



PRESENCIA DE ETIL CARBAMATO Y OCHRATOXINA A DURANTE LA FERMENTACIÓN DE UVA (*Vitis vinifera*) CARIGNANE

ETHYL CARBAMATE AND OCHRATOXIN A PRESENCE DURING CARIGNANE GRAPE (*Vitis vinifera*) FERMENTATION

Carmen María López-Saiz^{1,3}, María Esther Parra-Durazo^{2,3}, Manuel Sánchez-Lucero², Armando Burgos-Hernández³, Daniel Morales-Romero¹, Octavio Cota-Arriola^{*1}

¹ Programa de Ingeniería Ambiental, Universidad Estatal de Sonora, Campus Hermosillo. Hermosillo, Sonora, México. Ley Federal del Trabajo S/N. CP 83100.

² Instituto del Manejo, Conservación y Procesamiento de Alimentos. Hermosillo, Sonora, México. Fronteras #182 entre Reyes y Escobedo. Col. San Benito. CP 83190.

³ Departamento de Investigación y Posgrado en Alimentos, Universidad de Sonora. Blvd. Luis Encinas y Rosales S/N. Apartado Postal 1658, Hermosillo, Sonora 83000, México.

RESUMEN

El vino es una bebida conocida a nivel mundial con más de 500 diferentes tipos de compuestos, algunos relacionados con efectos adversos a la salud tales como la ocratoxina A (OTA) y el etil carbamato (EC). El objetivo de este trabajo fue estudiar la producción de ambos tóxicos durante el proceso de fermentación de uva Carignane. Se monitoreó la disminución de la concentración de azúcares fermentables por medio de un hidrómetro de gravedad específica, la concentración de OTA y EC por medio de HPLC y la identificación de hongos por microcultivo. Se encontró que el tiempo de fermentación está directamente relacionado con la temperatura de fermentación y presentan un comportamiento logarítmico. La concentración de OTA máxima fue de 3.423 ± 0.332 ppm; esta no se ve afectada por tiempo ni temperatura de fermentación, por lo que la presencia de esta micotoxina se debe a su producción por *Aspergillus niger* en campo; en cuanto al EC, este no se generó bajo las condiciones experimentales utilizadas. Este estudio demuestra que EC y OTA no representan un riesgo a la salud del consumidor bajo las condiciones utilizadas, y para disminuir el riesgo de OTA, se deben tener consideraciones en el campo vitivinícola.

Palabras Clave: Ocratoxina A, Etil Carbamato, Vino.

ABSTRACT

Wine is a worldwide known beverage, which possesses more than 500 different compounds, some related with adverse health effects such as Ochratoxin A (OTA) and Ethyl Carbamate (EC). The aim of this research was to study OTA and EC production during Carignane grape fermentation. Sugar concentration was monitored with a specific gravity hydrometer; OTA and EC were measured by HPLC and fungi identification was performed by microculture. Fermentation time directly related with fermentation temperature, with a logarithmic behavior. The highest OTA concentration obtained was 3.423 ± 0.332 ppm, which is not affected by fermentation time nor temperature; therefore, the mycotoxin is due to the presence of *Aspergillus niger* in the vineyard. On the other hand, EC was not produced under these fermentation conditions.

This study demonstrates that EC nor OTA represent a consumer health risk under the conditions used, nevertheless, to ensure OTA does not represent a real risk, good agricultural practices should be used in the vineyard.

Keywords: Ochratoxin A, Ethyl Carbamate, Wine.

INTRODUCCIÓN

El vino es una bebida conocida a nivel mundial, solo en el 2016 se reportó que su consumo excedió los 267 millones de hectolitros (OIV, 2017). El vino es el producto de la fermentación alcohólica de uva por diferentes especies de levaduras, principalmente de *Saccharomyces cerevisiae*; en este proceso, la glucosa y fructosa presentes en la uva son transformadas, principalmente, en etanol y dióxido de carbono, sin embargo, este es un proceso mucho más complejo (Moreno-Arriivas y Polo, 2009).

La presencia de más de 500 diferentes tipos de compuestos ha sido reportada en vinos, la mayoría de ellos se encuentran de manera natural en la uva, sin embargo, algunos son generados durante el proceso de vinificación (Leighton y Urquiaga, 2000).

Como es bien conocido, una parte estos compuestos se han relacionado con efectos en la salud humana, tanto benéficos como perjudiciales, pero el efecto real es aún en nuestros tiempos un tópico de discusión (Irity y Varoni, 2014); por ejemplo, el consumo moderado de vino tinto se asocia con la reducción de enfermedades cardíacas y un mayor tiempo de vida (Xiang, *et al.*, 2014).

Por otra parte está la presencia de sustancias que, en ciertas concentraciones, pueden ser consideradas como tóxicas, tales como arsénico y metales pesados (Hu, 2002), metabolitos no alcohólicos (Delfini y Formica, 2001), alcoholes y micotoxinas. Las ocratoxinas son metabolitos secundarios de las especies de *Penicillium* y *Aspergillus* cuya presencia ha sido reportada en vinos (Gil-Serna, *et al.*, 2018); de toda la familia de ocratoxinas, la ocratoxina A (OTA) es la que presenta un mayor efecto tóxico, y en concentraciones elevadas se ha relacionado con el desarrollo de glomerulonefritis (Bui-Klimke y Wu, 2015), además, esta micotoxina ha sido clasificado den-

*Autor para correspondencia: Octavio Cota-Arriola
Correo electrónico: tavo_baviacota@hotmail.com

Recibido: 25 de mayo de 2018

Aceptado: 5 de noviembre de 2018

tro del grupo 2A de la Agencia Internacional de Investigación en Cáncer (IARC) debido a su posible carcinogenicidad para humanos (IARC, 1993). Químicamente OTA se describe como una isocumarina clorada (Gil-Serna, *et al.*, 2018).

Por otra parte, también se ha reportado la presencia de etil carbamato (EC) en vino, también llamado uretano, químicamente es un etil éster del ácido carbámico. El EC se ha reportado principalmente en productos alimentarios y bebidas fermentados tales como el queso, pan, yogurt, vino, whisky, salsa de soya, entre otros (Gowd, *et al.*, 2018). Se ha detectado que este compuesto puede ejercer efectos tóxicos significativos en el ser humano; la exposición aguda provoca daño en riñones e hígado, depresión del sistema nervioso central, y los efectos crónicos pueden provocar anomalías y mortalidad fetal (Schlatter, *et al.*, 2010), además la IARC ha clasificado a este compuesto también dentro del grupo 2B (IARC, 2010).

Debido a la importancia del consumo mundial del vino, es importante conocer no solo los efectos benéficos que conlleva el consumo de la bebida, sino también los posibles efectos toxicológicos que puede ejercer su consumo; es por lo anterior que el objetivo del presente estudio fue estudiar la presencia de OTA y EC en el vino, así como su destino durante el proceso de fermentación de uva Carignane.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales

La uva Carignane (*Vitis vinifera*) fue obtenida de un viñedo local de Hermosillo, Sonora, México y transportado al laboratorio. Se tomaron muestras de 20 Kg para cada experimento. Las uvas fueron limpiadas y molidas en un equipo diseñado y construido para este propósito. Se tomó una alícuota de 200 mL del jugo de uva y se le añadieron 0.16 mg de levadura comercial (*Sacharomices cerevisiae*) y 0.40 mg de fosfato de sodio (para llegar a una concentración final de 20 µg/Kg), a lo cual se le denominó caldo iniciador y se reservó hasta que se activara la cepa de la levadura.

El caldo iniciador y la uva molida fueron combinados después de 4 horas y mezclados por dos minutos para homogenizar. La uva fue prensada en un equipo de laboratorio, diseñado y construido con este fin, de esta manera se separaron las fases líquida y sólida. El jugo de uva fue filtrado (mosto) y colocado en un fermentador. Una vez que la uva fue filtrada, se inició la fermentación a distintas temperaturas (20, 30 y 35 °C). En ese momento se tomó una muestra de cada uno de los tratamientos para iniciar el análisis ($t = 0$ min).

Diseño del Fermentador

Los fermentadores fueron construidos con acero inoxidable, material recomendado para realizar fermentaciones (Vine, 2002). Las medidas de los equipos fueron de 35 cm de altura, con un diámetro interno de 28 cm. Las tapas de los contenedores eran adaptables a los mismos y se cerraban con tuercas para simular las características de un tanque. La tapa contaba con un agitador eléctrico operando a 80 rpm para homogenización de las muestras. En la tapa el fermentador

contaba con una ventila diseñada para expulsar los gases de fermentación; así mismo se instaló un termopar con la finalidad de monitorear la temperatura durante el proceso.

Azúcares Fermentables

Se monitoreó el consumo de azúcares fermentables mediante la determinación de los grados brix de la solución; esta fue monitoreada periódicamente de acuerdo a la temperatura de fermentación. Se utilizó un hidrómetro de gravedad específica: las mediciones se realizaron a 20 °C y se hicieron correcciones si la temperatura de la muestra se encontraba fuera de esta temperatura con la ayuda de tablas de ICUMSA (2015).

Cuantificación de Ocratoxina A

La micotoxina fue determinada de acuerdo a la metodología descrita por (Bezzo, *et al.*, 2002). Se extrajo y concentró la micotoxina por medio de una columna de inmunoafinidad Ochraprep® (R-biopharm, Darmstadt, Alemania). El pH de las muestras se ajustó a 7.4 con la ayuda de una solución 1 N de NaOH así como una solución 2 N de H₃PO₄. Se hicieron pasar 30 mL de la muestra a través del cartucho, y después se enjuagó con 5 mL de agua destilada y finalmente se eluyó la ocratoxina con 6 mL de una solución metanol: ácido acético (98:2 v/v). Una vez que la OTA fue recuperada, se evaporó el solvente en un baño de agua y la muestra fue disuelta en 3 mL de la fase móvil.

Se utilizó un equipo de cromatografía líquida ProStar 215 de alta presión con una columna Hypersil (Thermo) de 2.1 mm de diámetro interno y 25 cm de longitud; las fases móviles fueron acetato de sodio 4mM-ácido acético (19:1) y acetonitrilo con flujo isocrático de 0.4 mL/min y una proporción de fases de 48:52 (v/v). Se utilizó un detector de fluorescencia con longitudes de onda de excitación y emisión de 230 y 458 nm, respectivamente.

Identificación de Hongos

Se realizó una siembra en agar PDA a 22 °C por 5 días de acuerdo a la NOM-111-SSA1-1994 y se identificaron colonias de *Aspergillus*. Después se realizó una resiembra en agar Czapeck para identificación de la especie productora de micotoxina de acuerdo a la metodología descrita por (Klich, 2004). Brevemente, la técnica consiste en una siembra en superficie, incubación por 5 días a 22 °C y finalmente un frotis y tinción para observar las características morfológicas del hongo. Además de esto se realizó un microcultivo para observar las estructuras morfológicas en los primeros estadios de desarrollo.

Cuantificación de Etil Carbamato

La determinación del EC se realizó por la técnica modificada propuesta por Herbert, *et al.* (2002). Para la preparación de la inyección al equipo cromatográfico, se tomaron 500 µL de muestra tomada directamente de la fermentación, se adicionaron 100 µL de 9-xantidrol como agente derivatizante, y 50 µL de ácido clorhídrico y se dejaron reaccionar por cinco

minutos en oscuridad. Una vez obtenida la solución, se hizo pasar a través de un acrodisco de 4.5 nm y la muestra filtrada fue inyectada al HPLC.

Se utilizó un equipo de cromatografía líquida ProStar 215 de alta presión con una columna HP Hypersil ODS de 250 mm de longitud de y 2.1 mm de diámetro interno. El detector utilizado fue de fluorescencia (HPLC-3) con longitud de onda de excitación 233 nm y longitud de onda de emisión 600 nm, las fases móviles utilizadas fueron acetonitrilo y acetato de sodio 0.02 mol/L. La temperatura de la columna se mantuvo a 40°C. Las señales se compararon contra una curva de calibración realizada con un estándar comercial (Sigma-Aldrich).

Diseño Experimental

Se realizó un diseño completamente al azar, utilizando como variable independiente la temperatura y tiempo de fermentación y como variable respuesta la concentración de OTA y EC. Los resultados son el promedio de tres repeticiones y dos réplicas; los datos fueron expresados como promedio \pm desviación estándar. Se realizó una comparación de medias por medio de la prueba de Tukey, con un nivel de significancia de $\alpha=0.05$. Para realizar los cálculos se utilizó el paquete estadístico JMP 9.0.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Consumo de Azúcares Fermentables

Se obtuvieron valores iniciales de contenido de azúcares fermentables de 17.4 ± 0.4 ; estos valores se encuentran dentro del rango de °Bx recomendados para fermentación, los cuales, de acuerdo a Vine (2002) se encuentran en un rango de 14 a 23°Bx.

Se realizaron ajustes para descubrir matemáticamente el comportamiento de la variación de los °Bx durante el proceso de fermentación a diferentes temperaturas; los comportamientos pueden ser descritos a través de un modelo logarítmico (Tabla 1). Se observó un claro efecto de la temperatura en el tiempo de fermentación, siendo la velocidad más alta a 35°C (Figura 1); esto se debe a la actividad de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, la cual se ve afectada por la temperatura. Mensonides (2002) reportó que la temperatura óptima para el crecimiento de esta especie es a 37°C y en temperaturas mayores y menores su actividad disminuye.

Tabla 1. Regresiones matemáticas para la disminución de azúcares fermentables en uva Carignane a temperaturas de 20, 30 y 35°C.

Table 1. Mathematical regressions for sugar depletion of Carignane grape at 20, 30 and 35°C.

Temperatura (°C)	Modelo Matemático*	Coefficiente de determinación (R ²)
20	$^{\circ}Bx_{20}=34.06-7.19\ln(t)$	0.9888
30	$^{\circ}Bx_{30}=40.59-10.95\ln(t)$	0.9980
35	$^{\circ}Bx_{35}=36.15-10.93\ln(t)$	0.9979

* Cada modelo matemático fue calculado con al menos 10 tiempos de fermentación y tres repeticiones por tratamiento

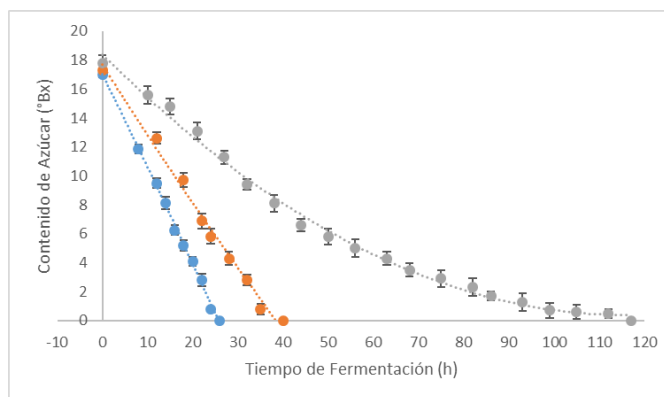


Figura 1. Disminución del contenido de azúcares fermentables en fermentación de uva Carignane.

Figure 1. Sugar depletion in Carignane grape fermentation.

Ocratoxina A

Se determinó el porcentaje de recuperación de la OTA a través de la contaminación de una muestra con una concentración conocida; el porcentaje obtenido fue de 96%, con el cual se realizaron los ajustes de los resultados a las muestras.

La micotoxina fue detectada en todas las muestras analizadas, de acuerdo a los resultados presentados en la Tabla 2. No se presentaron diferencias con respecto al tiempo de fermentación, lo que indica que su presencia en el producto terminado solamente a la producción de OTA en campo. Serra (2003) reportó que la síntesis de la micotoxina por cualquiera de los hongos productores puede ocurrir en las uvas, previo a la cosecha, y por tanto, se puede presentar en el vino; en los resultados obtenidos en este estudio se observó la presencia de la micotoxina desde el inicio de la fermentación y se mantuvo la misma durante el proceso de fermentación; este comportamiento discrepa de aquello reportado por (Ratola, *et al.*, 2005) quien en su estudio observó una reducción de la concentración de la micotoxina en un 92%. Los hongos del género *Aspergillus* son aeróbicos y al someterlas a las condiciones anaeróbicas durante la fermentación, se afecta la actividad enzimática provocando una influencia en todo el metabolismo del microorganismo (Haq, *et al.*, 2005).

Tabla 2. Presencia de OTA durante la fermentación a 20, 30 y 35 °C.

Table 2. Presence of OTA during fermentation at 20, 30 and 35 °C.

Temperatura (°C)	Tiempo (h)	OTA (ng/mL)*
20	0	0.2832 ± 0.0128^b
	57	0.2924 ± 0.0240^b
	105	0.2904 ± 0.0188^b
30	0	0.3423 ± 0.0332^a
	32	0.3069 ± 0.0235^a
35	42	0.3222 ± 0.0139^a
	0	0.2221 ± 0.0318^c
	18	0.2004 ± 0.0224^c
	28	0.2195 ± 0.0272^c

* Cada valor es el promedio de dos repeticiones y dos lecturas. Valores con la misma letra no presentaron diferencias significativas

Todos los valores de OTA en el estudio se encuentran por debajo del límite máximo recomendado por la Organización Internacional de la Vid y el Vino (OIV) quienes establecieron un máximo de 2 ng/mL (OIV, 2005); el valor más alto cuantificado en este estudio fue de 0.3243 ng/mL. Valores similares fueron reportados en otros estudios (Bellí, *et al.*, 2004; López de Cerain, *et al.*, 2002; Blesa, *et al.*, 2004).

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, por lo tanto, se deben tomar las medidas adecuadas en campo; Belly (2004) reportó que entre mayor sea la permanencia del fruto en el campo se presenta un mayor crecimiento de hongos micotoxigénicos del género *Aspergillus*.

Las cantidades de OTA en el mosto y el vino se ve influenciada fuertemente por las condiciones pre- y post-cosecha y las técnicas de vinificación. Las condiciones pre-cosecha que afectan los niveles de OTA son factores climáticos, locación del viñedo y variedad de uva (Rotaru, *et al.*, 2002). Durante la época de cosecha en este estudio se obtuvieron en campo temperaturas de hasta 43 °C y una alta humedad relativa debido a las lluvias que se presentaron, de hasta 42 mm; estas condiciones pudieron provocar el crecimiento del hongo y la producción de la micotoxina. Las condiciones óptimas de crecimiento de las especies de *Aspergillus* responsables de la producción de la micotoxina en uva son de 24 a 37 °C con actividad de agua entre 0.95 y 0.98 y con niveles de pH entre 5 y 6.5 (Passamani, *et al.*, 2014).

No existe diferencia significativa en la concentración de OTA en el transcurso de la fermentación, por lo que, si se desean incrementar la prevención, se deben tomar medidas en campo a través de las buenas prácticas de agricultura (Sage, *et al.*, 2002).

Identificación de Hongo

Se llevó a cabo la cuenta en placa de hongos y levaduras del jugo de uva, se realizó el conteo por triplicado y se obtuvo un promedio de 5400 ± 150 UFC/mL de jugo; este conteo estaba integrado por levaduras silvestres y hongos. De acuerdo a la NOM-093-SSA1-1994, este valor se encuentra por debajo del límite máximo permitido para alimentos, el cual está normado en 150,000 UFC/g.

Para llevar a cabo la identificación de la especie productora de la micotoxina se llevó a cabo un aislamiento por medio de un microcultivo donde se identificó al género *Aspergillus*. Después se llevó a cabo un cultivo por medio de siembra en superficie en agar Czapek para caracterizar las colonias de *Aspergillus* presentes en el jugo de uva.

En el cultivo se observó un micelio blanco con cabezas conidiales de color oscuro, ambas características de las especies *A. carbonarius* y *A. niger* de acuerdo a (Klich, 2004), 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 2.

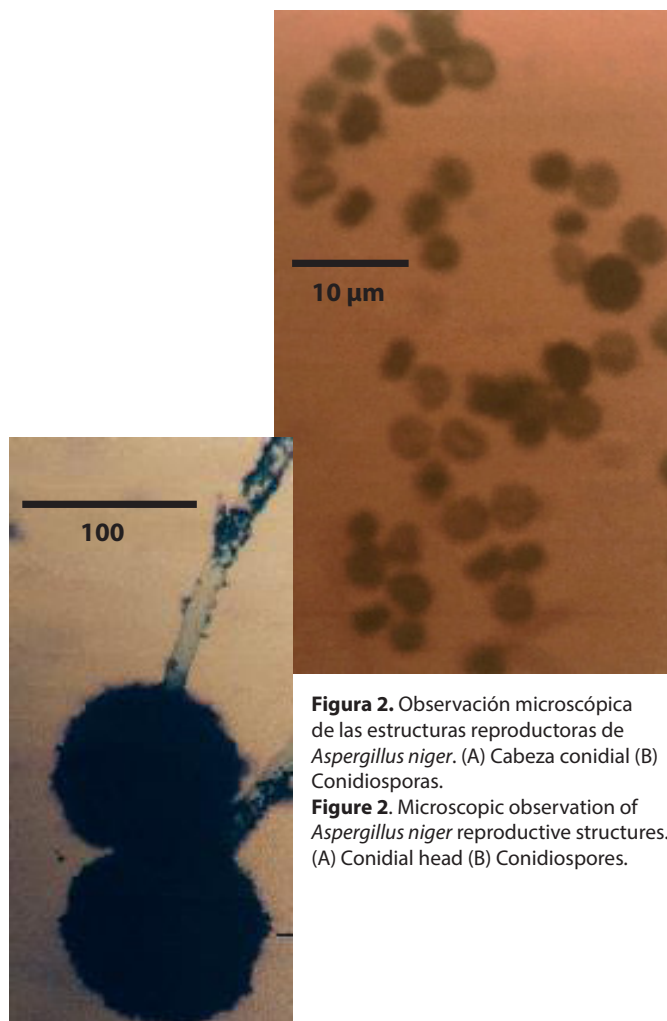


Figura 2. Observación microscópica de las estructuras reproductoras de *Aspergillus niger*. (A) Cabeza conidial (B) Conidiosporas.

Figure 2. Microscopic observation of *Aspergillus niger* reproductive structures. (A) Conidial head (B) Conidiospores.

De acuerdo a las observaciones se puede decir que *A. niger* es el hongo productor de la micotoxina presente en el vino de este estudio, ya que el tamaño de las conidias se encuentra en el rango especificado por (Klich, 2004) de 3.5 a 4.5 μm y la vesícula de 30 a 75 μm ; 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 .

A pesar de que *A. carbonarius* es la especie que ha sido reportada como el mayor productor de OTA, *A. niger* también ha sido identificada como productor en uva (Tjamos, *et al.*, 2004), y de todas las especies productoras de la micotoxina, *A. niger* es el que resiste las condiciones climatológicas más extremas de hasta 45-47 °C, temperaturas similares a las reportadas para el área de la zona vitivinícola (Benford, *et al.*, 2001).

Carbamato de Etilo

El límite de cuantificación para esta prueba fue de 30 ng/mL, el cual es el límite máximo recomendado para vinos de uva según la Asociación de Bienestar y Salud de Canadá (Lau, *et al.*, 1987).

Al momento de que las muestras de vino fueron analizadas, no se encontró presencia de este metabolito por arriba del límite de detección establecido para la técnica;

esto nos indica que, de acuerdo a las temperaturas y condiciones de fermentación presentadas en este estudio, el EC no se genera en el proceso de elaboración de vino. Estos resultados concuerdan con los reportados por Bluhm (1988) quienes en 114 muestras analizadas para EU no se detectó presencia de EC en un nivel mayor de 30 ng/mL (nivel 1), dos de ellas mostraron un valor dentro de 20-30 ng/mL (nivel 2), y para menos de 20 ng/mL (nivel 3) se observó un porcentaje de 1.75% de las muestras en este rango. Dado lo anterior, podemos sugerir que el EC en los vinos analizados en este estudio se encuentra por debajo del límite máximo establecido como máximo permitido por Canadá.

Es importante señalar que, de acuerdo a investigaciones recientes, se ha encontrado que el contenido de EC incrementa de manera lineal durante el tiempo de almacenamiento, por lo que se recomienda el tratamiento de los vinos con ureasa para prevenir la formación de este metabolito durante el almacenamiento de vinos (Cerreti, *et al.*, 2016).

CONCLUSIONES

En las condiciones a las que se llevó a cabo esta investigación, no se produce etil carbamato durante la fermentación, por lo que no representa un riesgo su consumo. El proceso de fermentación de uva Carignane no provoca la producción de ocratoxina A, sino que el contenido de esta micotoxina se debe a su producción en el campo, en este caso por la especie *A. niger*.

AGRADECIMIENTOS

Los autores desean expresar su gratitud al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada a López-Saiz; a la empresa Allied-Domecq por financiar el proyecto, así como al Instituto del Manejo, Conservación y Procesamiento de Alimentos por las facilidades para realizar el mismo.

REFERENCIAS

- Bellí, N., Marin, S., Duagües, A., Ramos, A.J., y Sanchis, V. 2004. Ochratoxin A in wines musts and grape juices from Spain. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 84(6):291-294.
- Bellí, N., Pardo, E., Marin, S., Farre, G., Ramos, A., y Sanchis, V. 2004. 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.
- Benford, D., Boyle, C., Dekant, W., Fuhs, R., Gaylor, D., Hard, G., McGregor, D., Pitt, J., Plestina, R., Shephard, G., Solfrizzo, M., Verger, P., y Walker, R. 2001. Ochratoxin A. JEFCA.
- Bezzo, G., Maggiorotto, G., y Testa, F. 2002. A method for the determination of specific mycotic contaminants random occurring in wines. Paris: Office International de la Vigne et du Vin.
- Blesa, J., Soriano, J., Moltó, J., y Mañes, J. 2004. Concentration of Ochratoxin A in wines from supermarkets and stores of Valencian community (Spain). *Journal of Chromatography*, Volumen 1054: 397-401.
- Bui-Klimke T., y Wu F. 2015. Ochratoxin A and human health risk: A review of the evidence. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 55(13):1860-1869.
- Cerreti, M., Fidaleo, M., Benucci, I., Liburdi, K., Tamborra, P., y Moresi, M. 2016. Assessing the Potential Content of Ethyl Carbamate in White, Red, and Rosé Wines as a Key Factor of Pursuing Urea Degradation by Purified Acid Urease. *Journal of Food Science* 81(7):C1603-C1612.
- Delfini, C., y Formica, J., 2001. Wine microbiology: Science and technology. Italia: L'artística savigliano.
- Gil-Serna, J., Vázquez, C., González-Jaén, M. T., y Patiño, B. 2018. Wine Contamination with ochratoxins: A Review. *Beverages*. 4(1):1-21.
- Gowd, V., Su, H., Karlovsky, P., y Chen, W. 2018. Ethyl carbamate: An emerging food and environmental toxicant. *Food Chemistry*. 248: 312-321.
- Haq, I., Ali, S., y 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.
- Herbert, P., Santos, L., Bastos, M., y Barros P. 2002. New HPLC method to determine ethyl carbamate in alcoholic beverages using fluorescence detection. *Journal of Food Science*. 67(5):1616-1620.
- Hu, H., 2002. Human health and heavy metal exposure. USA. MIT Press.
- IARC. 1993. Ochratoxin A. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to Humans, 56: 489-521.
- IARC. 2010. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Lyon: World Health Organization, International Agency for Research on Cancer.
- ICUMSA. 2015. International commission for uniform methods of sugar analysis methods.
- Iriti, M., y Varoni, E. 2014. Cardioprotective effects of moderate red wine consumption: Polyphenols vs ethanol. *Journal of Applied Biomedicine*. 12(4):193-202.
- Klich, M. 2004. Identification of common *Aspergillus* species. The Netherlands: Centraalbureau voor Schimmelcultures.
- Leighton, F., y Urquiaga, I. 2000. Polifenoles del vino y salud humana. *Antioxidantes y Calidad Humana*. 7: 5-13.
- López de Cerain, A., González-Peñas, E., Jiménez, A., y Bello, J. 2002. Contribution to the study of ochratoxin A in spanish wines. *Food Additives and Contaminants*. 19(11):1058-1064.
- Moreno-Arrivas, V., y Polo, C. 2009. Wine Chemistry and Biochemistry. USA. Ed. Springer.
- OIV. 2005. Resolution viti-oenol 1/2005, Francia: OIV.
- OIV. 2017. 2017 World Vitiviniculture Situation. OIV Statistical Report on World Vitiviniculture. Francia: OIV.
- Passamani, F.R., Hernandez, T., Lopes, N.A., Bastos, S.C., Santiago W.D., Cardisi N.D., y Batista L.R. 2014. Effect of temperature, water activity and pH on growth and production of ochratoxin A by *Aspergillus niger* and *Aspergillus carbonarius* from Brazilian grapes. *Journal of Food Protection*. 77(11):1947-1952.
- Ratola, N., Abade, E.E., Simoes, E.T., Venancio, E.A., y Alves A. 2005. Evolution of ochratoxin A content from must to wine in port wine microvinification. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 382:405-411.
- Rotaru, S., Israel-Roming, F., Campeanu, G., y Deciu, G. 2002. Correlation of Ochratoxin A level in wine with vine environment. *Romanian Biotechnological Letters*. 16(6):126-130.

- Sage, L., Krivobok, S., Delbos, E., Seigle-Murandi, F., y Creppy, E. 2002. Fungal flora and ochratoxin A production in grapes and musts from France. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 50:1306-1311.
- Serra, R., Abrunhosa, L., y Kozakiewickz, Z. V. A. 2003. Black *Aspergillus* species as ochratoxin A producers in Portuguese wine grapes. *International Journal of Food Microbiology*. 8(1):63-68.
- Schlatter J., DiNovi, M., y Setzer, R.W. 2010. Application of the margin of exposure (MoE) approach to substances in food that are genotoxic and carcinogenic. Example: Ethyl carbamate (CAS 51-79-6). *Food and Chemical Toxicology*. 48:563-568.
- Tjamos, S., Antoniou, P.P, Kazantzidou, A., Antonopoulos, D.F., Papageogiou, I., y Tjamos E.C. 2004. *Aspergillus niger* and *Aspergillus carbonarius* in Cornith raisins and wine-producing vineyards in Greece: Population composition, ochratoxin A production and chemical control. *Journal of Phytopathology*. 152:250-255.
- Vine, R. H. E. L. S. 2002. *Winemaking. From grape growing to market place*. USA: Kluwer academic/Plenum publishers.
- Xiang, L., Xiao, L., Wang, Y., Li, H., Huang, Z., y Xe, X. 2014. Health benefits of wine: Don't expect resveratrol too much. *Food Chemistry*. 156:258-263.