Identificación de Ocratoxina A en vinos artesanales *Identification of Ochratoxin A in artisanal wines*

Jorge Wilmer Elías Silupu ^a; jelias_s@hotmail.esORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0857-4258>

Universidad Nacional Ciro Alegría

Cecilia Edith García Rivas Plata ^b; cegrivas@gmail.comORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7254-1162>

Universidad Nacional Ciro Alegría

Ronald Pérez Salcedo ^c; ronaldps_13@gmail.comORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9251-1788>

Universidad Nacional José María Arguedas

Celia Rocío Yauris Silvera ^d; celyauris13@gmail.comORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2681-7724>

Universidad Nacional José María Arguedas

Recibido: Julio / 07 / 2021 – Revisado: Agosto / 15 / 2021 – Publicado: Septiembre / 30 / 2021

RESUMEN

Los principales géneros de hongos asociados a la producción de Ocratoxina A (OTA) son *Aspergillus* y *Penicillium*. OTA es una micotoxina con efectos nefrotóxicos e inmunosupresores sobre animales, y ha sido clasificada por la Agencia Internacional de Investigación del Cáncer como un posible cancerígeno en humanos (grupo 2B). Ha sido detectada en numerosos alimentos, como cereales, maíz, especias, legumbres, café, cacao, pasas, coco, cerveza y vino, entre otros. La OTA es estable en el tiempo y a altas temperaturas. El objetivo del presente estudio fue determinar la contaminación por OTA en muestras de vinos de producción artesanal. En la identificación y cuantificación de OTA en los vinos se utilizó un método de Cromatografía Líquida de Alto Rendimiento con detección por fluorescencia (HPLC-FL). Es un método fácil, robusto, reproducible, específico y sensible, con una recuperación promedio de 95,7%, un límite de detección de 0,043 µg/L y un límite de cuantificación de 0,088 µg/L. En este estudio se analizaron 15 muestras de vinos artesanales, observándose la presencia de OTA en todas las muestras analizadas, de las cuales dos muestras presentaron concentraciones superiores al límite máximo permisible establecido en la Legislación de la Unión Europea (2 µg/L).

Palabras claves: Límite de detección, Límite de Cuantificación, Micotoxina, Ocratoxina A, Vino.

ABSTRACT

The main genera of fungi associated with the production of Ochratoxin A (OTA) are *Aspergillus* and *Penicillium*. OTA is a mycotoxin with nephrotoxic and immunosuppressive effects on animals, and has been classified by the International Agency for Research on Cancer as a possible carcinogen in humans (group 2B). It has been detected in numerous foods, such as cereals, corn, spices, legumes, coffee, cocoa, raisins, coconut, beer and wine, among others. The OTA is stable over time and at high temperatures. The objective of this study was to determine OTA contamination in samples of artisanal wines. In the identification and quantification of OTA in the harvested wines, a High Performance Liquid Chromatography method with fluorescence detection (HPLC-FL) was used. It is an easy, robust, reproducible, specific and sensitive method, with an average recovery of 95.7%, a detection limit of 0.043 µg / L and a quantification limit of 0.088 µg / L. In this study, 15 samples of artisanal wines were analyzed, observing the presence of OTA in all the samples analyzed, of which two samples presented concentrations above the maximum permissible limit established in the European Union Legislation (2 µg / L).

Keywords: Limit of detection, limit of quantification, mycotoxin, ochratoxin A, Wine.

Introducción

Los principales hongos productores de micotoxinas, conocidos como micotoxicogénicos, corresponden a los géneros *Aspergillus*, *Penicillium* y *Fusarium*. Cada uno de estos géneros puede producir diferentes tipos de micotoxinas, así como, una misma micotoxina puede ser producida por diferentes especies de hongos (Napoli et al., 2009). Actualmente se conocen más de 400 micotoxinas diferentes, siendo las principales, ocratoxinas, aflatoxinas, zearalenona y patulina, todas ellas asociadas a problemas de toxicidad alimentaria (Miller, 1994).

Las micotoxinas son metabolitos secundarios producidos por hongos que se encuentran de forma natural en diversos cultivos agrícolas, que producen efectos perjudiciales en seres humanos y animales (Seguel, 2013). El conjunto de efectos sobre la salud derivados de tales toxinas se conoce como Micotoxicosis. La gravedad de éstos depende del grado de exposición y de la edad y estado nutricional del individuo. Las micotoxinas han sido identificadas en una variedad de alimentos como cereales, granos de cebada, centeno, maíz, trigo, café, frutas, nueces y otros.

Ocratoxina A es una micotoxina producida por ciertos hongos filamentosos como *Aspergillus ochraceus*, *Penicilium verrucosum* y *Aspergillus carbonarius*. Fue descubierta en 1965, en África por Van der Merwe en muestras de maíz. Originalmente fue descrita como un metabolito de *Aspergillus ochraceus*. Ha sido detectada en numerosos alimentos, como cereales, maíz, especias, legumbres, café, cacao, pasas, coco, cerveza, vino y otros (Wagacha et al., 2008).

OTA, es una molécula pequeña, es un compuesto fluorescente, moderadamente soluble en agua, muy soluble en solventes orgánicos polares, su peso molecular es de 403 g/mol, presente una estabilidad térmica hasta 180 °C. Químicamente es una molécula formada por 5-cloro-8-hidroxi-3,4 dihidro-(3R)-metil isocumarina enlazada mediante el grupo carboxi a L-β-fenilalanina, (Ravelo et al., 2011).

De acuerdo a una autorregulación de la calidad de los alimentos, a principios del año 2004 la Comunidad Europea estableció el límite máximo permisible de Ocratoxina A en vino y frutos asociados (Tabla 1) (FAO, 2004).

Tabla 1: Límites máximos permitidos de Ocratoxina A.

Producto	Valor límite
Uvas, pasas	10 µg/k
Vino y vino de frutas	2 µg/L

Fuente: Legislación de la Unión Europea sobre Contenidos Máximos de Micotoxinas.

Visto y analizado los antecedentes se plantea el siguiente problema de investigación: ¿Cuál es la concentración de ocratoxina A en muestras de vinos artesanales?

Para dar respuesta al problema de investigación se propone la siguiente hipótesis:

La concentración de Ocratoxina A en vinos de producción artesanal está sobre el límite máximo permisible por la Legislación de la Unión Europea (2 µg/L).

Este trabajo de investigación tiene como objetivo general determinar la concentración de Ocratoxina A en vinos de producción artesanal y como objetivos específicos los siguientes:

Caracterizar la propiedad físico-química de las muestras de vinos artesanales.

Determinar y cuantificar mediante el uso de metodología HPLC-FL la contaminación por OTA, en vinos artesanales.

Materiales y Métodos

1.1. Materiales y equipos

- Probetas de 100, 250, 500 y 1000 mL.
- Vasos de precipitación de borosilicato de 100, 250 y 500 mL.

- Micropipetas de 500 y 1000 μ L.
- Matraces de aforo 5,0: 10,0: 25,0 mL.
- Tubos falcón de 15,0 y 50,0 mL.
- Frascos de vidrio Schott Duran de 100, 250, 500, 1000 mL.
- Columnas de extracción (Bakerbond, Octadecyl C18) 500 mg. Fase Reversa unida a gel de silica. SPE (Extracción de Fase Sólida) de 3 mL de la marca Agilent Technologies.

1.2. Equipos

- Cromatógrafo Líquido de Alto Rendimiento equipado con: Muestreador automático (Prominence SIL-20 AC), Bomba isocrática (Prominence Liquid chromatograph LC-20AT), Detector de fluorescencia (Shimadzu RF-10AXL).

1.3. Estándar y reactivos

- Standard Ochratoxin A from *Aspergillus ochraceus*. (Sigma), (1mg). Lote 126k4026, $\geq$ 98% pureza.
- Acetonitrilo, J.T. Baker, grado HPLC.
- Metanol, J.T. Baker, grado HPLC.
- Ácido Acético, para análisis.

1.4. Métodos

Para determinar las características fisicoquímicas se realizó:

- pH a través de potenciometría (Ribéreau-Gayon P, 1971).
- Grado alcohólico, expresado en % v/v de alcohol mediante destilación y aerometría (Ribéreau-Gayon P, 1971).
- Azúcares reductores, en base a titulación con licor de Fehling, expresado en g/L de glucosa (Ribéreau-Gayon P, 1971).
- Anhídrido sulfuroso (SO₂) libre y total, según el método de Ripper (Ribéreau-Gayon P, 1971).
- Acidez total, según el método de Blarez, y expresado como g/L de ácido sulfúrico (Ribéreau-Gayon P, 1971).
- Acidez volátil, según el método de Blarez, y expresado como g/L de ácido acético (Ribéreau-Gayon P, 1971).

1.4.1. Preparación de soluciones

- Solución de dilución: acetonitrilo/agua/ácido acético (30:70:1) v/v
- Solución de extracción: acetonitrilo/agua/ácido acético (70:30:1) v/v
- Solución de lavado: metanol/ agua (30:70) %
- Solución de elución: metanol/ ácido acético (99.5/0.5) v/v
- Fase Móvil: acetonitrilo/agua/ácido acético (56:43:1) v/v

1.4.2. Extracción del analito desde la muestra

Para la extracción de OTA desde las muestras de vinos, se utilizaron columnas de extracción de fase sólida (SPE) de 3 mL, 500 mg, fase reversa unida a gel de sílica (Octadecyl C18).

1.4.3. Preparación de la muestra

En un tubo de 30 mL, con pipetas graduadas de 10 mL agregar, vino y solución de extracción 50:50 (v/v)

Homogenizar la muestra durante 15 minutos.

1. Activación de la columna.

- Agregar 3 mL de agua desionizada.
- Agregar 3 mL de metanol.

No permitir secar la columna.

Descartar

2. Aplicación de la muestra.

- Agregar 3 mL de la muestra de vino preparado.
- Hacer pasar la muestra a través de la columna.

Descartar

3. Lavado de la muestra.

- Lavar con 2,5 mL de metanol/agua (solución de lavado).
- Secar completamente la columna con presión.

Descartar

4. Elución del analito.

- Eludir la muestra suavemente a una velocidad de 10 a 12 gotas por minuto con 2,5 mL de metanol/ácido acético (solución de elución).
- Recoger el eluido en un tubo ámbar de 8 mL.
- Secar en baño maría a 45°C bajo corriente de N₂
- Finalmente reconstituir con 0,5 mL de solución de dilución.

1.4.4. Condiciones cromatográficas

- Columna Phenomenex: Synergi fusión, 150 x 4,60 mm 4μ

- Longitud de onda de excitación: 333 nm.
- Longitud de onda de emisión: 460 nm.
- Fase móvil: acetonitrilo/agua/ácido acético (56:43:1) v/v.
- Flujo de la fase móvil: 0,8 mL/min.
- Volumen de inyección: 100 µL.
- Tiempo de Retención estimado: Aprox 6,5 min.
- Tiempo de corrida: 15 min.

Resultados

En la Tabla 2 se pueden ver los resultados del análisis físico-químico de los 15 vinos artesanales en estudio. Nótese las marcadas diferencias entre ellos en los distintos parámetros analizados, particularmente en los azúcares reductores, cuyas concentraciones se distribuyeron en el rango desde 1,4 a 111,7 g/L de glucosa.

Tabla 2: Análisis físico-químico de los vinos en estudio.

Código	Ac. Volátil (g/L)	SO ₂ Libre (mg/L)	SO ₂ Total (mg/L)	Ac. H ₂ SO ₄ (g/L)	pH	Grado Alcohólico	Azúcares Reductores glucosa (g/L)
PQ.Ch.CC.	1,4	2,4	6,4	3,1	3,8	10,5	111,7
PQ.Ch.Cr.1	2,3	4,8	10,4	5,5	3,6	14,6	1,5
PQ.Ch.Cr.2	4,8	7,2	15,2	7,6	3,5	12,9	5,2
PQ.V.A.	1,5	5,6	15,2	2,6	4,4	14,4	83,8
PQ.V.T.	2,3	4,3	13,6	3,2	3,1	13,2	23,6
PQ.Ch.Cr.3	1,2	3,6	20,5	5,2	3,3	14,2	4,6
SC.V.T.	0,9	4,8	31,2	3,6	3,2	11,9	1,4
SC.V.R.	0,9	18,4	19,3	4,4	3,1	11,5	47,9
SC.Ch.Cr.	3,3	6,6	11,6	3,3	3,6	12,1	8,9
SC.V.T.	2,4	4,6	9,8	4,6	3,2	11,5	16,2
P.Ch.Cr.1	1,6	1,6	6,4	3,8	3,5	12,3	18,6
P.Ch.Cr.2	9,2	3,2	13,6	10,6	3,5	11,2	27,9
P.V.T.	2,2	3,3	9,3	8,6	3,1	10,6	17,1
P.Ch.Cr.3	1,5	4,5	14,5	4,2	3,9	12,5	15,5
P.Ch.Cr.4	1,6	2,3	10,6	3,1	3,8	10,9	14,2

PQ= Pumanque

SC= Santa Cruz

P= Peralillo

Ch= Chicha

CC= Cocida

Cr= Cruda

V= Vino

A= Añejo

T= Tinto

R=Rosé

El vino representa, después de los cereales, la fuente más frecuente de ingesta diaria de OTA (Bayman et al., 2006). Los niveles de esta toxina en el vino dependen de múltiples factores, entre los que destacan la ubicación geográfica de los viñedos, el clima, temperatura ambiental y la humedad relativa en los viñedos, la fecha de recolección, tratamientos fitosanitarios y las distintas técnicas de elaboración del vino (Bayman et al., 2006).

OTA es una micotoxina termoestable que se absorbe fácilmente en el tracto gastrointestinal, siendo su biodisponibilidad superior al 50% en todas las especies de mamíferos ensayadas. Presenta una alta afinidad por las proteínas plasmáticas, lo que determina una larga persistencia en el organismo contaminado (Valle, 2010). Diversos estudios han demostrado que la ingesta crónica de OTA da lugar a la aparición de un efecto tóxico renal en todas las especies de mamíferos monogástricos testeados (Ostry et al., 2015). Se ha relacionado con la nefropatía porcina, la nefropatía aviar espontánea, y en el hombre con la Nefropatía Endémica de los Balcanes (Heussner et al., 2015). Además, OTA induce adenomas renales y carcinomas en ratas y ratones, por lo que la IARC ha clasificado esta toxina como

potencialmente carcinógeno del grupo 2B (Stoev et al., 2010). Esta acción carcinogénica podría derivar de su efecto mutagénico asociado a su capacidad de formación de aductos con el DNA (Schwartz, 2002).

1.5. Niveles de ocratoxina a en los vinos artesanales analizados

La caracterización de una herramienta analítica para la determinación de OTA en vinos es una condición necesaria para un análisis confiable de esta toxina. La existencia de un sistema económico globalizado con un muy elevado tránsito de productos obliga a que los procedimientos analíticos que respaldan las exportaciones de productos sean análogos a los procedimientos que respaldan las importaciones que hacen los compradores.

En España, uno de los países con mayor producción de vino en el mundo, se realizó un estudio en 290 muestras de vino dulce, observándose un 3% de muestras que superaban el límite máximo permitido por la legislación de la Comunidad Europea (2 µg/L) (Burdaspal et al., 2007).

La Tabla 3, detalla los resultados obtenidos en las 15 muestras de vinos artesanales analizados en duplicado. Todas las muestras analizadas presentaron concentraciones de OTA cuantificables, cuyas concentraciones promedio se distribuyeron en el rango desde 0,08 hasta 3,69 µg/L. Dos de las muestras analizadas presentaron concentraciones de 3,69 y 2,15 µg/L, valores que superan el límite máximo permisible según la Legislación de la Unión Europea (2 µg/L).

Tabla 3: Contenido de OTA en los vinos artesanales analizados.

Tipo de Vino Artesanal	Código	Replica 1 (µg/L)	Replica 2 (µg/L)	Concent. Promedio
Chicha Cocida	PQ.Ch.CC.	0,15	0,16	0,15
Chicha Cruda	PQ.Ch.Cr.1	0,14	0,13	0,13
Chicha Cruda	PQ.Ch.Cr.2	0,37	0,36	0,37
Vino Añejo	PQ.V.A.	2,16	2,14	2,15
Vino Tinto	PQ.V.T.	0,11	0,12	0,11
Chicha Cruda	PQ.Ch.Cr.3	0,14	0,14	0,14
Vino Tinto	SC.V.T.	0,29	0,29	0,29
Vino Rosé	SC.V.R.	0,45	0,57	0,51
Chicha Cruda	SC.Ch.Cr.	0,08	0,07	0,08
Vino Tinto	SC.V.T.	0,11	0,11	0,11
Chicha Cruda	P.Ch.Cr.1	0,13	0,12	0,13
Chicha Cruda	P.Ch.Cr.2	0,09	0,08	0,08
Vino Tinto	P.V.T.	3,61	3,78	3,69
Chicha Cruda	P.Ch.Cr.3	0,07	0,08	0,08
Chicha Cruda	P.Ch.Cr.4	0,09	0,09	0,09

Los métodos de determinación y cuantificación de OTA, así como los procedimientos necesarios para su extracción, han variado a lo largo de los años, (Joshi et al., 2016). Para estos fines, en este estudio se empleó metodología cromatográfica HPLC-FL. Este método para la determinación de OTA, ha probado ser fácil, robusto, específico y sensible. Además, por ser expedito representa una valiosa herramienta para procesar en tiempos acotados un gran número de muestras.

En Portugal, país con una gran diversidad climática por la doble influencia del océano Atlántico y del mar Mediterráneo que incide directamente sobre el desarrollo de hongos toxigénicos, en un estudio de 60 muestras se detectó OTA en

el 26% de los vinos tintos y 12% de los vinos blancos y sólo una muestra de vino blanco que excedió el límite permitido por la Comunidad Europea (Pena et al., 2010). Asimismo, en un estudio en Italia con vinos de producción local se encontró que el 92,8% de los vinos rosados y el 100% de los vinos tintos estaban contaminados por OTA (Bacaloni et al., 2005).

Conclusiones

- El método utilizado logró determinar un Límite de Detección de 0,043 µg/L y un Límite de Cuantificación de 0,060 µg/L, valores muy inferiores al Límite Máximo Permisible por la Comunidad Europea. La recuperación promedio alcanzada fue de 96,5%, valor también acorde con las exigencias de la Comunidad Europea.
- Los vinos artesanales estudiados presentaron valores normales en parámetros fisicoquímicos generales, tales como acidez total, acidez volátil, fenoles totales, anhídrido sulfuroso, grado alcohólico y pH, con la excepción de dos vinos que presentaron valores muy elevados de azúcares reductores (equivalentes en glucosa).
- Todos los vinos artesanales analizados (n = 15) presentaron concentraciones de OTA cuantificables, en el rango desde 0,08 a 3,69 µg/L. Algunos de los vinos artesanales analizados (n= 2) presentaron concentraciones de OTA que superan el Límite Máximo Permitido por la legislación de la Comunidad Europea (2 µg/L).

Referencias

- Burdaspal P, Legarda T. (2007). Occurrence of Ochratoxin A in sweet wines produced in Spain and other countries. *Food Additives and Contaminants*. 24(9):976-986.
- FAO (2004). Reglamento a nivel mundial para las micotoxinas en los alimentos y en las regiones en el año 2003. Estudio FAO: Alimentación y Nutrición. n° 81, Roma.
- Heussner A, Bingle L. (2015). Comparative Ochratoxin Toxicity: A Review of the Available Data. *Toxins (Basel)*. 22: 7(10).
- Miller J. (1994). Fungi and mycotoxins in stored products. *J Food Prot*. 71(8)126-135p.

- Napoli C, Marcotrigiano V, Pagliarone C, Montagna M. (2009). Mycotoxins in food: legislation and thresholds. *Sanita Pubbl.* 65(6):607-20.
- Ostry V, Malir F, Dofkova M, Skarkova J, Pfohl-Leszkowicz A, Ruprich J. (2015). Ochratoxin A Dietary Exposure of Ten Population Groups in the Czech Republic: Comparison with Data over the World. *Toxins (Basel).* 7(9):3608-35.
- Schwartz G. (2002). Hypothesis: Does Ochratoxin A cause testicular cancer. *Cancer Causes Control.* 13: 91-100.
- Seguel E. (2013). Determinación y cuantificación de OTA en vinos comerciales chilenos. Tesis desarrollada en la Universidad de Chile, Facultad Agronomía.
- Stoev S, Dutton M, Njobeh P, Mosonik J, Steenkamp P. (2010). Mycotoxic nephropathy in Bulgarian pigs and chickens: complex aetiology and similarity to Balkan endemic nephropathy. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess.* 27(1):72-88.
- Ravelo A, Rubio A, Gutiérrez F, Hardisson de la Torre. (2011). Ochratoxin A. Food. Intake. Regulations. OCHRATOXIN A IN FOODS FOR HUMAN CONSUMPTION. *Nutr Hosp.* 26:1215-1226.
- Ribéreau-Gayon P, Bertrand A. (1971). Simultaneous determination of Organic acids, polyalcohols and sugars in wine. *Sci Hebd Seances Acad Sci.* 8:273(19):1761-2.
- Valle A. (2010). Evaluación del peligro potencial y real de la presencia de ocratoxina A, tricotecenos B y patulina en trigo y manzana mediante técnicas microbiológicas y cromatográficas. Tesis desarrollada en la Universidad de València – España en el Departamento de Química Analítica. 543:338p.
- Wagacha J, Muthomi J. (2008). Mycotoxin problema in Africa: current status, implorations to food safety and health and posible management strategies. *Int J Food Microbiol.* 124(1):1-12.

Identificación de Ochratoxina A en vinos artesanales (Jorge Wilmer Elías - Silupu) Por [Revista Sendas](#) se encuentra bajo una [Licencia Creative Commons–No Comercial–Sin Derivadas 3.0 Uported.](#)

ANEXOS

Figura 1: Cromatograma de matriz fortificada con OTA de 1,0 µg/L (control).

Figura 2: Cromatograma de solución estándar puro de OTA de 1,0 µg/L.

Figura 3: Cromatograma de vino artesanal con presencia de OTA de 3,69 µg/L.

Figura 4: Cromatograma de vino con presencia de OTA de 0,29 µg/L.