

**UNIVERSIDAD DE CHILE**  
**FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS**  
**ESCUELA DE PREGRADO**

MEMORIA DE TITULO

**NUEVO MÉTODO DE CUANTIFICACION DE OCRATOXINA A Y SU  
APLICABILIDAD EN VINOS CARMÉNÈRE Y CABERNET SAUVIGNON.**

MARCELO ALEJANDRO BAHAMONDES ALVAREZ

SANTIAGO - CHILE  
2012

**UNIVERSIDAD DE CHILE**  
**FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS**  
**ESCUELA DE PREGRADO**

MEMORIA DE TITULO

**NUEVO MÉTODO DE CUANTIFICACION DE OCRATOXINA A Y SU  
APLICABILIDAD EN VINOS CARMÉNÈRE Y CABERNET SAUVIGNON.**

**NEW METHOD OF QUANTIFYING OCHRATOXIN A AND ITS  
APPLICABILITY IN WINE CARMENERE AND CABERNET SAUVIGNON**

MARCELO ALEJANDRO BAHAMONDES ALVAREZ

SANTIAGO - CHILE  
2012

**UNIVERSIDAD DE CHILE**  
**FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS**  
**ESCUELA DE PREGRADO**

**NUEVO MÉTODO DE CUANTIFICACION DE OCRATOXINA A Y SU  
APLICABILIDAD EN VINOS CARMÉNÈRE Y CABERNET SAUVIGNON.**

Memoria para optar al Título  
Profesional de Ingeniero Agrónomo  
Mención: Enología

MARCELO ALEJANDRO BAHAMONDES ALVAREZ

<b>Profesores Guías</b>	<b>Calificaciones</b>
Sr. Elias Obreque Slier Ingeniero Agrónomo-Enólogo, Dr	6,5
Sr. Américo López Rivera Médico Cirujano, Dr	6,8
<b>Profesores Evaluadores</b>	
Sr Remigio López Solís. Bioquímico, Dr	6,5
Sr Mauricio Meyer de Goyeneche Ingeniero Agrónomo	6,7

SANTIAGO - CHILE  
2012

## **AGRADECIMIENTOS**

*A mis dos profesores guía de tesis Dr. Américo López Rivera y el Dr. Elias Obrequé Slier por sus enseñanzas, apoyo incondicional, la ayuda brindada en forma desinteresada y la colaboración para la realización del presente trabajo.*

*A mi familia, polola y amigos que siempre estuvieron conmigo durante todo el proceso de realización de este trabajo.*

*Mi reconocimiento y agradecimiento a los proyectos U-Inicia 11/05 y al Fondecyt 11121322 que me apoyaron para la realización de la presente investigación.*

## ÍNDICE

<b>RESUMEN</b>	<b>5</b>
<b>Palabras claves</b>	<b>5</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>6</b>
<b>Key words</b>	<b>6</b>
<b>INTRODUCCION</b>	<b>7</b>
<b>Objetivo</b>	<b>8</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODO</b>	<b>9</b>
<b>Lugar del estudio</b>	<b>9</b>
<b>Materiales</b>	<b>9</b>
Vinos	9
Equipamiento	9
Reactivos y material general	9
<b>Método</b>	<b>10</b>
Tratamientos y Diseño Experimental	10
<b>Procedimientos</b>	<b>10</b>
Método de cuantificación	10
Procedimiento de extracción	11
Análisis químicos generales de los vinos	11
<b>Análisis estadístico</b>	<b>12</b>
<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>13</b>
<b>Análisis químicos generales de los vinos</b>	<b>13</b>
<b>Curvas de Calibración</b>	<b>14</b>
Solución de estándares	14
Curva de calibración de vino fortificado	14
<b>Estabilidad</b>	<b>16</b>
<b>Especificidad</b>	<b>16</b>
<b>Recuperabilidad</b>	<b>18</b>
<b>Variabilidad</b>	<b>19</b>
<b>Reproducibilidad del método</b>	<b>20</b>
Contenido de OTA en vinos Cabernet Sauvignon y Carménère	20
<b>CONCLUSIONES</b>	<b>22</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>23</b>
<b>ANEXOS</b>	<b>26</b>
<b>Anexo I</b>	<b>26</b>

## RESUMEN

La ocratoxina A es una toxina producida por hongos de los géneros *Aspergillus* y *Penicillium*. Estas micotoxinas presentan propiedades tóxicas que afectarían a los riñones, el hígado, sistema inmune y desarrollo embrionario. Estas toxinas poseen una alta capacidad para producir cáncer y son producidas por algunas contaminaciones fungosas en uvas destinadas a la producción de vino. Aunque, en algunos países importadores de vino se han definido normas de aceptabilidad del contenido de ocratoxina A para el vino, actualmente existe limitada información acerca de métodos apropiados para la identificación de ocratoxinas en vinos.

El objetivo de este estudio fue desarrollar un método de cromatografía líquida de alto rendimiento para la identificación y cuantificación de ocratoxina A (OTA) y evaluar su aplicabilidad en vinos tintos. Para la implementación del método se elaboró una fase móvil y diversas curvas de calibración con estándares puros y con vino fortificado. Se evaluó la estabilidad, especificidad, recuperabilidad, variabilidad y reproducibilidad del método.

Las curvas de calibración con el estándar puro y con vino fortificado presentaron un valor de  $R^2$  igual a 0,99, un límite de cuantificación de 0,088 ng/mL y un límite de detección de 0,043 ng/mL de OTA. Además se observó que no existe interferencia en el tiempo de retención de OTA al adicionar elementos propios del vino y un porcentaje de recuperabilidad de un 95% en sus resultados. A partir de lo se concluye que el método propuesto es reproducible, fácil de aplicar y confiable en la detección y cuantificación de OTA en vinos tintos.

**Palabras claves:** Micotoxinas, HPLC, toxinas.

## ABSTRACT

Ochratoxin A is a toxin which is produced by fungi of the genera *Aspergillus* and *Penicillium*. The micro toxins have properties that affect kidneys, liver, immune system, embryonic development. These toxins have a high capacity to cause cancer. It has been observed that these toxins are synthesized in the presence of some fungal contamination of grapes for wine production. In some countries that are importers of wine they have defined standards that accept wine containing Ochratoxin. Currently there is limited information about new methods of identifying ochratoxin wine.

The aim of this study was to develop a method of chromatography high performance liquid to identify and quantity of Ochratoxin A (OTA) and its appropriateness in red wines. To implement the new method of calculation a mobile phase was created with various standards of calibration curves, pure and fortified wine were used. Stability, specification, recovery, changes and production of the method were evaluated.

The curves of alignment of the standard pure and fortified wine showed that they presented an R<sup>2</sup> value equal to 0.99, a limit of quantification of 0.088 ng / mL and a detection limit of 0.043 ng / mL of OTA. It was also observed that there is no interference in the retention time of OTA by adding elements of the wine and a recoverability rate of 95% in its results. Since it is concluded that the proposed method is reproducible, easy to apply and reliable detection and quantification of OTA in red wines.

**Key words:** Mycotoxin, HPLC, toxins.

## INTRODUCCION

Los hongos fitopatógenos producen distintos metabolitos que pueden ser tóxicos, afectando la salud humana y animal. Los metabolitos fúngicos secundarios son compuestos orgánicos y se les denomina micotoxinas. Estas micotoxinas no participan del metabolismo primario del hongo y son producidas por especies toxigénicas en ciertas condiciones de humedad, temperatura y nutrientes. Entre los hongos productores de micotoxinas, se encuentran *Fusarium*, *Aspergillus* y *Penicillium* (De la Vega, 1986).

La Ocratoxina A (OTA) es un metabolito fúngico con propiedades tóxicas que es producido por las especies *Aspergillus* y *Penicillium*. Los responsables de la presencia de OTA en vinos son principalmente cepas de *Aspergillus* de la sección *Nigri* que crecen sobre la uva de vinificación (Marin *et al.*, 2008).

La Ocratoxina A es una sustancia nefrotóxica que provoca alteraciones irreversibles. El Centro Internacional de Investigación contra el Cáncer considera que esta toxina es cancerígena (clase 2B) y que tiene efectos inmunodepresivos y neurotóxicos. La dosis diaria tolerable, muy baja, varía entre 0,30 y 0,89 µg por día para una persona con un peso de 60 kg (Rousseau, 2005).

A mediados de los años 90 se detectó la presencia de Ocratoxina A (OTA) en vinos, jugos de uva y pasas de uva. Los análisis realizados en Dinamarca y Finlandia durante 1997 y 1998 demostraron que los vinos, jugos de uva y vinos dulces naturales pueden contener hasta 10 µg/L de OTA (Rousseau, 2005). Actualmente, la resolución CST 1/2002 de la Organización Internacional de la Vid y el Vino (OIV) fija en 2,0 µg/L el contenido máximo de OTA en los vinos (OIV, 2005).

Hoy en día, se utilizan numerosos métodos para la determinación de OTA, tales como, cromatografía de capa fina, ensayo inmunoenzimático, cromatografía líquida de alto rendimiento con detección por fluorescencia (HPLC-FL) y cromatografía líquida de alto rendimiento con espectroscopia de masas (HPLC-MS). En los últimos años, el uso de columnas de inmunoafinidad y multifuncionales para la extracción y aislamiento de OTA se ha incrementado. Sin embargo, existe poca información sobre el uso de columnas multifuncionales de limpieza para OTA en diferentes matrices biológicas (Sugita-Konishi *et al.*, 2005). Asimismo las condiciones cromatográficas descritas para la cuantificación de ocratoxina son diversas (Kumagai *et al.*, 2008; Serra *et al.*, 2004; Sugita-Konishi *et al.*, 2006) por lo que presumiblemente los resultados también lo sean. Ambos antecedentes demuestran la importancia de generar una metodología de cuantificación precisa de ocratoxinas, más aún, considerando los peligros que presentan aún concentraciones bajas de esta micotoxina, como contaminante natural de los productos alimenticios (Naccha *et al.*, 2005).



Por otra parte, las exportaciones de vino embotellado en Chile en el período de Enero a Diciembre 2011, aumentaron 10,8% en valor (US\$ 1.415 millones), 7,7% en precio promedio (US\$ 29,03/Caja) y 3% en volumen (439 millones de litros), convirtiéndose en el quinto exportador mundial de vino (Vinos de Chile A.G., 2011).

No obstante lo anterior, en Chile existe limitada información sobre métodos para la identificación y cuantificación de OTA en vino. Esto representa un riesgo para la industria nacional, ya que el destino de este producto son países que tienen una rigurosa legislación de inocuidad en los alimentos.

### **Objetivo**

Desarrollar un método de identificación y cuantificación de ocratoxina A y evaluar su aplicabilidad en dos vinos tintos de las variedades Carménère y Cabernet Sauvignon.

## MATERIALES Y MÉTODO

### Lugar del estudio

Los análisis de OTA se realizaron en el laboratorio de Toxicología del Instituto de Ciencias Biomédicas de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile.

### Materiales

**Vinos.** En este estudio se utilizaron vinos varietales del año 2010 de los cultivares Carménère y Cabernet Sauvignon provenientes del Valle del Maule, Séptima región, Chile. Estos vinos provienen de plantas establecidas el año 2003 y están dispuestos en un sistema de conducción en espaldera simple, con orientación de este-oeste y un marco de plantación de 2 m entre hileras y 1 m sobre hilera. Ambos cultivares estuvieron sometidos a las mismas condiciones ambientales y similares manejos agronómicos y enológicos.

**Equipamiento.** Se utilizó un equipo de cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC-FL) Shimadzu constituido por un detector de fluorescencia RF-10Ax1, una bomba isocrática Prominence Liquid Chromatograph LC-20AT, un muestreador automático termoregulado Prominence SIL-20AC. Además, se utilizó una columna analítica marca Phenomenex Luna 5u C<sub>18</sub> 100 (250 x 4,6) y columnas de extracción fase sólida de Bakerbond spe<sup>TM</sup> Octadecyl (C<sub>18</sub>) 500 mg fase reserva unida a gel de sílica.

De la misma manera, se utilizó un Vortex Vx100 Labnet, un sistema Manifold para columnas SPE y un sonicador 2510 Branson (Bu-02).

**Reactivos y material general.** Los estándares de (+)-catequina, ácido gálico y ocratoxina A de *Aspergillus ochraceus*, pureza mayor al 98%, PM 403 fueron adquiridos en Sigma (St. Louis, U.S.A.). Acetonitrilo, metanol, ácido acético glacial y el agua desionizada todo grado HPLC adquiridos en J.T. Baker (U.S.A.). Se utilizaron matraces aforados ámbar de distintos volúmenes, viales ámbar, micropipetas de 200 y 1000 µL, matraces de aforo ámbar de distintos volúmenes y viales de 2 mL de capacidad.

## Método

### Tratamientos y Diseño Experimental

En el presente estudio se analizaron 12 muestras de un vino varietal Cabernet Sauvignon y otro Carménère. La unidad experimental correspondió a 750 mL de vino.

### Procedimientos

**Método de cuantificación.** Para la implementación del método de cuantificación de OTA se revisaron diversos procedimientos según antecedentes bibliográficos (Kumagai *et al.*, 2008; Serra *et al.*, 2004; Sugita-Konishi *et al.*, 2006). Así, se seleccionaron los siguientes parámetros:

*Fase móvil.* Se utilizaron los solventes acetonitrilo, agua y ácido acético, (56/43/1 v/v) que fueron aplicados con la ayuda de una bomba HPLC de gradientes. Se determinó el flujo en 0,28 mL/min, condición que permite obtener el mejor tiempo de retención de OTA.

*Curva de calibración.* Se realizaron curvas de calibración con 8 concentraciones (0,0; 0,675; 1,0; 1,25; 2,5; 5,0; 10,0 y 20,0 ng/mL) con un estándar OTA.

*Curvas de calibración en vino fortificado.* Para realizar la curva de calibración en vino, se uso una muestra de Cabernet Sauvignon, la cual fue fortificada con 4 µg/L de OTA. Este vino fortificado fue diluido con vino sin fortificar para obtener concentraciones de 0,0; 0,25; 0,5; 1,0 y 2,0 ng/mL de OTA.

*Estabilidad.* Se realizaron ensayos para determinar el efecto del almacenamiento sobre la cuantificación de OTA. Para ello, se utilizó una solución de 5,0 ng/mL de OTA almacenada a diferentes temperaturas. Se evaluó el efecto del tiempo de almacenamiento sobre los porcentajes de recuperación de OTA.

*Especificidad.* En este ensayo se evaluó la interferencia de 3,5 ng/mL de (+)-catequina y ácido gálico sobre la cuantificación de OTA en un vino enriquecido con 2,0 ng OTA/mL de vino.

*Recuperabilidad.* Se determinó el porcentaje de recuperación de la toxina incorporada al vino fortificado durante el periodo del estudio, y durante la toma de muestras.

*Variabilidad.* Se realizaron estudios de la variación de los resultados, durante el día, semanas, mes y entre los analistas durante el periodo de estudio de 6 meses, se realizaron evaluaciones durante el día con repeticiones.

*Reproducibilidad.* El método fue reproducido por dos integrantes del laboratorio con muestras de vino fortificado durante el periodo de estudio de 6 meses, se analizaron los porcentajes de recuperación de ambos analistas del laboratorio.

**Procedimiento de extracción.** Para la determinación de OTA en vino, se utilizaron 4 soluciones: acetonitrilo/agua/ácido acético (69,3/29,7/1 v/v) (Solución 1); metanol/agua (30/70 v/v) (Solución 2); metanol/ácido acético (99,5/0,5 v/v) (Solución 3) y acetonitrilo/agua/ácido acético (29,7/69,3/1 v/v) (Solución 4). Las fases del procedimiento fueron las siguientes:

*Preparación de la muestra.* 10 mL de vino fueron mezclados con 10 mL de la Solución 1 en un tubo de ensayo de 30 mL de capacidad. Esta solución fue mezclada durante 15 minutos con agitación vortex, con reposo intermitente.

*Activación de la columna de extracción.* Se aplicaron en forma continua 3 mL de agua desionizada a la columna de extracción, seguido de 3 mL de metanol. El flujo de elución fue de 20 a 25 gotas/minuto. Se veló que la columna permaneciera húmeda en todo momento.

*Colocación de la muestra.* En la columna se aplicaron 3 mL de la muestra de vino con la Solución 1.

*Lavado de la columna de extracción.* Inmediatamente después de haber colocado la muestra en la columna, se aplicaron 2,5 mL de la Solución 2. Una vez que la solución ha eluido totalmente, la columna fue secada manualmente con presión de aire utilizando una jeringa.

*Elución del analito.* Luego de lavar la columna, se agregaron 2,5 mL de la Solución 3, para obtener el analito de estudio. Las primeras 5 gotas se colocaron en tubo ámbar de 8 mL de volumen, para luego de 2 minutos a presión atmosférica, aplicar presión manual y eluir la totalidad de volumen aplicado de Solución 3 (10-12 gotas/minuto).

*Secado de la muestra.* El secado fue realizado a baño-maría (45°C aproximadamente) bajo una corriente de nitrógeno. La muestra se reconstituyó con 1 mL de la Solución 4.

**Análisis químicos generales de los vinos.** Los vinos utilizados en este estudio se caracterizaron mediante análisis generales y espectrofotométricos.

*Fenoles totales.* Por espectrofotometría a longitud de onda de 280 nm (García-Barceló, 1990).

*Taninos totales.* Por reacción con metilcelulosa (Mercurio *et al.*, 2007).

*Antocianos totales.* Por el método de decoloración por bisulfito (García-Barceló, 1990).

*Intensidad colorante.* Mediante la suma de las longitudes de ondas de 420, 520 y 620 nm (Glories, 1984).

*pH.* Por potenciometría (García-Barceló, 1990).

*Acidez total.* Por titulación con NaOH (García-Barceló, 1990).

*Alcohol probable.* Por destilación y densimetría (García-Barceló, 1990).

*Azúcares reductores.* Por titulación con licor de Fehling (García-Barceló, 1990).

*Anhídrido sulfuroso libre y total.* Mediante titulación con yodo (García-Barceló, 1990).

### **Análisis estadístico**

Se utilizó el programa estadístico MINITAB 16 para obtener valores de promedio, varianza y coeficiente de variación. Además, se aplicó el test *t* de Student para la evaluación de la reproducibilidad del método.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Análisis químicos generales de los vinos

En el Cuadro 1 se muestran los distintos parámetros analizados en los vinos. Es interesante notar que el vino Carménère presentó valores mayores de fenoles y antocianos totales, coincidente con estudios previos (Gruettner *et al.*, 2005). En general, los resultados obtenidos coinciden con los valores observados en otros estudios (González *et al.*, 2004; Gruettner *et al.*, 2005).

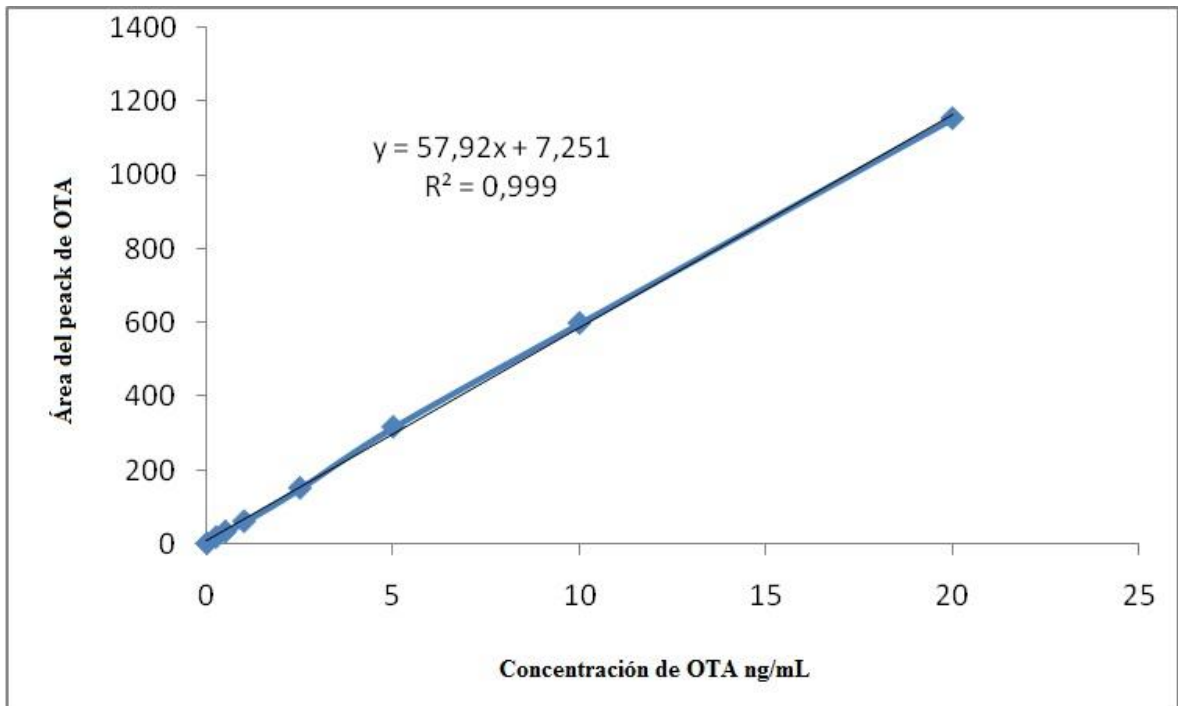
**Cuadro 1.** Análisis químicos a los vinos

Parámetro	Cabernet Sauvignon	Carménère
pH	3,52 ± 0,00	3,58 ± 0,01
Acidez total*	4,90 ± 0,00	4,80 ± 0,00
Anhídrido sulfuroso libre **	19,67 ± 0,57	27,67 ± 2,88
Anhídrido sulfuroso total **	60,00 ± 3,46	72,33 ± 4,04
Azúcares reductores ***	1,24 ± 0,20	1,42 ± 0,02
Alcohol probable †	12,77 ± 0,05	12,63 ± 0,05
Intensidad colorante ‡	11,67 ± 1,63	13,403 ± 0,10
Polifenoles totales #	943,67 ± 95,65	1156,33 ± 97,07
Antocianos totales ##	600,33 ± 12,01	754,67 ± 2,51
Taninos totales ###	148,67 ± 0,57	150,00 ± 14,42

\* g equivalentes de ácido tartárico/L, \*\* mg de anhídrido sulfuroso/L, \*\*\* g equivalentes de glucosa/L, † % de alcohol v/v, ‡ Unidades de absorbancia, # mg equivalentes de ácido gálico/L, ## mg equivalentes de malvidina-3-glucósido/L, ### mg equivalentes de catequina/L.

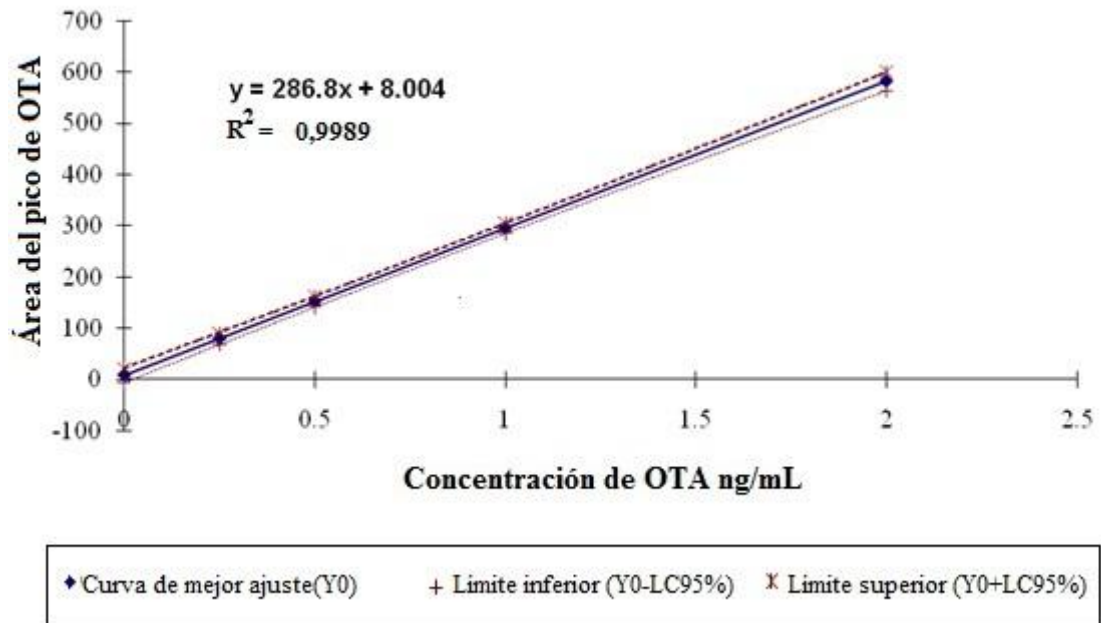
## Curvas de Calibración

**Solución de estándares.** La Figura 1 muestra la curva de calibración realizada con las diferentes concentraciones de estándar de OTA en acetonitrilo. Se utilizaron 8 concentraciones de OTA (0,0; 0,675; 1,0; 1,25; 2,5; 5,0; 10,0 y 20,0 ng/mL) preparadas a partir de una solución patrón, según lo descrito por el método de la AOAC (AOAC International, 1996). La curva obtenida obtuvo un valor  $R^2 = 0,999$ , lo que indicaría una alta linealidad entre las concentraciones y las áreas correspondientes (AOAC International, 1996).



**Figura 1.** Curva de Calibración con estándar de OTA.

**Curva de calibración de vino fortificado.** En la Figura 2, se muestra la curva de calibración de un vino fortificado con OTA. Al igual que la curva de calibración del estándar, la curva de calibración de OTA en vino presentó valor  $R^2 = 0,999$ , lo que indicaría una alta linealidad del método entre las concentraciones y las áreas correspondientes (AOAC International, 1996).



**Figura 2.** Curva de Calibración de Ocratoxina A en vino

A partir de los resultados de la Figura 2, se obtuvieron los límites de detección y cuantificación que se resumen en el Cuadro 2. La metodología se resume en el Anexo 1. Como se muestra en el cuadro resumen, los valores están muy por debajo de las cantidades de OTA encontradas por distintos autores en diferentes vinos. Estas concentraciones pueden alcanzar niveles de hasta 10 ng/mL (Mateo *et al.*, 2007; Pacin *et al.*, 2005; Ratola *et al.*, 2004). Asimismo, los valores de los límites de detección y cuantificación observados son menores que los indicados en otros estudios que utilizan otras metodologías de análisis (Muñoz *et al.*, 2006; Pacin *et al.*, 2005; Sugita-Konishi *et al.*, 2006).

**Cuadro 2.** Datos de la curva de calibración de OTA en vino

Coefficiente de Correlación (r)	0,9995
Coefficiente de determinación ( $R^2$ )	0,9989
Límite de Detección (LD)	0,043 ng/mL
Límite de Cuantificación (LC)	0,088 ng/mL



## Estabilidad

El Cuadro 3 muestra los resultados del efecto del tiempo y temperatura sobre la cuantificación en estándares de OTA. La concentración original en todas las muestras fue de 5 ng/mL. Se pudo observar que diferentes temperaturas (4-6 y 19-24 °C) no afectaron la medición del contenido de OTA. De la misma manera, el análisis cuantitativo durante 6 meses demostró una concentración invariable del analito. Estas observaciones demostrarían que OTA es estable en el tiempo y que la temperatura no afecta la identificación y cuantificación de OTA.

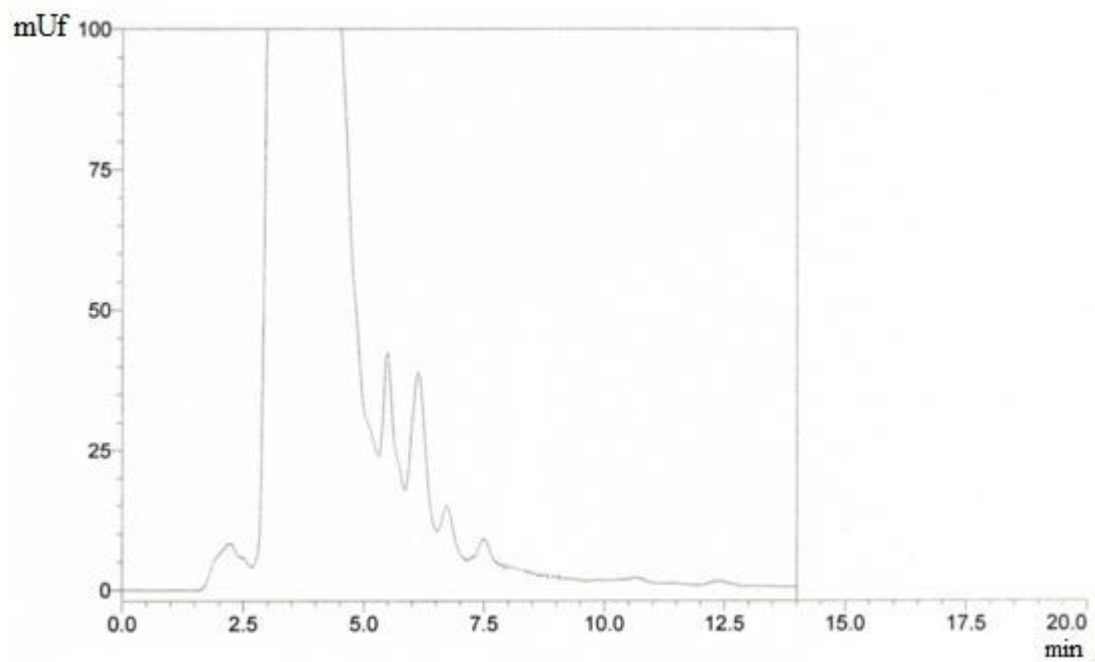
**Cuadro 3.** Estudio de estabilidad de OTA

Meses	Temperatura 4-6 °C		Temperatura 19-24 °C	
	Contenido (ng/mL)	Variación (%)*	Contenido (ng/mL)	Variación (%)*
1	5,16	3,14	5,19	3,82
2	5,16	3,16	5,16	3,21
3	5,16	3,27	5,16	3,14
4	5,16	3,25	5,16	3,29
5	5,14	2,77	5,16	3,12
6	5,16	3,29	5,17	3,35
Promedio	5,16 ± 0,01	3,15 ± 0,19	5,17 ± 0,01	3,32 ± 0,26

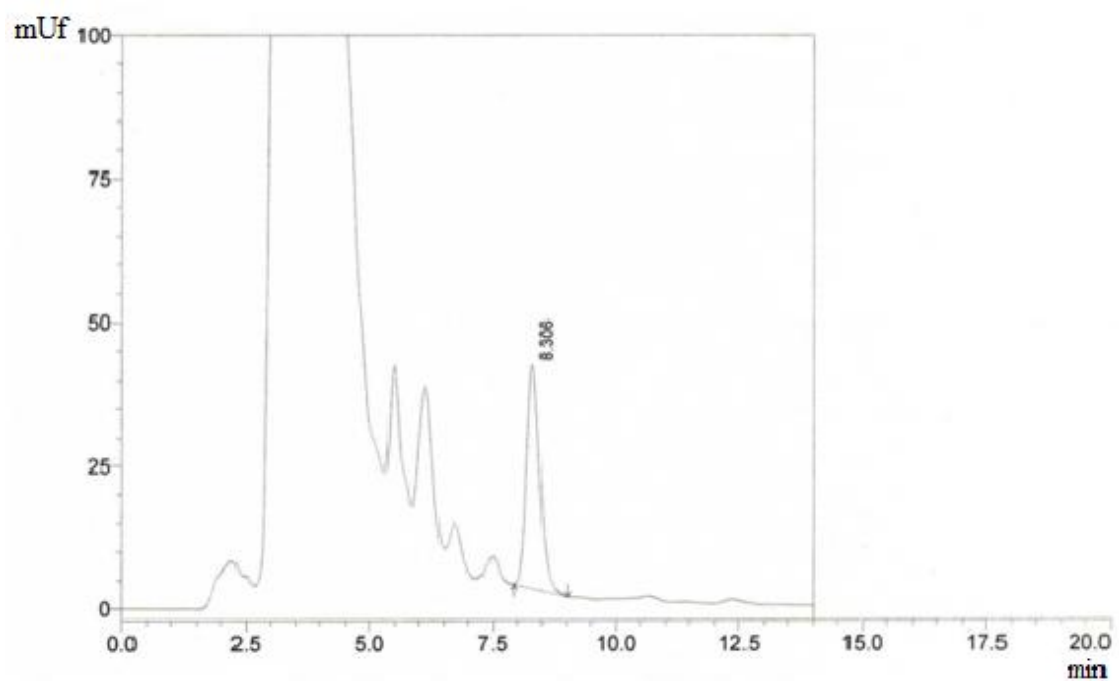
\* Variación porcentual con respecto al contenido teórico (5 ng/mL)

## Especificidad

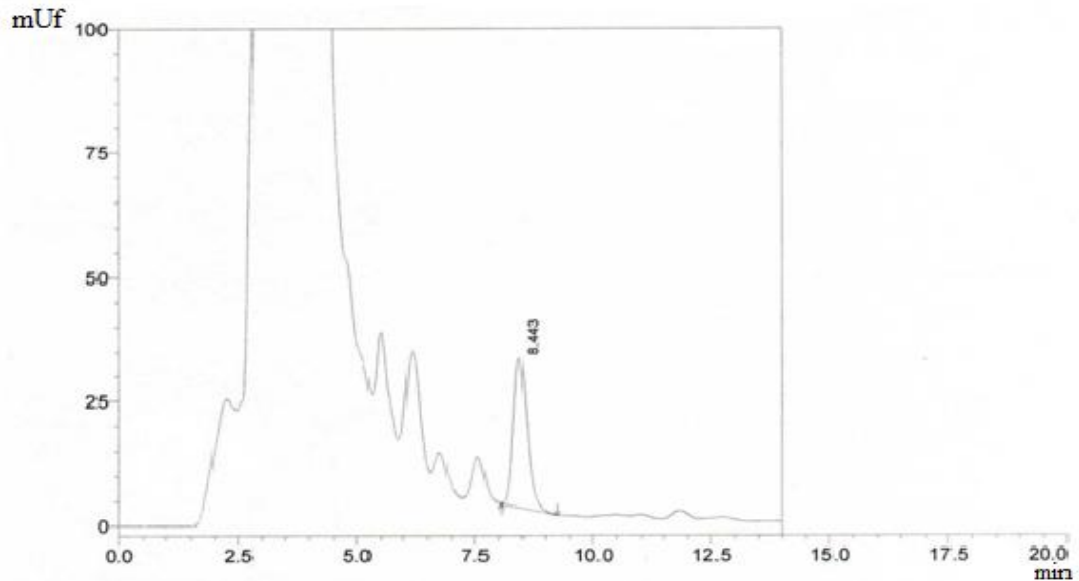
La Figura 4 muestra los cromatogramas representativos obtenidos luego de que un vino base (Figura 3) fuera enriquecido con OTA (2,0 ng/mL) (Figura 4) y además se le aplicara 3,5 ng/mL de (+)-catequina y ácido gálico (Figura 5).



**Figura 3.** Cromatograma representativo de un vino base.



**Figura 4.** Cromatograma representativo de un vino fortificado con OTA (2,0 ng/mL).



**Figura 5.** Cromatograma representativo de un vino fortificado con OTA (2,0 ng/mL) y 3,5 ng/mL de (+)-catequina y ácido gálico.

De acuerdo a la Figuras 4, a los 8,4 minutos se observa la presencia de un pico de alta resolución correspondiente a la micotoxina OTA. De la misma manera, al agregar una cantidad fija de de (+)-catequina y ácido gálico, se observó que OTA mantiene el valor de tiempo de retención del analito (Figura 5). Esto demostraría la inexistencia de interferencia del extracto de polifenoles sobre el tiempo de retención de OTA. Esta observación indica que el método de análisis, tiene una gran especificidad, lo cual permitiría evaluar distintos tipos y variedades de vino que posean concentraciones diferenciales de estos compuestos bioactivos.

### Recuperabilidad

La recuperabilidad de OTA fue evaluada mediante el uso de un vino fortificado con 1,0; 2,0 y 4,0 ng/mL de OTA. En los tres casos el porcentaje promedio de recuperación fue mayor a 95% (Cuadro 4). Este valor estaría dentro de los rangos de recuperabilidad propuestos por la Food and Drug Administration (FDA, 2001) que recomienda límites entre 80 y 100%. Esta observación demostraría que bajo las condiciones metodológicas aplicadas se logra una alta recuperabilidad de OTA.

**Cuadro 4.** Estudio de Recuperabilidad

Valor Teórico (ng/mL)	Recuperación (%)
4,0	95,25 ± 0,08
2,0	99,00 ± 0,14
1,0	95,00 ± 0,03

## Variabilidad

En este ensayo se evaluó la variabilidad del método de cuantificación durante el día e inter-días. Para la evaluación del efecto del día, se realizaron evaluaciones a las 9.00, 12.00 y 16.00 hrs, cada una con dos repeticiones. El vino fue enriquecido con cantidades de 1,0; 2,0 y 4,0 ng/mL de OTA. Según el Cuadro 5, la recuperabilidad alcanzó un promedio de 95,08% con un coeficiente de variación bajo 1,5%.

**Cuadro 5.** Estudio de variabilidad intra-día

Valor teórico (ng/mL)	Recuperabilidad (ng/mL)*	Recuperabilidad. (%)	Coefficiente de Variación (%)
4.0	3.628 ± 0,018	90.71	0.506
2.0	1.948 ± 0,055	97.40	2.808
1.0	0.971 ± 0, 007	97.14	0.684
Promedio	95.08 ± 1,333		

\*Promedio n=6

Para el caso de la evaluación del efecto entre días, se realizaron evaluaciones a las 9.00 hrs. De la misma manera, el vino fue enriquecido con cantidades de 1,0; 2,0 y 4,0 ng/mL de OTA. Según el Cuadro 6, la recuperabilidad alcanzó un promedio de 95,12% con un coeficiente de variación bajo 2,5%.

Los resultados anteriormente expuestos muestran que los valores de recuperabilidad obtenidos, coinciden con lo recomendado por la FDA (1996), mientras que los porcentajes de la variabilidad están por debajo de lo observado con otros métodos (Chan *et al.*, 2004; Miller y Miller, 2002).

**Cuadro 6.** Estudio de la variabilidad inter-días

Valor teórico (ng/mL)	Recuperabilidad inter-día promedio (ng/mL)	Recuperabilidad. (%)	Coefficiente de Variación. (%)
4,0	3,648 ± 0,084**	91,20	2,297
2,0	1,940 ± 0,063*	96,98	3,264
1,0	0,972 ± 0,014 *	97,21	1,437
Promedio		95,12	2,332

\* promedio n=12 en 46 días

\*\* promedio n=25 en 46 días

### Reproducibilidad del método

La reproducibilidad del método se evaluó analizando muestras de vino fortificado con 1,0; 2,0 y 4,0 ng/mL de OTA. El análisis fue realizado por dos integrantes del laboratorio en forma independiente. Al evaluar los resultados de reproducibilidad, no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los analistas ( $p > 0.05$ , test de *t* Student) (Cuadro 7), lo que indicaría que los resultados obtenidos mediante el método aplicado son independientes del operador.

Cuadro 7. Estudio de Reproducibilidad del metodo

Valor teórico (ng/mL)	Analista 1		Analista 2		Desviación estándar (s) entre analistas
	Valor real (ng/mL)*	Recuperabilidad (%)	Valor real (ng/mL)*	Recuperabilidad (%)	
4,0	3,643	91,07	3,752	93,80	1,928
2,0	1,852	92,60	1,884	94,22	1,140
1,0	0,972	97,21	0,956	95,62	1,128
Promedio	93,63±3,20 a		94,55 ± 0,95 a		

\*Promedio n=8

### Contenido de OTA en vinos Cabernet Sauvignon y Carménère

En el Cuadro 9 se presentan los valores de concentraciones de OTA encontradas en vinos Cabernet Sauvignon y Carménère. Cada muestra fue analizada en duplicado. Cabe señalar que en el caso de Cabernet Sauvignon solo se pudo identificar la presencia de OTA, pero no fue posible cuantificarla debido a que se encontraba bajo el límite de cuantificación. Por otra parte, el vino Carménère presentó una concentración promedio de 0,100 ng/mL de OTA.

**Cuadro 9.** Contenido de OTA (ng/ml) en vinos Cabernet Sauvignon y Carménère.

Muestra	Cabernet Sauvignon	Carménère
1	BLC*	0,101 ± 0,004
2	BLC	0,099 ± 0,005
3	BLC	0,107 ± 0,001
4	BLC	0,095 ± 0,001
5	BLC	0,091 ± 0,004
6	BLC	0,093 ± 0,002
7	BLC	0,090 ± 0,003
8	BLC	0,131 ± 0,003
9	BLC	0,095 ± 0,005
10	BLC	0,088 ± 0,001
11	BLC	0,105 ± 0,008
12	BLC	0,108 ± 0,013
Promedio	-	0,100 ± 0,012

\*BLC: bajo el límite de cuantificación

Se ha observado que el contenido de OTA en los vinos depende de diversos factores, tales como condiciones agroclimatológicas y de vinificación (Gambutì *et al.* 2005; Majerus *et al.*, 2000; OIV, 2005). En este estudio se observó que el vino Carménère analizado presentó concentraciones cuantificables de OTA, en cambio Cabernet Sauvignon se encontró bajo el límite de cuantificación. Esta observación sugeriría que el vino Carménère se produjo en condiciones favorables para el desarrollo de microorganismos productores de micotoxinas. Estas condiciones podrían estar relacionadas con la maduración más tardía de esta variedad lo que facilitaría el desarrollo de estos hongos fitopatógenos.

Los valores de OTA detectados en los vino Carménère son similares a los encontrados en vinos de distintos lugares del mundo (Majerus *et al.*, 2000; Mateo *et al.*, 2007; Miraglia y Brera, 2002; Ospital *et al.*, 1998). No obstante lo anterior, el contenido de OTA detectado en este estudio, se encuentra muy por debajo de lo permitido por organismos internacionales, que fijan el contenido máximo de OTA en 2,0 µg/L (Resolución CST 1/2002) (OIV, 2005). Es interesante señalar que los valores encontrados en este estudio están por sobre los niveles encontrados en trabajos previos realizados en vinos chilenos (Mateo *et al.*, 2007; Pacin *et al.*, 2005), esta discrepancia podría estar relacionada con diferentes factores entre los que caben incluso, particularidades de las metodologías utilizadas por otros autores que bien pudieron resultar en una subvaloración de los niveles de esta toxina, lo que podría representar que el método propuesto tiene ventajas comparativas con respecto a otros métodos de cuantificación de OTA .

## **CONCLUSIONES**

Bajo las condiciones metodológicas propuestas en este estudio el método analítico propuesto es reproducible y confiable para la detección y cuantificación de OTA en vinos tintos.

## BIBLIOGRAFÍA

Chan Ch.Ch, Y.C. Lee, H. Lam y X.-M. Zhang. 2004. Method validation for HPLC analysis of related substances in pharmaceutical drug products. Analytical Method Validation and Instrument Performance Verification. John Wiley & Sons. USA. 27-49p.

Comisión de las Comunidades Europeas. 2006. Reglamento (CE) No 1881/2006 (19 de diciembre de 2006). Diario Oficial de la Unión Europea. Disponible en [http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/site/es/oj/2006/1\\_364/1\\_36420061220es00050024.pdf](http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/site/es/oj/2006/1_364/1_36420061220es00050024.pdf). Leído el 17 de diciembre de 2010.

De la Vega Y. 1986. Características químicas y metabólicas de las micotoxinas. Encuentro nacional sobre micotoxinas y micotoxicosis en el sector agropecuario. Instituto de Investigaciones Agropecuarias, Santiago, Chile 1: 75 y 2: 73.

Food and Drug Administration (FDA). 2001. Guidance for industry bioanalytical method validation. 5 p.

Gambutí A., D. Strollo, A. Genovese, M. Ugliano, A. Ritieni and L. Moio. 2005. Influence of enological practices on Ochratoxin A concentration in wine. American Journal of Enology and Viticulture 56: 155-162p.

García-Barceló J. 1990. Técnicas analíticas para vinos. Ediciones FAB. Barcelona. España. 1713p.

Glories, Y. 1984. La couleur des vin rouge. 2ème partie. Mesure, origine et interpretation. Conn. Vigne Vin 18:253-271p.

Gruettner P., L. Leiva y B. Rodillo. 2005. Caracterización de los racimos, evaluación del potencial productivo y enológico de diferentes cvs. de *Vitis vinifera* L. en las comunas de Coelemu y Trehuaco. Memoria Ingeniero Agrónomo. Pontificia Universidad Católica de Chile, Facultad de Agronomía e Ingeniería Forestal. Santiago, Chile. 81p.

Kumagai S., M. Nakajima, S. Tabata, E. Ishikuro, T. Tanaka, H. Norizuki, Y. Itoh, K. Aoyama, K. Fujita, S. Kai, T. Sato, N. Yoshiike and Y. Sugita-Konishi. 2008. Aflatoxin and ochratoxin A contamination of retail foods and intake of these mycotoxins in Japan. Food Additives and Contaminants 25(9): 1101-1106

Majerus P., H. Bresch and H. Otteneder. 2000. Ochratoxin A in wines, fruit juices and seasonings. Archiv für Lebensmittelhygiene 51: 95-97p.



Mannari J. Tillement and L. Giovannini. 2005. Effect of ethanol and red wine on Ochratoxin A-induced experimental acute nephrotoxicity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53(6): 6924-6929

Marin S., A. Valero y V. Sanchos. 2008. Presencia de ocratoxina a (OTA) en vinos especiales europeos. La pasificación y su repercusión en el contenido de OTA en los vinos. Generalitat de Catalunya. Disponible en <http://www.gencat.net/salut/acsa/html/ca/dir1311/dd16608/03-c-marin.pdf>. Leído el 17 de octubre de 2010.

Mercurio, M., R. Damberg, M. Herderich and P. Smith. 2007. High throughput analysis of red wine and grape phenolics - adaptation and validation of methyl cellulose precipitable tannin assay and modified somers color assay to a rapid 96 well plate format. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55(12): 4651-4657.

Miller J.N. and J.C. Miller. 2002. Métodos de calibración en análisis instrumental: regresión y correlación en estadística y quimiometría para química analítica. Editorial Practice. 4<sup>a</sup> ed. Madrid. 111-155p.

Meier P. and Zünd R. 2000. Statistical method in analytical chemistry. 2<sup>nd</sup> ed. Jhon Wiley & Sons, New York, EEUU. 456p.

Miraglia M. and C. Brera. 2002. Assessment of dietary intakes of ochratoxin A by the population of EU member states. Reports on takes for scientific cooperation. Reports of experts participating in Task 3.2.7. Dirección General de Salud y Protección al Consumidor, Roma, Italia.

Muñoz K., M. Vega, G. Rios, S. Muñoz and R. Madariaga. 2006. Preliminary study of Ochratoxin A in human plasma in agricultural zones of Chile and its relation to food consumption. *Food and Chemical Toxicology* 44: 1884-1889p.

Naccha L., N. Cavazos, A. Torres, M. Castillo y A. Robledo. 2005. Ocratoxinas y su impacto en la salud. *Universidad Autónoma de Nuevo León* 8(3): 373-377

Obreque-Slier E, A. Peña-Neira, R. López-Solís, F. Zamora-Marín, J.M. Ricardo-da Silva and O. Laureano. 2010. Comparative study of the phenolic composition of seeds and skins from Carménère and Cabernet Sauvignon grape varieties (*Vitis vinifera L.*) during ripening. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58: 3591-3599

Obreque-Slier E., R. López-Solís, L. Castro-Ulloa, C. Romero-Díaz and A. Peña-Neira. 2012. Phenolic composition and physicochemical parameters of Carménère, Cabernet Sauvignon, Merlot and Cabernet Franc grape seeds (*Vitis vinifera L.*) during ripening. *Food Science and Technology* 48: 134-141

Organización Internacional del Vino y el Viñedo. 2005. Resolución Viti-oenológico 1/2005. The International Organization of Vine and Wine. Disponible en [http://news.reseau-concept.net/images/oiv\\_es/Client/VITI-OENO\\_1-2005\\_ES.pdf](http://news.reseau-concept.net/images/oiv_es/Client/VITI-OENO_1-2005_ES.pdf). Leído el 17 de Octubre de 2010.

Ospital M., J.M. Cazabeil, A.M. Betbeder, C. Tricard, E. Creppy and B. Medina. 1998. Ochratoxin A in wines. *Revue Francoise d'Oenologie* 169: 16-18p.

Ratola N., L. Martins and A. Alves. 2004. Ochratoxin A in wines – assessing global uncertainty associated with the result. *Analytica Chimica Acta* 513: 319-324p.

Rousseau J. 2005. Ochratoxina A en vinos: Estado de los conocimientos. Instituto Cooperativo del Vino. Disponible en <http://www.icv.fr/kiosque/bibliotheque/bibliespagnol/OTA.pdf>. Leído el 17 de Octubre de 2010.

Serra R., C. Mendonca, L. Abrunhosa, A. Pietri and A. Venâncio. 2004. Determination of ochratoxin A in wine grapes: comparison of extraction procedures and method validation. *Analytica Chimica Acta* 513: 41-47

Sugita-Konishi Y., T. Tanaka, M. Nakajima, K. Fujita, H. Norizuki, N. Mochizuki y K. Takatori. 2006. The comparison of two clean-up procedures, multifunctional column and immunoaffinity column for HPLC determination of ochratoxin A in cereals, raisins and green coffee beans. *Talanta* 69: 650-655

Vinos de Chile A.G. 2011. Exportaciones de vino año 2011. Disponible en <http://www.vinasdechile.com/contenidos/informacion/estadisticas-anuales/>. Leído el 12 de Junio de 2012.

## ANEXOS

### Anexo I

La linealidad del método se evaluó tomando como referencia el libro Statistical Method in Analytical Chemistry, (Meier-Zünd, 2000). Con los resultados obtenidos se realizó el estudio de regresión lineal.

- **Coefficiente de correlación (r):**

#### Ecuación 1.

$$r = \frac{S_{xy}}{\sqrt{S_{xx} * S_{yy}}}$$

Donde:

$S_{xy}$  = sumatoria del eje **XY**

$S_{xx}$  = sumatoria del eje **X** (concentraciones)

$S_{yy}$  = sumatoria del eje **Y** (áreas)

- **Límite de detección (LD):**

#### Ecuación 2

$$LD = t * S_y * \frac{\sqrt{\frac{\sum x^2}{n * S_{xx}}}}{b}$$

Donde:

$t$  = constante 2.77

$S_y$  = desviación estándar de **Y**

$\sum x^2$  = sumatoria del eje **X<sup>2</sup>**

$n$  = número de mediciones

$S_{xx}$  = sumatoria del eje **X** (concentraciones)

$b$  = pendiente

- **Limite de cuantificación (LC):**

### Ecuación 3

$$LC = t * S_y * \frac{\sqrt{\frac{\sum x^2}{n * S_{xx}} + \frac{1}{n} + \frac{(LD - x)^2}{S_{xx}}}}{b}$$

Donde:

$t$  = constante 2.77

$S_y$  = desviación estándar de **Y**

$\sum x^2$  = sumatoria del eje **X**<sup>2</sup>

$n$  = número de mediciones

$S_{xx}$  = sumatoria del eje **X** (concentraciones)

$LD$  = limite de detección

$x$  = media de **X**

$b$  = pendiente