

CARBAMATO DE ETILO EN VINOS TINTOS Y SU RELACION CON EL ENVEJECIMIENTO Y LA ACTIVIDAD BACTERIANA

C.A. Uthurry y J.A. Suárez Lepe

Departamento de Tecnología de Alimentos, E.T.S.Ing. Agrónomos, Universidad Politécnica de Madrid. Ciudad Universitaria S/N, (28040) Madrid, España.

*Autor de contacto: TEL: +34-91.336.57.50; FAX: +34-91.336.57.46; E-MAIL:
carlos_uthurry@yahoo.com.ar.

Palabras clave: picado láctico, bacterias lácticas, carbamato de etilo, envejecimiento.

RESUMEN

Durante el envejecimiento de vinos tintos la formación de carbamato de etilo a partir de la etanólisis de la urea procedente del metabolismo nitrogenado de levaduras (Monteiro *et al.*, 1989), y/o de compuestos carbamílicos derivados del metabolismo de bacterias lácticas (Arena *et al.*, 1999) constituye un fenómeno conocido. El uso de bacterias lácticas seleccionadas con escasa o ninguna expresión del sistema enzimático de la arginina-desaminasa (ADI), ha sido recomendado para gestionar las fermentaciones malolácticas (Uthurry *et al.*, 2006). Sin embargo, puede existir una tercera posibilidad de formación de carbamato de etilo, debido a la presencia de azúcares residuales y la tendencia a no practicar la filtración amicróbica en tintos de calidad, operación que les haría perder atributos organolépticos de interés. Los azúcares residuales pueden significar alteraciones bacterianas como el picado láctico, conducido en general por bacterias lácticas heterofermentativas que, en el caso de poseer actividad ADI, podrían sintetizar precursores carbamílicos a partir de la arginina, potenciales de sufrir etanólisis. En el presente trabajo se investigaron los niveles de uretano en dos grupos de muestras de vinos envejecidos y varios índices analíticos (lactato de etilo, acidez volátil, ácido láctico), indicadores de actividad microbiana. Los análisis de componentes principales demostraron fuertes correlaciones entre la concentración de carbamato de etilo y los niveles de dichos parámetros indicadores del desarrollo bacteriano. Los datos obtenidos y el estudio de la microbiota presente, revelaron que algunos vinos eran afectados por picado láctico. En general, el contenido en carbamato de etilo de las muestras estudiadas superó ampliamente el límite legal establecido por Canadá (30 µg/L), lo que sugiere un riguroso control de los azúcares residuales en vinos tintos de calidad.

INTRODUCCION

El carbamato de etilo (uretano) es una sustancia soluble en agua, etanol y en otros disolventes orgánicos. Tiene un índice DL₅₀ en el conejo de 2 g/Kg., y es utilizado desde hace tiempo como anestésico en veterinaria. En ratas y ratones se ha demostrado su capacidad de inducir la aparición de tumores pulmonares. De la experimentación con animales de laboratorio se ha estimado la dosis diaria “sin efectos” para el hombre en 0,3 ppb/Kg. de peso corporal (Schlatter, 1986, Zimmerli *et al.*, 1986).

Los problemas de salud que se originan por una sustancia como el carbamato de etilo pueden aparecer a largo plazo, dependiendo su efecto, de factores como la ingesta, la susceptibilidad del individuo, y su toxicidad intrínseca. Es importante reconocer que la aparición de efectos tóxicos debidos a una sustancia, no depende exclusivamente de su toxicidad, sino directamente de su ingesta. Así, una determinada sustancia con una toxicidad intrínseca definida es tanto más tóxica cuanto mayor sea la dosis ingerida. En general las sustancias carcinogénicas están encuadradas en el grupo de las que originan *toxicidad crónica*, y el carbamato de etilo es una de ellas. Aunque se conoce su potencial carcinogénico (Sotomayor *et al*, 1990) en animales de experimentación, la información en humanos todavía puede considerarse insuficiente (Schlatter *et al*, 1990), lo que incrementa y justifica el interés de su investigación.

A principios de los años 70' s la revista *Science* denunció por primera vez la presencia en las bebidas alcohólicas de carbamato de etilo o uretano. Dado que la presencia de carbamato de etilo en las bebidas no ofrecía ninguna ventaja tecnológica, se excluyó la hipótesis de la adición fraudulenta de esta sustancia y se empezaron a investigar las causas de la formación de uretano. Como precursor del uretano fue indicado el pirocarbonato de dietilo (DEPC, diethylpyrocarbonate) o dicarbonato de dietilo (DEDC, diethyldicarbonate), empleado como fungicida para simular una pasteurización en frío de los vinos, ofreciendo buenas propiedades para su estabilización biológica, especialmente en dulces. En consecuencia, su uso en la industria alimentaria fue prohibido (Suarez *et al*, 2004).

De acuerdo con la revisión que de este tema llevaron a cabo Trioli y Colagrande (1991), del uretano no se volvió a hablar más durante algunos años, hasta que en 1985, un organismo provincial canadiense, el *Liquor Control Board of Ontario*, encontró en algunos vinos y en otras bebidas alcohólicas cantidades significativas de carbamato de etilo. Entre las bebidas analizadas sobresalían por su elevado contenido los aguardientes de fruta de hueso (ciruela y cereza), donde se encontraron hasta 3200 ppb ($\mu\text{g/L}$) de uretano. Posteriormente, un organismo federal canadiense, la *Health Protection Branch*, definió los contenidos máximos permitidos de la sustancia en bebidas alcohólicas, estableciendo para vinos de mesa el valor de 30 ppb.

Diferentes administraciones han establecido unos límites para la concentración de carbamato de etilo. Así, el Comité Codex de la FAO/OMS sobre aditivos alimentarios y contaminantes estableció en 1993 un máximo de referencia de 30 ppb en vinos de mesa. La legislación en los Estados Unidos regula su límite a un máximo de 15 ppb (US FDA, 2000).

Un programa de investigación francés llevado a cabo sobre más de 2000 muestras ha demostrado que el carbamato de etilo está presente en todos los vinos (Bertrand *et al*, 1991).

Los estudios realizados por Ough (1976) demostraron que el carbamato de etilo puede formarse naturalmente en el vino a través de la fermentación, y los mismos dieron origen a numerosas investigaciones que evidenciaron su formación como consecuencia de la fermentación maloláctica y el envejecimiento.

Es su 64º reunión en febrero de 2005, el Comité Experto FAO/OMS en aditivos alimentarios (JEFCA) consideró especial atención para el carbamato de etilo y elaboró un informe en el que se aconseja garantizar las buenas prácticas de elaboración con el objetivo de reducir el contenido en carbamato de etilo en bebidas alcohólicas (Food Standards Agency, 2005). La *Food Standards Agency* en el Reino Unido, en su estudio de los contenidos de carbamato de etilo en diferentes alimentos de consumo cotidiano en aquél país, informó que el vino generalmente contiene niveles de carbamato de etilo cuantificables. Siete de los trece vinos de mesa analizados presentaron concentraciones de carbamato de etilo comprendidas entre 11 ppb y 24 ppb, sin diferencias aparentes entre vinos tintos y blancos (Food Standards Agency, 2005).

Nuestro estudio de dos muestras de vinos envejecidos durante diferentes períodos sugirió la existencia de una relación entre ciertas enfermedades de origen bacteriano como el “picado láctico” con el contenido de carbamato de etilo. Estos resultados indican que podría formarse carbamato de etilo durante el desarrollo de la enfermedad láctica en vinos.

MATERIALES Y METODOS

Vinos

Los vinos antiguos fueron cordialmente aportados por la *Escuela de la Vid e Industrias Lácteas de Madrid* (Madrid, España). Se dividieron en dos grupos en función de su edad, obteniéndose un grupo de vinos de entre 6 y 10 años, y otro de entre 36 y 70 años. El muestreo de vinos dentro de un rango de edades más acotado resultó complicado debido a la escasez de muestras que cumpliesen con tal requisito, por lo que, con el objetivo de obtener resultados estadísticamente más fiables, se procedió a formar grupos más amplios. Así, el primer grupo estuvo formado por 13 observaciones ($n = 13$) y el segundo por 16 observaciones ($n = 16$).

Análisis químicos

La glicerina presente en los vinos se determinó mediante el método enzimático de Boehringer-Mannheim (Roche, R-Biopharm GmbH, D-64293 Darmstadt, Germany). Las determinaciones espectrofotométricas del método se realizaron con un equipo Jasco V-530 de doble haz.

Los ácidos orgánicos tartárico, málico y láctico fueron determinados por HPLC según procedimiento interno, empleando un cromatógrafo HPLC Waters 600E con inyector automático Waters 717 Plus, y un detector PDA Waters 996 (Waters, Milford, MA 01757, USA). Este procedimiento interno utilizó una columna cromatográfica *Fast Fruit Juice*, con una fase móvil levemente ácida de ácido fosfórico H_3PO_4 al 1‰.

La composición en compuestos volátiles (lactato de etilo, ácido acético, acetato de etilo, etc.) se determinó por cromatografía de gases, con un equipo HP 5890 Series II con detector FID (CG/FID) (Hewlett Packard Company, USA), según procedimiento de calibración con estándar interno (4- metil 2- pentanol).

La medición de la concentración de carbamato de etilo en las muestras de vinos, al igual que en los capítulos anteriores, se realizó de acuerdo al *Procedimiento Normalizado de Trabajo PNT*, convalidado internamente por el *Laboratorio Arbitral del Estado Español* (MAPYA).

Análisis estadístico

Las metodologías estadísticas empleadas fueron los análisis multivariantes de componentes principales (ACP) y de clasificación jerárquica (CLUSTER).

Los programas estadísticos empleados fueron *Stat-itcf* (*Institut Technique des Céréales et des Fourrages*, 8 Avenue du Président Wilson, 75116 Paris, France), y *Statgraphics 4.0* (Manugistics, Inc., 9715 Key West Avenue, Rockville, MD, 20850, USA).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Análisis estadístico del grupo de vinos de 6 a 10 años

Los resultados más relevantes del análisis químico de estos vinos se muestran en la Tabla I.

Tabla I. Concentraciones de carbamato de etilo y de los compuestos de mayor interés de los vinos de entre 6 y 10 años

| Código vino | Ác. acético (mg/L) | Ác. láctico (g/L) | Acetato de etilo (mg/L) | Lactato de etilo (mg/L) | Carbamato de etilo (μg/L) |
|-------------|--------------------|-------------------|-------------------------|-------------------------|---------------------------|
| 20 | 1223.6 | 5.10 | 80.9 | 191.8 | 22.8 |
| 24 | 1645.9 | 4.88 | 119.1 | 145.2 | 26.9 |
| 25 | 1656.1 | 4.10 | 11.7 | 281.2 | 126.2 |
| 26 | 1595.8 | 4.78 | 123.1 | 142.1 | 24.0 |
| 27 | 2837.6 | 9.49 | n.d. | 486.5 | 7.8 |
| 29 | 1439.8 | 9.72 | 113.4 | 242.1 | 7.3 |
| 31 | 1508.3 | 7.71 | 124.4 | 202.1 | 28.3 |
| 33 | 1596.4 | 4.88 | 106.6 | 142.1 | 38.5 |
| 34 | 1434.4 | 3.78 | 104.4 | 112.8 | 32.4 |
| 35 | 3710.7 | 7.29 | 8.6 | 740.9 | 231.0 |
| 36 | 1350.2 | 7.60 | 109.0 | 198.0 | 34.6 |
| 37 | 2867.1 | 7.23 | 239.6 | 495.8 | 212.8 |
| 42 | 1280.8 | 3.72 | 131.5 | 111.7 | 35.3 |

El estudio por ACP de todas las variables analizadas en la muestra reveló correlaciones positivas fuertes entre el contenido de carbamato de etilo y las concentraciones de lactato de etilo y ácido acético. Los coeficientes de correlación fueron de 0.763 y 0.746 respectivamente. A su vez, se pudo apreciar una fuerte correlación positiva entre estas dos variables (0,958). La representación tridimensional de la nube de puntos-variables se puede apreciar en la Figura I.

Gráfico 3D del círculo de correlaciones

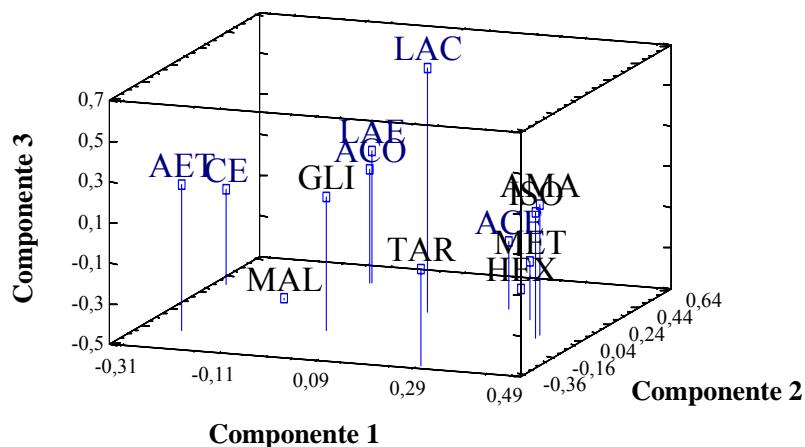


Figura I. Gráfico tridimensional de la nube de puntos-variables

En la representación tridimensional de la nube de puntos-variables puede apreciarse la mínima distancia entre el lactato de etilo y el ácido acético, y la proximidad de sus puntos representativos con el del carbamato de etilo.

El estudio de las observaciones (vinos), se llevó a cabo complementando el análisis de componentes principales, con un análisis de clasificación automática o “cluster” del grupo. El dendrograma generado por este análisis (Figura II) ha permitido definir los grupos de vinos con similares características que aparecen en la proyección de las observaciones sobre el primer plano factorial. La interpretación de estos resultados sobre la proyección de la nube de puntos-observaciones se muestra en la Figura III.

Dendrograma

Método "Furthest Neighbour". Distancia euclídea al cuadrado.

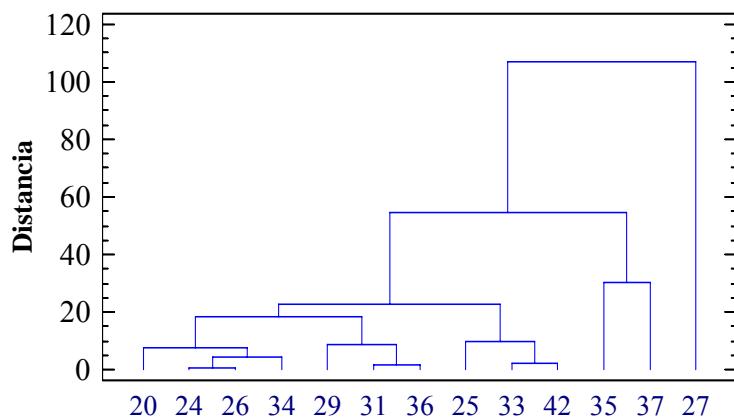


Figura II. Dendrograma del grupo de vinos de 6 a 10 años de antigüedad

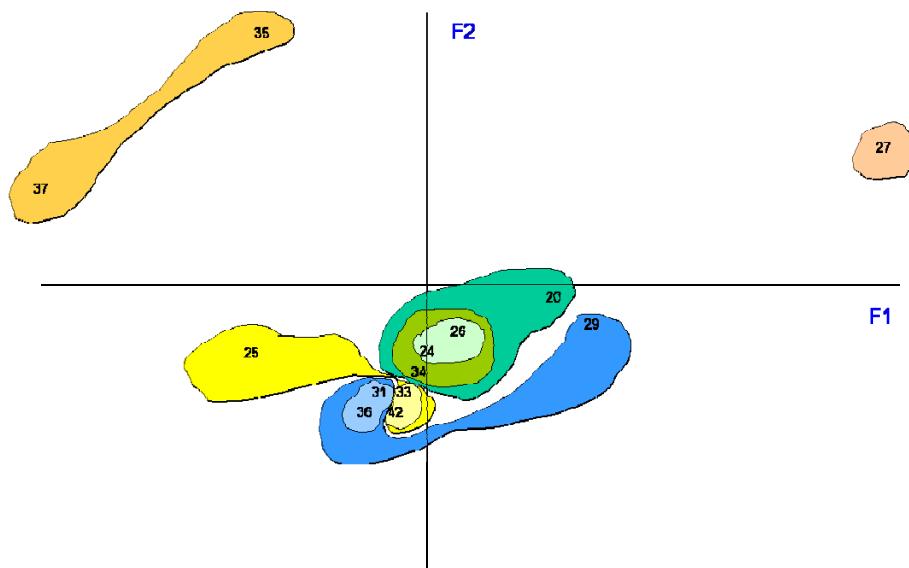


Figura III. Proyección de las observaciones en el primer plano factorial y agrupamiento de los vinos analizados

Se observó que los vinos agrupados en el 4º cuadrante del primer plano factorial (muestras 35 y 37) se caracterizaron por el altísimo contenido en carbamato de etilo ($230.0 \mu\text{g/L}$ y $212.8 \mu\text{g/L}$, respectivamente) y tanto de una elevada acidez volátil como de concentraciones significativas de lactato de etilo.

La observación microscópica de una suspensión de los precipitados obtenidos tras la centrifugación de ambas muestras corroboró la presencia de un gran número de bacterias lácticas de forma bacilar repartidas por todo el campo visual, sugiriendo, en concordancia con los resultados analíticos observados, enfermedades bacterianas como el “picado láctico”.

Dado que el “picado láctico” de los vinos implica la fermentación bacteriana de los azúcares residuales con fines energéticos, los resultados obtenidos sugieren que, en función del carácter fermentativo de las bacterias implicadas, de la concentración de azúcares y de arginina en el vino final, aquéllas podrían incluso haber metabolizado a esta última produciendo ATP y precursores carbamílicos como la citrulina y el fosfato de carbamilo (Mira de Orduña *et al*, 2000), susceptibles de sufrir etanolisis.

Análisis estadístico del grupo de vinos de 36 a 70 años

Los resultados más interesantes del análisis químico de estos vinos se muestran en la Tabla II.

Tabla II. Concentraciones de carbamato de etilo y de los compuestos de mayor interés de los vinos de entre 36 y 70 años

| Código vino | Ác. acético (mg/L) | Ác. láctico (g/L) | Acetato de etilo (mg/L) | Lactato de etilo (mg/L) | Carbamato de etilo (µg/L) |
|-------------|-----------------------|-------------------|----------------------------|----------------------------|------------------------------|
| 63 | 3322.9 | 4.56 | 119.4 | 192.6 | 26.2 |
| 64 | 3520.1 | 6.04 | 88.0 | 299.6 | 84.1 |
| 71 | 2734.9 | 3.65 | 95.6 | 130.5 | 56.2 |
| 72 | 2596.8 | 3.63 | 92.1 | 116.1 | 50.1 |
| 76 | 2925.9 | 3.64 | 17.0 | 130.3 | 46.8 |
| 48 | 1135.9 | 2.69 | 89.7 | 995.2 | 31.0 |
| 49 | 882.1 | 2.68 | 60.4 | 501.2 | 27.3 |
| 86 | 2973.3 | 4.49 | 20.1 | 268.6 | 41.6 |
| 125 | 2946.2 | 6.50 | 18.9 | 305.2 | 98.8 |
| 92 | 3116.2 | 3.51 | 35.8 | 60.4 | 40.2 |
| 10 | 1322.1 | 6.04 | 92.5 | 288.1 | 95.5 |
| 120 | 5922.5 | 4.56 | 45.2 | 240.4 | 99.0 |
| 18 | 1608.1 | 4.43 | 139.2 | 185.7 | 48.4 |
| 7 | 2275.7 | 7.00 | 183.2 | 403.5 | 104.7 |
| 6 | 1774.7 | 5.84 | 117.5 | 163.7 | 52.1 |
| 16 | 1524.7 | 4.10 | 124.4 | 114.8 | 54.5 |

El estudio por ACP de esta muestra de vinos demostró una correlación positiva fuerte entre el carbamato de etilo y el ácido láctico, con un coeficiente de 0,787. No sucede lo mismo para el ácido acético, con un coeficiente de correlación de 0,361. Para el resto de las variables no se observaron correlaciones importantes. La representación de la nube de puntos-variables se observa en la Figura IV.

Gráfico 3D del círculo de correlaciones

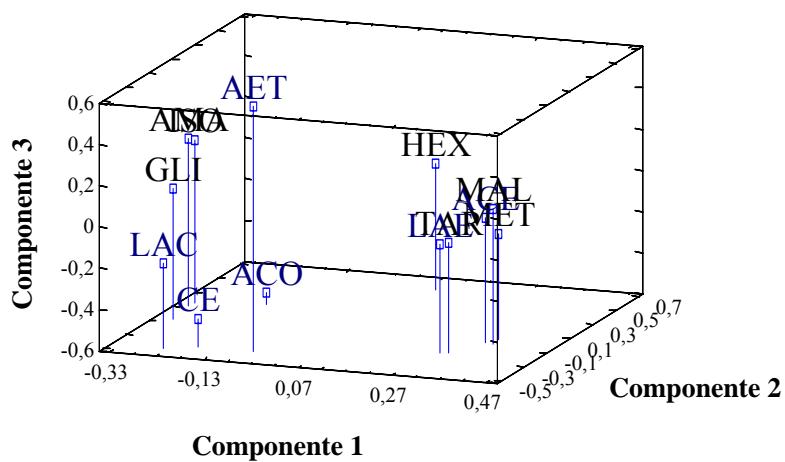


Figura IV. Gráfico tridimensional de la nube de puntos-variables

En efecto, se observa la proximidad espacial entre los puntos representativos del carbamato de etilo y del ácido láctico, siendo variables que tienen una correcta representación en el primer plano principal.

En el estudio de los vinos mediante el análisis de clasificación “cluster”, pudo predecirse la existencia de grupos bien compactos que resaltan la falta de homogeneidad de la muestra. El dendrograma obtenido se observa en la figura V.

Dendrograma

Método "Furthest Neighbour". Distancia euclídea al cuadrado.

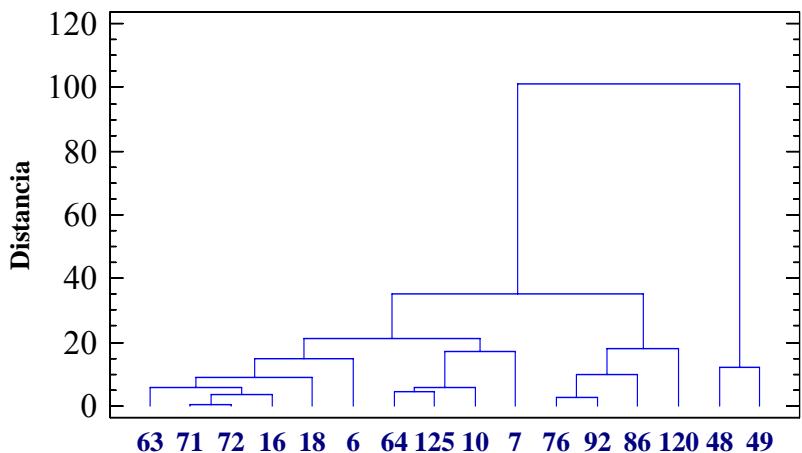


Figura V. Dendrograma del grupo de vinos de 36 a 70 años de antigüedad

La figura VI muestra la proyección de la nube de puntos-observaciones sobre el primer plano factorial y los grupos definidos tras el análisis de clasificación.

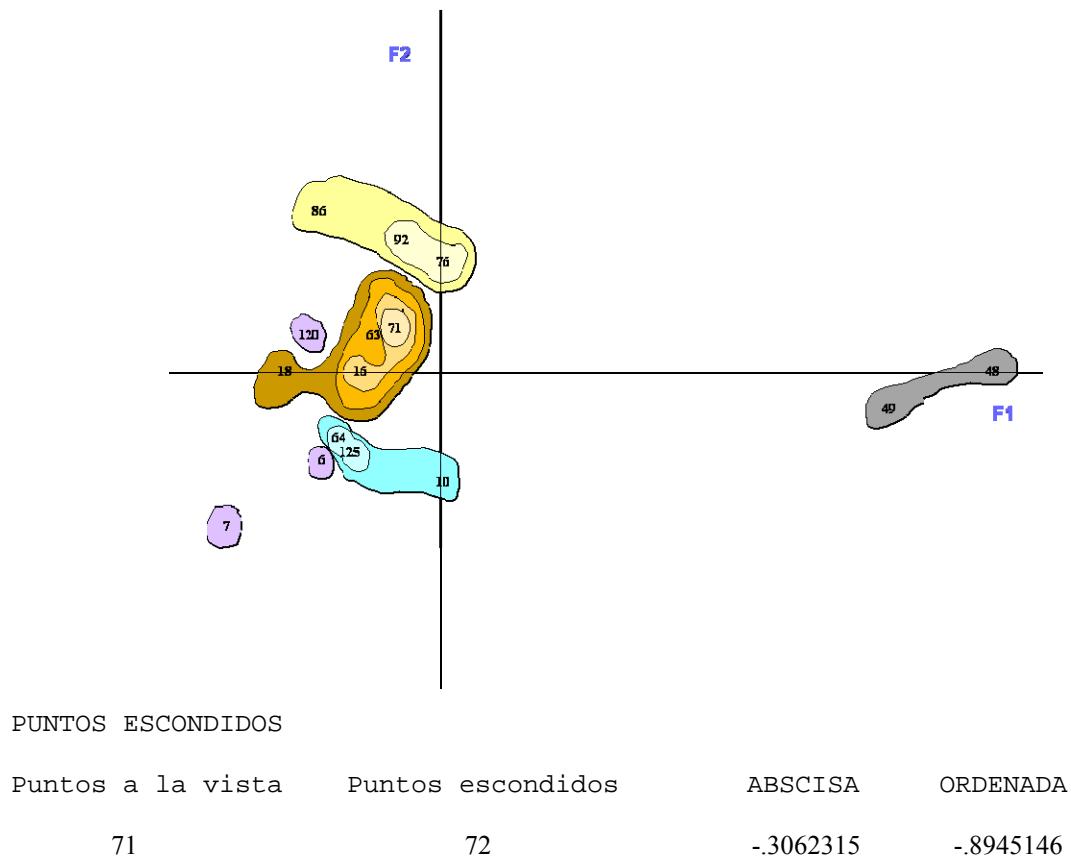


Figura VI. Proyección de las observaciones en el primer plano factorial y agrupamiento de los vinos analizados

En este caso, el truncamiento de la jerarquía durante el proceso de agrupamiento permitió diferenciar nítidamente dos vinos (muestras 48 y 49) que se caracterizaron por su elevado contenido en ácido málico (en torno a 10 g/L). El vino codificado como 7 quedó bien diferenciado en el 3º cuadrante del primer plano factorial debido a sus elevados contenidos en ácido láctico y carbamato de etilo (104.7 µg/L).

Al igual que en el grupo de vinos más jóvenes analizado anteriormente (6 a 10 años) se observó una intensa correlación entre un parámetro indicador de actividad fermentativa por bacterias, en este caso el ácido láctico, con el contenido de carbamato de etilo, sugiriendo el posible metabolismo de arginina vía ADI-conducente a la formación de compuestos carbamilicos-tras la fermentación láctica de los azúcares.

CONCLUSIONES

Los resultados de los análisis químicos y de las observaciones microscópicas de las muestras de vinos envejecidos estudiadas demostraron caldos que a lo largo de sus períodos de envejecimiento adquirieron enfermedades bacterianas como el “picado láctico”. De acuerdo con los datos analíticos de acidez volátil y de ácido láctico, se sugirió esa enfermedad como causa de la significativa alteración de las muestras.

Los análisis estadísticos aplicados a los datos de composición obtenidos revelaron correlaciones positivas fuertes tanto del carbamato de etilo con el ácido acético y el lactato de etilo, como con el ácido láctico, sugiriendo la posible participación bacteriana en el incremento de los niveles de uretano a lo largo del tiempo.

Esta participación de las bacterias lácticas responsables del deterioro de los vinos puede explicarse si los niveles de azúcares y de arginina en el vino embotellado estuvieron en una relación tal que, tras el agotamiento de los primeros, los microorganismos (ADI +) recurrieron a la segunda para la obtención de energía. Estos resultados sugieren la presencia de arginina en los vinos embotellados, al igual que la falta de tratamientos de filtración amicróbica adecuados que garantizaran la estabilidad microbiológica de los caldos.

Si bien un vino enfermo por “picado láctico” sería ampliamente rechazado por el consumidor, este trabajo demuestra nuevamente, que es necesario controlar los niveles finales de aminoácidos como la arginina, de cara a minimizar la formación de carbamato de etilo en vinos sin suficiente estabilidad microbiológica.

Las concentraciones de carbamato de etilo de los vinos analizados superaron ampliamente en su mayoría el límite legal establecido por Canadá (30 µg/L).

No obstante, con el fin de reforzar estas conclusiones sería recomendable estudiar un mayor número de muestras de vinos de las edades estudiadas, o bien grupos de edades diferentes más homogéneos e integrados por un mayor número de vinos.

LITERATURA

Arena, M.E., Saguir, F.M. y Manca de Nadra, M.C. (1999). Arginine, citrulline and ornithine metabolism by lactic acid bacteria from wine. *International Journal of Food Microbiology*, 52, págs. 155-161.

Bertrand, A. (1991). *Connaissance de la Vigne et du Vin*, 22 (11), págs. 39-47. Citado por Suárez en *Microbiología Enológica. Fundamentos de Vinificación (3º edición)*.

Food Standards Agency, Chemical Safety Division (2005). Survey of ethyl carbamate in food and beverages. Internet: <http://www.food.gov.uk>.

Laboratorio Arbitral del Estado Español (Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación – MAPYA- de España). *Procedimiento Normalizado de Trabajo* (PNT). Padre Buidobro s/n, Aravaca, (28023) Madrid, España.

Mira de Orduña, R., Liu, S.-Q., Patchet, M.L. y Pilone, G.J. (2000). Kinetics of the arginine metabolism of malolactic wine lactic acid bacteria *Lactobacillus buchneri* CUC-3 and *Oenococcus oeni* Lo111. *Journal of Applied Microbiology*, 89, págs. 547-552.

Monteiro, F.F., Trousdale, E.K. y Bisson, L.F. (1989). Ethyl Carbamate Formation in Wine: Use of Radioactively Labeled Precursors to Demonstrate the Involvement of Urea *American Journal of Enology and Viticulture*, 1, 40, págs. 1-8.

Ough, C.S. (1976). Ethylcarbamate in Fermented Beverages and Foods. I. Naturally Ocurring Ethylcarbamate. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 2, 24, págs. 323-327.

Schlatter, J. (1986). The toxicity of urethane (ethylcarbamate). *Proceedings Eurotox.*, Zurigo, págs. 249-254.

Schalatter, J. y Lutz, W.K. (1990). The carcinogenic potential of ethyl carbamate (urethane): risk assessment at human dietary exposure levels. *Food Chem. Toxicol.*, 28, págs. 205-211.

Sotomayor, R.E. y Collins, T.F.X. (1990). Mutagenicity, metabolism, and DNA interactions of urethane. *Toxicol. Ind. Health*, Jan., 1 (6), págs. 71-108.

Suárez Lepe, J.A. e Iñigo Leal, B. (2004). *Microbiología Enológica. Fundamentos de Vinificación*. 3' Edición. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid.

Trioli, G. y Colagrande, O. (1991-2). El carbamato de etilo en el vino. *Vitivinicultura*, págs . 45-49.

U.S. Food and Drug Administration, Center for Food Safety and Nutrition. (Actualizado al 17/03/2000). Information on Ethyl Carbamate (Urethane) in Foods and Beverages. Internet: www.cfsan.fda.gov/~frf/ecintro.html.

Uthurry, C.A.; Varela, F.; Colomo, B.; Suárez Lepe, J.A.; Lombardero, J. y García del Hierro, J.R. (2004). Ethyl carbamate concentrations of typical Spanish red wines. *Food Chemistry.*, 88, págs. 329-336.

Uthurry, C.A.; Suárez Lepe, J.A.; Lombardero, J. y García del Hierro, J.R. (2007). Ethyl carbamate production induced by selected yeasts and lactic acid bacteria in red wine (Erratum to *Food Chemistry*, 94 (2006), págs. 262-270). Prueba corregida.

Zimmerli, B. (1986). *Proceedings Eurotox.*, Zurigo, págs. 243-248. Citado por TRIOLI en *Vitivinicultura* (1991-2), págs . 45-49.