



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

Estandarización de la extracción de ADN de *Vitis vinífera* en vinos e identificación de ocratoxina A en vinos de diferentes regiones del mundo.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
INGENIERA EN ALIMENTOS

P R E S E N T A:

AIMEÉ MONDRAGÓN HERNÁNDEZ

ASESOR:

Dr. JOSÉ FRANCISCO MONTIEL SOSA

ASESORA:

M. en M. JOSEFINA MORENO LARA

CUAUTITLÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO, 2021



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
SECRETARÍA GENERAL
DEPARTAMENTO DE TITULACIÓN**

ASUNTO: VOTO APROBATORIO

**M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE**

**ATN: I.A. LAURA MARGARITA CORTAZAR FIGUEROA
Jefa del Departamento de Titulación
de la FES Cuautitlán.**

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el trabajo de: **Tesis**

Estandarización de la extracción de ADN de Vitis vinífera en vinos e identificación de ocratoxina A en vinos de diferentes regiones del mundo.

Que presenta la pasante: **Aimeé Mondragón Hernández**

Con número de cuenta: **310195108** para obtener el Título de: **Ingeniera en Alimentos**

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el **EXAMEN PROFESIONAL** correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO**.

ATENTAMENTE

“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 25 de Mayo de 2021.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Dr. José Francisco Montiel Sosa	
VOCAL	I.A. Miriam Alvarez Velasco	_____
SECRETARIO	M. en C. Ana Elvia Sánchez Mendoza	_____
1er. SUPLENTE	Q.F.B. Alejandro Gutiérrez García	_____
2do. SUPLENTE	Dra. Alma Adela Lira Vargas	_____

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional.

LMCF/javg



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
SECRETARÍA GENERAL
DEPARTAMENTO DE TITULACIÓN**

ASUNTO: VOTO APROBATORIO

**M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE**

**ATN: I.A. LAURA MARGARITA CORTAZAR FIGUEROA
Jefa del Departamento de Titulación
de la FES Cuautitlán.**

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el trabajo de: **Tesis**

Estandarización de la extracción de ADN de Vitis vinifera en vinos e identificación de ocratoxina A en vinos de diferentes regiones del mundo.

Que presenta la pasante: **Aimeé Mondragón Hernández**

Con número de cuenta: **310195108** para obtener el Título de: **Ingeniera en Alimentos**


Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el **EXAMEN PROFESIONAL** correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO**.

ATENTAMENTE

“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 25 de Mayo de 2021.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Dr. José Francisco Montiel Sosa	_____
VOCAL	I.A. Miriam Alvarez Velasco	_____ 
SECRETARIO	M. en C. Ana Elvia Sánchez Mendoza	_____
1er. SUPLENTE	Q.F.B. Alejandro Gutiérrez García	_____
2do. SUPLENTE	Dra. Alma Adela Lira Vargas	_____

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional.

LMCF/javg



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
SECRETARÍA GENERAL
DEPARTAMENTO DE TITULACIÓN**

ASUNTO: VOTO APROBATORIO

**M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE**

**ATN: I.A. LAURA MARGARITA CORTAZAR FIGUEROA
Jefa del Departamento de Titulación
de la FES Cuautitlán.**

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el trabajo de: **Tesis**

Estandarización de la extracción de ADN de Vitis vinífera en vinos e identificación de ocratoxina A en vinos de diferentes regiones del mundo.

Que presenta la pasante: **Aimeé Mondragón Hernández**
Con número de cuenta: **310195108** para obtener el Título de: **Ingeniera en Alimentos**

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el **EXAMEN PROFESIONAL** correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO**.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cuautitlán Izcalli, Méx. a 25 de Mayo de 2021.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Dr. José Francisco Montiel Sosa	_____
VOCAL	I.A. Miriam Alvarez Velasco	_____
SECRETARIO	M. en C. Ana Elvia Sánchez Mendoza	
1er. SUPLENTE	Q.F.B. Alejandro Gutiérrez García	_____
2do. SUPLENTE	Dra. Alma Adela Lira Vargas	_____

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional.

LMCF/javg



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
SECRETARÍA GENERAL
DEPARTAMENTO DE TITULACIÓN**

ASUNTO: VOTO APROBATORIO

**M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE**

**ATN: I.A. LAURA MARGARITA CORTAZAR FIGUEROA
Jefa del Departamento de Titulación
de la FES Cuautitlán.**

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el trabajo de: **Tesis**

Estandarización de la extracción de ADN de Vitis vinífera en vinos e identificación de ocratoxina A en vinos de diferentes regiones del mundo.

Que presenta la pasante: **Aimeé Mondragón Hernández**

Con número de cuenta: **310195108** para obtener el Título de: **Ingeniera en Alimentos**

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el **EXAMEN PROFESIONAL** correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO**.

ATENTAMENTE

“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 25 de Mayo de 2021.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Dr. José Francisco Montiel Sosa	_____
VOCAL	I.A. Miriam Alvarez Velasco	_____
SECRETARIO	M. en C. Ana Elvia Sánchez Mendoza	_____
1er. SUPLENTE	Q.F.B. Alejandro Gutiérrez García	
2do. SUPLENTE	Dra. Alma Adela Lira Vargas	_____

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional.

LMCF/javg



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
SECRETARÍA GENERAL
DEPARTAMENTO DE TITULACIÓN**

ASUNTO: VOTO APROBATORIO

**M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE**

**ATN: I.A. LAURA MARGARITA CORTAZAR FIGUEROA
Jefa del Departamento de Titulación
de la FES Cuautitlán.**

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el trabajo de: **Tesis**

Estandarización de la extracción de ADN de Vitis vinífera en vinos e identificación de ocratoxina A en vinos de diferentes regiones del mundo.

Que presenta la pasante: **Aimeé Mondragón Hernández**

Con número de cuenta: **310195108** para obtener el Título de: **Ingeniera en Alimentos**

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el **EXAMEN PROFESIONAL** correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO**.

ATENTAMENTE

“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 25 de Mayo de 2021.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Dr. José Francisco Montiel Sosa	_____
VOCAL	I.A. Miriam Alvarez Velasco	_____
SECRETARIO	M. en C. Ana Elvia Sánchez Mendoza	_____
1er. SUPLENTE	Q.F.B. Alejandro Gutiérrez García	_____
2do. SUPLENTE	Dra. Alma Adela Lira Vargas	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional.

LMCF/javg

DEDICATORIAS

A mis abuelos Roselia y Arnulfo, por acompañarme, apoyarme e impulsarme a estudiar hasta el último día de sus vidas.

A mi madre y hermana, por ser los pilares de mi vida. Son mi más grande motor y soporte, este documento es fruto de su apoyo, las amo.

A mi Jacques Pierre, por su amor incondicional a lo largo de esta aventura.

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a Dios, por darme la oportunidad y el privilegio de poder estudiar una licenciatura.

Gracias totales a esas personas que yo llamo ángeles, quienes llegaron a mi vida a iluminar este camino: mis asesores el Dr. Montiel por su total apoyo, y Mtra. Josefina por regalarme su tiempo y esfuerzo para realizar este trabajo, gracias Dra. Martha por sus asesorías y entusiasmo al compartir su conocimiento, gracias Dra. Carmen Valderrama por ser una gran inspiración.

A todas las y los profesores que dejaron un impacto positivo en mi vida: Saturnino, Julieta, Francisco J. López, Miriam, Vaely, y Laura Cortázar quien siempre me orientó en mis dudas profesionales, gracias a todos por compartir su conocimiento y por su dedicación, me llevo todas sus enseñanzas en el corazón.

Gracias a la coordinadora Dulce por su arduo trabajo y sobre todo por su guía durante este proceso.

A mis amigas, quienes hicieron este camino una aventura más alegre y sencilla.

Sobre todo, gracias a mi familia, a mis abuelos por animarme a comenzar esta licenciatura, a mi madre por todo el apoyo, sin ti nada de esto sería posible, a mi hermana por siempre animarme, a mis primas por escucharme, y a las familias Rincón Solórzano y Hernández Escamilla gracias por celebrar conmigo los pequeños logros.

Gracias a Simón quién siempre estuvo pendiente de mí y de mis estudios, incluso estando en otro país.

Gracias a la UNIGRAS por recibirme, por darme la oportunidad de aprender de personas maravillosas, y por ayudarme a encontrar mi vocación.

Gracias UNAM y FES Cuautitlán, por darme todas las herramientas para seguir adelante. Es un orgullo pertenecer a la máxima casa de estudios.

Gracias a todas las personas que no he mencionado y que fueron un gran soporte en mi vida durante todos estos años.

ÍNDICE

Índice de figuras.....	12
Índice de tablas.....	13
Resumen.....	14
Introducción.....	14
CAPÍTULO 1: Antecedentes.....	16
1.1 La vid.....	16
1.2 La uva (<i>Vitis vinífera</i>).....	17
1.2.1 Morfología y taxonomía de la uva.....	17
1.2.2 Composición química y clasificación.....	18
1.2.3 Variedades de uva para vinos.....	20
1.2.4 Producción mundial de uva.....	23
1.2.5 Producción nacional de uva industrial.....	23
1.2.6 Importación y exportación de uva industrial.....	25
1.3 Uva genéticamente modificada.....	25
1.3.1 Definición de Organismos Genéticamente Modificados.....	25
1.3.2 Técnicas de modificación genética.....	26
1.3.3 Producción de OGM.....	27
1.3.4 Legislación de OGM en el mundo.....	30
1.3.5 Legislación de OGM en México.....	31
1.3.6 Modificaciones genéticas en la uva para vino.....	32
1.3.7 Métodos de identificación de OGM.....	33
1.3.7.1 Reacción en cadena de la polimerasa PCR.....	34
1.3.7.2 Fundamento de la PCR.....	34
1.3.7.3 Elementos de la PCR.....	34
1.3.7.4 Etapas de la PCR.....	35
1.3.7.5 Diseño de primers.....	36
1.3.7.6 Ventajas y desventajas de la PCR.....	36
1.3.7.7 Electroforesis.....	36
1.3.7.8 Fundamento de la electroforesis.....	36
1.4 Hongos presentes en las uvas.....	37
1.4.1 <i>Aspergillus ochraceus</i>	37
1.4.1.1 Características.....	37
1.4.2 <i>Aspergillus niger</i>	37
1.4.2.1 Características.....	37
1.4.3 <i>Aspergillus carbonarius</i>	38

1.4.3.1 Características	38
1.5 Micotoxinas	39
1.5.1 Definición	39
1.5.2 Toxicidad	39
1.5.3 Ocratoxina A	39
1.5.3.1 Definición	39
1.5.3.2 Ocratoxina A en vinos.....	40
1.5.3.3 Normas generales sobre ocratoxinas	41
1.6 El vino	42
1.6.1 Historia del vino	42
1.6.2 Definición	44
1.6.3 Composición química del vino	44
1.6.4 Tipos de vino	45
1.6.5 Producción mundial de vino	46
1.6.6 Producción nacional de vino	48
1.6.6.1. Regiones vinícolas nacionales	48
1.6.7 Elaboración de vinos	49
1.6.8 Fermentación.....	53
1.6.9 Fermentación alcohólica y maloláctica	54
CAPÍTULO 2: Metodología experimental	55
2.1 Justificación	55
2.2. Cuadro Metodológico	56
2.3. Descripción del cuadro metodológico.....	57
2.3.1. Objetivo General.....	57
2.3.2. Objetivo Particular 1	57
2.3.3. Objetivo Particular 2	57
2.3.4. Objetivo Particular 3	57
2.4 Materiales y Métodos	57
2.4.1 Diseño de primers	59
2.4.2 Extracción de ADN	59
2.4.3 Cuantificación de ADN	61
2.4.4 Técnica PCR	61
2.4.5 Electroforesis	62
2.4.6 Determinación de ocratoxina A	63
CAPÍTULO 3: Resultados y discusión	64
3.1 Resultados	64

3.1.1. Resultados del objetivo particular 1	64
3.1.2. Resultados del objetivo particular 2	64
3.1.3. Resultados del objetivo particular 3	68
3.2 Discusión	69
3.3 Conclusiones	70
3.4 Recomendaciones	70
Bibliografía	71
Anexos	76
Anexo 1. Diseño de primers.....	76

Índice de figuras

Figura 1. Partes de la vid	16
Figura 2. Flores de vid en diferentes estados de desarrollo	17
Figura 3. Corte esquemático de un grano de uva	18
Figura 4. Formas de los frutos de uva	20
Figura 5. Superficie de los principales países vitícolas.	23
Figura 6. Volumen de producción nacional de uva industrial.	24
Figura 7. Principales estados productores de uva industrial.	24
Figura 8. Modificación de cultivo tradicional.....	26
Figura 9. Ingeniería genética	26
Figura 10. Edición del genoma	26
Figura 11. Superficie de cultivos Genéticamente Modificados a nivel mundial.	28
Figura 12. Países que cultivan Organismos Genéticamente Modificados al año 2019. Superficie y tipos de cultivo.	29
Figura 13. Uvas creadas por el Instituto Nacional para la Investigación Agronómica (INRA).....	32
Figura 14. Racimo de uvas afectado por <i>Aspergillus niger</i>	38
Figura 15. Uvas afectadas por <i>Aspergillus carbonarius</i>	38
Figura 16. Estructura química de la ocratoxina A	40
Figura 17. Consumo y producción mundial de vino.	46
Figura 18. Exportaciones e importaciones mundiales de vino.	47
Figura 19. Producción mundial de vino. (Media obtenida del 2013-2017).....	47
Figura 20. Principales entidades vinícolas de México y sus variedades de uva.....	48
Figura 21. Diagrama de flujo del vino tinto.....	50
Figura 22. Diagrama de flujo del vino blanco.....	53
Figura 23. Vinos utilizados para la experimentación.	59
Figura 24. Sedimento del vino	60
Figura 25. Molienda de uva.	61
Figura 26. Programa de PCR para <i>Vitis vinífera</i>	62
Figura 27. Gel de agarosa al 1% a 90 V para la amplificación de 2 muestras de uva, utilizando primers de <i>Vitis vinífera</i> con amplificado de 713 pb. En el carril (M) marcador de peso molecular. En el carril (B) control negativo. En el carril (UR) uva roja. En el carril (UV) uva verde.....	66
Figura 28. Gel de agarosa al 1% a 90 V para la amplificación de 2 muestras de uva y 2 muestras de vino, utilizando primers de <i>Vitis vinífera</i> con amplificado de 713 pb.	67
Figura 29. Gráfica del contenido de ocratoxina A en vinos.	69

Índice de tablas

Tabla 1. Clasificación taxonómica de la Vitis vinífera.	18
Tabla 2. Composición química por 100g de porción comestible de uvas blancas y tintas.	19
Tabla 3. Contenido de vitaminas en uvas blancas y tintas.	19
Tabla 4. Variedades de uvas blancas para la elaboración de vinos.	21
Tabla 5. Variedades de uvas tintas para la elaboración de vinos.	22
Tabla 6. Límites máximos para la ocratoxina A establecidos por la Comisión Europea.	42
Tabla 7. Composición química del vino por 100g de porción comestible.	45
Tabla 8. Vinos utilizados para la investigación.	58
Tabla 9. Cuantificación del ADN obtenido de vino tinto.	64
Tabla 10. Información de los primers diseñados para Vitis vinífera.	65
Tabla 11. Resultados de cuantificación de ADN de uva blanca y tinta.	65

Resumen

México reporta un incremento en la producción de vino en los últimos años, esto se ha logrado gracias a las nuevas tecnologías implementadas y al mejoramiento de las uvas destinadas para la producción de esta bebida y de igual manera presenta un aumento en el consumo de vino mexicano en la última década, dentro de los países con mayor superficie vitivinícola se encuentra en el lugar 25 con 34 mil hectáreas y posee 4 estados principales dedicados a la producción de vinos, a pesar de estos datos, poco se ha considerado la aparición de la ocratoxina A (OTA) en este producto, tanto es así que en el país no existe una normatividad que regule los límites para esta toxina a pesar de que existe una regulación europea y diversas investigaciones que confirman la presencia de la ocratoxina A en el vino, asimismo existen investigaciones que declaran el riesgo que implica la aparición de esta toxina, pues es nefrotóxica, teratogénica, inmunotóxica y posible cancerígena.

El principal objetivo de este trabajo fue el de estandarizar una metodología para la extracción del ADN de la uva de vino, adaptada a las condiciones del laboratorio disponibles en la universidad y también el análisis de ocratoxina A, utilizando columnas de inmunoafinidad con la finalidad de conocer la calidad de 19 vinos obtenidos de diferentes países del continente americano y del continente europeo.

Se evaluaron 19 muestras de vino, 2 vinos rosados, 4 vinos blancos y 13 vinos tintos, de los cuales 9 vinos fueron producidos en el continente americano en los países: México, Estados Unidos y Chile, y 10 vinos del continente europeo de los países: Francia, España y la región de Cataluña. Se diseñaron primers específicos para *Vitis vinífera* por medio de programas bioinformáticos y se realizó la técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) en 2 variedades de uvas de mesa para corroborar la funcionalidad de estos, la extracción de ADN de las uvas se hizo con el kit "DNeasy® PowerPlant® Pro". A todas las muestras de vino se les determinó la ocratoxina A mediante columnas de inmunoafinidad.

Los resultados obtenidos de la PCR mostraron amplificados de uva verde y uva roja dentro de la región esperada. Únicamente en 7 vinos (2 rosados, 4 blancos y 1 tinto) se encontró la presencia de ocratoxina A dentro del límite establecido por la Comisión Europea de 2µg/Kg, el resto superó este límite.

En conclusión, se logró establecer el protocolo de extracción de ADN de vino tinto y se comprobó la eficacia de los primers diseñados. Todos los vinos presentaron la aparición de ocratoxina A, siendo los blancos y rosados los que poseyeron una menor concentración de esta toxina.

Introducción

La uva es el fruto maduro de la vid, la uva para vino a diferencia de la uva de mesa, está destinada principalmente a la vinificación. En el país se hace una distinción entre uva fruta o uva de mesa que es

aquella destinada al consumo, y uva industrial que será la utilizada para la producción de jugos, mermeladas, concentrados, y vinos, entre otros (NOM-199-SCFI-2017).

De manera global, los países con mayor superficie vitícola son España, China continental y Francia; México se encuentra en la posición número 25 con 34 mil hectáreas (OIV, 2019).

Del año 2008 al 2017 hubo un aumento en la producción nacional de uva industrial de 10 toneladas/hectárea a 13.5 toneladas/hectárea, esto gracias a la implementación de innovaciones tecnológicas y al mejoramiento en las variedades de uva (SAGARPA/SIAP, 2018).

El vino se define como “la bebida resultante exclusivamente de la fermentación alcohólica parcial o completa de uvas frescas, ya sea trituradas o no, o de mosto de uva. Su contenido real de alcohol no será inferior al 8,5% del volumen” (OIV, 2019). Los principales productores a nivel mundial son Italia, Francia y, en tercer lugar, España. El consumo de vino per cápita en México al 2017 es de 750mL y dentro de los últimos 10 años, el consumo de vino mexicano ha crecido en un 20%, entre los estados productores de vino más importantes que destacan en el territorio mexicano se encuentran: Baja California, Zacatecas, Coahuila y Querétaro (SAGARPA/SIAP, 2018).

En el mundo se está realizando la modificación genética de las uvas con diferentes propósitos, tales como generar una resistencia a los insectos, resistencia a los hongos, y en uvas de mesa la ausencia de semillas en algunas variedades (FAO, 2001).

Existen diversas investigaciones en las cuales se evalúa la modificación genética de la uva para el uso en vinos, las principales aplicaciones de estas modificaciones son para la resistencia a enfermedades, el aumento de productividad, eficiencia y sostenibilidad, por otro lado, se busca el respeto al medio ambiente mejorando el control de plagas, la eficiencia del uso del agua y la calidad de la uva, que a su vez se ve reflejado en la calidad de los vinos (Vivier y Pretorius, 2002).

Los cultivos de vid pueden ser atacados por hongos, algunos de estos tienen la capacidad de producir micotoxinas, que son los metabolitos secundarios producidos por diferentes especies, pueden ser tóxicas para el consumo humano y se encuentran en diversos productos alimenticios, una de estas micotoxinas es la ocratoxina A (OTA) sintetizada por varias especies de los géneros de *Aspergillus* y *Penicillium* (Rousseau, 2004).

La OTA encontrada en uvas, es principalmente producida por *Aspergillus niger*, *Aspergillus carbonarius*, y en uvas pasas *Aspergillus ochraceus* y *Aspergillus foetidus*. En cuanto a vinos, se reporta que esta toxina se detecta en vinos tintos en mayor proporción que en vinos blancos y rosados (Rousseau, 2004). Su toxicidad radica en que es nefrotóxica, inmunosupresora, genotóxica, teratogénica,

neurotóxica y está clasificado por la Agencia Internacional de Investigación contra el Cáncer (IARC) como 2B, esto quiere decir, posible carcinógeno humano (Ravelo et al., 2011).

Este trabajo de tesis busca lograr la estandarización de un protocolo de extracción del ADN de uvas en vinos, para así lograr en una futura investigación la identificación de organismos genéticamente modificados en vinos, así como la detección de ocratoxina A en ellos. Esto principalmente para conocer la calidad de los vinos, así como para comprender las posibles ventajas o desventajas que conlleva el uso de estas uvas modificadas.

CAPÍTULO 1: Antecedentes

1.1 La vid

La *Vitis vinífera* o mejor conocida como vid, es una planta que pertenece a la familia de las Ampelídeas; el fruto de la vid es el conjunto de frutos en forma de racimo agrupados por un órgano herbáceo, el cual soporta un determinado número de bayas o frutos carnosos (Hidalgo, 2011).

Esta planta se puede distinguir en dos partes fundamentales, una es la subterránea que está formada por las raíces, y la parte aérea en donde se encuentra el tronco, los brazos, las ramas o sarmientos, hojas, frutos y el zarcillo, entre otros, en la Figura 1 están representadas las partes de la vid, de lado izquierdo podemos apreciar la parte subterránea y de lado derecho de manera más específica se muestran las partes que contiene la rama o sarmiento (Carbonari y Silva, 2013).

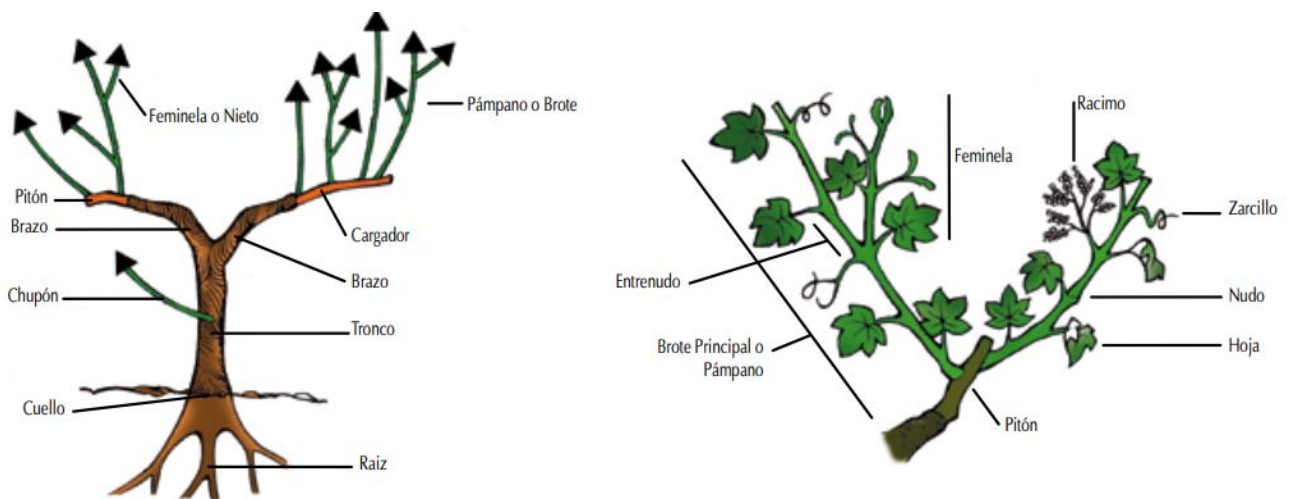


Figura 1. Partes de la vid

Fuente: Carbonari y Silva (2013).

En un principio, los racimos de uvas fueron flores que con el tiempo fueron fecundadas hasta llegar a la maduración para transformarse finalmente en el fruto o grano de uva (Hidalgo 2011). En la Figura 2

se presenta las flores de vid en las diferentes etapas de su crecimiento, la primera forma es la de la flor cerrada (A), seguida de la flor abriendo de la vid (B), las imágenes C y D representan la flor recién abierta con la corola caída y por último se muestra un corte en el que se almacenan las semillas (E) (Hidalgo, 2011).

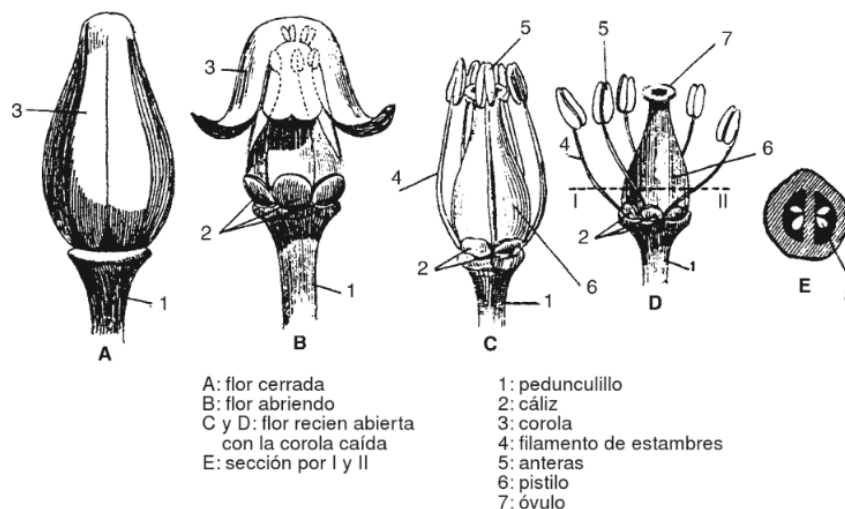


Figura 2. Flores de vid en diferentes estados de desarrollo

Fuente: Hidalgo (2011).

Otra parte fundamental de la vid son los racimos, que de manera general están constituidos por el escobajo (5%), hollejo o piel (7%), pulpa (84%) y semillas (4%) (Hidalgo, 2011).

1.2 La uva (*Vitis vinífera*)

Se entiende como uva el fruto maduro de la vid, la uva para vino a diferencia de la uva de mesa, está destinada principalmente a la vinificación, que es el conjunto de operaciones que se practican para la elaboración de vinos (NOM-199-SCFI-2017), básicamente por sus características; esta puede ser demasiado madura o ligeramente pasificada siempre y cuando pueda ser sometida a un proceso de triturado o prensado utilizando los procedimientos normales de vinificación y que sea capaz de sufrir una fermentación alcohólica espontánea, mientras que la uva de mesa es producida a partir de variedades de vid especiales o cultivadas para ese propósito, destinadas al consumo, debido a sus características sensoriales y comerciales (OIV, 2019).

1.2.1 Morfología y taxonomía de la uva

La uva son los frutos o bayas de la vid que aparecen una vez que se cumple con la fecundación, en la Figura 3, se muestra un corte esquemático del grano de uva, este fruto tiene 3 partes principales: el hollejo o piel, la pulpa y las pepitas o también conocidas como semillas (Hidalgo, 2011).

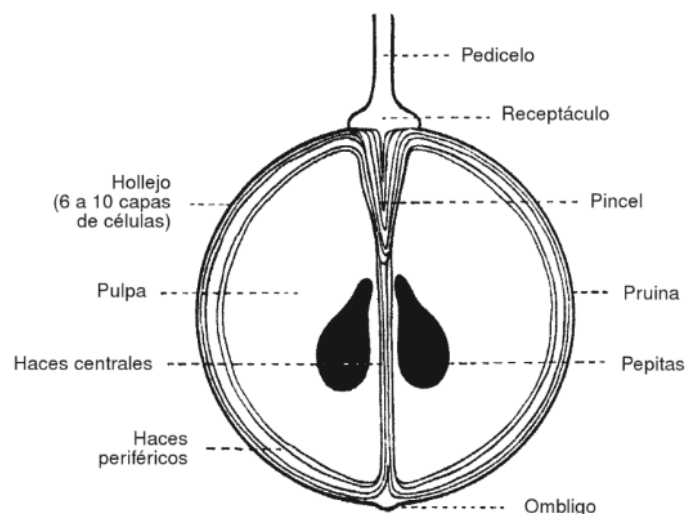


Figura 3. Corte esquemático de un grano de uva

Fuente: Hidalgo (2011).

La clasificación taxonómica presentada por El Real Jardín Botánico de Madrid (1999) se presenta en la Tabla 1.

Tabla 1. Clasificación taxonómica de la *Vitis vinífera*.

Reino	<i>Plantae</i>
División	<i>Magnoliophyta</i>
Clase	<i>Magnoliopsida</i>
Orden	<i>Vitales</i>
Familia	<i>Vitaceae</i>
Género	<i>Vitis</i>
Especie	<i>V. Vinífera</i>
Subespecie	<i>V.v. vinífera</i>

Fuente: Real Jardín Botánico de Madrid (1999).

1.2.2 Composición química y clasificación

Las uvas, ya sean blancas o tintas van a estar constituidas en mayor proporción por agua (82-83 %) y aportan en entre 63 y 34 kcal por cada 100 gramos consumidos, su contenido de proteínas es de 0.6% y de carbohidratos de 16.1-15.5%. En la Tabla 2, se muestra de manera desglosada la composición química de la uva blanca y tinta (Moreiras et al., 2011).

Tabla 2. Composición química por 100g de porción comestible de uvas blancas y tintas.

Elemento	Uva blanca	Uva tinta
Agua (g)	82.3	83.5
Energía (kcal)	63	61
Proteínas (g)	0.6	0.6
Lípidos (g)	-	-
Carbohidratos (g)	16.1	15.5
Fibra (g)	0.9	0.4
Ca (mg)	17	4
Fe (mg)	0.4	0.3
I (µg)	2	2
Mg (mg)	10	4
Zn (mg)	0.1	0.1
Na (mg)	2	2
K (mg)	250	320

Fuente: Elaboración propia a partir de datos de Moreiras et al. (2011).

Las uvas como muchas otras frutas y verduras poseen vitaminas hidrosolubles como son la riboflavina, tiamina, el ácido fólico y ácido ascórbico entre otros. En la Tabla 3, se presentan las cantidades de estas vitaminas contenidas en las uvas blancas y tintas (Moreiras et al., 2011).

Tabla 3. Contenido de vitaminas en uvas blancas y tintas.

Vitamina	Uva blanca	Uva tinta
Tiamina (mg)	0.04	0.04
Riboflavina (mg)	0.04	0.02
Niacina (mg)	0.3	0.3
Vitamina B6 (mg)	0.1	0.1
Ácido fólico (µg)	6	6
Vitamina B12 (µg)	0	0
Ácido ascórbico (mg)	4	4
Vitamina A (µg)	-	-
Retinol (µg)	0	0
Carotenos (µg)	-	-
Vitamina D (µg)	0	0
Vitamina E (mg)	-	-

Fuente: Elaboración propia a partir de datos de Moreiras et al. (2011).

Las bayas de uva pueden presentar diferentes características dependiendo de la variedad o de las condiciones de cultivo, de acuerdo con su forma se pueden clasificar como se muestra en la Figura 4 (Hidalgo, 2011).

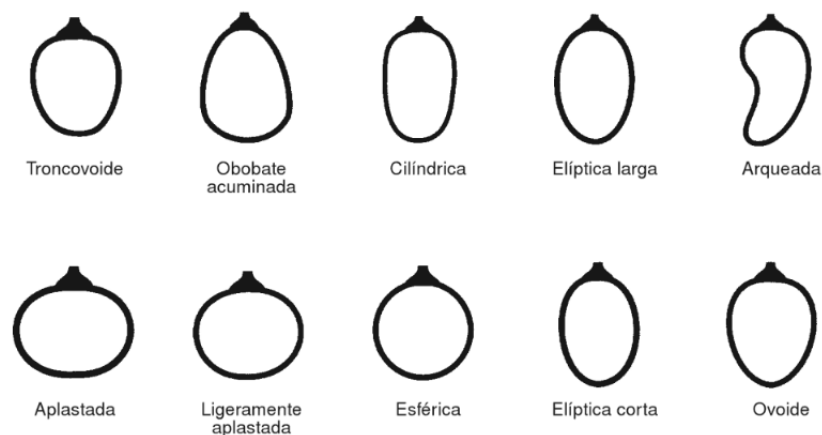


Figura 4. Formas de los frutos de uva.

Fuente: Hidalgo (2011).

Otra clasificación existente es de acuerdo con su tamaño, bajo este criterio se encuentran las uvas grandes medianas y pequeñas, siendo las uvas pequeñas aquellas que poseen una mayor relación superficie de hollejo/ volumen de la pulpa, esta relación en mayor proporción es favorable ya que con este tipo de uvas se producen vinos de mayor calidad debido a la conferencia de las propiedades del hollejo hacia el mosto (Hidalgo, 2011).

1.2.3 Variedades de uva para vinos

El tipo de uva que se utiliza en la vinificación es un factor de gran influencia en la elaboración de vinos, de esto depende las características que se le transfieren a los vinos ya sean virtudes o defectos, usualmente los vinos pueden ser elaborados con una o más variedades de uva, por el color que poseen se pueden clasificar en dos tipos: uvas blancas, aquellas que tiene una pulpa amarillenta y piel amarillenta por igual, y las uvas tintas que tienen pulpa amarillenta y piel roja. En las siguientes tablas (Tabla 4 y 5) se presentan algunas de las variedades de uvas más conocidas para la elaboración de vinos (Hidalgo,2011).

Tabla 4. Variedades de uvas blancas para la elaboración de vinos

Blancas	Características
<p>Chardonnay</p> 	<p>Variedad francesa originaria de Borgoña y Champagne, ampliamente cultivada en varias zonas vitícolas del mundo, una de las uvas blancas de mayor calidad, se elabora frecuentemente por un sistema de fermentación en barrica.</p> <p>En la juventud de los vinos presenta aromas a flores blancas, mantequilla fresca y miel, y posteriormente evoluciona hacia matices tostados confitados y de nuez.</p> <p>Grano pequeño redondo de un color dorado verdoso intenso.</p>
<p>Chenin blanc</p> 	<p>Variedad del Valle de Loira en Francia, de maduración media generalmente es preferible su uso como uva de mesa, sin embargo, es utilizada para hacer vinos secos o espumosos.</p> <p>Produce vinos diversos desde secos hasta espumosos, intensos con aromas a membrillo y evolucionando hacia tostados y canela.</p>
<p>Moscatel</p> 	<p>Variedad blanca mediterránea, por su riqueza aromática en vinos presenta un aroma a pétalos de rosa, geranio, azahar, vainilla y uvas pasa, así como un sabor dulce. Tiene granos grandes, redondos, y lisos y su piel es color blanco</p> <p>Da vinos aromáticos nítidos y frescos.</p>
<p>Sauvignon blanc</p> 	<p>Originaria de Burdeos, tiene racimos pequeños con bayas verdes y ovaladas, otorga un gusto a frutas tropicales cuando está muy madura y un toque ligeramente floral. Tiene racimos pequeños con bayas verdes y forma ovalada, produce vinos con aroma a cassis,</p>

Fuente: Elaboración propia con datos de Hidalgo (2011).

Tabla 5. Variedades de uvas tintas para la elaboración de vinos.

Tintas	Características
<p>Merlot</p> 	<p>Variedad originaria de la Burdeos, posee un color oscuro azulado y piel gruesa. Sus racimos son de tamaño medio-grande y el tamaño de baya media. Produce vinos jóvenes aromáticos con aroma a arándanos, frutos silvestres y tabaco.</p>
<p>Pinot Noir</p> 	<p>Variedad francesa originaria de la Borgoña, difícil de cultivar con racimos pequeños en forma de piña, produce aromas a frambuesa, violeta. Su racimo y bayas son muy pequeños y produce vinos de crianza con buen cuerpo y complejidad aromática.</p>
<p>Syrah</p> 	<p>Variedad de origen italiano, las uvas son ovoides y pequeñas, en vinos se tiene un aroma a violeta y a frutos negros maduros.</p>
<p>Cabernet Sauvignon</p> 	<p>Variedad de origen francés, procedente de la región de Burdeos, surge por un cruce entre dos variedades de uva Cabernet Franc y Sauvignon Blanc. Produce vinos con aromas a grosellas y bayas negras de color intenso.</p>
<p>Nebbiolo</p> 	<p>Variedad tinta italiana, de maduración tardía, produce vinos con aromas a ciruelas y violetas que evolucionan hacia matices tostados y trufados.</p>
<p>Tempranillo</p> 	<p>Las uvas son tintas con una piel gruesa, con bayas de color muy oscuro y en forma de esfera. Se utiliza para mezclas de vino, produce vinos de baja acidez y bajo contenido de azúcar.</p>
<p>Malbec</p> 	<p>Variedad de uva tinta con origen francés en la región de Burdeos, sus bayas son grandes y redondas, de tamaño uniforme, y los racimos pequeños con bayas compactas y péndulo corto. Produce vinos de color intenso, muy aromáticos y con amplios taninos, a menudo es mezclada con Merlot y Cabernet Sauvignon.</p>

Fuente: Elaboración propia con datos de Hidalgo (2011).

1.2.4 Producción mundial de uva

En la Figura 5 se muestra la superficie de los principales países vitícolas, en 2017 la Organización Internacional de la Viña y el Vino reporta que los 3 países principales con mayor superficie vitícola son España con 968 miles de hectáreas, seguido por China continental con 865 y en tercer lugar Francia con 788 miles de hectáreas, mientras que México se sitúa en la posición 25 con 34 mil hectáreas (OIV, 2019).

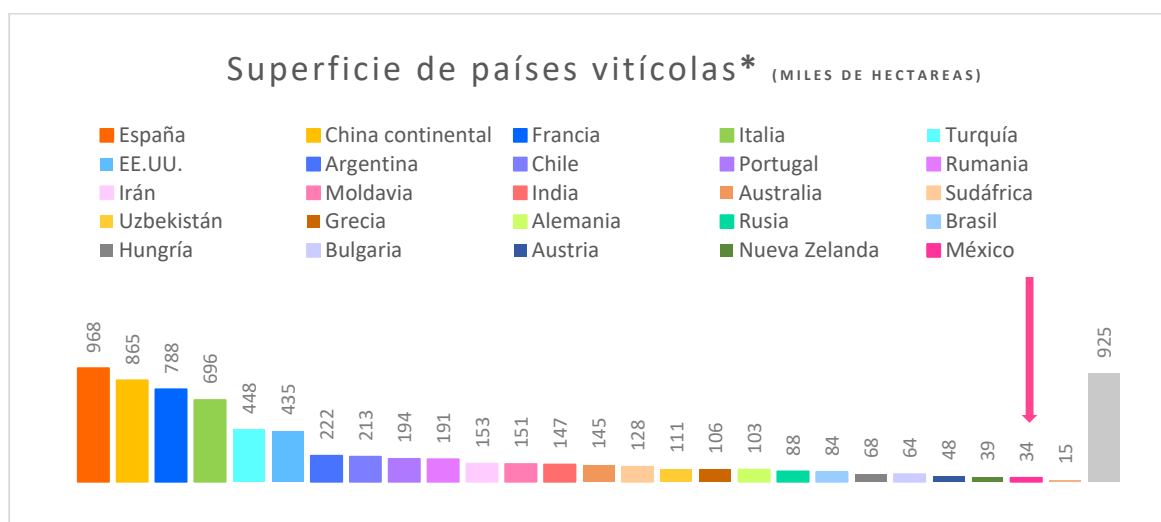


Figura 5. Superficie de los principales países vitícolas.

Fuente: Elaboración propia con datos de OIV (2019).

* Uvas de vinificación, uvas de mesa o uvas pasas, en fase de producción o todavía improductivos.

1.2.5 Producción nacional de uva industrial

De acuerdo el Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP), al año 2017 en México se cultivaron aproximadamente 80 variedades de uva, de las cuales el 50% son de uso industrial para la elaboración de bebidas y principalmente para vino. De las variedades de uvas tintas más utilizadas para la producción de vino resalta el Cabernet Sauvignon con 22%, Salvador 16%, Carignan 15% Merlot 8%, Tempranillo 5% Syrah 5%, y otras con el 29%, por otro lado, de las variedades de uvas tintas sobresalen el Chenin Blanc 19%, Chardonnay 18%, Early Divine 17% Saint Emilion 17% Sauvignon Blanc 12%, Moscatel 3% y otras con el 14% (SAGARPA/SIAP, 2018). La Figura 6 representa la evolución del volumen de la producción nacional de uva industrial desde el año 2008 al 2017.

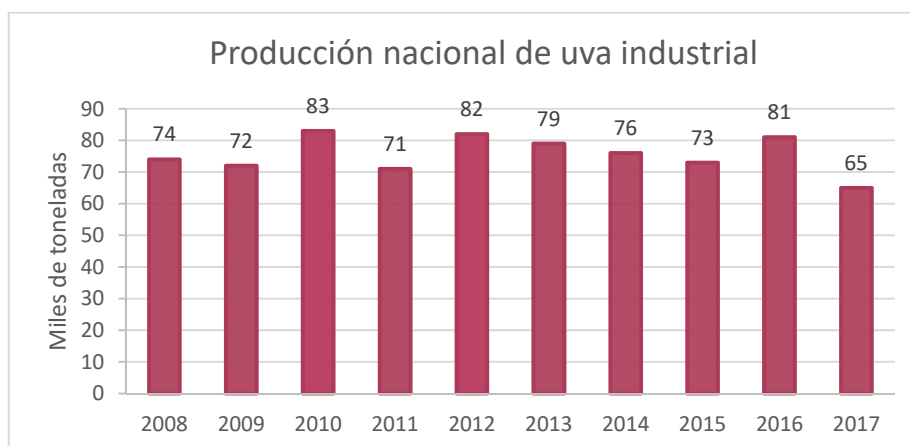


Figura 6. Volumen de producción nacional de uva industrial.

Fuente: Elaboración propia con datos de SAGARPA/SIAP (2018).

En México existen diversos estados productores de uva, sin embargo, en cuanto a uva industrial, que es la utilizada para elaboración de bebidas como vinos, jugos y concentrados, en el 2017 los 10 principales fueron los presentados en la Figura 7, el principal estado productor es Baja California con 27.73%, de la producción nacional, seguido de Zacatecas con 27.26% y en tercer lugar se encuentra Sonora con 19.37% (SAGARPA/SIAP, 2018).

1. Baja California
2. Zacatecas
3. Sonora
4. Aguascalientes
5. Coahuila
6. Querétaro
7. Chihuahua
8. Guanajuato
9. San Luis Potosí
10. Nuevo León

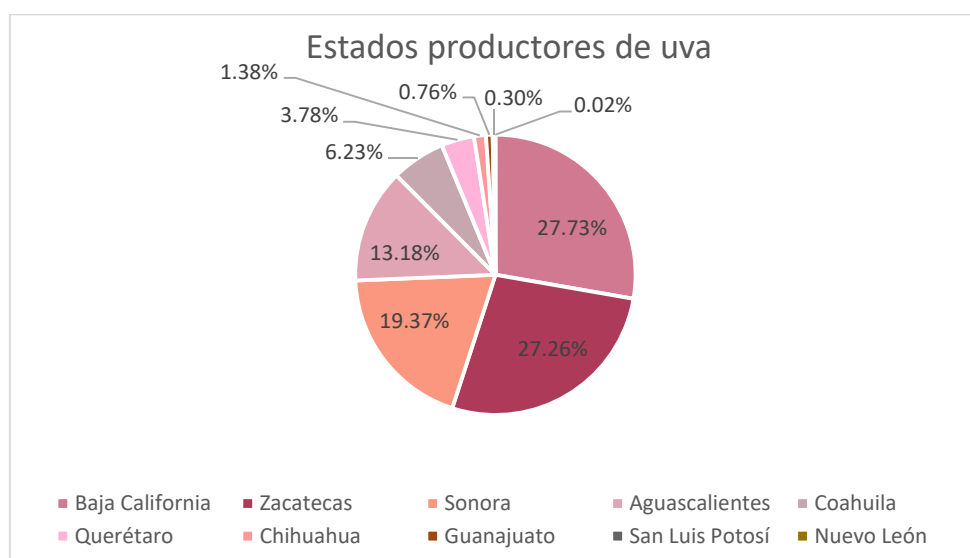


Figura 7. Principales estados productores de uva industrial.

Fuente: Elaboración propia con datos de SAGARPA/SIAP (2018).

De acuerdo el Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP), en el 2017 en México se cultivaron aproximadamente 80 variedades de uva, de las cuales el 50% son de uso industrial para la elaboración de bebidas y principalmente para vino. De las variedades de uvas tintas más utilizadas para la producción de vino resalta el Cabernet Sauvignon con 22%, Salvador 16%, Carignan 15% Merlot

8%, Tempranillo 5% Syrah 5%, y otras con el 29%, por otro lado, de las variedades de uvas tintas sobresalen el Chenin Blanc 19%, Chardonnay 18%, Early Divine 17% Saint Emilion 17% Sauvignon Blanc 12%, Moscatel 3% y otras con el 14% (SAGARPA/SIAP, 2018).

1.2.6 Importación y exportación de uva industrial

Conforme a los datos presentados en el Atlas Agroalimentario 2018 se entiende que las industrias tanto vitícola como de jugos del país están provistas principalmente por uvas generadas en viñedos nacionales, por otra parte, se expresa que la cantidad de uva industrial exportada en el periodo del 2012 al 2017 fue de 2.9 toneladas, siendo el principal cliente Estados Unidos y Alaska, mientras que las importaciones representan apenas 0.0002 toneladas dentro del mismo periodo de tiempo, siendo el Reino Unido el principal país importador de uva industrial al territorio mexicano, si se habla del mosto de uva; Alemania, Francia e Italia son los países de los que se importa este producto, con un valor monetario mayor a los 96 millones de dólares anuales (SAGARPA/SIAP, 2018).

1.3 Uva genéticamente modificada

Los organismos genéticamente modificados (OGM) han estado al alcance de los consumidores desde los años 1990, fue desde ese entonces que diversos organismos en todo el mundo comenzaron a ocuparse de la regulación y transmisión de información que atañe en esta materia, en los Estados Unidos de América la Administración de Alimentos y Medicamentos de los EE. UU o FDA por sus siglas en inglés, la Agencia de Protección Ambiental (EPA, en inglés), y el Departamento de Agricultura de los EE. UU. (USDA) comenzaron a trabajar en conjunto para garantizar la seguridad de estos productos (FDA, 2020).

La producción de estos cultivos genéticamente modificados está enfocada sobre todo en mejorar el rendimiento y la resistencia a enfermedades, así como la resistencia a las plagas en las plantas, estos cultivos pueden permitir la reducción de precios a través de la mejora del rendimiento del campo y la confiabilidad. En el futuro, la modificación genética de los alimentos podría tener un enfoque diferente teniendo como objetivo cambiar el contenido nutrimental, o tal vez reducir el potencial alergénico. En la actualidad, los alimentos OGMs provienen principalmente de plantas, sin embargo, es probable que en el futuro se induzcan en el mercado alimentos derivados de microorganismos o animales genéticamente modificados (OMS, 2014).

1.3.1 Definición de Organismos Genéticamente Modificados

La Organización Mundial de la Salud (OMS) define a los alimentos genéticamente modificados como “alimentos derivados de organismos cuyo material genético (ADN) ha sido modificado de una manera que no se produce de forma natural, por ejemplo, mediante la introducción de un gen de un organismo diferente”, la tecnología utilizada para la modificación de los genes es denominada biotecnología

moderna, tecnología genética o también tecnología del ADN recombinante o ingeniería genética (OMS, 2014).

Por otro lado, la FDA los define como “una planta, animal o microorganismo al que se le ha cambiado su material genético (ADN) utilizando tecnología que generalmente implica la modificación específica del ADN, incluida la transferencia de ADN específico de un organismo a otro” (FDA, 2020). Y la Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios, un organismo del gobierno mexicano los define como “organismos vivos desarrollados por científicos, en el que se ha alterado o modificado su material genético mediante el uso de técnicas de ingeniería genética, diferentes a las modificaciones tradicionales. Estos organismos genéticamente modificados han sido desarrollados para obtener características deseadas específicas” (COFEPRIS, 2017).

1.3.2 Técnicas de modificación genética

A grandes rasgos, la FDA en su documento “Feed Your Mind” relata 3 tipos de métodos de modificación genética para cultivos, en primer lugar, está la **modificación de cultivo tradicional**, en el que dos plantas similares se polinizan de manera cruzada para así crear una nueva (Figura 8), el segundo método es la **ingeniería genética** que permite copiar el gen de un organismo en otro diferente, para este método es conocido el uso de la bacteria *Bacillus Thuringiensis* (Figura 9), por último está la **edición de genoma** en donde gracias a herramientas de edición se puede eliminar un gen no deseado de los organismos (Figura 10) (FDA, 2020).

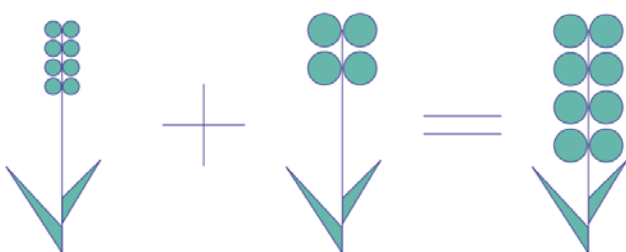


Figura 8. Modificación de cultivo tradicional



Figura 9. Ingeniería genética

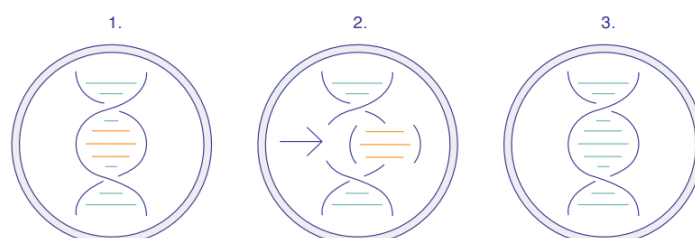


Figura 10. Edición del genoma

Fuente: FDA (2020).

Por su parte el autor Luke Anderson menciona 4 métodos para la creación de plantas transgénicas, la primera es la **transformación genética** que se realiza con una bacteria del suelo *Agrobacterium tumefaciens*, a la cual se le inserta un segmento de ADN que se desea replicar en la planta y que posteriormente gracias a su capacidad de infectar a las plantas de manera natural integra el genoma en ellas; la siguiente técnica es la **microinyección** la cual consiste en introducir el gen de interés en una célula huésped inyectado con una aguja microscópica de vidrio la construcción genética dentro del núcleo de la célula receptora, el tercer método es la **electroporación** que consta en la aplicación de pulsos de electricidad los cuales provocan permeabilidad temporal en la membrana de las células huéspedes, así como en el núcleo, permitiendo como consecuencia la entrada de una suspensión que contiene copias de una construcción que se desea integrar; finalmente menciona la **biobalística** que es un método que implica la preparación de microproyectiles que contienen ADN los cuales penetran a células suspendidas en un medio de cultivo, de esta manera el ADN entra en la solución y se promueve la inserción del material genético a los cromosomas de la célula de forma aleatoria (Anderson, 2011).

1.3.3 Producción de OGM

El Servicio Internacional de Adquisición de Aplicaciones Agro-biotecnológicas, ISAAA por sus siglas en inglés (International Service for de Acquisition of Agri-biotech Applications) es una organización internacional sin fines de lucro que prepara anualmente un informe llamado “Global Status of Commercialized Biotech/GM crops” en el último informe publicado en el 2019 se expone lo siguiente:

De manera general, los cultivos más adoptados son la soya con 91.9 millones de hectáreas (48% de la superficie del cultivo genéticamente modificado mundial), el maíz con 90.9 millones de hectáreas, el algodón con 25.7 millones de hectáreas y la canola con 10.1 millones de hectáreas. Además de estos 4 cultivos principales existen también cultivos de alfalfa con 1.3 millones de hectáreas, remolacha con 473.000 hectáreas, caña de azúcar con 20,000 hectáreas, papaya 12,000 hectáreas, cártamo 3,500 hectáreas, papas con 2,265 hectáreas, berenjena 1,931 hectáreas, y menos de 1,000 hectáreas para calabazas, manzanas y piñas. En la Figura 11 se tiene una representación gráfica de la superficie de estos cultivos a nivel mundial (ISAAA, 2019).

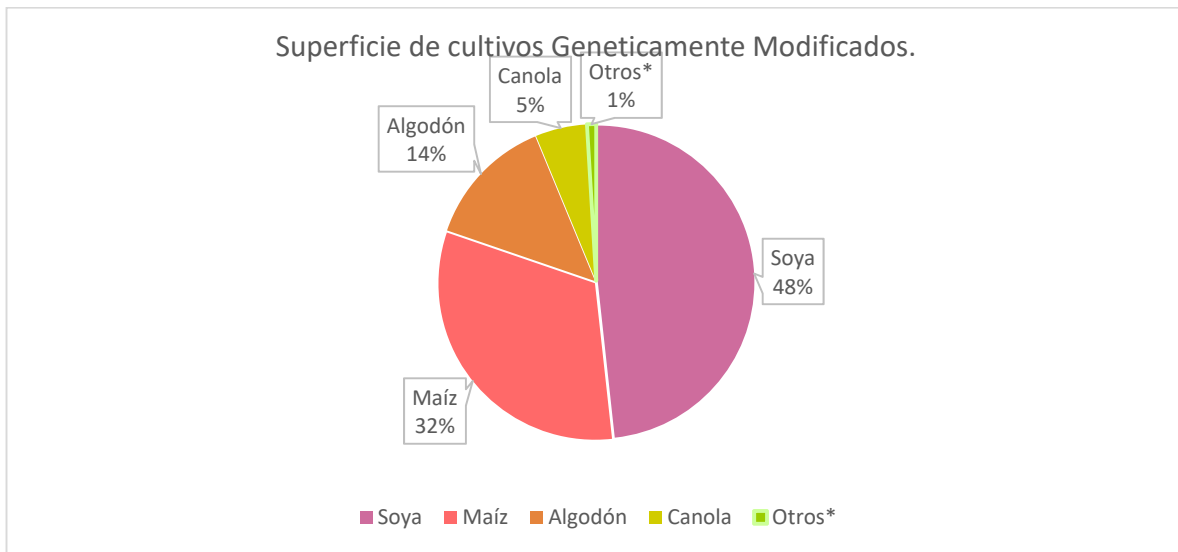


Figura 11. Superficie de cultivos Genéticamente Modificados a nivel mundial.

Fuente: ISAAA (2019).

Existen en la actualidad 29 países que poseen cultivos de organismos genéticamente modificados, la superficie total cultivada es de 190.4 millones de hectáreas, comparado con el año anterior, se registra una disminución del 0.7%, si se hace una comparación de la superficie mundial cultivada en el 2019 con la superficie cultivada en los inicios de 1996, se puede decir que se ha multiplicado 112 veces, pasando de 1.7 millones a 190.4 en 24 años. De estos 29 países, 24 de ellos son considerados como países en desarrollo y los otros 5 se consideran como países industriales. Además del cultivo de estos organismos otros 42 países (16 más 26 países de la UE) han importado este tipo de cultivos para la producción de alimentos, así como para piensos, es decir, 71 países en total han decidido adoptar los cultivos biotecnológicos para satisfacer sus necesidades (ISAAA, 2019).

El 91% de la superficie mundial de los cultivos genéticamente modificados se encuentra en 5 países principales: Estados Unidos (71.5 millones de hectáreas), Brasil (52.8 millones de hectáreas), Argentina (24 millones de hectáreas), Canadá (12.5 millones de hectáreas) e India (11.9 millones de hectáreas). En la Figura 12 se presenta un esquema más detallado de la distribución de la superficie cultivada de los organismos genéticamente modificados a nivel mundial al año 2019. En 19 de los 29 países se cultivan más de 50,000 hectáreas y están señalados en naranja con un asterisco (ISAAA, 2019).

En América latina existen 10 países que han decidido adaptar el cultivo de OGM, entre ellos se encuentra Brasil con 52.8 millones de hectáreas, Argentina con 24 millones de hectáreas, Paraguay con 4.1 millones de hectáreas, Bolivia con 1.4 millones de hectáreas, Uruguay con 1.2 millones de hectáreas, México con 223,000 hectáreas, Colombia con 101,188 hectáreas, Chile con 41,093 hectáreas, Honduras con 37.386 hectáreas y Costa Rica con 297 hectáreas, en total 83.9 millones de hectáreas (ISAAA, 2019).

Actualmente, el Departamento de Agricultura de Estados Unidos, USDA por sus siglas en inglés (U.S. Department of Agriculture) reporta una lista de los alimentos modificados por bioingeniería, que están en producción legal en diferentes lugares del mundo, en esta lista se encuentran: la alfalfa, la manzana, la canola, el maíz, la berenjena, la papaya, la piña, la papa, el salmón, la soya, las calabazas, y la remolacha (USDA, 2020).



Figura 12. Países que cultivan Organismos Genéticamente Modificados al año 2019. Superficie y tipos de cultivo.

Fuente: ISAAA (2019).

México fue uno de los primeros países en donde se comenzaron las solicitudes para realizar ensayos experimentales con OGMs, de acuerdo con datos proporcionados por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) la introducción legal de estos alimentos comenzó en 1988, desde ese año y hasta el 2005 se tiene registrado la autorización de 344 ensayos de OGMs entre los cuales destacan: la alfalfa, el arroz, la calabaza, la canola, el chile, el jitomate, el limón, el maíz, el melón, la papa, la papaya, la piña, el plátano, la soya, el tomate y el trigo. Por otro lado, se han otorgado 620 permisos de liberación del 2005 al 2017 para diversos organismos, los alimentos que destacan son la alfalfa, el frijol, el limón mexicano, el maíz, la naranja dulce de Valencia, la Soya y el Trigo (CONACYT, 2018).

Algunos beneficios socioeconómicos reportados de este tipo de cultivos biotecnológicos han sido documentados desde el año 1996 al 2018, entre estos se encuentra el aumento de la productividad lo que contribuye a la seguridad mundial de los alimentos, los piensos y las fibras, el apoyo a la autosuficiencia en la tierra cultivable de las naciones, la conservación de la biodiversidad, el evitar la deforestación y la protección de santuarios de biodiversidad, y la mitigación de desafíos relacionados al cambio climático (ISAAA, 2019).

1.3.4 Legislación de OGM en el mundo

Todos los organismos genéticamente modificados deben ser evaluados antes de que su distribución esté permitida en el mercado, en la actualidad existen 3 directrices del Codex FAO/OMS para analizar el riesgo de estos productos (Paoletti et al., 2008).

- CXG 45-2003: Directrices para la realización de la evaluación de la inocuidad de los alimentos obtenidos de plantas de ADN recombinante. Cuya última modificación fue realizada en 2008.
- CXG 46-2003: Directrices para la realización de la evaluación de la inocuidad de los alimentos producidos utilizando microorganismos de ADN recombinante.
- CXG 68-2008: Directrices para la realización de la evaluación de la inocuidad de los alimentos obtenidos de animales de ADN recombinante.

En la Unión Europea (UE) se acordó un marco jurídico para la autorización de los OGM, el Consejo Directivo creó el documento 2001/18/EC donde están establecidos los principios que regulan la liberación de OGM al ambiente y en el Reglamento (EC) 1829/2003 del Parlamento Europeo y el consejo donde expresa las normas para la evaluación de seguridad de los OGM (Paoletti et al., 2008). A continuación, se enlistan los documentos llamados pilares de la legislación sobre OGM de la UE.

- Directiva 2001/18/CE sobre la liberación intencional de OMG en el medio ambiente.
- Reglamento (CE) 1829/2003 sobre alimentos y piensos modificados genéticamente.
- Directiva (UE) 2015/412 por la que se modifica la Directiva 2001/18/CE en lo que respecta a la posibilidad de que los Estados miembros restrinjan o prohíban el cultivo de OMG en su territorio.

- Reglamento (CE) 1830/2003 relativo a la trazabilidad y al etiquetado de organismos modificados genéticamente y a la trazabilidad de los alimentos y piensos producidos a partir de éstos.
- Directiva 2009/41/CE relativa a la utilización confinada de microorganismos modificados genéticamente. Reglamento (CE) 1946/2003 sobre el movimiento transfronterizo de OGM.

En Estados Unidos de América (EUA), en el año 2018 se anunció el Estándar Nacional de Divulgación de Alimentos de Bioingeniería (National Bioengineered Food Disclosure Standard), esto gracias a que previamente en el año 2016 el congreso aprobó la Ley Nacional de Divulgación de Alimentos por Bioingeniería (The National Bioengineered Food Disclosure Law), en la cual se hace obligatorio la declaración de los alimentos que pueden haber sido modificados por bioingeniería (USDA, 2021).

1.3.5 Legislación de OGM en México

En mayo del 2019 el Centro de Estudios para el Desarrollo Rural Sustentable y la Soberanía Alimentaria (CEDRSSA) publicó el documento “Regulaciones para la importación y etiquetado de Organismos Genéticamente Modificados” en el cual se describen de manera general los 6 instrumentos regulatorios para OGM dentro del país que serán mencionados a continuación

- **Protocolo de Cartagena sobre Seguridad de la Biotecnología:** Acuerdo internacional que busca asegurar la correcta manipulación y uso en movimientos tanto de importación como de exportación, así como la previsión de reacciones adversas para la conservación y la sostenibilidad de la diversidad biológica tomando en cuenta los riesgos a la salud humana.
- **Ley de Bioseguridad de Organismos Genéticamente Modificados:** Busca garantizar la protección de la salud humana y del medio ambiente, de la diversidad biológica y de la sanidad vegetal y animal con respecto a los efectos adversos que pudieran ser provocados por la preparación de OGM.
- **Reglamento de la Ley de Bioseguridad de Organismos Genéticamente Modificados:** Establece procedimientos y requisitos para la solicitud tanto de permisos como de autorizaciones de la LBOGM.
- **Régimen de Protección Especial del Maíz:** Abarca disposiciones relativas a bioseguridad que incluye prevención, monitoreo, inspección, vigilancia y medidas de control para resolver las solicitudes de liberación de maíces GM.
- **Acuerdo por el que se Determinan los Centros de Origen y Centros de Diversidad Genética del Maíz:** Posee información relativa a las áreas ubicadas en Baja California Norte y Sur, Chihuahua, Coahuila, Nuevo León, Sinaloa, Sonora y Tamaulipas, las cuales con considerados como centros de origen y centros de diversidad genética del maíz.
- Norma Oficial Mexicana **NOM-164-SEMARNAT/SAGARPA-2013:** Se define el contenido de los reportes de resultados, para las liberaciones de OGM, considerando los posibles riesgos (al

ambiente, a la diversidad genética, a la sanidad animal, vegetal y acuícola), para poder continuar hacia las fases de liberación.

Adicional a los documentos previamente mencionados es importante resaltar que México es un país que carece de reglamentación para el etiquetado de OGM, sin embargo, ya existe un proyecto de Norma Oficial Mexicana llamado “Especificaciones generales de etiquetado de organismos genéticamente modificados que sean semillas o material vegetativo destinados a siembra, cultivo y producción agrícola”. En el que se comienzan a plantear las especificaciones para el etiquetado de OGM en semillas o material vegetativo destinado a consumo humano (CEDRSSA, 2019).

1.3.6 Modificaciones genéticas en la uva para vino

Existe poca evidencia que demuestre la modificación de la uva utilizada para la elaboración de vino, sin embargo se encontró que el Instituto Francés de Investigación Agronómica INRA por sus siglas en francés (Institut National de la Recherche Agronomique), desde el año 2000 comenzó un proyecto de investigación destinado a la creación de variedades de uvas con resistencia natural a enfermedades fúngicas (específicamente mildiú y oídio) en enero del 2018 se logró el registro de cuatro variedades, las cuales fueron denominadas Artaban, Floreal, Vidoc y Voltis (Figura 13) se asegura que la calidad de los vinos creadas con estas uvas es equivalente al de vinos elaborados con variedades tradicionales. Estas son el resultado de la cruce de progenitores del INRA seleccionados por el científico Alain Bouquet y dos adquisiciones del Instituto Alemán Julius Kuhn (INRA, 2018).

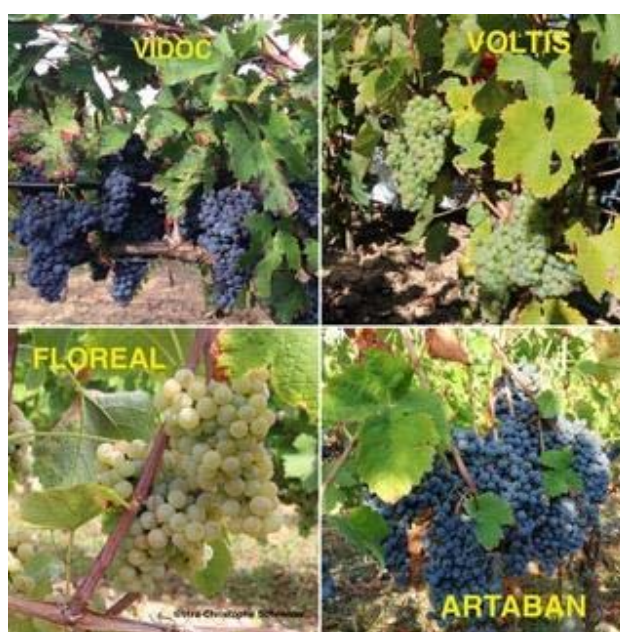


Figura 13. Uvas creadas por el Instituto Nacional para la Investigación Agronómica (INRA).

Fuente: INRA (2018)

Por otro lado, en el 2017 se dio a conocer la investigación de la Dra Rong Di, profesora asociada en el Departamento de Biología Vegetal de la Universidad de Rutgers ubicada en Nueva Jersey, la cual consiste en la creación de una variedad de uva resistente a la plaga del mildiu, esto mediante el empleo de la técnica de modificación genética CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats). Este trabajo fue financiado por el Instituto Nacional de Alimentos y Agricultura de Estados Unidos. La variedad de uva creada fue llamada Dijon Chardonnay 76 y en la actualidad puede encontrarse a la venta en diferentes sitios de internet (Borel, 2017).

1.3.7 Métodos de identificación de OGM

Existen métodos tanto cuantitativos como cualitativos para la detección de los OGMs, éstos se basan en la identificación de la modificación introducida en el ADN, la detección de las nuevas proteínas secretadas por el organismo modificado y en tercer lugar realizando un análisis de las variaciones fenotípicas (Núñez, 2011).

Dentro de los **métodos de detección de OGM basados en el análisis del ADN** se encuentra la Reacción en Cadena de la Polimerasa, que permite reconocer las modificaciones realizadas en el ADN nativo, ésta a su vez tiene 2 versiones, la primera es la PCR punto final, la cual utiliza una electroforesis para la detección y la segunda es la PCR en tiempo real (qPCR) (Leguizamón et al., 2018), que está basada en la elaboración de una curva de calibración preparada con un patrón de referencia (Alba Aguayo y Rueda, 2013).

Entre los **métodos de detección basados en proteínas** los ensayos disponibles son el ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas o ELISA por sus siglas en inglés (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay), y Western Blot, estos implican diferentes tecnologías de inmunoensayos con anticuerpos mono o policlonales que varían dependiendo de la especificidad del sistema de detección, ambos son ampliamente utilizados gracias a su bajo costo, sin embargo, la exactitud puede verse fácilmente afectada por diversos factores (Leguizamón et al., 2018).

El método **ELISA** utiliza enzimas unidas covalentemente a anticuerpos o antígenos para identificar y medir la presencia de una sustancia determinada, si el antígeno o el anticuerpo de interés están presentes, la enzima se unirá a estos y al final se genera un cambio de color debido a la reacción enzimática producida (Ríos et al., 2012).

Por su parte el método **Western Blot** o también llamado inmunotransferencia de proteínas está basado en la separación de proteínas conforme a su carga y peso molecular, esto se realiza en geles de poliacrilamida y una transferencia posterior hacia una membrana sólida en donde un anticuerpo específico detecta la proteína de interés (Martínez-Flores et al., 2017).

Como consecuencia del avance tecnológico que se da en el campo de la biotecnología es posible encontrar organismos con múltiples modificaciones, y para poder realizar la detección se han desarrollado nuevos métodos de análisis, entre los cuales se hallan (Leguizamón et al., 2018):

- **Amplificación isotérmica mediada por bucle LAMP** por sus siglas en inglés: utiliza 4 primers específicos diseñados para reconocer 6 zonas diferentes en el ADN.
- **PCR digital (dPCR)**: se diluye y fragmenta el ADN en pequeñas particiones, para posteriormente realizar la reacción en cada segmento, al final se cuentan las particiones positivas y se establece la proporción obtenida.
- **Secuenciación de nueva generación NGS** por sus siglas en inglés: consiste en una caracterización molecular en la que se necesita conocer previamente la localización de los fragmentos insertados.

1.3.7.1 Reacción en cadena de la polimerasa PCR

La reacción en cadena de la polimerasa o PCR por sus siglas en inglés (*Polymerase Chain Reaction*), es una técnica innovadora desarrollada en 1983 por el Doctor Kary Mullis, ampliamente conocida para el estudio de los ácidos nucleicos ya que permite amplificar secciones específicas de ADN a partir de una pequeña cantidad de material genético. De manera general, se puede decir que, a partir de un fragmento de ADN conocido, la enzima polimerasa va agregando deoxirribonucleótidos trifostato (dNTPs) complementarios a la cadena sencilla, esta unión está delimitada por primers o cebadores previamente diseñados para cada caso específico, requiere de varios elementos (ADN molde, primers, dNTPs, Taq polimerasa) y ocurre en 3 etapas (Pérez de Castro, 2008).

1.3.7.2 Fundamento de la PCR

La PCR es una reacción enzimática en donde se realiza una amplificación de ADN (ya sea un gen o un fragmento) in vitro mediante la enzima ADN polimerasa a lo largo de varios ciclos. Su objetivo principal es obtener varias copias de un fragmento de ADN, esto para poder visualizarlo y analizarlo o utilizarlo en otras aplicaciones (Tamay de Dios, et al., 2013).

1.3.7.3 Elementos de la PCR

El elemento principal para llevar a cabo la PCR es el fragmento de **ADN** o **ADN molde**, es necesario conocer la secuencia del fragmento que se quiere replicar, además se requiere que tenga una buena concentración para lograr una amplificación exitosa, puede tener desde 50 hasta 2,000 nucleótidos de longitud (Tamay de Dios et al., 2013).

Para lograr la amplificación se diseñan dos secuencias diferentes de **primers** a partir de la secuencia conocida de ADN, uno es llamado *forward* o frontal y otro es *reverse* o reverso, éstos son diseñados

para hibridar, son complementarios a la secuencia de ADN conocida y tienen una longitud de entre 15 y 25 pares de bases (Tamay de Dios et al., 2013).

La enzima **Taq polimerasa** es la enzima responsable de unir los dNTPs a la cadena sencilla de ADN conocida al extremo 3', proviene de una bacteria termófila que vive en condiciones extremas de temperatura llamada *Thermus aquaticus*, y es capaz de funcionar a temperaturas elevadas, por tal motivo es considerada una enzima termoestable (Tamay de Dios et al., 2013).

El sustrato de la enzima tag polimerasa son deoxirribonucleótidos trifostato o **dNTPs**, que al inicio de la reacción no forman ninguna secuencia, pero serán los componentes con los cuales se construirán las nuevas cadenas de ADN, así como el ADN éstos deben tener una buena concentración (Tamay de Dios et al., 2013).

Además de los componentes previamente mencionados se utiliza una solución amortiguadora que en este caso es el buffer con pH de 8 que usualmente está constituida por Tris-HCl en una concentración entre 0.2 y 1.0 mM, y magnesio (puede estar en forma de MgCl₂ o MgSO₄) este magnesio es un cofactor de la enzima y permite que la taq polimerasa cumpla con su función (Tamay de Dios, et al., 2013).

1.3.7.4 Etapas de la PCR

La PCR es un proceso que se lleva a cabo en 3 etapas fundamentales: desnaturalización, hibridación y elongación. En la **desnaturalización** se sube la temperatura a 95°C para calentar las cadenas de ADN y así separarlas, esto ocurre durante 20 o 30 segundos dependiendo de la secuencia del ADN, si la secuencia tiene una gran cantidad de Guanina-Citosina, será necesario más tiempo para romper los 3 enlaces que unen estos nucleótidos, al terminar esta fase se obtienen cadenas sencillas de ADN que han sido separadas y funcionarán como base para la siguiente etapa que es la hibridación. En la **hibridación** los primer se alinean al extremo 3' de la cadena sencilla de ADN que se separó en la fase de desnaturalización e hibridan con la secuencia complementaria, para que se pueda concretar la hibridación es necesario conocer la temperatura óptima de hibridación o (T_m) usualmente esta temperatura va de 50 a 60°C y depende de los primers que se diseñan; por último está la fase de **elongación** donde la enzima Taq polimerasa ejerce su función catalítica añadiendo dNTPs complementarios a la cadena sencilla para así generar las cadenas completas de ADN, la elongación de las cadenas se da en dirección de la síntesis de ADN (5' a 3') y se efectúa a una temperatura de 72°C esto debido a que es la temperatura a la que la enzima es funcional. Una vez terminado el ciclo se obtienen miles de las cadenas de ADN deseadas (Tamay de Dios et al., 2013).

1.3.7.5 Diseño de primers

Para poder realizar la PCR de manera adecuada, se requiere efectuar el diseño de oligonucleótidos llamados *primers* o cebadores, éstos son capaces de hibridar una zona específica de la secuencia de ADN a partir del extremo 3' para permitir posteriormente la extensión de la cadena mediante la reacción de la enzima polimerasa, de igual manera, estos primers son capaces de delimitar la región de interés que se desea replicar (Roca et al., 2013).

Los primers se sitúan en cada extremo de la cadena 3 que se desea amplificar', poseen una longitud de entre 15 y 30 pares de bases y presentan una complementariedad de bases con la región de ADN que se busca amplificar, para realizar el diseño de éstos es necesario conocer la secuencia de ADN, como requisito se busca que no exista una complementariedad de bases entre ellos ni con otra sección de ADN, además que su temperatura de fusión también llamada **T_m** sea similar entre ellos y no varíe en más de 5°C, ya que esta temperatura será un factor determinante en la etapa de hibridación de la PCR, asimismo es necesario que los primer tengan una relación de 50% de G-C (Roca et al., 2013).

1.3.7.6 Ventajas y desventajas de la PCR

La PCR tiene la ventaja de que requiere cantidades reducidas de material biológico para poder llevarse a cabo además este material biológico puede ser obtenido a partir de alimentos que han sido procesados, otra ventaja es que es una técnica con alta especificidad y sensibilidad, asimismo, el producto de esta reacción puede ser fácilmente utilizado para análisis posteriores (Negroni, 2009).

Como desventaja se puede mencionar que hay diferentes factores que intervienen en la eficacia y la especificidad de la PCR, entre ellos puede ser la concentración del ADN, la pureza del ADN, la concentración de la enzima polimerasa y del magnesio, las temperaturas de desnaturalización y de hibridación, el número de ciclos establecidos, por otro lado otra desventaja que se tiene de esta técnica es que se requiere necesariamente conocer la secuencia del fragmento de ADN que se va a replicar (Negroni, 2009).

1.3.7.7 Electroforesis

Después de efectuar la PCR es necesario conocer si la reacción sucedió de manera exitosa, por lo que se lleva a cabo una electroforesis en gel de agarosa; esta electroforesis en gel es una técnica bastante utilizada para separar segmentos de ácidos nucleicos, esto sucede debido al campo eléctrico que se emplea y a la carga negativa del ADN que está dada por los grupos fosfatos.

1.3.7.8 Fundamento de la electroforesis

La electroforesis consiste en un gel que puede ser de poliacrilamida (para segmentos pequeños de 1 a 20 pares de bases) o de agarosa (para segmentos de 20 a 50,000 pares de bases) que sirve como filtro molecular para separar los ácidos nucleicos en función de su tamaño y carga eléctrica, en el caso

de los ácidos nucleicos, al tener una carga negativa proporcionada por el grupo fosfato al aplicar una fuerza (campo eléctrico) durante la electroforesis migran desde el polo negativo hacia el positivo . Para que esta separación suceda se diluye el gel en una solución buffer que puede ser TAE y se le añade bromuro de etidio, el cual es capaz de unirse a la molécula de ADN y al ser excitado con luz UV emite luminiscencia, lo que permite visualizar la amplificación del ADN (Tamay de Dios et al., 2013).

1.4 Hongos presentes en las uvas

1.4.1 *Aspergillus ochraceus*

Se encuentra distribuido en alimentos secos incluido el pescado seco, legumbres, frijoles secos, nueces, oleaginosas, uvas secas y se reporta con menos frecuencia en cereales como el arroz, trigo, maíz, y cebada, la presencia de este hongo en granos verdes de café puede dar lugar a la producción de ocratoxina A. Su presencia se asocia con climas cálidos y tropicales (Hocking, 2006).

1.4.1.1 Características

Este hongo produce colonias de color marrón amarillento (ocre), las vesículas son esféricas con métulas y filiares densamente compactados con pequeños conidios lisos de color marrón pálido, crece a temperaturas entre 8 y 37° (raramente crece a 37°C), su aw mínima para el crecimiento es de 0.77 a 25°C. En 1965 se descubrió que produce la micotoxina llamada ocratoxina A. Crece bien en pH de entre 3 y 10 y crece lentamente en pH de 2.2 (Hocking, 2006).

1.4.2 *Aspergillus niger*

El *Aspergillus niger* forma colonias de color negro o marrón oscuro fácilmente reconocibles, es frecuente encontrarlo en climas cálidos, así como en situaciones de campo y en alimentos almacenados. Es la especie más común responsable de la podredumbre en la postcosecha de la fruta fresca (manzanas, peras, fresas, higos, mango, melón), especialmente en la uva produce podredumbre en el racimo. Se aísla fácilmente de productos secados al sol, como la uva y especialmente se reporta que ha sido aislado frecuentemente de nueces, cacahuates, pistaches, avellanas, nueces, cereales, semillas oleaginosas, también es posible encontrarlo en productos cárnicos secos, ahumados y en el pescado (Hocking, 2006).

1.4.2.1 Características

Posee esporas negras que proporcionan protección contra la luz del sol, y la irradiación de los rayos ultravioleta, lo que proporciona una gran ventaja en ambientes cálidos y soleados, crece a temperaturas de mínimo 6-8°C y máximo 45-47°C, aunque su temperatura óptima se encuentra entre 35-37°C, se reporta su germinación con una aw de 0.77 a 35°C y es capaz de crecer a un pH de 2.0 con un aw elevado (Hocking, 2006). En la Figura 14 se muestra un racimo de uvas afectado por *Aspergillus niger*.



Figura 14. Racimo de uvas afectado por *Aspergillus niger*.

Fuente: Domingo et al. (2005).

1.4.3 *Aspergillus carbonarius*

Este hongo ha cobrado importancia en los últimos 10 años debido a su capacidad de producir ocratoxina A en las uvas, se distingue del *Aspergillus niger* por sus conidios más grandes y negras, fue reportado como causa de la pudrición del racimo de las uvas en 1956, y se reporta que también ha sido encontrado en granos de café donde también es una fuente de ocratoxina A. Es la fuente principal de micotoxinas en uvas y productos derivados de las uvas como el vino, jugo de uva, vinagre y uvas secas (Hocking, 2006).

1.4.3.1 Características

Crece a una temperatura entre 10 y 42° C su aw óptimo para el crecimiento está en un rango entre 0.93-098 dependiendo de la cepa, sin embargo, la temperatura óptima para la producción de ocratoxina A es más baja que para el crecimiento, alrededor de 15-20°C (Hocking, 2006). En la Figura 15 se tiene un racimo de uvas que ha sido afectado por el hongo *Aspergillus carbonarius*.



Figura 15. Uvas afectadas por *Aspergillus carbonarius*.

Fuente: Vázquez et al. (2014).

1.5 Micotoxinas

Las micotoxinas son toxinas producidas por hongos que se encuentran de manera natural en una gran cantidad en productos agrícolas que son utilizados para la elaboración de alimentos, por lo que representan un riesgo para la salud humana y animal (Ruiz Quiroz, 2016), se estima que el 25% de las cosechas mundiales de granos están afectadas por hongos toxicogénicos, esto quiere decir que, las pérdidas mundiales de alimentos producidas por micotoxinas equivalen a 1000 millones de toneladas al año (FAO, 2021).

La aparición de estas toxinas en los alimentos depende de diversos factores como la temperatura, humedad relativa, pH, acidez y género del hongo (Ruiz Quiroz, 2016) A lo largo de la historia se han logrado identificar varios tipos de micotoxinas entre los más peligrosos se encuentran las aflatoxinas, la ocratoxina A, la patulina, las fumonisinas, la zearalenona, el nivalenol y el desoxinivalenol (OMS, 2018).

1.5.1 Definición

Las micotoxinas son compuestos tóxicos producidos naturalmente por diferentes tipos de hongos, se definen como “compuestos naturales de bajo peso molecular producidos por hongos microscópicos que generan una respuesta tóxica cuando son introducidos en concentraciones bajas en animales por una ruta natural” (Bennet, 1987). Hoy en día también se sabe que son metabolitos secundarios tóxicos producidos por hongos al final de su etapa de crecimiento (Ruiz Quiroz, 2016).

1.5.2 Toxicidad

Las micotoxinas tienen graves efectos crónicos en seres humanos y animales (especialmente monogástricos) esto depende de la especie, metabolismo y de la susceptibilidad de cada uno. La micotoxicosis tanto en humanos como en animales se caracteriza por estar relacionada al consumo de alimentos, no es contagiosa, transferible, ni infecciosa (Hussein y Brasel, 2001).

El peligro a la salud de las micotoxinas en los humanos ha sido ampliamente estudiado en los últimos años, en 1993, el Centro Internacional de Investigación contra el Cáncer (IRAC) evaluó el potencial cancerígeno de los tricotecenos zearalenona, fumonisina, ocratoxina, y aflatoxina. La aflatoxina fue clasificada como carcinógena para los humanos (grupo 1), mientras que la ocratoxina y fumonisina fueron clasificados como posibles carcinógenos (grupo 2B) y los tricotecenos y zearalenona fueron clasificados como no carcinógenos (grupo 3) (Hussein y Brasel, 2001).

1.5.3 Ocratoxina A

1.5.3.1 Definición

La ocratoxina A (OTA) es una micotoxina sintetizada por hongos filamentosos considerada como un metabolito secundario de algunas especies principalmente de *Aspergillus* y *Penicillium*, su estructura química está conformada por un anillo de 3,4 dihidro metil isocumarina unido por un grupo carboxilo, y

un enlace de tipo amida a una molécula de fenilalanina (Figura 16); es una molécula estable, poco soluble en agua y soluble en disolventes orgánicos, incolora, tiene la capacidad de expedir fluorescencia al ser excitada con luz ultravioleta (Ravelo et al., 2011).

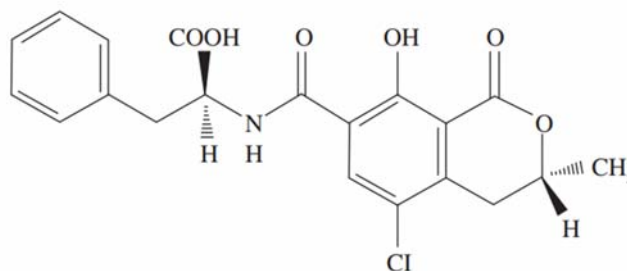


Figura 16. Estructura química de la ocratoxina A

Fuente: Ravelo et al., (2011).

La aparición de la OTA en los alimentos puede ser influenciada por diversos factores como las condiciones ambientales tales como son la humedad y la temperatura durante el almacenamiento y el transporte, se tiene reporte que la actividad de agua es un elemento que propicia la producción de la OTA en los alimentos (Ravelo et al., 2011).

Esta toxina se absorbe en el tracto intestinal pasando a la circulación sistémica, se une fuertemente a las proteínas plasmáticas en la sangre por lo que es posible detectarla en ella (Ravelo et al., 2011), se encuentra en mayor concentración en los órganos con mayor actividad metabólica como el riñón y en concentraciones menores se distribuye en el hígado, los músculos y la grasa. El riñón es el principal órgano objetivo de los efectos adversos de la OTA (IARC, 2012).

Se ha demostrado que la OTA es nefrotóxica, hepatotóxica, embriológica, teratogénica, neurotóxica, inmunotóxica, genotóxica y ha sido clasificada por el Centro Internacional de Investigación contra el Cáncer (IARC) como posible cancerígena (IARC, 2012).

Las pruebas de la carcinogenicidad de la OTA provienen principalmente de estudios en animales de experimentación, sin embargo, se llegó a la conclusión de que hay suficiente evidencia para clasificarla como Grupo 2B, lo que quiere decir posible cancerígeno para los seres humanos (IARC, 2012).

1.5.3.2 Ocratoxina A en vinos

La OTA es una micotoxina dominante en el vino, su contenido está influenciado por el proceso de elaboración, siendo la fuente principal de ésta las uvas, cuando las bayas están dañadas son susceptibles a una infección por hongos filamentosos los cuales producen OTA como metabolito secundario, esto sucede durante la fase de maduración de las bayas. Los hongos ocratoxigénicos

pertenece a la especie *Aspergillus*, en particular a las especies *A. carbonarius* y *A. niger* (Torovic et al. 2020). La presencia y propagación de estos hongos en los vinos depende de factores climáticos, condición de humectación nocturna de las uvas, la susceptibilidad de las variedades de vid, la aireación de los racimos, siendo las lesiones de las bayas la entrada principal de los hongos (FAO, 2007).

Se ha identificado que los hongos productores de ocratoxina A en las uvas son esencialmente *Aspergillus carbonarius*, que tiene un poder de síntesis elevado y en segundo lugar *Aspergillus niger* con menor poder de síntesis, en uvas pasas, los hongos responsables de la aparición de la OTA son *Aspergillus ochraceus* y *Aspergillus foetidus* (Rousseau, 2004).

Por otro lado, se ha comprobado que la OTA puede presentarse en todo tipo de vinos, ya sean tintos, blancos, o rosados, no obstante, se tiene registro de que es más frecuente encontrar la OTA en vinos tintos que en vinos blancos y rosados (Rousseau, 2004), sucede lo mismo con la concentración, ya que existe una mayor concentración de la OTA en vinos tintos que en vinos blancos y rosados, esto debido al proceso de elaboración de cada tipo de vino (Ravelo et al. 2011).

1.5.3.3 Normas generales sobre ocratoxinas

Pocos países en el mundo han establecido límites máximos para la presencia de la OTA en alimentos; Brasil estableció normas en donde se fijó como límite 10ng/g en arroz, cebada, legumbres y maíz; el límite en Uruguay para los mismos cultivos adicionalmente para el café es de 50 ng/g; en Israel el límite es de 50ng/g para todos los cereales y legumbres, mientras que Suiza tiene un límite más estricto de 2ng/g para todos los cereales (Mitchell et al., 2017).

A la fecha del 2017 en Estados Unidos de América la Food and Drug Administration (FDA) no tiene establecida una legislación que indique límites para la OTA, mientras que en Canadá se han planteado la opción de establecer estos límites, sin embargo, las normas no han entrado en vigor (Mitchell et al., 2017).

La Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA), en el 2006 estableció gracias a evidencias científicas una ingesta semanal tolerable (tolerable weekly intake, TWI) de la OTA de 120 ng/kg de peso corporal (CE, 2006).

La legislación más clara que se tiene hasta el momento es de la Comisión Europea (CE) que fijó los niveles máximos de OTA en una serie de productos susceptibles de contaminación por OTA incluido el límite para el vino, fijado en 2 µg/kg, ver Tabla 6 (CE, 2006).

Tabla 6. Límites máximos para la ocratoxina A establecidos por la Comisión Europea.

Tipo de alimento	Límite máximo (µg/kg)
Vino (incluidos los vinos espumosos y excluidos los vinos de licor y los vinos con un grado alcohólico mínimo de 15 % vol.) y vino de frutas.	2.0
Vino aromatizado, bebidas aromatizadas a base de vino y cócteles aromatizados de productos vitivinícolas.	2.0
Zumo de uva, zumo de uva concentrado reconstituido, néctar de uva, mosto de uva y mosto de uva concentrado reconstituido, destinados al consumo humano directo.	2.0

Fuente: Elaboración propia basado en: REGLAMENTO (CE) No 1881/2006 DE LA COMISIÓN EUROPEA (2006).

La Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación en 1999 creó un programa conjunto FAO/OMS sobre normas alimentarias, en donde se trató el documento de posición sobre la ocratoxina A en donde se hizo la siguiente recomendación respecto al límite máximo para la OTA.

“Se recomienda que se establezca un límite máximo del Codex para la ocratoxina A al nivel de 5 µg/kg para cereales y productos de cereales” (Comisión del Codex Alimentarius, 1999).

En México, como en muchos otros países no existe una regulación para los límites máximos de la OTA en alimentos, únicamente se cuenta con la Norma Oficial Mexicana **NOM-188-SSA1-2002**, Productos y Servicios. Control de aflatoxinas en cereales para consumo humano y animal, y la Norma Oficial Mexicana **NOM-187-SSA1/SCFI-2002**, Productos y servicios. Masa, tortillas, tostadas y harinas preparadas para su elaboración y establecimientos donde se procesan. Especificaciones sanitarias. Información comercial. Métodos de prueba, las cuales determinan los límites máximos de otro tipo de micotoxinas (aflatoxinas). En estas normas se establece el límite máximo de aflatoxinas que va de 12 a 20 (µg/kg) dependiendo del tipo de alimento.

1.6 El vino

1.6.1 Historia del vino

La historia del vino se puede remontar al año 8,000 a.C. y 6,000 a.C. en el periodo Neolítico cuando las condiciones fueron propicias para el cultivo de la vid en la zona localizada entre el mar Negro y el mar Caspio, (Turquía, Siria, Irak, Irán y Rusia). En un comienzo, se supone que en pequeñas aldeas del mundo se consumió de manera espontánea el jugo fermentado de uvas silvestres. En este periodo Neolítico; se formaron las primeras ciudades y se inventó la metalurgia y la agricultura, y en el año 5,000 a.C. se inventó la cerámica, y con este invento fue posible construir vasijas ideales para la fermentación y conservación del vino (Carbonari & Silvia, 2013).

La primera evidencia arqueológica que se tiene respecto al vino consiste un conjunto de vasijas encontradas en Irán, que datan entre los años 5,400 y 5,000 años a.C. en las cuales se determinó la presencia del ácido tartárico en las paredes (Carbonari & Silvia, 2013).

En la segunda mitad del tercer milenio a.C. se conoce que la vid se cultivó en el este de Mesopotamia, en el segundo milenio, el cultivo de la vid se extendió hasta el norte del valle Tigris, y según el Código de Hammurabi se sabe la importancia de esta bebida dentro de las ceremonias religiosas, por otro lado, dentro del imperio romano, el consumo de vino era un privilegio para la clase noble, los reyes y sacerdotes (Carbonari & Silvia, 2013).

El cultivo de la vid se amplificó desde Mesopotamia hacia el Cercano Oriente y el Mediterráneo gracias a diversas culturas tales como la griega, romana, fenicia y babilónica entre otras, y no fue hasta el segundo milenio que la viticultura llegó a China y Japón (Carbonari & Silvia, 2013).

Otros registros históricos indican que en Egipto, reyes, sacerdotes y faraones consumían vino en los años del 2,700 a.C., sin embargo, se considera que los primeros expertos en vinos fueron los griegos, ya que el esplendor de la vitivinicultura comenzó con ellos, pues extendieron el consumo hacia el extremo oeste de Europa, el norte de África y Asia, fueron los griegos ubicados en Marsella en el siglo VI a.C. los que introdujeron la vid al actual país de Francia. Los primeros viñedos romanos fueron establecidos cerca de ríos importantes como el Danubio, Rin y Ródano, por su lado, los galos inventaron la barrica, el recipiente originariamente de roble que resistía los traslados y el clima cuyo uso se hizo popular después de la caída del Imperio Romano (Carbonari & Silvia, 2013).

Después de la caída del Imperio Romano, el consumo del vino fue una de las tradiciones que prevaleció, en la edad media, esta bebida se utilizó también para curar heridas, aliviar dolor de garganta, y era una fuente de ingresos para los mercaderes medievales. En Francia algunos monasterios se encargaban del cultivo y la elaboración, y no fue hasta finales de 1600 cuando se comenzaron a utilizar botellas de vidrio para para contener este producto (Carbonari & Silvia, 2013).

En México, las primeras vides fueron traídas por los españoles durante la conquista una vez que fue consumada, los sembradíos se extendieron desde el centro del país hacia los demás estados, principalmente hacia regiones como Querétaro y Guanajuato, sin embargo, en el norte del país en Baja California y Sonora se explotó realmente el potencial vitivinícola ya que estos estados poseen condiciones adecuadas para la producción de vino de calidad, por lo que se decidió incluir variedades francesas de vid (INAES, 2018).

Después de la conquista de México, Hernán Cortés ordenó traer semillas y plantas de *Vitis vinífera* provenientes de España, además de que en 1524 firmó un decreto en el que se ordenaba a los españoles plantar 1000 viñas por cada 100 indígenas a su servicio, por estos motivos es considerado

como el principal promotor de este cultivo. Para 1531 el Rey Carlos V ordenó que todo navío con destino a la Nueva España llevara viñas y olivos para ser cultivados (World Wine Now, 2019).

Para 1595 el Rey Felipe II prohibió la siembra de nuevos viñedos, así como la producción en tierras americanas por temor a que existiera competencia con España ya que el territorio sembrado incrementaba. En 1900 una plaga llamada filoxera destruyó una gran cantidad de viñedos mexicanos y para el año de 1910 los viñedos fueron abandonados y destruidos por diligencias de Francisco Villa (World Wine Now, 2019).

En 1920 se reanudó la producción de vinos mexicanos de una manera más seria, pero no se logró que tuvieran una buena calidad, y para los años 80, comienza la producción de vinos de alta gama en el país (World Wine Now, 2019). En 1948 fue creada la Asociación Nacional de Vitivinicultores A. C. y en el año de 1970 México ingresó a la Oficina Internacional de la Viña y el Vino, hoy llamada Organización Internacional de la Viña y el Vino (OIV). Para el 2009 se crea el Consejo Mexicano Vitivinícola A.C. y en 2018 se celebran 70 años del Consejo Mexicano Vitivinícola, se promulga la Ley de Fomento a la Industria Vitivinícola y se impulsa la Marca Colectiva de Vino Mexicano (CMV, 2020).

1.6.2 Definición

De acuerdo con la Organización Internacional de la Viña y el Vino (OIV, 2018), la definición básica que se le otorga a este producto es la siguiente: “El vino es exclusivamente la bebida resultante de la fermentación alcohólica completa o parcial de la uva fresca, estrujada o no, o del mosto de uva. Su graduación alcohólica adquirida no puede ser inferior al 8.5% vol”.

De manera nacional, la NOM-199-SCFI-2017 define al vino como “Bebida alcohólica que se obtiene de la fermentación alcohólica únicamente de los mostos de uva fresca (*Vitis vinífera*) con o sin orujo, o de la mezcla de mostos concentrados de uva (*Vitis vinífera*) y agua. Su contenido alcohólico es de 8% a 16% Alc. Vol.”

Si bien, ambas definiciones están dadas por instituciones diferentes, se coincide en que el vino es una bebida obtenida a partir de la fermentación alcohólica de uvas, en la primera definición se establece un límite mínimo de alcohol permitido para esta bebida, mientras que, en la segunda definición dada por las autoridades mexicanas, además del contenido mínimo se fija también el contenido máximo de alcohol.

1.6.3 Composición química del vino

La composición química del vino va a variar dependiendo del tipo de uva y del proceso con el que se elabora, sin embargo, en la Tabla 7, se presentan a grandes rasgos los valores dados para los vinos de mesa.

Tabla 7. Composición química del vino por 100g de porción comestible.

Elemento	Cantidad
Agua (g)	98.8
Energía (kcal)	78
Proteínas (g)	0.1
Lípidos (g)	0
Carbohidratos (g)	1.1
Fibra (g)	0
Ca (mg)	8.7
Fe (mg)	0.7
I (mg)	5
Mg (mg)	8
Zn (mg)	0.1
Na (mg)	12
K (mg)	98

Fuente: Elaboración propia a partir de datos de Moreiras et al. (2011).

1.6.4 Tipos de vino

Existen diversas clasificaciones para el vino, de acuerdo con el contenido de azúcar (OIV, 2018) el vino puede ser:

- **Seco:** Cuando el contenido de azúcar es mínimo de 4g/L y máximo 9g/L.
- **Semi-seco:** El contenido de azúcar alcanza un mínimo de 12g/l y máximo 18 g/L.
- **Semi-dulce:** El vino posee un contenido de azúcar máximo de 45 g/L.
- **Dulce:** El contenido mínimo de azúcar es de 45g/L.

La NOM-199-SCFI-2017 proporciona una lista de diferentes tipos de vinos, entre ellos los que destacan son los siguientes:

- 1) **Vino de mesa** es el vino que se obtiene de la fermentación alcohólica de los mostos de fresca con o sin orujo, o de la mezcla de mostos concentrados de uva y agua. Su contenido alcohólico es de 8,5 % a 15% Alc. Vol.
- 2) **Vino tinto**, aquel resultante de la vinificación de los mostos de uvas tintas, con maceración de sus orujos o de la vinificación de uvas cuyo jugo es tinto.
- 3) **Vino blanco** es aquel resultante de la vinificación de los mostos de uvas blancas o de mostos de uvas tintas de jugo blanco.
- 4) **Vino rosado**, resultante de la vinificación de los mostos de uvas blancas o uvas (*Vitis vinifera*) tintas con maceración parcial de sus orujos.

- 5) **Vino clarete** es aquel procedente de mostos obtenidos con mezcla de uvas tintas y/o blancas, o de sus mostos y cuya fermentación se hace parcialmente en presencia de los orujos de uva tinta
- 6) **Vino varietal**, el vino que contiene al menos 75% de una variedad específica de uva, la cual debe ser declarada en la etiqueta.
- 7) **Vino de origen**, aquel en que se da importancia a la región o localidad en donde fueron producidas por lo menos el 85% de las uvas de las que proviene el vino.
- 8) **Vino Mexicano** será el vino producido con el 100% de uvas de origen mexicano y que además su contenido total es fermentado y envasado en territorio nacional.
- 9) **Vino espumoso** es aquel que cumple con las condiciones de un vino base y que, como consecuencia de su elaboración, contiene gas carbónico de origen endógeno, produce espuma de sensible persistencia seguida de un desprendimiento continuo de burbujas al ser descorchada la botella y servido el vino (contienen CO₂ exclusivamente endógeno).

1.6.5 Producción mundial de vino

La actualización más reciente sobre la producción de vino a nivel mundial la tiene la OIV, al año 2016 se produjeron 270,096 hectolitros, el consumo mundial fue de 241,444 hectolitros. En la Figura 17 se muestra la tendencia de producción y consumo de vino a nivel mundial del 2005 hasta el 2016.

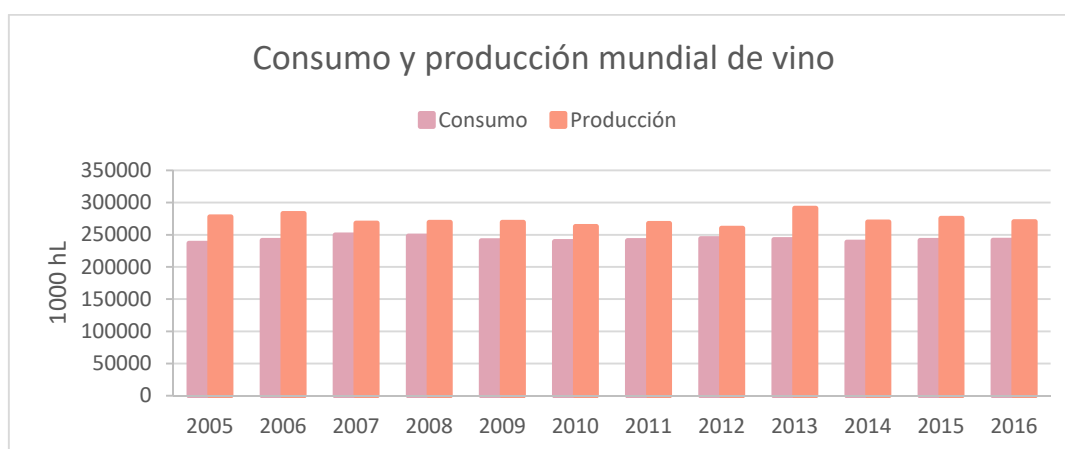


Figura 17. Consumo y producción mundial de vino.

Fuente: Elaboración propia a partir de datos de la OIV (2019)

Las exportaciones mundiales de vino en el año 2016 fueron de 103, 805 hectolitros y las importaciones fueron de 101,010 hectolitros; Los principales países exportadores son España, Italia y Francia, entre los 3 representan más del 50.7% del volumen del mercado mundial en 2018 (54,8 millones de hectolitros). Entre los cinco primeros importadores se encuentran Alemania, Reino Unido, Estados Unidos, Francia y China, juntos representan más de la mitad del total de las importaciones al 2018

(OIV., 2019). En la Figura 18 se muestra la tendencia de exportación e importación de vino a nivel mundial desde el año 2005, hasta el año 2016 (OIV, 2019).

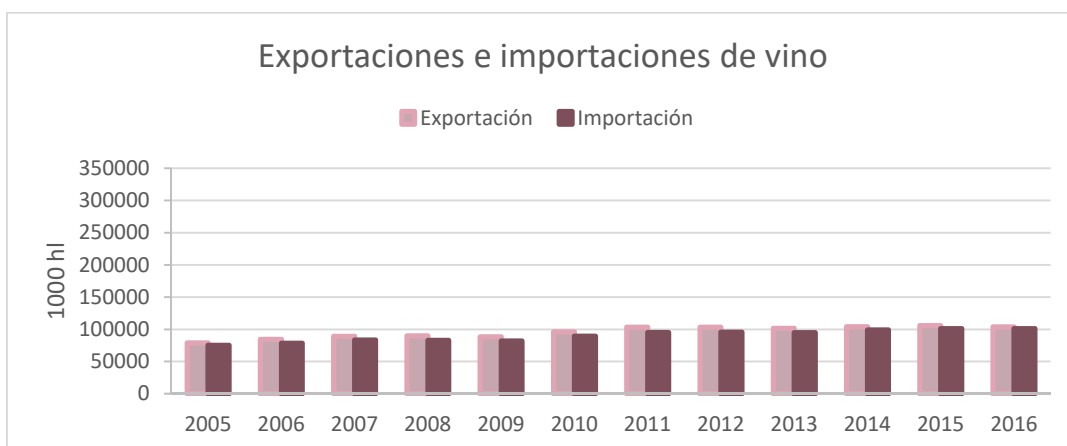


Figura 18. Exportaciones e importaciones mundiales de vino.

Fuente: Elaboración propia a partir de datos de la OIV (2019)

En la Figura 19 se presentan los principales países vitícolas, aquellos que producen la mayor cantidad de vino son Italia con 48.3 millones de hectolitros, Francia con 43.5 millones de hectolitros y en tercer lugar España con 38.9 millones de hectolitros. En el 2018 la producción de vino de la Unión Europea alcanzó los 181.9 millones de hectolitros, en Asia, principalmente en China, la producción fue de 8.3 millones de hectolitros; Mientras que en el continente americano Estados Unidos produjo 23.9, Argentina 14.5, Chile 12.9 y Brasil 3.1 millones de hectolitros. En Sudáfrica se produjeron 9.5 y en Oceanía se tuvo una producción de 12.9 millones de hectolitros mientras que la producción neozelandesa fue de 3 millones de hectolitros (OIV, 2019).

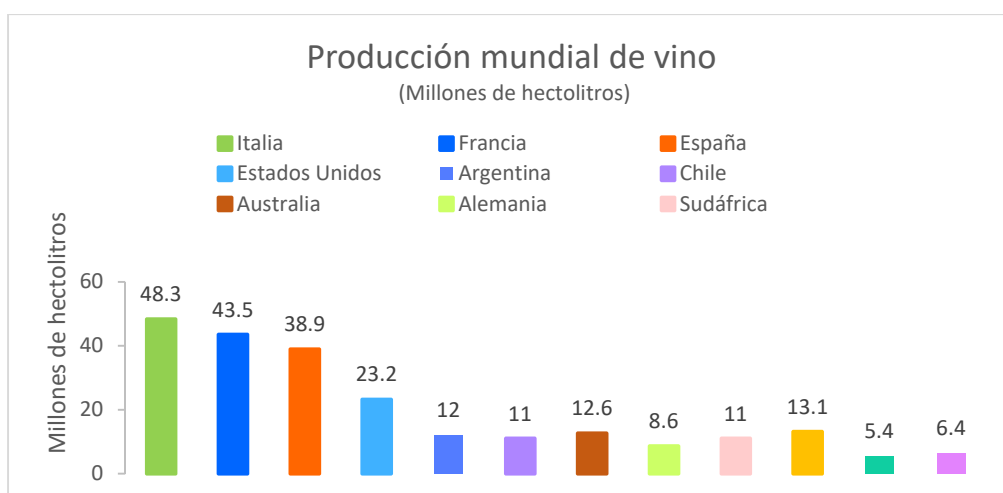


Figura 19. Producción mundial de vino. (Media obtenida del 2013-2017).

Fuente: Elaboración propia a partir de datos de la OIV (2019).

1.6.6 Producción nacional de vino

De acuerdo con cifras del Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera de la Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural, la exportación de vinos mexicanos creció 7.9% en 2019 respecto del año pasado. La cifra corresponde a los periodos de enero a noviembre de ambos años: mientras que en el 2018 se registraron ventas por 6 millones 403 mil dólares, el año siguiente fueron de 6 millones 485 mil 425 dólares (SAGARPA/SIAP, 2018).

1.6.6.1. Regiones vinícolas nacionales

En México al año 2018 se tiene estimado que el consumo de vino per cápita es de 750mL, durante los últimos 10 años, la producción de vino mexicano incrementó en un 20% (SAGARPA/SIAP, 2018). Entre las principales regiones vinícolas de México destacan Baja California que cuenta con el Valle de Guadalupe, Calafia, Santo Tomás, San Vicente y San Antonio de las Minas, en donde las variedades más cultivadas de uvas tintas son: Cabernet Sauvignon, Merlot y Tempranillo, y de uvas blancas: Chardonnay, Chenin Blanc y Sauvignon Blanc; Coahuila posee las regiones de cultivo de Parras, Arteaga y Santillo, maneja las variedades de uvas tintas como Cabernet Sauvignon, Merlot, Syrah, y blancas tales como Chardonnay y Moscatel; Querétaro estado ubicado a 160 km al norte de la Ciudad de México tiene las regiones de viticultura de San Juan del Rio, Ezequiel Montes y Tequisquiapan, dentro de estas regiones las variedades más cultivadas de uvas tintas son el Cabernet Sauvignon, Pinot Noir, Tempranillo, Malbec, Gamay y Pinot Gris, y uvas blancas tales como Chenin Blanc, Chardonnay, Sauvignon Blanc, St Emilion, entre otros; Zacatecas cuenta con las regiones de viticultura de Ojo Caliente y Valle de la Macarena en las cuales las variedades de uvas tintas que predominan son Carignan, Ruby, Cabernet Sauvignon y salvador, y uvas blancas como Saint Emilion, Italia y Moscatel (Consejo Mexicano Vitivinícola., 2018). En la Figura 20 se muestran las principales entidades vinícolas marcadas en color vino y las variedades de uva que se producen en cada entidad (SAGARPA/SIAP, 2018).



Figura 20. Principales entidades vinícolas de México y sus variedades de uva

Fuente: SAGARPA/SIAP (2018).

1.6.7 Elaboración de vinos

Se llama vinificación al proceso de transformación de la uva para convertirse en vino, este proceso varía dependiendo del tipo de vino que se busca obtener, sin embargo, a grandes rasgos podemos hablar de 2 tipos de vinificación, el primero es de vinos de mesa que incluye vinos blancos tintos y rosados y la segunda deriva en la obtención de vinos especiales como los espumosos. En la Figura 21 se presenta el diagrama de flujo del vino tinto (Nieto-Godínez, 2010).

Toda vinificación comienza con la materia prima que es la **uva**, una vez que se considera que ésta posee la madurez deseada y se determina que se encuentra sana y libre de enfermedades, se realiza la **vendimia** que es la recolección del fruto para su traslado hacia donde se elaborará el vino (Peñin, 2009).

Una vez que la uva es transportada hacia la bodega en donde se llevará a cabo la vinificación, se procede a realizar el **despalillado y estrujado**, ambas operaciones se realizan dentro del mismo equipo, el despalillado consiste en la eliminación parcial o total del raspón mientras que el estrujado es una operación con la cual se obtiene el jugo reventando las bayas de la uva (Nieto-Godínez, 2010).

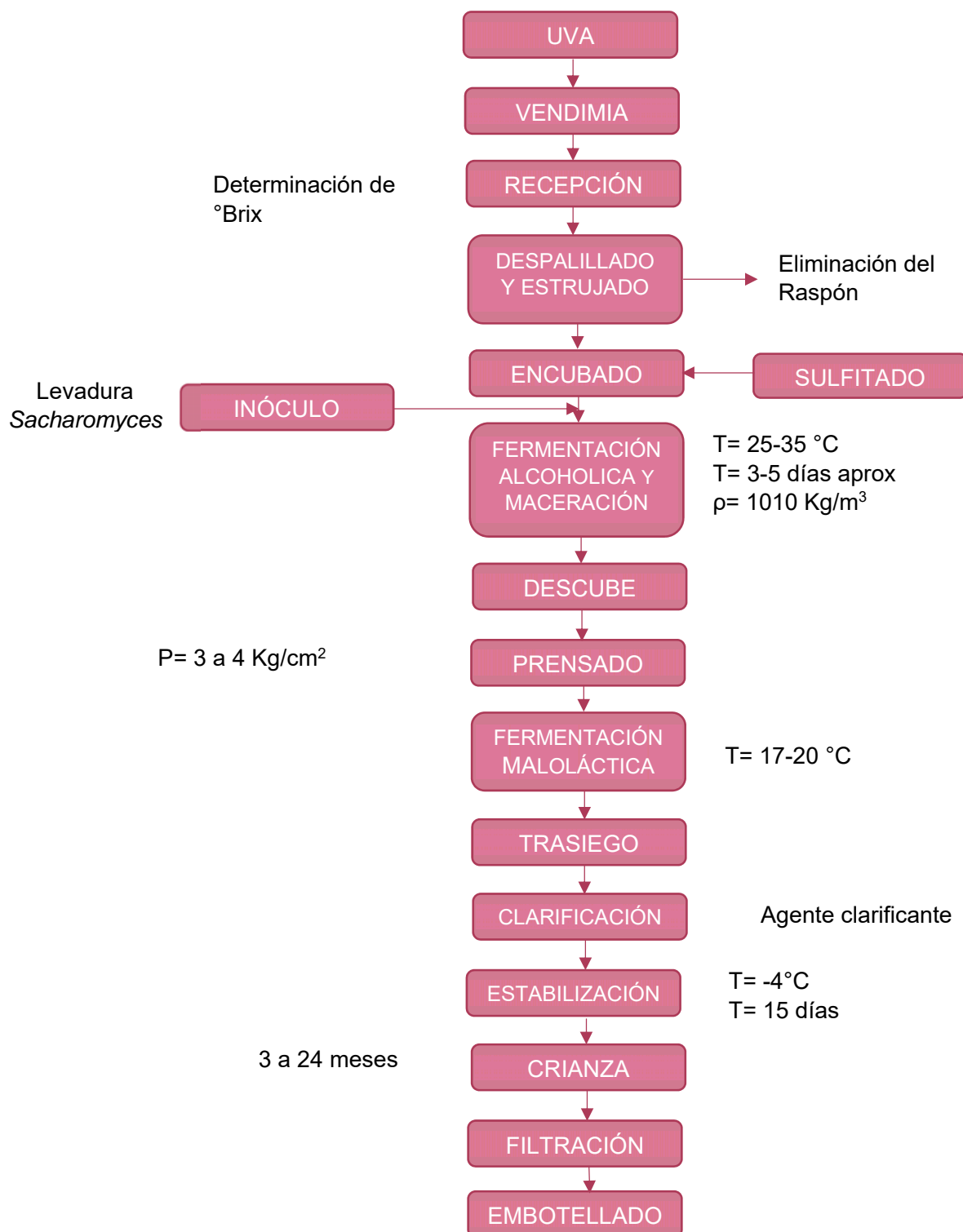


Figura 21. Diagrama de flujo del vino tinto

Fuente: Nieto-Godínez (2010).

En el **encubado** el mosto obtenido es introducido en grandes recipientes o cubas que pueden ser de madera, cemento, metal u otros materiales, aquí es donde sucederán los siguientes procesos de

sulfitado, maceración y fermentación. Posterior al encubado, en caso de tener una vendimia defectuosa en la que se produce oxidación por efecto de la enzima lactasa, se procede a ejecutar un **sulfitado** cuyo objetivo principal es la detención de la oxidación, esta operación se puede realizar con anhídrido sulfuroso gaseoso (SO₂), metabisulfito de potasio (K₂S₂O₅) o metabisulfito de sodio (Na₂S₂O₅). Es posible que se desee ajustar los tiempos de fermentación para lo que se usa la adición de un **inóculo** en proporción de 3 a 5% en volumen del mosto a fermentar, éste es añadido a las tinas de fermentación y permitirá una dispersión adecuada de los microorganismos en el mosto (Nieto-Godínez, 2010).

La **maceración** es una operación en donde el vino obtiene sus cualidad de color, aroma, taninos y está basada en un largo contacto entre los componentes del mosto que son los hollejos, semillas y la pulpa de la uva (Nieto-Godínez, 2010), mientras que la **fermentación alcohólica** es la transformación del alcohol a partir de los azúcares del mosto y se logra gracias a la adición de levaduras, la más conocida es la *Saccharomyces cerevisiae*, durante la fermentación es de suma importancia controlar la temperatura para evitar la muerte de las levaduras y por consecuencia la suspensión de este proceso (Peñin, 2009).

Posterior a la maceración y fermentación se procede a separar el mosto fermentado de los orujos, este procedimiento es conocido como **descube**, después del descube se obtiene una pasta formada por los orujos, la cual se transporta a prensas para llevar a cabo el **prensado**, de aquí se obtiene un vino con elevada concentración de compuestos fenólicos (Nieto-Godínez, 2010).

En el vino tinto existe una segunda fermentación llamada **fermentación maloláctica**, aquí se reduce la acidez total del vino, el ácido málico se transforma en ácido láctico debido al desarrollo de bacterias lácticas ubicadas en los hollejos de uvas maduras, proporcionando al vino finura y suavidad. Al terminar la fermentación maloláctica se realiza un **trasiego** que consiste en trasladar el vino de un envase hacia otro, esto para dejar sólidos en el recipiente previo, para eliminar los últimos restos sólidos se procede a realizar un **clarificado** que a su vez puede ser un clarificado natural o inducido con sustancias clarificantes (Peñin, 2009).

Los vinos son propensos a presentar alteraciones en su composición derivado de problemas microbiológicos, cambios de temperatura o aireación, para lo que es necesario ejecutar una **estabilización**, en la actualidad existen diferentes métodos para llevar a cabo esta operación como lo son centrifugación, filtrado, tratamientos en frío, estabilización por calor, entre otros, el empleo de cada método radica en el tipo de problema a solucionar (Hidalgo, 2018).

Para lograr el añejamiento de algunos vinos se realiza una **crianza** o envejecimiento con una duración determinada dependiendo del tipo de vino que se busca obtener, gracias a este proceso, el vino modifica y mejora sus propiedades organolépticas, ésta puede ser realizada en diferentes envases. Es

posible realizar una filtración después de la crianza con el objetivo de lograr la limpieza total del vino o clarificarlo, ésta es una técnica de separación ampliamente utilizada en la industria vitivinícola (Hidalgo, 2018).

Por último, se realiza el **embotellado** del vino para su venta y salida al mercado, para proceder con el embotellado, el vino debe cumplir con ciertos criterios, debe ser resistente al aire y estable para no presentar enturbiamiento, decoloración e inclusive una nueva fermentación dentro de la botella (Nieto-Godínez, 2010).

En vinos blancos el proceso de igual manera comienza con la **uva** y la **vendimia** para su recolección, en la **recepción** se verifican los grados Brix de las uvas, una vez que determina que la uva se encuentra en condiciones óptimas para realizar la vinificación se realiza el **estrujado** de las uvas presionando levemente las bayas para evitar que las pepitas y los raspones se rompan y por consecuencia contaminen el mosto, de esta operación se obtiene un mosto que es sometido a un **escurrido** y posteriormente a un **prensado**, en el prensado se da lugar a un mosto yema o flor, muy aromático, suave y afrutado (Peñin, 2009).

En el **desfangado**, se eliminan partículas sólidas contenidas en el mosto, es una operación de suma importancia, ya que permitirá la obtención de vinos frescos y afrutados, puede ser llevado a cabo de manera estática con la adición de SO₂, bentonita o enzimas pectolíticas, o dinámico aplicando una fuerza (centrifugación) (Nieto-Godínez, 2010).

La **fermentación alcohólica**, al igual que con los vinos tintos es una transformación de los azúcares de la uva en alcohol, acabada la fermentación se realiza el **trasiego** para incorporar oxígeno del aire y eliminar parcialmente el CO₂ disuelto, así como para eliminar los sólidos (Peñin, 2009).

Posterior a la fermentación es posible realizar una **crianza** en madera para aportar riqueza aromática al vino, seguido de una **clarificación, filtración y embotellado**, de la misma manera que con el vino tinto.

El diagrama de flujo para el vino blanco se presenta en la Figura 22.

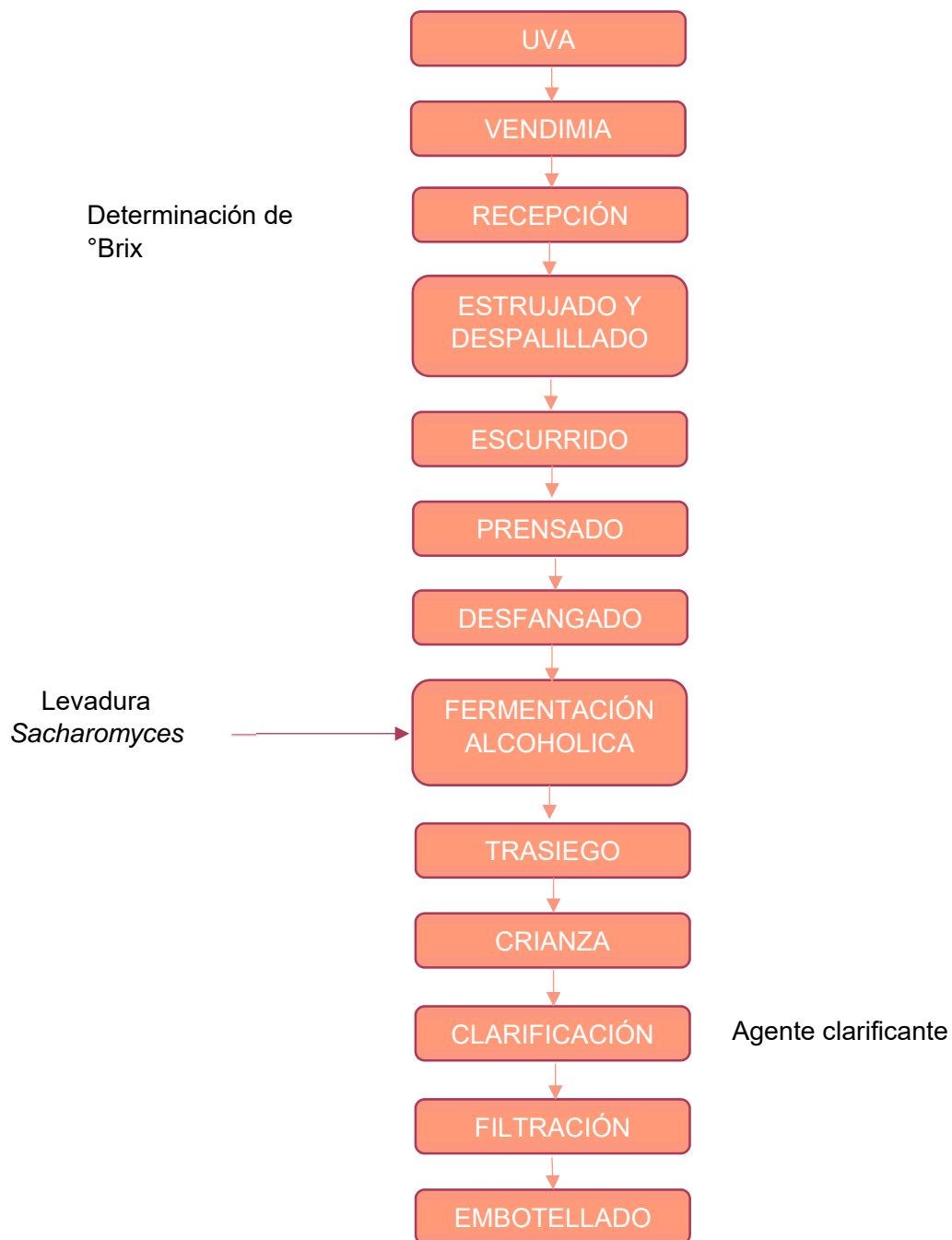


Figura 22. Diagrama de flujo del vino blanco

Fuente: Elaboración propia con datos de Nieto (2010) y Peñin (2008).

1.6.8 Fermentación

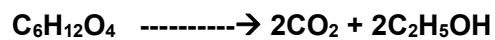
Para poder hablar de la fermentación en primer lugar se debe comprender la glucólisis, que es una serie de reacciones bioquímicas que permite a las células la transformación de azúcares en ácido pirúvico (Hidalgo, 2018), bajo condiciones anaerobias el piruvato llega a convertirse en etanol, ácido

láctico o ácido acético mediante una fermentación alcohólica, láctica o acética respectivamente (Mckee et al., 2009).

Dentro del proceso de vinificación las levaduras son los agentes que llevan a cabo la fermentación, estas son muy sensibles a la temperatura, necesitan oxígeno, así como una cantidad determinada de azúcares para realizar sus funciones (Peñin, 2008).

1.6.9 Fermentación alcohólica y maloláctica

La fermentación alcohólica consiste en una descomposición de hexosas producidas por las células de las levaduras con formación de dióxido de carbono y alcohol, la reacción se representa de la siguiente manera:



Las células de las levaduras aprovechan en esta fermentación anaerobia la energía de descomposición de la glucosa para cubrir sus necesidades energéticas, en general, la temperatura es un elemento de suma importancia para las levaduras, ya que estas no se desarrollan correctamente si no se controla, en el caso de los vinos, la temperatura ideal varía entre los 25 y 20°C dependiendo del tipo de vino que se desea (Nieto, 2010).

La fermentación maloláctica permite reducir la acidez total del vino, a veces sucede al final de la fermentación alcohólica de los vinos y antes del descube, o después del descube al trasladar el vino a toneles, este tipo de fermentación sucede por la presencia de bacterias lácticas presentes en el vino, que pueden encontrarse sobre el hollejo de las uvas maduras, o en los recipientes donde se contiene el vino. En vinos blancos la fermentación maloláctica no debe ser ejecutada, para evitar que suceda se puede añadir sulfuroso o realizar una filtración (Peñin, 2008).

CAPÍTULO 2: Metodología experimental

2.1 Justificación

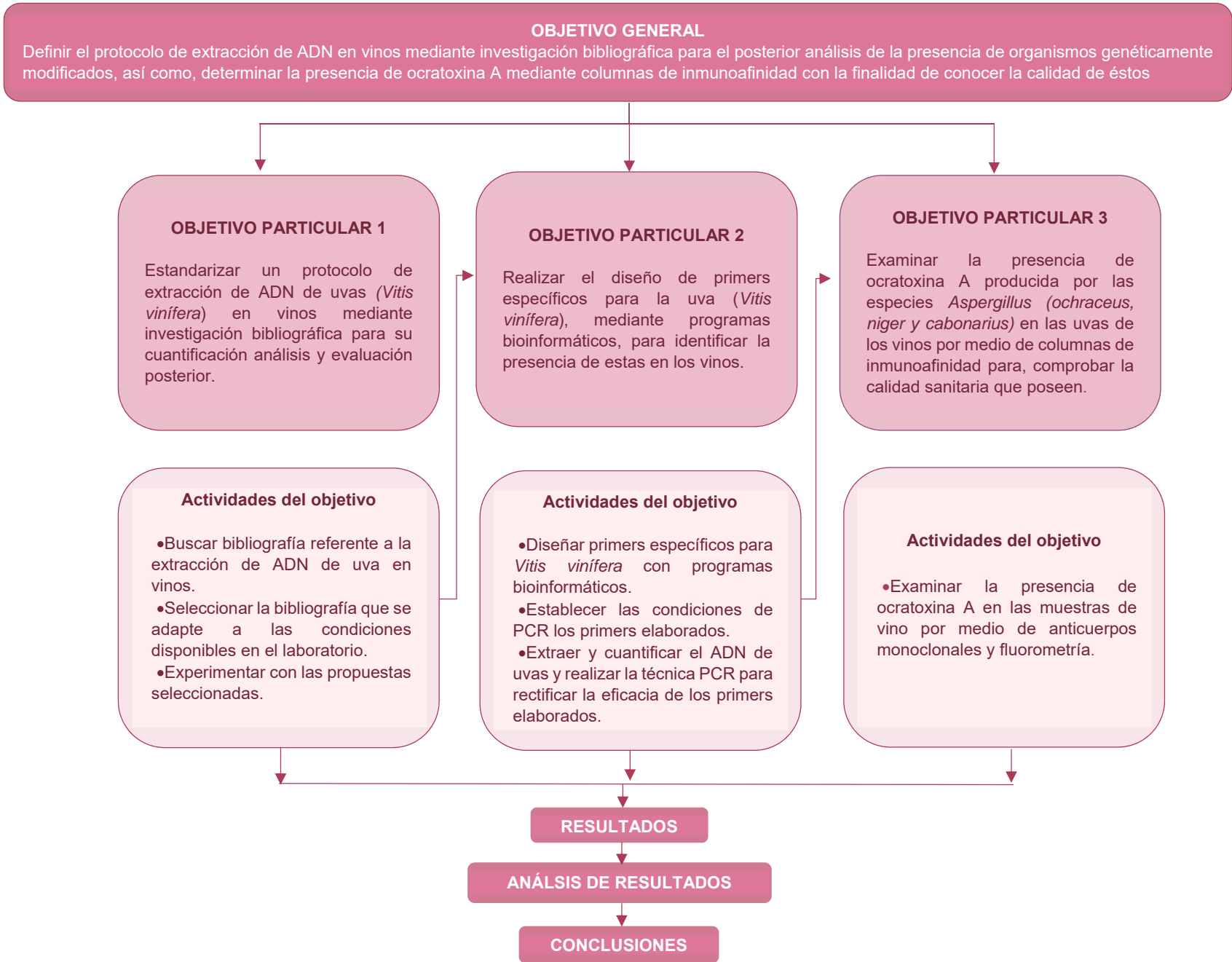
Considerando la información proporcionada anteriormente, este trabajo consiste en la estandarización de un protocolo de extracción del ADN de uvas en vinos para así lograr en una futura investigación la identificación de OGM en los vinos, ya que, aunado a la falta de regulación, existe una controversia que rodea el tema sobre el consumo de los OGM, que, aunque no se tiene suficiente evidencia científica que demuestre los daños a la salud humana, es necesario que el consumidor esté informado sobre el contenido y origen de sus alimentos, para que así puedan tomar una decisión informada.

Para corroborar la eficacia de la extracción del ADN de las uvas de los vinos se utilizará la técnica de PCR, una técnica ampliamente conocida en el campo de la biología molecular, que permite replicar millones de veces una secuencia específica de ADN a partir de pequeñas cantidades de material biológico y en un corto periodo de tiempo para su análisis posterior (Tamay de Dios et al. 2013). Dicha técnica, permitirá amplificar el ADN de la *Vitis vinifera*, y con ayuda de una electroforesis se logrará visualizar la sección amplificada para así demostrar la presencia de ésta en los vinos.

Por otro lado el autor Rousseau (2004), presenta un artículo en donde describe que, la aparición de hongos como *Aspergillus niger*, *Aspergillus carbonarius* y *Aspergillus ochraceus* es más propicia durante la maduración de la uva, estos hongos al estar en contacto con la pulpa producen metabolitos secundarios llamados micotoxinas, especialmente la ocratoxina A (Rousseau, 2004), dicha toxina tiene efectos dañinos para la salud humana y en México no existe una legislación que regule los límites mínimos y máximos permitidos para la presencia de la OTA en los productos alimenticios, únicamente se cuenta con normas que regulan los límites de una de estas micotoxinas llamadas *aflatoxinas*, las cuales se encuentran en granos, sémolas, semolinas y harinas de diferentes cereales. Sin embargo, a nivel internacional en el 2003 la FAO emitió “Reglamentos a nivel mundial para las micotoxinas en los alimentos y en las raciones” un documento en el que se mencionan los límites máximos permitidos desde 3 hasta 50µg/kg (dependiendo del país) que podrían ser utilizados como referencia.

Considerando los daños que pueden ser ocasionador por la ingesta de productos afectados por la OTA y la clasificación que le otorgó la IARC como posible carcinógeno, es de vital importancia evaluar la calidad de los vinos, tanto de México, como de otras regiones, y compararlos con las normas internacionales existentes, siendo este otro de los objetivos del presente trabajo; la identificación de la OTA se realizará por medio de la técnica de inmunoafinidad (Vicam, 1999), la cual involucra el uso de columnas de anticuerpos monoclonales además de fluorometría.

2.2. Cuadro Metodológico



2.3. Descripción del cuadro metodológico

2.3.1. Objetivo General

Definir el protocolo de extracción de ADN en vinos mediante investigación bibliográfica para el posterior análisis de la presencia de organismos genéticamente modificados, así como, determinar la presencia de ocratoxina A mediante columnas de inmovilización de anticuerpos con la finalidad de conocer la calidad de éstos.

2.3.2. Objetivo Particular 1

Estandarizar un protocolo de extracción de ADN de uvas (*Vitis vinífera*) en vinos mediante investigación bibliográfica para su cuantificación, análisis y evaluación posterior.

Actividades del objetivo

- Buscar bibliografía referente a la extracción de ADN de uva en vinos.
- Seleccionar la bibliografía que se adapte a las condiciones disponibles en el laboratorio.
- Experimentar con las propuestas seleccionadas.

2.3.3. Objetivo Particular 2

Realizar el diseño de primers específicos para la uva (*Vitis vinífera*), mediante programas bioinformáticos, para identificar la presencia de estas en los vinos.

Actividades del objetivo

- Diseñar primers específicos para *Vitis vinífera* con programas bioinformáticos.
- Establecer las condiciones de PCR los primers elaborados.
- Extraer y cuantificar el ADN de uvas y realizar la técnica PCR para confirmar la eficacia de los primers elaborados.

2.3.4. Objetivo Particular 3

Examinar la presencia de ocratoxina A producida por algunas especies de *Aspergillus* (*ochraceus*, *niger* y *carbonarius*) en las uvas de los vinos por medio de columnas de inmovilización de anticuerpos, para comprobar la calidad sanitaria que poseen.

Actividades del objetivo

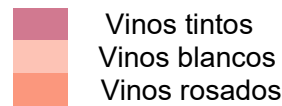
- Examinar la presencia de ocratoxina A en las muestras de vino por medio de anticuerpos monoclonales y fluorimetría.

2.4 Materiales y Métodos

Para llevar a cabo la experimentación de los objetivos planteados se recolectaron 19 diferentes variedades de vinos tintos blancos y rosados obtenidos de supermercados de México, Francia y Estados Unidos. En total se trabajó con 13 vinos tintos, 4 vinos blancos y 2 vinos rosados de éstos, 8

son originarios de Francia, 4 de Estados Unidos, 4 de México, 1 de España, 1 de Cataluña y 1 de Chile, dichos vinos se encuentran desglosados en la Tabla 8. La Figura 23 muestra fotografías de los vinos evaluados.

Tabla 8. Vinos utilizados para la investigación



Nombre	%Alcohol (Vol)	País de origen	Lote	Presentación (mL)	Tipo de uva	
VINOS AMERICANOS						
1	Black Box	13.5	Estados Unidos	LT280200101	500	Merlot
2	Liberty Creek	12	Estados Unidos	L202720A	500	Cabernet Sauvignon
3	Vendange	13	Estados Unidos	LT122200114	500	Merlot
4	Bota Mini	12	Estados Unidos	L1620205	500	Pinot Grigio
16	D-Vino Rosé	8	México	L279201005	330	No especifica
17	Domecq	12	México	L0182MV	375	No especifica
18	L.A. Cetto	13.5	México	-	187	Petite Sirah
19	D-vino Tinto	10	México	L279201005	330	No especifica
11	Estefanyas	15	Chile	L02010105	187.5	Merlot
VINOS EUROPEOS						
12	Pays d'OC	12	Francia	L19350	250	Sauvignon Blanc
13	Muscadel	11.5	Francia	L518025	375	Muscadel
14	La Croix du Pin	12	Francia	L519133	375	No especifica
15	Roche Mazet blanco	12	Francia	L905801C5	250	Sauvignon
5	Bordeaux	13	Francia	L519232	375	Bordeaux
6	Roche Mazet tinto	12.5	Francia	L932405C5	250	Cabernet Sauvignon
8	Pays d'OC	13	Francia	L19338	350	Merlot
9	Ferrandiere	13	Francia	L0F106960	187.5	Grenache Noir, Syrah, Marselan
7	Cune Rioja	13.5	España	L2017024	187	Tempranillo Garnacha y Mazuelo
10	Sangre de Toro	13.5	Cataluña	L19297C	187	Variedades Mediterráneas

Fuente: Elaboración propia.



Figura 23. Vinos utilizados para la experimentación.

Fuente: Elaboración propia.

2.4.1 Diseño de primers

Para realizar los primers específicos de *Vitis vinífera* se tomó como referencia el gen utilizado por Savazzini, y Martinelli (2005) 9-cis-epoxicarotenoide dioxigenasa2 y el programa bioinformático “PrimeQuest Tool”, posteriormente la especificidad de estos fue verificada con la base de datos GenBank del Nacional Center of Biotechnology Information (NCBI) con la clave de acceso AY337614.1. La información de los primers diseñados se encuentra desglosada en la sección de resultados del objetivo particular 2. La metodología del diseño de primers está especificada en el Anexo 1.

2.4.2 Extracción de ADN

Extracción de ADN de vino y uvas mediante Kit “DNeasy PowerPlant Pro Kit”.

Para llevar a cabo la extracción del material genético de los vinos se llevó a cabo una modificación al procedimiento propuesto por Savazzini y Martinelli (2005).

9vino y 1.4mL de una solución de NaCl 1.2M, posteriormente cada tubo fue colocado por 2 o 3 días dentro del refrigerador a una temperatura de -20°C, una vez pasado el tiempo de congelación, se sacaron las muestras y se descongelaron para centrifugar durante 30 minutos a 3000rpm, después de la centrifugación se descartó cuidadosamente el sobrenadante para conservar el sedimento (Figura 24).



Figura 24. Sedimento del vino

Posterior a la obtención del sedimento se siguió el procedimiento dado para el DNeasy PowerPlant Pro Kit, se añadieron 50mg del sedimento al tubo de 2mL dado por el kit, el cual ya contiene 2.38mm de Metak, se añadieron 410µL de “Bread Solution” y 40mL de “Phenolic Separarion Soltution”, se agitó brevemente en el vórtex para integrar todos los elementos y luego se añadieron 50mL de “Solution SL” y 3mL de “RNasa A Solution”, se agitó nuevamente en el vórtex. Para homogeneizar correctamente se colocó el tubo durante 5 minutos en el vórtex a velocidad máxima, a continuación, se centrifugó a 6000 rpm durante 2 minutos y el sobrenadante se colocó en un nuevo tubo de recolección de 2mL. Al nuevo tubo de recolección se le añadieron 1.75µL de “Solution IR” y se agitó en el vórtex durante 5 segundos, una vez concluido este tiempo de agitación el tubo se incubó en el refrigerador por 5 minutos. Pasados los 5 minutos se centrifugó a 6000 rpm y el sobrenadante se transfirió a un tubo de recolección limpio de 2mL, en este tubo se añadieron 600µL de “Solution PB” y 600µL de etanol (el líquido es el lisado) y se agitó en el vórtex brevemente por 5 segundos. En una “MB Spin Column” se transfirieron 600µL del lisado y se centrifugó a 6,000rpm por 30 segundos, se descartó el flujo y se repitió este procedimiento hasta que pasó todo el lisado, se adicionaron 500µL de “Solution CB” a la columna y se centrifugó nuevamente a 6,000rpm por 30 segundos, se descartó el flujo y se volvió a colocar la columna en el tubo de recolección, se añadieron 500µL de etanol a la columna y se centrifugó a 6,000rpm, de nuevo se descartó el flujo. Posteriormente se centrifugó a 10,000rpm x 2 minutos y se colocó la columna en un nuevo tubo de recolección de 2mL, se añadieron 30mL de “EB Solution” al centro de la membraba del filtro blanco y se incubó 2 minutos a temperatura ambiente, por último, se centrifugó la columna a 12,000rpm durante 30 segundos, se volvió a colocar el flujo en el tubo y se repitió la centrifugación, una vez terminada la centrifugación se descartó la columna y se almacenó el ADN a -20°C hasta su utilización.

Para la extracción de ADN de uvas se comenzó con una molienda en un mortero para obtener pequeños trozos que pudieran ser introducidos dentro de los tubos de 2mL, Figura 25.



Figura 25. Molienda de uva.

Posterior a la molienda se siguió el procedimiento dado por el DNeasy PowerPlant Pro Kit, previamente descrito.

2.4.3 Cuantificación de ADN

Posterior a la obtención del material genético de las muestras, se realizó la cuantificación del ADN utilizando el Spectrophotometer Nanodrop1000, de acuerdo con los autores Querci et al., (2007) el ADN tiene una densidad óptica de 50 μ L. El valor de la relación de la absorbancia a 260nm y 280nm es el que indica la pureza del ADN, siendo la proporción de 1.8 la ideal (ADN puro), aunque son aceptables los valores en el rango entre 1.7-1.9, mientras que valores menores a 1.7 indican la presencia de proteínas o fenoles y valores superiores a 2 reflejan preparaciones puras de ARN.

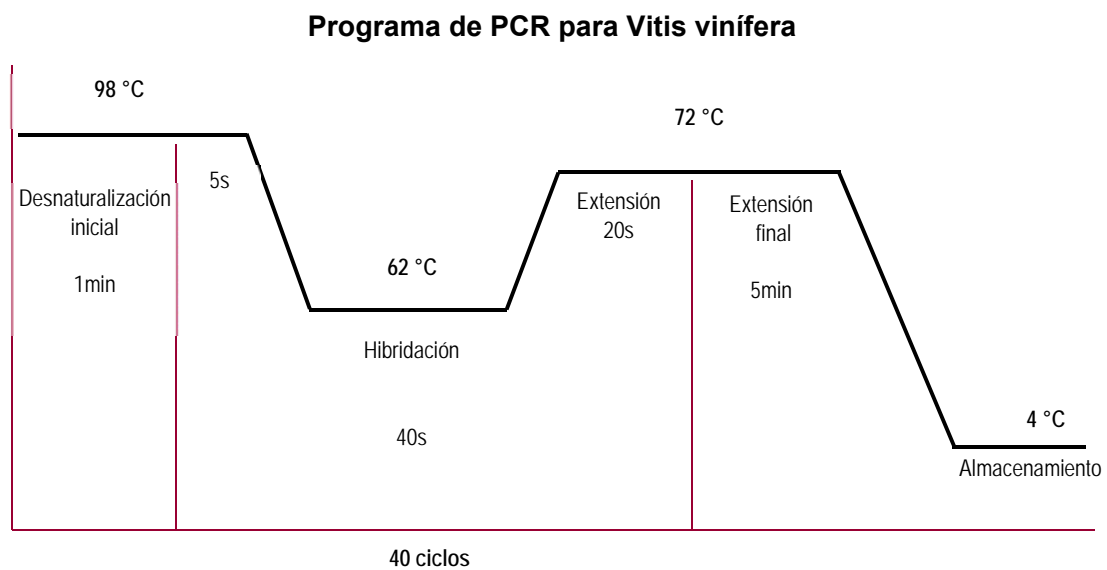
Una vez conectado el espectrofotómetro a la computadora se abrió el programa correspondiente y se seleccionó la opción de “ácidos nucleicos”, para iniciar el equipo se pusieron 2 μ L de agua libre de nucleasas y se presionó la opción “OK”, se limpió el sensor y luego se calibró el equipo colocando nuevamente 2 μ L de agua libre de nucleasas (que cumplió la función de blanco) y presionando la opción “OK”, el sensor se limpió una vez más y se procedió a colocar 2 μ L de la muestra de ADN a analizar y se seleccionó la opción “measure”, al terminar la medición se registró el valor de la relación 260/280 y el valor de la concentración (ng/ μ L).

2.4.4 Técnica PCR

Una vez diseñados los primers se procedió a planificar el programa de PCR, para *Vitis vinífera* (Figura 26).

El programa de PCR para *Vitis vinífera* implica una desnaturalización inicial a 98°C durante 5 minutos, seguido de 40 ciclos de hibridación a 62°C por 5 segundos, posteriormente se fijó una extensión inicial

de 20 segundos a 72°C y la extensión final por 1 minuto, igualmente a 72°C. Después se almacenó a 4°C.



*Figura 26. Programa de PCR para *Vitis vinifera**

La técnica se realizó con el kit GoTaq de la empresa Thermo Fisher Scientific. Después de haber realizado la extracción y cuantificación del ADN de las muestras para realizar la técnica de la PCR se añadieron los componentes de mayor a menor cantidad y procurando que el último en ser agregado fuera el ADN a analizar, bajo este principio se agregó en un pequeño tubo de recolección, 12.5µL de enzima GoTaq, 5.5µL de agua libre de nucleasas, 0.5µL de Primer Forward, 0.5µL de Primer Reverse, y 1.0µL de ADN, los tubos de recolección fueron colocados dentro del Termociclador Apollo ATC401 CLP, se configuró el programa diseñado para cada muestra y se procedió a iniciar la PCR (Thermo Fisher Scientific, 2017).

2.4.5 Electroforesis

La electroforesis fue efectuada después de haber realizado la técnica de la PCR, esto con la finalidad de analizar los fragmentos obtenidos, para este procedimiento se pesaron 0.5g de agarosa dentro de un matraz Erlenmeyer en la balanza analítica, se añadieron 50mL de buffer TAE (Tris-Acetato-EDTA) 1X y se calentó por un minuto dentro del horno de microondas haciendo intervalos de 20 segundos para agitar levemente hasta que la agarosa se diluyó totalmente, se esperó un momento a que enfriara la mezcla y después se añadió una gota de Bromuro de Etilo (BrEt) y se agitó hasta su disolución, posteriormente se vertió la mezcla en el soporte de la cámara de electroforesis previamente preparada evitando la formación de burbujas y colocando el peine correctamente para permitir la formación de los pozos en donde se pondrán las muestras, se dejó gelificar la agarosa y después de secarse se añadió TAE 1X a la cámara hasta que quedó cubierto el gel.

Para la carga y corrida del gel se pusieron en un pedazo de parafilm 3µL de BrEt, 3µL de colorante blue/orange, 1µL de marcador de peso molecular y 4µL de la muestra resultante de la PCR; cada una de las muestras fue colocada en un pozo determinado con ayuda de una micropipeta, después de colocar las muestras en su lugar correspondiente se cerró la cámara de electroforesis y se procedió a activar el campo eléctrico a 90V hasta que las marcas superaban la mitad del gel (Thermo Fisher Scientific, 2017).

Posterior al tiempo en la cámara de electroforesis, se sacó con cuidado el gel, escurriendo los restos de TAE 1X y una vez que estuvo seco se procedió a colocarlo dentro del transiluminador, se conectó y prendió la cámara y se procedió a fotografiar el gel obtenido (Podzorski et al., 2006).

2.4.6 Determinación de ocratoxina A

Se tomaron 15mL de vino y se transfirieron a un frasco de vidrio con 30 mL de etanol al 80%, se agregó 3mL de una solución previamente preparada (15% de NaCl y 2% de Na₂CO₃), se mezcló ligeramente haciendo movimientos circulares para posteriormente tomar 10mL de la mezcla y transferirla a un matraz Erlenmeyer con 40mL de agua destilada para hacer una dilución, después se prepararon las columnas monoclonales y las bombas, para pasar en ellas 10mL de la nueva dilución, posterior a este paso se realizó un primer lavado con 10mL del Buffer Fosfato Salino (BFS) con *tween* al 0.1%, se llevó a cabo un segundo lavado con 10mL de Buffer Fosfato Salino (BFS) sin *tween*, al terminar se retiró el frasco con los residuos de los lavados y se colocó un tubo de cristal debajo de la columna, por último, se añadieron 1.5mL de revelador Ochratest, al terminar de pasar por las columnas, el tubo fue llevado al fluorómetro previamente calibrado, para así obtener los datos correspondientes del contenido de ocratoxina A en el vino. Este procedimiento se repitió para cada uno de los 19 vinos con 3 repeticiones de cada una de ellas (Vicam, 1999).

CAPÍTULO 3: Resultados y discusión

3.1 Resultados

3.1.1. Resultados del objetivo particular 1

El primer objetivo está formulado de la siguiente manera:

*Estandarizar un protocolo de extracción de ADN de uvas (*Vitis vinífera*) en vinos mediante investigación bibliográfica para su cuantificación, análisis y evaluación posterior.*

Con base en la investigación bibliográfica realizada se definieron las condiciones y el proceso de extracción para ADN de *Vitis vinífera* en vinos, el cual está definido dentro de la metodología de este trabajo, este proceso de extracción fue tomado del artículo “*DNA analysis in wines: Development of methods for enhanced extraction and real-time polymerase chain reaction quantification*” de las autoras Savazzini y Martinelli (2005) y se modificó para adecuarse a las condiciones disponibles dentro del laboratorio, se complementó con el kit de extracción “**DNeasy PowerPlant Pro Kit**”.

Una vez definido el protocolo se procedió a realizar la extracción del ADN de 1 muestra de vino tinto, posteriormente se llevó a cabo la cuantificación del material genético obtenido, los valores que obtuvieron se encuentran en la Tabla 9.

Tabla 9. Cuantificación del ADN obtenido de vino tinto.

Vino	Concentración ng/ μ L	Pureza
Vino tinto	30.4	0.94

Como se aprecia en la Tabla 9, la concentración del material genético del vino fue de 30.4ng/ μ L, siendo que la concentración ideal al extraer material genético es de 60ng/ μ L, la pureza de 0.94 indica una posible contaminación con proteínas o fenoles.

3.1.2. Resultados del objetivo particular 2

Como segundo objetivo se planteó lo siguiente:

*Realizar el diseño de primers específicos para la uva (*Vitis vinífera*), mediante programas bioinformáticos, para identificar la presencia de estas en los vinos.*

Del diseño realizado utilizando programas bioinformáticos se obtuvieron los primers frontal y reverso para *Vitis vinífera* con un tamaño del amplificado de 713pb, el primer frontal tiene una longitud de 23 pares de bases y el primer reverso de 21 pares de bases. La información de los primers diseñados se encuentra en la Tabla 10.

Tabla 10. Información de los primers diseñados para *Vitis vinífera*.

PRIMER	SECUENCIA 5' – 3'	PB	Tm (°C)	Tamaño del amplificado
PF	CAGGAAGCCCAATAGTAGAAGAG	23	62	713
PR	GCTTGATTTCGCACTTGGTATG	21	62	

Una vez que se diseñaron los primers y se determinaron las condiciones de PCR para la *Vitis vinífera*, se procedió a realizar de manera experimental la extracción del ADN de dos tipos de uvas, una roja y una verde, ambas adquiridas en un supermercado de Cuautitlán Izcalli, esta extracción se llevó a cabo como se indica en la metodología, seguido de la extracción, se realizó la cuantificación del ADN, los valores obtenidos de esta cuantificación fueron los presentados en la Tabla 11.

Tabla 11. Resultados de cuantificación de ADN de uva blanca y tinta.

Tipo de uva	Concentración ng/μL	Pureza
Uva roja	26.5	1.01
Uva verde	7.8	0.70

Los resultados de la cuantificación de ambas uvas no fue el esperado, ya que en ninguna se presenta un valor dentro del rango de 1.7-1.9 que indique la extracción de un ADN puro (Thermo Scientific, 2016), ambos valores por debajo de 1.7 indican una posible contaminación significativa, ya sea de proteínas o fenoles, de la misma manera sucede con la concentración, pues la ideal es de 60ng/μL y en estas extracciones la concentración es mucho menor.

Posterior a la extracción y cuantificación se realizó la técnica PCR con el ADN previamente obtenido de las uvas y una electroforesis en gel de agarosa al 1%, esto para evaluar la eficacia de los primers diseñados, los resultados se muestran en la Figura 28.

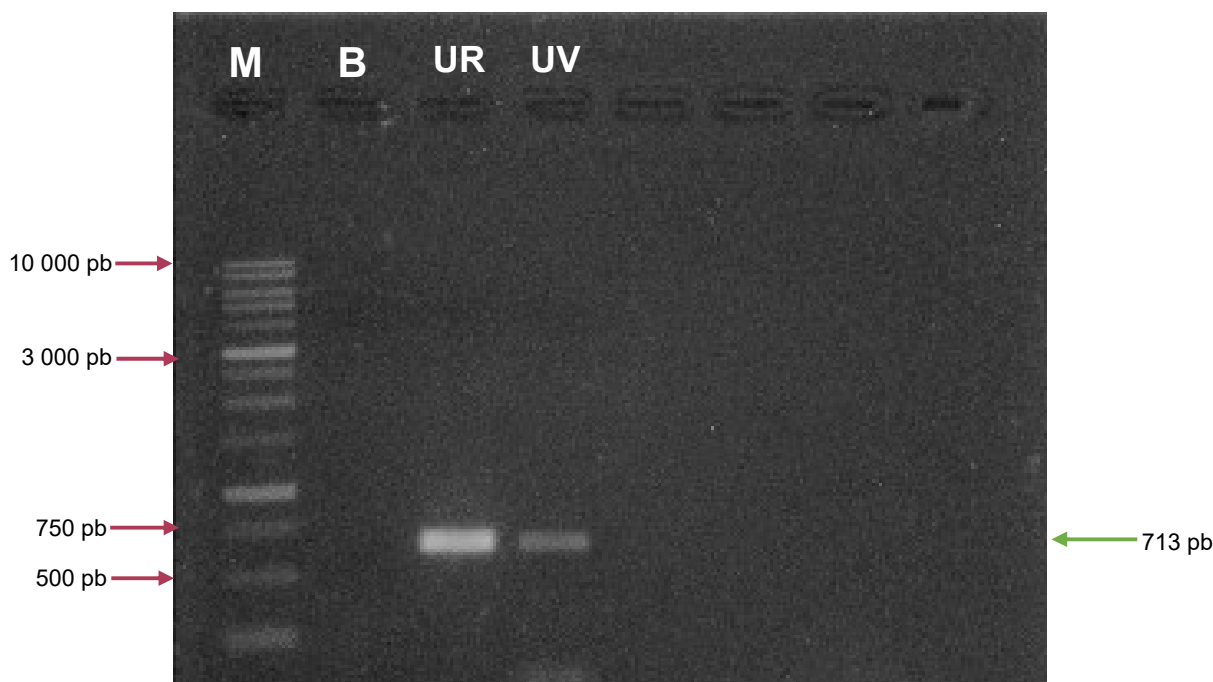


Figura 27. Gel de agarosa al 1% a 90 V para la amplificación de 2 muestras de uva, utilizando primers de *Vitis vinifera* con amplificado de 713 pb. En el carril (M) marcador de peso molecular. En el carril (B) control negativo. En el carril (UR) uva roja. En el carril (UV) uva verde.

En la Figura 27 se muestra la amplificación de muestras de ADN con los primers de *Vitis vinifera* en gel de agarosa al 1%, en el primer carril (M) se encuentra el marcador de peso molecular que va de un intervalo de 250 a 10,000 pares de base, el segundo carril (B) es la muestra blanco que no incluye ADN, nos indica que no hubo ninguna contaminación, ya que no se observa ningún amplificado. en el tercer carril (UR) se sitúa la uva roja y en el cuarto carril (UV) está la muestra de uva verde. Tanto la uva roja como la uva verde mostraron un amplificado en el fragmento de 713 pb que corresponde al amplificado de los primer diseñados para *Vitis vinifera*. Las autoras Savazzini y Martinelli (2005) en su artículo “DNA analysis in wines: Development of methods for enhanced extraction and real-time polymerase chain reaction quantification” realizaron un diseño de primers con el gen 9-cis-epoxycarotenoide dioxigenasa2, mismo que se utilizó como referencia para esta investigación y obtuvieron resultados de amplificados de *Vitis vinifera* para 10 variedades diferentes de uva para vino, sin embargo, su PCR fue realizada en tiempo real, los primers diseñados para este trabajo fueron diseñados para que los amplificados se pudieran obtener en un termociclador de punto final, en este caso se logró exitosamente el propósito de los primers en las dos variedades de uva bajo condiciones de PCR punto final.

Se realizó por segunda ocasión la técnica de PCR, esta vez utilizando el ADN obtenido de la uva verde (UV), la uva roja (UR) y con el ADN de 2 vinos tintos: Rioja (Ri) y Sangre de toro (S), se emplearon nuevamente los primers previamente diseñados para *Vitis vinifera*. posterior a la PCR se realizó una

electroforesis en gel de agarosa al 1%, esto con la finalidad de identificar la presencia de uva en las 2 muestras de vino, los resultados se muestran en la Figura 28.

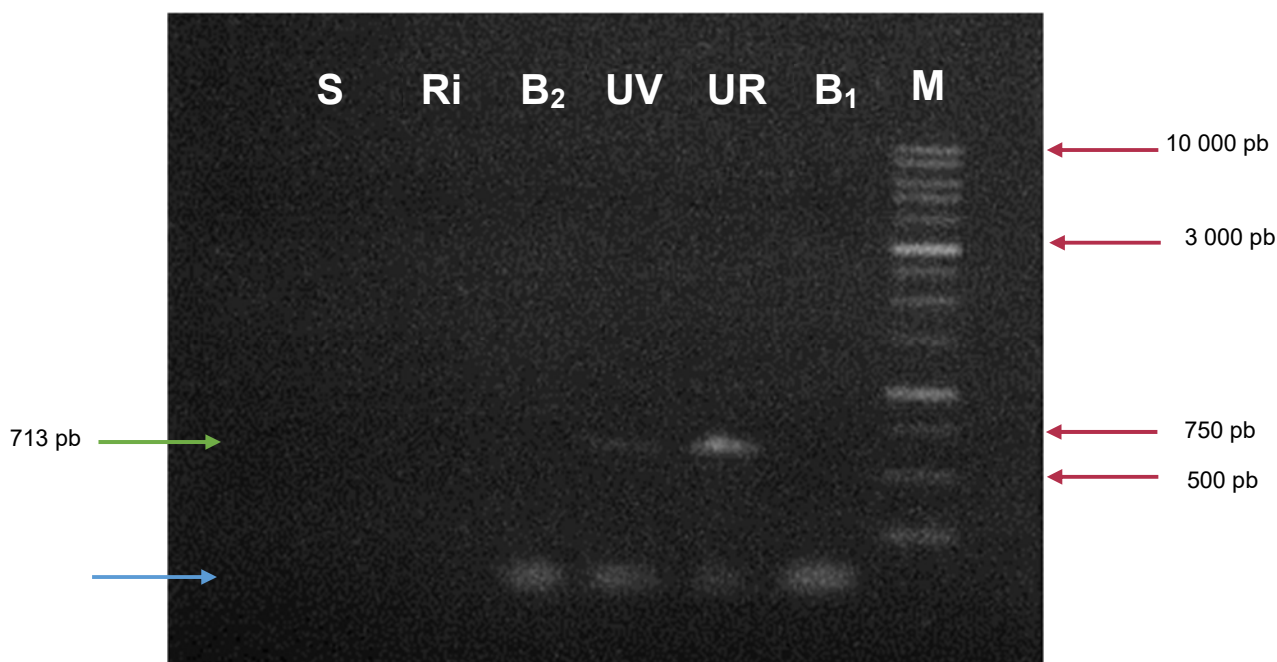


Figura 28. Gel de agarosa al 1% a 90 V para la amplificación de 2 muestras de uva y 2 muestras de vino, utilizando primers de *Vitis vinífera* con amplificado de 713 pb.

En el carril (M) marcador de peso molecular. En el carril (B₁ y B₂) control negativo. En el carril (UR) uva roja. En el carril (UV) uva verde. En el carril (Ri) vino tinto Rioja. En el carril (S) vino tinto Sangre de toro.

En la Figura 28 se observan la amplificación de muestras de ADN con los primers de *Vitis vinífera* en gel de agarosa al 1%, en el primer carril de derecha a izquierda está el marcador de peso molecular que va de un intervalo de 250 a 10,000 pares de base, seguido del carril (B₁) que es la muestra blanco exenta de ADN, este carril indica que no existe contaminación ya que no presenta ningún amplificado. En el tercer carril se encuentra la uva roja (UR) y posteriormente la uva verde (UV), ambos carriles muestran un ligero amplificado en la sección de 713 pb, lo que corresponde al amplificado de los primers diseñados, sucesivo a estos carriles se encuentra un carril (B₂) de muestra blanco sin presencia de contaminación, en el sexto carril (Ri) se encuentra el vino tinto Rioja que no presenta ningún amplificado, y por último en el séptimo carril (S) está el vino tinto Sangre de toro, el cual tampoco presenta amplificado en la sección deseada de 713pb. En la parte inferior se muestran 4 amplificados señalados con una flecha azul que no hacen referencia a ninguna muestra de ADN sino a los primers que avanzan a lo largo del gel de agarosa, estos 4 amplificados están después de las muestras de (B₁), (UR), (UV) y (B₂), sin embargo para ambas muestras de vino tinto (Ri) y (S) no se identifica su presencia en el gel, esto se le atribuye a lo mencionado por los autores Burçak et al., (2014) quienes en su artículo "Evaluation of methods for DNA extraction from must and wine" exponen que en situaciones en las

cuales el ADN no es suficientemente puro los contaminantes (que en este caso pueden ser fenoles) inhiben la Reacción en Cadena de la Polimerasa.

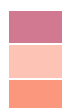
3.1.3. Resultados del objetivo particular 3

En el tercer objetivo se planteó:

Examinar la presencia de ocratoxina A producida por algunas especies de Aspergillus (ochraceus, niger y carbonarius) en las uvas de los vinos por medio de columnas de inmunoafinidad, para comprobar la calidad sanitaria que poseen.

Todas las muestras de vino presentaron ocratoxina A, siendo el vino blanco **Roche Mazet blanco** proveniente de Francia el que mostró la menor cantidad de OTA con 0.85 µg/Kg, seguido de los vinos blancos **Pays d'OC** y **Muscadel** originarios de Francia con 1.58 µg/Kg, dentro del límite también se encuentra el vino mexicano rosado **D-vino Rosé** con 1.9 µg/Kg, el vino americano **Bota Mini** con 2 µg/Kg y por último el vino rosado francés **La Croix du Pin** con 2.1 µg/Kg, el único vino tinto que se encuentra cerca del límite permitido de OTA es el vino mexicano **Domecq** con un contenido de 2.1 µg/Kg.

A excepción de 1 vino tinto todos los demás manifestaron la presencia de OTA en valores mayores al límite, comenzando con el vino catalán **Sangre de Toro** con 2.8 µg/Kg, seguido por el español **Cune Rioja** con 3.2 µg/Kg, el vino chileno **Estefanyas** con 3.15 µg/Kg, el vino mexicano **D-vino tinto** con 3.7 µg/Kg, los vinos franceses **Ferrandiere** con 4.1 µg/Kg y **Pay d'OC** con 5.2 µg/Kg, el vino mexicano **L.A. Cetto** con 5.25 µg/Kg, los vinos americanos **Black Box** con 5.7 µg/Kg y **Liberty Creek** con 5.8 µg/Kg. Los vinos con la mayor cantidad de OTA fueron el vino francés **Roche Mazet tinto** con 5.9 µg/Kg, seguido del vino americano **Vendange** con 6.1 µg/Kg y el más elevado fue el vino francés **Bordeaux** con 7.9 µg/Kg. En la figura 29 se presenta de manera gráfica el contenido de ocratoxina A en los vinos, previamente descrito, la línea verde marca el límite permitido por la Comisión Europea de 2 µg/Kg.

 Vinos tintos
Vinos blancos
Vinos rosados

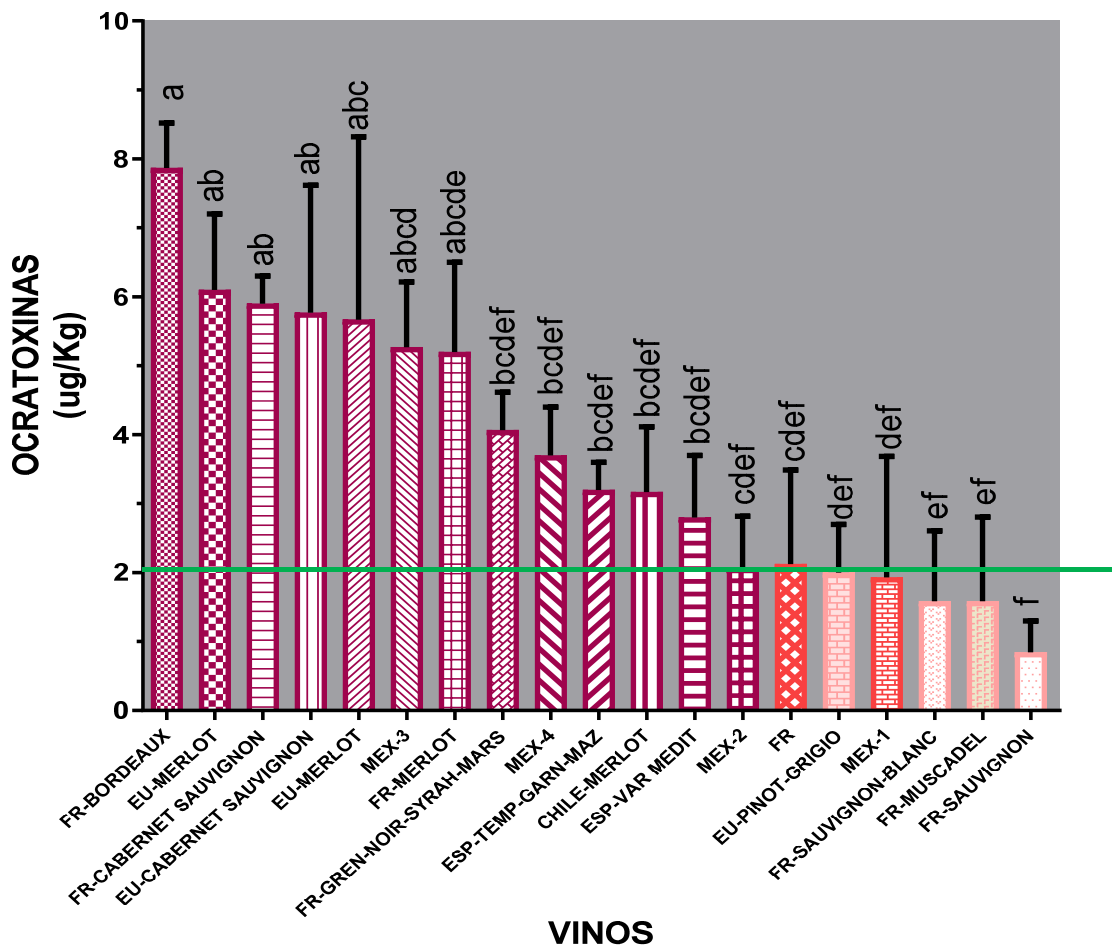


Figura 29. Gráfica del contenido de ocratoxina A en vinos.

Todos vinos blancos y rosados presentaron ocratoxina A en valores menores a los establecidos a la reglamentación europea (2µg/Kg), mientras que 12 de los 13 vinos tintos que fueron evaluados poseían un valor de ocratoxina A mayor al límite. Esta información nos permite confirmar lo expresado por el autor Rousseau (2004) quien declara que la concentración de OTA es menor en vinos blancos y rosados que en los vinos tintos.

3.2 Discusión

Por circunstancias adversas no se logró realizar la identificación de transgénicos en los vinos, sin embargo, con la estandarización de la extracción del ADN del vino puede funcionar como base para futuras investigaciones de identificación de organismos genéticamente modificados en vinos tintos blancos y rosados.

3.3 Conclusiones

Se concluye que se logró establecer una metodología para la extracción del ADN de vino tinto.

Se logró encontrar bibliografía valiosa con información referente a la extracción de ADN de *Vitis vinífera* en vino, se llevaron a cabo varias modificaciones para conseguir un protocolo de extracción realizable bajo las condiciones de laboratorio existentes y se logró extraer ADN de una muestra de vino tinto con una concentración de 30.4 ng/ μ L y una pureza de 0.94.

Conforme a lo establecido se consiguió el diseño de primers para *Vitis vinífera* a partir del gen 9-cis-epoxicarotenoide², se realizó el análisis de 2 muestras de uva de mesa en donde se obtuvo el amplificado esperado de 713pb, se realizó también el análisis de 2 muestras de vino tinto en las cuales no se obtuvo el amplificado esperado.

Se concluye que todos los vinos presentaron ocratoxina A, del total de vinos evaluados, únicamente el 37% está dentro de los límites establecidos por la legislación europea con un contenido de ocratoxina A menor o cercano a los 2 μ g/kg, el otro 63% de los vinos posee valores de entre 2.8 hasta 7.9 μ g/kg en promedio. El 100% de vinos blancos y rosados contienen OTA en valores menores o cercanos al límite. Se observó que los vinos tintos contienen una mayor concentración de OTA que vinos blancos y rosados.

A pesar de que existe poca evidencia a nivel mundial sobre la existencia de esta toxina en los vinos, este trabajo puede funcionar como referencia para resaltar la importancia de su identificación, esto sobre todo considerando que se encontró en mayor proporción al valor recomendado en una gran cantidad de vinos.

3.4 Recomendaciones

A pesar de que los primers diseñados funcionaron adecuadamente al utilizarlos con uva verde y uva roja es importante continuar con la investigación para verificar la especificidad de éstos, para así tener mayor seguridad en caso de evaluar la presencia de OGM en los vinos.

Es recomendable mejorar el procedimiento de extracción de ADN de vinos, pues al realizar la electroforesis en las muestras de esta investigación no se presentó el amplificado en la zona deseada, este hecho se le atribuye a una posible contaminación por fenoles por lo que se recomienda mejorar el método de extracción para así lograr eliminar estos compuestos.

Respecto a las ocratoxina A, se recomienda realizar un análisis más profundo de los vinos elaborados en México, esto para destacar la importancia de la regulación de esta toxina a nivel nacional considerando los daños a la salud que implica el consumo de esta toxina en cantidades elevadas.

Bibliografía

- Alba Aguayo D. R., y Rueda, A. (2013). Problema bioquímico: Determinación del ciclo umbral y la eficiencia para la PCR cuantitativa en tiempo real. REB Revista de educación bioquímica. Volumen (32). 36-39. Disponible en: [<http://www.scielo.org.mx/pdf/reb/v32n1/v32n1a6.pdf>]
- Anderson, L. (2011). Transgénicos. Ingeniería genética, alimentos y nuestro medio ambiente. Madrid, España: Ed. Gaia, Proyecto 2050.
- Bennett, J. W. (1987). Mycotoxins, mycotoxicoses, mycotoxicology and mycopathologia. Mycopathologia. 100(1), 3-5.
- Borel, B. (1 de enero de 2017). *Can Science Save Our Favorite Wines?* Wine Enthusiast Magazine. Disponible en: [<https://www.winemag.com/2017/01/01/can-science-save-our-favorite-wines/>]
- Burçak, I., Hatice Kalkan, Y., Ahmet, A. (2014) Evaluation of methods for DNA extraction from must and wine. *Institute of Brewing & Distilling. Volumen (120)*. 238-243. Disponible en: [<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1002/jib.129>]
- Carbonari y Silvia (2013) La cultura de la vid y el vino: la vitivinicultura hace Escuela. XIV Jornadas Interescuelas/Departamentos de Historia. Departamento de Historia de la Facultad de Filosofía y Letras. Universidad Nacional de Cuyo, Mendoza.
- CE (European Commission) (2006b). *Commission Regulation (EC) No. 401/2006 of 23 February 2006 laying down the methods of sampling and analysis for the official control of the levels of mycotoxins in foodstuffs. Off J Eur Union, L70*, 12–34. Disponible en: [<https://eur-lex.europa.eu/legal-content/ES/TXT/PDF/?uri=CELEX:02006R1881-20140701&from=EN>]
- CEDRSSA. (2019). Investigación interna. Regulaciones para la importación y el etiquetado de Organismos Genéticamente Modificados. Disponible en : [http://www.cedrssa.gob.mx/files/b/13/11OGM_etiquetado.pdf]
- Comisión del Codex Alimentarius. (1999). PROGRAMA CONJUNTO FAO/OMS SOBRE NORMAS ALIMENTARIAS. COMITÉ DEL CODEX SOBRE ADITIVOS ALIMENTARIOS Y CONTAMINANTES. DOCUMENTO DE POSICIÓN SOBRE LA OCRATOXINA A CX/FAC 99/14. Suecia.
- Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios (COFEPRIS). (31 de diciembre de 2017). *Organismos Genéticamente Modificados*. Gobierno de México Disponible en: [<https://www.gob.mx/cofepris/acciones-y-programas/organismos-geneticamente-modificados>]

- CONACYT (1 de marzo de 2018) *Comparativo entre ensayos de productos autorizados y permisos*. Gobierno de México. Disponible en: [\[https://www.conacyt.gob.mx/cibiogem/index.php/comparativo-ensayos-y-permisos\]](https://www.conacyt.gob.mx/cibiogem/index.php/comparativo-ensayos-y-permisos)
- Consejo Mexicano Vitivinícola (CMV). (2020). *Línea del tiempo*. Disponible en: [\[https://uvayvino.org.mx/linea-de-tiempo/\]](https://uvayvino.org.mx/linea-de-tiempo/)
- Domingo, C., Giralt, Ll., Catalina, O., Barrios, G., y Reyes, J. (2005). Guía básica de buenas prácticas vitícolas para minimizar la presencia de ocratoxina A en los productos vitivinícolas. *ACE Revista de Enología*. Volumen (59),1697-4123. Disponible en: [\[http://www.acenologia.com/enfoques71_02.htm\]](http://www.acenologia.com/enfoques71_02.htm)
- El Real Jardín Botánico de Madrid (1999). *Vitis vinifera*. Ciencia, Colección y Escuela. Disponible en: [\[Real Jardín Botánico de Madrid - Página principal \(csic.es\)\]](http://www.csic.es/real-jardin-botanico-de-madrid/)
- Food and Agriculture Organization (FAO) (2001). *Los organismos modificados genéticamente, los consumidores, la inocuidad de los alimentos y el medio ambiente*. Roma. Disponible en: [\[http://www.fao.org/3/x9602s/x9602s00.htm#TopOfPage\]](http://www.fao.org/3/x9602s/x9602s00.htm#TopOfPage)
- Food and Agriculture Organization (FAO) (2021). *Food safety and quality: Micotoxinas* Disponible en: [\[http://www.fao.org/food/food-safety-quality/a-z-index/mycotoxins/es/\]](http://www.fao.org/food/food-safety-quality/a-z-index/mycotoxins/es/)
- Food and Agriculture Organization (FAO). (2007) CODE OF PRACTICE FOR THE PREVENTION AND REDUCTION OF OCHRATOXIN A CONTAMINATION IN WINE CAC/RCP 63-2007. Disponible en: [\[http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/sh-proxy/en/?lnk=1&url=https%253A%252F%252Fworkspace.fao.org%252Fsites%252Fcodex%252Fstandards%252FCXC%2B63-2007%252FCXP_063e.pdf\]](http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/sh-proxy/en/?lnk=1&url=https%253A%252F%252Fworkspace.fao.org%252Fsites%252Fcodex%252Fstandards%252FCXC%2B63-2007%252FCXP_063e.pdf)
- Food and Drug Administration (FDA). (29 de septiembre 2020). *Feed your mind*. Agricultural Biotechnology. Disponible en: [\[https://www.fda.gov/food/consumers/agricultural-biotechnology\]](https://www.fda.gov/food/consumers/agricultural-biotechnology).
- Hidalgo, J. (2011) Tratado de enología. Mundi Prensa. España.
- Hidalgo, J. (2018). Tratado de Enología. Volumen I y II. Mundi Prensa. España.
- Hocking, A. D. (2006). 17 - Aspergillus and related teleomorphs. *In Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition*. 451-487 Disponible en: [\[http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9781855739666500171\]](http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9781855739666500171)
- Hussein, H., S., y Brasel, J. M. (2001). Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animal. *Toxicology* Volumen (167)2. 101-131. Disponible en: [\[http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0300483X01004711\]](http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0300483X01004711)

- INRA. (24 de enero 2018) *L'Inra obtient l'inscription au catalogue de quatre variétés sélectionnées pour la viticulture durable*. Disponible en: [<https://www.inrae.fr/actualites/inra-obtient-linscription-au-catalogue-quatre-varietes-selectionnees-viticulture-durable>]
- Instituto Nacional de Economía Social (INAES). (28 de Agosto 2018) *Historia de la Viticultura*. Disponible en: [<https://www.gob.mx/inaes/es/articulos/historia-de-la-viticultura?idiom=es>]
- International Agency for Research on Cancer (IARC). (2012) *Improving Public Health Through Mycotoxin Control*. Lyon, France. Disponible en: [<https://publications.iarc.fr/Book-And-Report-Series/Iarc-Scientific-Publications/Improving-Public-Health-Through-Mycotoxin-Control-2012>]
- International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications (ISAAA). (2019). *Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2019. ISAAA Brief No. 55. ISAAA*. Disponible en: [<https://www.isaaa.org/resources/publications/briefs/55/executivesummary/default.asp>]
- Leguizamón Guerrero J. E., Vela Rojas A. F., Arias Cortés M. M., y Cifuentes Fernández L. F. (2018). Panorama general de los organismos genéticamente modificados en Colombia y en el mundo: Capacidad nacional de detección. *Revista Colombiana de Biotecnología. Volumen (20)*. 101-116. Disponible en: [<http://www.scielo.org.co/pdf/biote/v20n2/0123-3475-biote-20-02-101.pdf>]
- Martínez-Flores K., Salazar-Anzures, Á.T., Fernández-Torres, J., Pineda, C., Aguilar-González, C. A., y López Reyes, A. (2017). Western blot: una herramienta en el área biomédica. *Investigación en Discapacidad. Volumen (6)*. 128-137. Disponible en: [<https://www.medigraphic.com/pdfs/invd/ir-2017/ir173e.pdf>]
- McKee, T., & McKee, J. R. (2009). *Bioquímica: Las bases moleculares de la vida (4a. ed.)*. ProQuest Ebook Central <https://ebookcentral.proquest.com>
- Mitchell, N. J., Chen, C., Palumbo, J. D., Bianchini, A., Capozzo, J., y Stratt, J. (2017). A risk assessment of dietary Ochratoxin a in the United States. *Food and Chemical Toxicology, Volumen (100)*. 265-273. Disponible en: [<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0278691516304987?via%3Dihub>]
- Moreiras, O., Carbajal, A., Cuadrado, C. y Cabrera, F. (2011). *Tablas de composición de alimentos*. Ediciones Pirámide.
- Negrón, M. (2009). *Microbiología Estomatológica: Fundamentos y guía práctica*. Buenos Aires Argentina. Médica Panamericana.
- Nieto Godínez, Y. (2010). *Manual del vino mexicano: Su historia características y proceso tecnológico*. [Tesis de licenciatura, Universidad Nacional Autónoma de México]. <http://132.248.9.195/ptb2011/agosto/0672039/Index.html>

- NOM-199-SCFI-2017. (2017) *Norma Oficial Mexicana Bebidas alcohólicas-Denominación, especificaciones fisicoquímicas, información comercial y métodos de prueba*. Diario Oficial de la Federación.
- Núñez Cárdenas, L. (2011). Detección y ensayo de los organismos genéticamente modificados. *Revista Cubana de Alimentación y Nutrición. Volumen (2)*. 293-302. Disponible en: [\[https://www.medigraphic.com/pdfs/revcubalnut/can-2011/can112j.pdf\]](https://www.medigraphic.com/pdfs/revcubalnut/can-2011/can112j.pdf)
- Organización Internacional de la Viña y el Vino (OIV). (2018). “*Definición de los productos de la vid por ficha código*”, Francia. Disponible en: [\[http://www.oiv.int/es/normas-y-documentos-tecnicos/definicion-de-productos-y-etiquetado/definicion-de-los-productos-de-la-vid-por-ficha-codigo\]](http://www.oiv.int/es/normas-y-documentos-tecnicos/definicion-de-productos-y-etiquetado/definicion-de-los-productos-de-la-vid-por-ficha-codigo)
- Organización Internacional de la Viña y el Vino (OIV). (2019).” *Código Internacional de prácticas Enológicas; Definiciones*”, Francia. Disponible en: [\[http://www.oiv.int/es/normas-y-documentos-tecnicos/practicas-enologicas/codigo-internacional-de-practicas-enologicas\]](http://www.oiv.int/es/normas-y-documentos-tecnicos/practicas-enologicas/codigo-internacional-de-practicas-enologicas).
- Organización Mundial de la Salud (OMS). (1 de mayo 2014). *Food, Genetically modified*. https://www.who.int/health-topics/food-genetically-modified#tab=tab_2
- Organización Mundial de la Salud (OMS). (9 de mayo de 2018). *Micotoxinas: Datos y cifras*. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/mycotoxins>
- Paoletti, C., Flamm, E., Yan, W., Meek, S., Renckens, S., Fellous, M. y Kuiper, H. (2008). GMO risk assessment around the world: Some examples. *Trends in Food Science & Technology. Volumen (19)*. S70-S78. Disponible en: [\[http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0924224408002239\]](http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0924224408002239)
- Peñín, J. (2008). *Historia del vino*. Editorial Espasa.
- Peñín, J. (2009). *Guía Peñín de los vinos de España 2009*. Peñín Ediciones.
- Pérez de Castro, A. M. (2008). *Reacción en cadena de la polimerasa (Polymerase Chain Reaction, PCR)*. Universidad Politécnica de Valencia. Valencia, España.
- Podzorski, R., Loeffelholz, R., & Haiden, R. (2006). *Detection and Characterization of Molecular Amplification Products: Agarose Gel Electrophoresis, Southern Blot Hybridation, Restriction Enzyme Digest Analysis, and Enzyme-Linked Immunoassay*. Springer, 243-263.
- Querci, M., Jermini, M., & Van den Eede, G., (2007). *Análisis de la Presencia de Organismos Genéticamente Modificados en Muestras de Alimentos. Manual del Participante. Comunidades Europeas*. Disponible en [\[https://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/capacitybuilding/manuals/Manual%20ES/User%20Manual%20ES%20full.pdf\]](https://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/capacitybuilding/manuals/Manual%20ES/User%20Manual%20ES%20full.pdf)

- Ravelo, A., Rubio, C., Gutiérrez, A.J., Hardisson, A. (2011). La ocratoxina A en alimentos de consumo humano: revisión. *Nutrición Hospitalaria*, Volumen (26). 1215-1226. Disponible en: [\[http://scielo.isciii.es/pdf/nh/v26n6/04_revision_01.pdf\]](http://scielo.isciii.es/pdf/nh/v26n6/04_revision_01.pdf)
- Ríos Yuil, J. M., Mercadillo Pérez, P., Yuil de Ríos, E. y Ríos Castro, M., (2012) ELISA y sus aplicaciones en dermatología. *Dermatología Cosmética, Médica y Quirúrgica (DCMQ)*. Volumen (10). 212-222. Disponible en: [\[https://www.medigraphic.com/pdfs/cosmetica/dcm-2012/dcm123j.pdf\]](https://www.medigraphic.com/pdfs/cosmetica/dcm-2012/dcm123j.pdf)
- Roca, P., Oliver, J., y Rodríguez, A. M. (2003). *Bioquímica: técnicas y métodos*. Madrid: Hélice.
- Rousseau, J. (2004). Ocratoxina A en los vinos: Estado de los conocimientos. Las micotoxinas y el vino. *Wine Internet Technical Journal*. Disponible en: [\[https://www.infowine.com/intranet/libretti/libretto827-01-1.pdf\]](https://www.infowine.com/intranet/libretti/libretto827-01-1.pdf)
- Ruiz Quiroz, J., R. (2016). Las micotoxinas y salud. *Revista de la Sociedad Química del Perú*, 82(4). 387-388. Disponible en: [\[http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1810-634X2016000400001&lng=es&tlng=es\]](http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1810-634X2016000400001&lng=es&tlng=es)
- SAGARPA/SIAP. (2018) Atlas Agroalimentario 2012-2018 (2018) Ciudad de México. México.
- Sambrook, J.F., Russell, D. (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Volumen (3). Disponible en: [\[https://www.researchgate.net/publication/200037138_Molecular_Cloning_A_Laboratory_Manual_3-Volume_Set\]](https://www.researchgate.net/publication/200037138_Molecular_Cloning_A_Laboratory_Manual_3-Volume_Set)
- Savazzini, F., y Martinelli, L. (2005). DNA analysis in wines: Development of methods for enhanced extraction and real-time polymerase chain reaction quantification. *Analytica Chimica Acta*. Volumen (563). 274-282. Disponible en: [\[https://www.researchgate.net/publication/223822851_DNA_analysis_in_wines_Development_of_methods_for_enhanced_extraction_and_real-time_polymerase_chain_reaction_quantification\]](https://www.researchgate.net/publication/223822851_DNA_analysis_in_wines_Development_of_methods_for_enhanced_extraction_and_real-time_polymerase_chain_reaction_quantification)
- Tamay de Dios, L., Ibarra, C., Velasquillo, C. (2013) Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. *Medigraphic*. Volumen (2). 70-78. Disponible en: [\[https://www.medigraphic.com/cgi-bin/new/resumen.cgi?IDARTICULO=44427\]](https://www.medigraphic.com/cgi-bin/new/resumen.cgi?IDARTICULO=44427)
- Thermo Fisher Scientific. (2017). 1 Kb Plus DNA Ladder. Product Information Sheet. Disponible en: https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https%3A%2F%2Fassets.thermofisher.com%2FTFS-Assets%2FLSG%2Fmanuals%2F1Kb_Plus_DNA_ladder_man.pdf&title=UHJvZHVjdCBTaGVldDsgMSBLYiBQbHVzIEROQSBMYWRkZXI=
- Thermo Scientific. (2016) *Nanodrop One. Guía del Usuario*. Disponible en: [\[http://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/3091-NanoDrop-One-User-Guide-v1.3-sw-SPANISH.pdf\]](http://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/3091-NanoDrop-One-User-Guide-v1.3-sw-SPANISH.pdf)

- Torovic, L., Lakatos, I., Majkic, T., y Beara, I. (2020) Risk to public health related to the presence of ochratoxin A in wines from Fruška Gora. *Food Science and Technology. Volumen* (129) 109537. [<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109537>]
- U.S. Department of Agriculture. (2020). *List of Bioengineered Foods*. Disponible en: [<https://www.ams.usda.gov/rules-regulations/be/bioengineered-foods-list>]
- U.S. Department of Agriculture. (2021). *Be Disclosure*. Disponible en: [<https://www.ams.usda.gov/rules-regulations/be#>]
- Vázquez, C., González-Jaén, M. T., Gil Serna, J., Arias, M., Cruz, A., García-Rubio, R. y Patiño, B. (2014). Hongos productores de Micotoxinas. *Detección y control. Departamentos de Microbiología III y Genética. Universidad Complutense de Madrid. Volumen* (57) Disponible en: [https://www.semicrobiologia.org/storage/secciones/publicaciones/semaforo/57/articulos/21_Patiño.pdf]
- Vicam (1999) Micotoxin testing system. Ochratest Somerville, M. A. USA.
- Vita Di Stefano. (2019). Occurrence & Risk of OTA in Food and Feed. *Encyclopedia of Food Chemistry*. 420-423. Disponible en: [<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780081005965218039>]
- Vivier, M., & Pretorius, I. (2002). Genetically tailored grapevines for the wine industry. *Trends in biotechnology. Volumen* (20). 472-478. Disponible en: [https://www.researchgate.net/publication/11051160_Genetically_tailoredgrapevines_for_the_wine_industry]
- World Wine Now. (2019) Historia del vino en México. Disponible en: [<https://www.worldwinenow.com/web/wp-content/uploads/2019/01/Antecedentes-e-historia-el-vino-en-Mexico.pdf>]

Anexos

Anexo 1. Diseño de primers

Para llevar a cabo el diseño de primers para la identificación de la *Vitis vinífera* se utilizaron programas bioinformáticos, el proceso que se siguió fue el siguiente:

1. Se ingresó a la página del Nacional Center of Biotechnology Information (NCBI) [<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>] y en el buscador se seleccionó la opción de nucleótidos para el gen 9-cisepoxicarotenoide dioxygenasa2 cuyo número de acceso proporcionado por Savazzini, y Martinelli (2005) es AY337614.



2. El código de acceso de GenBank de este gen proporcionado por la NCBI se introdujo en la página de la herramienta PrimerQuest Tool <https://www.idtdna.com/primerquest/home/index> en la sección “Download sequence(s) using Genbank or Accession ID”.

PrimerQuest Tool

3. Posteriormente se procedió a generar los primers oprimiendo el botón “PCR 2 Primers”.



4. Después de un breve tiempo de espera se abrió una nueva ventana con diferentes pares de primers que pueden ser utilizados para la experimentación requerida.

Set 3 ACC# AY337614.1

Amplicon Length: 757
View Assay Details

	Start	Stop	Length	Tm	GC%
Forward	159	181	22	62	50
Reverse	894	916	22	62	50

Set 4 ACC# AY337614.1

Amplicon Length: 241
View Assay Details

	Start	Stop	Length	Tm	GC%
Forward	5	25	20	62	50
Reverse	224	246	22	62	50

Set 5 ACC# AY337614.1

Amplicon Length: 713
View Assay Details

	Start	Stop	Length	Tm	GC%
Forward	215	238	23	62	47.8
Reverse	907	928	21	62	47.6

5. Para la selección de los primers adecuados se tomaron en cuenta diversos parámetros, tales como: que existiera una proporción de Guanina y Citosina de un 50%, que ambos primers tanto frontal como reverso tuvieran la misma longitud, y que su Tm no difiriera en más de 2 grados.

Set 5 ACC# AY337614.1

Amplicon Length: 713
View Assay Details

	Start	Stop	Length	Tm	GC%
Forward	215	238	23	62	47.8
Reverse	907	928	21	62	47.6

ADD TO ORDER ▾

6. Una vez seleccionado el primer ideal se procedió a oprimir la opción “View Assay Details” esto para conocer los detalles de la pareja de primers.

PrimerQuest Tool

ASSAY DESIGN RESULTS HELP ABOUT

ACC# AY337614.1 Assay Set 5 Details

BACK TO RESULTS

Parameter Set: General PCR (Primers only)
 Sequence Name: ACC# AY337614.1
 Amplicon Length: 713

	Start	Stop	Length	Tm	GC%
Forward	215	238	23	62	47.8
Reverse	907	928	21	62	47.6

Forward: **CAGGAAGCCCAATAGTAGAAG (Sense)**
 Reverse: **GCTTGATTCGCACCTGGTATG (AntiSense)**

Base	Sequence
1	TGAATTAGGCCAAACCCAACTCTCCTTGGCCCAACCATACGCCATTTCTCTGAATTCACAAGGCCCTTGTACTTGTAAATCCAAACCTGGCTTCTTC
101	TACTGCACCCACAGCAACACTACTGTACATGGCCGAGGCCATTCATAAGCTTGGCTCTTCTTCTTCTCTCACTACTTGATTG99GTTCCCTTCA
201	AAGTCCATCCCTT CAGGAAGCCCAATAGTAGAAG AGG9AAAGCCATTCACGTGGCTGCTCTGCAGTCTCAATTCGGTCTCAATACCCAAAGCAACCT
301	TCACCCGAAAGAAATTCACAAAGACACTTCCCTGAAACCCAGATAACTCAGCCACCGCAGTGGAAATTTTTCAGAGAGCAGCG9GCTTGGCTTGG
401	CAGGGCCGAGAGCGCTTGGTCTCACATGAGCGCCACACCTCTTCTAAATCCGCGACCCCGGTTCAAATTCGCGAAATTTGGCTCCCGTGGCG
501	GAGCAACCTGTCATCACTCTCTTCTGTTCCGACCATCCCTGATTGCATGAATGGAGTTTATCTGGAAACCGCCAAACCCACTGTTCCGAGCTG
601	TGGCTGGCAATCACTTCTCGATGGACCGGTATGGTTCACGAGTACCCCTTAATGGCGTTCCGCGAGTACGCTTGGCGTTCAACGAAACACAGAG
701	ATTGGTCAGAGCGAAAGCTGGCCCGCGGTGTTCCCAAGCCATAGGCGAGTCCATGGTCACTCCGCGATCGCTGGCTCTCTCTCTATAGCC
801	CGAGGCTATTTGGCTCGTGCATCAAAATCACGGCACTGGAGTGGTAACGCTGGCTTGGTGTACTTCAATCAGAGGCTCTTGGCCATGTGGAAAGATG
901	ACCTCC CATACCAAGTGGAAACAAG CCCTCCGCGACCTCGAGACTGTGGCGATAGCATTCCACAAGCAGCTCCGCTCCACCATGATGGCTCACCC
1001	GAAAGTCGACCCAGCTCCGCGAACTCTTGGCTAAAGCTACGAGCTTGTTCAGAGCCATATCTCAAGTCTTCCACTTCTCCCGAGAGGCCACAG
1101	TCTCCGAGCTTGAATCCCAATTCAGGCCCCACATGATGCACGACTTGGCCATCACAGAGAAATAGGTAGTGAATCCAGATCAGCAAGTGGTTTTAA
1201	AACTTCAAGAAATGATCACCAGAGGTTCCCGGTTATCTACCAAAAAAAGAAATCTCGGTTTGAATTCGCGAAATGCTCAAAACCGCTCTGA
1301	TATCATTGGGTGGAGTCAACCAACCTCTGCTTCCACCTTGGAAATGCTTGGAGGAGCCGAGACCAACGAAATGGTGGTGAATGGATCATGCATG
1401	AGCCCGCGGACTCCATTTTAAACGAATGGAGGAGAAATTTACAGAGGCTGCTATCAGAGATCAGGCTCAATTTGAAACCGGTGGTCCACTGGCCGCC
1501	CCATAGTTCCGCGCTCGAGCAAGTGAACCTGGAAAGCAGCATGGTGGATCGAACCCGACTCGGACGAAAAACCAATACGCTATCTCCGCTTGGCGA
1601	GCCATGGCCAAAGGTTTCGGGTTTTGCCAAGTGGACCTGTCCACGGGAGATGTTCCAGAAATCAAGTACGGCGACCAAAAGGTACGGCGGGGAACCATC

7. A un lado de la secuencia de primer frontal, se encuentran dos opciones “Hairpin” y “Blast”, se oprime en la opción de Blast, que abre una nueva ventana.

8. En la nueva ventana se selecciona la opción de “Mostrar resultados en una nueva ventana”, en seguida se oprime el botón de “Blast”. En la nueva ventana se verificó que tanto la cobertura como la identidad tuvieron un valor de 100%, ya que esto indica que es un primer específico para la especie.

Descriptions		Graphic Summary	Alignments	Taxonomy				
Sequences producing significant alignments								
<input checked="" type="checkbox"/> select all 100 sequences selected Download New Select columns Show 100 								
GenBank Graphics Distance tree of results New MSA Viewer								
Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per Ident	Acc. Len	Accession
<input checked="" type="checkbox"/> PREDICTED: <i>Vitis riparia</i> 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase NCED2_chloroplast... (LOC...	Vitis riparia	46.1	46.1	100%	0.016	100.00%	2367	gii1847841648 XM_034844706.1
<input checked="" type="checkbox"/> <i>Vitis vinifera</i> contig VV78X112955.9 whole genome shotgun sequence	Vitis vinifera	46.1	46.1	100%	0.016	100.00%	22426	gii147776989 AM457017.2
<input checked="" type="checkbox"/> <i>Vitis vinifera</i> 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase 2 (NCED2)_mRNA	Vitis vinifera	46.1	46.1	100%	0.016	100.00%	2297	gii526118127 NM_001281271.1
<input checked="" type="checkbox"/> <i>Coregonus</i> sp. 'balchen' genome assembly_chromosome_3	Coregonus sp...	38.2	38.2	100%	4.0	95.65%	42764345	gii1820178718 LR778255.1
<input checked="" type="checkbox"/> <i>Polaribacter</i> sp. KT_15 genome assembly_chromosome_1	Polaribacter s...	38.2	38.2	82%	4.0	100.00%	3221776	gii1109655499 LT670850.1
<input checked="" type="checkbox"/> <i>Salmo trutta</i> genome assembly_chromosome_4	Salmo trutta	38.2	70.4	82%	4.0	100.00%	73168960	gii1614056718 LR584420.1
<input checked="" type="checkbox"/> <i>Bos mutus</i> isolate yakQH1 chromosome_13	Bos mutus	36.2	134	100%	16	100.00%	75983851	gii1353793171 ICP027081.1
<input checked="" type="checkbox"/> PREDICTED: <i>Beta vulgaris</i> subsp. <i>vulgaris</i> serine carboxypeptidase-like 10 (LOC104906...	Beta vulgaris ...	36.2	36.2	78%	16	100.00%	1227	gii731364492 XM_010695700.1
<input checked="" type="checkbox"/> PREDICTED: <i>Beta vulgaris</i> subsp. <i>vulgaris</i> serine carboxypeptidase-like 10 (LOC104906...	Beta vulgaris ...	36.2	36.2	78%	16	100.00%	1694	gii131364490 XM_010695699.1
<input checked="" type="checkbox"/> <i>Pan troglodytes</i> chromosome X clone PTB-151L19 map human ortholog p11.3_complete...	Pan troglodytes	36.2	36.2	78%	16	100.00%	180551	gii117935096 AC186082.2
<input checked="" type="checkbox"/> Human DNA sequence from clone RP1-262B17 on chromosome Xp11.23-11.4_complete...	Homo sapiens	36.2	36.2	78%	16	100.00%	66736	gii2695811 AL008709.1
<input checked="" type="checkbox"/> <i>Homo sapiens</i> monoamine oxidase B (MAOB) RefSeqGene on chromosome X	Homo sapiens	36.2	36.2	78%	16	100.00%	122866	gii1016841222 NG_008723.2
<input checked="" type="checkbox"/> <i>Euproctis similis</i> genome assembly_chromosome_Z	Euproctis similis	36.2	36.2	78%	16	100.00%	26350309	gii1963875621 LR990107.1
<input checked="" type="checkbox"/> <i>Pan troglodytes</i> BAC clone CH251-340A1 from chromosome x_complete sequence	Pan troglodytes	36.2	36.2	78%	16	100.00%	173068	gii194272324 AC203666.3
<input checked="" type="checkbox"/> <i>Hymenobacter</i> sp. BRD128 chromosome_complete genome	Hymenobacter ...	34.2	34.2	91%	63	95.24%	4604416	gii1847993467 CP05

9. Se seleccionó el primer adecuado (*Vitis vinifera* 9-cis epoxicarotenoide dioxigenasa 2) para visualizar los detalles de éste, y verificar que cumpla con los criterios deseados.

[Download](#)
[GenBank](#)
[Graphics](#)

Vitis vinifera 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase 2 (NCED2), mRNA

Sequence ID: [NM_001281271.1](#) Length: 2297 Number of Matches: 1

[See 1 more title\(s\)](#)
[See all Identical Proteins \(IPG\)](#)

Range 1: 215 to 237
 [GenBank](#)
[Graphics](#)

[Next Match](#)
[Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
46.1 bits(23)	0.016	23/23(100%)	0/23(0%)	Plus/Plus

```

Query 1  CAGGAAGCCCAATAGTAGAAGAG 23
          |||
Sbjct 215 CAGGAAGCCCAATAGTAGAAGAG 237
  
```

10. Se repitieron los pasos del 7 al 9 pero esta vez para la secuencia del primer reverso, de igual manera, corroborando que cumpliera con los requisitos establecidos.

Standard Nucleotide BLAST

[blastn](#)
[blastp](#)
[blastx](#)
[tblastn](#)
[tblastx](#)

BLASTn programs search nucleotide databases using a nucleotide query. [more...](#)

[Reset page](#)
[Bookmark](#)

Enter Query Sequence

Enter accession number(s), gi(s), or FASTA sequence(s) [Clear](#)

GCTTGATTGCGACCTGGTATG

Query subrange

From:

To:

Or, upload file

[Seleccionar archivo](#) Ningún archivo seleccionado

Job Title

Enter a descriptive title for your BLAST search

Align two or more sequences

Choose Search Set

Database

Standard databases (nr etc.) rRNA/ITS databases Genomic + transcript databases Betacoronavirus

Nucleotide collection (nr/nt)

Organism

Optional

Enter organism name or id—completions will be suggested exclude [Add organism](#)

Enter organism common name, binomial, or tax id. Only 20 top taxa will be shown

Exclude

Optional

Models (XM/XP) Uncultured/environmental sample sequences

Limit to

Optional

Sequences from type material

Entrez Query

Optional

Enter an Entrez query to limit search [View Help](#) [Create custom database](#)

Program Selection

Optimize for

Highly similar sequences (megablast)

More dissimilar sequences (discontiguous megablast)

Somewhat similar sequences (blastn)

Choose a BLAST algorithm

BLAST Search database Nucleotide collection (nr/nt) using Blastn (Optimize for somewhat similar sequences)

Show results in a new window

11. Después de oprimir el botón “Blast” se abrió una nueva ventana con la información referente a la cobertura e identidad de los primers.

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
PREDICTED: <i>Vitis riparia</i> 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase NCED2_chloroplastic (LOC...	<i>Vitis riparia</i>	42.1	42.1	100%	0.17	100.00%	2367	gi 1847841648 XM_034844706.1
<i>Prunus avium</i> 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase 2(NCED2) mRNA, partial cds	<i>Prunus avium</i>	42.1	42.1	100%	0.17	100.00%	740	gi 255031694 FJ560910.1
<i>Vitis vinifera</i> contig VV78X112955.9 whole genome shotgun sequence	<i>Vitis vinifera</i>	42.1	42.1	100%	0.17	100.00%	22426	gi 147776989 AM457017.2
<i>Vitis vinifera</i> 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase 2 (NCED2) mRNA	<i>Vitis vinifera</i>	42.1	42.1	100%	0.17	100.00%	2297	gi 526118127 NM_001281271.1
<i>Lepeophtheirus salmonis</i> strain IoA-00 genome assembly chromosome_2	<i>Lepeophtheirus...</i>	38.2	38.2	90%	2.7	100.00%	39563600	gi 2002691741 HG994581.1
<i>Lepeophtheirus salmonis</i> strain IoA-00 genome assembly chromosome_2	<i>Lepeophtheirus...</i>	38.2	38.2	90%	2.7	100.00%	39563600	gi 1973725303 LR794185.1
<i>Micropterus salmoides</i> nuclear factor 7, brain-like (LOC119886327), mRNA	<i>Micropterus s...</i>	38.2	38.2	90%	2.7	100.00%	2412	gi 1951397539 XM_038696982.1
<i>Macrobrachium nipponense</i> isolate FS-2020 chromosome 48	<i>Macrobrachiu...</i>	38.2	38.2	90%	2.7	100.00%	24093560	gi 1922902530 CP062016.1
<i>Yersinia aleksiciae</i> strain 159 complete genome	<i>Yersinia aleks...</i>	36.2	36.2	85%	11	100.00%	4000307	gi 873253083 CP011975.1
uncultured <i>Sutterella</i> sp. isolate Sutterella canine HQ MAG genome assembly_chromoso...	uncultured <i>Su...</i>	36.2	36.2	85%	11	100.00%	2695037	gi 1997760568 LR994475.1
1_Tps_b3v08	<i>Timema popp...</i>	36.2	36.2	85%	11	100.00%	525	gi 1947635324 OD207766.1
1_Tps_b3v08	<i>Timema popp...</i>	36.2	36.2	85%	11	100.00%	774	gi 1946204412 OD126317.1
1_Tdi_b3v08	<i>Timema doug...</i>	36.2	36.2	85%	11	100.00%	508361	gi 1936881105 OA564330.1
<i>Macrobrachium nipponense</i> isolate FS-2020 chromosome 44	<i>Macrobrachiu...</i>	36.2	207	85%	11	100.00%	52992041	gi 1922900813 CP062010.1
<i>Streptococcus gallolyticus</i> strain FDAARGOS_755 chromosome complete genome	<i>Streptococcu...</i>	34.2	34.2	80%	42	100.00%	2258003	gi 1848624684 CP05

12. Se seleccionó nuevamente el primer adecuado (*Vitis vinifera* 9-cis epoxycarotenoid dioxygenasa 2) y se abrieron los detalles para corroborar la información.

Download GenBank Graphics

Vitis vinifera 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase 2 (NCED2), mRNA

Sequence ID: [NM_001281271.1](#) Length: 2297 Number of Matches: 1

[See 1 more title\(s\)](#) [See all Identical Proteins \(IPG\)](#)

Range 1: 907 to 927 [GenBank](#) [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
42.1 bits(21)	0.17	21/21(100%)	0/21(0%)	Plus/Minus

```

Query 1  GCTTGATTCGCACTTGGTATG 21
          |||
Sbjct 927 GCTTGATTCGCACTTGGTATG 907
  
```