la concentración de 18 $\mu\text{L}/\text{kg}$ de uva produjo una concentración significativamente mayor a las concentración de 0 $\mu\text{L}/\text{kg}$, al igual que en el estudio realizado por Gnekow y Ough (1976) donde el efecto de la concentración de enzima se observó solamente en la temperatura de 37°C y no en las bajas como la de 21°C. Esta diferencia puede deberse a que la levadura *Saccharomyces cerevisiae* tiene una actividad máxima a los 37°C (Mesonides y Col., 2002) donde puede producir la enzima PE (Gainvors y Col., 1994a) y ésta producción sea la suficiente como para provocar la diferencia entre las concentraciones de metanol.

Producción de metanol durante el proceso de fermentación

Se obtuvo un comportamiento similar al descrito por Magashi (citado por Arvid, 2004) en el proceso de fermentación de cerezas; en nuestro caso, la concentración de metanol va aumentando hasta llegar a un máximo, el cual está descrito en las ecuaciones expresadas abajo.

Los ajustes se realizaron por concentración de enzimas y por temperatura; para la concentración de 0 $\mu\text{L}/\text{kg}$ de uva se obtuvieron las siguientes relaciones matemáticas:

$$Met_{20} = 24.24(1 - e^{-0.062\%AF}) \quad R^2=0.9851$$

$$Met_{30} = 25.16(1 - e^{-0.037\%AF}) \quad R^2=0.9988$$

$$Met_{35} = 18.59(1 - e^{-0.064\%AF}) \quad R^2=0.9878$$

donde Met es la concentración de metanol expresado en mM y %AF el porcentaje de avance de la fermentación que es el % de °Brix que ya han sido fermentados del total que se tiene al inicio de la fermentación.

En el caso de las fermentaciones con 9 $\mu\text{L}/\text{kg}$ de uva de concentración de enzima se obtuvieron las siguientes ecuaciones:

$$Met_{20} = 26.13(1 - e^{-0.039\%AF}) \quad R^2=0.9583$$

$$Met_{30} = 24.46(1 - e^{-0.046\%AF}) \quad R^2=0.9907$$

$$Met_{35} = 19.05(1 - e^{-0.067\%AF}) \quad R^2=0.9960$$

y para las fermentaciones con 18 $\mu\text{L}/\text{kg}$ de uva se obtuvieron los siguientes ajustes:

$$Met_{20} = 25.92(1 - e^{-0.045\%AF}) \quad R^2=0.9931$$

$$Met_{30} = 24.12(1 - e^{-0.054\%AF}) \quad R^2=0.9997$$

$$Met_{35} = 21.44(1 - e^{-0.061\%AF}) \quad R^2=0.9954$$

las gráficas de todas las ecuaciones se encuentran en las Figuras 11, 12 y 13 para las concentraciones de enzimas pécticas de 0, 9 y 18 $\mu\text{L}/\text{kg}$ de uva, respectivamente.

En la Figura 11, donde no se adicionan enzimas pécticas a la fermentación, se observa claramente que en la temperatura de 20°C y 30°C las concentraciones de metanol no presentan diferencia significativa y para la temperatura de 35°C la línea que representa el comportamiento de la generación de metanol se encuentra por debajo de las otras dos por más de 5 unidades de diferencia, lo cual nos indica que para este caso, solo se puede observar el efecto que tiene la temperatura sobre la concentración del tóxico.

Para la adición de 9 $\mu\text{L}/\text{kg}$ de uva, la Figura 12 vuelve a mostrar el mismo comportamiento que el descrito para el control, la concentración de metanol a 35°C es menor que las anteriores y nuevamente, solo se observa el efecto de la

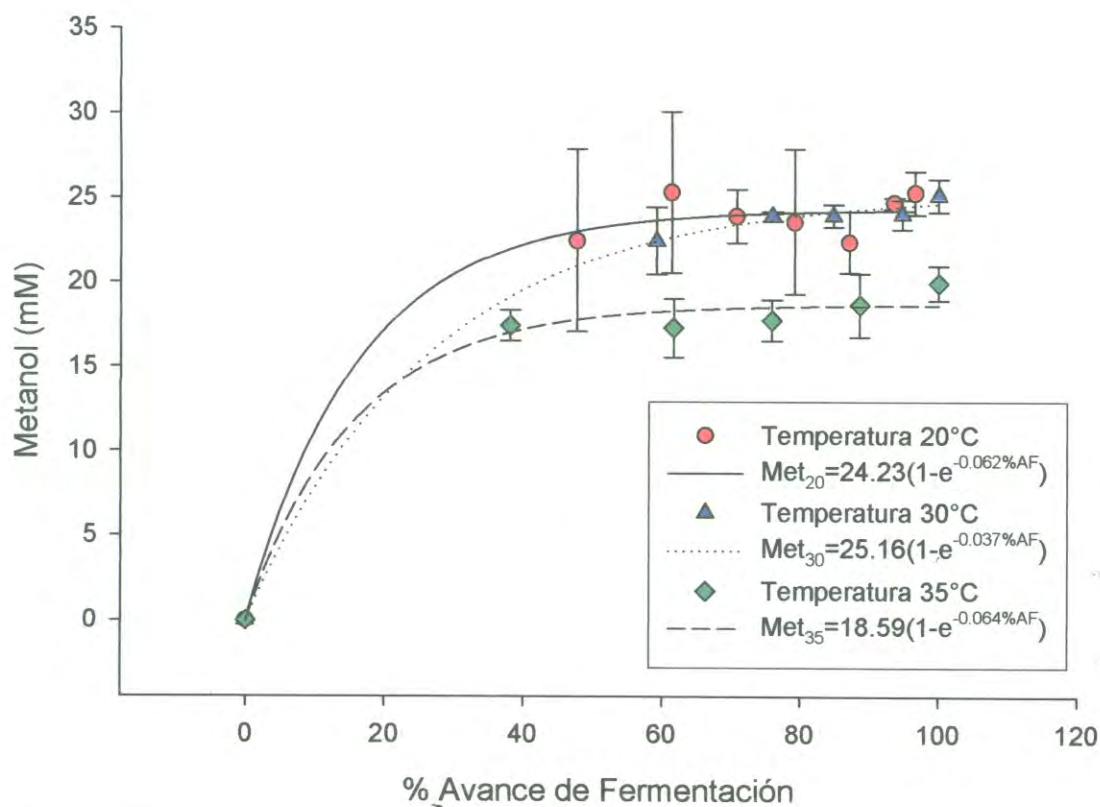


Figura 11. Efecto de la temperatura sobre la producción de metanol durante el proceso de fermentación sin adición de enzimas pécticas.

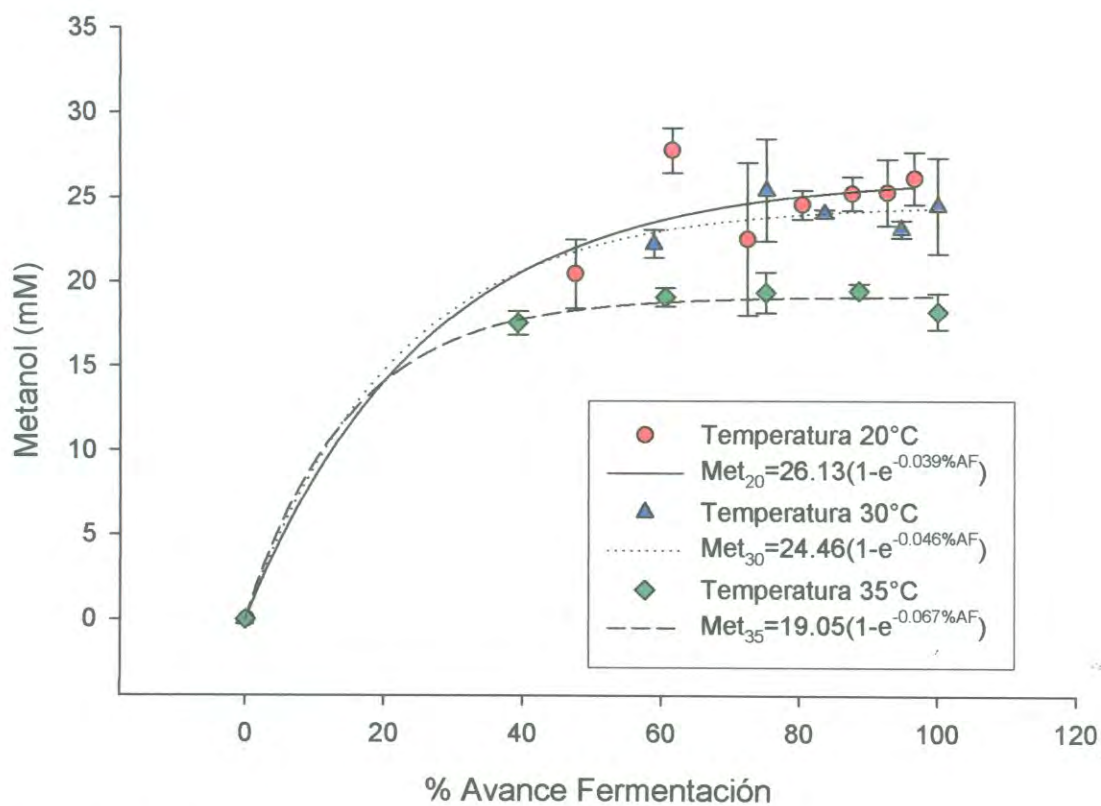


Figura 12. Efecto de la temperatura sobre la producción de metanol durante el proceso de fermentación con adición de enzimas pécticas a una concentración de 9 $\mu\text{L}/\text{kg}$ de uva.

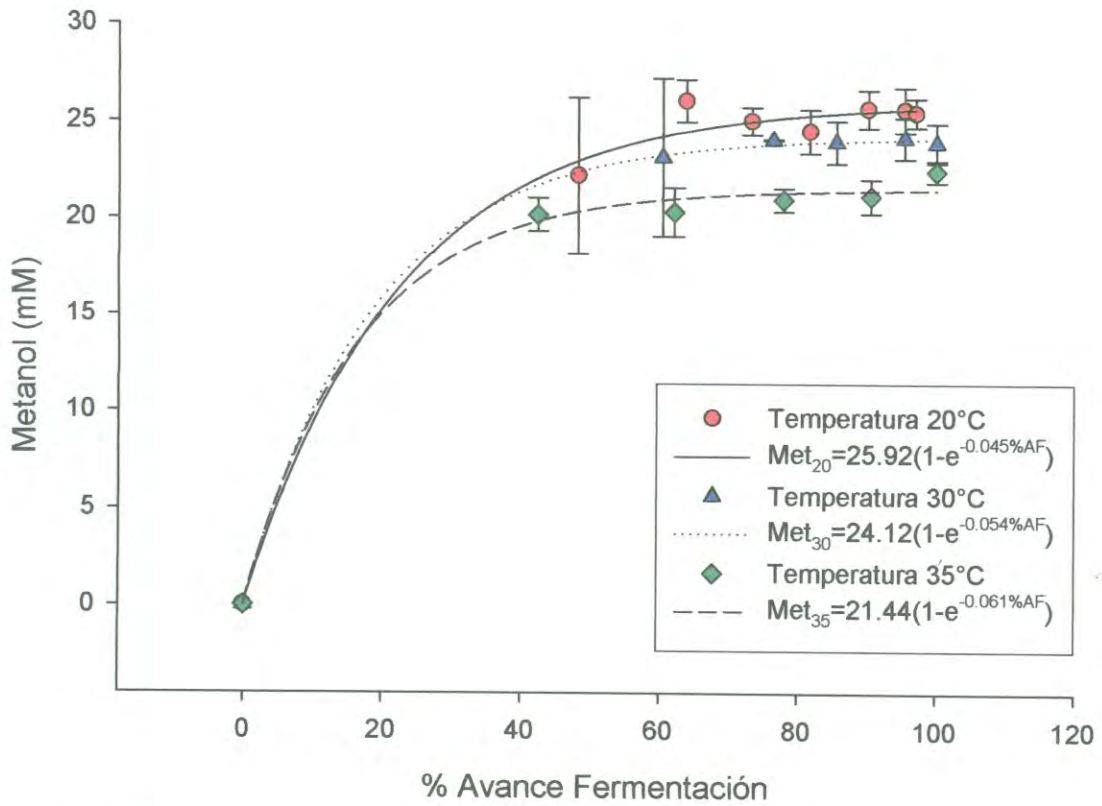


Figura 13. Efecto de la temperatura sobre la producción de metanol durante el proceso de fermentación con la adición de enzimas pécticas a una concentración de 18 $\mu\text{L}/\text{kg}$ de uva.

temperatura, pero en el caso de la adición de 18 $\mu\text{L}/\text{kg}$ de uva de enzimas pécicas ya no se observa una diferencia significativa entre las fermentaciones a 30 y 35°C, ya que, como se había discutido anteriormente, aproximadamente a esta temperatura se presenta la mayor actividad de la levadura (Mesonides y Col., 2002) y se pudo haber generado la suficiente enzima PE para aumentar la cantidad de metanol producida.

Ocratoxina A

Validación del método

Se preparó un estándar de OTA con distintas concentraciones para identificar el tiempo de retención y el límite de detección del equipo. Se analizaron muestras de 1, 2, 5, 7 y 10 ng/mL (Fig. 14) y el tiempo de retención bajo las condiciones experimentales fue de 4.4 min. También se observó que el pico correspondiente a 1 ng/mL es observable mas no cuantificable puesto que la señal no es 5 veces mayor al ruido, por lo tanto se consideró que 2 ng/mL era el mínimo cuantificable para esta técnica. Se construyó una curva de calibración y se obtuvo un ajuste a una recta con una r^2 de 0.9970 (Fig. 15).

También se realizó la determinación del porcentaje de recuperación de la técnica. Se contaminaron muestras en las cuales no se había detectado la micotoxina a concentraciones conocidas y se obtuvo un porcentaje de recuperación de 96%, porcentaje con el que se realizaron los ajustes de los resultados.

Presencia de OTA durante el proceso de fermentación

La micotoxina fue detectada en todas las muestras analizadas, pero solo se pudo cuantificar en las correspondientes a la temperatura de 30°C (tabla 7); realizando el balance de materia, el mínimo cuantificable para la metodología utilizada es 0.20 ng/mL. Las figuras 16, 17 y 18 muestran un cromatograma de las temperaturas de 20, 30 y 35°C , respectivamente.

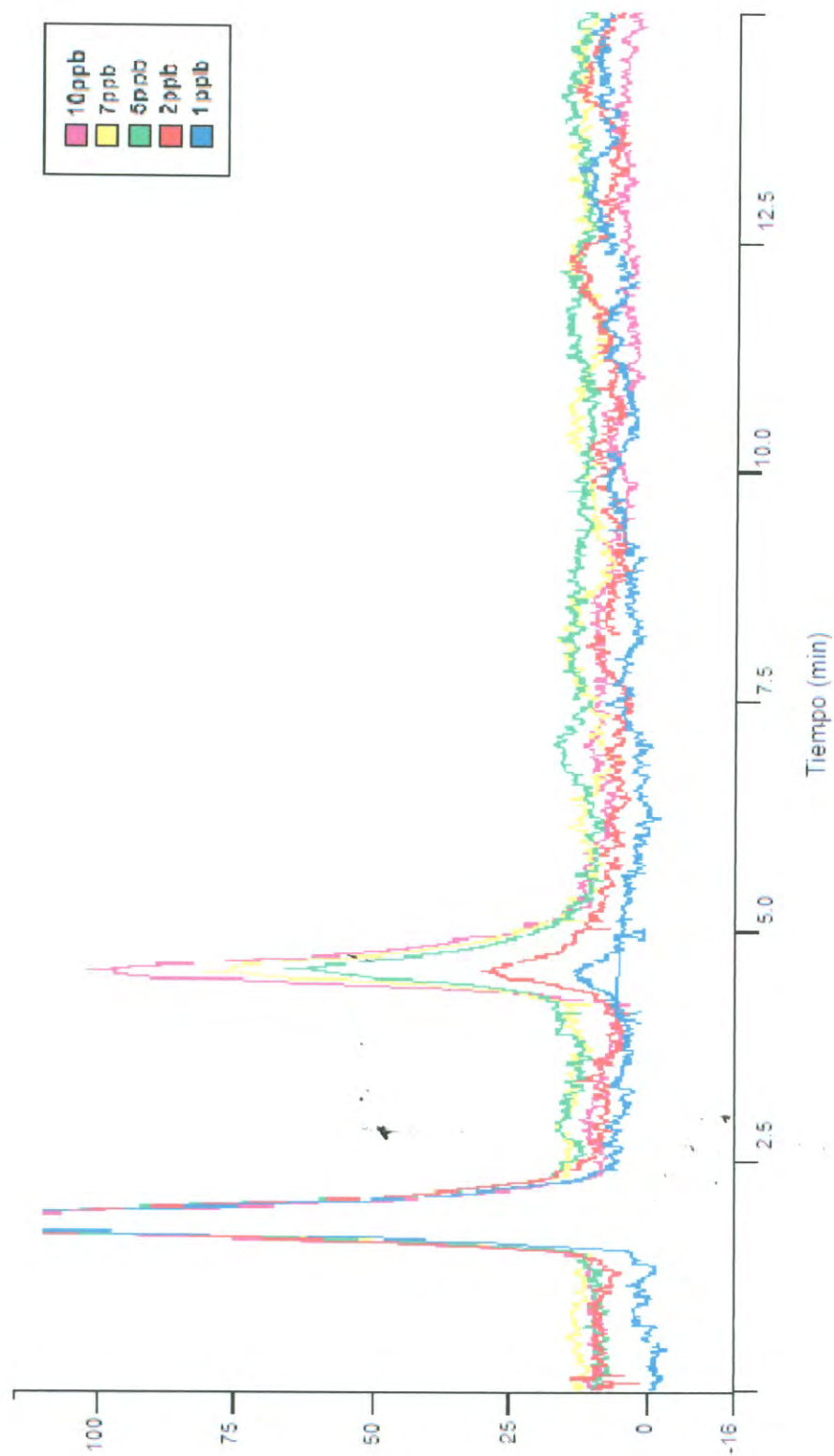


Figura 14. Tiempo de retención de distintas concentraciones de estándares de OTA en cromatografía líquida.

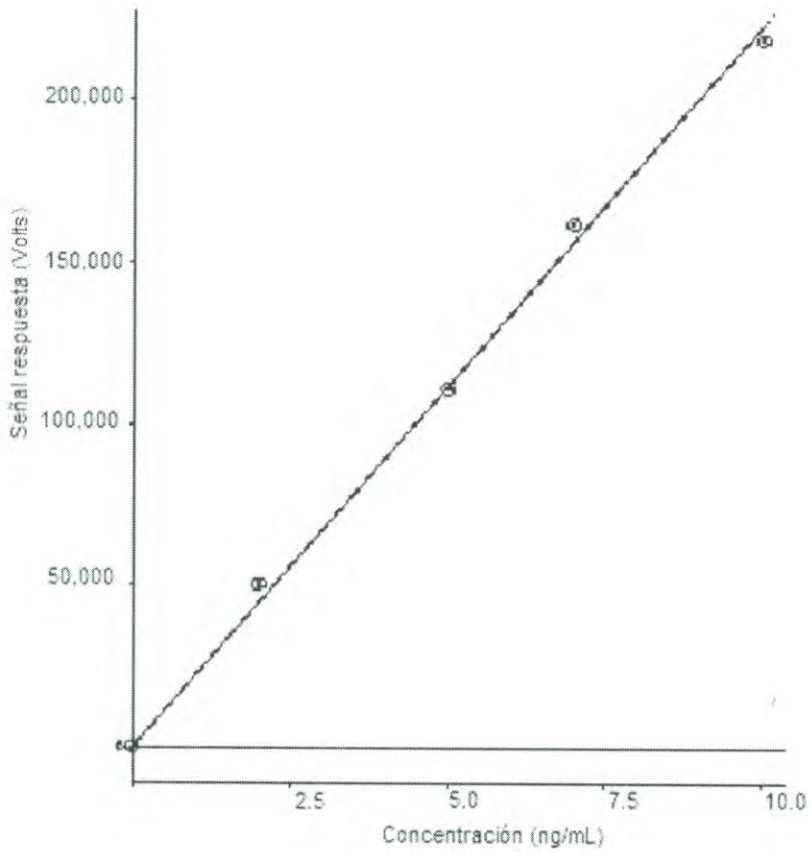


Figura 15. Curva de calibración para técnica de determinación de OTA.

Tabla 7. Presencia de OTA durante la fermentación a 20, 30 y 35°C

Temperatura	Tiempo	OTA (ng/mL)*
20	0	NC
	57	NC
	105	NC
30	0	3.423±0.332 ^a
	32	3.069±0.235 ^a
	42	3.222±0.139 ^a
35	0	NC
	18	NC
	28	NC

* Cada valor es el promedio de dos repeticiones y dos lecturas.

a Valores con misma letra no presentaron diferencias significativas ($p < 0.05$)

NC Valores no cuatificables

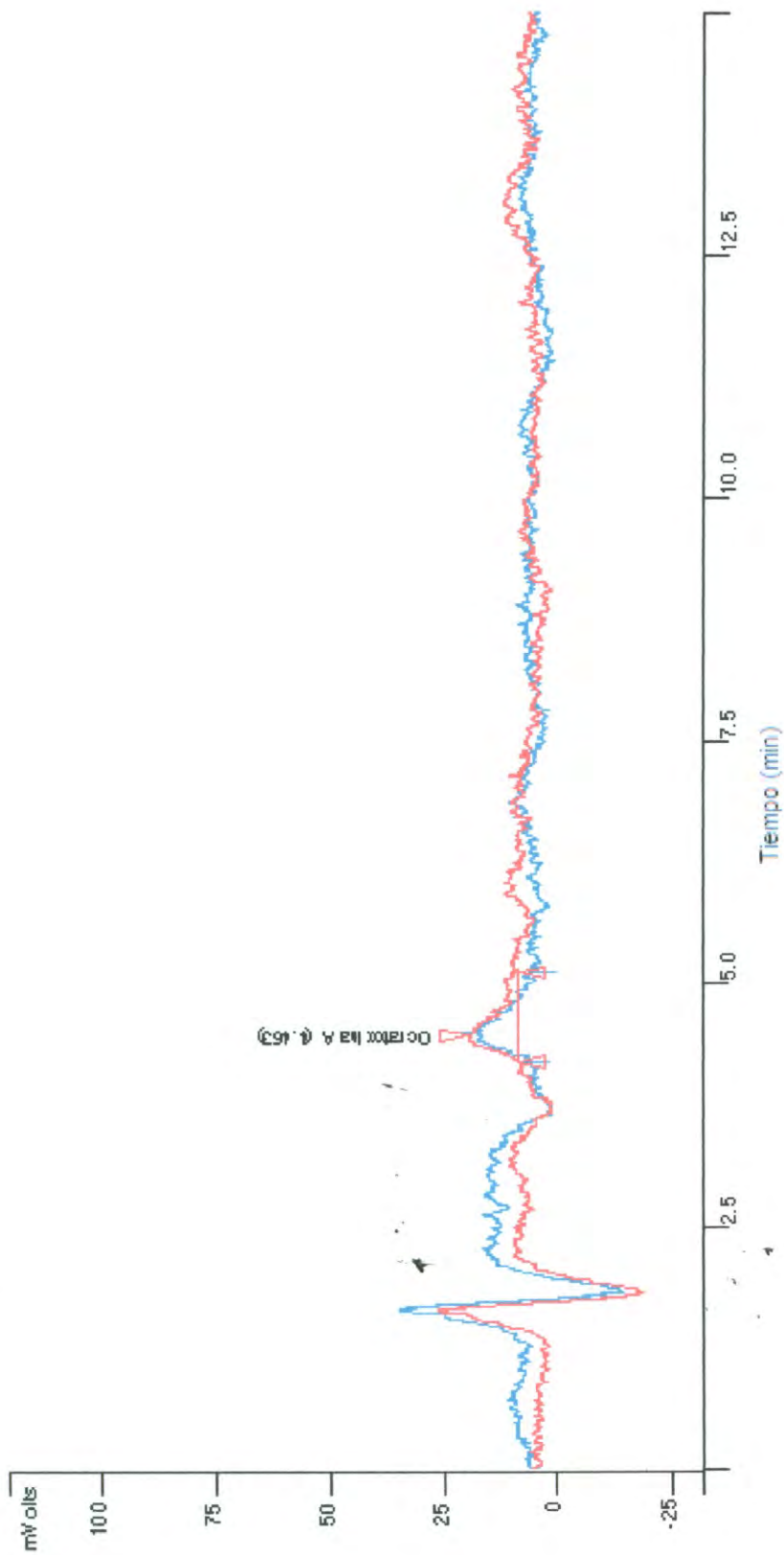


Figura 16. Cromatograma para la detección y cuantificación de OTA en la fermentación a 20°C en cromatografía líquida.

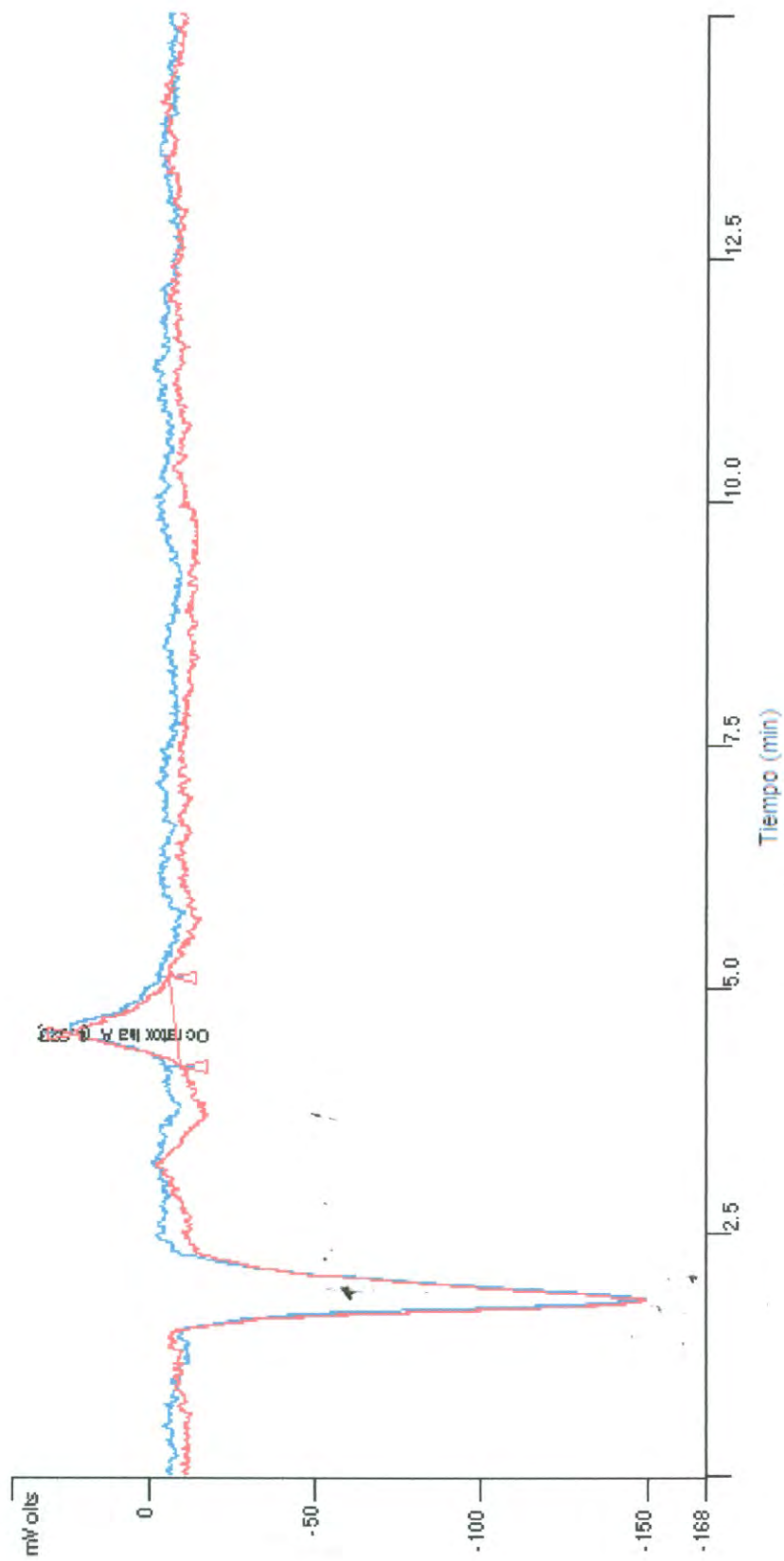


Figura 17. Cromatograma para la detección y cuantificación de OTA en la fermentación a 30°C en cromatografía líquida.

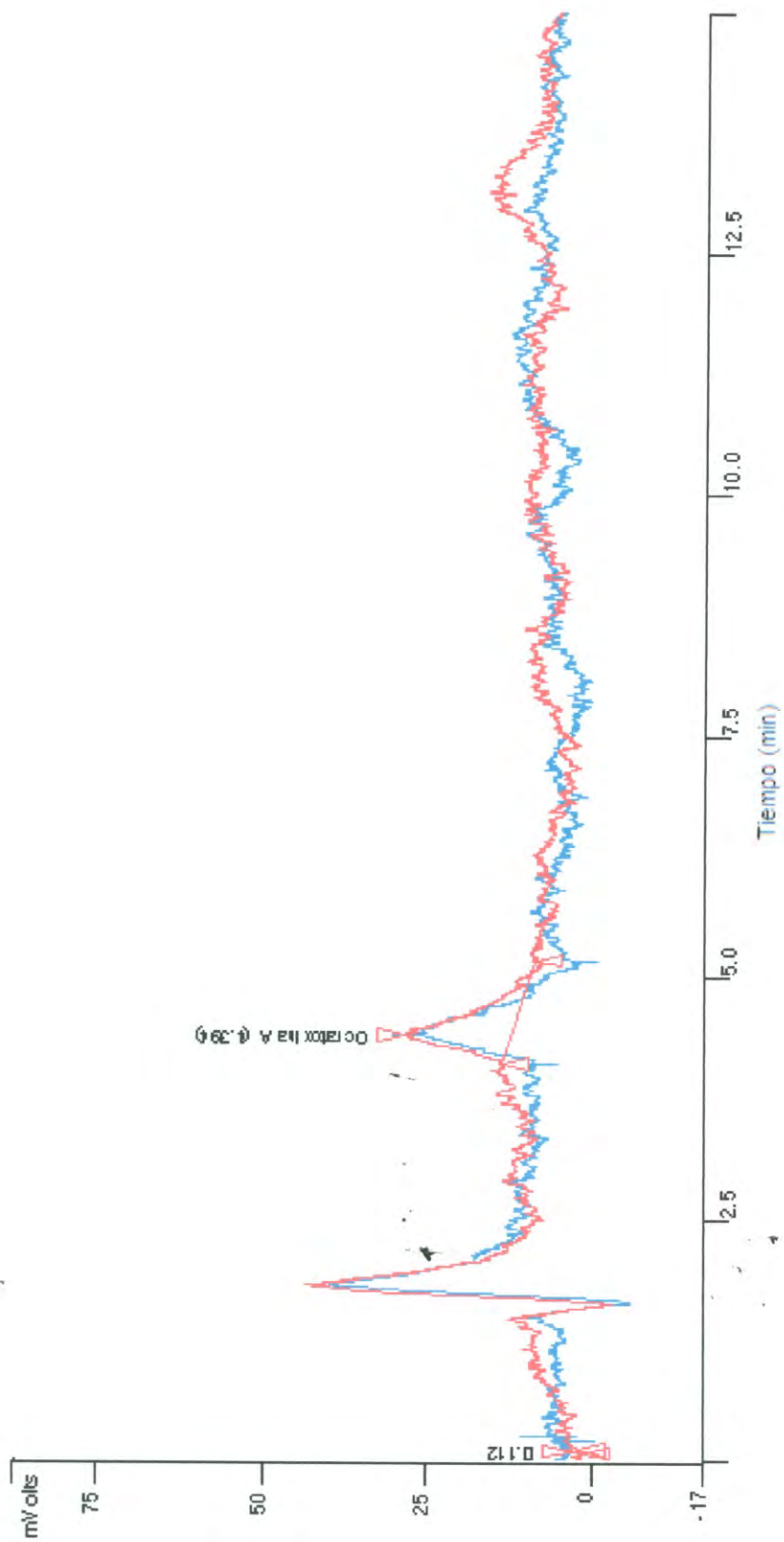


Figura 18. Cromatograma para la detección y cuantificación de OTA en la fermentación a 35°C en cromatografía líquida.

De acuerdo a Serra y Col. (2005) se ha encontrado que la síntesis de la micotoxina por el hongo puede ocurrir en las uvas antes de la cosecha, y por lo tanto, se puede presentar en el vino; en los resultados obtenidos de este estudio se observó la presencia de la micotoxina desde el inicio de la fermentación hasta el final de la misma, este comportamiento no se asemeja al reportado por Ratola (2005) quien en su estudio observó que durante la vinificación se redujo en un 92%.

Las especies del género *Aspergillus* son aeróbicas y someterlas a condiciones anaeróbicas afecta la actividad de enzimas específicas provocando una influencia en todo el metabolismo del microorganismo (Haq y Col., 2005); estas condiciones de anaerobiosis se dieron durante el proceso de la fermentación ya que la generación de etanol es un proceso anaeróbico (Madigan y Otheners, 2002 citado por Vullo y Wachsmann, 2005) lo cual pudo provocar que el hongo no se encontrara en las condiciones óptimas de la generación de la micotoxina.

Todos los valores de OTA en el estudio se encuentran por debajo del límite máximo recomendado por la OIV y la UE de 2 ng/ml ya que el valor más alto cuantificado fue de 0.3243 ng/mL. Este valor es similar a los valores máximos obtenidos por Bellí y Col (2004a), López de Cerain y Col. (2002) y el valor medio de Blesa y Col (2004) $<0.01 - 0.76$ ng/mL.

De acuerdo a los resultados de este estudio, la concentración de OTA en el producto terminado se debe únicamente a la cantidad de micotoxina presente al inicio de la fermentación, es decir, a la concentración presente en las uvas y por lo tanto se deben tomar las medidas adecuadas con el tiempo que permanece el fruto en la viña ya que Bellí y Col. (2004b) reportaron que entre mayor sea la permanencia del fruto en el campo se presenta un mayor crecimiento de hongos del género *Aspergillus* productores de OTA.

La producción de la micotoxina por el hongo se ve afectada por la humedad relativa y la temperatura a la que se ve sometido (Battilani y Pietri, 2002). Durante la época de cosecha de la uva se tuvieron temperaturas

elevadas de hasta 43°C y una alta humedad relativa debido a las lluvias que se presentaron, de hasta 42 mm (CONAGUA, 2006) lo que pudo provocar el crecimiento del hongo y la producción de la micotoxina; de acuerdo a Pardo y Col., (2005) La temperatura y humedad relativa óptima para la generación de OTA son 30°C, que fue la temperatura mas alta utilizada durante el estudio, y 100%, respectivamente.

No existe diferencia significativa en la concentración de OTA durante el tiempo de fermentación de acuerdo a los resultados obtenidos del análisis de comparación de medias, lo que significa que la cantidad de micotoxina producida en el campo es la misma que se encuentra presente al final de la fermentación y que la mejor manera de proteger a los consumidores contra los daños a la salud producidos por OTA es implementar buenas prácticas de agricultura para disminuir la presencia de las colonias de hongos en la uva, y por lo tanto, reducir la posibilidad de la producción de OTA en el vino (Sage y Col., 2002).

Se han reportado sólo dos estudios de concentraciones de OTA en vinos producidos en América; el primero es el de Pacin y Col. (2005) quienes no encontraron la presencia de la toxina en vinos argentinos y chilenos; el segundo es el realizado por Ng y Col. (2004) en vinos canadienses. Ellos observaron la presencia de la micotoxina en el 19% del total de sus muestras, y la concentración más elevada presente fue de 0.393 ng/mL que son concentraciones similares a las reportadas en este estudio. También se han reportado concentraciones similares de OTA, de hasta 0.43 ng /mL, producidas por *A. carbonarius* en uva cultivada en Francia (Sage y Col., 2004)

Identificación de Hongos

En la primera etapa de esta prueba, donde se llevó a cabo la cuenta en placa de hongos y levaduras del jugo de uva que ingresó a la planta vitivinícola, y se realizaron 3 repeticiones; se obtuvo un promedio de 5,400 unidades formadoras de colonia por mL de jugo de uva integradas por levaduras silvestres y hongos.

Para llevar a cabo la identificación de la especie de los hongos presentes, a partir de las colonias de estos se llevó a cabo un aislamiento por medio de un microcultivo para observar especies que fueran posibles productoras de OTA y se identificó al género *Aspergillus*. Por lo anterior se llevó a cabo un cultivo de siembra en superficie en agar czapek para caracterizar las colonias de *Aspergillus* presentes en el jugo de uva.

En el cultivo en agar czapek se observó un micelio blanco con cabezas conidiales de color oscuro que son características de la especie *A. carbonarius* y *A. niger* de acuerdo a Klich (2002), además de esto se llevaron a cabo observaciones microscópicas de frotis teñidos con azul de metileno y se observó claramente la cabeza conidial y las esporas, las dimensiones se muestran en la Figura 19 A y B respectivamente.

De acuerdo a las observaciones se puede decir que, presuntivamente, *A. niger* es el hongo productor de la micotoxina presente en el vino producido en esta investigación ya que el tamaño de las conidias se encuentran en el rango especificado por Klich (2002) de 3.5 a 4.5 μm y la vesícula de 30 a 75 μm y en el caso de *A. carbonarius* se describen conidias muy grandes de 7 a 10 μm de diámetro y vesículas de 65 a 90 μm .

Aunque *A. carbonarius* y no *A. niger* ha sido reportado como el mayor productor de OTA en el vino, se ha reportado la presencia de este mismo microorganismo en uvas dirigidas a la producción de vino en la región de Grecia por Tjamos (2004), y, de todos los hongos productores de OTA, *A. niger* es el que resiste las condiciones climatológicas más extremas de hasta 45-47°C (Pitt y Hocking, 1997 citado por Benford y Col., 2001), temperaturas similares a las reportadas para el área donde se encuentra ubicado el viñedo productor de la uva.

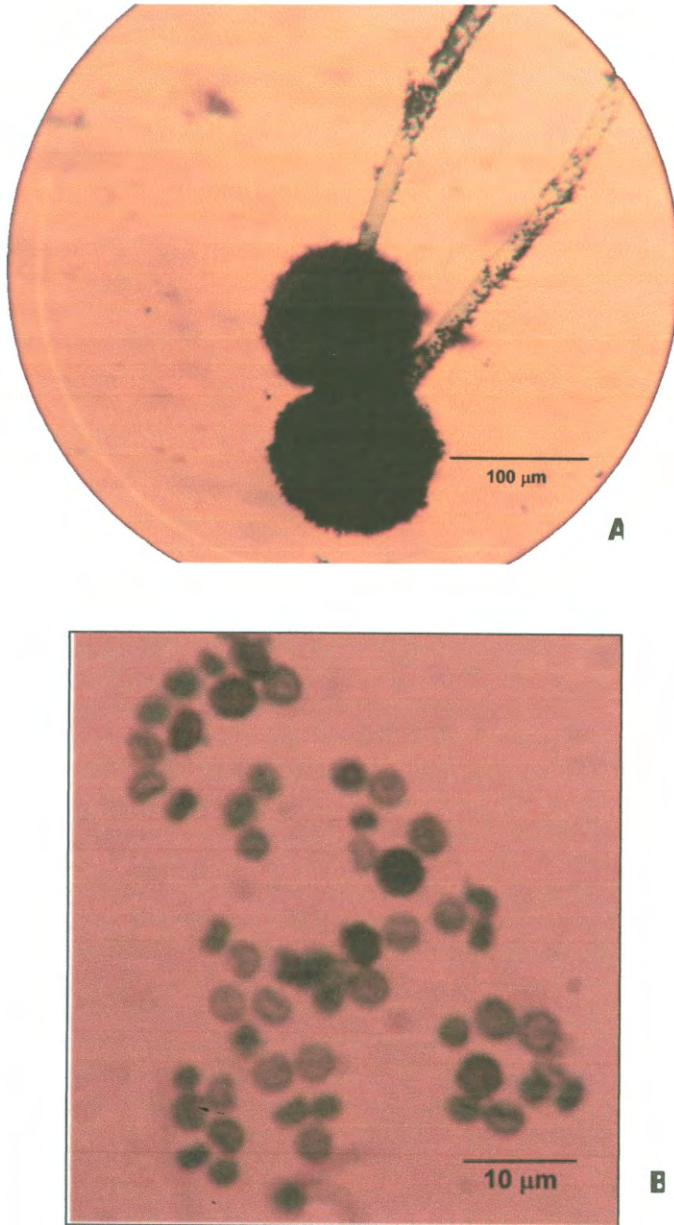


Figura 19. Observación microscópica de las estructuras reproductoras de *Aspergillus*. (A) Cabeza conidial. (B) Conidiosporas.

CONCLUSIONES

- El rendimiento de la producción de etanol por °Bx en el rango de 20 a 35°C no se ve afectada por la temperatura ni por la concentración de enzimas pécticas utilizadas; sin embargo, la velocidad a la que se lleva a cabo la producción de etanol, es decir el tiempo en que se alcanza ese rendimiento, si se ve afectada por la temperatura de fermentación.
- La concentración de metanol en el producto terminado es dependiente de la temperatura de fermentación, obteniéndose la producción más alta a 25°C, que es la temperatura óptima de la enzima péctica utilizada y el aumento de la temperatura más allá de esta provoca que disminuya de manera significativa la cantidad de este tóxico.
- La concentración de enzimas pécticas produjo una diferencia significativa en la concentración de metanol a los 35°C de temperatura durante la fermentación, lo cual se puede deber a la enzima pectinesterasa producida por la levadura, cuya actividad máxima ha sido reportada a esta temperatura. Por otra parte, la concentración de enzimas pécticas no produjo diferencias significativas en las concentraciones de metanol para las temperaturas de 20, 25 y 30°C.
- Aún cuando en la fermentación a 35°C se obtuvo la concentración mínima de metanol no se recomienda utilizar esta temperatura para realizar las fermentaciones a nivel industrial puesto que se puede ver afectada la calidad del producto.
- Las concentraciones de metanol obtenidas para todos los tratamientos se encuentran por debajo del límite de la NMX-V-012-1986 de 300 mg metanol/100 mL alcohol anhidro.
- La concentración de OTA en el producto terminado es igual a la del fruto, por lo cual, la presencia de esta toxina proviene directamente del campo y no se

produce durante el proceso de fermentación ya que las condiciones del ambiente no son las indicadas para la producción de la micotoxina por el hongo.

- Las concentraciones de OTA que se encuentran presentes en todas las muestras se encuentran por debajo del límite máximo permitido de la OIV de 2 ng/mL, lo que significa que, de acuerdo al criterio de la Comisión Europea, no son dañinas para el consumo humano.
- La siembra y aislamiento de los hongos que crecieron y que proceden de la uva utilizada, conducen a concluir por pruebas presuntivas que *Aspergillus niger* fue el hongo que pudo ser el productor de las pequeñas cantidades de OTA que se encontraron en este estudio.

RECOMENDACIONES

- Definir una metodología alternativa para la determinación de metanol con el fin de poder cuantificar las concentraciones de este compuesto en la primera etapa de la fermentación y determinar la diferencia en las velocidades iniciales de generación de metanol.
- Este estudio constituye la primera investigación sobre la presencia de OTA en vinos producidos en Sonora; se recomienda realizar más estudios en diferentes productos agrícolas y en diferentes zonas de cultivo de uva, con el fin de determinar la exposición de la población sonorense a esta micotoxina.
- Ampliar el estudio de un número mayor de viñedos productores de uva industrial para sectorizar la presencia del microorganismo productor de la micotoxina así como también estudiar la producción de la micotoxina en las variedades de uva que se producen en la región de Sonora para observar la resistencia que tienen cada una de ellas a la invasión por este microorganismo.
- La mayoría de los vinos producidos en el estado de Sonora se destinan a la producción de aguardiente, y, puesto que el peso molecular de la OTA es muy elevado y tiene una alta estabilidad a temperaturas elevadas, se propone estudiar el efecto de la destilación en OTA.

REFERENCIAS

- Andraous, J.I., Claus, M.J., Lindemann, D.J., and Berglund, K.A. (2004). Effect of liquefaction enzymes on methanol concentration of distilled fruit spirits. *American Journal of Enology and Viticulture* 55(2):199-205.
- Arvid, K. (2004). *Artisan distilling: A guide for small distilleries*. Electronic edition 1.0.0. Pp. 21-28. Internet page:
<http://aec.msu.edu/product/documents/ARTISANDISTILLING1.0.01.pdf>
- Bates, M. (1994). Arsenic toxicity. *Environmental Health Monthly* 6(12).
- Bau, M., Bragulat, M., Abarca, M., Minguez, S., and Cabañes, F. (2005). Ochratoxigenic species from Spanish wine grapes. *International Journal of Food Microbiology* 98:125-130.
- Battilani, P. and Pietri, A. (2002). Ochratoxin A in grapes and wine. *European Journal of Plant Pathology* 108(7):1306-1311.
- Bellí, N., Marín, S., Duagües, A., Ramos, A.J., and Sanchis, V. (2004a). Ochratoxin A in wines musts and grape juices from Spain. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 84(6):291-594.
- Bellí, N., Pardo, E., Marín, S., Farré, G., Ramos, A., and Sanchis, V. (2004b). Occurrence of ochratoxin A and toxigenic potential of fungal isolates from Spanish grapes. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 84(6):541-546.
- Bellí, N., Ramos, A.J., Sanchis, V., and Marín, S. (2002). Incubation time and water activity effects on ochratoxin A production by *Aspergillus section Nigri* strains isolated from grapes. *Letters in Applied Microbiology* 38:72-77.
- Benford, D., Boyle, C., Dekant, W., Fuhs, R., Gaylor, D., Hard, G., McGregor, D., Pitt, J., Plestina, R., Shephard, G., Solfrizzo, M., Verger, P. and Walker, R. (2001). Ochratoxin A. JECFA, 47. Internet page:
<http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v47je04.htm>
- Bernard, A. and Lauwerys, R. (1984). Cadmium in human population. *Cellular and Molecular Life Sciences* 40(2):143-152.
- Bezzo, G., Maggiorotto, G., and Testa, F. (2000). A method for the determination of specific mycotic contaminants random occurring in

- wines. Office International de la Vigne et du Vin. F.V. 1097. 2706/070200.
- Blesa, J., Soriano, J.M., Moltó, J.C. and Mañes, J. (2004). Concentration of ochratoxin A in wines from supermarkets and stores of Valencian community (Spain). *Journal of Chromatography* 1054:397-401.
- Boletín Ciencia Vino y Salud (1997). Consumo de vino y salud: estilo de vida moderado. 1(1).
- Boletín Ciencia Vino y Salud (1999). Conclusiones. 3(1).
- Boletín Ciencia Vino y Salud (1999). Polifenoles y flavonoides. 3(2).
- Boletín Ciencia Vino y Salud (2002). Daño oxidativo al material genético. frutas, verduras y vino protegen al ADN de daño oxidativo inductor de cáncer. 4(1).
- Brera, C., Soriano, J.M., Debegnach, F. and Miraglia M. (2005). Exposure assessment to ochratoxin A from the consumption of Italian and Hungarian wines. *Microchemical Journal* 79:109-113.
- Butzke, C. and Bisson, L.U. (1997). Ethyl carbamate preventative action manual. Ethyl. S. Food and drug administration. Center for Food Safety and Applied Nutrition. Internet page:
www.cfsan.fda.gov/~frf/ecaction.html
- Cabañes, F.J., Accensi, F., Bragulat, M.R., Abarca, M.L., Castellá, G., Minguez, S., and Pons, A. (2002). What is the source of ochratoxin A in wine?. *International Journal of Food Microbiology* 79(3):213-215.
- Cabaroglu, T. (2005). Methanol contents of Turkish varietal wines and effect of processing. *Food Control* 16:177-178.
- Castellari, M., Verari, A., Fabiani, A., Parpinello, G., and Galassi, S. (2001). Renoval of ochratoxin A in red wines by jeans of adsorption treatment with commercial finings agents. *Journal of agricultural and food chemistry* 49(8):3917-3921
- Chatt, A. (2004). Wine? Yes please, arsenic? No thanks. *Analytical Applications of Nuclear Techniques*. International Atomic Energy Agency. Austria. Part IX, Pp. 190-193.
- Codex Alimentarius Commission (1997) Revised position paper on ochratoxin A. CX/FAC98/16.

- Codex Alimentarius Commission (1999). Codex Committee on Food additives and contaminants. Position paper on Ochratoxin A, 31st session; The Hague, The Netherlands, March 22-26; CX/FAC 99/14.
- CONAGUA (2006). Reporte de estación meteorológica María del Carmen de la costa de Hermosillo. Gerencia regional noroeste de la Comisión Nacional del Agua.
- Creppy, E. (1999). Human ochratoxicosis. *Journal of Toxicology-Toxin Reviews* 18(3-4):277-293.
- Da Rocha-Rosa, C.A., Palacios, V., Combina, M., Fragay, M.E., De Oliveira-Reksny, A., Magnoli, C.E., and Dalcero, A.M. (2002). Potential ochratoxin A producers from wine grapes in Argentina and Brazil. *Food Additives and Contaminants* 19(4):408-414.
- Dahodwala, S., Humphrey, A., and Weibel, M. (1974) Pectic enzymes: Individual and concerted kinetic behavior of pectinesterase and pectinase. *Journal of Food Science* 39:920-926.
- Dai, J., Park, G., Perry, J., Il'ichev, Y., Bow, D., Pritchard, J., Faucet, V., Pfohl-Leskowicz, A., Manderville, R., and Simon, J. (2004). Molecular aspects of the transport and toxicity of ochratoxin A. *Accounts of Chemical Research* 23(11):874-881.
- Delfini, C. and Formica, J. (2001). *Wine microbiology: science and technology*. Ed. L'artistica savigliano, Italia. Chapter 14..
- Dharmadhikari, M. (1999). Small-scale white wine production (part 4). *Vineyard and Vintage View* 14(5):1-3
- Fachine, M., Pizauro, J., and Rossini, M. (2005). Analysis of the secondary compounds produced by *Saccharomyces cerevisiae* and wild yeast strains during the production of "cachaça". *Brazilian Journal of Microbiology* 36:70-74.
- FAO Nutrition Meetings (1970). Toxicological evaluation of some extraction solvents and certain other substances. Report series No. 48A. WHO/FOOD ADD/70.39. Internet page:
www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v48aje19.htm
- FAO Nutrition Meetings (1972). Evaluation of Certain Food Additives and the Contaminants Mercury, Lead and Cadmium. Sixteenth Report. Report Series, 1972, No. 51; Wld Hlth Org. techn. Rep. Ser., 1972, No. 505.

- Frenkel, C., Peters, J.S., Tieman, D., Tiznado, M.E. and Handa, A.K. (1998). Pectin methylesterase regulates methanol and ethanol accumulation in ripening tomato (*Lycopersicon esculentum*) fruit. *The Journal of Biological Chemistry* 273(8):4293-4295.
- Gainvors, A., Frézier, V., Lemaesquier, H., Lequart, C., Aigle, M., and Belarbi, A. (1994a). Detection of polygalacturonase, pectin-lyase and pectin-esterase activities in a *Saccharomyces cerevisiae* strain. *Yeast* 10(10):1311-1319.
- Gainvors, A., Karam, N., Lequart, C., and Belarbi, A. (1994b). Use of *Saccharomyces cerevisiae* for the clarification of fruit juices. *Biotechnology Letters* 16(12):1329-1334.
- Gekle, M., Sauvant, C., and Schwerdt, G. (2005). Review: Ochratoxin A at nanomolar concentrations: a signal modulator in renal cells. *Molecular Nutrition and Food Research* 49:118-130.
- Gnekow, B. and Ough, C.S. (1976). Methanol in wines and musts: source and amounts. *American Journal of Enology and Viticulture* 27(1):1-6.
- Grosso, F. (2003). New data on the occurrence of ochratoxin A in human sera from patients affected or not by renal diseases in Tunisia. *Journal of Food and Chemical Toxicology* 41(8):1133-1140.
- Haq, I., Ali, S., and Qadeer, M. (2005). Influence of dissolved oxygen concentration on intracellular pH for regulation of *Aspergillus niger* growth rate during citric acid fermentation in a stirred tank bioreactor. *International Journal of Biological Sciences* 1:34-41.
- Harper, C. and Matsumoto, I. (2005). Ethanol and brain damage. *Current Opinion in Pharmacology* 5:73-78.
- Hayes, W. (1981). *Mycotoxin teratogenicity and mutagenicity*. CRC Press, USA.
- Herbert, P., Barros, P., Ratola, N. and Alves, A. (2000). HPLC determination of amino acids in musts and port wine using OPA/FMOC derivatives. *Journal of Food Science* 65(7):1130-1133.
- <http://rbiopharm.insitoo.com/documents/R-BiopharmNEWS%20French%20II%2005%20lay%205.pdf>
- Hu, H. (2002). *Human health and heavy metal exposure*. MIT press. USA. Chapter 4 Pp. 1.

- IARC (1974). Urethane. Vol.7:111.
- IARC (1987) a. Arsenic and arsenic compounds. 7: 100.
- IARC (1987) b. Lead and lead compounds. 7: 230.
- IARC (1988). Alcohol drinking. 35:44.
- IARC (1993). Ochratoxin A. 56:489–521.
- IARC (1999). Acetaldehyde. 71:319.
- ICUMSA (1998). International commission for uniform methods of sugar analysis. Apendix 2, Pp. 8.
- INEGI (2006). Elaboración de bebidas destiladas de uva. Página de internet: <http://dgcnesyp.inegi.gob.mx/cgi-win/bdieintsi.exe/Consultar>.
- Johansson, K., El-Ahmad, M., Friemann, R., Jornvall, H., Markovic, O. and Eklund, H. (2002). Crystal structure of plant pectin methylesterase. FEBS letters 514:243-249.
- Jones, R. and Ough, C. (1985). Variations in the percent ethanol (v/v) per °brix conversions of wines from different climatic regions. American Journal of Enology and Viticulture 36(4):268-270
- Karlson, P. (1975). Introduction to modern biochemistry. Fourth edition. Ed. Avademic Press. USA. Pp. 90
- Klich, M. (2002). Identification of common *Aspergillus* species. Ed, Centraalbureau voor Schimmelcultures. Pp. 30, 31, 62 y 63.
- Kuldiloke, J. (2002). Effect of ultrasound, temperature and pressure treatments on enzyme activity and quality indicators of fruit and vegetable juices. Tesis doctoral. Universidad de Berlin.
- Lachenmeier, D., Sohnius, E., Attig, R., and López, M. (2006). Quantification of selected volatile constituents and anions in mexican agave spirits (tequila, mescal, stool, bacanora) Journal of acrigultural and foof chemistry. Internet page: <http://pubs.acs.org/cgi-bin/abstract.cgi/jafcau/asap/abs/jf060094h.html>
- Lao, C., López-Tamames, E., Lamuela-Raventós, R., Buxanderas, S., and De la Torre-Boronat, M. (1997). Pectic enzyme treatment effects on quality of white grape musts and wines. Journal of Food Science 62(6):1142-1145.

- Lee, C.Y., Smith, N.L. and Nelson, R.R. (1979). Relationship between pectin methylesterase activity and the formation of methanol in concord grape juice and wine. *Food Chemistry* 4:143-148.
- Leighton, F. y Urquiaga, I. (2000). Polifenoles del vino y salud humana. *Antioxidantes y calidad Humana* 7:5-13.
- Lo Curto, R., Pellicanó, T., Vilasi, F., Munafó, P. and Dugo, G. (2004). Ochratoxin A occurrence in experimental wines in relationship with different pesticide treatments on grapes. *Food Chemistry* 84:71-75.
- López de Cerain, A., González-Peñas, E., Jiménez, A.M. and Bello, J. (2002). Contribution to the study of ochratoxin A in spanish wines. *Food Additives and Contaminants* 19(11):1058-1064.
- Lüchtrath, H. (1983). The consequences of chronic arsenic poisoning among moselle wine growers. Pathoanatomical investigations of post-mortem examinations performed between 1960 and 1977. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology* 105(2):173-182.
- Mensonides, F., Schuurmans, J., Joost, M., Hellingwerf, K., and Brul, S. (2002). The metabolic response of *Saccharomyces cerevisiae* to continuous heat stress. *Molecular Biology Reports* 29(1-2):103-106.
- Mitchell, D., Parra, R., Aldred, D. and Magan., N. (2004). Water and temperature relations of growth and ochratoxin A production by *Aspergillus carbonarius* strains from grapes in Europe and Israel. *Journal of Applied Microbiology* 97:439-445
- Miyake, T. and Shibamoto, T. (1993). Quantitative analysis of acetaldehyde in foods and beverages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 41:1968-1970.
- Montedoro, G. (1968). Formation of methanol during vinification with maceration. *Annali della Facolta di Agraria, Università degli Studi di Perugia*. 23:573-584.
- Ng, W., Mankotia, M., Pantazopoulos, P., Neil, R., and Scott, P. (2004). Ochratoxin A in wine and grape juice sold in Canada. *Food Additives and Contaminants* 21(10):971-981.
- Norma Mexicana NMX-V-012-1986 (14 de Julio de 1986).
- Norma Oficial Mexicana NOM-111-SSA1-1994 (10 de mayo de 1995).
- Norma Oficial Mexicana NOM-142-SSA1-1995 (3 de junio de 1996).

- OIV (2004). Maximum content limits of methanol in wines. Resolution OENO 19/2004. Internet page: www.oiv.int
- OIV (2005). Commission regulation No 123/2005 amending regulation No. 446/2001. Office international de la vigne et du vin. Internet page: www.oiv.int
- Ough, C.S. (1992). Tratado de enología. Ed. Acribia, España.
- Ough, C.S. and Crowell, E.A. (1979). Pectic enzyme treatment of white grapes –temperature, variety and skin contact time factors. *American Journal of Enology and Viticulture* 30(1):22-26.
- Otteneder, H. and Majerus, P. (2000). Ocurrente of ochratoxin A (OTA) in wines: Influence of the type of wine and its geographical origin. *Food Additives and Contaminants* 17(9):793-798.
- Pacin, A., Resnik, S., Vega, M., Saelzer, R., Ciancio-Bovier, E., Ríos, G., and Martínez, N. (2005). Occurrence of ochratoxin A in wines in de Argentinian and Chilean markets. *ARKIVOC* xii:214-223.
- Palacios, A., Santiago, L. y Guerrand, D. (consultado mayo de 2006). Utilización de enzimas de maceración en vinificación en tinto. Página de Internet:
<http://www.haro.org/pdf/cursoharoantonio.pdf>
- Paltrinieri, G. y Figuerola, F. (1993). Manual para el curso sobre procesamiento de frutas y hortalizas a pequeña escala en Perú. Seminario subregional y curso para el desarrollo de microempresas a agroindustriales rurales y talleres itinerantes sobre procesamiento de frutas y Hortalizas. Lima, Peru. Página de Internet:
<http://www.fao.org/docrep/x5063S/x5063S00.htm#Contents>
- Pardo, E., Marín, S., Sanchis, V., and Ramos, A. (2005). Impact of relative humidity and temperature on visible fungal growth and OTA production of ochratoxigenic *Aspergillus ochraceus* isolates on grapes. *Food Microbiology* 22:383-389.
- Petzinger, E. and Ziegler, K. (2000). Ochratoxin A from a toxicological perspective. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* 23(2):91-98.

- Pietri, A., Bertuzzi, T., Pallaroni, L. and Piva, G. (2001). Occurrence of ochratoxin A in Italian wines. *Food Additives and Contaminants*. 18(7):641-654
- Prescott and Dunn (1982). *Industrial microbiology*. Fourth edition, U.S.A. Avi Publishing.
- Ramos, A.J. (2002). Review: Ochratoxin A (OTA) in wines, musts and grape juices: Occurrence, regulations and methods of analysis. *Food science and Technology International* 8(6):325-335.
- Ratola, N., Abade, E.E., Simoes, E.T., Venancio, E.A., and Alves, A. (2005). Evolution of ochratoxin A content from must to wine in port wine microvinification. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 382: 405-411.
- Renaud, S., Lanzmann-Petithory, D., Gueguen, R., and Concard, P. (2004). Alcohol and mortality from all causes. *Biological research* 37:183-187.
- Revilla, I. and González-San José, M.L. (1998). Methanol release during fermentation of red grapes treated with pectolytic enzymes. *Food Chemistry* 63(3):307-312.
- Ringot, D., Changoa, A., Schneider, Y., Larondelle, Y. (2006). Mini review: toxicokinetics and toxicodynamics of ochratoxin A, an update. *Chemico-Biological Interactions* 159:18-46.
- Sage, L., Garon, D., and Seigle-Murandi, F. (2004). Fungal microflora and ochratoxin A risk in french vineyards. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52:5764-5768.
- Sage, L., Krivobok, S., Delbos, E., Seigle-Murandi, F., and Creppy, E. (2002). Fungal flora and ochratoxin A production in grapes and musts from france. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50:1306-1311.
- Sánchez, C. (2002). Intoxicación por alcohol metílico. Página Internet: <http://www.aibarra.org>
- Segal, M. (1998). Too many drinks spiked with urethane. U.S. Food and Drug Administration. FDA consumer. Internet page: <http://vm.cfsan.fda.gov/~frf/fc0488ur.html>
- Serra, R., Abrunhosa, L., Kozakiewicz, Z and Venâncio, A. (2003). Black *Aspergillus* species as ochratoxin A producers in Portuguese wine grapes. *International Journal of Food Microbiology* 88(1):63-68.

- Schlatter, J., and Lutz, W. (1990). The carcinogenic potential of ethyl carbamate (urethane): risk assessment at human dietary exposure levels. *Journal of Food Chemistry and Toxicology* 28(3):205-211.
- Shephard, G., Fabiani, A., Stockenström, S., Mshicileli, N., and Sewram, V. (2003). Quantitation of ochratoxin A in South African wines. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 51(4):1102-1106.
- Soufleros, E.H., Tricard, C., and Bouloumpas E.C. (2003). Occurrence of ochratoxin A in Greek wines. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 83:173-179.
- Swi-Bea, J., W., Ming-Chang, W., Chii-Ming, J., Ya-Ping, H., Szu-Chuan, S. and Hung-Min, C. (2005). Pectinesterase inhibitor from Jelly-Fig (*Ficus awkeotsang* Makino) Achenes reduces methanol content in carambola wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53:9506-9511.
- Tjamos, S.E., Antoniou, P.P., Kazantzidou, A., Antonopoulos, D.F., Papageogiou, I., and Tjamos, E.C. (2004). *Aspergillus niger* and *Aspergillus carbonarius* in Corinth raisins and wine-producing vineyards in Greece: Population composition, ochratoxin A production and chemical control. *Journal of Phytopathology* 152:250-255.
- USDA (2004). Alcoholic beverage, red table wine. National Nutrient Database for Standard Reference. Release 16-1. Internet page: http://www.nal.usda.gov/fnic/cgi-bin/list_nut.pl
- Varga, J. and Kozakiewicz Z. (2006) Ochratoxin A in grapes and grape-derived products. *Trends in Food Science and Technology* 17:72-81.
- Venancio, A., Serra, R., Mensorca, C., Abrunhosa, L. and Pietri, A. (2004). Determination of ochratoxin A in wine grapes: comparison of extraction procedures and method validation. *Analytica Chimica Acta* 513:41-47.
- Vine, R., Harkness, E., and Lintora, S. (2002). *Winemaking. From grape growing to market place.* Kluwer academic/Plenum publishers. USA. pp. 221, 226, 231
- Viticulture and Enology Team (2004). Better winemaking through biochemistry: Episode 1, sugars. WSU Wine and Grape Research and Extension Newsletter 14(2):10-13.

- Vullo, D. and Wachsman, M. (2005). A simple laboratory exercise for ethanol production by immobilized bakery yeasts (*Saccharomyces cerevisiae*). *Journal of Food Science Education* 4:53-55.
- Whiton, R. and Zoecklein, B. (2002). Determination of ethyl carbamate in wine by solid-phase microextraction and gas chromatography/mass spectrometry. *American Journal of Enology and Viticulture* 53(1):60-63.
- Wimee, W., Russel, J. and Kaplan, H. (1983). *Alcohols toxicology*. Ed. NDC. United States
- Winter, M. (2002). Ethyl carbamate research. *Wine business monthly*. Internet page :
<http://www.winebusiness.com/html/MonthlyArticle.cfm?aid=53982&issueid=53965>.
- Wool, I.S., Kim, I.H., Yun, U.J., Chung, S.K., Rhee, I.K., Choi, S.W., and Park, H.D. (2001). An improved method for the determination of ethyl carbamate in Korean traditional rice wine. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 26:363-368.
- World Drink Trends (1996). Wine consumption by country. Internet page:
http://www.pgd.nl/downloads/wdt_worldcon96.pdf.