



**FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD  
ESCUELA DE TECNOLOGÍA MÉDICA**

**PRESENCIA DE OCRATOXINA A EN ALIMENTOS Y USO DE BACTERIAS  
ÁCIDO LÁCTICAS COMO MECANISMO DE CONTROL**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO  
DE LICENCIADO EN TECNOLOGÍA MÉDICA**

**AUTORES: GUSTAVO ANTONIO ENCINA TRONCOSO Y DIEGO EDUARDO  
STIGLICH FUENTEALBA**

**PROFESORA GUÍA: T.M. Dra. VERÓNICA CARRASCO SÁNCHEZ**

**TALCA-CHILE  
2021**

## CONSTANCIA

La Dirección del Sistema de Bibliotecas a través de su unidad de procesos técnicos certifica que el autor del siguiente trabajo de titulación ha firmado su autorización para la reproducción en forma total o parcial e ilimitada del mismo.



Talca, 2022



## **DEDICATORIA**

*A nuestros familiares y seres queridos, quienes nos brindaron todo el apoyo para llegar a donde estamos.*

## AGRADECIMIENTOS

*A nuestra profesora guía Doctora Verónica Carrasco Sánchez que nos dio la oportunidad de conocer su admirable línea investigativa y brindarnos apoyo constante resolviendo todas las dudas que nos surgían en el camino de la elaboración de nuestra memoria.*

*A la Universidad de Talca por darnos las competencias y prepararnos para el día de mañana, los conocimientos adquiridos jamás serán olvidados. También por darnos la oportunidad de conocernos y permitirnos establecer grandes lazos de amistad.*

*A nuestros queridos amigos, quienes tuvieron la paciencia de escucharnos hablar apasionadamente sobre lo mucho que amábamos nuestra memoria.*

## ÍNDICE

1. RESUMEN.....	8
2. INTRODUCCIÓN .....	9
3. OBJETIVOS.....	11
4. METODOLOGÍA DE BÚSQUEDA DE LA INFORMACIÓN .....	12
5. MARCO TEÓRICO.....	13
5.1 Micotoxinas .....	13
5.2 Ocratoxina A.....	15
5.2.1 Toxicidad asociada a OTA.....	18
5.2.2 Absorción de OTA en el organismo .....	24
5.2.3 OTA en los alimentos .....	25
5.2.4 Presencia de OTA en alimentos en Chile.....	31
5.3 Control de OTA en alimentos.....	33
5.4 Control de OTA en alimentos a través del uso de BAL .....	35
5.4.1 BAL como adsorbentes de OTA .....	38
5.4.2 BAL como biotransformadores de OTA.....	43
6. CONCLUSIÓN .....	49
7. BIBLIOGRAFÍA.....	50

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Micotoxinas y sus efectos en el organismo humano. ....	14
Tabla 2. Contenidos máximos de OTA establecidos para alimentos. ....	28
Tabla 3. Regulación actual de ocratoxina A en algunos estados miembros de la Unión Europea. ....	30
Tabla 4. Adsorción de OTA con diferentes BAL inactivadas térmicamente. ....	40
Tabla 5: Adsorción de OTA por distintas especies de BAL activas. ....	41
Tabla 6. Efecto del tamaño de inóculo en la biotransformación de OTA. ....	44
Tabla 7. Efecto de temperatura en la biotransformación de OTA.....	45
Tabla 8. Porcentaje de biotransformación de OTA a través de BAL en diferentes pH.....	46

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Fórmula estructural de OTA y de los principales productos de conjugación y degradación.....	16
Figura 2: Representación esquemática de la vía biosintética hipotética de la OTA propuesta por Huff y Hamilton .....	17
Figura 3. Modelo propuesto para la carcinogenicidad de OTA. ....	22
Figura 4. Ingreso de OTA al torrente sanguíneo y su unión con albumina.....	24
Figura 5. Clasificación de las metodologías utilizadas para la remoción de OTA.....	34
Figura 6. Interacciones de OTA con las estructuras de bacterias ácido lácticas. ....	37
Figura 7. Degradación de ocratoxina A por hidrólisis de enlace amida.....	43

## 1. RESUMEN

Las micotoxinas son metabolitos tóxicos producidos por algunas especies de hongos filamentosos y representan una gran problemática para las industrias alimenticias, siendo la ocratoxina A una de las más relevantes por sus efectos toxigénicos en diversos órganos. Esta micotoxina se encuentra contaminando una amplia variedad de alimentos, debido a esto, diferentes organizaciones han generado límites reglamentarios respecto a su contenido en productos de consumo masivo.

Si bien, estrategias físicas y químicas han sido desarrolladas para remover estas sustancias tóxicas de los alimentos, son los métodos biológicos las que se consideran más seguras para la industria, donde los principales microorganismos utilizados son las bacterias ácido lácticas, ya que se ha reportado que presentan propiedades de adsorción y biotransformación sobre ocratoxina A, considerándolas como un método innovador, efectivo e inocuo para la remoción de esta micotoxina.

Por esta razón, esta revisión bibliográfica comprende información recopilada de la literatura respecto a la presencia de ocratoxina A en alimentos, junto el análisis de diversas investigaciones que utilizan bacterias ácido lácticas como alternativa de control en matrices alimentarias.

**Palabras claves:** Micotoxinas, ocratoxina A, bacterias ácido lácticas, adsorción, biotransformación.

## 2. INTRODUCCIÓN

Las micotoxinas son compuestos tóxicos producidos como metabolitos secundarios de la mayoría de los hongos filamentosos, las cuales pueden estar presentes contaminando los alimentos provenientes de cultivos agrícolas en etapas previas y posteriores a las cosechas. Estas toxinas tienen un bajo peso molecular y son de difícil eliminación cuando ya han contaminado los alimentos, generando un gran desafío a la hora de su remoción.

La ocratoxina A es una micotoxina producida por algunas especies pertenecientes a los géneros *Aspergillus* y *Penicillium*. Se encuentra en cereales, frutos secos, vino, cerveza, leche, granos de café, entre otros. Siendo una de las micotoxinas más relevantes debido a su potencial toxicidad, ya que su ingesta habitual en productos contaminados causa acumulación en tejidos, pudiendo generar diversas consecuencias negativas al organismo, entre ellas neurotoxicidad, nefrotoxicidad e inclusive cáncer.

Actualmente existen varios métodos de remoción y/o eliminación de ocratoxina A, tanto físicos, químicos como biológicos, siendo estos últimos los más apropiados para productos de consumo alimenticio. El uso de microorganismos, como las bacterias ácido lácticas, se ha propuesto como una de las mejores opciones, dado que son seguras y eficaces, presentando dos principales mecanismos de descontaminación: la adsorción y la biotransformación.

La propiedad de adsorción de las bacterias ácido lácticas se relaciona con la morfología de su pared, por lo cual, se pueden encontrar diferencias entre distintas especies y las condiciones que se encuentra (vivas o muertas). Mientras que los procesos de biotransformación se basan en las propiedades proteolíticas de las bacterias, disminuyendo las concentraciones de ocratoxina A, a través de la hidrólisis, en compuestos menos tóxicos.

Ambos procesos han demostrado ser exitosos a la hora de remover micotoxinas desde distintas matrices utilizando diferentes especies de bacterias ácido lácticas. Por esta razón, esta revisión tiene por objetivo recopilar información de distintas fuentes, y comparar

los estudios que han utilizado bacterias ácido lácticas en la remoción de la micotoxina ocratoxina A desde matrices líquidas.

### **3. OBJETIVOS**

#### **Objetivo general:**

1. Revisar literatura sobre la presencia de ocratoxina A en alimentos y analizar los trabajos investigativos que utilizan bacterias ácido lácticas como alternativas de control.

#### **Objetivos específicos:**

1. Revisar literatura científica sobre la presencia de OTA en alimentos.
2. Revisar y analizar la toxicidad asociada a OTA.
3. Revisar y Analizar los distintos estudios sobre adsorción y biotransformación de ocratoxina A por bacterias ácido lácticas.

#### **4. METODOLOGÍA DE BÚSQUEDA Y ORGANIZACIÓN DE LA INFORMACIÓN**

En la elaboración de esta revisión bibliográfica, se llevó cabo la búsqueda de información en base de datos, principalmente de *Web of Science*, y en menor frecuencia de *PubMed* y *Scielo*. Las búsquedas se enfocaron en los términos “Mycotoxins”, “Food”, “Toxicity”, “Ochratoxin”, “OTA”, “Lactic Acid Bacteria”, “LAB”, “Adsorption”, “Biodegradation”. En las referencias bibliográficas utilizadas para nuestro tema, priorizamos la búsqueda dentro los últimos 7 años, con el propósito de obtener datos actualizados sobre la revisión. Finalmente se recopiló y organizó la información obtenida de los temas, desde lo más general a lo más específico en cada punto, enfocado en el cumplimiento de los objetivos planteados.

## 5. MARCO TEÓRICO

### 5.1 Micotoxinas

Las micotoxinas son compuestos tóxicos de bajo peso molecular producidos de forma natural como metabolitos secundarios de varias especies de hongos filamentosos (Tabla 1). Los principales géneros productores de estos metabolitos corresponden a *Fusarium*, *Aspergillus* y *Penicillium*(1). Los cuales, a pesar de colonizar los productos agrícolas en etapas previas o posteriores de sus cosechas, la presencia de sus micotoxinas puede encontrarse en los productos finales, debido principalmente a su estabilidad química, térmica y física, llegando a diferentes matrices, resistiendo a la mayoría de los procesos de la industria alimentaria. Siendo los principales alimentos contaminados los cereales, leguminosas, frutas, semillas, nueces, maíz, arroz, aceites vegetales crudos, granos de cacao, alimentos para animales y productos de ganadería(2, 3).

Actualmente no se sabe con certeza las funciones específicas que representa la síntesis y liberación de micotoxinas por estos diferentes hongos y sus interacciones con otros organismos y su ambiente. Aunque existen evidencias registradas que las micotoxinas actúan como señales químicas entre especies, como repelente de insectos, factores de virulencia en enfermedades de las plantas o inhibidores de la detección del *quórum sensing*(4).

Las micotoxinas en concentraciones trazas pueden ser nocivas para mamíferos, incluyendo al ser humano(5). Cada micotoxina, de manera individual, actúa de forma específica, por lo que afectan de manera nociva distintos órganos o partes del organismo, ya que pueden inhibir el sistema inmunitario y tener efectos adversos para la salud (teratogenicidad, inhibición del desarrollo y de la reproducción de mamíferos)(6). (Tabla 1). Inclusive está comprobado que la exposición continua a largo plazo, en bajas concentraciones, contribuye al desarrollo de cáncer en distintos órganos(2).

**Tabla 1.** Micotoxinas y sus efectos en el organismo humano.

<b>Micotoxina</b>	<b>Hongos productores</b>	<b>Alimentos donde puede encontrarse</b>	<b>Efectos en el organismo</b>
<b>Ocratoxina A</b>	<i>Aspergillus ochraceus</i> <i>Aspergillus niger</i> <i>Aspergillus carbonarius</i> <i>Penicillium verrucosum</i> <i>Penicillium viridicatum</i>	Cebada, trigo, maíz, cereales, frutos secos de la vid, vino, uvas, café, cacao, queso, piensos	Carcinogenicidad Hepatotoxicidad Inmunotoxicidad Nefrotoxicidad Teratogenicidad Neurotoxicidad Estrogenicidad
<b>Aflatoxina</b>	<i>Aspergillus flavus</i> <i>Aspergillus parasiticus</i> <i>Aspergillus ochraceus</i> <i>Aspergillus carbonarius</i> <i>Aspergillus niger</i>	Maíz, maní, trigo, arroz, sorgo, pistacho, nueces, almendras, avellanas, semillas de algodón, especias (comino, pimienta negra, vainas de chile / polvo), frutos secos (higos, crianza, grosellas, pasas, ciruelas, dátiles, albaricoques), cereales, soja, cacao, leche, productos lácteos, carne, piensos	Carcinogenicidad Hepatotoxicidad Inmunotoxicidad Teratogenicidad
<b>Fumonisina</b>	<i>Fusarium verticillioides</i> <i>Fusarium proliferatum</i>	Productos de maíz, sorgo, espárragos, piensos	Carcinogenicidad Hepatotoxicidad Inmunotoxicidad Nefrotoxicidad Neurotoxicidad

Tomado y adaptado de Mavrommatis, A y cols. (2021)(7) y Buszewka-Forajta. M y cols. (2020)(2).

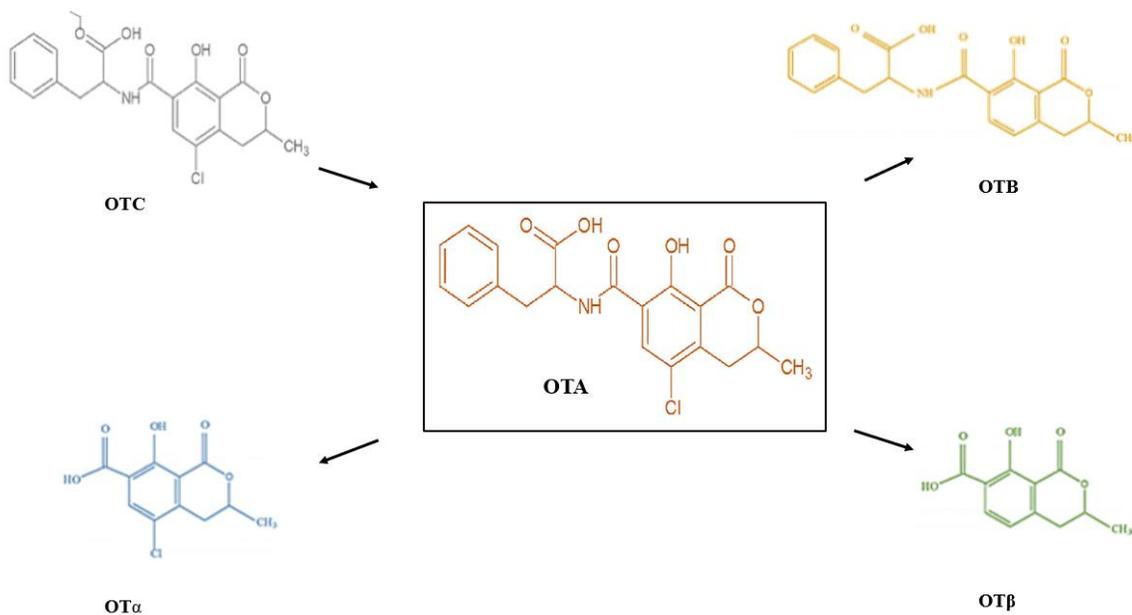
Actualmente se han identificado más de 500 micotoxinas, siendo una de las más significativas, desde un punto de salud pública, la ocratoxina A (OTA) debido a la potencial amenaza por sus efectos tóxicos y alta prevalencia en los productos agroalimentarios(8).

## 5.2 Ocratoxina A

OTA (Figura 1), es generada por algunas especies de los géneros *Penicillium* y *Aspergillus* (Tabla 1), se encuentra principalmente contaminando cereales, granos de café, granos de cacao, uvas, pasas, vino, higos, carne de cerdo y especias(9).

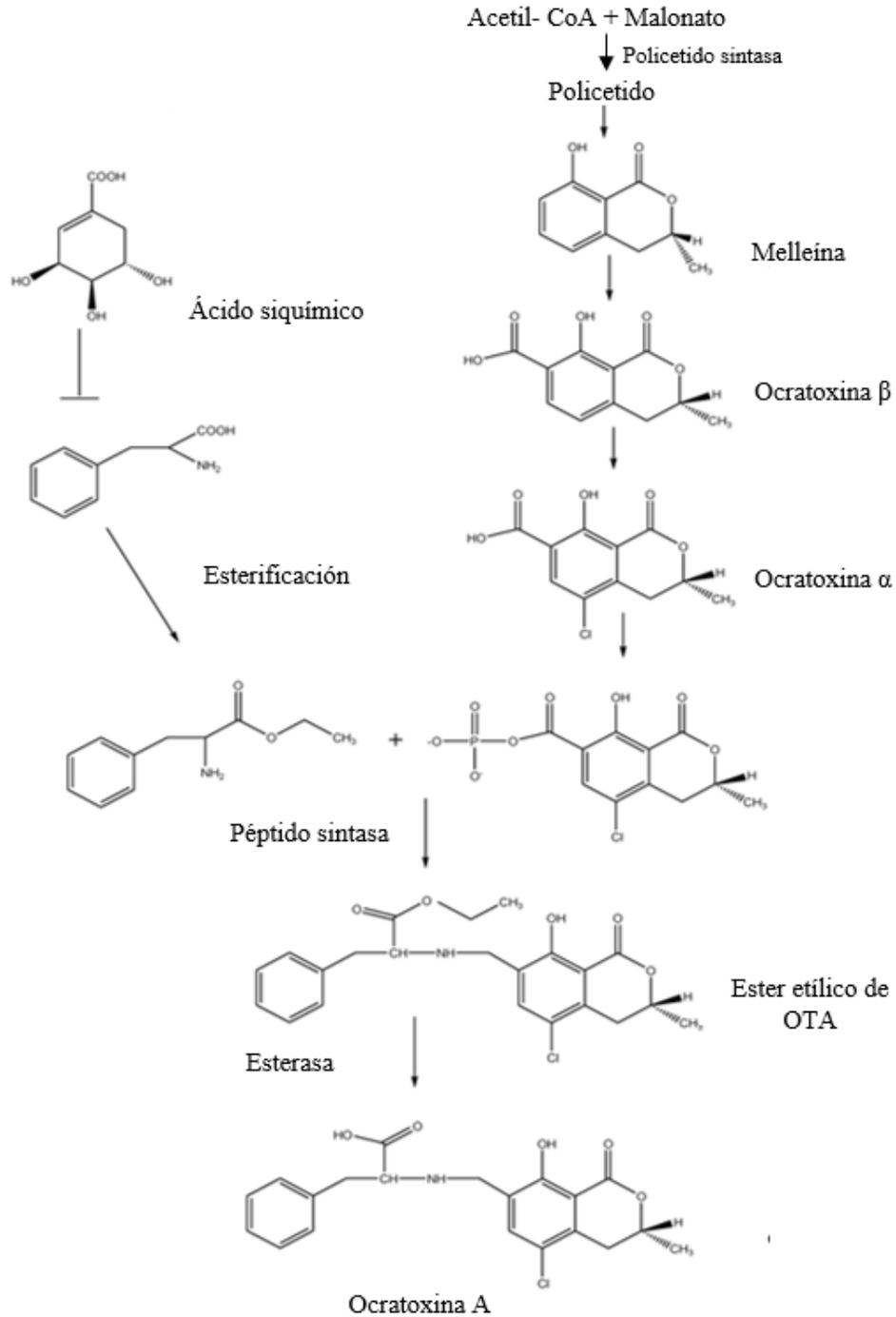
Esta micotoxina corresponde químicamente a un ácido orgánico débil con un valor de  $pK_a$  de 7,1 y con un peso molecular de 403,8 g/mol. Presenta una estructura cristalina que varía de incolora a blanca, es inodora, termoestable, soluble en disolventes orgánicos polares, presenta escasa solubilidad en agua y además es capaz de emitir fluorescencia al ser excitada con luz ultravioleta, presentándose como el miembro más tóxico de la familia de las ocratoxinas(10-12).

Su estructura química está compuesta de una fracción isocumarina clorada y una L-fenilalanina unidas por un enlace amida(13). La OTA presenta varios metabolitos derivados (Figura 1) como la ocratoxina B (OTB), la cual es una forma declorada de OTA; la ocratoxina C (OTC), una forma de OTA que incluye un éster etílico en su estructura. Y un derivado isocumarínico de OTA, denominado ocratoxina  $\alpha$  ( $OT\alpha$ ) con su análogo declorado ocratoxina  $\beta$  ( $OT\beta$ )(14). Además, existen otras formas de la ocratoxina como el éster metílico de ocratoxina A (MeOTA), éster metílico de OTB (MeOTB), éster metílico de  $OT\alpha$  y un etilamida de OTA(15). Todas estas variantes, en la actualidad, aún no son reguladas en los alimentos, aunque su presencia es sin duda un riesgo para la salud humana(16).



**Figura 1.** Fórmula estructural de OTA y de los principales productos de conjugación y degradación. Fuente: Elaboración propia Encina, G. Stiglich, D. (2021).

Huff y Hamilton, 1979(17), postularon un modelo sobre la biosíntesis de OTA basado en tres etapas, donde la primera parte corresponde a la síntesis de policétidos de OT $\alpha$  mediante la melleína, involucrando a la enzima policétido sintasa. En la segunda etapa se genera la activación de acilo, donde la melleína se metila y se oxida a OT $\beta$ , posteriormente se clora por una cloroperoxidasa para la formación de OT $\alpha$  y luego transformarse, utilizando ATP, en un ambiente anhidro mixto. Por otro lado, la fenilalanina, el segundo precursor, es sintetizado a través de la vía del ácido siquímico, seguido de la activación del éster etílico. Finalmente, se unen ambos precursores activados para generar OTC, siendo la desesterificación el último paso de esta vía sintética(10, 17). (Figura 2).



**Figura 2:** Representación esquemática de la vía biosintética hipotética de la OTA propuesta por Huff y Hamilton. Tomada y adaptada de El Khoury, A y cols(2010)(10).

A pesar de que los productos de conjugación y degradación de OTA pueden ejercer efectos negativos en el organismo, estos son menos tóxicos, por lo que sus mecanismos de acción no han sido tan estudiados como los de OTA, la cual representa un gran peligro para la salud pública por sus efectos negativos(16)

### **5.2.1 Toxicidad asociada a OTA**

La OTA al tener actividad nefrotóxica, hepatotóxica, inmunosupresora y teratogénica, para muchas especies animales se considera de alto riesgo, inclusive ha sido clasificada como posible carcinógeno para humanos (Grupo 2B) por la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC por su nombre en Inglés)(18). Por ello, se considera a la OTA como una gran amenaza para las personas, ya que además se acumula en varios tejidos del cuerpo y puede conducir a la producción de enfermedades crónicas. Sorprendentemente, la exposición crónica a dosis bajas de OTA podría ser aún más perjudicial que la exposición aguda a una dosis alta(16). Por ende, el rol patológico que desemboca es bastante relevante dado que la OTA está implicada en la patogénesis de enfermedades renales, hepáticas, neurológicas, entre otras(16).

El riñón se ha considerado como el órgano diana clave de la toxicidad por OTA en la mayoría de las especies de mamíferos(19), pero se han encontrados diferencias de toxicidad entre especies y sexos(20). Estudios aplicados en ratas Fisher donde administraron dosis cercanas al rango cancerígeno de OTA (0.5 mg/kg de peso corporal) en lapsos repetitivos, concluyeron que la exposición subcrónica afectaba de manera diferente el curso temporal transcriptómico de machos y hembras, principalmente en la expresión de enzimas metabólicas y transportadores(21). Por lo que la susceptibilidad específica del sexo, en los eventos renales adversos, puede estar relacionada con los niveles de expresión basal de genes implicados en diversas funciones renales a lo largo del ciclo de vida(22).

Además, varios estudios en animales y humanos han confirmado una conexión causal entre la exposición a OTA y los cánceres del tracto urinario(20). Incluso, en análisis del plasma sanguíneo humano, se ha encontrado la presencia de OTA, confirmando la implicancia de esta micotoxina en nefropatías como la nefropatía endémica de los Balcanes (BEN, por su nombre en inglés), la cual es una enfermedad progresiva, grave y hasta mortal(23, 24). Se cree que el principal efecto nefrotóxico esta dado en los túbulos proximales de las nefronas(20). Algunas hipótesis describen que la expresión polimórfica de la enzima superóxido dismutasa 2 (SOD2) genera un estrés mitocondrial por el acúmulo de superóxido inducido por OTA, produciendo la apoptosis de células renales humanas, contribuyendo al daño renal y el desarrollo de BEN(25).

Aunque el hígado no es el principal órgano diana de OTA, sigue siendo uno de los órganos más sensibles a las sustancias tóxicas exógenas, por lo cual es sometido con mayor frecuencia a análisis toxicológicos(26). Incluso en modelos de estudios, se asume que la eliminación de OTA es principalmente por vía hepática, ya que el hígado es el primer órgano en recibir esta micotoxina, posterior al ser absorbida a través del tracto gastrointestinal(26, 27).

La exposición a OTA (*in vivo* o *in vitro*), se ha implicado en la sobreproducción de especies reactivas de oxígeno (ROS, por su nombre en inglés), así como el daño oxidativo, el cual se ha relacionado y confirmado con el mecanismo de hepatotoxicidad en estudios con células hepáticas humanas y de ratones(26, 28). Varios investigadores concuerdan que la principal causa de toxicidad generada por OTA en distintos órganos, es inducida por la respuesta al estrés oxidativo(11), afectando mecanismos de protección enzimáticos, causando daño al ADN, citotoxicidad y apoptosis(28).

La exposición a OTA en células del túbulo proximal primario de rata y línea celular de riñón de cerdo, da como resultado una elevación dependiente de la concentración de los niveles de ROS, reduciendo la defensa antioxidante de las células al disminuir los niveles de

glutación intracelular y aumentando la formación de 8-oxoguanina(11, 22). Tratamientos con tocoferol reducen significativamente la respuesta del estrés oxidativo inducida por OTA. No obstante, este antioxidante que frena la cadena oxidativa, no reduce la citotoxicidad y no puede prevenir el agotamiento de los niveles totales del glutación en las células expuestas a la micotoxina(11).

Estudios que evaluaron el impacto de la exposición de OTA en células madres embrionarias humanas, en modelos de pre y post implantación de embriones, indicaron múltiples efectos sobre estructuras celulares, como la pérdida de la integridad de la membrana por efectos citotóxicos y exposición a ROS(23). Ratas tratadas por vía oral con OTA por 60 días, indicaron una mayor formación de productos de la peroxidación lipídica(29). Concordando de igual forma en que el estrés oxidativo es la principal causa de la toxicidad generada por OTA en distintos órganos.

Se ha reconocido que la toxicidad de OTA puede conducir a efectos neurotóxicos y a la progresión de la enfermedad de Alzheimer(30). Incluso diferentes concentraciones de OTA en cerebros de roedores proponen que esta micotoxina, puede cruzar activamente la barrera hematoencefálica y acumularse dentro del cerebro(30). Análisis en astrocitos humanos tratados con OTA, también observaron una reducción de la proliferación e inducción de apoptosis celular, a través de la pérdida del potencial de membrana mitocondrial(31). Además, la OTA puede disminuir las concentraciones de noradrenalina, dopamina y 5-hidroxitriptamina en el cerebro del ratón(32), junto con la inhibición de expresión de transportadores de glutamato, glutamato-aspartato y otros transportadores de aminoácidos(33). Otros estudios, indican que la OTA provoca estrés oxidativo que conduce a la apoptosis en células de neuroblastoma de ratón y células progenitoras neuronales humanas, evidenciado por un fuerte aumento de la actividad de la superóxido dismutasa (SOD) total y mitocondrial(23, 34).

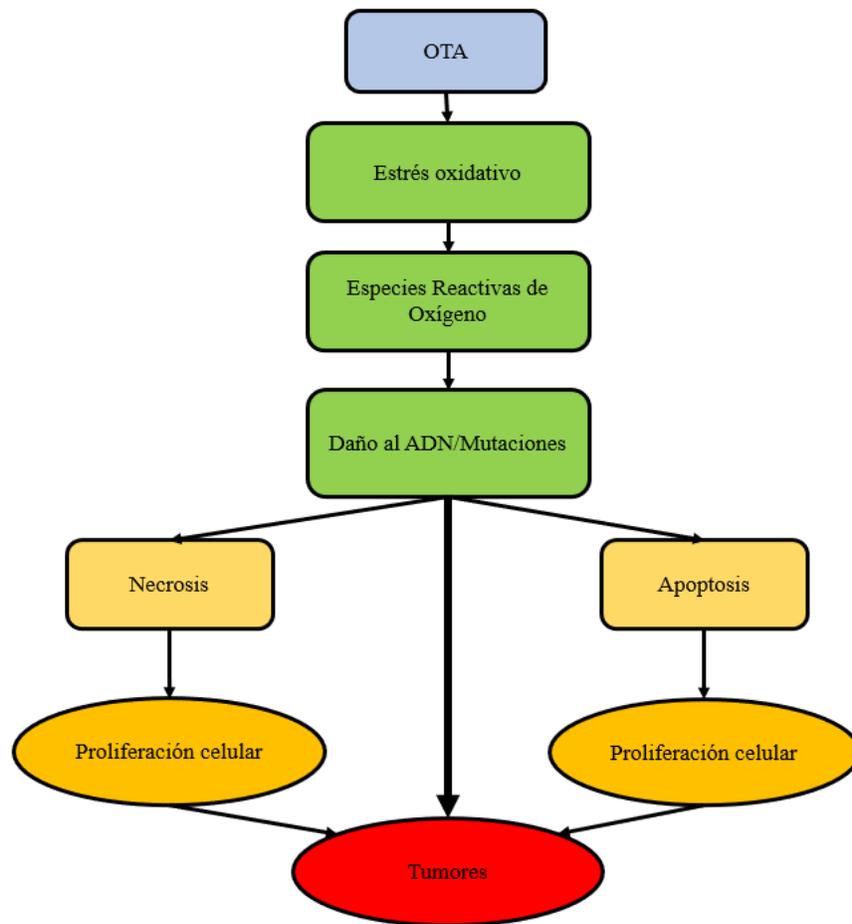
Varias investigaciones realizadas en ratones *in vivo*, han revelado que el tratamiento con diferentes concentraciones de OTA, disminuye la expresión del factor neurotrófico derivado del cerebro mediante el estrés oxidativo y apoptosis, el cual también disminuye en trastornos neurológicos como la enfermedad de Parkinson, enfermedad de Huntington y la esquizofrenia(30). En general, la información actual demuestra que la neurotoxicidad por OTA se da incluso con dosis moderadamente bajas(30), concluyendo que puede contribuir al desarrollo de enfermedades neurodegenerativas.

La OTA altera diferentes funciones inmunes en el hombre, ratones, cerdos y pollos(35). Investigaciones concuerdan que la OTA provoca una disminución en el peso relativo de los órganos inmunitarios. Sin embargo, en algunos estudios no queda claro si estos cambios degenerativos y necróticos se deben por los efectos citotóxicos directos o si es el resultado de la apoptosis inducida(35).

La muerte celular producto de apoptosis y necrosis podría conducir a una reducción del número de células productoras de anticuerpos en los órganos linfoides y la disminución de los niveles séricos de inmunoglobulinas. La OTA retrasa la mitosis de células inmunitarias que proliferan rápidamente a causa de la inhibición de síntesis de proteínas, por consiguiente, podría afectar la regeneración de los tejidos dañados. Además, trastornos relacionados a la síntesis proteica en linfocitos, estarían involucrada alteraciones observadas en macrófagos. También se cree que la migración extensa de linfocitos a los riñones, hígado y otros órganos puede causar la hipocelularidad observadas en los órganos linfoides y en el torrente sanguíneo en estudios con exposición a OTA(35). El deterioro de células y órganos inmunitarios estaría relacionado con la activación de linfocitos, macrófagos y células Kupffer, inducidos por la producción de citoquinas proapoptóticas (TNF-  $\alpha$  e IL-6) a causa de la exposición a OTA(35).

Si bien la apoptosis habitualmente elimina células anormales y previene el desarrollo de tumores(36). Datos de estudios *in vitro*, sostienen que la apoptosis mediada por OTA

podría conducir a la selección de células resistentes a la necrosis o procesos apoptóticos, y calificarlas con una mayor probabilidad de transformación en células tumorales(37). Además, se puede estimular una respuesta celular compensatoria, que da como resultado la exacerbada proliferación celular y el desarrollo de cáncer(38). (Figura 3). Por consiguiente, un daño bajo, pero sostenido de estrés oxidativo inducido por OTA, puede generar daño en el ADN, provocando mutaciones, transformaciones y proliferación celular, lo que pudiese llevar al desarrollo del cáncer(36).



**Figura 3.** Modelo propuesto para la carcinogenicidad de OTA. Tomada y adaptada de Marin-Kuan, M y cols (2008) (36).

La OTA es un potente carcinógeno renal en roedores, produciendo cariomegalia y poliploidía prominente de las células del túbulo proximal(39). Investigaciones realizadas en la piel de ratones *in vivo*, revelaron que la exposición cutánea de OTA causa la iniciación de procesos tumorales, lo que pudiese estar relacionado con el estrés oxidativo y daño del ADN(40). Otros estudios realizados en roedores demostraron que la exposición intrauterina a OTA produce aductos de ADN en testículos de ratones recién nacidos(41). También la exposición de OTA a través de la dieta a largo plazo, provoca aductos de ADN en riñón y testículos de ratones adultos(42). Estos datos observados en animales se pueden utilizar como análogos para predecir la incidencia de potenciales tumores en humanos(39, 42).

La OMS(43), en el 2008 consideró seis hipótesis sobre el mecanismo de acción cancerígeno de OTA:

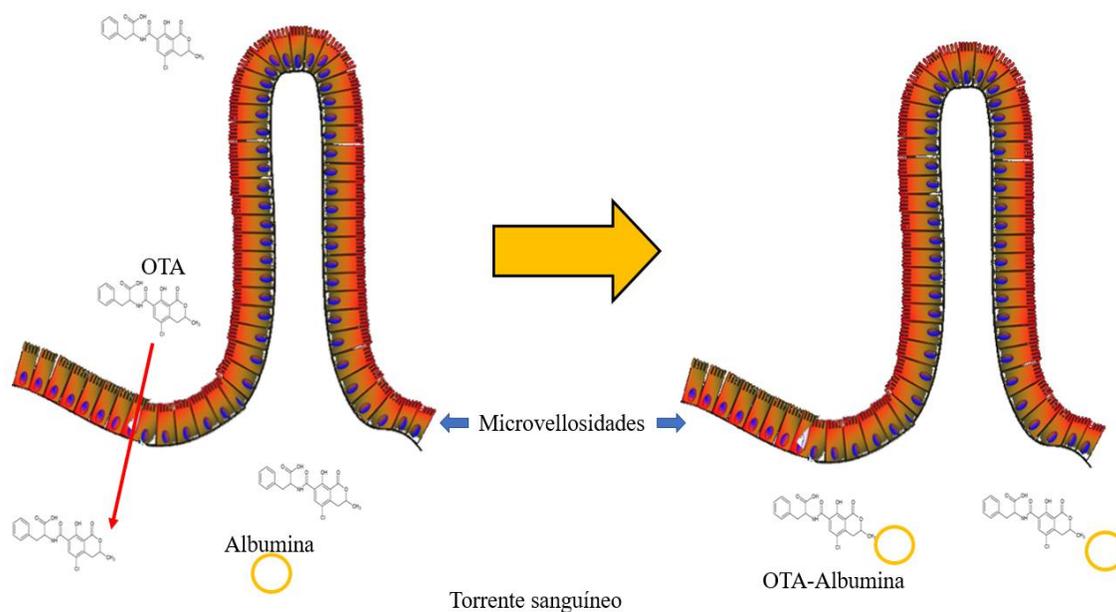
- Genotoxicidad por interacción directa de OTA o un metabolito reactivo con ADN.
- Generación de tumores secundarios a toxicidad renal crónica y proliferación celular compensadora.
- Generación de tumores secundarios a la inhibición de síntesis de proteínas.
- Interrupción de las vías de señalización célula-célula y el proceso de división celular.
- Alteración de la homeostasis del calcio intracelular.
- Disfunción mitocondrial que conduce a estrés oxidativo e inducción indirecta del daño al ADN.

A la luz de datos recientes, como la formación de tumores por genotoxicidad que implica la aducción de ADN, podría llevar a la reclasificación de OTA del Grupo 2B (posiblemente carcinógeno para los seres humanos) al Grupo 1(cancerígeno para los seres humanos), ya que se tienen pruebas contundentes para afirmar que realmente esta micotoxina es carcinogénica si se consume de manera constante(16).

Por todas estas razones, es importante recalcar el papel toxicológico de OTA y proponer la regularización activa de la ingesta diaria tolerable en alimentos, para minimizar los potenciales riesgos que puede conllevar el consumo recurrente de esta micotoxina.

### 5.2.2 Absorción de OTA en el organismo

Una vez ingerida la OTA, debido al rápido tránsito del quimo alimenticio en el estómago, a causa de su grosor y capa mucosa, solo una fracción menor de OTA se absorbe aquí. Mientras, en las primeras porciones del intestino delgado (duodeno y yeyuno), es donde se absorbe la mayor cantidad de OTA (Figura 4), debido a la permeabilidad que presenta esta zona, lo que facilita su ingreso(16, 40, 44). Además, el rango de pH del intestino delgado (6,1-7,8), facilita aún más la absorción de la OTA, debido a los valores de pKa (7,1) que esta posee(45). Cabe mencionar que esta micotoxina, al ser absorbida, puede afectar la integridad de las paredes del intestino delgado, provocando inflamación y trastornos intestinales(40)



**Figura 4.** Ingreso de OTA al torrente sanguíneo y su unión con albúmina. Fuente: Elaboración propia Encina, G. Stiglich, D. (2021).

Después de la absorción de OTA en el tracto gastrointestinal, esta micotoxina se une con gran afinidad a la albúmina, transportándola a diferentes tejidos y otorgándole una vida media más prolongada de unos pocos días a un mes, según la especie(44). En los seres humanos, la OTA se metaboliza lentamente, con una vida media de aproximadamente un mes, lo que conduce un efecto acumulativo en distintos órganos(44, 46).

La OTA luego de ser ingerida puede sufrir biotransformaciones a causas de enzimas proteolíticas y enzimas de la microbiota bacteriana que hidrolizan la OTA a OT $\alpha$ . La hidrólisis de OTA produce la apertura del anillo de lactona que en condiciones alcalinas da como resultado la formación de un compuesto altamente tóxico llamado OTA abierta con lactona (OP-OTA). De otra forma, a causa de la oxidación de OTA, se produce un compuesto de baja toxicidad llamado 4-hidroxiocratoxina A (4-OH-OTA) y 10-hidroxiocratoxina A (10-OH-OTA), que también es menos tóxica(44).

Asimismo, también se ha observado la formación de otros metabolitos derivados de la biotransformación de OTA en especies como OTB y en el resultado de la conjugación de la OTA con compuestos como sulfatos, ácido glucurónico, hexosa (hex-OTA), pentosa (pen-OTA), glutatión (OT-GSH), entre otros. La producción de estos metabolitos, es de consideración, debido a que pueden interactuar con otras moléculas y conducir a la formación de compuestos más tóxicos(44, 47).

### ***5.2.3 OTA en los alimentos***

Como se mencionó anteriormente, OTA es bastante resistente a diversos procesamientos, por lo que se puede encontrar en múltiples alimentos, previos a las cosechas (en el campo), cosecha y postcosecha (durante el procesamiento, envasado, almacenamiento

y transporte)(48). Las concentraciones de OTA en los alimentos suelen ser más bajas después del procesamiento en comparación con materias primas(40).

Los productos de origen vegetal como el café, el cacao, los cereales y frutas secas suelen contaminarse durante el almacenamiento, mientras que la contaminación de uvas se centra en el campo(49), ya que la formación de OTA está influenciada por factores ambientales como las variaciones climáticas entre las regiones geográficas. Estudios indican una mayor incidencia de OTA en el sur de Europa, donde presentan climas húmedos y cálidos que favorecen el crecimiento de hongos, siendo sus valores significativamente superiores en comparación con las regiones del norte(50). Además, factores como el periodo de cosecha, predisponen el aumento de infección por hongos cuando se retrasa la recolección de frutas maduras(14). También las condiciones de procesamiento influyen su contaminación, ejemplo de esto, es la comparación de vinos tintos y vinos blancos, donde los tintos se dejan macerar con las lías durante varios días y permite transferir mayores cantidades de OTA al mosto(51). Por otra parte, se estima que los principales alimentos de consumo recurrente que están contaminados son de origen vegetal, siendo los más importantes el café, alimentos en base a cereales y el vino tinto(52).

Además de encontrarse en alimentos vegetales, la OTA se ha notificado presente en tejidos y productos de origen animal como lácteos, carne de cerdo, aves de corral, entre otros. El consumo principalmente de piensos contaminados con esta micotoxina genera la acumulación en sus tejidos(53). Se cree que los cerdos son los principales animales de corral afectados, dado que son los más susceptibles a absorber OTA en su alimentación y presentar una eliminación lenta(48). Por otro lado, los rumiantes como vacas, cabras y ovejas son comparativamente resistentes a la toxicidad de OTA, gracias a su microbiota gastrointestinal (fracción protozoaria y enzimas bacterianas) que es capaz de degradar la OTA en OT $\alpha$ . (48, 54). Por ende, solo adsorberían una pequeña cantidad de OTA, explicando la baja presencia de esta micotoxina en sus tejidos y sus productos lácteos(54). Sin embargo, su capacidad de desintoxicar está estrictamente relacionada con un rumen funcional, el cual puede cambiar cuando se altera su dieta (55). Al igual que los rumiantes, también se ha observado que las

aves de corral pueden eliminar OTA más rápido que los mamíferos monogástricos, lo que resulta en una baja acumulación de OTA en sangre y los tejidos, por lo que la transferencia de esta micotoxina a los huevos solo ocurriría con dosis de consumo de OTA muy altas(56-58).

La Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA, por su nombre en inglés) caracterizó la toxicocinética de OTA como un compuesto que se absorbe rápidamente después de la ingestión oral, alcanzando niveles máximos en la sangre en unas pocas horas, con una biodisponibilidad que oscila entre el 40 y 66% según la especie y la dosis, pero se elimina y excreta lentamente, lo que conduce a una posible acumulación en los tejidos(54). Siendo preocupante su consumo, principalmente en grupos vulnerables como niños y embarazadas(59).

La disponibilidad sistémica a través de la difusión pasiva de la OTA, principalmente en el yeyuno proximal, puede ser facilitada en gran medida por la alta afinidad de unión de OTA a las proteínas plasmáticas(54). Incluso, para reflejar la rápida absorción de esta micotoxina en el organismo, se llevó a cabo un estudio en un varón adulto, donde se administró OTA por vía oral marcada con tritio a una dosis de 0,02 nmol/kg de peso corporal. El 93% de la radiactividad administrada, se encontró en la sangre dentro de las 8 horas siguientes a la ingestión(60). Si bien, estos resultados indican una rápida absorción, se requiere una mayor cantidad de sujetos de estudio para darle una mayor credibilidad a la investigación.

Varios países y organizaciones internacionales han regulado el contenido de OTA en algunos productos alimentarios comerciales (Tabla 2). El Comité Mixto entre la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y Agricultura/Organización Mundial de la Salud (FAO/OMS), estableció en el 1995 un valor máximo de ingesta semanal tolerable de 100 ng/kg de peso corporal, equivalente a una ingesta diaria de 14 ng/kg de peso corporal. Posteriormente el Comité científico sobre alimentación (SCF, por su nombre en

inglés) de la Comisión Europea, en el 1998 considero necesario reducir la exposición de OTA lo máximo posible de los alimentos, debido a su potencial toxicidad, estableciendo un límite diario de 5 ng/kg peso corporal(12).

La SCF, años más tarde publicó el Reglamento de la Comisión Europea (CE) N° 466/2001, donde estableció límites de 0,5 µg/kg en alimentos destinados para lactantes y niños de corta edad. Un año después, dictó el Reglamento (CE) N° 472/2002, donde estableció nuevos métodos de toma de muestra y análisis de OTA en alimentos. Además, fijó límites máximos de OTA para uvas pasas, cereales y derivados de cereales con 10, 5, 3 µg/kg respectivamente(12).

Actualmente los niveles de OTA en alimentos están regularizados por el Reglamento (CE) N° 1881/2006, el cual detalla el contenido máximo de esta micotoxina en distintos productos alimenticios(53). Aunque, al pasar de los años, se han ido estableciendo nuevos límites para otros alimentos, como en el Reglamento Unión Europea (UE) N° 105/2010 y en el Reglamento (UE) N° 1137/2015 que fija el contenido de varias especias, regaliz y *Capsicum spp*(61).

**Tabla 2.** Contenidos máximos de OTA establecidos para alimentos.

Producto alimenticio	Nivel máximo permitido µg/kg	Referencia
Nuez moscada, chile y pimentón, jengibre, pimienta y cúrcuma	20	Codex alimentarius.(62)
Cereales no elaborados	5	CE,N° 1881.(53) REA,Chile.(63)
Todos los productos derivados de cereales no elaborados, incluidos los productos transformados a base de cereales y los cereales destinados al consumo humano	3	CE,N° 1881.(53)

Uvas pasas (pasas de Corinto, sultanas y otras variedades de pasas)	10	CE,N° 1881.(53)
Café tostado en grano y café tostado molido, excluido el café soluble	5	CE,N° 1881.(53) REA,Chile.(63)
Café soluble (café instantáneo)	10	CE,N° 1881.(53) REA,Chile.(63)
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	CE,N° 1881.(53)
Vino aromatizado, bebidas aromatizadas a base de vino y cócteles aromatizados de productos vitivinícolas	2	CE,N° 1881.(53)
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	CE,N° 1881.(53)
Alimentos elaborados a base de cereales y alimentos infantiles para lactantes y niños de corta edad	0,5	CE,N° 1881.(53)
Alimentos dietéticos destinados a usos médicos especiales dirigidos específicamente a los lactantes	0,5	CE,N° 1881.(53)
Cacao, pasas, jugos o zumos, néctares, concentrado de uva	5	CE,N° 1881.(53)
Raíz de regaliz, ingrediente para infusiones	20	CE,N° 1881.(64)
Extracto de regaliz para uso alimentario, especialmente en bebidas y confitería	80	CE,N° 1881.(64)
Pimienta blanca y negra, nuez moscada, jengibre y cúrcuma	15	CE,N° 1881.(61)
Capsicum (frutos de dicho genero desecados, enteros o pulverizados, incluidos chiles, el chile en polvo, la cayetana y el pimentón	20	CE,N° 1881.(61)

Elaboración propia Encina, G. Stiglich, D (2021).

No obstante, algunos países de la UE, establecieron sus propios límites máximos para OTA en alimentos y piensos (Tabla 3), como en Italia, Grecia, Finlandia, Francia, entre otros(50).

**Tabla 3.** Regulación actual de ocratoxina A en algunos estados miembros de la Unión Europea.

País	Alimentos	Límite máximo (µg/kg )
Dinamarca	Cereales y productos de cereales	5
	Riñón de cerdo	25
Finlandia	café	5
Francia	Cereales	4
Grecia	Café (todo tipo)	20
Italia	Cerveza	0,2
	Productos derivados del cacao	0,5
	Comida para bebé	0,5
	Carne de cerdo y productos derivados	1
	Cereales y productos derivados	3
	Café tostado e instantáneo	4
	Café verde	8
Suecia	Cereales y productos derivados	5
Países bajos	Todos los alimentos	10

Tomado y adaptado de Miraglia, M y cols. (2002)(50).

Se puede observar una variación en los límites máximos de OTA en distintos países. Estos datos pueden estar relacionados a las diferentes condiciones ambientales otorgadas por la temperatura, precipitaciones y latitud geográfica, por lo que, aquellos países que poseen climas húmedos y cálidos, predisponen el crecimiento de hongos productores de OTA, siendo más susceptible a encontrarla en alimentos. Por ende, sus límites máximos serán más elevados respecto a otros.

Factores socioculturales también pueden influir en la presencia de OTA en los alimentos, ya sea en las técnicas de cultivo, manipulación y procesamiento de productos, debido a que países con mayor desarrollo industrial cuentan con mejores métodos para reducir los niveles de OTA, mediante el control del crecimiento de hongos y técnicas para eliminar directamente esta micotoxina de matrices contaminadas, por lo que sus límites máximos serán más exigentes en los alimentos.

En Chile el Reglamento Sanitario de los Alimentos solo establece los límites máximos de OTA, para Cereales y sus derivados, cacao, pasas, jugos o zumos, néctares, concentrado de uva y café en grano de 5  $\mu\text{g}/\text{kg}$  y para café soluble (café instantáneo) 10  $\mu\text{g}/\text{kg}$ (63).

#### ***5.2.4 Presencia de OTA en alimentos en Chile***

Estudios Chilenos referentes a la transferencia de OTA de madre a hijo, han demostrado una relación entre la concentración de OTA en la ingesta dietética de la madre y su leche materna, donde se reportó que los posibles alimentos involucrados eran: productos de panadería, embutidos y jugos de fruta(65). Asimismo, otro estudio analizó muestras de leche materna, sangre y orina del lactante, e indicaron la presencia OTA en plasma sanguíneo en casi todas las muestras analizadas (43/45), mientras que, en las muestras de leche materna un 79% contenían esta micotoxina. En sus conclusiones mencionan que una ingesta continua de OTA por parte de la madre, genera su eficaz transferencia durante la lactancia, evidenciado mediante el análisis de OTA como marcador en la orina del lactante(66).

Datos sobre la presencia de micotoxinas en alimentos vendidos en Chile, indicaron que varios productos estaban contaminados con OTA, ejemplo de ello, un estudio reportó un valor medio de 355  $\mu\text{g}/\text{kg}$  de OTA en pimientos(67). Asimismo, el Ministerio de Salud (MINSAL), en el 2017(68), emitió una notificación de alerta sanitaria por merkén contaminado con OTA con 19,74  $\mu\text{g}/\text{kg}$  y 71,77  $\mu\text{g}/\text{kg}$  en merkén envasado y vendido en el

comercio. Si bien, en Chile aún no existe regulación para OTA en *Capsicum spp*, es recomendable considerar la incorporación de límites máximos para estas especias dentro del Reglamento Sanitario de los Alimentos.

Datos referentes a la presencia de OTA en café instantáneo en Chile, indicaron el hallazgo de esta micotoxina en niveles inferiores a los límites máximos permitidos. Aunque de las 63 muestras analizadas, se encontró positivo un 100% en la presencia de OTA(69). Estos resultados no se asocian a un riesgo toxicológico grave, sin embargo, como se mencionó anteriormente un consumo bajo, pero recurrente, puede inducir acumulaciones en el organismo, por lo que recomienda un control de vigilancia constante. Por otra parte, el MINSAL, informo en el año 2017(70), una alerta alimentaria por la presencia de OTA en lotes de café en grano de la marca “Gol Premier”, elaborado por le empresa Tresmontes, cuyos valores superaban los límites máximos reglamentarios.

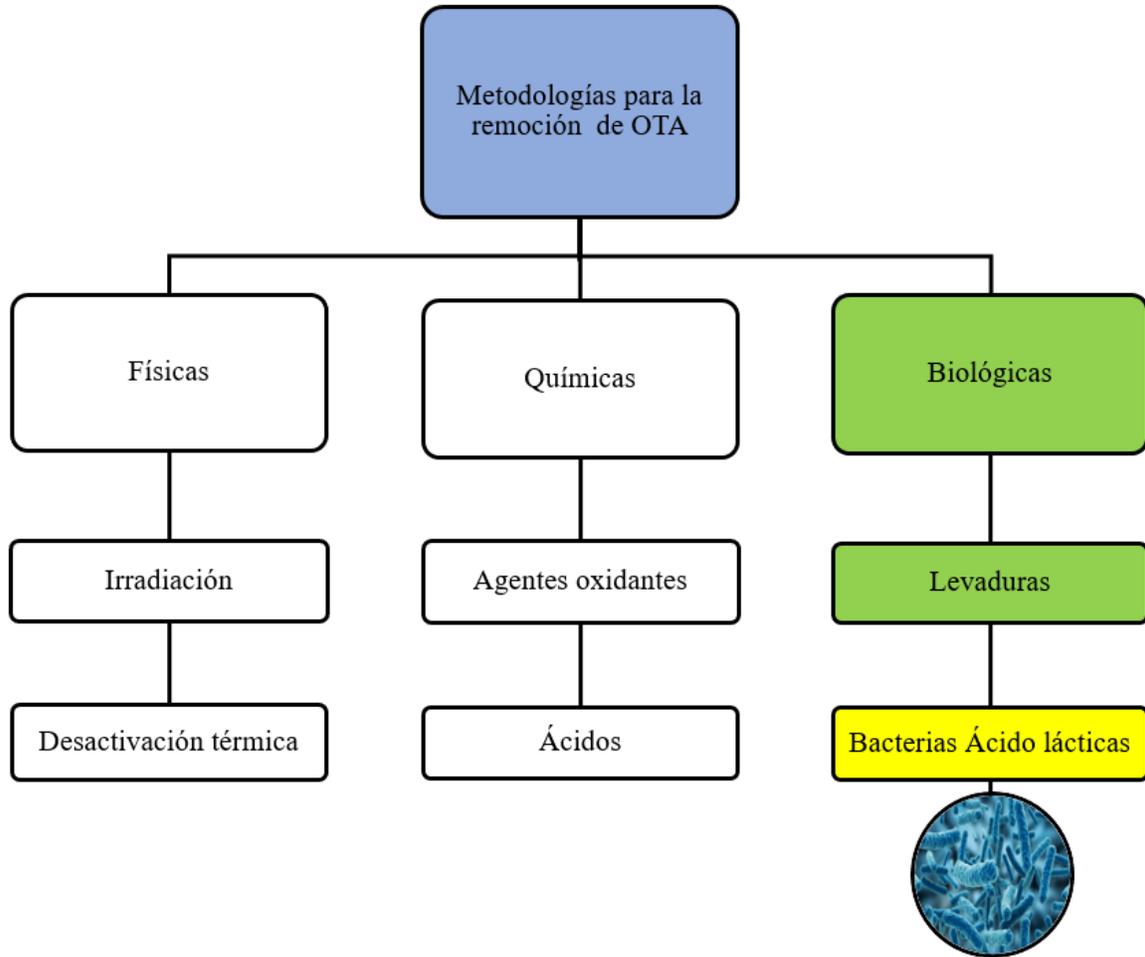
En Chile la Red de Información y Alertas alimentarias (RIAL), tiene la responsabilidad de realizar notificaciones de inocuidad en los alimentos de consumo humano o animal presentes en el mercado nacional o exportados. También tiene como objetivo contribuir en una rápida gestión de los eventos por parte de los servicios competentes: Ministerio de Salud (MINSAL), Servicio Agrícola y Ganadero (SAG) y Servicio Nacional de Pesca y Acuicultura (SERNAPESCA), entre otros; a fin de proteger la salud de los consumidores y dar una respuesta oportuna a notificaciones de terceros países. En la RIAL se denomina evento aquella situación en la cual se ha verificado de manera oficial la presencia de un peligro en un alimento que haya incumplido la normativa nacional o del mercado de destino. La mayoría de los eventos que han tenido lugar en Chile han sido notificados por el MINSAL, el cual cuenta con programas de vigilancia diseñados desde el Departamento de Nutrición y Alimentos, donde la vigilancia de micotoxinas tiene como objetivo contar con información confiable sobre peligros y riesgos alimentarios que se encuentran circulando en los alimentos, tanto de origen nacional como importados, verificando el cumplimiento de la regulación vigente, a fin de estimar el nivel de exposición de la población a estos agentes de enfermedad y establecer las medidas de control o

mitigación correspondientes. Los eventos de notificación son aquellos que no cumplen los criterios químicos según lo establecido en el reglamento sanitarios de los alimentos(71).

El aumento de investigaciones respecto a OTA, permite la actualización de la información sobre su toxicidad y presencia en diferentes alimentos, a causa de ello, las normativas, reglamentos y códigos sanitarios que fiscalizan los límites de OTA, deberían reevaluar constantemente sus parámetros. Asimismo, el Reglamento Sanitario de los Alimentos de Chile, se encuentra desactualizado, abarcando una escasa cantidad de productos que fiscalizan.

### **5.3 Control de OTA en alimentos**

Para los programas de seguridad alimenticia, es un objetivo esencial la disminución y eliminación de micotoxinas en productos de consumo masivo, por ello existen diversas técnicas y metodologías físicas, químicas y biológicas para su remoción. (Figura 5).



**Figura 5.** Clasificación de las metodologías utilizadas para la remoción de OTA. Fuente: Elaboración propia Encina, G. Stiglich, D. (2021).

Se ha encontrado una amplia variedad de compuestos químicos que son efectivos para destruir las micotoxinas, incluyendo diversos ácidos, bases, agentes oxidantes, agentes clorantes o reductores, sales, entre otros(72). También algunos métodos de desintoxicación sugieren el uso de ozono, tratamiento con peróxido de hidrógeno alcalino e irradiación gamma en cereales y derivados(73). Aunque se debe mencionar que el tratamiento químico no está permitido dentro de la Unión Europea para productos destinados al consumo humano, dado que pueden conllevar efectos negativos tanto para el medio ambiente como para la salud de las personas(72).

Una estrategia alternativa podría ser la utilización de microorganismos capaces de remover micotoxinas en alimentos contaminados, lo que actualmente ha captado las miradas investigativas como un método más eficaz y accesible para remover, eliminar o transformar las micotoxinas presentes en diferentes matrices. Las bacterias ácido lácticas (BAL), son microorganismos prometedores, que exhiben propiedades descontaminantes, ya que son seguras e inocuas para la remoción de micotoxinas en productos alimenticios(9).

#### **5.4 Control de OTA en alimentos a través del uso de BAL**

Las bacterias ácido lácticas comprenden a un diverso grupo de bacterias Gram positivo, no formadoras de esporas, anaeróbicas facultativas, generalmente inmóviles, que producen ácido láctico como principal metabolismo de carbohidratos durante la fermentación(74). Se encuentran en grandes cantidades en la naturaleza al igual que en el microbiota humana. Estas se pueden clasificar en cuatro géneros principalmente: *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc* y *Pediococcus*(75).

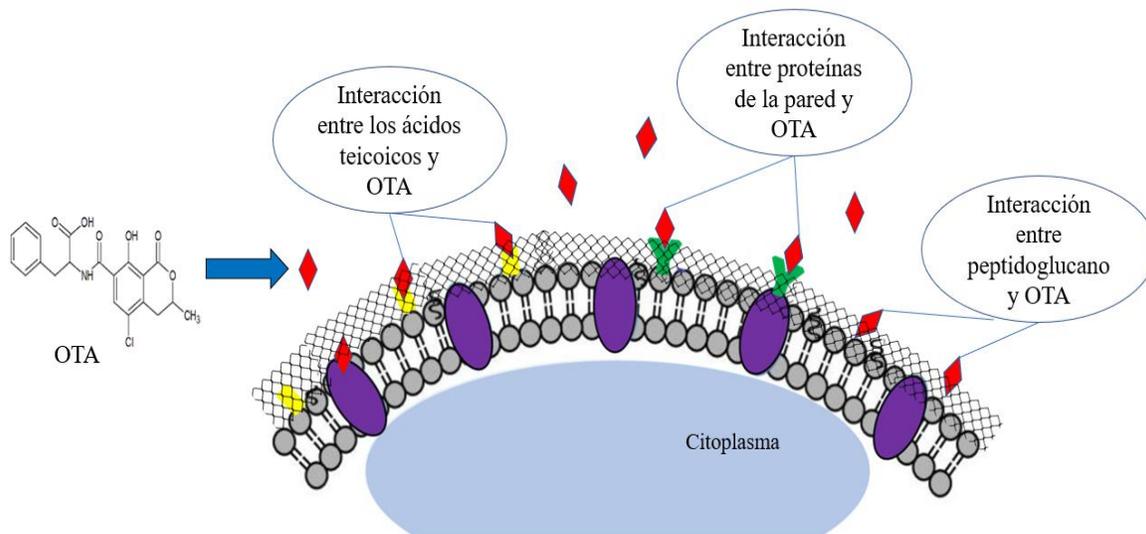
La fermentación de las BAL es comúnmente utilizada dentro de la industria de alimentación para la manufactura de productos lácteos, carnes, pescados e incluso verduras, dado a sus beneficios probióticos(9, 76). Además, tienen la capacidad de inhibir el crecimiento de varios tipos de hongos y extender la vida útil de los alimentos(77). Siendo los candidatos más prometedores para ser ocupados como antagonistas fúngicos(74). Como se mencionó anteriormente, las BAL son importantes inhibidores de la invasión y crecimiento fúngico, pero sus propiedades no se limitan en este aspecto, ya que también pueden interactuar con sus micotoxinas mediante su inactivación y/o adsorción(74, 77).

Muchas BAL al ser expuestas en una matriz contaminada por micotoxinas, tienen la propiedad de reducir o degradar el contenido de estos compuestos, debido a diferentes procesos de desintoxicación biológica, las cuales pueden implicar reacciones químicas y/o

enzimáticas, generando conversiones metabólicas que inducen una adsorción y/o biotransformación de micotoxinas por los componentes en la pared celular de las BAL, generando una disminución de su contenido. (77). (Figura 6).

Se ha demostrado que las BAL adsorben micotoxinas en sus grupos funcionales de la pared celular. Una pared celular típica de BAL, como muchas otras bacterias Gram positivo, contiene un peptidoglicano de múltiples capas, rodeado por una membrana citoplasmática, que está decorada con polisacáridos, proteínas, ácidos lipoteicoicos y ácidos teicoicos. Sin embargo, los polisacáridos y peptidoglucanos se consideran los componentes principales de las BAL para la eliminación de micotoxinas(78). Asimismo, las diferencias en la capacidad de unión a las distintas toxinas entre las BAL pueden explicarse racionalmente por las diferencias existentes en sus estructuras del peptidoglicano y el número de sitios de unión disponibles. Aunque la organización de la pared celular es bastante conservada en muchas bacterias Gram positivo, existen pequeñas diferencias en la estructura del peptidoglicano que pueden ser responsables de la capacidad diferencial de la remoción de micotoxinas(74).

La mayor capacidad de eliminación de toxinas se ha encontrado para las bacterias entéricas *Lactobacillus rhamnosus* y *L. acidophilus*, así como para las bacterias asociadas a plantas, como *L. plantarum*, *L. brevis* y *L. sanfranciscensis*. Inclusive, se ha demostrado que especies de este género reducen con una mayor capacidad el contenido de OTA en los medios de crecimiento(74, 79).



**Figura 6. Interacciones de OTA con las estructuras de bacterias ácido lácticas.** La figura esquematiza las principales interacciones de OTA y los componentes estructurales de la pared celular de las BAL. Fuente: Elaboración propia Encina, G. Stiglich, D. (2021).

Niderkorn y colaboradores, 2009(80), mencionaron que el papel clave en la unión de micotoxinas por la biomasa bacteriana estaría dado por los componentes estructurales de la pared celular. Aunque no se sabe con exactitud cómo funciona el mecanismo específico de adsorción de las micotoxinas por las paredes celulares. Por otra parte, la unión de OTA con la superficie celular de BAL no es muy estable, y se ha reportado que distintos agentes físicos, como el lavado, pueden disociar su interacción(79).

La contaminación por OTA es un problema grave y recurrente en todo el mundo, por lo que ha sido muy estudiada junto con sus mecanismos de descontaminación en alimentos. Existen diversas técnicas y metodologías que permiten su extracción, pero solo algunas de ellas pudiesen ser útiles para productos de consumo humano, siendo las BAL organismos prometedores para reducir los niveles de OTA en variadas matrices, mediante procesos de adsorción y biotransformación, los cuales han sido evaluados en distintos análisis. Por ello, en los siguientes apartados se revisarán y analizarán diferentes estudios que los involucran.

#### 5.4.1 BAL como adsorbentes de OTA

Las BAL como adsorbentes han sido estudiadas en su forma activa (Tabla 5) e inactivas (Tabla 4), ejemplo de esto son los experimentos llevados a cabo por Piotrowska y colaboradores, 2014(79), quienes estudiaron la capacidad de adsorción de OTA por tres distintas especies de *Lactobacillus* (*L. plantarum*, *L. brevis* y *L. sanfranciscensis*) en medio MRS a pH 6,2, utilizando diferentes concentraciones de biomasa ( $10^4$  UFC/mL y  $10^9$  UFC/mL) junto con una concentración de OTA de 1  $\mu$ g/mL a 30 °C. Las cantidades de la toxina residual con respecto a los valores iniciales fueron detectadas por cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC). Sus análisis indicaron que los resultados variaban en relación a la densidad de la biomasa utilizada y concluyeron que debía ser igual o superior a  $10^9$  UFC/mL para lograr un porcentaje de remoción sobre el 50%.

También se encontraron diferencias significativas en la capacidad adsorptiva entre las distintas especies de *Lactobacillus*. Así, *L. plantarum* y *L. sanfranciscensis* mostraron porcentaje de adsorción de OTA significativamente favorables, alcanzando sobre el 30% de adsorción del contenido inicial de OTA. Mientras la especie *L. brevis*, resultó menos eficaz adsorbiendo un 20,5%.

Para evaluar la adsorción de OTA por BAL muertas, se basaron en el mismo protocolo anterior. Al comparar los valores de las tres especies, tanto vivas como muertas, en concentraciones de biomasa superiores ( $10^9$  UFC/mL), *L. plantarum* obtuvo porcentajes de reducción de 26,02% y 56,16% en vivas y muertas respectivamente. Mientras *L. brevis* alcanzó 24,23% en vivas y 59,82% en biomasa muerta. En el caso de *L. sanfranciscensis*, se obtuvo 22,53% en vivas y 56,40% de reducción en muertas. Concluyendo ser más efectivas las BAL inactivadas térmicamente en la adsorción de OTA en comparación con las BAL vivas. Estos resultados pudiesen ser debido a los cambios que ocurren en la pared celular bacteriana inducidos por la alta temperatura, es decir, la desnaturalización de proteínas y la generación de poros que conducen a una mayor permeabilidad de las capas externas de la pared celular, esto a su vez resulta en un mayor número de sitios activos responsables de la adsorción de diferentes compuestos(79).

Mateo y colaboradores, 2010(81), también evaluaron la tasa de reducción de OTA por bacterias muertas, empleando cepas de la especie *Oenococcus oeni*, con una concentración del inoculo de  $10^7$  UFC/mL con un pH de 4,8 a 28 °C, utilizando niveles de OTA de 2 µg/L. Las mediciones realizadas por sistema HPLC, indicó una reducción de 67% de la micotoxina, corroborando la eficacia de las BAL térmicamente inactivas en la adsorción de OTA.

Considerando ambos autores(79, 81), las diferencias en las condiciones del medio de cultivo pudieron ser significativas en los valores de adsorción de OTA. Por ejemplo, la concentración inicial de OTA (Tabla 4) favorece a los estudios con la especie *Oenococcus oeni*, debido a que los niveles de biomasa utilizados fueron capaces de sobrellevar mejor las concentraciones de OTA, en comparación a los estudios realizados por Piotrowska y colaboradores(79). También diferencias en el pH, ya sea ácido (4,2) o valores más cercanos al neutro (6,2), pudiesen haber facilitado las interacciones de unión con la micotoxina, generado el mejor rendimiento en la especie *O. oeni*. Además, las pequeñas diferencias estructurales de sus paredes celulares, posiblemente sea un factor contribuyente en los distintos rendimientos entre especies.

Asimismo, Abrunhosa y colaboradores, 2014(9), en sus experimentos evaluaron la adsorción de OTA por bacterias de *Pediococcus parvulus* inactivadas térmicamente en medio MRS a pH 4,6. Sus resultados indicaron 1,3% de adsorción de OTA por la biomasa muerta. Concluyeron apresuradamente que el mecanismo de unión para la eliminación de OTA fue insignificante. Diversos factores pudieron interferir en el bajo porcentaje de adsorción, como el uso de concentraciones muy elevadas de OTA (2500 µg/L) para la cantidad de biomasa utilizada ( $10^9$  UFC/mL), de modo que el mecanismo de adsorción no sería capaz de solapar los niveles de OTA en el medio. Por lo cual, los datos realmente no son contradictorios, sino las concentraciones de OTA fueron distintas, dando resultados que difieren con las demás investigaciones.

**Tabla 4.** Adsorción de OTA con diferentes BAL inactivadas térmicamente.

Bacterias ácido lácticas	Concentración inicial de OTA	Concentración de biomasa inactiva	Adsorción (%)	Referencia
<i>L. plantarum</i> <i>L. sanfranciscensis</i> <i>L. brevis</i>	1000 µg/L	10 <sup>9</sup> UFC/mL	56,16 56,4 59,82	Piotrowska y cols, (2014).(79).
<i>P. parvulus</i>	2500 µg/L	10 <sup>9</sup> UFC/mL	1,3	Abrunhosa y cols, (2014).(9).
<i>O. oeni</i>	2 µg/L	10 <sup>7</sup> UFC/mL	67	Mateo y cols, (2010).(81).

Elaboración propia Encina, G. Stiglich, D. (2021).

Khattab y colaboradores, 2018(82), analizaron 8 cepas de bacterias ácido lácticas donde notaron que la especie *Lactobacillus delbrueckii* NRRL B-1024 resultó ser la más eficiente en la absorción de OTA. Debido a esto, se seleccionó para ser mutada utilizando metanosulfanato de etilo (EMS) como mutágeno químico para inducir variaciones genéticas aleatorias en relación con la mejora de la bioadsorción de OTA, donde la técnica ADN polimórfico amplificado al azar (RAPD) se utilizó para comprobar si los cambios genéticos fueron efectivos. En sus ensayos de adsorción, se analizaron dos variables: el tiempo de incubación de 1, 3 y 5 horas en las mismas condiciones (concentración de 100 ng/mL de OTA en un medio MRS con un pH de 7,0 a 30 °C); y la concentración del inoculo(v/v) en distinta cantidad de biomasa de 10, 20 y 40% de suspensión bacteriana durante una hora. Reportando que la cepa *L. delbrueckii* NRRL B-1024 resultó tener en la primera hora su mayor potencial de bioadsorción de OTA, por lo cual se mantuvo el parámetro tiempo para los ensayos posteriores con las cepas mutadas de esta misma especie. Dentro de los resultados, se percataron que al variar la concentración del inoculo, se generaba una elevación en la adsorción de OTA a medida que se aumentaba las concentraciones de la biomasa. Al elevar la concentración de 10% a 20% se incrementó la adsorción de OTA de 67,9% a 79,2% para la cepa mutada. Asimismo, al aumentar la concentración de 10% a 40%, la absorción de OTA aumento de 82,5 a 88,1 ng/mL para la cepa mutada, corroborando los análisis de los estudios anteriormente mencionados.

Otros ensayos de adsorción de OTA, realizados por Luz y colaboradores, 2018(83), utilizando una concentración de  $10^8$  UFC/mL de variadas especies de BAL en medio MRS a 37 °C por 24 horas, donde compararon en dos diferentes pH (3,5 y 6,5) en matrices contaminadas con 0,6 µg/mL de OTA. Para evaluar las cantidades de micotoxina adsorbida realizaron la extracción de OTA utilizando 1 mL de metanol y se mantuvo 12 horas en agitación, para luego ser centrifugada a 4000 rpm durante 5 min a 4 °C y finalmente ser analizado el sobrenadante obtenido mediante cromatografía líquida con detector de fluorescencia (LC-FLD). Las cepas que mostraron una mayor actividad de adsorción a pH 3,5 de fueron: *L. johnsinii*, con 45,1 ppb, *L. bulgaricus* con 47,4 ppb y *L. salivarius* con 45,3 ppb. No obstante, a pH 6,5, las cepas que mostraron mayor afinidad de unión a OTA fueron tres cepas de *L. plantarum* con valores de 45,1 ppb, 32,3 ppb y 32,7 ppb(83). Esto puede ser debido por las diferencias estructurales de los componentes de la pared celular de las distintas especies, donde a variados pH puede generar una diversidad en la polaridad y cargas que influyen en la adsorción.

**Tabla 5:** Adsorción de OTA por distintas especies de BAL activas.

Bacteria ácido láctica	Concentración inicial de OTA	Concentración de biomasa	Bioadsorción	Referencia
<i>L. plantarum</i> <i>L. sanfranciscensis</i> <i>L. brevis</i>	1000 ng/mL	$10^9$ UFC/mL	35,01% 32% 20,5%	Piotrowska y cols, (2014).(79).
<i>L. delbrueckii</i>	100 ng/mL	40% v/v	88,1%	Khatab y cols, (2018). (82).
<i>L. johnsonii</i> <i>L. bulgaricus</i> <i>L. salivarius</i> <i>L. plantarum</i>	600 ng/mL	$10^8$ UFC/mL	45,1 ppb 47,4 ppb 45,3 ppb 45,1 ppb	Luz y cols, (2018).(83).

Elaboración propia Encina, G. Stiglich, D (2021).

Haskard y colaboradores, 2001(84), también realizaron ensayos con BAL, utilizando la especie *L. rhamnosus* en una concentración de  $10^9$  UFC/mL a 37 °C. A través de HPLC, evaluaron el rendimiento de la BAL inactiva térmicamente en la adsorción de micotoxinas. Sus análisis concluyeron que el proceso de adsorción se debe particularmente a las características de la superficie celular al ser desnaturalizada, generando un incremento en sus poros, aumentando la permeabilidad de la pared celular. Además, menciona que la capacidad de unión de las BAL vivas hacia las micotoxinas posiblemente sea atribuible a la presencia de bolsas hidrófobas en su pared, aunque presenten una naturaleza hidrófila en su superficie celular.

Las investigaciones han confirmado que al elevar la concentración de la biomasa bacteriana en una matriz contraminada por OTA, bajo similares condiciones del medio, también se aumentaba la adsorción por esta micotoxina. Estos datos, llevan a concluir que la adsorción por BAL es proporcional a la concentración del inóculo, ya que aumentaría las interacciones de las estructuras superficiales de la pared bacteriana con la OTA(79, 82).

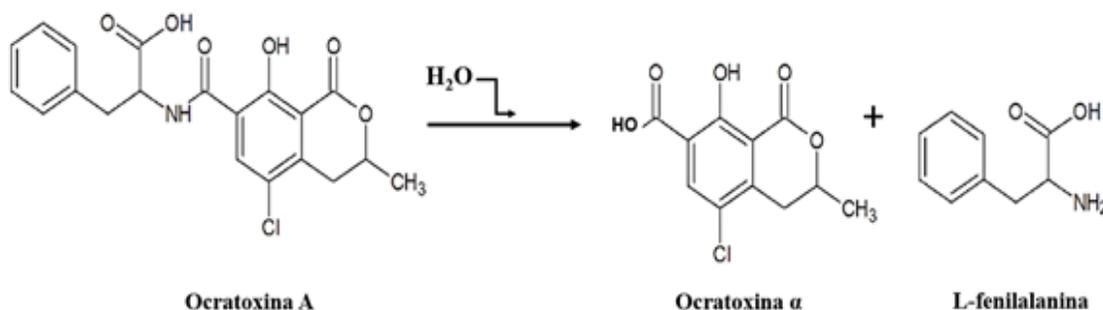
Al comparar los estudios sobre la capacidad de adsorción de las BAL vivas y muertas(79, 81, 84), sus resultados concuerdan que las células térmicamente inactivadas presentan una mayor efectividad. Por ende, se puede inferir que, al generar una desnaturalización de la pared celular, se induce a un aumento en la exposición de elementos que interactúan con OTA. Contrariamente, otro estudio(9, 85), obtuvo mejores resultados con BAL vivas. Esto puede deberse a distintos procesos de actividades enzimáticas, involucrando procesos de biodegradación de BAL vivas, obteniendo resultados sobreestimados en la adsorción. Además, no hubo una discriminación sobre biotransformación de OTA, por esta razón, sus resultados no son concluyentes. Por lo que en ensayos futuros deberían realizar mediciones sobre los productos de hidrólisis de OTA, para asegurar si realmente se trata de procesos de adsorción por BAL.

El empleo de BAL muertas para procesos de adsorción se ha mostrado beneficioso como método de descontaminación, mejorando la calidad de los alimentos y manteniendo sus propiedades organolépticas. Cabe mencionar, que la especie utilizada con mayor

frecuencia y con buenos resultados hasta es el momento ha sido *Lactobacillus plantarum*(79, 83), por lo que esta especie puede ser considerada prometedora para futuras implementaciones en la remoción de OTA de matrices alimentarias.

#### 5.4.2 BAL como biotransformadores de OTA

Las BAL aparte de poseer la propiedad de adsorber OTA mediante su pared celular, también tienen la capacidad de biotransformarla. Esta micotoxina, como se mencionó anteriormente, está compuesta por una fracción isocumarina junto con una molécula de L-fenilalanina unidas por un enlace amida, el cual puede ser hidrolizado por diversas BAL mencionadas en varios estudios(9). (Figura 7). Como la OT $\alpha$  se describe inocua y posee una vida media de eliminación 10 veces menor que OTA, el proceso de biodegradación se considera factible para minorizar la toxicidad en matrices contaminadas(86).



**Figura 7.** Degradación de ocratoxina A por hidrólisis de enlace amida. Fuente: Elaboración propia Encina, G. Stiglich, D. (2021).

Ensayos realizados de Abrunhosa y colaboradores, 2014(9), analizaron la capacidad de biodegradar OTA a OT $\alpha$  desde vinos tintos de Duero mediante el uso de cepas de *Pediococcus parvulus*. Las bacterias estudiadas se cultivaron en un caldo MRS en

condiciones anaeróbicas, evaluando distintos parámetros: tamaño del inóculo, concentración de OTA y temperatura de incubación.

Para evaluar los efectos en el tamaño del inóculo de BAL, se utilizó 5 mL de un caldo MRS contaminado con 1 µg/mL de OTA, incubando concentraciones de  $10^3$ ,  $10^6$  y  $10^9$  UFC/mL a 30 °C. Los resultados obtenidos, indicaron un incremento en la tasa de biotransformación de OTA hacia OTα cuando el tamaño de la biomasa se aumentaba. Incluso observaron que a concentraciones de  $10^3$  UFC/mL se demoraba 79 horas en degradar solo el 50% de OTA en el medio, mientras que el inóculo a  $10^9$  UFC/mL tardaba 19 horas en biodegradar el 90%. (Tabla 6).

**Tabla 6.** Efecto del tamaño de inóculo en la biotransformación de OTA. Se muestran valores calculados para el 50% y 90% en horas.

Tamaño del inóculo	50% de biotransformación	90% de biotransformación
	(Horas)	(Horas)
$10^3$ UFC/mL	79	100
$10^6$ UFC/mL	55	70
$10^9$ UFC/mL	6	19

Tomada y adaptada de Abrunhosa, L y cols (2014)(9).

En los análisis de la variación de concentración, se utilizaron tubos con 5 mL de caldo MRS, a los cuales se les añadió 0,01, 0,1 y 1 µg de OTA/mL, usando  $10^9$  UFC/mL de BAL a 30°C, no hubo gran variación en los resultados, por lo cual, la concentración de OTA en el medio no influyó en la biodegradación.

En el efecto de la temperatura, utilizaron una concentración de  $10^9$  UFC/mL en caldo MRS con  $1 \mu\text{g/mL}$  de OTA, incubando a diferentes temperaturas de 20, 30 y 37 °C. Los resultados indicaron que a 37 °C mostró una biodegradación de 50% y 90% de OTA más rápido en comparación con las otras temperaturas, con tiempos de 6 y 24 horas respectivamente (Tabla 7). Esto puede ser debido que las tasas de crecimiento celular y reacciones enzimática se aumentan al elevar hasta la temperatura óptima.

**Tabla 7.** Efecto de temperatura en la biotransformación de OTA.

Temperatura	50% de biotransformación	90% de biotransformación
	(Horas)	(Horas)
20 °C	32	63
30 °C	9	31
37 °C	6	24

Tomada y adaptada de Abrunhosa, L y cols. (2014)(9).

En cada uno de estos parámetros analizados, los niveles de biotransformación de OTA a OT $\alpha$  se determinaron por HPLC realizando tres replicas diariamente, donde la hidrólisis de OTA a OT $\alpha$  fue identificada inequívocamente por el método de análisis cromatografía líquida con espectrometría de masas (LC-MS/MS).

Luz, 2018(83), evaluó la actividad proteolítica de 27 especies de BAL con un método de difusión en agar. Prepararon placas de agar con leche desnatada al 1,5% y 1,6% (p/v)

inoculadas con  $10^8$  UFC/mL a 37 °C durante 48 horas, con el fin de seleccionar aquellas bacterias con mayor actividad proteolítica, evidenciándose una zona de hidrólisis en la placa de leche, siendo las especies más efectivas *L. delbrueckii bulgaricus*, *L. Paracasei* y *L. plantarum* con una zona de hidrólisis superior a 10 mm.

Para evaluar el efecto de hidrólisis de OTA por BAL a distinto pH (3,5 y 6,5) (Tabla 8), utilizaron un medio MRS con una concentración del inóculo de  $10^8$  UFC/mL a 37 °C. En pH 3,5, las mayores reducciones de OTA estuvieron dadas por las especies *Bifidobacterium breve* con 87,2%, *L. rhamnosus* con 92,1% y *L. casei* con 87,1%. Por otro lado, la bacteria con menor reducción a este pH fue la cepa de *L. plantarum* CECT 221 con 29,6%.

Mientras a pH 6,5, las bacterias que tuvieron mayor reducción de OTA fue la cepa de *L. plantarum* CECT 749 con 97,1% y la especie *L. bulgaricus* con 96,4%. Por el contrario, aquellas con menor reducción de OTA a este pH fueron *L. mesenteroides* y *L. plantarum* CECT 748 con 52,4% y 58,4% respectivamente. Concluyendo que la biotransformación de OTA por BAL obtuvo tasas más elevadas en pH 6,5 en comparación con el pH 3,5.

**Tabla 8.** Porcentaje de biotransformación de OTA a través de BAL en diferentes pH.

Cepa bacteria	Biotransformación (%)	Biotransformación (%)
	pH 3,5	pH 6,5
<i>Bifidobacterium breve</i>	87,2	94,1
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	92,1	90,3
<i>Lactobacillus plantarum</i> CECT 221	29,6	64,4
<i>Lactobacillus plantarum</i> CECT 749	90,5	97,1
<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	73,9	96,4

<i>Lactobacillus mesenteroides</i>	---	52,4
<i>Lactobacillus plantarum</i> CECT 748	30,1	58,4

Tomada y adaptada de Luz, C y cols (2018)(83).

Los niveles de hidrólisis de OTA se midieron por medio de HPLC. Para confirmar los productos de degradación por BAL, identificaron mediante espectrometría de masas asociado a trampa iónica lineal (LC-MS-LIT) dos pick que correspondían a OT $\alpha$  y 1- $\beta$ -fenilalanina.

Estudios anteriormente mencionados(9), indicaron que, a mayor concentración de biomasa, se presentaba un aumento en la biotransformación de OTA. Esto puede estar dado por el incremento de reacciones enzimáticas producidas por las BAL, induciendo un incremento en la hidrólisis. Aunque, hasta el momento no se tienen datos concluyentes respecto al mecanismo específico de la biodegradación de OTA generado por BAL(9).

Aparte de evaluar los niveles de hidrólisis de OTA por BAL con el mismo método, ambos estudios analizados(9, 83) corroboraron la existencia de biodegradación por la presencia de OT $\alpha$  y L-fenilalanina. Por lo que sus resultados respaldan la biotransformación.

La evaluación del pH, en uno de los estudios(83), mostró valores mayores de biotransformación de OTA en niveles de pH 6,5. Esto puede ser explicado por el rango de pH óptimo de las BAL, siendo cercano al neutro y al básico, por lo que sus enzimas funcionan con una mayor capacidad hidrolítica, degradando un mayor porcentaje de OTA. Cabe mencionar que diferentes cepas de la misma especie pueden dar valores sorprendentemente variados en un mismo pH, observándose en *L. Plantarum* con los mejores y peores porcentajes de biodegradación.

Es destacable la evaluación de la actividad proteolítica realizada a las BAL por Luz y colaboradores, 2018(83), ya que es una técnica eficaz que permite conocer el potencial proteolítico de las bacterias, mediante la capacidad de hidrolizar las caseínas en la leche desnatada, permitiendo seleccionar aquellas cepas prometedoras para ensayos en biotransformación.

Los porcentajes de desintoxicación de OTA por BAL, resultan ser más elevados en los ensayos de biotransformación(9, 83), en relación con los de adsorción(79, 81-83, 85). No obstante, sus valores no toman peso comparativo, ya que las concentraciones de OTA utilizada en los ensayos de biotransformación son bastante inferiores a las utilizadas en los estudios de adsorción.

Si bien, las BAL son seguras para la industria alimentaria, los procesos de biodegradación pudiesen modificar las propiedades organolépticas de la matriz en que se encuentren, concluyendo que su uso en alimentos no es recomendable. A parte, la hidrólisis de la OTA genera un compuesto menos tóxico, que no deja de ser posiblemente dañino para el consumo. En cambio, la utilización de BAL como adsorbente, retiran la molécula completa del medio, más aún, si se encuentran térmicamente inactivas, tienen menos posibilidad de generar algún cambio en las propiedades de la matriz.

## 6. CONCLUSIÓN

Ocratoxina A es considerada un compuesto tóxico por varias instituciones reglamentarias, ya que existen diversos estudios que la clasifican como dañina para diferentes órganos, generando nefrotoxicidad, teratogenicidad, hepatotoxicidad, neurotoxicidad, inclusive con la información actual debería considerarse carcinogénica.

La presencia de OTA en los alimentos, se predispone según diferentes factores que facilita su contaminación por hongos productores de micotoxinas, afectando mayoritariamente productos vegetales como el café, derivados de cereales y el vino tinto. Asimismo, animales de ganado, al consumir OTA en la dieta, pueden presentar concentraciones considerables en sus tejidos y alimentos derivados. Para las personas, ya sea el consumo de productos directamente contaminados o por contaminación cruzada, puede inducir su acumulación en distintos órganos.

El uso de BAL vivas como muertas, presentan la propiedad de disminuir las concentraciones OTA en distintas matrices, siendo la adsorción el mecanismo más estudiado y efectivo. Incluso, las BAL inactivadas térmicamente presentan mejores resultados de remoción.

La propiedad de desintoxicar OTA por biotransformación es menor que la de adsorción, además su implementación en matrices reales se ve dificultada por el hecho de no remover compuestos derivados de OTA y su posible alteración en las propiedades organolépticas de los alimentos.

Las BAL se consideran un método innovador y efectivo en la remoción de OTA, siendo una técnica prometedora para la industria alimentaria, ya que son una alternativa inocua. Aunque su uso se ve dificultado, debido que, al ser microorganismos, estas no pueden estar presente en grandes cantidades en los alimentos. Por lo que una alternativa posible, sería su inmovilización en matrices poliméricas para su posterior remoción una vez cumplida su función.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

1. Paterson R, Venancio A, Lima N, Guilloux-Benatier M, Rousseaux S. Predominant mycotoxins, mycotoxigenic fungi and climate change related to wine. *Food Research International*. 2018;103:478-91.
2. Buszewska-Forajta M. Mycotoxins, invisible danger of feedstuff with toxic effect on animals. *Toxicon*. 2020;182:34-53.
3. Hassan M, Zareef M, Xu Y, Li H, Chen Q. SERS based sensor for mycotoxins detection: Challenges and improvements. *Food Chemistry*. 2021;344.
4. McCormick S. Microbial Detoxification of Mycotoxins. *Journal of Chemical Ecology*. 2013;39(7):907-18.
5. Pfliegler W, Pusztahelyi T, Pocsi I. Mycotoxins - prevention and decontamination by yeasts. *Journal of Basic Microbiology*. 2015;55(7):805-18.
6. He J, Zhang B, Zhang H, Hao L, Ma T, Wang J, et al. Monitoring of 49 Pesticides and 17 Mycotoxins in Wine by QuEChERS and UHPLC-MS/MS Analysis. *Journal of Food Science*. 2019;84(9):2688-97.
7. Mavrommatis A, Giamouri E, Tavrizelou S, Zacharioudaki M, Danezis G, Simitzis PE, et al. Impact of Mycotoxins on Animals' Oxidative Status. *Antioxidants*. 2021;10(2):214.
8. Pickova D, Ostry V, Malir J, Toman J, Malir F. A Review on Mycotoxins and Microfungi in Spices in the Light of the Last Five Years. *Toxins*. 2020;12(12).
9. Abrunhosa L, Ines A, Rodrigues A, Guimaraes A, Pereira V, Parpot P, et al. Biodegradation of ochratoxin A by *Pediococcus parvulus* isolated from Douro wines. *International Journal of Food Microbiology*. 2014;188:45-52.
10. el Khoury A, Atoui A. Ochratoxin A: General Overview and Actual Molecular Status. *Toxins*. 2010;2(4):461-93.
11. Tao Y, Xie S, Xu F, Liu A, Wang Y, Chen D, et al. Ochratoxin A: Toxicity, oxidative stress and metabolism. *Food and Chemical Toxicology*. 2018;112:320-31.
12. Abreu A, Armendariz C, Fernandez A, de la Torre A. OCHRATOXIN A IN FOODS FOR HUMAN CONSUMPTION: REVIEW. *Nutricion Hospitalaria*. 2011;26(6):1215-26.
13. Gu K, Ryu D, Lee H. Ochratoxin A and its reaction products affected by sugars during heat processing. *Food Chemistry*. 2021;348.

14. Gil-Serna J, Vazquez C, Gonzalez-Jaen M, Patino B. Wine Contamination with Ochratoxins: A Review. *Beverages*. 2018;4(1).
15. Remiro R, Ibanez-Vea M, Gonzalez-Penas E, Lizarraga E. Validation of a liquid chromatography method for the simultaneous quantification of ochratoxin A and its analogues in red wines. *Journal of Chromatography a*. 2010;1217(52):8249-56.
16. Malir F, Ostry V, Pfohl-Leszkowicz A, Malir J, Toman J. Ochratoxin A: 50 Years of Research. *Toxins*. 2016;8(7).
17. Huff WE, Hamilton PB. Mycotoxins—their biosynthesis in fungi: ochratoxins—metabolites of combined pathways. *Journal of Food Protection*. 1979;42(10):815-20.
18. Vega M, Rios G, von Baer D, Mardones C, Tessini C, Herlitz E, et al. Ochratoxin A occurrence in wines produced in Chile. *Food Control*. 2012;28(1):147-50.
19. Jilani K, Lupescu A, Zbidah M, Abed M, Shaik N, Lang F. Enhanced Apoptotic Death of Erythrocytes Induced by the Mycotoxin Ochratoxin A. *Kidney & Blood Pressure Research*. 2012;36(1):107-18.
20. Hope JH, Hope BE. A review of the diagnosis and treatment of Ochratoxin A inhalational exposure associated with human illness and kidney disease including focal segmental glomerulosclerosis. *Journal of environmental and public health*. 2012;2012.
21. Pastor L, Vettorazzi A, Guruceaga E, de Cerain A. Time Course of Renal Transcriptomics after Subchronic Exposure to Ochratoxin A in Fisher Rats. *Toxins*. 2021;13(3).
22. Kwekel J, Desai V, Moland C, Vijay V, Fuscoe J. Sex differences in kidney gene expression during the life cycle of F344 rats. *Biology of Sex Differences*. 2013;4.
23. Erceg S, Mateo E, Zipancic I, Jimenez F, Arago M, Jimenez M, et al. Assessment of Toxic Effects of Ochratoxin A in Human Embryonic Stem Cells. *Toxins*. 2019;11(4).
24. Zaied C, Bouaziz C, Azizi I, Bensassi F, Chour A, Bacha H, et al. Presence of ochratoxin A in Tunisian blood nephropathy patients. Exposure level to OTA. *Experimental and Toxicologic Pathology*. 2011;63(7-8):613-8.
25. Dragicevic B, Suvakov S, Jerotic D, Reljic Z, Djukanovic L, Zelen I, et al. Association of SOD2 (rs4880) and GPX1 (rs1050450) Gene Polymorphisms with Risk of Balkan Endemic Nephropathy and its Related Tumors. *Medicina-Lithuania*. 2019;55(8).

26. Damiano S, Longobardi C, Andretta E, Prisco F, Piegari G, Squillacioti C, et al. Antioxidative Effects of Curcumin on the Hepatotoxicity Induced by Ochratoxin A in Rats. *Antioxidants*. 2021;10(1).
27. Vettorazzi A, de Troconiz I, Gonzalez-Penas E, Arbillaga L, Corcuera L, Gil A, et al. Kidney and liver distribution of ochratoxin A in male and female F344 rats. *Food and Chemical Toxicology*. 2011;49(9):1935-42.
28. Shin H, Lee H, Pyo M, Ryu D, Lee K. Ochratoxin A-Induced Hepatotoxicity through Phase I and Phase II Reactions Regulated by AhR in Liver Cells. *Toxins*. 2019;11(7).
29. Petrik J, Zanic-Grubisic T, Barisic K, Pepeljnjak S, Radic B, Ferencic Z, et al. Apoptosis and oxidative stress induced by ochratoxin A in rat kidney. *Archives of Toxicology*. 2003;77(12):685-93.
30. Niaz K, Shah SZA, Khan F, Bule M. Ochratoxin A–induced genotoxic and epigenetic mechanisms lead to Alzheimer disease: its modulation with strategies. *Environmental Science and Pollution Research*. 2020:1-28.
31. Park S, Lim W, You S, Song G. Ochratoxin A exerts neurotoxicity in human astrocytes through mitochondria-dependent apoptosis and intracellular calcium overload. *Toxicology Letters*. 2019;313:42-9.
32. TAMARU M, HIRATA Y, MATSUTANI T. NEUROCHEMICAL EFFECTS OF PRENATAL TREATMENT WITH OCHRATOXIN-A ON FETAL AND ADULT-MOUSE BRAIN. *Neurochemical Research*. 1988;13(12):1139-47.
33. Razafimanjato H, Garmy N, Guo X, Varini K, Di Scala C, Di Pasquale E, et al. The food-associated fungal neurotoxin ochratoxin A inhibits the absorption of glutamate by astrocytes through a decrease in cell surface expression of the excitatory amino-acid transporters GLAST and GLT-1. *Neurotoxicology*. 2010;31(5):475-84.
34. Bhat P, Pandareesh M, Khanum F, Tamatam A. Cytotoxic Effects of Ochratoxin A in Neuro-2a Cells: Role of Oxidative Stress Evidenced by N-acetylcysteine. *Frontiers in Microbiology*. 2016;7.
35. Al-Anati L, Petzinger E. Immunotoxic activity of ochratoxin A. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*. 2006;29(2):79-90.
36. Marin-Kuan M, Cavin C, Delatour T, Schilter B. Ochratoxin A carcinogenicity involves a complex network of epigenetic mechanisms. *Toxicon*. 2008;52(2):195-202.

37. O'Brien E, Dietrich D. Ochratoxin A: The continuing enigma. *Critical Reviews in Toxicology*. 2005;35(1):33-60.
38. Tessitore L. Apoptosis and cell proliferation are involved in the initiation of liver carcinogenesis by a subnecrogenic dose of diethylnitrosamine in refed rats. *Journal of Nutrition*. 2000;130(1):104-10.
39. Pfohl-Leszkowicz A, Manderville R. An Update on Direct Genotoxicity as a Molecular Mechanism of Ochratoxin A Carcinogenicity. *Chemical Research in Toxicology*. 2012;25(2):252-62.
40. Kumar R, Ansari K, Chaudhari B, Dhawan A, Dwivedi P, Jain S, et al. Topical Application of Ochratoxin A Causes DNA Damage and Tumor Initiation in Mouse Skin. *Plos One*. 2012;7(10).
41. Jennings-Gee J, Tozlovanu M, Manderville R, Miller M, Pfohl-Leszkowicz A, Schwartz G. Ochratoxin A: In Utero Exposure in Mice Induces Adducts in Testicular DNA. *Toxins*. 2010;2(6):1428-44.
42. Herman D, Mantle P. Rat Tumour Histopathology Associated with Experimental Chronic Dietary Exposure to Ochratoxin A in Prediction of the Mycotoxin's Risk for Human Cancers. *Toxins*. 2021;13(3):205.
43. Joint FAO, Additives WHOECof. Safety evaluation of certain food additives and contaminants: World Health Organization; 2002.
44. Koszegi T, Poor M. Ochratoxin A: Molecular Interactions, Mechanisms of Toxicity and Prevention at the Molecular Level. *Toxins*. 2016;8(4).
45. Pfohl-Leszkowicz A, Manderville R. Ochratoxin A: An overview on toxicity and carcinogenicity in animals and humans. *Molecular Nutrition & Food Research*. 2007;51(1):61-99.
46. Il'ichev YV, Perry JL, Simon JD. Interaction of ochratoxin A with human serum albumin. Preferential binding of the dianion and pH effects. *The Journal of Physical Chemistry B*. 2002;106(2):452-9.
47. Ringot D, Chango A, Schneider Y, Larondelle Y. Toxicokinetics and toxicodynamics of ochratoxin A, an update. *Chemico-Biological Interactions*. 2006;159(1):18-46.

48. Kumar P, Mahato D, Sharma B, Borah R, Haque S, Mahmud M, et al. Ochratoxins in food and feed: Occurrence and its impact on human health and management strategies. *Toxicon*. 2020;187:151-62.
49. Bhat R, Rai R, Karim A. Mycotoxins in Food and Feed: Present Status and Future Concerns. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 2010;9(1):57-81.
50. Miraglia M, Brera C. Assessment of dietary intake of ochratoxin A by the population of EU member states. Reports on tasks for scientific cooperation Reports of experts participating in SCOOP Task. 2002;3(7).
51. Ottener H, Majerus P. Occurrence of ochratoxin A (OTA) in wines: influence of the type of wine and its geographical origin. *Food Additives & Contaminants*. 2000;17(9):793-8.
52. Marin S, Ramos A, Cano-Sancho G, Sanchis V. Mycotoxins: Occurrence, toxicology, and exposure assessment. *Food and Chemical Toxicology*. 2013;60:218-37.
53. Europea U. Contenido máximo de determinantes contaminantes en los productos alimenticios. Reglamento CE 1881/2006 de la Comisión. *Diario Oficial de la Unión Europea* 20.12. 2006. L364/5-L364/24; 2006.
54. Schrenk D, Bodin L, Chipman J, del Mazo J, Grasl-Kraupp B, Hogstrand C, et al. Risk assessment of ochratoxin A in food. *Efsa Journal*. 2020;18(5).
55. Mobashar M, Blank R, Hummel J, Westphal A, Tholen E, Südekum KH. Ruminant ochratoxin A degradation—Contribution of the different microbial populations and influence of diet. *Animal feed science and technology*. 2012;171(2-4):85-97.
56. Schiavone A, Cavallero C, Girotto L, Pozzo L, Antoniazzi S, Cavallarin L. A survey on the occurrence of ochratoxin A in feeds and sera collected in conventional and organic poultry farms in Northern Italy. *Italian Journal of Animal Science*. 2008;7(4):495-503.
57. Battacone G, Nudda A, Pulina G. Effects of Ochratoxin A on Livestock Production. *Toxins*. 2010;2(7):1796-824.
58. Giancarlo B, Elisabetta B, Edmondo C, Valeriana C, Giuseppina T. Determination of ochratoxin A in eggs and target tissues of experimentally drugged hens using HPLC–FLD. *Food chemistry*. 2011;126(3):1278-82.

59. Raiola A, Tenore G, Manyes L, Meca G, Ritieni A. Risk analysis of main mycotoxins occurring in food for children: An overview. *Food and Chemical Toxicology*. 2015;84:169-80.
60. Studer-Rohr I, Schlatter J, Dietrich D. Kinetic parameters and intraindividual fluctuations of ochratoxin A plasma levels in humans. *Archives of Toxicology*. 2000;74(9):499-510.
61. de la Unión Europea DO. Reglamento (UE) No 488/2014 de la Comisión del 12 de mayo de 2014 que modifica el Reglamento (CE) N 1881/2006 por lo que respecta al contenido máximo de cadmio en los productos alimenticios. *Diario Oficial de la Unión Europea*. 13 de mayo de 2014. L138/75-79; 2014.
62. De CDELCSC. PROGRAMA CONJUNTO FAO/OMS SOBRE NORMAS ALIMENTARIAS COMISIÓN DEL CODEX ALIMENTARIUS 37. o período de sesiones Ginebra (Suiza), 14-18 de julio de 2014. 2014.
63. Ministerio de Salud de C. Reglamento Sanitario de los Alimentos. Ediciones Publibey; 2001.
64. Europea U. Reglamento (UE) No 420/2011 de la Comisión, de 29 de abril de 2011, que modifica el Reglamento (CE) No 1881/2006, por el que se fija el contenido máximo de determinados contaminantes en los productos alimenticios. *D Of Unión Eur L*. 2011;111:3-6.
65. Muñoz K, Campos V, Blaszkewicz M, Vega M, Alvarez A, Neira J, et al. Exposure of neonates to ochratoxin A: first biomonitoring results in human milk (colostrum) from Chile. *Mycotoxin research*. 2010;26(2):59-67.
66. Munoz K, Blaszkewicz M, Campos V, Vega M, Degen G. Exposure of infants to ochratoxin A with breast milk. *Archives of Toxicology*. 2014;88(3):837-46.
67. Ikoma T, Tsuchiya Y, Asai T, Okano K, Ito N, Endoh K, et al. Ochratoxin A contamination of red chili peppers from Chile, Bolivia and Peru, countries with a high incidence of gallbladder cancer. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*. 2015;16(14):5987-91.
68. MINSAL. Sistema alertas minsal. Alerta sanitaria por merken gourmet: INOFOOD; 2017.

69. Galarce-Bustos O, Alvarado M, Vega M, Aranda M. Occurrence of ochratoxin A in roasted and instant coffees in Chilean market. *Food Control*. 2014;46:102-7.
70. MINSAL. Ministerio de salud informa alerta alimentaria por presencia de sustancia contaminante en dos lotes de cafe. In: micotoxinas pndvd, editor. 2017.
71. Aylwin H. Reporte de notificaciones 2016. 2017.
72. Varga J, Kocsube S, Peteri Z, Vagvolgyi C, Toth B. Chemical, Physical and Biological Approaches to Prevent Ochratoxin Induced Toxicoses in Humans and Animals. *Toxins*. 2010;2(7):1718-50.
73. Varga J, Rigó K, Téren J. Degradation of ochratoxin A by *Aspergillus* species. *International journal of food microbiology*. 2000;59(1-2):1-7.
74. Sadiq FA, Yan B, Tian F, Zhao J, Zhang H, Chen W. Lactic Acid Bacteria as Antifungal and Anti-Mycotoxigenic Agents: A Comprehensive Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 2019;18(5):1403-36.
75. Dalie D, Deschamps A, Richard-Forget F. Lactic acid bacteria - Potential for control of mould growth and mycotoxins: A review. *Food Control*. 2010;21(4):370-80.
76. Hatti-Kaul R, Chen L, Dishisha T, El Enshasy H. Lactic acid bacteria: from starter cultures to producers of chemicals. *Fems Microbiology Letters*. 2018;365(20).
77. Ahlberg S, Joutsjoki V, Korhonen H. Potential of lactic acid bacteria in aflatoxin risk mitigation. *International Journal of Food Microbiology*. 2015;207:87-102.
78. Chapot-Chartier M, Kulakauskas S. Cell wall structure and function in lactic acid bacteria. *Microbial Cell Factories*. 2014;13.
79. Piotrowska M. The Adsorption of Ochratoxin A by *Lactobacillus* Species. *Toxins*. 2014;6(9):2826-39.
80. Niderkorn V, Morgavi DP, Aboab B, Lemaire M, Boudra H. Cell wall component and mycotoxin moieties involved in the binding of fumonisin B1 and B2 by lactic acid bacteria. *Journal of Applied Microbiology*. 2009;106(3):977-85.
81. Mateo E, Medina A, Mateo F, Valle-Algarra F, Pardo I, Jimenez M. Ochratoxin A removal in synthetic media by living and heat-inactivated cells of *Oenococcus oeni* isolated from wines. *Food Control*. 2010;21(1):23-8.

82. Khattab A, Ibrahim M, El-Kady A. Ochratoxin A biosorption onto genetically improved of *Lactobacillus delbrueckii* mutants. *International Food Research Journal*. 2018;25(2):515-22.
83. Luz C, Ferrer J, Manes J, Meca G. Toxicity reduction of ochratoxin A by lactic acid bacteria. *Food and Chemical Toxicology*. 2018;112:60-6.
84. Haskard CA, El-Nezami HS, Kankaanpää PE, Salminen S, Ahokas JT. Surface binding of aflatoxin B1 by lactic acid bacteria. *Applied and environmental microbiology*. 2001;67(7):3086-91.
85. Fuchs S, Sontag G, Stidl R, Ehrlich V, Kundi M, Knasmüller S. Detoxification of patulin and ochratoxin A, two abundant mycotoxins, by lactic acid bacteria. *Food and Chemical Toxicology*. 2008;46(4):1398-407.
86. Li S, Marquardt R, Frohlich A, Vitti T, Crow G. Pharmacokinetics of ochratoxin A and its metabolites in rats. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 1997;145(1):82-90.