



**DETERMINACIÓ ANALÍTICA DE 2,4,6-TICLOROANISOLE I ALTRES
CLOROANISOLES EN VINS I SUROS**
Marc Riu Rusell

ISBN: 9788469432358
Dipòsit Legal: T. 1044-2011

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tesisenxarxa.net) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tesisenred.net) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tesisenxarxa.net) service has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized neither its spreading and availability from a site foreign to the TDX service. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service is not authorized (framing). This rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
DETERMINACIÓ ANALÍTICA DE 2,4,6-TRICLOROANISOLE I ALTRES CLOROANISOLES
EN VINS I SUROS
Marc Riu Rusell
ISBN:9788469432358/DL:T. 1044-2011

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
DETERMINACIÓ ANALÍTICA DE 2,4,6-TRICLOROANISOLE I ALTRES CLOROANISOLES
EN VINS I SUROS
Marc Riu Rusell
ISBN:9788469432358/DL:T. 1044-2011

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
DETERMINACIÓ ANALÍTICA DE 2,4,6-TRICLOROANISOLE I ALTRES CLOROANISOLES
EN VINS I SUROS
Marc Riu Rusell
ISBN:9788469432358/DL:T. 1044-2011



Departament de Química Analítica i Química Orgànica
Àrea de Química Analítica

**DETERMINACIÓ ANALÍTICA DE
2,4,6-TRICLOROANISOLE
I ALTRES CLOROANISOLES
EN VINS I SUROS**

Memòria presentada per
MARC RIU i RUSELL
per assolir el grau de
Doctor

Tarragona, març de 2011

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
DETERMINACIÓ ANALÍTICA DE 2,4,6-TRICLOROANISOLE I ALTRES CLOROANISOLES
EN VINS I SUROS
Marc Riu Rusell
ISBN:9788469432358/DL:T. 1044-2011



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

DEPARTAMENT DE QUÍMICA ANALÍTICA
I QUÍMICA ORGÀNICA

C/ Marcel·lí Domingo s/n
Campus Sescelades
43007 Tarragona
Tel. 34 977 55 97 69
Fax 34 977 55 84 46
e-mail: secqaqo@urv.cat

La Dra. Montserrat Mestres Solé, Professora Agregada, i la Dra. Olga Busto Busto, Titular d'Universitat, membres del Departament de Química Analítica i Química Orgànica, a la Facultat d'Enologia de Tarragona de la Universitat Rovira i Virgili,

CERTIFIQUEN

Que el treball aquí presentat i que duu per títol *Determinació analítica de 2,4,6-tricloroanisole i altres cloroanisoles en vins i suros*, ha estat realitzat per en Marc Riu i Rusell, sota la direcció de les sotasignants, en el Grup de Química Analítica Enològica i dels Aliments del Departament de Química Analítica i Química Orgànica d'aquesta Universitat i que tots els resultats presentats són fruit de les experiències per ell realitzades.

Tarragona, 21 de gener de 2011

Dra. Montserrat Mestres i Solé

Dra. Olga Busto Busto

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
DETERMINACIÓ ANALÍTICA DE 2,4,6-TRICLOROANISOLE I ALTRES CLOROANISOLES
EN VINS I SUROS
Marc Riu Rusell
ISBN:9788469432358/DL:T. 1044-2011



Aquest treball ha constituït una de les línies de recerca del Grup de Química Analítica Enològica i dels Aliments de la Universitat Rovira i Virgili, i tots els resultats que es presenten són fruit dels experiments realitzats al Laboratori d'Instrumentació Analítica de la Facultat d'Enologia de Tarragona.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
DETERMINACIÓ ANALÍTICA DE 2,4,6-TRICLOROANISOLE I ALTRES CLOROANISOLES
EN VINS I SUROS
Marc Riu Rusell
ISBN:9788469432358/DL:T. 1044-2011

Han passat moltes llunes des de l'inici d'aquesta Tesi Doctoral. Durant aquest temps la navegació no ha estat fàcil, però no exempta de moments inoblidables, sobretot gràcies a la gent que m'ha acompanyat en aquest trajecte. En escriure aquest petit text, em passen pel cap moltes estones divertides, frustracions compartides i moltes cares, a les quals vull agrair haver estat al meu costat durant aquests anys.

Al Ramón Carreté i a la Cristina Reguant. La meva col·laboració amb vosaltres aquell estiu del 2000 en el Departament de Bioquímica i Biotecnologia va plantar la llavor, el fruit del qual és aquesta tesi.

Als companys Quimiomètrics, que sempre tingueren un moment per resoldre els meus dubtes més estadístics.

Als companys bioquímics, Josep, Maite, Ángel, Mireia, Roser, Gemma, Chus, Sumpta, Rosana, Carmen, Núria i Guillem, pels cafès (i alguna cervesa) compartida en l'antiga Facultat d'Enologia.

Als companys del Laboratori d'Instrumentació Analítica, Pili, Sandra, Núria, Marie, Laura i Luciano, per compartir tantes bones hores junts.

A la Susan E. Ebeler, per l'oportunitat donada de treballar amb ella i la seva gent del Viticulture and Enology Department de la University of California a Davis.

Als "jefes" i directors de Tesi, Josep Guasch, Montserrat Mestres i Olga Busto. Gràcies per l'oportunitat i confiança donada. La vostra experiència i paciència m'han fet créixer com a químic i com a persona.

Als meus amics (ja saben quins). Sempre heu estat al meu costat. No cal dir res més.

A la meua família, sogres, cunyats, neboda i fillolleta, però, especialment als meus pares, Josep i Pietat, i el meu germà, Jordi. Sense vosaltres res hagués estat possible. Cap paraula escrita faria justícia a l'estimació que us tinc.

I, finalment, a l'Eva, el meu far.

Gràcies a tots, per haver-ho fet real.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
DETERMINACIÓ ANALÍTICA DE 2,4,6-TRICLOROANISOLE I ALTRES CLOROANISOLES
EN VINS I SUROS
Marc Riu Rusell
ISBN:9788469432358/DL:T. 1044-2011

*Quan surts per fer
el viatge cap a Ítaca,
has de pregar que el camí sigui llarg,
ple d'aventures, ple de coneixences.
Has de pregar que el camí sigui llarg,
que siguin moltes les matinades
que entraràs en un port
que els teus ulls ignoraven,
i vagis a ciutats
per aprendre dels que saben.
Tingues sempre al cor la idea d'Ítaca.
Has d'arribar-hi, és el teu destí,
però no forçis gens la travessia.
És preferible que duri molts anys,
que siguis vell quan fondegis l'illa,
ric de tot el que hauràs guanyat
fent el camí,
sense esperar
que et doni més riqueses.
Ítaca t'ha donat el bell viatge,
sense ella no hauries sortit.
I si la trobes pobra, no és que Ítaca
t'hagi enganyat.
Savi, com bé t'has fet,
sabràs el que volen dir les Ítaques.*

*Ítaca (o Viatge a Ítaca)
Lluís Llach – 1975-*

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
DETERMINACIÓ ANALÍTICA DE 2,4,6-TRICLOROANISOLE I ALTRES CLOROANISOLES
EN VINS I SUROS
Marc Riu Rusell
ISBN:9788469432358/DL:T. 1044-2011

Objectius	1
Capítol I. Petita història del vi	5
1. Alfa	9
2. Mesopotàmia, Orient Mitjà i Egipte	10
3. Des de Grècia fins a l'Imperi Romà	11
4. Des del segle III fins a l'Edat mitjana	12
5. Del Renaixement fins al segle XVIII	14
6. Del principi científic del vi als nostres dies	15
Bibliografia	16
Capítol II. El suro	17
1. Vidre-vi-suro. La triada	21
1.1. Els envasos pre-vidre	21
1.2. L'ampolla de vidre	21
1.3. El tap de suro	22
2. Elaboració, propietats i cultura del tap de suro	23
2.1. L'alzina surera	23
2.2. Què és el suro?	25
2.3. Propietats del suro	26
2.4. De l'arbre a l'ampolla	27
2.4.1. Extracció i preparació del suro de l'arbre	28
2.4.2. Fabricació de taps per a vins tranquils (suro natural i semielaborats)	29
2.4.3. Acabat de taps de suro natural i semielaborats	30
2.4.4. Observacions	31
2.5. Hi ha món després del tap de suro?	32
2.5.1. Taps tècnics	32
2.5.2. Taps sintètics	33
2.5.3. Altres tipus de taps	35
2.5.4. Altres tipus d'envasos	35
2.5.5. Quin és el tap adequat per a conservar un vi? Estudis comparatius de diferents taps	36
Bibliografia	41
Capítol III. L'olor a humitat	47
1. Introducció	49
2. Defectes en l'aroma	50
3. Defectes organolèptics del vi	51

4. Olor a humitat	54
4.1. Què és l'olor a humitat?	54
4.2. Quins són els compostos responsables de l'olor a humitat?	55
4.2.1. Guaiacol	55
4.2.2. 2-metilisoborneol i geosmina	55
4.2.3. 1-octen-3-ol i 1-octen-3-ona	58
4.2.4. 2-metoxi-3,5-dimetilpirazina	58
4.2.5. Haloanisoles	59
5. Haloanisoles	60
5.1. Com arriben els haloanisoles al vi	60
5.1.1. Els clorofenols. Punt de partida del problema	60
5.1.2. Contaminació clorofenòlica de l'alzina surera	62
5.1.3. Contaminació produïda en el procés de fabricació del tap de suro	62
5.1.4. Contaminació durant el transport i embalatge	64
5.1.5. Contaminació en el celler	65
5.2. Microorganismes responsables de la transformació d'halofenols a haloanisoles	67
5.3. Prevenció i eliminació d'haloanisoles. Evitar l'olor a humitat en el vi	69
5.3.1. Mesures preventives	69
5.3.2. Mesures correctores	71
Bibliografia	74
Capítol IV. Determinació de cloroanisoles en vins i suros	87
1. Introducció	89
2. Tècniques d'extracció	91
2.1. Extracció líquid-líquid	91
2.2. Extracció sòlid-líquid	92
2.3. Extracció i destil·lació simultànies	93
2.4. Hidrodestil·lació al buit	94
2.5. Espai de cap	95
2.5.1. Espai de cap estàtic	95
2.5.2. Espai de cap dinàmic. Purga i trampa	96
2.6. Fluids supercrítics	98
2.7. Extracció amb líquid pressuritzat	99
2.8. Extracció assistida amb microones	99
2.9. Desorció tèrmica directa	100
2.10. Pervaporació i preevaporació	101

2.11.	Extracció en fase sòlida	102
2.12.	Microextracció en fase sòlida	104
2.12.1.	Introducció	104
2.12.2.	Variants de la tècnica	105
2.12.3.	Fonament de la tècnica	107
2.12.4.	Tipus de fibres	108
2.12.5.	Variables experimentals	110
2.12.6.	Aplicacions de la microextracció en fase sòlida en la determinació d'haloanisoles en vins i taps de suro	112
2.13.	Stir bar sorptive extracció (SBSE)	116
2.13.1.	Principis de la SBSE	116
2.13.2.	Extracció i desorció	117
2.13.3.	Limitacions	118
2.13.4.	Aplicacions en la determinació d'haloanisoles en vins i suros	118
2.14.	Microextracció amb solvent	118
3.	Tècniques cromatogràfiques	120
3.1.	Detectors per a cromatografia de gasos	121
3.1.1.	Detector de captura electrònica	121
3.1.2.	Detector d'espectrometria de masses	121
3.1.3.	Detector d'emissió atòmica	122
4.	Tècniques no cromatogràfiques	124
4.1.	Nas electrònic	124
4.1.1.	El sentit de l'olfacte	124
4.1.2.	Què és un nas electrònic?	125
4.1.3.	Aplicacions en la determinació d'haloanisoles	128
4.2.	Immunoassaig i biosensors	128
	Bibliografia	130
Capítol V. Determinació de 2,4,6-tricloroanisol en vins mitjançant HS-SPME-GC-ECD		149
1.	Introducció	151
2.	Paràmetres experimentals	152
	<i>Determination of 2,4,6-trichloroanisole in wines by headspace solid-phase microextraction and gas chromatography-electron capture detection</i>	156

Capítol VI. Determinació de 2,4,6-tricloroanisole en vins mitjançant HS-MS	165
1. Introducció	167
2. Paràmetres experimentals	168
<i>Fast screening method for determining 2,4,6-trichloroanisole in wines using a headspace-mass spectrometry (HS-MS) system and multivariate calibration</i>	170
Capítol VII. Comparativa de dos mètodes cromatogràfics per a determinar 2,4,6-tricloroanisole en vins	175
1. Introducció	177
2. Paràmetres experimentals	178
<i>Comparative study of two chromatographic methods for quantifying 2,4,6-trichloroanisole in wines</i>	180
Capítol VIII. Determinació de cloroanisoles en suros mitjançant HS-SPME-GC-ECD	189
1. Introducció	191
2. Microextracció de cloroanisoles en suro	192
3. Paràmetres experimentals	196
4. Preparació de patrons sòlids	202
<i>Quantification of chloroanisoles in cork using headspace solid-phase microextraction and gas chromatography with electron capture detection</i>	205
<i>Determination of total chloroanisoles in different kind of cork stoppers</i>	213
Capítol IX. Aplicació de la norma UNE 56930:2005	219
1. Introducció	221
2. Part experimental	222
<i>Estudio de la aplicación de la norma UNE 56930:2005 para la determinación del 2,4,6-tricloroanisol (TCA) transferible</i>	224
Capítol X. Anàlisi sensorial, cloroanisoles totals i cloroanisoles extraïbles	229
1. Introducció	231
2. Part experimental	232
<i>Releasable trichloroanisole, total trichloroanisole or sensory analysis. What is the best way to assess the cork taint?</i>	234
Capítol XI. Conclusions	255
Abreviatures	261

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
DETERMINACIÓ ANALÍTICA DE 2,4,6-TRICLOROANISOLE I ALTRES CLOROANISOLES
EN VINS I SUROS
Marc Riu Rusell
ISBN:9788469432358/DL:T. 1044-2011

OBJECTIUS

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
DETERMINACIÓ ANALÍTICA DE 2,4,6-TRICLOROANISOLE I ALTRES CLOROANISOLES
EN VINS I SUROS
Marc Riu Rusell
ISBN:9788469432358/DL:T. 1044-2011

La qualitat és un concepte cada dia més lligat a qualsevol producte o servei. Només fa falta fer l'exercici d'introduir aquesta paraula en un motor de cerca, com per exemple el *Google*, per veure'n la importància en la xarxa. Així, pel terme "qualitat", en el moment de redactar aquest text, es troben 50.200.000 entrades. Si es repeteix la cerca amb la paraula en espanyol, en trobem 123.000.000 i, en anglès, el nombre arriba a 908.000.000. Però, què s'entén per qualitat? Segurament la definició més generalista i acceptada seria que la qualitat és la percepció del grau en què un producte o servei assoleix les expectatives de l'usuari.

El vi, com a producte amb gran valor afegit, no es pot deslligar del concepte de qualitat i, tenint en compte aquesta definició, es pot desprendre que la qualitat d'un vi anirà íntimament lligada a l'absència de qualsevol defecte.

Un dels defectes amb més importància en el món enològic és, sense cap dubte, el descrit com a "olor a humitat", tradicionalment conegut com a "gust a suro", el qual és conseqüència de la presència d'alguns compostos químics de la família dels cloroanisoles, especialment, el 2,4,6-tricloroanisol (TCA). Per tant doncs, per assegurar que s'està davant un producte de qualitat, es fa necessari el desenvolupament de mètodes d'anàlisi que permetin la determinació d'aquests compostos de manera fiable.

Tenint en compte que el TCA i altres cloroanisoles són compostos volàtils i amb grups halògens a la seva estructura química, la cromatografia de gasos amb detecció específica de compostos halogenats (amb el detector de captura electrònica), esdevé la tècnica més adient.

Tenint en compte aquestes premisses, els objectius de la present Tesi Doctoral han estat:

1. Avaluar l'efectivitat de la tècnica de la microextracció en fase sòlida com a sistema d'extracció i concentració dels cloroanisoles, especialment el TCA, en vins i suros.
2. Desenvolupar una metòdica per a l'obtenció d'un *in-house reference material* en el cas del suro.
3. Desenvolupar, mitjançant la cromatografia de gasos, un mètode de quantificació dels diferents cloroanisoles, especialment el TCA, en vins i suros, tot determinant-ne llurs paràmetres de qualitat mitjançant una validació.

4. Avaluar la capacitat del nas electrònic basat en un sistema d'espai de cap i espectrometria de masses) com a tècnica ràpida per dur a terme la determinació del TCA en vins.
5. Comprovar l'efectivitat dels paràmetres descrits en la norma UNE 56930:2005 "*Determinación del 2,4,6-tricloroanisol (TCA) transferible*" per a dur a terme la determinació del TCA transferible.
6. Estudiar la relació entre els paràmetres TCA total, TCA transferible i l'anàlisi sensorial en taps de suro.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
DETERMINACIÓ ANALÍTICA DE 2,4,6-TICLOROANISOLE I ALTRES CLOROANISOLES
EN VINS I SUROS
Marc Riu Rusell
ISBN:9788469432358/DL:T. 1044-2011

CAPÍTOL I

PETITA HISTÒRIA DEL VI

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
DETERMINACIÓ ANALÍTICA DE 2,4,6-TRICLOROANISOLE I ALTRES CLOROANISOLES
EN VINS I SUROS
Marc Riu Rusell
ISBN:9788469432358/DL:T. 1044-2011

*El vi és de les principals coses que condueix a l'alegria.
L'abús del vi és la principal de les causes que
condueixen a la pèrdua de la intel·ligència i de la
memòria.*

(Charaka-Samhita, aprox. 400 aC)

*Doneu begudes fortes al qui s'arruïna
i vi als que tenen l'amargor al cor,
perquè begui i s'oblidi de la seva pobresa
i no pensi més en la seva pena*

(Proverbis 31: 6-7, 500 aC)

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
DETERMINACIÓ ANALÍTICA DE 2,4,6-TRICLOROANISOLE I ALTRES CLOROANISOLES
EN VINS I SUROS
Marc Riu Rusell
ISBN:9788469432358/DL:T. 1044-2011

1.- ALFA

La nostra cultura, la nostra història, tenen un vincle íntimament lligat a la vinya i al vi. No en va, la Bíblia lliga l'origen de la civilització amb la plantació de la vinya, després del Gran Diluvi Universal. Així, en el Gènesis, 9, 20-21 es diu: "Noè, agricultor, fou el primer a plantar una vinya. Va beure el vi, es va embriagar i es va despullar dins la seva tenda" [1]. Com es pot veure, la història de l'abús del vi també es remunta fins a l'alba dels temps.

Per altra banda, tal com delaten els fòssils descoberts, la vinya es va estendre per tot l'hemisferi nord, a partir del final de l'era Terciària. Però els freds que arribaren amb la Quarta Glaciació (fa aproximadament 80.000 anys) van fer que aquesta varietat només pogués sobreviure a les contrades més càlides localitzades en la zona que va des de l'est del Càucas fins a l'Europa Occidental, passant pel Mediterrani [2,3].

D'entre les diferents varietats de vinya, la que centra el nostre interès és la *Vitis vinifera*, ja que és a partir de la qual se n'obté el vi. Els primers cultius d'aquesta planta es feren ara fa uns cinc o sis mil anys, en terres de la Transcaucàssia [4]. Unes centúries més tard, cap el 2.500 aC, la *vitis vinifera* ja es troba aclimatada en les zones ocupades per dos dels bressols de la civilització: Egipte i Mesopotàmia.

D'aquests orígens sorgiren les varietats vinícoles (la *Pontica*, l'*Occidentalis* i l'*Orientalis*) que constitueixen les bases de la vinya europea actual [2,5].

Mentre que la trobada entre la humanitat i el vi en el Paleolític s'hauria produït per pura coincidència en els intents infructuosos d'emmagatzemar suc de raïm, en el Neolític la producció de vi ja és una operació perfectament intencionada [5].

2.- MESOPOTÀMIA, ORIENT MITJÀ I EGIPT

La mostra de vi més antiga de la que se'n té constància data, aproximadament, del 6.000 aC i va ser descoberta en una gerra a l'Iran occidental; i a Japó es troba la gerra més ancestral descoberta fins ara, datada al segle XI aC [5]. A part d'aquesta troballa existeixen nombroses referències a Mesopotàmia i Egipte que deixen palès el cultiu estès de la vinya i, per descomptat, el consum de vi. Així, d'entre les diferents mostres d'art trobades d'aquesta època, es podria citar l'Estela de Nefertiabet (aproximadament 2.590 aC), descoberta en una tomba de la Vall de Gizeh. En aquesta representació es pot veure que, entre la llista d'ofrenes que acompanyarà a la jove en el seu camí cap al més enllà, hi figura el vi [6]. També resulten destacables els residus de vi medicinal trobats en 700 gerres de fang descobertes a la tomba d'Escorpí I, a Abidos (3.150 aC) [7]. Però cal dir que el vi no només apareix en la iconografia de la mort, sinó que pels egipcis el vi també era símbol de vida i, en la vessant comercial, adoptà un paper predominant [2].

3.- DES DE GRÈCIA FINS A L'IMPERI ROMÀ

Grècia produïa vi i el comerciava, una tradició heretada dels fenicis. El producte que obtenien, però, tenia unes propietats organolèptiques que no tenien res a veure amb un vi tal i com el coneixem ara, per la qual cosa no es bevia en estat pur sinó que es barrejava amb aigua, aigua de mar, mel, farigola,... [2].

Al segle VII aC, els etruscs van expandir el conreu de la planta per tota la Península Itàlica, la qual cosa suposà l'origen del famós vi produït a la Toscana anomenat *chianti*. L'expansió d'aquest poble cap a altres zones com la Gàl·lia, va suposar també la propagació de la vinya [2]. A diferència dels grecs, el consum del vi per part d'aquest poble es feia sense addició de cap producte. Homer denominà a aquest vi "Mel del cor".

Roma agafà el testimoni de grecs i etruscs en el segle I aC, tot potenciant el cultiu d'aquesta planta a tots els seus territoris. Però, inicialment, durant l'època de la Monarquia i durant la República, el vi no era gaire apreciat ja que eren temps d'hàbits molt sobris, gairebé espartans. Al segle I dC, no obstant, la tendència canvia i el vi acapara una gran rellevància en tota la vida de l'Imperi. D'aquesta època deriven les normes tècniques dictades per Columela, encara algunes d'elles vigents actualment, o la classificació de Plini de diferents vins [2]. A més, no podem oblidar l'expansió de la vinya que s'aconseguí mitjançant la promoció de la plantació d'aquesta (sempre a mans dels ciutadans romans) en tot el territori conquerit.

Fruit d'aquesta expansió, el vi es convertí en un producte de consum quotidià en tot l'Imperi Romà i el seu comerç prengué gran importància. La Via Augusta esdevingué un dels centres neuràlgics de l'economia, comunicant Cadis amb Bríndisi, tot passant per la nostra estimada Tarraco. Fou tanta la rellevància del vi en l'economia de l'època que provocà que molts pagesos decidissin canviar els cultius de cereals per vinyes. Aquests canvis en la producció agroalimentària de l'època van fer que el mateix Emperador Dominià, l'any 92 dC, promulgés un decret que obligava a arrencar totes les vinyes de les províncies cultivables i plantar cereals i altres productes alimentaris. Aquesta maniobra alhora que va fer desaparèixer molts vins de qualitat ínfima, va potenciar els vins italians, però també causà que l'expansió de la vinya s'aturés gairebé un segle [2].

4.- DES DEL SEGLE III FINS A L'EDAT MITJANA

Ja en el segle III dC, concretament a l'any 276, l'Emperador Provo trencà amb el decret de l'Emperador Dominicià i va permetre a tots els pobladors de les diferents províncies romanes cultivar de nou la vinya. Així, a finals del segle III dC la presència de la vinya a Europa era més gran que en els nostres dies [2] i, tot i que en aquesta època va començar la davallada i posterior caiguda de l'Imperi Romà, la cultura del vi es mantenia viva. De fet, hi ha alguns documents prou interessants que en deixen constància, com ara el fet que un dels primers texts en italià (any 766) és una declaració de deute relacionada amb el vi.

Entrant ja en l'Edat mitjana, cal destacar la gran importància en la producció de vi dels centres religiosos, i sobretot dels monestirs, regits per la seva màxima *ora et labora*. De totes maneres, aquests centres no només utilitzaven el vi per al ritus litúrgics tal i com consta, per exemple, a la regla de Sant Benet (segle VI dC), la qual estipulava un consum de vi d'una mica menys d'un quart de litre per dia i per monjo, tot i que aquesta mesura podia canviar-se a gust del superior del centre [8]. Sigui com sigui, els monestirs no només tingueren importància en la vessant productiva, sinó que també tingueren gran impacte en la seva expansió. Això és degut a què quan els missioners anaven a convertir als infidels, aquests sempre anaven acompanyats d'un especialista en viticultura per poder plantar vinyes a partir de les qual obtenir el vi necessari per als seus ritus. Així, per exemple, la tradició explica que l'origen de l'albarinyo a Galícia es deu a que un monjo de Cluny, en el seu camí de Santiago, portà aquesta varietat de vinya des del Rhin.

Tampoc es pot oblidar l'empenta que la noblesa de l'època va donar al cultiu de la vinya ja que, fins al segle XII dC, tot senyor feudal rodejava el seu castell amb vinyes, símbol d'hospitalitat, signe del seu rang [2]. Per altra banda, aquest estament de la societat també col·laborà en l'aparició d'escoles relacionades amb la vinya, com la que va fundar Carlemany a Rudesheim (Alemanya).

Si fins aquest moment la Conca Mediterrània tenia l'hegemonia pel que fa al conreu de la vinya, entre els segles VII dC i X dC es produeix un desplaçament del centre productor de vi cap a l'oest i nord d'Europa a causa de la invasió islàmica que començà pel sud de la Península Ibèrica. De fet, no va ser fins el moment de la Reconquesta que la vinya va tornar a tenir un paper preponderant entre els cultius de la Península, ja que va ser llavors quan, a mesura que els castellans anaven reconquerint terreny a, s'anaven plantant vinyes en les noves terres [2].

Respecte a les tècniques enològiques emprades a l'edat mitjana, aquestes eren força rudimentàries i sempre basades en l'empirisme i en la cultura popular. Tot i així,

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
DETERMINACIÓ ANALÍTICA DE 2,4,6-TRICLOROANISOLE I ALTRES CLOROANISOLES
EN VINS I SUROS
Marc Riu Rusell
ISBN:9788469432358/DL:T. 1044-2011

algunes de les pràctiques utilitzades en aquella època romangueren entre nosaltres fins no fa gaire temps [2].

5.- DEL RENAIXEMENT FINS AL SEGLE XVIII

Només cal donar una ullada a les grans obres pictòriques del Renaixement per entendre la importància del vi en aquesta època. A mode d'exemple, es pot nombrar l'obra titulada "L'estiu" de Giuseppe Arcimboldo (1527-1593) o "Les bodes de Canà", de Paolo Caliari (1528-1588) [6].

Durant aquesta època, tenen lloc alguns canvis en els centres productors vitivinícoles de la Conca Mediterrània entre els que cal destacar el fet que a Creta i a les illes gregues es va produir una aturada en la producció de vi causada per la seva conquesta per part dels turcs. En aquestes terres destacava l'elaboració dels vins licorosos de malvasia, els quals eren molt apreciats en l'època. Aquest fet fou aprofitat per altres zones productores com Catalunya, València o Andalusia per omplir aquest buit del mercat, tot produint aquest tipus de beguda [2].

Cal destacar també el descobriment d'Amèrica, episodi que comportà el viatge de la vinya a terres transoceàniques i, tenint en compte que els conqueridors espanyols portaven el seu cultiu a totes les terres que anaven ocupant, aquesta es propagà simultàniament pels actuals estats de Bolívia, Perú, Xile, Argentina, Mèxic i Califòrnia [2,5].

És ja ben entrat el segle XV quan algunes pràctiques enològiques donaren lloc a vins que destacaven per les seves propietats organolèptiques, adquirint una fama que, en alguns casos, és vigent encara en els nostres dies. Exemple d'aquestes pràctiques serien les que, a finals del segle XVI, cellerers del sud d'Espanya utilitzaven per estabilitzar i variar les característiques del vi, tot afegint-li alcohol, la qual cosa donà lloc al preuat Xerès [6]. Un altre exemple d'aquests vins el constitueixen els Tokaji, els quals tenen el seu origen en la descoberta de la bondat de la *Botrytis cynerea* per part d'alguns productors hongaresos a mitjans del segle XVII [9].

Respecte al comerç i al seu epicentre, també es produeixen canvis importants. En el segle XVI un nou protagonista s'aixecà com el gran dominador del comerç internacional: Holanda. Va ser aleshores que adquiriren gran importància els destil·lats de vi, com el cognac, el brandy o l'armagnac [2].

Del segle XVIII cal destacar-ne, per una banda, l'aparició de nombrosos vins especials, com per exemple el Champagne o el Marsala i, per altra, la introducció de la vinya a Àfrica del Sud, Austràlia i Nova Zelanda [2,5].

6.- DEL PRINCIPI CIENTÍFIC DEL VI ALS NOSTRES DIES

Ja en el segle XIX cal parlar de dos esdeveniments que canviaren la història de l'enologia d'una manera radical: la fil·loxera i la publicació del primer tractat d'enologia.

Les conseqüències de la importació de vinyes procedents d'Estats Units cap a Europa van ser del tot nefastes i també inesperades. Amb la introducció d'aquestes vinyes es va donar pas, també, a l'entrada de la fil·loxera, plaga que va arrasar la *Vitis vinifera* de tot el continent europeu i també la d' Austràlia [2].

Per altra banda no es pot parlar del segle XIX des d'un punt de vista enològic sense parlar d'un nom en lletres majúscules: PASTEUR. Les investigacions i coneixements d'aquest gran investigador van provocar un canvi trencador. No sense exagerar, se'l coneix com a iniciador de la història moderna de l'enologia. Fou al 1863 quan l'emperador francès, Carles Lluís Napoleó va demanar a Pasteur que estudiés les malalties de la vinya. Tres anys després es publicava la seva obra històrica "*Études sur le vin*", tractat on ja s'explica la importància de la barrica i de l'ampolla en l'elaboració d'un bon vi [9,10].

I, arribant finalment als nostres dies, ha estat en els últims 40 anys quan l'enologia ha fet camí al costat de la ciència, de manera que la majoria dels grans avenços tècnics i científics en aquest àmbit han tingut lloc durant aquest curt període de la història. En aquest àmbit es poden destacar les universitats de Bordeus i de Califòrnia, on, en la dècada del 80 del segle XIX, es van crear instituts d'Enologia. Els objectius de cadascuna eren força diferents: mentre que la de Bordeus es va centrar en el coneixement i millora dels mètodes tradicionals, la de Califòrnia (situada a Davis a partir de 1928), es va dedicar a l'estudi de la millor manera de crear una indústria vitivinícola en un indret sense tradició [9]. Gràcies a la transferència dels coneixements adquirits en aquestes universitats i en d'altres com la nostra Universitat Rovira i Virgili, cada dia s'elaboren vins de qualitat més elevada.

I continua.

Amb aquestes quatre pinzellades es pot veure que el vi ha acompanyat a la humanitat pràcticament des de la seva aparició sobre la terra. Tot i així, les característiques dels vins, la manera de prendre'ls i la seva qualitat han anat evolucionant al llarg del temps. I és ara, en aquest moment, on s'emplaça aquesta tesi doctoral: un petit gra de sorra en el coneixement del vi, un menut intent per a millorar-ne la seva qualitat.

BIBLIOGRAFIA

1. *La Bíblia*. 4^{arta} edició. Andorra La Vella (Andorra): Editorial Casal i Vall; 1986
2. A. Reixach, G. Pous. *Conocer y escoger el vino. Arte y cultura del vino*. 1^{era} edició. Barcelona (Catalunya): Editorial Salvat-Hachette; 1996
3. H. P. Olmo. "The origins and domestication of the *Vinifera grape*" dins P. E. McGovern, S. J. Fleming, S. H. Katz (editors), *The origins and ancient history of wine*. 3^{era} edició. Amsterdam (Holanda): Gordon Breach Publishers; 2000. Capítol II.3, 31-45
4. M. Mestres. *Anàlisi de compostos sofrats a l'aroma del vi*. Tesis Doctoral. Tarragona (Catalunya): URV; 2001.
5. I. Hornsey. *The Chemistry and Biology of Winemaking*. 1^{era} edició. Cambridge (Gran Bretanya): The Royal Society of Chemistry; 2007
6. *La guía del Louvre*. 1^{era} edició. París (França): Musée du Louvre Éditions; 2005
7. National Geographic. Agost 2009
8. <http://www.benedictinescat.com/Montserrat/vidacat.html#Text> de la Regla de St. Benet (8 de gener de 2010)
9. H. McGee. *La cocina y los alimentos*. 2^{ona} edició. Barberà del Vallès (Catalunya): Debate; 2007
10. L. Pasteur. *Études sur le vin: ses maladies, causes qui les provoquent, procédés, nouveaux pour le conserver et pour le vieillir*. París (França): A'Imprimerie Impériale; 1866. <http://pds.lib.harvard.edu/pds/view/6433715?n=1&jp2Res=.25&imagesize=1200&rotation=0> (24 de setembre de 2009)

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
DETERMINACIÓ ANALÍTICA DE 2,4,6-TRICLOROANISOLE I ALTRES CLOROANISOLES
EN VINS I SUROS
Marc Riu Rüsell
ISBN:9788469432358/DL:T. 1044-2011

CAPÍTOL II

EL SURO

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
DETERMINACIÓ ANALÍTICA DE 2,4,6-TRICLOROANISOLE I ALTRES CLOROANISOLES
EN VINS I SUROS
Marc Riu Rusell
ISBN:9788469432358/DL:T. 1044-2011

*Aquest dia de festa, al tornar de l'any, farà saltar el tap
de suro enganxat amb brea a una àmfora,...*

(Horaci -27 a.C.- "Odes", Llibre III, Oda 8, línia 10)

*"...I prithee, tell me who it is quickly, and speak apace. I
would that thou couldst stammer, that thou might
pour this concealed man out of thy mouth as wine comes
out of a narrow-mouth'd bottle, either too much at once
or none at all. I prithee, take the cork out of thy mouth
that I may drink the tidings."*

(William Shakespeare -1599- "As you like it", Acte III,
Escena III)

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
DETERMINACIÓ ANALÍTICA DE 2,4,6-TRICLOROANISOLE I ALTRES CLOROANISOLES
EN VINS I SUROS
Marc Riu Rusell
ISBN:9788469432358/DL:T. 1044-2011

1.- VIDRE-VI-SURO. LA TRÍADA

Tradicionalment la tríada vidre-vi-suro ha anat íntimament lligada. Però aquesta unió no sempre ha existit. Aquest capítol ens endinsarà en un petit recorregut per a la història amb l'objectiu de donar unes pinzellades de com l'ampolla de vidre i, principalment el suro, han arribat a ser tan importants en la cultura i economia del vi, del qual s'ha parlat en el capítol anterior.

1.1.- Els envasos pre-vidre

Òbviament, el vi no sempre ha anat acompanyat d'una ampolla de vidre.

A Egipte, el vi es servia en gerres o àmfores de terrissa de diferents capacitats. Els grecs, en canvi, eren més partidaris d'utilitzar un altre tipus de recipient, també de terrissa, anomenat garrafó. L'art també fa la seva aparició en recipients que han de contenir aquesta beguda tan valorada. Així, gerres i copes amb representacions artístiques eren utilitzades per alts dignataris i nobles, tal i com mostra, per exemple, la *Oinochoé* jònica (650 aC, Museu del Louvre) [1,2].

Respecte al transport del vi, els etruscs i romans utilitzaven tres tipus de contenidors diferents, bàsicament: els *doliae* (pensats especialment per volums grans), les àmfores (volums de 25 litres) i les odres (uns 500 litres) [1].

Els primers barrils de fusta apareixen en el segle I aC, però amb l'objectiu de contenir el vi, no pas per millorar-ne la qualitat que implica una criança [1].

1.2.- L'ampolla de vidre

Les diferents troballes arqueològiques situen els orígens del vidre a Mesopotàmia a finals del tercer mil·lenni aC, en plena Edat del Bronze. La primera fàbrica data del 1.500 aC, a Egipte. Es va necessitar l'ajut de nous invents de caire tècnic, com la canya per a bufar, per a què fessin aparició en la història les primeres ampolles de vidre.

En un principi l'ampolla de vidre només s'utilitzava pel servei a la taula. Per trobar les primeres aplicacions de l'ampolla de vidre en el comerç cal remuntar-se a l'antiga ampolla toscana (*el fiasco de chianti*). Aquesta aparició es situa a la població toscana de San Gimignano, l'any 1275, on l'ajuntament donà permís a un artesà de nom Cheronimo per obrir un forn per l'art del vidre. Aquest artesà, un mestre "coper", a més de copes, diversificà la seva producció a recipients de vidre i ampolles. Ràpidament aquests nous envasos començaren a substituir als antics recipients. En aquest punt apareix un altre nom il·lustre de la història, com és

Leonardo da Vinci. Aquest eminent artista i inventor va rebre l'encàrrec d'un grup de vidriers de crear quelcom per evitar el trencament de les ampolles durant el transport. La seva aportació va ser el recobriments de palla, encara present en algunes presentacions de certs vins [1].

L'ampolla de vidre es consolida definitivament l'any 1662, quan Sir Kene Digby, un cortesà britànic, fabricà la primera ampolla tubular, d'omòplats caiguts i amb un coll llarg, de forma cilíndrica. Aquesta forma permetia l'emmagatzematge en posició horitzontal. En el seu extrem superior hi havia una anella, per tal de poder ajustar el tap de fusta amb una corda. Aquesta ampolla rebé el nom *d'ampolla a la manera anglesa* pels holandesos o *bordelaise* per part dels francesos, que la van adoptar per exportar els seus clarets a partir del 1707 [3].

1.3.- El tap de suro

El suro s'ha utilitzat des de temps immemorials. Diferents civilitzacions trobaren aplicacions d'aquest noble material tal i com queda reflectit en els treballs de nombrosos savis de l'antiguitat, com Virgili, Plini el Vell, Horaci o Columella, que anomenen el suro i les seves propietats [2,4]. Així, grecs, egipcis i romans utilitzaven aquest producte per tapar àmfores o altres recipients i, també, com a material de flotació en la pesca. Els àrabs l'usaven com a aïllament tèrmic de vivendes, per utensilis domèstics i també per elaborar elements ornamentals.

I ja molt més proper als nostres dies, no va oferir el buit de l'escorça d'una alzina surera protecció diverses vegades a Don Quixot? [4]. No va ser l'observació de les cèl·lules de l'escorça de suro la primera aplicació d'un microscopi? [5].

Però el seu ús com a tap d'ampolles de vi s'inicia amb la història del *Champagne*. El frare Dom Pérignon necessitava un material que permetés tancar les ampolles que contenien un vi en presència de gas. Això implicava que aquest producte havia de ser elàstic i resistent a la vegada. Segons la mescla entre tradició i història, Don Pérignon va veure uns pelegrins espanyols que visitaven l'abadia de Hautvillers, els quals utilitzaven trossos de suros per a tapar les seves cantimpleres. Així va ser com, finalment, va trobar el producte pel seu *Champagne* i, també, com nasqué el tap de suro com es coneix avui en dia [6,7].

2.- ELABORACIÓ, PROPIETATS I CULTURA DEL TAP DE SURO

Endinsant-nos una mica més en el tema que ens ocupa, resulta especialment interessant comentar les interessants propietats d'aquest material, a més d'entendre la seva importància en la nostra cultura. A més, no es pot oblidar que Catalunya i Espanya tenen una indústria relacionada amb el suro gens menyspreable. Per aquesta raó, aquest apartat es farà un petit viatge pel món del suro i ens fixarem en l'arbre que el produeix: l'alzina surera.

2.1.- L'alzina surera

El nom científic per aquest arbre és el de *Quercus suber* (*Q. Suberosa Salisb*), però a Catalunya es coneix amb el nom de surera, suro o alzina surera [7-10]. L'alzina surera pertany a la família de les Fagàcees (*Fagaceae*) [11].

L'arbre té una alçada que difícilment supera els 20 metres, d'aparença robusta, molt similar a l'alzina, excepte per la seva escorça, tret diferenciador d'aquesta espècie. El seu tronc sol presentar una estructura recta i gruixuda, que pot arribar a superar els 2 metres de diàmetre. La seva escorça és llisa en la seva joventut, la qual es va recobrint de suro en el seu creixement [10,12]. La seva fulla és persistent, de 3 a 7 cm, de forma ovada, dentada i poc lobulada, coriàcia, de color verd fosc lluent per dalt i envellutada de color gris-blanquinós per la part de sota. Generalment, quanta més quantitat de fulla té l'arbre, més producció de suro s'obté [9].

L'alzina surera creix principalment en l'oest de la conca Mediterrània, sota l'empar, i valgui la redundància, d'un clima Mediterrani. Aquest clima es pot definir com a extratropical, amb un fotoperíode estacional i diari, amb una pluviositat concentrada en les estacions fredes de l'any i amb un estiu generalment sec [4,13]. Aquestes característiques són les adequades per la surera que necessita un clima suau, lleugerament humit, sense gelades fortes, amb precipitacions mitjanes anuals superiors als 400 mm i normalment alçades no superiors als 1.000 metres (es poden trobar excepcions a Granada i al Marroc) [7].

Dintre de l'àrea Mediterrània, el factor que té una influència més marcada en el desenvolupament d'aquest arbre és el sòl, ja que requereix terrenys amb un marcat component silícic i descalcificats (arenita, granits, gneis i pissarres), especialment sorrencs, amb poca quantitat de nitrogen i fòsfor, però rics en potassi i amb pH entre 5 i 6 [10].

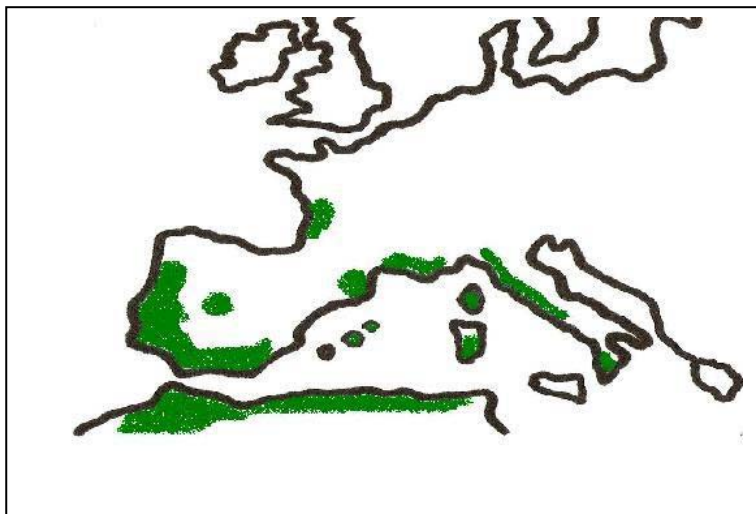


Figura II.1. Distribució de l'alzina surera a la conca Mediterrània

En la Figura II.1 es pot veure la distribució de l'alzina surera en la conca mediterrània. En la Taula II.1 es detalla la producció, en percentatges, dels principals països productors de suro on es pot veure clarament la predominança de Portugal, seguida per la d'Espanya [7-10,13-17].

Taula II.1. Superfície i producció de l'alzina surera al món

PAÍS	SUPERFÍCIE	PRODUCCIÓ
Mundial	2.600.000 hectàrees	450.000 tones/any
Portugal	39 %	58 %
Espanya	19 %	21 %
Algèria	17 %	9 %
Marroc	13 %	4 %
Itàlia	2 %	4 %
França	6 %	2 %
Tunis	4 %	2 %

Taula II.2. Superfície i producció de l'alzina surera a Espanya

COMUNITAT AUTÒNOMA	SUPERFÍCIE	PRODUCCIÓ
Andalusia	55 %	55 %
Extremadura	25 %	36 %
Catalunya	15 %	5,5 %
Resta	5 %	3,5 %

A la Taula II.2 s'especifiquen les dades de producció d'alzina surera, però focalizant-se ara en diferents comunitats autònomes espanyoles. En aquest cas es pot veure clarament la supremacia d'Andalusia per sobre de les altres comunitats.

A Catalunya es poden trobar alzines sureres distribuïdes, principalment, per les comarques de l'Alt Empordà, Baix Empordà, Gironès, La Selva, Maresme i Vallès Oriental. Molts alzinars de La Selva i de l'Empordà tenen el seu origen en plantacions realitzades durant el segle XIX i principis del XX, durant la crisi de la fil·loxera [9,18,19].

2.2.- Què es el suro?

El suro o suber s'origina a partir d'una capa generadora, el fel·logen o canviament suberogen, que és part dels teixits meristemàtics que permeten el creixement en gruix de la planta.

El fel·logen es troba entre els teixits corticals. Les seves cèl·lules es divideixen segons un pla paral·lel a la superfície de la tija per formar capes successives. El resultat de la primera divisió és la formació de dues cèl·lules idèntiques. La més externa d'aquestes segueix el procés de diferenciació, augmenta el volum i es transforma en cèl·lules suberoses, mitjançant un procés de suberització, que consisteix en la deposició de suberina, un polímer natural, en aquestes cèl·lules. En canvi, la més interna es manté indiferenciada i continua dividint-se [7,20,21].

El fel·logen de l'alzina surera, a diferència d'altres espècies, té persistència continuada al llarg de la vida de la planta i això permet l'acumulació de capes amb la formació del suro. El fel·logen és actiu tota la vida de l'arbre, però si es mor, se'n pot formar un altre de nou, a partir de la diferenciació dels teixits més interns i, en conseqüència es formen noves capes de suro [8,20,21].

Les cèl·lules que han estat suberitzades proporcionen una barrera gairebé perfecta al moviment d'aigua apoplàstica, però també actua com una gran protecció a agents patògens [20].

La composició percentual de les cèl·lules suberitzades es detalla tot seguit [20-23]:

- Suberina: 40 % - 50 %
- Compostos polifenòlics: 20 % - 30 %
- Polisacàrids: 20 %
- Compostos extraïbles: 15 %

La suberina, per la seva banda, està composta per una mescla de compostos alifàtics i compostos aromàtics [20]:

- Compostos alifàtics
 - Cadenes llargues (C₁₆ – C₃₂) d'àcids grassos
 - Alcohols
 - Àcids ω-hidroxicarboxílics
 - Àcids α,ω-dioics
 - Glicerol
 - Compostos derivats de l'octadecà (com, per exemple, l'àcid 9,10-epoxi-18-hidroxi octadecanòic)
- Compostos aromàtics
 - Àcid ferrúlic
 - Àcid cafeic

2.3.- Propietats del suro

Per entendre el perquè el suro es pot considerar com un producte idoni per conservar el vi, cal recórrer a les propietats d'aquest material, entre les quals podem destacar [23-31]:

- *Aïllament*. La presència de gasos en el citoplasma és el que el fa bo per aïllar. En un estudi de Lopes *et al.* [32], s'ha determinat que l'entrada d'oxigen a través del tap de suro natural a l'ampolla de vi és de 0,5–6,1 µl per dia els primers 12 mesos d'embotellament. A partir d'aquest punt i fins als 36 mesos, l'ingrés d'oxigen decreix fins a 0,1–2,7 µl per dia. Aquestes petites quantitats d'oxigen són suficients pel refinament del vi durant el procés d'envelliment, però no causen l'oxidació del producte [33].
- *Baixa densitat*. El 90% del teixit vegetal que constitueix el suro està format per gas, fet que li atorga una densitat compresa entre 0,12–0,20 kg/l.
- *Lleugeresa*. Propietat lligada a l'anterior.
- *Impermeabilitat a l'aigua i a l'oli*. Aquesta característica és deguda a la presència de suberina, lignina i ceres en l'estructura d'aquest material.
- *Durabilitat*. La presència de tanins ajuda a evitar la degradació.

- *Bona compressibilitat i elasticitat.* Aquestes dues propietats venen donades, principalment, per l'estructura de les cèl·lules del suro. Aquestes són hexagonals, estan connectades mitjançant uns petits canals (plastoderms) i en el seu interior hi ha un gas de composició molt similar a l'aire. D'aquesta manera, quan s'aplica una força prou elevada, el gas intern de les cèl·lules és expulsat de manera que es produeix una compressió del material que pot comportar una reducció fins a un 40% de la seva grandària original. Un cop s'elimina la força compressiva, es produeix una recuperació elàstica ja que les cèl·lules tendeixen a recuperar la seva forma original tot absorbint aire de l'entorn. Només en uns segons, el suro que ha deixat d'estar comprimit pot recuperar fins a un 85-90 % de la seva forma originària, i després de 24 hores haurà recuperat ja fins el 98 %.
- *Bon comportament davant del foc.* Aquesta propietat no el fa especialment interessant des del punt de vista enològic, però si des de la perspectiva del clima mediterrani, ja que li dona una resistència davant als habituals incendis que assolen a aquesta regió.
- *Bona resistència davant l'atac dels fongs.* Tot i aquesta resistència, però, cal dir que, tal i com es veurà més endavant, el suro pot patir l'atac de diferents microorganismes, entre ells fongs, que tindran un paper determinant en l'aparició de certs defectes.
- *No és completament inert.* Pot contenir substàncies volàtils, les quals es poden transmetre al vi.

Amb tot això, es pot comprovar que realment el suro és un material que reuneix gairebé totes les característiques que se li exigeixen a un material per poder ser utilitzat com a tap en les botelles de vi i que són [34]:

- Assegurar certa estanquitat al vi
- Respectar les característiques del vi
- Participar positivament en l'evolució i envelliment del vi
- Realitzar un fàcil taponament
- Permetre realitzar un taponament amb gran cadència, és a dir, a nivell industrial
- Possibilitar una extracció del tap senzilla i fàcil pel consumidor

2.4.- De l'arbre a l'ampolla

Un cop s'ha parlat de l'alzina surera i de les propietats del suro, arriba el moment de descriure, encara que sigui de manera breu, com el suro procedent de l'arbre arriba a tapar un ampolla. Això ens donarà algunes de les bases per entendre com

es genera el defecte conegut com *olor a humitat* en un vi. En les següents línies, doncs, es presenta, en termes generals, el procés de fabricació més clàssic de taps de suro natural, que ens servirà d'exemple per entendre tot el procés.

2.4.1.- Extracció i preparació del suro de l'arbre

a) *Pela del suro de l'arbre*

La pela del suro consisteix en llevar l'escorça exterior de l'alzina surera. La pela del suro es fa tant del tronc com de les branques, però no s'arriba mai gaire alt. Aquesta pràctica té lloc durant els mesos d'estiu. Els intervals d'extracció solen estar compresos entre 9-10 anys, encara que a Catalunya es fa, més o menys, cada 12 anys. Aquesta freqüència dependrà del gruix del suro, el creixement del qual es veurà afectat per factors climàtics o geològics. El procés d'extracció es fa de manera totalment manual.

El suro obtingut de la primera extracció s'anomena pelegri i no és adequat per a fer taps de suro. El seu destí serà l'elaboració d'altres productes. El de la segona extracció rep el nom de primerenc, essent encara no vàlid per a taps. Serà a partir de la tercera extracció quan el suro és adequat per a ser utilitzat en el món enològic [22,28,35-37].

b) *Emmagatzematge al camp i tria*

El suro s'emmagatzema al camp durant un període de 6 a 9 mesos i es fa una primera tria. El producte de més qualitat serà destinat a l'elaboració de taps i s'elimina tota aquella part que presenti contaminació o la que estava arran de terra. Aquesta part no acceptada s'anomena rebuig i representa un 40% del total. En aquesta etapa on les planxes es deixen a l'intempèrie hi ha un perill gran de que aquestes puguin rebre un atac microbiològic [22,28,35-37].

c) *Primer rentat*

Aquest tractament de les planxes de suro té, principalment, tres objectius:

- Aplanar el suro. S'aconsegueix fent bullir el suro a 100°C durant uns 50-60 minuts en aigua. Després, es passen les plaques per una premsa, per tal de fer-les planes.
- Netejar el suro. Amb aquest procés s'eliminen les restes de terra i altres brutícies que pogués contenir el suro.
- Eliminar compostos químics indesitjables presents en el suro. Alguns d'aquests compostos són els fenols i els tanins.

Tradicionalment, aquesta bullida es solia fer en presència d'hipoclorit sòdic, la qual cosa tenia un efecte determinant en l'aparició de l'olor a humitat [22, 28, 35-38]. Aquest problema ha fet que es canviés l'hipoclorit per altres productes com el peròxid d'hidrogen, l'ozó o el metabisulfat de potassi [28,40,41].

d) *Classificació*

Un cop obtingudes les diferents planxes de suro, es fa una classificació d'aquestes segons la qualitat i el gruix [22,28,35-37].

e) *Assecat*

El suro s'ha de deixar assecat entre 6 i 9 mesos quan les condicions de temperatura i humitat són suaus, encara que a la pràctica sol ser molt menys. Es solen deixar a l'aire lliure, encarat al terra, tot i que també es poden mantenir sota cobert [22,28,35-38].

f) *Enfardat i emmagatzematge*

L'enfardat consisteix en fer paquets de suro per tal de facilitar-ne el transport. Normalment el lloc d'extracció del suro està lluny de l'empresa destinada a transformar-lo, essent necessari el transport [22,28,35-37].

2.4.2.- Fabricació dels taps per a vins tranquils (suro natural i semielaborats)

Per tal de poder utilitzar un suro per a la fabricació de taps, és imprescindible que aquest sigui, com a mínim, de la collita anterior. El procés d'elaboració és el que es detalla a continuació.

a) *Segona bullida*

Amb el pas del temps el suro s'assecar i es torna vidrat. Amb aquesta segona bullida s'aconsegueix que aquest adopti la flexibilitat adequada per tal de poder-lo treballar. També serveix per a acabar de netejar-lo. És recomanable anar canviant l'aigua utilitzada per tal d'evitar contaminacions creuades [22,28,35-37].

b) *Repòs de les planxes bullides*

Les planxes es deixen en una sala tancada, la qual rep el nom de trau, per tal de que el suro perdi part d'humitat, fins a un contingut entre 15-18%. Es solen deixar set dies a l'estiu i deu dies al hivern, tot i que aquest interval pot canviar. Les tendències actuals és de tenir-ho en una sala ventilada i amb humitat controlada [22,28,35-38].

c) *Tria de les planxes*

Acabat el pas anterior, es realitza una altra tria de les planxes, segons la seva qualitat [22,28,35-37].

d) *Llescat i perforat de les planxes*

Les planxes es llesquen, és a dir, se'n fan tires i, després, es perforen amb un tall circular per tal d'obtenir un cilindre de suro d'unes determinades dimensions que és el precursor del tap [22,28,35-37].

e) *Tria del perforat*

Es trien els cilindres de suro que reuneixen les característiques i dimensions adequades [22,28,35-37].

f) *Esmerilat*

En aquesta etapa es dona la forma al tap, tal com es coneix [22,28,35-37].

g) *Selecció del porus*

En aquesta etapa es fa una tria dels diferents taps segons la quantitat de porus. Aquest procés es sol fer utilitzant un aparell que, mitjançant una càmera, detecta els porus i fa la tria segons la densitat que presenten en el tap. Com menor sigui la densitat de porus, millor serà la qualitat del tap. Els taps que presenten una elevada densitat de porus passen un procés que s'anomena de rebliment. En aquest tractament els porus s'omplen amb pols de suro mitjançant la utilització d'un aglutinant (normalment poliuretà). Els taps reblerts (semielaborats) són de menor qualitat [22,28,35-37].

2.4.3.- Acabat de taps de suro natural i semielaborats

a) *Tria*

En aquest punt es duu a terme una tria dels taps per tal de separar els defectuosos [22,28,35-37].

b) *Rentat*

Es fa un altre rentat dels taps, similar al comentat en l'apartat anterior, amb un posterior emblanquiment i desinfecció, per tal d'eliminar olors estranyes o microorganismes. Es poden utilitzar diferents productes en aquest procés, tal com es comentarà en l'apartat 2.4.4. [22,28,35-37].

Un dels mètodes més tradicionals ha estat la utilització d'aigua per tal d'eliminar la pols i altres partícules acumulades, per després sotmetre els taps

a l'acció d'una solució d'hipoclorit, per exemple càlcic ($\text{Ca}(\text{OCl})_2$). Aquest tractament realitza les funcions de neteja i emblanquiment. Per acabar es disposen els suros dintre d'una solució d'àcid oxàlic. Aquest àcid reacciona amb l'hipoclorit càlcic residual, alliberant clor gasós i precipitant el calci en forma de sals oxàliques. L'àcid oxàlic també es pot complexar amb els ions de ferro, els quals poden provindre del procés de tallar el suro. Si no s'eliminen, poden reaccionar amb els tanins del suro donant lloc a taques fosques. Tot aquest procés s'acaba amb un aclariment amb aigua [33].

c) *Marcatge*

El marcatge dels taps de suro es pot fer amb tinta o al foc. Els caps es solen marcar a foc [22,28,35-37].

d) *Tractament superficial*

S'apliquen silicones alimentàries o parafines sobre la superfícies del tap per tal que aquest llisqui millor, la qual cosa facilitarà el procés d'embotellament i d'extracció del tap [22,28,33,35-37].

e) *Embalatge*

L'embalatge es fa per a transportar els taps de suro acabats als cellers o embotelladores que els requereixin, però, prèviament, es tracten amb diòxid de sofre. Els taps es solen posar dintre de sacs grans o en caixes de cartró, de manera que per facilitar l'aixecament i maneig d'aquestes càrregues tan feixugues, sol ser necessari l'ús de palets de fusta [22,28,33,35-38].

2.4.4.- Observacions

Al llarg d'aquests processos ha anat apareixent el tractament dels suros amb diferents productes. Cal comentar que actualment tota la indústria surera ja ha deixat de banda la utilització d'hipoclorit en els rentats dels taps, pels problemes derivats que aquest reactiu químic contingui clor en la seva estructura, participant en la generació de l'olor a humitat.

El producte més utilitzat en substitució d'hipoclorit és el peròxid, tal com recomana el *Código Internacional de Prácticas Taponeras* [39]. La utilització de peròxids permet l'emblanquiment i desinfecció del suro, tot i que s'han de controlar perfectament les dosis utilitzades [40,41]. Els peròxids són oxidants forts i, si s'apliquen directament, poden causar una degradació de la lignina del suro, afectant, per exemple, la superfície exterior. Això ocasiona la destrucció de les ceras naturals i els àcids grassos imprescindibles per a què el tap llisqui dins la botella en el moment de l'embotellament [42-47]. Per tal d'obtenir aquest peròxid,

generalment, s'utilitza àcid peracètic (CH_3CO_3) que, en reaccionar amb matèria orgànica, forma peròxid d'hidrogen i àcid acètic. Les reaccions que donen lloc al procés d'emblanquiment, oxidació i desinfecció consumeixen gran part del peròxid alliberat. L'àcid acètic s'elimina mitjançant aclariments amb aigua o per evaporació. Un altre fet positiu de l'aplicació de peròxids és que indueixen la polimerització dels fenols superficials, de manera que es redueix de manera important la seva participació en la potencial formació de 2,4,6-tricloroanisole [33].

Altres alternatives suggerides en aquest procés de rentat és la utilització de solucions de l'1 al 3% de metabisulfit potàssic. Aquest producte és molt efectiu en l'eliminació de microorganismes, però no blanqueja el suro, fet de gran importància comercial [40,44]. Altres proves dutes a terme amb etanol han donat resultats similar al del metabisulfit potàssic [40,42-47].

2.5.- Hi ha món després del tap de suro?

Una de les grans preguntes en el món enològic és "Quina és la millor manera d'embotellar un vi? Taps de suro natural o sintètics?". Entrar en aquest camp és especialment complicat per la controvèrsia existent sobre el tema, però s'intentarà donar una breu pinzellada sobre alternatives al tap de suro, basant-nos en diferents estudis que s'han dut a terme sobre aquest tema.

Per tal de fer una discussió més metòdica de les alternatives al suro resulta útil la següent classificació:

- Taps tècnics
- Taps sintètics
- Altres tipus de taps
- Altres tipus d'envasos

2.5.1.- Taps tècnics

El tap tècnic és aquell que està constituït per petites peces o grànuls de suro natural net, els quals s'uneixen entre sí mitjançant l'ús d'una resina o un adhesiu sintètic per tal de formar una única unitat de tap. Generalment als extrems d'aquesta unitat (part que ha d'entrar en contacte amb el vi) es posen un o més discs de suro natural [48]. Són les varietats que habitualment coneixem com a taps de suro aglomerat, els quals poden ser més o menys simples.

Originalment aquests tipus de taps eren utilitzats pels *champagnes*, caves o vins escumosos. Alguns dels exemples més importants d'aquest grup de taps són el Twin-Top [28] i el Neutrocork [28] d'Amorim, el Duodisk [49] de Manuel Pereira De Sousa & Philos o el 2plus2 [50] de Vinocor.

La innovació que aporten alguns d'aquests tipus de taps és el procés de neteja, desinfecció i desodoració a la que es sotmet el suro, com per exemple el Ultracork [51], el INOS II [48] o el DS5 [48], els quals seran comentats més extensament en el següent capítol.

2.5.2.- Taps sintètics

Tal com diu el seu nom, els taps sintètics estan elaborats a partir de suro artificial, bàsicament, elements plàstics (etil-vinil acetat o una mescla de poliofines) [28,48]. En aquest grup es pot trobar un gran nombre de varietats.

Bàsicament existeixen dos processos majoritaris de fabricació de taps sintètics: d'emmotllament per injecció i d'extrusió. En els taps d'emmotllament per injecció, els elastòmers (polímer termoplàstic) s'injecten dintre d'un motlle, a on solidifiquen sota pressió. En els taps d'extrusió hi ha un èmbol que empeny la pasta de grànuls fosos i es fa passar per un capçal o matriu de sortida, és a dir, es té una massa de polímer termoplàstic llarga, la qual s'anirà tallant per donar lloc a cada un dels taps individuals. En el cas dels taps per extrusió, el procés de síntesi més habitual és el de co-extrusió, és a dir, la part interior està formada per una escuma, la qual es recobreix per un elastòmer termoplàstic [52].

En principi, totes les marques comercials asseguren que aquest grup de taps es caracteritzen perquè no modifiquen el sabor del vi (i, per tant, no provoquen l'aparició de l'olor a humitat o altres), no alliberen partícules quan son extrets de l'ampolla i presenten varietat de colors, la qual cosa obre nous camps de presentació del vi. Malgrat això, s'ha de constatar que alguns poden donar aromes o sabor de plàstic [33,34].

Es nombraran alguns exemples per tal de donar una visió de les possibilitats que ofereix el mercat.

El tap sintètic que té més acceptació en el món és el del fabricant SupremeCorq, els quals són utilitzats en més de 1.000 cellers en 30 països d'arreu del món. Aquest tap està elaborat amb elastòmers termoplàstics de grau alimentari (similars als que s'utilitzen en instruments mèdics i productes per a nadons), amb motlles d'injecció d'alta qualitat. En principi són neutres i no permeten el creixement microbià (que després pot causar l'aparició del defectes *de l'olor a humitat*), ni alteren el sabor [53]. Aquest tap atorgaria una estanquitat gairebé perfecta, de manera que les filtracions, evaporacions i defectes organolèptics són pràcticament eliminats. Les ampolles es poden emmagatzemar tant en vertical com en horitzontal. És set vegades menys permeable a l'oxigen que el tradicional tap de suro [48]. Un altre producte del mateix fabricant és el T-Top, una combinació de tapa i tall, amb el

qual no cal un llevataps [53]. El productor recomana la utilització d'aquests taps en vins que s'hagin de consumir en dos anys [53].

El fabricant anglès *Betacorque* és un altre exemple. És un tipus de tap que assegura el tancament hermètic, l'asèpsia per contacte, l'absència de bacteries nocives pel vi, el no desenvolupament de malalties que afecten al suro i la seva fàcil extracció i reinserció. Aquest tipus de tap, en el moment d'inserir-se en l'ampolla, sofreix un tipus de procés que rep el nom d'*elastificació dinàmica*, pel qual el tap s'adapta perfectament a l'ampolla [54,55].

El Nomarcorc és el fabricant d'Estats Units d'uns taps sintètics fabricats mitjançant un procés de co-extrusió. Aquest tipus de tap té un interior transpirable, de manera que permet el pas de petites quantitats d'oxigen, necessàries pel bon desenvolupament del vi, mentre que l'exterior ofereix una perfecta estanquitat. Pot presentar-se en color de suro o en qualsevol altre [56].

Un exemple de fabricant australià és el Nukorc, el qual elabora els taps mitjançant extrusió única (una sola peça). L'extrusió única permet una millor homogeneïtat entre els taps. Es poden presentar en tretze colors [57-59].

Per acabar, altres exemples de taps sintètics són l'Integra [60], el Neocork (tap sintètic co-extruït amb un interior consistent amb una escuma neutra de polietilè de baixa densitat i una capa externa d'un elastòmer termoplàstic (TPE)) [61], Aegis [34], Auscork [34] o el Tage [34].

Cal fer una especial menció als taps Altec (del fabricant francès Sabaté) i als produïts per l'empresa, també francesa, Cortex ja que aquests es troben a mig camí entre el tap sintètic i el tap tècnic. Tot i així, s'ha cregut més idoni incloure'l dintre aquest grup, pel fet de contenir en la seva estructura una part polimèrica. En el procés de desenvolupament de l'Altec s'elimina la lignina, reduint el suro a micropartícules. Aquestes son mesclades amb microesferes constituïdes per polímers termoplàstics que encapsulen un fluid volàtil. D'aquesta manera s'aconsegueix un producte molt similar al tap de suro natural [26,62]. Pel que fa al Cortex, tap que rep el mateix nom que la seva empresa creadora, combina parts de suro natural i altres de sintètic. Està constituït per un tap de suro, al qual se li ha incorporat un element de silicona a la part interna, la qual rep el nom de *preservador*. Segons els seus creadors, aquest tipus de tap presenta les bones propietats del tap de suro natural, però eliminant el seu principal desavantatge, la possible formació del defecte a *olor a humitat* [26].

Un dels principals problemes d'aquest tipus de tap és que els consumidors associen el seu ús a una idea de baixa qualitat [63]. Per aquesta raó, les innovacions

en aquests tipus de taps han anat encaminades a emular al màxim el tap de suro natural fent, per exemple, que quan es destapi una botella de vi, l'extracció del tap produeixi el soroll característic de "pop". Aquest és el cas del tap Zork, fabricat a Austràlia [58,64].

2.5.3.- Altres tipus de taps

Dintre d'aquest grup s'hi engloben aquelles altres formes de tapar el vi que no impliquen la introducció a pressió d'un tap dins l'ampolla.

Un primer exemple d'aquest grup és el tap de rosca, conegut també com a ROTE (*roll-on tamper evident aluminium closure*), utilitzat per primera vegada en el 1920 per a medicaments [65]. Solen estar elaborats amb alumini, tot i que, últimament, són molt utilitzats, també, els fets amb plàstic. L'interior està recobert de diferents tipus de materials, depenent del producte que han d'emmagatzemar [65,66]. Una de les seves avantatges és que l'obertura del mateix és molt senzilla [67].

En el món enològic han començat a aparèixer taps de vidre. El producte més famós és el *Vino-lok*, de l'empresa alemanya CSI. La principal avantatge d'aquest model és que l'ampolla, una vegada oberta, es pot tapar fàcilment amb el mateix tap [68].

Per acabar, comentar que una altra variant utilitzada és el tap corona, característic de moltes begudes refrescants no alcohòliques o de la cervesa [64,65].

2.5.4.- Altres tipus d'envasos

En aquest grup s'hi troben totes aquelles maneres de disposar el vi pel seu consum diferents al binomi "ampolla de vidre-tap".

El model més famós és, sense cap mena de dubte, el Tetrabrick® (nom comercial i registrat de l'envàs de forma rectangular fabricat per la casa Tetra Pak).

Altres variants existents és el conegut pel nom *Bag in box* que consisteix, com el seu nom indica, una bossa de plàstic que conté el líquid, la qual disposa d'una vàlvula per a la dosificació. Aquesta bossa està disposada dintre de una caixa. La principal avantatge que promulguen els seus defensors és, a diferència del vi embotellat que, després de la seva obertura ha de ser consumit immediatament si no es vol perdre la seva qualitat, el vi envasat amb aquest sistema es manté igual durant setmanes ja que el segellat de la bossa no permet l'entrada d'aire dins [33,69].

2.5.5.- Quin és el tap adequat per a conservar un vi? Estudis comparatius de diferents taps

Tot i que trobem diferents estudis comparatius per intentar trobar quin és el tap més adequat per conservar el vi, el resultat i les conclusions a les que s'arriba en cada cas depenen molt de quin era l'objectiu marcat a l'inici del treball.

Aquests diferents assajos han estudiat quina era l'evolució de diferents vins, ja siguin blancs, rosats, negres, caves o *champagnes*, al llarg del temps, quan les ampolles han estat tapades amb diferents tipus de taps, ja siguin naturals, sintètics o tècnics. També han estudiat quina era la millor posició de l'ampolla per a una conservació òptima del vi, si vertical o horitzontal.

Aquest és el cas dels treballs de Mas *et al.* [70,71], en els quals avaluaren el comportament de diferents tipus de taps al llarg de 24 mesos per a vins blancs, caves i *champagnes* i 36 mesos pels vins negres. En el cas dels vins, els millors resultats foren obtinguts pels taps de suro natural reblert o tap de suro de pols de suro. Respecte al tap de suro aglomerat, el seu comportament era similar als taps que obtingueren el millor resultat, sempre i quan l'emmagatzematge fora realitzat en posició horitzontal. En aquesta posició s'obtingueren oxidacions menors que no pas en posició vertical, independentment del tap utilitzat. Amb el cas dels caves i *champagnes*, els millors resultats foren obtinguts amb els taps de suro aglomerat amb doble disc de suro natural i el tap de corona, en contraposició al tap de suro aglomerat i tap de plàstic. Respecte a la incidència de l'olor a humitat es trobà major incidència al utilitzar taps de suro aglomerat en tots els casos.

Un estudi similar fou el que portaren a terme Chatonet *et al.* [72], els quals provaren l'efecte de diferents tipus de taps (suro, tècnics i sintètics) en vins blancs i vins negres durant 12 mesos. Trobaren que l'oxidació experimentada pels diferents vins era menor quan la posició de l'ampolla era en horitzontal, obtenint els millors resultats quan el tap de suro natural era utilitzat. Respecte a la força d'extracció, trobaren que aquesta decreix al llarg del temps. En general, la força requerida per treure un tap de suro natural és menor en comparació amb els altres taps examinats. També avaluaren les sensacions organolèptiques. La pitjor nota se l'emportà un vi blanc que portava un tap sintètic. Quan s'utilitzava aquest tipus de tap, compostos del mateix, com amines aromàtiques, migraven al vi.

Sobre la relació entre la permeabilitat d'oxigen i posició de les ampolles és interessant els treballs realitzats per Lopes *et al.* [32,73], on avaluaren l'efecte de diferents taps (suro natural, taps tècnics –Neutrocork i Twintop-, taps sintètics –Supremecorq i Nomacorq- i taps de rosca). Els taps menys permeables a l'oxigen foren els taps tècnics i taps de rosca, els taps de suro presentaren un comportament

intermedi, mentre que els taps sintètics es mostraren permeables a aquest gas. Respecte a la posició, trobaren que pràcticament no afectava en el pas d'oxigen a l'ampolla, almenys en els 24 mesos d'estudi.

Per la seva banda, Godden *et al.* [74,75] i Francis *et al.* [76] varen estudiar el rendiment d'una gran varietat de taps (suro natural, sintètics, tècnics i taps de rosca) en un *Sémillon*, sense fusta, al llarg de 36 mesos. Els taps de suro presentaven bons rendiments respecte als aromes oxidats, tot i que, en algun cas, també presentaven olors a reducció i baixa concentració de diòxid de sofre. Això indicava que no tots els taps de suro tapaven de la mateixa manera, donant lloc a oxidacions aleatòries. En contraposició, els taps que patiren menys oxidació foren els de rosca, tot i que presentaven més intensitat aromes de reducció. Respecte a l'olor a humitat, cap ampolla tapada amb taps de composició diferent al suro presentava aquest defecte, mentre que les que estaven tapades amb taps a base de suro, sí (per exemple, taps Altec), trobant la correlació d'increment de contaminació en funció al temps. Respecte als taps sintètics, alguns d'ells es varen desestimar ja al poc temps de començar l'estudi, pel seu pobre rendiment. Cal destacar que alguns d'aquests taps sintètics presentaven olors a goma, concloent que no eren adequats per a la conservació de vins durant un llarg temps.

Aquesta diferència en el nivell d'oxidació entre els taps de rosca i els taps de suro natural fou tractat amb més profunditat per Brajkovich *et al.* [77], en un estudi en el qual no trobaren pràcticament diferències amb el nivell d'oxigen dissolt en el vi, relacionat amb la pèrdua de SO₂. Les úniques divergències apareixien en la disminució d'alguns tiols volàtils en el cas del tap de suro. Aquests compostos estan relacionats amb l'aroma afruitat del vi. Tot i així, aquestes diferències no pogueren ser identificades per un panell de tast.

Altres treballs, com els de Silva *et al.* [78] i Cravero *et al.* [79] no arriben a cap conclusió clara sobre quin dels taps és més adequat a l'hora d'embotellar un vi. Els resultats més interessants observats per aquests científics foren, en el cas de Silva *et al.*, que les forces d'extracció eren més elevades pel cas dels taps sintètics i que el seu retorn elàstic disminuïa de manera proporcional cada mes.

Cal dir també que, a més d'aquests estudis amb vins, hi ha algunes comparatives més enfocades al comportament del suro i no tant en el vi final.

Aquest és el cas dels estudis portats a terme per Chatonet *et al.* [80,81], a on s'avaluà la presència de diferents tipus de residus en els taps i també la migració de compostos dels taps al vi (mitjançant maceració hidroalcohòlica dels taps durant dues setmanes). Els resultats van demostrar que, efectivament, alguns dels taps tècnics avaluats contenien residus com benzè, toluè, o-xilè, m-xilè, p-xilè o

BTX (mescla d'hidrocarburs aromàtics), però que d'altres taps com el Neutrocork o Twintop no presentaven aquesta contaminació. Respecte a la migració de components des del tap cap al vi, a part d'algun component típic d'aquesta migració com és la vainillina, i d'alguns compostos que provenien del tractament de superfícies dels taps i dels productes d'aglomeració com el polimetilsiloxà i hidrocarburs de parafina, només es va detectar algun defecte olfatiu de característiques olfactivas de goma en algun tap sintètic. També cal destacar que en cap dels suros tècnics estudiats es va detectar la presència de 2,4,6-tricloroanisole, però sí que es va detectar en el tap aglomerat. Aquests resultats concorden amb els de Godden *et al.* [74,75] i Francis *et al.* [76] ja que, segons aquests, els taps que no contenen suro no presentava el defecte *olor a humitat*, mentre que les ampolles amb taps a base de suro, sí que el presentaven.

Un altre estudi comparatiu interessant és el portat a terme per De Filippis *et al.* [82] en el qual es comparen diferents paràmetres físics (estructura macroscòpica, estructura per IR, colorimetria diferencial, proves mecàniques, etc.) en taps sintètics obtinguts amb diferents tècniques d'injecció o d'extrusió. En termes generals, com a resultat d'aquest estudi es pot dir que els taps d'injecció són menys homogenis que els d'extrusió, la qual cosa es tradueix en un diferent comportament en el manteniment de l'estanquitat. Tot i així, presenten una superfície amb defectes, fet que provocarà que el contacte amb l'ampolla no sigui regular. Aquest problema de la irregularitat superficial es pot resoldre fabricant taps de major densitat, amb l'inconvenient que suposa un augment en la força d'extracció. Per altra banda, aquest estudi també va demostrar que un mateix tap pot ser utilitzat amb bons resultats tant per conservar vins de consum ràpid com de criança, depenent del tipus d'elastòmer termoplàstic utilitzat. De totes maneres, però, el resultat que més crida l'atenció és el que mostra que els taps sintètics presenten una permeabilitat inferior a la dels de suro natural.

Giunchi *et al.* [52] varen realitzar un treball on es compara el comportament mecànic del tap de suro natural, el tap de suro tècnic i el sintètic. Pel que fa a la força necessària per llevar el tap de l'ampolla, la més petita correspon al tap de suro natural, mentre que el suro tècnic suposa una força més elevada. Respecte a la força de compressió (força necessària per passar del diàmetre inicial d'un tap al 33%), el tap de suro té els resultats més alts, mentre que els taps sintètics d'injecció els més baixos.

Per últim, no es pot deixar de fer menció als treballs que fan referència al *scalping flavour*. Aquest concepte defineix la pèrdua de qualitat del producte envasat, a causa de l'absorció per part del producte de compostos aromàtics volàtils

provinents de l'embalatge o de l'absorció de compostos volàtils del producte per part de l'embalatge [65]. En aquest sentit, Capone *et al.* [83] van avaluar quin era l'efecte del tap en l'absorció de compostos volàtils provinents del vi tot fent servir diferents tipus de tap. Els resultats van demostrar que la càpsula metàl·lica era el sistema més inert ja que, amb aquest producte, no s'observa modificació de compostos. Per altra banda, però, es va veure que, en termes generals, els compostos volàtils relativament no polars eren més absorbits per suros sintètics i naturals, mentre que els compostos no polars eren més absorbits per suros sintètics. Una diferència clara es va veure en l'absorció d'un noraisoprenoid C13, el TDN (1,1,6-trimetil-1,2-dihidronaftalè), que aporta una aroma a querosè i és característic de vins envellits, especialment rieslings [84]. Així, passats dos anys, aquest compost era absorbit entre 96-98 % per part dels taps sintètics, mentre que el suro natural n'absorbia un 50-70%. En definitiva, doncs, fos quin fos el tap utilitzat, aquest afectava en la concentració de volàtils dels vins.

En aquesta línia també es troba el treball realitzat per Culleré *et al.* [85] en el qual realitzen una comparativa de diferents taps de suro (sintètics i naturals). En una primera part varen dur a terme una maceració dels taps, per tal de ser avaluada per un panell de tast. Es trobà que els macerats del suro sintètic eren menys aromàtics que els suros naturals i que els suros sintètics donaven més components negatius. Entre aquests es pot destacar el de goma pels suros sintètics i el de suro/bolet pels suros naturals. En una segona part, investigaren el perfil aromàtic d'aquests suros mitjançant cromatografia de gasos i detecció olfactimètrica. Entre les principals conclusions que es poden destacar és que, en tots els casos, els taps alliberen compostos, els quals podran arribar al vi i afectar al seu perfil aromàtic. Cal destacar que els compostos alliberats pel taps sintètics no es solen trobar en vins sans (compostos aliens als vins), mentre que els que són alliberats pels taps de suro natural sí que es poden trobar habitualment en vins. En cap cas es trobà compostos com el 2,4,6-tricloroanisole o el 2,4,6-tribromoanisole, però sí que es detectà altres com el guaiacol o el 1-octen-3-ona.

Per tant, amb tot el que s'ha exposat fins ara queda palès que els taps de suro natural, generalment són els que proporcionen millors resultats en les diferents comparatives mentre que els taps de suro aglomerat són els que s'emporten la pitjor valoració. Per altra banda, també s'ha constatat que els taps sintètics no provoquen l'aparició del defecte aromàtic florit/humitat, tot i que alguns, però, aporten aromes de goma, entre d'altres defectes. Sigui com sigui, el que es fa patent amb tots aquests estudis és que no hi ha cap tap perfecte. Per tant, és l'enòleg qui haurà de decidir quin tipus de tap és el més adequat pel seu vi, tenint en compte tots els pros i contres de cadascun d'ells. I tot això sense aprofundir en

l'aspecte psicològic: la imatge. En aquest sentit, encara el consumidor relaciona el tap de suro amb qualitat, preferint aquesta modalitat front el tap sintètic o altres [86-88]. És interessant el quadre resum que va aparèixer a *Corkwatch* [34,89] sobre les diferents modalitats de tap i que a continuació s'exposa (Taula II.3), com a resum final.

Taula II.3. Resum dels avantatges i inconvenients de les modalitats de taponat d'un vi

TAPS DE SURO		TAPS TÈCNICS I/O SEMI SINTÈTICS	
Avantatges	Inconvenients	Avantatges	Inconvenients
	Olor a humitat?		
Tradicional	Material heterogeni,	Aparença de suro	Olor a humitat?
Bona imatge	variabilitat entre taps	Consistència	Oxidació?
Eficàcia comprovada	Oxidació?	Extracció fàcil	Necessita llevataps
Extracció fàcil	Necessita llevataps	S'adapten fàcilment a	Les ampolles s'han
Fàcil mecanització	Les ampolles s'han	les taponadores de	d'emmagatzemar en
	d'emmagatzemar en	suro	horitzontal
	horitzontal		
TAPS SINTÈTICS		CÀPSULA METÀL·LICA (ROSCA)	
Avantatges	Inconvenients	Avantatges	Inconvenients
Consistència		Consistència	
Lliures de l'olor a		Eficàcia provada en	Problemes d'imatge?
humitat	Problemes d'imatge?	blancs	En vins negres no s'ha
S'adapten fàcilment a	Oxidació?	Mantenen la frescor	provat llargs
les màquines	Olor a goma o plàstic?	S'extreuen amb	envelliments
embotelladores de	Necessita un llevataps	facilitat	Problemes de reducció
suro	Problemes d'extracció	Les ampolles es poden	Requereix ampolles i
Les ampolles es poden	descriu a vegades	emmagatzemar en	equips adequats
emmagatzemar en		vertical	
vertical			

BIBLIOGRAFIA

1. A. Reixach, G. Pous. *Conocer y escoger el vino. Arte y cultura del vino*. 1^{era} edició. Barcelona (Catalunya): Editorial Salvat-Hachette; 1996
2. *La guía del Louvre*. 1^{era} edició. París (França): Musée du Louvre Éditions; 2005
3. J. Peñín. *Guía Peñín de los Vinos de España*. 1^{era} edició. Madrid (Espanya): Peñín Ediciones; 2007
4. J. Aronson, J. S. Pereira, J. G. Pausas. *Cork oak woodlands on the edge: Ecology, adaptive management, and restoration*. 1^{era} edició. Washington (USA): Island Press; 2009
5. R. Hooke. *Micrographia. Some Physiological Descriptions of Minute Bodies Made by Magnifying Glasses with Observations and Inquiries Thereupon*. <http://www.gutenberg.org/ebooks/15491> (14 de novembre de 2009)
6. <http://www.corkfacts.com/contpges/histmain.htm> (14 de novembre de 2009)
7. H. McGee. *La cocina y los alimentos*. 2^{ona} edició. Barberà del Vallès (Catalunya): Debate; 2007
8. M. Oliva. *Silvicultura de l'alzina surera. Curs El suro a l'Enologia*. Vilafranca del Penedès (Catalunya): Parc Agroindustrial Àgora; juny-juliol de 1999
9. R. A. Alturo. *L'alzina surera. Aspectes forestals. Curs El suro a l'Enologia*. Tarragona (Catalunya): Facultat d'Enologia; març de 2001
10. L'alzina surera i el corc *Coroebus undatus*. Catalunya forestal 58 (2004) <http://www.forestal.cat/numero68/noti01.htm> (14 de novembre de 2009)
11. J.M. Montoya. *Los alcornocales*. 1^{era} edició: Madrid (Espanya): MAPA; 1988
12. J. Vieira. *Subericultura*. 1^{era} edició. Madrid (Espanya) MAPA; 1991
13. M. C. Varela. El corcho y los alcornocales. *Revista Unasyuva* 197 (5) (1999). <http://www.fao.org/docrep/x1880s/x1880s08.htm#el%20corcho%20y%20los%20alcornocales> (14 de novembre de 2009)
14. Instituto del corcho, la madera y el carbón vegetal. <http://www.iprocor.org> (14 de novembre de 2009)
15. J. C. Ponte e Sousa, J. M. Ginja Teixeira, A. M. Neto Vaz. The importance of cork (bark) of *Quercus Suber* in the environmental monitoring of heavy metals. *Elec. J. Environ., Agric. Food Chem.*, 2 (2) (2003) 314-319
16. J.S. Carrión, I. Parra, C. Navarra, M. Manueras. Past distribution and ecology of the cork oak (*Quercus suber*) in the Iberian Peninsula: a pollen-analytical approach. *Diversity and Distributions*, 6 (2000) 29-44
17. N. Vogiatzakis, M. B. Careddur. Mapping the distribution and extent of *Quercus suber* habitats in Sardinia: a literature review and a proposed methodology.

- Geographical Papers, 171 (2003). <http://wap.rdg.ac.uk/web/FILES/geog/GP171.pdf>
(14 de novembre de 2009)
18. El clima fa del 2008 un any excepcional per a l'extracció del suro: El corc i la disminució de la demanda, l'altra cara de la moneda. *Catalunya Forestal*, 92 (2008) 6-9
 19. <http://www.coscoja.com> (14 de novembre de 2009)
 20. K. Roberts. *Handbook of Plant Science*. 1^{era} edició. Chichester (Gran Bretanya): John Wiley and Sons, Ltd.; 2007
 21. L. J. Gibson, M. F. Ashby. *Cellular solids, structure and properties*. 2^{ona} edició. Cambridge (Gran Bretanya): Cambridge University Press; 1997. Capítol 12, 15-51
 22. D. Petegolli. El corcho, cruz y delicia de la enología. *Sevi*, 2790 (2000) 358-369
 23. Redacció. La protecció del suro. *ACE Revista d'Enologia*, 54 (2001) 3
 24. M Riu. *2,4,6-tricloroanisol: aspectes enològics i mètodes d'anàlisi*. Diploma d'Estudis Avançats (DEA). Tarragona (Catalunya): URV; 2001
 25. J. A. Casey. The cork paradox. *Aust. Grapegrower Winemaker*, 411a (1998) 15-20
 26. Redacció. La protecció del suro. *ACE Revista d'Enologia*, 54 (2001) 5-7
 27. D. Wilson, L. Lockshin. The issue of synthetic closures: What can the wine tell you? *Wine Ind. J.*, 16 (2001) 101-103
 28. www.corkfacts.com (14 de novembre de 2009)
 29. J. A. Casey. Closures for wine bottles – a user's viewpoint. *Aust. Grapegrower Winemaker*, (1989) 99-107
 30. J. A. Casey. "Closures for wine bottles: Issues and challenges" dins P. Leske, J. Eglinton (editors), *ASVO Seminar*. 1^{era} edició. Adelaida (Austràlia): Australian Society of Viticulture and Oenology, 1995. 3-8
 31. J. A. Casey. A Report on the 2nd International Symposium of cork. *Aust. Grapegrower Winemaker*, (1996) 30-32
 32. P. Lopes, C. Saucier, P. L. Teissedre, Y. Glories. Main routes of oxygen ingress through different closures into wine bottles. *J. Agric. Food Chem.*, 55 (13) (2007) 6741-6746
 33. R. Jackson. *Wine Science: Principles and Applications*. 3^{era} edició. Amsterdam (Holanda): Elsevier Science and Technology; 2008. Capítol 8, 418-459
 34. F. Zamora. ¿Son los tapones sintéticos una alternativa al tapón de corcho? *Enólogos*, 33 (2005) 46-55

35. R.F. Simpson. Cork taint in wine: A review of the causes. *Aust. N. Z. Wine Ind. J.*, (1990), 286-296
36. R. Cantagrel, J. P. Vidal. Recherche des composés responsables du goût du bouchon dans les cognacs. *Extrait du Bulletin de l'OIV*, (1990) 709-710
37. R. M. Soler. *Procés de producció de taps de suro per a vins tranquils i vins escumosos. Curs El suro a l'Enologia*. Vilafranca del Penedès (Catalunya): Parc Agroindustrial Àgora; juny-juliol de 1999
38. A. Madigan. Cork – An Industry Under Scrutiny. *Wine Ind. J.*, 17 (6) (2002) 62- 67
39. C. E. Liège. *Código Internacional de Práticas Taponeras*. 4^{arta} edició. Santa Maria de Lamas (Portugal): C. E. Liège; 2003
40. M. Deves. Uncorking cork. A report into the future of cork in the Australian wine Industry. *Wine Ind. J.*, 12 (2) (1997) 168-179
41. P. Vieira Neto. *Portuguese Research Priorities and Direction*. Adelaide (Austràlia): ASVO Oenology Seminar. Corks and Closures; 2004
42. Natural Cork User Group. *Guía Internacional para la compra de taponos de corcho para vinos tranquilos*. Versió 1. Santa Maria de Lamas (Portugal): C. E. Liège; 2007
43. S. Insa. *Detecció de Compostos Volàtils, Clorofenols, Cloroanisoles i 2,4,6-Tribromoanisoles, relacionats amb el "Gust de Suro"*. Tesi Doctoral. Girona (Catalunya): Universitat de Girona; 2006
44. P. Galetto. Cork taint in Wine: Changes in the Portuguese Cork Industry to Confront the Issue. *Wine Ind. J.*, (1993) 84-87
45. J. M. Amon, R. F. Simpson. Wine corks: a review of the incidence of cork related problems and the means for their avoidance. *Aust. Grapegrower Winemaker*, 268 (1986) 63-80
46. R. F. Simpson. Cork Taint in Wine: A review of the causes. *Aust. N. Z. Wine Ind. J.*, 4 (4) (1990) 286-293
47. Sefton, M. A.; Simpson, R. F. Compounds causing cork taint and the factors affecting their transfer from natural cork closures to wine – a review. *Aust. J. Grape Wine Res.*, 11 (2005) 226-240
48. http://www.vwm-online.com/Magazine/Archive/1999/Vol25_No6/Cork.htm (14 de novembre de 2009)
49. T. Caputo. The Cork Industry Responds. *Wines and Vines*. <http://www.allbusiness.com/retail-trade/food-beverage-stores-beer-wine-liquor/294470-1.html> (7 de novembre de 2009)
50. <http://www.vinocor.es> (7 de novembre de 2009)

51. Taint risk reduced, workshop told. *Wine Ind. J.*, 19 (5) (2004) 80-82
52. A. Giunchi, A. Versari, G. P. Parpinello, S. Galassi. Analysis of mechanical properties of cork stoppers and synthetic closures used for wine bottling. *J of Engineering*, 88 (2008) 576-580
53. <http://www.supremecorq.com> (7 de novembre de 2009)
54. <http://www.azom.com/details.asp?ArticleID=1628> (11 de novembre de 2009)
55. <http://www.guiadeprensa.com/alimentacion/hispacorque-accesorios-vinos.html> (7 de novembre de 2009)
56. <http://www.nomacorrc.com> (7 de novembre de 2009)
57. <http://www.nukorc.com> (11 de novembre de 2009)
58. Alternative Closures keep coming. *Wine Ind. Journal*, (2004) 84
59. B. Dolling. The NuSpark synthetic closure for sparkling wine. *Aust. N. Z. Grapegrower Winemaker*, 485a (2004) 104-109
60. <http://www.solutions-greece.com/html/integra.html> (11 de novembre de 2010)
61. <http://www.neocork.com> (07 de novembre de 2009)
62. <http://www.sabate.com> (07 de novembre de 2009)
63. A. Donaldson. Wine Closures. An Industry Opens. *Aust. N. Z. Grapegrower Winemaker*, 482 (2004) 37-41
64. P. Le Lacheur. Marketing Wine Closures – the race to get the seal approval. *Aust. N. Z. Grapegrower Winemaker*, 487 (2004) 72
65. G. L. Robertson. *Food Packaging: Principles and Practices*. 2^{ona} edició. Nova York (USA): Marcel Decker, Inc.; 2006
66. <http://www.stelvin.com> (07 de novembre de 2009)
67. A. Madigan. The Screw Cap revolution Rolls On. *Wine Ind. J.*, 19 (5) (2004) 59-65
68. <http://www.vino-lok.de/> (7 de novembre de 2009)
69. [http://www.guiaenvase.com/bases/guiaenvase.nsf/0/0B23788EF00042A8C125714D004EA6F0/\\$FILE/bag%20in%20box.pdf?OpenElement](http://www.guiaenvase.com/bases/guiaenvase.nsf/0/0B23788EF00042A8C125714D004EA6F0/$FILE/bag%20in%20box.pdf?OpenElement) (7 de novembre de 2009)
70. A. Mas, J. Puig, N. Lladó, F. Zamora. *Evolución de vinos tranquilos y champagnes según diferentes tipos de tapado. Función del Tapón de corcho*. Tarragona (Catalunya): Universitat Rovira i Virgili i Institut Català del Suro; 2002
71. A. Mas, J. Puig, N. Lladó, F. Zamora. Evolució del cava i del champagne segons diferents tipus de tapada. *ACE Revista d'Enologia*, 54 (2001) 12-15

72. P. Chatonet, D. Labadie, M. C. Gubbiotti. Étude comparative des performances de différents types de bouchage. *Rev Oenol.*, 95 (2000) 7-13
73. P. Lopes, C. Saucier, P. L. Teissedre, Y. Glories. Impact of storage position on oxygen ingress through different closures into wine bottles. *J. Agric. Food Chem.*, 54 (2006) 6741-6746
74. P. Goden, L. Francis, J. Field, M. Gishen, A. Coulter, P. Valente, K. Lattey, P. Høj, E. Robinson. Wine bottle closures: sensory properties of Semillon wine – performance up to 20 months post-bottling. *Wine Ind. J.*, 16 (5) (2001) 93-112
75. P. Goden, L. Francis, J. Field, M. Gishen, A. Coulter, P. Valente, K. Lattey, P. Høj, E. Robinson. Wine bottle closures: sensory properties of Semillon wine – performance up to 20 months post-bottling. *Aust. J. Grape Wine Res.*, 7 (2001) 64-105
76. L. Francis, J. Field, M. Gishen, A. Coulter, P. Valente, K. Lattey, P. Høj, E. Robinson, P. Goden. The AWRY closure trial: sensory evaluation data 36 months after bottling. *Aust. N. Z. Grapegrower Winemaker*, 475 (2003), 59-64
77. M. Brajkovich, N. Tibbits, G. Peron, C. M. Lund, S. I. Dykes, P. K. Kilmartin, L. Nicolau. Effect of Screwcap and cork closures on SO₂ levels and aromas in a sauvignon blanc wine. *J. Agric. Food Chem.*, 53 (2005) 10006-10011
78. A. Silva, M. Lambri, M. D. Faveri. Evaluation of the performance of synthetic and cork stoppers up to 24 months post-bottling. *Eur. Food. Res. Technol.*, 216 (2003) 529-534
79. M. C. Cravero, C. Ponte, F. Bonello, E. Boglio, B. Cordero, D. Eberle. Confronto tra tappi di sughero e sintetici. Proves su dolcetto d'ovada a doc. *Enologo*, 39 (5) (2003) 103-112
80. P. Chatonet, M. C. Gubbiotti. Une nouvelle génération de bouchons industriels à base de liège: Évaluation des performances du bouchon Neutrocork and Irmaos. *Rev. Oenol.*, 99 (2001) 7-11.
81. P. Chatonet, D. Labadie, M. C. Gubbiotti. Étude comparative des caractéristiques de bouchons en liège et en matériaux synthétiques – Premiers résultats. *Rev. Oenol.*, 92 (1999) 9-14
82. P. De Filippis, D. Liberati, M. Scarsella. Tappi sintetici: caratteristiche meccaniche e prestazionali. *Ind. Bevande*, 33 (2004) 213-220
83. D. Capone, M. Sefton, I. Pretorius, P. Høj. Flavour *scalping* by wine bottle closures. *Wine Ind. J.*, 18 (5) (2003) 16-20
84. S. H. Lee, M. J. Seo, M. Riu, J. P. Cotta, D. E. Block, N. K. Dokoozlian, S. E. Ebeler. Vine microclimate and norisoprenoid concentration in cabernet sauvignon grapes and wines. *Am. J. Enol. Vitic.*, 58 (3) (2007) 291-301

85. L. Culleré, J. Cacho, V. Ferreira. Comparative study of the aromatic profile of different kinds of wine cork stoppers. *Food Chem.*, 112 (2009) 381-387
86. T. Stelzer. Will they buy it? Convincing consumers of the case for screw caps. *Aust. N. Z. Grapegrower Winemaker*, 479 (2003) 88-93
87. Editorial. Le bouchage du vin vu par les consommateurs. *Rev. Française Oenol.*, (2003) 35
88. M. Bolton. *Consumer responses to problem wines and alternative closures*. Adelaide (Austràlia): ASVO Oenology Seminar. Corks and Closures; 2004
89. <http://www.corkwatch.com> (7 de novembre de 2009)

CAPÍTOL III
L'OLOR A HUMITAT

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
DETERMINACIÓ ANALÍTICA DE 2,4,6-TRICLOROANISOLE I ALTRES CLOROANISOLES
EN VINS I SUROS
Marc Riu Rusell
ISBN:9788469432358/DL:T. 1044-2011

1.- INTRODUCCIÓ

Un dels defectes més importants que es poden trobar al vi és el que tradicionalment es coneix com a gust a suro, o *cork taint* en anglès, o *goût a bouchon* en francès. En aquesta tesi doctoral, s'ha volgut evitar premeditadament aquesta denominació de gust a suro, per tal de no desprestigiar gratuïtament aquest material tot fent-lo culpable/responsable del problema (mentre no es demostrï el contrari, tothom és innocent). És per això que hom considera el terme "olor i/o sabor a florit o humitat" més adient per designar aquest defecte, ja que aquest descriu perfectament una característica organolèptica. Una altra denominació que també es considera adequada és la que descriu el contaminant que genera aquest defecte, és a dir, contaminació per haloanisoles. Tot i així, aquesta només es centra en uns compostos concrets i, com es veurà més endavant, això no té per què ser exactament d'aquesta manera. Per totes aquestes raons, i per facilitar la lectura i comprensió d'aquest treball, s'ha decidit utilitzar la denominació *d'olor a humitat*, ja que es considera que defineix prou correctament el defecte que s'està tractant.

El capítol intenta donar resposta a les sis preguntes que surgeixen quan es parla de *l'olor a humitat*: Què, qui, com, quan, a on i per què.

2.- DEFECTES EN L'AROMA

En menjar-nos un aliment, la interacció entre el gust, l'olor, el tacte i, inclús la percepció visual d'aquest, provoca un conjunt de sensacions que hom defineix com flavor [0], terme derivat de l'anglès *flavor* (o *flavour* en americà).

Els compostos responsables del gust no són generalment volàtils a temperatura ambient. Aquests interaccionen només amb els receptors localitzats en la llengua. Tot i que se'n poden descriure uns quants més, els quatre gustos principals són: amarg, àcid, dolç i salat [2].

Per altra banda, les substàncies aromàtiques solen ser compostos volàtils els quals són percebuts pels receptors olfactius situats en l'òrgan de l'olfacte. Aquestes substàncies arriben als receptors, o bé a través del nas (detecció orthonasal) o bé a través de la gola, una vegada els aliments han estat mastegats (detecció retronasal). Cal dir, però, que un compost serà detectat per l'olfacte humà sempre i quan la seva concentració estigui per sobre del llindar de percepció, que és la mínima quantitat que pot ser detectada per l'òrgan olfatiu [3].

Encara que és més habitual parlar de l'aroma dels aliments com un valor afegit (i important) dels mateixos, en aquest capítol només es farà referència a l'aspecte negatiu que poden tenir certes substàncies presents en aquesta aroma i que poden condicionar, fins al rebuig, el consum dels productes alimentaris.

Una aroma desagradable pot ser deguda bàsicament a tres causes: aparició d'una substància aromàtica estranya, pèrdua d'un compost impacte o canvis en la relació de concentracions de les substàncies aromàtiques individuals. En la Figura III.1 es poden veure les principals causes d'aparició de defectes en l'aroma dels aliments.

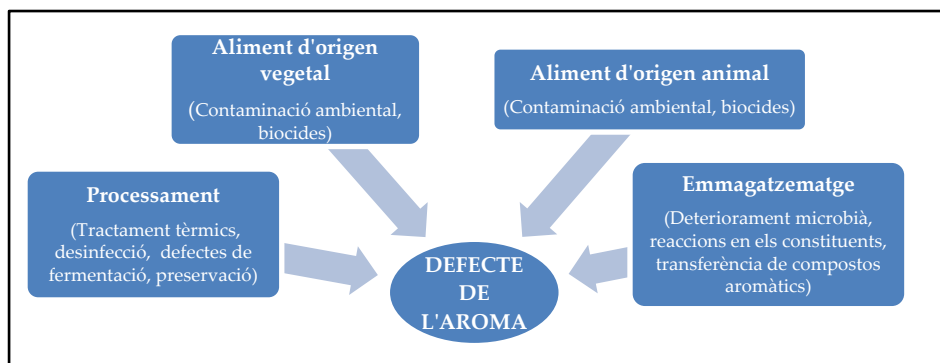


Figura III.1. Causes dels defectes aromàtics en els aliments [3]

3.- DEFECTES ORGANOLÈPTICS DEL VI

El vi és quelcom viu. Neix, evoluciona, té un període en el qual deixa veure les seves millors propietats i finalment, mor. Però, en el transcurs d'aquesta vida, també pot patir *malalties* que alteraran les seves característiques composicionals i organolèptiques. Pel que fa a les *malalties* responsables de la modificació de l'aroma del vi, aquestes deriven en diferents defectes. Tot seguit es fa una breu descripció dels que es consideren els més importants.

- Defectes provocats per l'oxidació. Aquest defecte causa en el vi una atenuació o modificació de les seves aromes primer i, després, una aparició de l'etanal lliure i els seus derivats, que atorguen una aroma de poma fresca tallada [4,5]. Cal dir que aquesta és molt diferent de l'oxidació que es produeix una vegada l'ampolla de vi s'ha obert i roman així un temps llarg. En aquest cas, es manifesta mitjançant una pèrdua constant de la frescor deguda, bàsicament, a la degradació d'èsters d'etil i acetat i, amb menys importància, de terpenols volàtils [6].
- Defectes provocats per contaminació bacteriana. En aquest grup s'hi engloben diferents tipus de defectes:
 - *Augment de l'acidesa volàtil*. Aquest augment del contingut d'àcid acètic es deu a l'acció de bacteris làctics anaerobis o de bacteris acètics aerobis. Aquest defecte atorga al vi un gust àcid i amarg. És el que normalment es coneix com a *picat acètic* [4-6].
 - *Contaminació causada per bacteris làctics*. Diferents bacteris làctics poden créixer en el vi, tot i el seu elevat contingut alcohòlic i el seu baix pH. Quan ja no hi ha sucre en el vi, la molècula més fàcilment degradable és l'àcid màlic. Aquesta fermentació millora la qualitat dels vins negres i d'alguns blancs, aportant aromes làctiques, encara que també es produeix un petit augment de l'acidesa volàtil a causa de la degradació de l'àcid cítric. Però quan la fermentació alcohòlica és molt lenta o s'atura, els bacteris làctics són capaços de transformar els sucres encara presents, tot produïnt àcid acètic i àcid làctic, causant un augment de l'acidesa volàtil fins a límits que provoquen que el vi no sigui comercialitzable [4-7].

Els bacteris làctics també poden veure's involucrats en altres tipus de defectes. La *tourne* o la volta del vi, que afecta a l'àcid tartàric, provoca que els vins adquireixin un color marronós i l'aparició d'un precipitat viscos. El *amertume*, en el qual es produeix la degradació del glicerol a

acroleïna o a 1,3-propanediol, donant lloc a vins amargs, amb aparició de diòxid de carboni i augment de l'acidesa volàtil. La fermentació manílica provoca l'aparició de manitol i àcid acètic. La *graisse* o degeneració grassa provoca que el vi es torni viscos i oliós. Aquest defecte es deu principalment a l'acció d'unes soques específiques de bacteris làctics, els quals sintetitzen polisacàrids β -glucànids, que consisteixen en la repetició d'una unitat trisacàrida. Per altra banda, en presència d'àcid sòrbic, alguns bacteris làctics poden provocar l'aparició d'una aroma de gerani [4-8].

○ *Contaminació causada per altres bacteris diferents de l'acètic i el làctic.* Entre els més importants es pot destacar el *Bacillus*, relacionat amb la degradació del glicerol a acroleïna, i el *Streptomyces*, que pot donar lloc a l'aparició de geosmina i 2-metilisoborneol [5,6].

- Contaminació per llevats micodèrmics. Els vins amb baix contingut alcohòlic es veuen afectats pel desenvolupament d'una capa de flora en la seva superfície en contacte amb l'aire. Aquesta capa consisteix en una soca d'un llevat (*Candida mycoderma*). La conseqüència més destacada causada per aquest llevat és l'oxidació de l'etanol a etanal, podent seguir la reacció fins a una oxidació complerta, donant lloc a diòxid de carboni i aigua. El llevat també pot oxidar els àcids orgànics, de manera que es produeix una disminució de l'acidesa del vi, el qual es torna aigualit i amb aspecte tèrbol, la qual cosa afecta també a les característiques organolèptiques (caràcter oxidat) [4,5].
- Caràcter fenòlic. Els responsables d'aquest defecte són l'etil-4-fenol, el vinil-4-fenol, l'etil-4-guaiacol i el vinil-4-guaiacol. Els vinilfenols solen aparèixer en els vins blancs, mentre que els etilfenols en els vins negres. Les aromes que atorguen aquests compostos són d'estable, de fum, especiada, farmacèutica o càrnica (generalment catalogades com a olors animals). Els vinilfenols es formen per l'acció de la descarboxilació enzimàtica de dos àcids cinàmics per part de *Saccharomyces cerevisiae*. Els etilfenols es formen durant la fermentació alcohòlica, al mateix temps que es produeixen grans quantitats d'acidesa volàtil, acció duta a terme per llevats, bàsicament *Brettanomyces* i *Dekkera* [4,5,9-11].
- Compostos sofrats. Alguns compostos sofrats tenen una contribució positiva a les aromes varietals de certs raïms, com, per exemple, el que aporta la 4-mercapto-4-metil-pentan-2-ona a l'aroma del Cabernet sauvignon, però la

majoria d'ells tenen un efecte negatiu, atorgant olors desagradables, amb límits de percepció sensorial molt diversos [4,11,12].

Els compostos sofrats poden tenir diferents orígens. Alguns provenen de la fermentació alcohòlica per efecte dels llevats, d'altres de la descomposició de certs aminoàcids amb sofre, com la metionina i la cisteïna i d'altres tenen el seu origen en la descomposició d'alguns fungicides i insecticides que contenen àtoms de sofre en la seva estructura. Donat que algunes d'aquestes reaccions vénen catalitzades per la llum, especialment la ultravioleta, de vegades aquestes aromes reben el nom d'aromes de llum. Alguns protectors lligats a aquest efecte són les catequines i la vitamina C, a causa de la seva fotosensivitat [4-6,12-14].

- Olor a marieta. L'aroma que rep el nom d'aquest escarabat ha estat detectat en alguns vins d'Amèrica del Nord. El principal compost d'aquest defecte és la 2-isopropil-3-metoxipirazina, la qual presenta límits de percepció a nivells de $\text{ng}\cdot\text{l}^{-1}$. Sembla ser que la presència d'aquest insecte en algunes etapes del procés de vinificació pot fer aparèixer aquesta aroma [15]. Aquest defecte organolèptic és un exemple de com poden afectar les influències ambientals en l'aroma del vi.
- Olor a humitat. Aquest és el defecte conegut també com a gust a suro. En ser el tema central d'aquesta tesi, es mereix una descripció més detallada.

4.- OLOR A HUMITAT

4.1.- Què és l'olor a humitat?

Es denomina *olor a humitat* [16,17] a la sensació produïda per certs components de caràcter contaminant apareguts en el vi i que tenen diversos orígens, tal com es veurà en el transcurs d'aquest capítol. Inclús en petites concentracions (nivells de $\text{ng}\cdot\text{l}^{-1}$) produeixen olors desagradables. Tot i que molt habitualment aquest defecte organolèptic es coneix com a gust a suro [18-24], hom considera més adequat utilitzar la denominació d'olor a humitat o florit, ja que descriu més acuradament la sensació organolèptica. Una altra designació àmpliament acceptada és la de contaminació per haloanisoles. Aquest terme es deu a què, com es veurà més endavant, aquests són els principals compostos químics relacionats amb el defecte. La denominació *gust a suro* seria millor reservar-la per aquelles ocasions en què el tap n'és el veritable responsable i no només un agent transmissor. El que es pot considerar autènticament com a *gust a suro*, defecte poc habitual, es caracteritza per una aroma pútrida [16].

Tot i que la primera referència al *goût de bouchon*, va ser feta per Lefebvre *et al.* [25], al 1904 [20], no ha estat fins els darrers 30 anys que l'olor a humitat s'ha reconegut com un seriós problema que afecta al vi. Segons els diferents estudis, la freqüència d'incidència d'aquest defecte en els vins, oscil·la entre un 1 % i un 7 % de les ampolles [16,23,24,26-28], la qual cosa dóna una idea de l'abast de la qüestió.

Aquest defecte no només apareix en el tap de suro i, per extensió, en el vi, sinó que molts altres aliments i envasos poden veure's afectats, principalment per 2,4,6-tricloroanisol (TCA) i altres cloroanisoles com, per exemple, ous i pollastres [29-31], aigües [32-47], cafè [48-51], conyac [52], embalatges [53-56], panses [57,58] i raïm [59], menjar empaquetat [60], barrils de roure [61] i begudes alcohòliques en general [62,63].

Tot i l'extensió del problema a tants àmbits, l'eliminació d'aquesta olor o la reducció del seu impacte organolèptic són encara assignatures pendents. Precisament, a partir d'aquesta necessitat de reduir la incidència d'alteracions organolèptiques relacionades amb l'olor a humitat nasqué el Projecte Quercus, un projecte conjunt entre la Federació Europea d'Indústries del Suro (CELIÉGE) i la Unió Europea, amb l'objectiu d'identificar les fonts dels defectes organolèptics associats amb el suro i desenvolupar una estratègia que permetés de corregir-los [64].

4.2.- Quins són els compostos responsables de l'olor a humitat?

Són diversos els compostos que es poden veure implicats en la generació de l'olor a humitat. Saber quins són i com poden aparèixer en el vi és el primer dels passos per tal d'evitar-ne la seva presència. A la Taula III.1 es presenta un llistat d'aquests compostos amb el seu llindar de percepció sensorial i a la Figura III.2 es presenta la seva estructura [4,20,22,26,65-70].

Taula III.1. Principals compostos implicats en l'olor a humitat, l'aroma que normalment se'ls atribueix i el seu llindar de percepció sensorial [4,20,22,26,34,65-67,69,71-79]

COMPOST	AROMA	LLINDAR DE PERCEPCIÓ EN VI	LLINDAR DE PERCEPCIÓ EN AIGUA
Guaiacol	Fumat, fenòlica, medicinal	20 µg·l ⁻¹	13 µg·l ⁻¹
1-octen-3-ona	Bolet, metàl·lica	20 ng·l ⁻¹	5 ng·l ⁻¹
1-octen-3-ol	Bolet, metàl·lica	20 µg·l ⁻¹	1 µg·l ⁻¹
2-metilisoborneol	Terra, fang, humitat	30 ng·l ⁻¹	18 ng·l ⁻¹
Geosmina	Terra, fang, humitat	25 ng·l ⁻¹	4 ng·l ⁻¹
2,4,6-tricloroanisole	Fong, humitat, paper mullat	1,4 ng·l ⁻¹	0,03 ng·l ⁻¹
2,3,4,6-tetracloroanisole	Florit, humitat	< 10 ng·l ⁻¹	0,04 ng·l ⁻¹ - 4 ng·l ⁻¹
2,3,4,5,6-pentacloroanisole	Florit, humitat	> 50 µg·l ⁻¹	4 µg·l ⁻¹
2,4,6-tribromoanisole	Humitat, Fong	< 10 ng·l ⁻¹	0,03 ng·l ⁻¹
2-metoxi-3,5-dimetilpirazina	Fong	2 ng·l ⁻¹	0,4 ng·l ⁻¹

4.2.1.- Guaiacol

L'aroma del guaiacol (2-metoxifenol) es defineix com de fumat, fenòlica o medicinal. Aquest compost ha estat detectat en diversos vins i suros que presenten el defecte que ara ens ocupa, però normalment en una concentració que està per sota del seu límit de percepció (20 µg/l en el vi i de 13 µg/l en aigua) [4,20,22,26,65-67,69]. Això no obstant, però, sembla que aquest compost influencia l'aroma del vi tot actuant en combinació amb altres compostos [20]. Fou identificat per Lefebvre *et al.* [25] com la causa del defecte d'aroma a humitat quan les escorces de l'alzina surera es veuen afectades pel que es coneix com la "taca groga". Aquesta afectació es deu a que el *Bacillus subtilis* i el *Streptomyces* són capaços de degradar l'àcid vainillínic, via catecol, com a resultat d'una reacció de descarboxilació no

oxidativa. Aquest procés està relacionat amb la degradació de la lignina del suro, tal com es pot veure en la Figura III.3 [20,80,81].

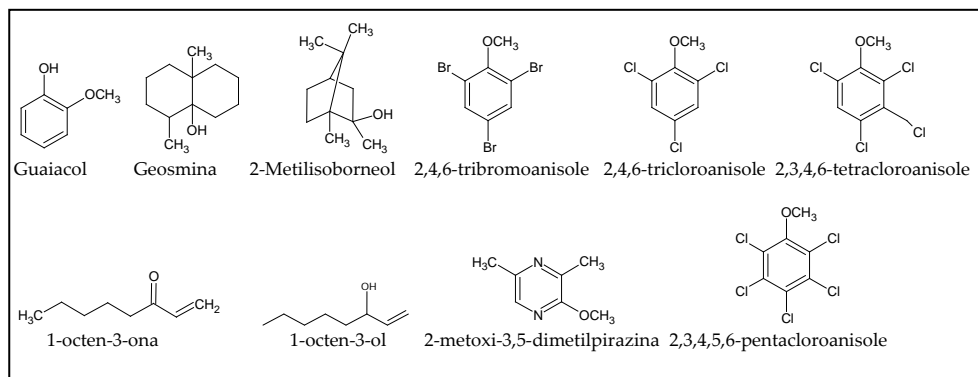


Figura III.2. Estructura dels compostos relacionats amb l'olor a humitat

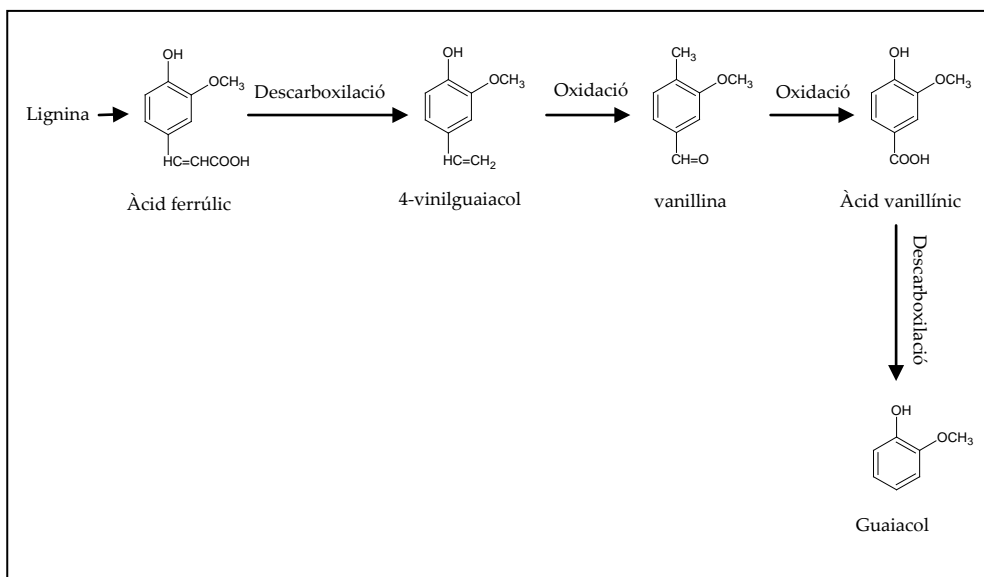


Figura III.3. Formació de guaiacol a partir de la lignina

4.2.2.- 2-metilisoborneol i geosmina

El 2-metilisoborneol i la geosmina (octahidre-4,8a-dimetil-4a(2H)-naftalenol) proporcionen una aroma a terra, fang i humitat, tot i que a altes concentracions, l'aroma del 2-metilisoborneol recorda a la càmfora [4,20,22,26,65-67,69]. Els límits de percepció sensorial en el vi són de 30 ng·l⁻¹ i de 25 ng·l⁻¹, respectivament [4,20,22,26,65-67,69,71]. Cal tenir en compte, però, que, com la majoria dels compostos olorosos, aquests poden interaccionar amb altres components de l'aroma de manera que poden establir efectes sinèrgics que potenciïn el defecte [82].

Tot i que alguns estudis dels anys 60-70 apuntaven que la geosmina era inestable en medi àcid, fet que dificultaria trobar-la en vins, estudis més recents han demostrat que no és així [71]. De fet, s'ha comprovat que aquests dos compostos actuen, no només com a contaminants en vins, sinó també en aigües, peixos i animals aquàtics i aliments marins [34,66,78].

Els dos compostos són metabòlits coneguts de bacteris (especialment *Actinomycetes*) i d'algues (*Cyanobacteria*) però es té constància que un gran nombre de microflora és capaç de dur a terme la seva biogènesis [34,66,78]. Així, diferents fongs aïllats en taps de suro han estat capaços de generar la geosmina i el 2-metilisoborneol, quan se'ls ha fet créixer en suro granulat i estèril [20]. Per altra banda, però, altres microorganismes, com la *Pseudomonas spp.*, tenen capacitat per a degradar el 2-metilisoborneol [20,66].

El 2-metilisoborneol es pot produir mitjançant l'addició d'un grup metil, provinent de la S-adenosilmetionina, a un precursor d'un monoterpé (C-10). La geosmina, per la seva part, es creu que pot formar-se per la pèrdua d'un grup isopropil d'un sesquiterpé bicíclic (C-15) [34,66,78].

Existeixen diferents vies que poden explicar com aquests compostos arriben al vi. Una d'aquestes seria la contaminació directa per bacteris quan el suro es troba en contacte amb el terra. Una altra possibilitat la constitueix el fet que s'ha descobert la presència de certes algues en bosses de polietilè utilitzades en el transport dels taps de suro. A partir d'aquí, es poden formar tant el 2-metilisoborneol com la geosmina [20,66].

Cal dir, però, que, en alguns casos, la presència de la geosmina en el vi es troba relacionada també amb l'ús de raïm infectat per la podridura noble (*Botrytis Cinerea*), és a dir, sense cap intervenció del suro [71].

4.2.3.- 1-octen-3-ol i 1-octen-3-ona

Aquests dos compostos atorguen al vi una aroma característic de bolet i, de vegades, metàl·lica. El seu límit de percepció sensorial en el vi és de 20 ng/l per a la 1-octen-3-ona, mentre que el 1-octen-3-ol el té de 20 µg/l. Ambdós són metabòlits de fongs, especialment de *Penicillium spp.* i *Aspergillus spp.* [20,66,83].

A la Figura III.4 es mostra la via de síntesi d'aquests compostos que té lloc en fongs. Tal i com es pot veure, l'àcid linoleic, alliberat enzimàticament de lípids, és oxidat en presència de l'oxigen atmosfèric, donant lloc a hidroxiperòxids. L'àcid 10-hidroperoxi-trans-8,cis-12-octadecadienoic és tallat mitjançant una liasa, formant-se el 1-octen-3-ol. Finalment, per oxidació es produeix la 1-octen-3-ona [66].

Existeixen dos estereoisòmers del 1-octen-3-ol degut a la presència d'un centre asimètric en el carboni 3. El R(-)-1-octen-3-ol presenta l'aroma de bolet, mentre que l'altre estereoisòmer no proporciona gairebé olor [66].

4.2.4. 2-metoxi-3,5-dimetilpirazina

En el vi poden aparèixer altres defectes aromàtics que, de vegades, es confonen amb el d'humitat. Aquest és el cas de la 2-metoxi-3,5-dimetilpirazina (MDMP), que atorga al vi una aroma a fong (*fungal must*) [84]. El seu llindar de percepció sensorial es situa a nivells de ppt (2 ng/l) [67]. En alguns casos aquest compost és considerat com el segon principal causant de l'olor a humitat, després del 2,4,6-tricloroanisole [85].

Es desconeix com es forma aquest compost en el suro, tot i que se sap que alguns bacteris (*Pseudomonas spp.*) i alguns fongs (*Aspergillus flavus*) poden donar lloc a pirazines [86]. Per altra banda, cal dir que la MDMP és considerada una causa força comú de defecte organolèptic ambiental. De fet, s'ha identificat la MDMP en certes màquines talladores utilitzades a nivell industrial com poden ser les màquines perforadores del suro, les quals transferirien el defecte al tap de suro [67]. Per tant, en molts casos, el tap no serà el culpable de la formació d'aquest compost, sinó que només es comportarà com un mitjà de transferència del defecte de l'ambient cap al vi [67]. Aquesta migració es veuria més accentuada pel fet que el tap de suro presenta molt poca afinitat per certes pirazines [87].

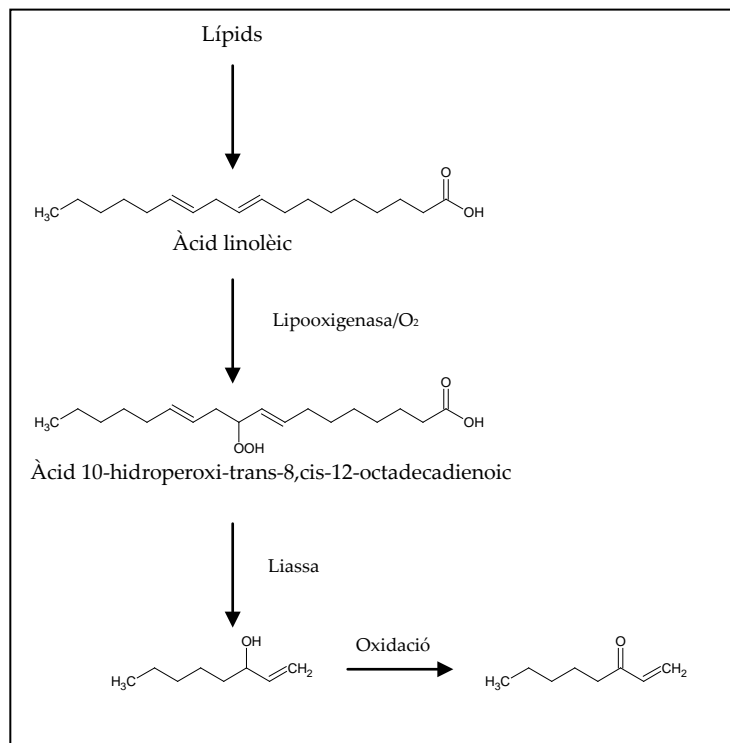


Figura III.4. Formació de compostos C-8 a partir dels lípids

4.2.5.- Haloanisoles

Els haloanisoles, especialment els derivats clorats, són els compostos determinats en aquesta tesi. Per aquesta raó es tractaran amb més detall que els altres, tot raonant el per què hom s'ha centrat en aquesta família.

5.- HALOANISOLES

Els haloanisoles estructuralment són derivats halogenats de l'anisole o metoxibenzè. A nivell sensorial, se'ls relaciona directament amb l'olor a humitat. Concretament es tracta d'un bromoanisole, que és el 2,4,6-tribromoanisole (TBA) i de cinc cloroanisoles: el 2,4-dicloroanisole (2,4-DCA), el 2,6-dicloroanisole (2,6-DCA), el 2,3,4,6-tetracloroanisole (TeCA), el 2,3,4,5,6-pentacloroanisole (PCA) i, especialment, el 2,4,6-tricloroanisole (TCA).

L'aroma que caracteritza els principals haloanisoles i el seu llindar de percepció sensorial es poden veure en la Taula III.1. Aquests compostos són volàtils i molt aromàtics, tal i com posen de manifest els valors extremadament baixos dels seus llindars de percepció sensorial. Directament relacionat amb aquest paràmetre, resulta interessant parlar també dels valors del que es coneix com el llindar de rebuig del consumidor (valor a partir del qual persones que consumeixen habitualment vi, rebutgen el producte) els quals, per a aquests compostos, es situen en el rang 2,1-3,1 ng·l⁻¹ [88]. De fet, tot i que s'està parlant de concentracions molt baixes, s'ha comprovat que, al voltant del 80-85% dels vins rebutjats pel fet de presentar aquest defecte, estan afectats per aquest tipus de compostos químics [67]. Això fa que la seva identificació en els vins i en els taps sigui tan important.

5.1.- Com arriben els haloanisoles al vi?

Al llarg de les següents línies s'esboça, de manera general, l'origen que poden tenir aquests compostos i com evolucionen fins arribar al vi.

5.1.1.- Els clorofenols. Punt de partida del problema

Els clorofenols s'han utilitzat extensament durant anys, sobretot a partir del 1950, essent els més emprats el 2,4,6-triclorofenol (TCP) i el 2,3,4,5,6-pentaclorofenol (PCP) [66]. Aquests compostos són considerats de gran toxicitat, essent el PCP el més agressiu [89-91]. Els principals usos d'aquests compostos estan relacionats amb el fet que poden actuar com agents conservants de la fusta, additius en la indústria tèxtil, fungicides, bactericides, tractaments contra mol·luscs o agents desinfectants. Aquest ús tan generalitzat fa que es puguin trobar restes d'aquests compostos a tot arreu [66,91-93].

Degut a la seva toxicitat, actualment el seu ús està restringit en més de 30 països i, a Europa, per exemple, està prohibit el comerç i l'ús tant del PCP com de les seves sals i esters en una concentració igual o superior al 0,1 % en massa, exceptuant quatre casos: quan s'empra com a agent conservant de la fusta, en la impregnació

en fibres i alguns productes tèxtils, com a agent de processos industrials i en el tractament *in situ* de monuments [94]. En altres països europeus la utilització d'aquests compostos es veu més restringida encara [95].

Com a alternativa als clorofenols s'utilitzen també altres agents halogenats, com poden ser els bromofenols, especialment el tribromofenol, que també tenen aplicacions similars [60,96]. En aquest cas, però, cal dir que no hi ha cap normativa que en reguli l'ús [97-103].

No obstant, pel que fa a la present Tesi Doctoral, el que interessa no és tant les aplicacions d'aquests compostos sinó el com aquests compostos deriven en haloanisoles. Així doncs, se sap que alguns microorganismes, com a mecanisme de defensa, poden biotransformar aquests agents tòxics, els halofenols, en altres productes no tòxics, els haloanisoles, mitjançant una biometil·lació, tal com es pot veure en la Figura III.5, a on es posa com exemple la transformació bioquímica del 2,4,6-triclorofenol a 2,4,6-tricloroanisole [66,93].

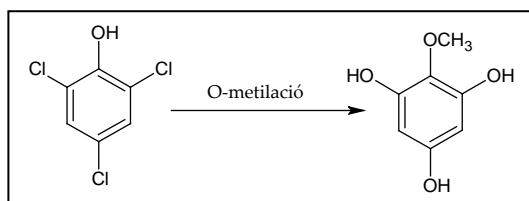


Figura III.5. Formació de cloroanisoles a partir de clorofenols

Per altra banda, alguns bacteris del sòl tenen la capacitat de degradar el PCP i altres clorofenols a compostos amb menys àtoms de clor, afavorint les posicions 3 i 5. El compost majoritari en aquests casos és el 3,4,5-triclorofenol. Clorofenols amb menys de dos àtoms de clor no solen aparèixer [66]. Cal dir, però, que no totes les vies de degradació dels clorofenols impliquen l'actuació d'algun microorganisme. De fet, una altra via de descomposició molt important del PCP i que dóna lloc a tetraclorofenols, és la que té lloc a través de la degradació fotoquímica [66].

Sigui com sigui, però, independentment de com s'hagi produït la transformació dels halofenols en haloanisoles, un cop s'han generat aquests darrers, encara els falta una via de transport que els condueixi cap al vi. Tot seguit es descriuen les possibles fonts de contaminació: la pròpia alzina surera, el procés d'elaboració del tap, el transport i embalatge o el celler.

5.1.2.- Contaminació clorofenòlica de l'alzina surera

Aprofitant les propietats insecticides que té el PCP, aquest compost es sol aplicar en la base de l'alzina surera per tal d'evitar plagues. El problema, però, és que, tal i com s'ha demostrat en alguns estudis, en molts casos queden restes d'aquest compost en aquest punt de l'arbre [16,52,66,93,104] de manera que només cal la intervenció d'algun microorganisme dels que se'n parlarà més extensament en posteriors apartats, per degradar el PCP i donar lloc als cloroanisoles. Per tant, resulta obvi que si, durant el procés de fabricació del tap de suro, no s'eliminen els cloroanisoles que s'han format en l'arbre contaminat, aquest pot constituir un camí d'arribada de cloroanisoles al vi.

5.1.3.- Contaminació produïda en el procés de fabricació del tap de suro

Com ja s'ha explicat en l'apartat anterior, els cloroanisoles poden ja estar en el suro, abans que aquest arribi a la fàbrica que produeix els taps. Però cal dir que existeixen altres punts crítics en el procés d'elaboració que també poden generar aquests compostos.

Així, el primer punt que cal considerar és el procés de bullit de les planxes de suro quan aquestes arriben a la fàbrica per tal de netejar-les, i fer-les més manejables. S'ha comprovat que en aquest procés es produeix la disminució del 50% de TCA present [16]. Aquesta disminució implica la necessitat de controlar de manera molt acurada aquesta aigua, renovant-la sovint [16] per tal d'assegurar que aquest procés impliqui una disminució i no un augment de la concentració, si l'aigua està contaminada amb TCA procedent de rentats previs.

Els entre 7 i 10 dies de repòs a què s'han de sotmetre les planxes després del bullit, constitueixen el següent punt crític. Durant aquest temps té lloc la proliferació de floridura en tota la planxa. Si aquest suro està contaminat amb clorofenols, els microorganismes tindran via lliure per produir la transformació d'aquests a cloroanisoles [66].

Una altra de les etapes de més importància en el procés de manufactura de taps és la seva esterilització i emblanquiment. Tal com ja s'ha comentat en el capítol anterior, un dels productes més utilitzats, tot i que cada vegada menys, és l'hipoclorit sòdic. Aquest s'ha utilitzat durant dècades perquè dona lloc a un tap estèril amb una bona (i econòmica) presentació. El problema que implica el seu ús és que aquest compost provoca un augment en la concentració de 2,4,6-triclorofenol, tot i que, en absència de contaminació microbiana, no s'observa un increment en el contingut de TCA respecte a taps que no s'han blanquejat [16,66].

El suro en forma natural conté petites quantitats de compostos fenòlics. En les condicions que té lloc el tractament amb hipoclorit sòdic té lloc la formació de 2,4,6-triclorofenol i també 2,6-diclorofenol i 2,4-diclorofenol, aquest últim amb més quantitat.

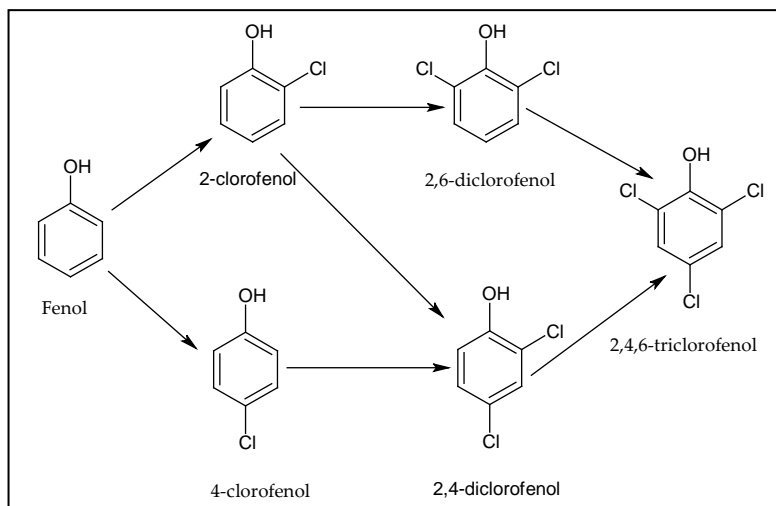


Figura III.6. Cloració del fenol amb hipoclorit a un pH= 8,0 amb una relació de fenol:clor 1:2

Aquests darrers, tal i com es mostra a la Figura III.6, quan es troben en una solució altament concentrada d'hipoclorit sòdic evolucionen, després de dues hores, cap a la formació única de 2,4,6-triclorofenol, no detectant-se la presència ni de diclorofenols, ni de pentaclorofenol ni de cap altre isòmer triclorofenòlic [65,66].

Una altra possible via de síntesi de TCA en presència de clor actiu o hipoclorit la constitueix la ruta de l'àcid siquímic, partint d'una font de carbohidrats. Amb aquest procés es dona lloc a clorofenols, els quals podran ser metilats segons la disponibilitat d'aminoàcids i reguladors del creixement, com l'àcid fòlic, tal com es pot veure en la Figura III.7 [66].

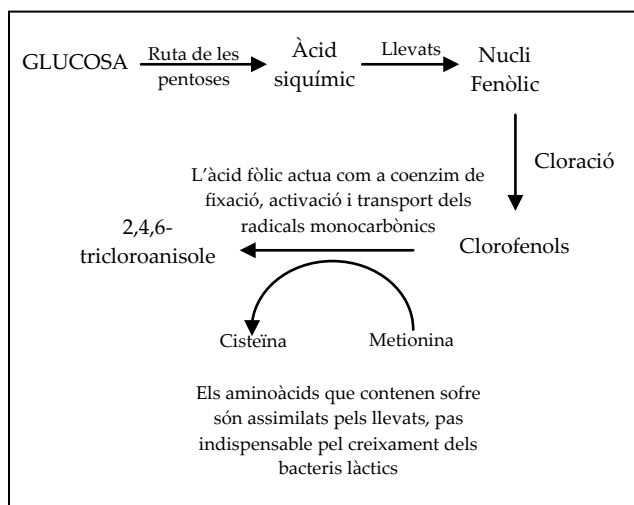


Figura III.7. Biosíntesi de TCA

5.1.4.- Contaminació durant el transport i embalatge

En una investigació que es va dur a terme sobre uns taps de suro que van ser enviats a Austràlia en vaixell en un viatge transoceànic dins de caixes de cartró, es trobà que els taps presentaven contaminació per 2,4,6-triclorofenol i 2,4,6-tricloroanisol. El mateix estudi va revelar que les caixes de cartró que contenien els taps eren les responsables d'aquesta contaminació ja que aquestes estaven en contacte amb el terra del vaixell, el qual havia sofert un tractament amb un producte que contenia, entre d'altres, 2,4,6-triclorofenol i que aquest, a causa de l'acció microbiana, havia derivat en 2,4,6-tricloroanisol [16,66,105]. Estudis posteriors, han demostrat que aquesta contaminació de cloroanisoles també pot donar-se en sacs de jute [21].

Altres investigacions dutes a terme en contenidors amb el terra de fusta i caixes de cartró han trobat resultats similars, com les de Hill *et al.* [55] i Whitfield *et al.* [53,106] o els realitzats per Diserens [107], Triantafyllou *et al.* [108] i Nerín *et al.* [109] en altres matrius, com paper i aliments. En aquests estudis [53,106], també constaten la formació de 2,4,6-tricloroanisol a partir de 2,4,6-triclorofenol, amb la intervenció de fongs. Cal dir que la humitat té gran importància en aquesta biotransformació.

La conclusió de tots aquests estudis, és que, si no és possible eliminar els fongs o controlar la humitat en les caixes de cartró, caldrà eliminar els clorofenols del material d'embalatge o bé utilitzar material hermètic.

5.1.5.- Contaminació en el celler

És ben sabut que l'atmosfera d'un celler no és una atmosfera esterilitzada. És per això que aquesta pot ser una altra via de contaminació del vi. Tal com s'ha comentat en l'apartat 5.1, donat que els clorofenols s'utilitzen com a protectors de la fusta, aquests poden estar presents en diferents elements del celler. Una posterior transformació d'aquests productes en haloanisoles pot generar un ambient contaminat, el qual podria passar al vi durant el procés d'elaboració [4,16,20,54,66,110,111].

En aquest sentit es pot nombrar el treball de Baker *et al.* [112] en el que comprovaren que el tap de suro era capaç d'absorbir el TCA present en una atmosfera contaminada, sense contacte físic directe (transmissió per l'aire).

La contaminació del vi en el celler també es pot produir a través de les bótes de roure ja que aquestes poden ser netejades amb productes que contenen clorofenols (principalment TeCP, PCP i TCP), de manera que una posterior acció microbiana sobre aquests productes pot derivar en la formació dels cloroanisoles [59].

Respecte a aquesta última possible via de contaminació del vi, es pot plantejar la pregunta de com es pot saber quina és la causa de la contaminació que hagi sofert un vi. Per respondre-la, s'han dut a terme estudis que han demostrat que en el cas que el vi estigui contaminat abans de ser embotellat cal esperar una contaminació homogènia de totes les ampolles, cosa que no passarà si el responsable de la contaminació és el suro [113,114].

Un altre aspecte important a tenir en compte a l'hora de preveure la contaminació d'un vi és la capacitat d'absorció que presenten els taps del suro envers aquests compostos. Aquest és l'objectiu d'un estudi portat a terme per Capone *et al.* [115] en el qual s'embotellaren diferents ampolles de vi blanc addicionat amb una concentració considerable de TCA marcat isotòpicament (d_5 -TCA), i emmagatzemat durant 30 mesos. En addicionar aquest d_5 -TCA, els investigadors podien seguir l'evolució d'aquest compost sense confondre'l amb el TCA present de manera natural en el tap o en el vi. A la fi de l'emmagatzematge, s'analitzaren taps i vins, trobant que es recuperava el 90% del d_5 -TCA repartit, aproximadament, a parts iguals entre el vi i el tap. Aquest fet demostrava la capacitat que tenen els taps per absorbir els cloroanisoles. Alguns taps presentaven també contaminació endògena per TCA i, en alguns casos, transferiren una petita part d'aquest

contingut al vi [113]. En aquest estudi també s'estudià la capacitat del tap de suro d'absorbir altres cloroanisoles. Per fer-ho, varen macerar diferents taps amb vi contaminat per 2,6-DCA, 2,4-DCA, TCA, 2,3,4,6-TeCA i PCA. Trobaren que els taps tenen gran capacitat per absorbir aquests compostos, essent directament proporcional al número de clors presents en la molècula.

En un estudi paral·lel, Capone *et al.* [116] repetiren el mateix estudi, però addicionant el d_5 -TCA al tap de suro, enlloc d'addicionar-lo al vi. Emmagatzemaren les ampolles de vi amb el tap contaminat durant 30 mesos. Observaren que no havien arribat traces de d_5 -TCA al vi i que aquest es desplaçava longitudinalment al llarg del tap, però molt lentament. Això els va fer concloure que realment el tap de suro és una bona barrera a la transferència d'haloanisoles i que el vi és alterat amb aquests compostos solament quan parts contaminades del suro entren en contacte directe, o molt proper, al vi (o al seu espai de cap).

A la Figura III.8 es presenta un esquema que resumeix de manera gràfica les principals causes de l'aparició dels haloanisoles en el vi.

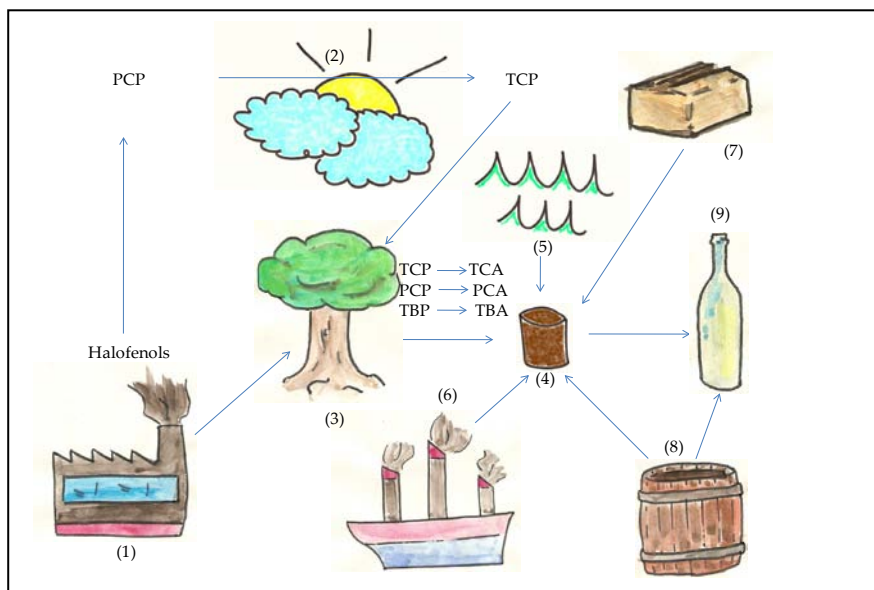


Figura III.8. Principals causes de l'aparició d'haloanisoles en el vi. (1) Contaminació produïda per ús d'halofenols, (2) el PCP ambiental pot deshalogenar-se per efecte de la llum solar, (3) l'alzina surera pot estar contaminada per halofenols, (4) el tap de suro, que pot estar contaminat per haloanisoles, a causa de: (5) ús d'hipoclorit sòdic en el rentat en les diferents etapes d'elaboració de taps, (6) durant el transport, (7) per l'embalatge, (8) contaminació en el celler. Al final la contaminació arriba al vi (9)

5.2.- Microorganismes responsables de la transformació d'halofenols a haloanisoles

Amb el que s'ha parlat fins ara, ha quedat palès que en la majoria dels casos la transformació dels halofenols cap a haloanisoles la duen a terme microorganismes que, òbviament, han d'estar localitzats en algun punt. La primera localització que cal tenir en compte és el propi suro, en el qual els microorganismes poden proliferar, i en qualsevol etapa de la seva elaboració o, fins i tot, quan ja és un tap pròpiament dit. En la Taula III.2 es nombren els principals microorganismes que s'han aïllat en el suro [8,11,16,69,81,106,117-132].

Taula III.2. Microorganismes identificats en el suro

FONGS	
<i>Acremonium roseum</i>	<i>Penicillium citrinum</i>
<i>Acremonium strictum</i>	<i>Penicillium citro-viride</i>
<i>Alternaria alternata</i>	<i>Penicillium commune</i>
<i>Alternaria tenuissima</i>	<i>Penicillium decaturense</i>
<i>Aphanoclodium album</i>	<i>Penicillium decumbens</i>
<i>Armillaria mellea</i>	<i>Penicillium echinulatum</i>
<i>Aspergillus bridgeri</i>	<i>Penicillium expansum</i>
<i>Aspergillus conicus</i>	<i>Penicillium fellutanum</i>
<i>Aspergillus flavus</i>	<i>Penicillium frequentans</i>
<i>Aspergillus fumigatus</i>	<i>Penicillium glabrum</i>
<i>Aspergillus glaucus</i>	<i>Penicillium glandicola</i>
<i>Aspergillus nidulans</i>	<i>Penicillium granulatum</i>
<i>Aspergillus niger</i>	<i>Penicillium janthinellum</i>
<i>Aspergillus niveus</i>	<i>Penicillium lilacinum</i>
<i>Aspergillus ochraceus</i>	<i>Penicillium meleagrinum</i>
<i>Aspergillus ruber</i>	<i>Penicillium meleagrinum var. viridiflavum</i>
<i>Aspergillus sydowii</i>	<i>Penicillium multicolor</i>
<i>Aspergillus versicolor</i>	<i>Penicillium novae-zeelandiae</i>
<i>Asymetria velutina</i>	<i>Penicillium olsonii</i>
<i>Aureobasidium pullulans</i>	<i>Penicillium purpurescens</i>
<i>Chrysonilia sitophila</i>	<i>Penicillium purpurogenum</i>
<i>Cladosporium cladosporoides</i>	<i>Penicillium roqueforti</i>
<i>Cladosporium herbarum</i>	<i>Penicillium rugulosum</i>
<i>Cladosporium macrocarpum</i>	<i>Penicillium simplicissimum</i>
<i>Cladosporium oxysporum</i>	<i>Penicillium steckii</i>
<i>Fusarium monoliforme</i>	<i>Penicillium toxicarium</i>
<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>Penicillium variabile</i>
<i>Geosmithia spp.</i>	<i>Penicillium viridicatum</i>
<i>Monilia sitophila</i>	<i>Penicillium waksmanii</i>
<i>Mortierella alpina</i>	<i>Phoma herbarum</i>
<i>Mucor hiemalis</i>	<i>Rhizopus arrhizus</i>

<i>Mucor mucedo</i>	<i>Rizoctonia spp.</i>
<i>Mucor plumbeus</i>	<i>Scopulariosis candida</i>
<i>Mucor racemosus</i>	<i>Sporodiobolus</i>
<i>Paecilomyces spp.</i>	<i>Troncatella truncata</i>
<i>Paecilomyces viride</i>	<i>Trichoderma hamatum</i>
<i>Penicillium adametzi</i>	<i>Trichoderma longibranchiatum</i>
<i>Penicillium angulare</i>	<i>Trichoderma viride</i>
<i>Penicillium brevi-compactum</i>	<i>Rhizopus stolonifer</i>
<i>Penicillium chrysogenum</i>	<i>Verticillium fusisporum</i>
<i>Penicillium citreonigrum</i>	<i>Verticillium psalliotae</i>
LLEVATS	
<i>Candida cifferi</i>	<i>Saccharomyces cerevisae</i>
<i>Candida famata</i>	<i>Saccharomyces heterogenicus</i>
<i>Candida humicola</i>	<i>Saccharomyces italicus</i>
<i>Cryptococcus spp.</i>	<i>Saccharomyces ludwigii</i>
<i>Kluyveromyces veronae</i>	<i>Saccharomyces rouxii</i>
<i>Rhodotorula candida</i>	<i>Sporodiobolus johnsonii</i>
<i>Rhodotorula glutinis</i>	<i>Trichosporum pullulans</i>
BACTERIS	
<i>Achromobacter spp.</i>	<i>Erwinia herbicola</i>
<i>Aeromonas spp.</i>	<i>Flaobacterium spp.</i>
<i>Acinetobacter lwoffii</i>	<i>Kurthia spp.</i>
<i>Agrobacterium spp.</i>	<i>Listeria spp.</i>
<i>Bacillus cereus</i>	<i>Micrococcus spp.</i>
<i>Bacillus circulans</i>	<i>Micrococcus luteus</i>
<i>Bacillus lentus</i>	<i>Micrococcus lylae</i>
<i>Bacillus firmus</i>	<i>Nocardia spp.</i>
<i>Bacillus pentothenicus</i>	<i>Pseudomonas spp.</i>
<i>Bacillus sedentarius</i>	<i>Streptococcus</i>
<i>Corynebacterium spp.</i>	<i>Streptomyces spp.</i>

Però també s'han de considerar els microorganismes que s'han aïllat en altres indrets i que poden participar en el procés de fabricació de taps de suro o en el de l'elaboració del vi: caixes de cartró, pallets, bótes de vi o el mateix celler. En la Taula III.3 es resumeixen els més destacats [53,55,69].

Taula III.3. Principals microorganismes aïllats en pallets, bótes de roure i caixes de cartró

FONGS	
<p><i>Alternaria spp.</i> <i>Aspergillus spp.</i> <i>Aspergillus flavus</i> <i>Aspergillus niger</i> <i>Aspergillus sydowii</i> <i>Aspergillus versicolor</i> <i>Aureobasidium spp</i> <i>Euroticum amstelodami</i> <i>Euroticum chevalieri</i> <i>Euroticum rubrum</i> <i>Paecilomyces variotii</i> <i>Cladosporium spp.</i> <i>Epicoecum spp.</i> <i>Hormonema, spp.</i></p>	<p><i>Mucor</i> <i>Penicillium spp.</i> <i>Penicillium brevicompactum</i> <i>Penicillium chrysogenum</i> <i>Penicillium corylophilum</i> <i>Penicillium crustosum</i> <i>Penicillium glabrum</i> <i>Penicillium roqueforti</i> <i>Rhizopus spp.</i> <i>Trichoderma spp.</i> <i>Trichoderma harzianum</i> <i>Trichoderma koningii</i> <i>Trichoderma pseudokoningii</i></p>
LLEVATS	
<p><i>Candida spp.</i></p>	<p><i>Rhodotorula spp.</i></p>

Tal com es pot veure el llistat de microorganismes que han estat aïllats és extens. Llavors, la pregunta que es planteja és si tots aquests tenen la capacitat de metabolitzar els halofenols a haloanisoles. La resposta és no. No tots tenen aquesta competència. Els principals microorganismes capaços de dur a terme aquesta transformació són els fongs filamentosos com els *Aspergillus* o *Penicillium*, tot i que els llevats *Rhodotorula spp.* i *Candida spp.* també si veuen implicats [53,55,69,106]. La humitat i la falta de aireació seran factors importants en el desenvolupament dels microorganismes.

5.3.- Prevençió i eliminació d'haloanisoles: evitar l'olor a humitat en el vi

Fins ara s'ha parlat de les vies de contaminació del vi, però, què passa quan aquestes han portat haloanisoles fins el vi i l'han contaminat? La veritat és que, arribats a aquest punt, ja no es pot fer res donat que aquest defecte no es pot eliminar. És per això que el que cal fer és prendre mesures preventives o correctores per tal d'evitar-ho.

5.3.1.- Mesures preventives

Com a mesura preventiva s'entén tota acció que es pren per tal d'evitar l'aparició d'haloanisoles. Aquestes mesures poden anar dirigides a eliminar, de tot el procés d'elaboració del vi, a un o a ambdós components responsables de l'aparició del defecte de l'olor a humitat, és a dir, evitar l'ús de halofenols i/o evitar l'aparició i

desenvolupament dels microorganismes responsables de dur a terme la transformació d'aquests en haloanisoles.

Per tal d'evitar l'ús dels halofenols, una tècnica força utilitzada en la indústria alimentària és la desinfecció mitjançant l'ús de radiacions ionitzants, com els raigs X, els raigs gamma o els electrons accelerats. La radiació per electrons accelerats s'ha provat en el suro, i ha demostrat el seu efecte en l'esterilització del mateix, en dosis de entre 10 KGy i 25 KGy. A radiacions més elevades -100 KGy- la radiació ja pot provocar efectes en la composició del suro, sobretot a nivell d'alguns compostos fenòlics [133].

Una altra possibilitat consisteix en l'eliminació dels haloanisoles presents en l'aire, i que poden arribar al vi. En aquests sentit, Vlachos *et al.* [134] proposaren una tècnica basada en la utilització d'un film de titani nanocristal·lí i radiació propera a l'UV, de manera que la mateixa llum solar podria provocar la degradació dels haloanisoles i per tant provocar la seva eliminació.

Una altra tècnica preventiva respecte l'aparició d'haloanisoles o la presència d'halofenols en el suro, consisteix en protegir la base del tap amb una capa de silicona impermeable al TCA de manera que s'intenta evitar el pas d'aquest compost al vi. Aquesta capa de silicona ha estat provada en els taps de suro per a *champagnes*, amb bons resultats [135].

Respecte al control del desenvolupament de microorganismes, especialment els fongs filamentosos, el control de la humitat, ja sigui en el suro quan s'està elaborant el tap o en el celler, pot resultar una mesura molt útil. I quan es parla d'humitat, no es fa referència només a la quantitat d'aigua sinó també a la seva forma de presentació de la mateixa, és a dir, si aquesta es troba en forma lliure o en forma combinada. Per a la germinació de les espores dels fongs és necessari que l'aigua es trobi lliure. Una via eficaç de determinar aquesta aigua lliure és mitjançant la determinació de l'activitat de l'aigua (a_w). La a_w ens indica quina és la quantitat d'aigua disponible per al desenvolupament dels microorganismes una vegada s'ha arribat a l'equilibri hídric en el sistema. La a_w s'expressa com la relació existent entre la tensió de vapor de l'aigua en el substrat (P) i de l'aigua pura (P_0), a la mateixa temperatura. Els fongs per a desenvolupar-se necessiten uns valors mínims de a_w . Així, controlant aquest valor, es pot prevenir quin tipus de fong pot créixer i desenvolupar-se [119].

Per altra banda, existeixen també diversos estudis que demostren que certs microorganismes, tot aprofitant la competència que pot haver-hi entre diferents espècies, poden evitar el desenvolupament dels responsables de l'aparició dels

haloanisoles. Un exemple d'això el constitueix un treball de Silva Pereira *et al.* [136] on comprovaren l'efecte beneficiós del desenvolupament d'un determinat fong en les planxes de suro. Concretament s'estudià la *Chrysonilia sitophila*, la qual no només degrada el TCP, sinó que també inhibeix el creixement d'altres fongs. El desenvolupament d'aquest fong en el suro podria evitar, doncs, la formació de TCA.

I per últim ja, però no menys important, un altre factor que no es pot ometre com a desencadenant d'aquest defecte (i del que ja s'ha parlat) és el rentat de les planxes de suro en el procés d'elaboració dels taps. En aquest cas, la mesura preventiva passa per suprimir totalment l'ús de l'hipoclorit.

5.3.2.- Mesures correctores

Amb el concepte de mesures correctores es pretén incloure tota acció encaminada a l'eliminació d'halofenols o haloanisoles, una vegada que aquests estan formats però no han arribat encara al vi. En els següents paràgrafs es fa una breu descripció d'alguns exemples.

Una de les principals vies utilitzades per aconseguir aquesta correcció la constitueixen els rentats dels taps contaminats, utilitzant diferents dissolvents. La principal avantatge d'aquesta eina és la seva fàcil implementació en la indústria surera. En aquest sentit, Insa *et al.* [137] provaren diferents solucions de rentat, atansant bons resultats en la utilització d'una solució aquosa d'hidròxid sòdic, aconseguint una reducció d'aproximadament del 70% del contingut de TCA. Altres formes innovadores de rentat ja estan implementades en la indústria, com per exemple el mètode CONVEX, el qual es basa en l'extracció en continu de volàtils de les aigües de rentat de manera que s'evita o es minimitza la contaminació creuada, podent eliminar fins a un 97% de TCA [138].

Aquests rentats es poden portar a terme, també, mitjançant la utilització de productes específics que eliminin els clorofenols presents en el suro. Una opció seria la utilització d'un producte enzimàtic anomenat Suberase™, el qual oxida aquests clorofenols, de manera que ja no suposen un risc [139]. Com una alternativa al rentat usual, es pot considerar el rentat amb temperatura i pressió, és a dir, un autoclavatge amb vapor d'aigua (com, per exemple, temperatures de 130°C i pressions de 180 KPa), la qual cosa ha demostrat ser una bona eina per eliminar (extreure) els compostos que causen l'olor a humitat [140-142]. Aquesta tècnica també s'utilitza a nivell industrial [138].

Un procés intermig entre el rentat i l'aplicació d'autoclavatge, és el ROSA (*rate of optimal steam application*), el fonament del qual és l'eliminació del TCA present en el suro mitjançant una destil·lació per arrossegament de vapor. La utilització d'una temperatura adequada serà vital en l'aplicació del procés, ja que temperatures molt elevades poden provocar alteracions en les propietats físiques del suro, tot i que com més alta és la temperatura més efectiva és l'eliminació de TCA. Així, cal arribar a una temperatura suficientment alta com per aconseguir una eliminació de TCA del 70-80% però prou baixa com per no provocar alteracions físiques al tap [139]. En aquest cas, però, el TCA que s'elimina no és el TCA total sinó l'extraïble (terme del qual es parlarà en capítols posteriors) [143].

Una altra via d'eliminació de TCA en el suro és l'extracció mitjançant fluids supercrítics. Aquesta es basa en l'extracció de TCA en el suro mitjançant CO₂ en estat supercrític. Mitjançant aquesta extracció s'aconsegueix l'eliminació del 97% de TCA i del 94 % de PCP, per exemple. En aquest cas també es considera el TCA extraïble [144,145].

L'esterilització de les planxes i dels taps de suro constitueix un altre camí molt útil per solventar el problema que s'està tractant ja que, amb aquest tractament, el que es fa és eliminar la presència de microorganismes. Aquesta esterilització es pot dur a terme, per exemple, mitjançant ozó, de manera que s'arriba a eliminar el 80% de contaminació microbiana de la superfície de les planxes o dels taps de suro [138]. No obstant, l'aplicació d'una radiació pot ser una alternativa vàlida a l'ús de l'ozó per l'esterilització. Aquesta pràctica s'utilitza avui en dia en un gran nombre de productes. El *Codex Alimentarius* recomana una radiació no superior a 10 KGy. Tot i així, diferents estudis portats a terme per la WHO (*World Health Organization*), la FAO (*Food and Agriculture Organization*) i l'IAEA (*International Atomic Energy Agency*) constaten que es podrien aplicar radiacions més elevades sense perill.

Per altra banda, però, cal tenir en compte que l'aplicació d'una radiació pot provocar, no només l'esterilització del producte, sinó la transformació de certs compostos [146]. Careri *et al.* [146,147] aplicaren radiació per feix d'electrons per tal d'esterilitzar suros i van constatar que, en incrementar la radiació (de 25 KGy a 1000 KGy), el nombre de compostos volàtils augmentava, especialment els hidrocarburs alifàtics i els compostos carbonílics. Per contra, en el cas del TCA, en incrementar la radiació (de 25 KGy a 500 KGy) disminuïa la seva presència, mentre, però, augmentava la concentració dels seus derivats, com el 2,4-dicloroanisole i el 4-cloroanisole, amb l'excepció del 2,6-dicloroanisole. Una altra radiació aplicable és la radiació gamma, la qual ja era utilitzada els anys 80 en la

indústria del suro com a mitjà desinfectant. Un estudi de Pereira *et al.* [148] en el que utilitzen aquesta radiació, confirma que el TCA era eliminat en un 90%, tot i que, a causa de la seva degradació, es formaven altres anisoles. En un estudi anterior portat a terme per Nakagawa [149], ja es va comprovar l'aparició d'aquests subproductes de degradació, la qual cosa es veia afavorida en un medi bàsic alcohòlic. Per tant doncs, caldria veure com poden evolucionar aquests productes, per saber si aquesta tècnica és realment efectiva o no.

Una altra proposta, encara que només a nivell teòric, seria la utilització de la tecnologia MIP (*molecular imprinting polymers*) per tal d'eliminar el TCA del tap de suro. La inclusió d'uns receptors (o anticossos sintètics) en el tap de suro específics pel TCA podrien captar-lo i retenir-lo, de manera que el seu pas al vi fos impossible. Aquesta proposta, efectuada per McCluskey i Bowyer [150], va ser provada a nivell de laboratori amb bons resultats, però caldria provar-la a nivell industrial.

A la bibliografia apareixen encara més mètodes com el de Ma *et al.* [151], els quals proposen l'aplicació d'aire ionitzat, generat mitjançant una descàrrega elèctrica, per tal de degradar el TCP. Amb aquesta tècnica, ja utilitzada en la conservació d'aliments, aconseguixen un alt percentatge de dechloració (53%) del TCP en una sola hora.

Altres propostes tenen el seu origen en l'eliminació dels compostos que provoquen l'olor a humitat o florit en aigües. L'aplicació de la filtració ha estat molt usada en aquest camp [152], tot i que la seva aplicació en la indústria vinícola o del suro es fa dubtosa, ja que la poca selectivitat de les membranes farien eliminar altres compostos d'interès. La seva aplicació podria anar encaminada en la neteja de les aigües de rentat dels suros, per tal de poder-la reutilitzar i evitar contaminacions creuades. El mateix es podria comentar de la proposta d'eliminació de TCA en aigües, mitjançant l'ozonització catalitzada per bauxita [46] o l'eliminació de geosmina i 2-metilisoborneol mitjançant ultrasons [45]. En aquest sentit, Benítez *et al.* [153] varen proposar una ozonització per eliminar les substàncies orgàniques de les aigües de rentat dels suros.

BIBLIOGRAFIA

1. X. Rull. *Lèxic Bàsic d'Enologia i Viticultura*. 1^{era} edició. Tarragona (Catalunya): Editorial Serveis Lingüístics de la Universitat Rovira i Virgili; 1997
2. C. Fisher, T.R. Scott. *Flavores de los alimentos. Biología y Química*. 1^{era} edició. Saragossa (Espanya): Editorial Acribia, S.A.; 2000
3. H. D. Belitz, W. Grosch. "Aroma substances" dins H. D. Belitz, W. Grosch (editors), *Food Chemistry*. 2^{ona} edició. Berlín (Alemanya): Springer; 1999. 319-375
4. P. Ribéreau-Gayón, Y. Glories, A. Maujeun, D. Dubordieu "Chemical nature, origins and consequences of the main organoleptic defects" dins P. Ribéreau-Gayón, Y. Glories, A. Maujeun, D. Dubordieu (editors), *Handbook of enology: The chemistry of wine: stabilization and treatments*. 1^{era} edició. Chichester (Anglaterra): John Wiley and sons; 2000. Volum 2, 209-255
5. W. R. Sponholz. "Wine spoilage by microorganisms" dins G. H. Fleet (editor), *Wine Microbiology and Biotechnology*. 1^{era} edició: Chur (USA): Hardwood Academics publishers; 1993. 353-373.
6. R. S. Jackson. "Postfermentation treatments and related topics" dins R. S. Jackson (editor), *Wine Science Principles and Applications*. 3^{era} edició. Amsterdam (Holanda): Elsevier; 2008. Capítol 8, 86-104
7. A. Constantini, E. García-Moruno, M. V. Moreno-Arribas. "Biochemical transformations produced by malolactic fermentation" dins M. V. Moreno-Arribas, M. C. Polo (editors), *Wine Chemistry and Biochemistry*. 1^{era} edició. Nova York (USA): Springer Science+Business Media, LLC, 2009. Capítol 2, 27-58
8. O. Colagrande, V. Mazzoleni, A. Silva. Genesi degli odori e sapori anomali dei vini. *Vignevini*, 7/8 (1988) 23-30
9. E. Navascués López Cordón. *Brettanomyces/Dekkera*: control y detección en bodegas. ACE revista de Enología, 78 (2007). http://www.acenologia.com/ciencia78_2.htm (11 de novembre de 2009)
10. P. Chattonnet, D. Dubordieu, J. Boidron. The influence of *Brettanomyces/Dekkera* sp. Yeast and lactic acid bacteria on the ethylphenol content of red wines. *Am. J. Enol. Vitic.*, 46 (1995) 463-468
11. O. Colagrande. Genèse des odeurs et des goûts anormaux des vins. *Rev. Oenol.*, 53 (1989) 17-20
12. M. Mestres. *Anàlisi de compostos sofrats a l'aroma del vi*. Tesis Doctoral. Tarragona (Catalunya): URV; 2001

13. M. Mestres, O. Busto, J. Guasch. Analysis of organic sulfur compounds in wine aroma. *J. Chromatogr. A.*, 881 (2000) 569-581
14. F. Zamora. El potencial de oxidoreducció en enologia. *ACE*, 114 (2010). http://www.acenologia/cienciaytecnologia/potencial_oxido_reducci3n_cien0210.htm (9 d'octubre de 2010)
15. G. Pickering, Y. J. Lin, G. Soleas, A. Reynolds, R. Riesen, I. Bridle. Ladybug: a new wine off-flavour. Extended abstract. Tarragona (Catalunya): Conference on Wine off-flavours; 23-25 de novembre de 2005
16. C. Silva Pereira, J. J. Figueiredo Marques, M. V. San Romao. Cork taint in wine: Scientific knowledge and public perception – A critical review. *Crit. Rev. Microbiol.*, 26 (3) (2000) 147-162
17. A. Mas, J. Puig, N. Lladó, F. Zamora. *Evolució de vins tranquils y champagnes segun diferentes tipos de tapado. Función del Tapón de corcho*. Tarragona (Catalunya): Universitat Rovira i Virgili i Institut Català del Suro; 2002
18. A. Mas, J. Puig, N. Lladó, F. Zamora. Evolució del cava i del champagne segons diferents tipus de tapada. *ACE Revista d'Enologia*, 54 (2001) 12-15
19. M. B. Springett. "Formation of off-flavours due to microbiological and enzymatic action" dins M. J. Saxby (editor), *Food taints and off-flavours*. 2^{ona} edició. Glasgow (Gran Bretanya): Blackie Academic and Professional, Chapman and Hall; 1995. Capítol 9, 274-289
20. T. H. Lee, R. F. Simpson. "Microbiology and chemistry of cork taints in wine" dins G. H. Fleet "Wine microbiology and biotechnology". 1^{era} edició: Chur (USA): Hardwood Academics publishers; 1993. Capítol 12, 353-372
21. A. P. Pollnitz, K. H. Pardon, D. Liacopoulos, G. K. Skouroumounis, M. A. Sefton. The analysis of 2,4,6-trichloroanisole and other chloroanisoles in tainted wines and corks. *Aust. J. Grape Wine Res.*, 2 (1996) 184-190
22. I. Hermosin Gutiérrez. Los tapones para botellas de vino: eficacia de cierre, control de calidad sensorial y microbiológica, y relación con el defecto de "gusto a corcho" del vino. *Tecnología del vino*, 4 (2002) 64-78
23. T. J. Evans, C. E. Butzke, S. E. Ebeler. Analysis of 2,4,6-trichloroanisole in wines using solid-phase microextraction coupled to gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, 786 (1997) 293-298
24. C. E. Butzke, T. J. Evans, Susan E. Ebeler. "Detection of cork taint in wine using automated solid-phase microextraction in combination with GC/MS-SIM" dins A. L. Waterhouse, S. E. Ebeler (editors), *Chemistry of wine flavour*. 1^{era} edició. Washington (USA): American Chemistry Society; 1999. Capítol 15, 209-216

25. A. Lefebvre, J. M. Riboulet, J. N. Boidron, P. Ribereau Gayon. Incidence des micro-organismes du liège sur les altérations olfactives du vin. *Sciences des Aliments*, 3(2) (1983) 265-278
26. S. Insa. *Detecció de compostos volàtils, clorofenols, cloroanisoles i 2,4,6-tribromoanisoles, relacionats amb el "gust a suro"*. Tesi Doctoral. Girona (Catalunya): Universitat de Girona; 2006
27. J. A. Casey. "Closures for wine bottles: Issues and Challenges" dins P. Leske, J. Eglinton (editors), *ASVO Seminar*. Adelaide (Austràlia): Australian Society of Viticulture and Oenology; 1995. 3-8
28. M. Thiering. Of cork and wine. *Wine Ind. J.*, 4 (12) (1997) 388-391
29. R. F. Curtis, D. G. Land, Nerys M. Griffiths, M. Gee, D. Robinson, J. L. Peel, C. Dennis, Jennifer M. Gee. 2,3,4,6-tetrachloroanisole Association with Musty taint in chickens and Microbiological Formation. *Nature*, 235 (28) (1972) 223-224
30. J. M. H. Bemelmans, M. C. Ten Noever de Brauw. Chloroanisoles as Off-flavour components in eggs and broilers. *J. Agric. Food Chem.*, 22 (6) (1974) 1137-1138
31. J. E. R. Frijters, J. M. H. Bemelmans. Flavour sensitivity of chloroanisoles in coagulated egg yolk. *J. Food Sci.*, 42 (4) (1977) 1122-1123
32. M. J. Saxby. "Taints and off-flavours in food" dins de I. D. Morton, A. J. MacLeod (editors), *Food Flavours. Part A: Introduction*. 1^{era} edició: Nova York (USA): Elsevier Scientific Publishing Company; 1982. 439-457
33. R. Savenhed, H. Borén, A. Grimvall, B. V. Lundgreen, P. Balmér, T. Hedberg. Removal of individual off-flavour compounds in water during artificial groundwater recharge and during treatment by alum coagulation/sand filtration. *Wat. Res.*, 21 (3) (1987) 277-283
34. S. E. Jensen, C. L. Anders, L. J. Goatcher, T. Perley, S. Kenefick, S. E. Hruday. Actinomycetes as a factor in odour problems affecting drinking water from the north Saskatchewan River. *Wat. Res.* 28 (6) (1994) 1393-1994
35. S. Karlsson, S. Kaugare, A. Grimvall, H. Borén, R. Sävenhed. Formation of 2,4,6-trichlorophenol and 2,4,6-trichloroanisole during treatment and distribution of drinking water. *Wat. Sci. Tech.*, 31 (11) (1995) 99-103
36. A. Montiel, S. Rigal, B. Welté. Study of the origin of musty taste in the drinking water supply. *Wat. Sci. Tech.* 40 (6) (1999) 171-177
37. L. Malleret, J. Dugay, A. Brauchet, M. C. Hennion. Simultaneous determination of "earthy-musty" odourous haloanisoles and their corresponding halophenols in water samples using solid-phase microextraction coupled to gas chromatography with electron capture detection. *J. Chromatograph. A.*, 999 (2003) 135-144

38. S. B. Watson, J. Ridal, B. Zaitlin, A. Lo. Odours from pulp mill effluent treatment ponds: the origin of significant levels of geosmin and 2-methylisoborneol (MIB). *Chemosphere*, 51 (2003) 765-773
39. Y. H. Sung, T. Ying, S. D. Huang. Analysis of earthy and musty odors in water samples by solid-phase microextraction coupled to gas chromatography/ion trap mass spectrometry. *Talanta*, 65 (2005) 518-524
40. P. B. M. Pinheiro, J. C. G. Esteves da Silva. Detection of 2,4,6-trichloroanisole in chlorinated water at nanogram per litre levels by SPME-GC-ECD. *Anal. Bioanal. Chem.*, 382 (2005) 341-346
41. L. Zhang, R. Hu, Z. Yang. Simultaneous picogram determination of "earthy-musty" odorous compounds in water using solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry coupled with initial cool programmable temperature vaporizer inlet. *J. Chromatograph. A*, 1098 (2005) 7-13
42. L. Zhang, R. Hu, Z. Yang. Routine analysis of off-flavour compounds in water at sub-part-per-trillion level by large-volume injection GC/MS with programmable temperature vaporizing inlet. *Water Res.*, 40 (2006) 699-709
43. A. Salemi, S. Lacorte, H. Bagheri, D. Barceló. Automated trace determination of earthy-musty odorous compounds in water samples by on-line-purge-and-trap-gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatograph. A*, 1136 (2006) 170-175
44. N. Park, Y. Lee, S. Lee, J. Cho. Removal of taste and odor model compound (2,4,6-trichloroanisole) by tight ultrafiltration membranes. *Desalination*, 212 (2007) 28-36
45. W. Song, K. O'Shea. Ultrasonically induced degradation of 2-methylisoborneol and geosmin. *Water Res.*, 41 (2007) 2672-2678
46. F. Qi, B. Xu, Z. Chen, J. Ma, D. Sun, L. Zhang. Influence of aluminium oxides surface properties on catalyzed ozonation of 2,4,6-trichloroanisole. *Separation and Purification Technology*, 66 (2009) 405-410
47. F. Qi, B. Xu, Z. Chen, J. Ma, D. Sun, L. Zhang, F. Wu. Ozonation catalyzed by the raw bauxite for the degradation of 2,4,6-trichloroanisole in drinking water. *J. Hazardous Materials*, 168 (2009) 246-252
48. J. C. Spadone, G. Takeoka, R. Liardon. Analytical Investigation of Rio Off-Flavour in Green Coffe. *J. Agric. Food Chem.*, 38 (1990) 226-233
49. E. Cantergiani, H. Brevard, Y. Krebs, A. Fera Morales, R. Amadò, C. Yeretian. Characterization of the aroma of green Mexican coffe and identification of mouldy/earthy defects. *Eur. Food Res. Technol.*, 212 (2001) 648-657
50. I. Blank, W. Grosch. On the role of (-)-2-methylisoborneol for the aroma of robusta coffe. *J. Agric. Food Chem.*, 50 (2002) 4653-4656

51. M. Petracco. Our Everyday Cup of Coffe: The Chemistry Behind its magic. J. Chemical Education, 82 (8) (2005) 1161-1167
52. R. Cantagrel, J. P. Vidal. Recherche des composés responsables de goût de bouchon dans les cognacs. Extracte del "Bulletin de l'O.I.V", 709-710 (1990) 251-277
53. F. B. Whitfield, T. H. Ly Nguyen, J. H. Last. Effect of relative humidity and chlorophenol content in fungal conversion of chlorophenols to chloroanisoles in fibreboard cartons containing dried fruit. J. Sci. Food Agric., 54 (1991) 595-604
54. A. Bertrand, M. L. Barrios. Contamination de bouchons par les produits de traitements de palettes de stockage des bouteilles. Rev. Française Oenol., 149 (1994) 29-32
55. J. L. Hill, A. D. Hocking, Frank B. Whitfield. The role of fungi in the production of chloroanisoles in general purpose freight containers. Food Chem., 54 (1995) 161-166
56. M. J. Saxby "A survey of chemicals causing taints and off-flavours in food" dins M. J. Saxby (editor), *Food taints and off-flavours*. 2^{ona} edició. Glasgow (Gran Bretanya): Blackie Academic and Professional, Chapman and Hall; 1995. Capítol 2, 41-67
57. L. H. Aung, J. L. Smilanick, P. V. Vail, P. L. Hartsell, E. Gomez. Investigations into the Origin of Chloroanisoles Causing Musty Off-Flavour of Raisins. J. Agric. Food Chem., 44 (1996) 3294-3296
58. L. H. Aung, J. F. Jenner. Detection of 2,4,6-trichloroanisole in microorganisms-free irradiated raisins by solid-phase microextraction and GC-MS. J. Stored Products Res., 40 (2004) 451- 459
59. S. La Guerche, B. Dauphin, M. Pons, D. Blancard, P. Darriet. Characterization of some mushroom and earthy off-odors microbially induced by the development of rot on grapes. J. Agric. Food Chem., 54 (2006) 9193-9200
60. F. B. Whitfield, J. L. Hill, K. Shaw. 2,4,6-tribromoanisole: a Potential Cause of Mustiness in Packaged Food. J. Agric. Food Chem., 45 (3) (1997) 889-893
61. C. Pizarro, J. M. González Sáiz, N. Pérez del Notario. Multiple response optimisation based on desirability functions of a microwave-assisted extraction method for the simultaneous determination of chloroanisoles and chlorophenols in oak barrel sawdust. J. Chromatograph. A, 1132 (2006) 8-14
62. J. A. Ragazzo Sánchez, P. Chalier, D. Chavalier Lucia, M. Calderon Santoyo, C. Ghommidh. Off-Flavous detection in alcoholic beverages by electronic nose coupled to GC. Sensors and Actuators B: Chemical, 140 (2009) 29-34
63. A. Miki, A. Isogai, H. Utsunomiya, H. Iwata. Identification of 2,4,6-trichloroanisole (TCA) causing a musty/muddy off-flavor in sake and its production in rice koji and *moromi* mash. J. of Biosci. and Bioeng., 100 (2) (2005) 178-183

64. *QUERCUS*-Qualitative experiments to determine the components responsible and eliminate the causes of undesirable sensory characteristics in drinks stoppered with cork. European Union and C.E. Liege No. AIRI-CT92-0372; 1996
65. J. M. Amon, J. M. Vandeeper, R. F. Simpson. Compounds responsible for cork taint in wine. *Aust. N. Z. Wine Ind. J.*, 4 (1) (1989) 62-69
66. R. F. Simpson. Cork taint in wine: A review of the causes. *Aust. N. Z. Wine Ind. J.*, 5 (1990) 286-296
67. M. A. Sefton, R. F. Simpson. Compounds causing cork taint and the factors affecting their transfer from natural cork closures to wine – a review. *Aust. J. Grape Wine Res.*, 11 (2005) 226-240
68. F. B. Whitfield, R. L. McBride, T. H. Ly Nguyen. Flavour Perception of Chloroanisoles in Water and Selected Processed Foods. *J. Sci. Food Agric.*, 40 (1987) 357-365
69. E. Navascués, F. Calderón, J. A. Suárez. El metabolismo microbià en el binomi suro-vi. *ACE Revista de Enología*, 18 (54) (2001) 8-11
70. J. Casey. Controversies about corks. *Aust. N. Z. Grapegrower Winemaker*, 475 (2003) 68-74
71. P. Darriet, M. Pons, S. Lamie, D. Dubourdieu. Identification and Quantification of Geosmin, and earthy odorant contaminating wines. *J. Agric. Food Chem.*, 48 (2000) 4835-4838
72. K. Grainger. *Wine Quality Tasting and Selection*. 1^{era} edició. Chichester (Anglaterra): John Wiley and sons; 2009. Capítol 6, 67-77
73. <http://www.docstoc.com/docs/10177493/Why-does-tap-water-hava-a-taste-or-smell> (14 de novembre de 2009)
74. <http://www.patentstorm.us/patents/7332042/description.html> (14 de novembre de 2009)
75. R. Eder, G. Weingart, W. Brandes. *Ocurrence of Geosmin in Australian Wines*. Grapeloux 2008: Grape Bunch rot and Associated Organoleptic Problems. Remich (Luxemburg); 24-25 de novembre de 2008
76. D. Kilcast. “Sensory evaluation of taints and off-flavours” dins M. J. Saxby (editor), *Food taints and off-flavours*. 2^{ona} edició. Glasgow (Gran Bretanya). Blackie Academic and Professional; 1995. Capítol 1, 1-40
77. F. B. Whitfield, K. J. Shaw, T. H. Ly Nguyen. Simultaneous Determination of 2,4,6-trichloroanisole, 2,3,4,6-tetrachloroanisole and pentachloroanisole in foods and packaging materials by high-resolution gas chromatography-multiple ion monitoring-mass spectrometry. *J. Sci. Food Agric.*, 37 (1986) 85-96

78. S. La Guerche. *Nature and Origin of Earthy and Fungal "Off-Flavours" in grapes and wines*. Extended abstract. Conference on Wine off-flavours. Tarragona (Catalunya); 23-25 novembre de 2005
79. <http://www.leffingwell.com/odorthre.htm> (15 de novembre de 2009)
80. M. L. Álvarez Rodríguez, C. Belloch, M. Villa, F. Uruburu, G. Larriba, J. J. R. Coque. Degradation of vanillic acid and production of guaiacol by microorganisms isolated from cork samples. *FEMS Microbiology Letters*, 220 (2003) 49-55
81. J. Codina, C. Esteban, A. Calvo, M. Agut. Influence of microorganisms in cases of cork taint. *Ind. Bevande*, 22 (1993) 561-563
82. C. Prat, R. Trias, L. Culleré, A. Escudero, E. Enticó, L. Bañeras. Off-Odor compounds produced in cork by isolated bacteria and fungi: A gas chromatography-mass spectrometry and gas chromatography-olfactometry study. *J Agric. Food Chem.*, 57 (2009) 7473-7479
83. R. S. Jackson. "Chemical constituents of grapes and wines" dins Ronald S. Jackson (editor), *Wine Science Principles and Applications*. 3^{era} edició. Amsterdam (Holanda): Elsevier; 2008. Capítol 6, 270-332
84. B. Duncan. "Closure Quality Control at Southcorp Wines" dins P. Leske, J. Eglinton (editors), *Proceedings of the ASVO Oenology Seminar on Corks and Closures*. Adelaida (Australia): Australian Society of Viticulture and Oenology; 1995. 29-30
85. R. F. Simpson, D. L. Capone, M. A. Sefton. Isolation and Identification of 2-methoxy-3,5-dimethylpyrazine, a Potent Musty Compound from Wine Corks. *J. Agric. Food Chem.*, 52 (2004) 5425-5430
86. R. F. Simpson, D. L. Capone, B. Duncan, M. A. Sefton. Incidence and nature of 'fungal must' taint in wine corks. *Aust. N.Z. Wine Ind J.*, 20 (1) (2005) 26-31
87. D. Capone, M. A. Sefton, I. Pretorius, P. Høj. Flavour "scalping" by wine bottle closures. *Wine Ind. J.*, 18 (5) (2003) 16-20
88. J. Prescott, L. Norris, M. Kunst, S. Kim. Estimating a "consumer rejection threshold" for cork taint in white wine. *Food Quality and Preference*, 16 (2005) 345-349
89. B. A. Richardson. *Wood Preservatives*. 2^{ona} edició. Abingdon(Gran Bretanya): Taylor and Francis; 1993. Capítol 4, 97-152
90. http://www.atsdr.cdc.gov/es/toxfaqs/es_tfacts107.html (15 de novembre de 2009)
91. <http://www.ces.iisc.ernet.in/energy/HC270799/HDL/ENV/envsp/Vol314j.htm> (15 de novembre de 2009)

92. A. Fernández Bremauntz, M. Yarto Ramírez, José Castro Díaz. *Las sustancias tóxicas persistentes*. 1^{era} edició. Mèxic DF (Mèxic): Instituto Nacional de Ecología; 2004
93. D. G. Crosby. Environmental Chemistry of Pentachlorophenol. *Pure & Appl. Chem.*, 53 (1981) 1051-1080
94. Directiva 91/173/ECC; 1991
95. Directiva 96/211/EC; 1996
96. P. Chatonnet, S. Bonnet, Stéphane Boutou, Marie Dominique Labadie. Identification and Responsibility of 2,4,6-tribromoanisole in musty, corked odors in wine. *J. Agric. Food Chem.*, 52 (2004) 1255-1262
97. C. Pizarro, N. Pérez del Notario, J. M. González Sáiz. Optimization of a microwave-assisted extraction method for the simultaneous determination of haloanisoles and halophenols in cork stoppers. *J. Chromatogr. A*, 1149 (2007) 138-144
98. S. Jönsson, J. Hagberg, B. van Bavel. Determination of 2,4,6-trichloroanisole and 2,4,6-tribromoanisole in wine using microextraction in packed syringe and gas chromatography-mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.*, 56 (2008) 4962-4967
99. S. Jönsson, T. Uusitalo, B. van Bavel, I. B. Gustafsson, G. Lindström. Determination of 2,4,6-trichloroanisole and 2,4,6-tribromoanisole on ng L⁻¹ to pg L⁻¹ levels in wine by solid-phase microextraction and gas chromatography-high-resolution mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, 1111 (2006) 71-75
100. S. Insa, E. Anticó, V. Ferreira. Highly selective solid-phase extraction and large volume injection for the robust gas chromatography-mass spectrometric analysis of TCA and TBA in wines. *J. Chromatogr. A*, 1089 (2005) 235-242
101. M. Nickkova, M. Germany, M. P. Marco. Immunochemical analysis of 2,4,6-tribromophenol of wood contamination. *J. Agric. Food Chem.*, 56 (2008) 29-34
102. A. Díaz, F. Ventura, M. T. Galceran. Determination of odorous mixed chloro-bromoanisoles in water by solid-phase microextraction and gas chromatography-mass detection. *J. Chromatogr. A*, 1064 (2005) 97-106
103. C. Lorenzo, A. Zalacain, G. L. Alonso, M. R. Salinas. Non destructive method to determine halophenols and haloanisoles in cork stoppers by headspace sorptive extraction. *J. Chromatogr. A*, 1114 (2006) 250-254
104. J. J. Descout, A. Bertrand, M. Barrios. Observations sur la traçabilité de la pollution des bouchons en liège par les polychlorophénols et polychloroanisoles. *Rev. Oenol.* 89 (1998) 31-32
105. E. Gremaud, R. Turesky. Rapid Analytical Methods to Measure Pentachlorophenol in wood. *J. Agric. Food Chem.*, 45 (1997) 1229-1233

106. F. B. Whitfield, T. H. Ly Nguyen, C. R. Tindale. Effect of relative humidity and incubation time on the o-methylation of chlorophenols in fibreboard by *Paecilomyces variotti*. J. Sci. Food Agric., 55 (1991) 19-26
107. J. M. Diserens. Rapid determination of nineteen chlorophenols in wood, paper, cardboard, fruits and fruit juices by gas chromatography/mass spectrometry. J. AOAC, 84 (3) (2001) 853-860
108. V. I. Triantafyllou, K. Akrida-Demertzi, P. G. Demertzis. Migration studies from recycled paper packaging materials: development of an analytical method for rapid testing. Anal. Chim. Acta, 467 (1-2) (2002) 253-260
109. C. Nerín, E. Asensio. Behaviour of organic pollutants in paper and board samples intended to be in contact with food. Anal. Chim. Acta, 508 (2) (2004) 185-191
110. A. Bertrand, M. L. Barrios. Contamination des bouchons par les produits de traitements de palettes de stockage des bouchons. Rev. Française Oenol., 34 (149) (1994) 29-32
111. M. I. Mijares. Los olores-sabores confusos de ciertos olores. Semana Vinícola, 2809 (2000) 2042-2047
112. D. A. Barker, D. L. Capone, A. P. Pollnitz, H. J. McLean, I.L. Francis, H. Oakey, M. A. Sefton. Absorption of 2,4,6-trichloroanisole by wine corks via the vapour phase in an enclosed environment. Aust. J. Grape Wine Res., 7 (2001) 40-46
113. P. R. Howland, A. P. Pollnitz, D. Liacopoulos, H. J. Mc. Lean, M. A. Sefton. The location of 2,4,6-trichloroanisole in a batch of contaminated wine corks. Aust. J. Grape Wine Res., 3 (1997) 141-145
114. A. Peña Neira, B. Fernández de Simón, M. C. García Vallejo, T. Hernández, E. Cadahía, J. A. Suárez. Presence of cork-taint responsible compounds in wines and their cork stoppers. Eur. Food. Technol., 211 (2000) 257-261
115. D. L. Capone, G. K. Skouroumounis, D. A. Barker, H. J. McLean, A. P. Pollnitz, M. A. Sefton. Absorption of chloroanisoles from wine by corks and by other materials. Aust. J. Grape Wine, 5 (1999) 91-98
116. D. L. Capone, G. K. Skouroumounis, M. A. Sefton. Permeation of 2,4,6-trichloroanisole through cork closures in wine bottles. Aust. J. Grape Wine Res., 8 (3) (2002) 196-199
117. R. Serra, S. Peterson, CTCOR, Armando Venâncio. Multilocus sequence identification of *Penicillium* species in cork bark during plank preparation for the manufacture of stoppers. Res. Microbiol., 159 (2008) 178-186

118. S. Prak. Z. Gunata, J. P. Guiraud, S. Schorr Galindo. Fungal strains isolated from cork stoppers and the formation of 2,4,6-trichloroanisole involved in the cork taint of wine. *Food Microbiol.*, 24 (2007) 271-280
119. M. Pi. *Hongos y micotoxinas en tapones de corcho. Propuesta de límites micológicos aceptables*. Tesi doctoral.Barcelona (Catalunya): UAB; 2006
120. G. H. Fleet. Yeast interactions and wine flavour. *Int. J. Food Microbiol.*, 86 (2003) 11-22
121. M. L. Álvarez Rodríguez, L. López Ocaña, J. M. López Coronado, E. Rodríguez, M. J. Martínez, G. Larriba, J. J. R. Coque. Cork taint of wines: Role of the filamentous fungi isolated from cork in the formation of 2,4,6-trichloroanisole by O methylation of 2,4,6-trichlorophenol. *App. Environ. Microbiol.*, 68 (12) (2002) 5860- 5869
122. I. Hermosín Gutiérrez, A. I. Peña Barba. Los tapones de vino: eficacia de cierre, control de calidad sensorial y microbiológica, y relación con el defecto de "gusto a corcho" del vino. *Tecnología del Vino*, 4 (Marzo/Abril) (2002) 64-78
123. J. A. Suárez Lepe. Las alteraciones del vino microbiano. De Pasteur al siglo XXI. *Semana Vinícola*, 2839 (2001) 6-16
124. M. Du Toit, I. S. Pretorius. Microbial spoilage and preservation of wine: using weapons from nature's own arsenal – a review. *S. Afr. J. Enol. Vitic.*, 21 (2000) 74-96
125. D. Petegolli. El corcho, cruz y delicia de la enología. *Semana vinícola*, 2790 (2000) 359-369
126. L. Moio, M. Diana, G. del Prete, G. Di Landa, A. A. Valentino, A. Bianco. Analisi dei componenti volatili del sughero affetto da "macchia gialla" e "verdone" e di vini con odore di sughero mediante GC/Sniffing e GC/MS. *Ind. Bevande*, 27 (1998) 615-619
127. M. A. Calvo Torras, M. Agut Bonsfills. Microbiological Aspects of cork. *Ind. Alimentarie*, 12 (1998) 14-17
128. J. A. Suárez, E. Navascués, F. Calderón, J. Vila, B. Colomo, C. García Vallejo. Présence de champignons et concentration de chloroanisoles pendant le processus de fabrication des bouchons de liège pour l'embouteillage des vins. *Bulletin de l'OIV*, 793-797 (1997) 234-245
129. S. Rocha. I. Delgadillo, A. J. Ferrer Correia. GC-MS study of volatiles of normal and microbiologically attacked cork from *Quercus suber* L. *J. Agric. Food Chem.*, 44 (1996) 865-871
130. W. R. Sponholz, H. Muno. Corkiness—A microbiological problem? *Ind. Bevande*, 23 (1994) 133-138
131. G. Di Falco, S. Sampò. Influence of preventive mycological and organoleptical controls on the raw cork quality. *Ind. Bevande*, 22 (1993) 549-550

132. G. Di Falco, S. Sampò. Contaminazione fungina e qualità del sughero grezzo. Riv. Vitic. Enol., 1 (1992), 31-41
133. V. Mazzoleni, R. Molteni, M. D. Fumi. Effetto dell'irradiazione con elettroni accelerati sul sughero utilizzato per la produzione di tappi. Ind. Bevande, 29 (2000) 247-255
134. P. Vlachos, E. Stathatos, G. Lyberatos, P. Lianos. Gas-phase photolytic degradation of 2,4,6-trichloroanisole in the presence of a nanocrystalline Titania film. Applications to the treatment of cork stoppers. Catalysis communications, 9 (2008) 1987-1990
135. Y. Vasserot, C. Pitois, P. Jeandet. Protective effect of a composite cork stopper on champagne wine pollution with 2,4,6-trichloroanisole. Am. J. Enol. Vitic., 52 (3) (2001) 280-281
136. C. Silva Pereira, A. Pires, M. J. Valle, L. Vilas Boas, J. J. Figueiredo Marques, M. V. San Romao. Role of *Chrysonilia sitophia* in the quality of cork stoppers for sealing wine bottles. J. Ind. Microbiol. & Biotech., 24 (2000) 256-261
137. S. Insa, V. Salvadó, E. Anticó. Assays on the simultaneous determination and elimination of chloroanisoles and chlorophenols from contaminated cork samples. J. Chromatogr. A, 1122 (2006) 215-221
138. M. F.A. Ferreira Cabral, J. Leal Ferreira. Reducing contaminants in wine corks. Aust. Grapegrower Winemaker, 449A (221) 169-170
139. B. Garrigues. Élimination des composés phénoliques présents dans les bouchons de liège par une phénoloxydase: Suberase™. Rev. Oenol., 93 (1999) 20-22
140. S. Rocha, I. Delgadillo, A. J. Ferrer Correia, A. M. Bastos, I. Roseira, A. Guimaraes. Elimination of "Cork Taint" in wines in the course of the cork manufacturing process. Wine Ind. J., 8 (3) (1993) 223-227
141. S. Rocha, I. Delgadillo, A. J. Ferrer Correia. Improvement of the volatile components of cork from *Quercus suber* L. by an autoclaving procedure. J. Agric. Food Chem., 44 (1996) 872-876
142. Amorim. Focus Amorim Technical Bulletin, 3 (2003). <http://www.corkfacts.com/pdf/files/focus3.pdf> (11 de novembre de 2010)
143. M. Hall, N. Byrd, J. Williams. An assessment of the effect of the ROSA treatment on the level of TCA in naturally-contaminated cork granules. Aust. N. Z. Grapegrower Winemaker, 484 (2004) 57-59
144. J. M. Aracill. Erradicación del TCA extrayendo las moléculas contaminantes. El proceso DIAMANT: un objetivo de gran envergadura. Revista Enología, 1 (2005), 1-

6. (http://www.revistaenologia.com/pdf/rev0502/rev_n6_novTec1.pdf) (11 de novembre de 2010)
145. T. White. Are Diamonds Forever? *Aust. N. Z. Grapegrower Winemaker*, Març (2004) 42-44
146. M. Careri, V. Mazzoleni, M. Musci, R. Molteni. Effects of electron beam irradiation on cork volatile compounds by gas chromatography-mass spectrometry. *Chromatographia*, 49 (3/4) (1999) 166-172
147. M. Careri, V. Mazzoleni, M. Musci, R. Molteni. Study of electron beam irradiation effects on 2,4,6-trichloroanisole as a contaminant of cork by gas chromatography-mass spectrometry. *Chromatographia*, 53 (9/10) (2001) 553-557
148. C. Pereira, L. Gil, L. Carriço. Reduction of 2,4,6-trichloroanisole content in cork stoppers by using gamma radiation. *Rad. Phys. Chem.*, 76 (2007) 729-732
149. S. Nakagawa, T. Shimokawa. Degradation of halogenated carbons in alkaline alcohol. *Rad. Phys. Chem.*, 63 (2002) 151-156
150. A. McCluskey, M. Bowyer. Synthetic antibodies and the Australian wine industry: A Hunter Valley solution to cork taint?. *Aust. N. Z. Grapegrower Winemaker*, 485a (2004) 111-115
151. H. Ma, J. Wohlers, U. Meierhenrich, A. Bernecker, V. Suling, W. Thiemann. Analysis of oxidative degradation products of 2,4,6-trichlorophenol treated with air ions. *Anal. Chem.*, 72 (2001) 3506-3510
152. N. Park, Y. Lee, S. Lee, J. Cho. Removal of taste and odor model compound (2,4,6-trichloroanisole) by tight ultrafiltration membranes. *Desalination*, 212 (2007) 28-36
153. F. J. Benítez, J. L. Acero, J. García, A. I. Leal. Purification of cork processing wastewaters by ozone, by activated sludge, and their two sequential applications. *Water Res.*, 37 (2003) 4081-4090

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
DETERMINACIÓ ANALÍTICA DE 2,4,6-TRICLOROANISOLE I ALTRES CLOROANISOLES
EN VINS I SUROS
Marc Riu Rusell
ISBN:9788469432358/DL:T. 1044-2011



CAPÍTOL IV
DETERMINACIÓ DE CLOROANISOLES
EN VINS I SUROS

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
DETERMINACIÓ ANALÍTICA DE 2,4,6-TRICLOROANISOLE I ALTRES CLOROANISOLES
EN VINS I SUROS
Marc Riu Rusell
ISBN:9788469432358/DL:T. 1044-2011

1.- INTRODUCCIÓ

En aquest capítol es pretén donar una visió general de com els diferents investigadors han donat resposta i solucions al problema analític que s'està tractant: la determinació de cloroanisoles en vins i suros.

En el moment d'enfrontar-se amb la problemàtica analítica que implica la determinació d'un compost individual o un grup de compostos cal tenir en compte les seves propietats físiques, en quin rang de concentració es troben i, finalment, en quina matriu estan. També cal tenir en compte, òbviament, els recursos existents i qui és el destinatari de la informació final ja que, tot i que de vegades no es consideren, poden condicionar completament la metodologia a seguir [1].

Sigui com sigui, en el cas concret de la determinació analítica de cloroanisoles en vi i suro, especialment el 2,4,6-tricloroanisol (TCA), cal tenir en compte:

- *Nivells de concentració.* Les concentracions a les que es troben aquests compostos són molt baixes de manera que, per exemple, en el cas del TCA, aquest està a nivells de $\text{ng}\cdot\text{l}^{-1}$ en el cas dels vins i $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$ en el cas dels suros. Això fa necessari l'aplicació a la mostra de tècniques d'extracció i concentració.
- *Matriu.* El vi i el suro són dues matrius molt complexes. Per tant, la determinació d'aquests compostos es veurà afectada pels nombrosos interferents existents en elles. És per això que cadascuna serà objecte d'estudi de manera particular ja que, mentre que en el cas del suro el principal problema és la manca d'homogeneïtat, en el cas del vi el que condicionarà l'anàlisi és el component etanòlic d'aquesta matriu.

Tenint en compte les propietats físico-químiques dels cloroanisoles (Taula IV.1), la principal tècnica de separació utilitzada és la cromatografia de gasos (GC), ja sigui utilitzant la detecció per captura electrònica (ECD), per espectrometria de masses (MS) o d'emissió atòmica (AED). Però, per arribar als nivells de concentració d'interès serà imprescindible la utilització d'una tècnica d'extracció i/o preconcentració tal i com es veurà en l'apartat que segueix. Cal tenir en compte però, que existeixen alternatives a les tècniques cromatogràfiques com són el nas electrònic o el immunoassaig i biosensors.

Taula IV.1. Propietats físico-químiques dels cloroanisoles [2-5]

DCA: dicloroanisole; **TCA:** tricloroanisole; **TeCA:** tetracloroanisole; **PCA:** pentacloroanisole

	2,4-DCA	2,6-DCA	2,4,6-TCA	2,3,4,6-TeCA	2,3,4,5,6-PCA
Número CAS	553-82-2	1984-65-2	87-40-1	938-22-7	1825-21-4
Fórmula molecular	C ₇ H ₆ Cl ₂ O	C ₇ H ₆ Cl ₂ O	C ₇ H ₅ Cl ₃ O	C ₇ H ₄ Cl ₄ O	C ₇ H ₃ Cl ₅ O
Pes molecular (g/mol)	177,028	177,028	211,473	245,918	280,370
Punt fusió (°C)	20,65	20,65	61,50	68,39	84,27
Punt ebullició (°C)	215,67	215,67	241	272,80	297,85
logK _{ow}	3,36	3,10	4,11	4,75	5,45
Volum molar (cm ³ ·mol ⁻¹)	137,3	137,3	190,0	161,2	173,1
Solubilitat en aigua (mg·l ⁻¹ a 25°C)	76,44	21,8	13,2	3,3873	0,3535
Pressió de vapor (Pa a 25°C)	21,865	0,011	2,065	0,516	0,074
Constant Llei de Henry (atm·m ⁻³ ·mol ⁻¹ a 25°C)	1,75·10 ⁻⁴	1,75·10 ⁻⁴	1,30·10 ⁻³	9,61·10 ⁻⁵	7,12·10 ⁻⁵

2.- TÈCNIQUES D'EXTRACCIÓ

S'entén per tècnica d'extracció aquella etapa en la preparació de la mostra que porta a l'aïllament i, de vegades, també a la concentració dels components d'interès provinents de la matriu de la mostra [6].

Les tècniques emprades pels diferents investigadors per tal d'aconseguir aquest objectiu en l'anàlisi dels cloroanisoles en vins i suros són l'extracció líquid-líquid, l'extracció sòlid-líquid, l'extracció i destil·lació simultànies, la hidrodestil·lació al buit, l'espai de cap estàtic i dinàmic, l'extracció amb fluïds supercrítics, l'extracció amb líquid pressuritzat, l'extracció assistida amb microones, la desorció tèrmica directa, la pervaporació i perevaporació, l'extracció en fase sòlida, la microextracció en fase sòlida, la *stir bar sorptive extraction* i la microextracció amb solvent. Totes elles es comenten tot seguit.

2.1.- Extracció líquid-líquid

L'extracció líquid-líquid és aquella en la que, mitjançant l'addició d'un líquid immiscible amb la matriu, també líquida, es pretén aconseguir la transferència dels analits d'interès des de la fase líquida inicial (la matriu) a la segona (solvent afegit).

Com és ben sabut, una de les fases sol ser aquosa (generalment la fase inicial), mentre que l'altra sol ser orgànica (normalment, la fase nova adicionada, anomenada extractant). La composició de les fases jugarà un paper clau en el procés extractiu. La fase extractant pot ser un dissolvent orgànic, una mescla de dissolvents o una substància dissolta, coneguda com a agent extractant, en un dissolvent o una mescla de dissolvents, anomenat diluent. El diluent normalment no intervé en l'extracció, però sol millorar les característiques de l'agent extractant [7].

La fase orgànica ha de complir una sèrie de requisits, com que ha de ser molt poc soluble en aigua, no ha de reaccionar amb ella, ha de presentar un punt d'ebullició baix, una pressió de vapor i una viscositat moderada, no formar emulsions, tenir una bona estabilitat química i no ser tòxic. No sempre serà possible reunir totes aquestes característiques per la qual cosa el procés d'extracció es pot modificar mitjançant l'addició d'agents emmascarants, amb l'addició d'agents salins (disminueixen l'activitat de l'aigua i afavoreixen la solvatació), variant la temperatura, afegint agitació o variant els volums de les fases [7,8].

Els principals avantatges d'aquesta tècnica són la versatilitat i el cost relativament baix. Però presenta una sèrie de desavantatges importants, com que no es pot

automatitzar, implica temps d'anàlisis llargs, es perden analits durant el procés, hi ha facilitat de formació d'artefactes i cal la utilització de grans quantitats de dissolvents amb el subseqüent impacte mediambiental [9,10].

Aquesta tècnica ha estat força utilitzada en l'extracció de cloroanisoles en vins. Els dissolvents orgànics més emprats han estat la mescla de pentà i acetat d'etil (3:1) [11], l'n-pentà [12, 14-16], la mescla de diclorometà:pentà (2:1) [13] i l'hexà [17]. En el cas de l'extracció del 2,4,6-tribromoanisol, també s'ha utilitzat com a dissolvent extractant una mescla a parts iguals de diclorometà i n-pentà, prèvia acidificació amb àcid sulfúric diluït [18]. Aquesta tècnica també s'ha utilitzat per a la determinació de TCA, emprant n-pentà com a extractant, en cervesa [19] i aigua [20], emprant una mescla d'èter i pentà (1:1) en conyac [21] o amb n-hexà per dur a terme l'extracció en un medi de cultiu microbiològic [22].

Un cop hem extret els analits, donada la baixa concentració en la que aquests es troben, caldrà procedir a una etapa de concentració. Algunes de les tècniques de preconcentració emprades en el camp que ens ocupa han estat la destil·lació amb una columna Vigreux [12-14], la utilització d'una columna neutra d'alúmina [15], l'ús de corrent de nitrogen [14,18] o d'un condensador Kuderna-Danish [16,18].

2.2.- Extracció sòlid-líquid

Els fonaments d'aquesta extracció són els mateixos que els comentats anteriorment però, en aquest cas, es té una fase sòlida (fase inicial), a la qual s'addiciona una fase líquida, generalment orgànica, per a extreure'n els compostos d'interès. Tot i que generalment es diu que es produeix un procés extractiu, és millor denominar-lo com a lixiviació, dissolució selectiva, percolació o rentat, depenent de si el compost o compostos que es volen extreure són els d'interès o no [7]. El dissolvent s'ha de difondre dintre del sòlid per aconseguir que els soluts es dissolguin en ell, aconseguint així una fase líquida rica amb els compostos d'interès [23,24].

Aquest procés es pot dur a terme de diferents maneres. Una de les versions més emprades és la soxhlet, desenvolupada pel químic alemany Franz Soxhlet (1848-1913). El seu fonament és el pas continu a través del sòlid d'un dissolvent calent, el qual es va enriquint amb els compostos extrets [25]. Actualment es poden trobar versions més modernes d'aquest sistema, com el Soxtec. Els principals avantatges i desavantatges d'aquesta tècnica són idèntiques a les comentades per l'extracció líquid-líquid però, en aquest cas, sí que és possible l'automatització.

L'extracció sòlid-líquid ha estat utilitzada per analitzar els cloroanisoles en suros, emprant com a agent extractant l'n-pentà [13-15,21,26-30], el metanol [31] una solució hidroalcohòlica [17] amb una posterior extracció líquid-líquid amb

diclorometà [32], l'etanol, també amb extracció posterior amb n-pentà [22] o l'n-hexà [16,33]. També ha estat emprada en l'extracció de cloroanisoles en les partícules de fusta procedents de barrils de roure tot utilitzant metanol com a agent extractant [34].

L'extracció sòlid-líquid es pot realitzar de manera simple mitjançant agitació o amb l'ajuda de l'ultrasons [28]. Cal comentar que, en el cas dels ultrasons, és necessari controlar també la temperatura del bany, ja que el mateix procés causa l'elevació de temperatura del sistema, que pot alterar a l'extracció i afectar als coeficients de distribució.

Tot i que en la majoria de casos es busca extreure el contingut total de cloroanisoles presents en la mostra, en el cas del suro existeixen altres possibilitats com el determinar només els cloroanisoles o TCA fàcilment extraïbles (*releasable TCA*), el qual es defineix com la quantitat de TCA alliberat en una solució a l'equilibri [35]. Aquest concepte es tractarà amb més profunditat en els propers capítols. En aquests casos, l'extracció té lloc utilitzant, majoritàriament, un vi [35,36] o una solució hidroalcohòlica [37].

De la mateixa manera que amb l'extracció líquid-líquid, és necessària una etapa addicional per tal de concentrar els analits extrets. Les principals tècniques de preconcentració utilitzades amb aquest propòsit han estat l'ús d'un corrent de nitrogen [21,32], la destil·lació fraccionada amb una columna Vigreux [13,14] i posterior corrent de nitrogen [14], la concentració amb rotavapor [22,28-30] i posterior corrent de nitrogen [28-30] o l'extracció en fase sòlida [37].

2.3.- Extracció i destil·lació simultànies

L'extracció i destil·lació simultànies (SDE) és una de les tècniques més utilitzades en l'anàlisi d'aromes, descrit per primera vegada per Likens-Nickerson. L'aparell que aquest va dissenyar es fonamenta en mantenir la fase aquosa (mostra líquida o mostra sòlida suspesa en aigua) i la fase orgànica separades en dos matrassos diferents, els quals són escalfats. Els vapors es troben en la part central, de manera que els analits de la mostra, depenent de les seves característiques, passaran a la fase orgànica. Com que els dos dissolvents són immiscibles, un cop es refreden, es separen i retornen al seu matràs respectiu, de manera que té lloc una destil·lació i extracció simultània mentre dura el procés [5,38]. Hi ha hagut diferents modificacions respecte al disseny inicial, com el de Schultz *et al.*, el qual duu a terme el procés a pressions reduïdes o el de Godefroot *et al.* que dissenyaren una

micro-SDE [39]. Els factors que afecten a l'extracció són el dissolvent escollit, la temperatura i la durada del procés [40].

Els principals avantatges de la tècnica són que, amb un petit volum de dissolvent orgànic, serà suficient per extreure quantitats importants de compostos volàtils presenta una excel·lent capacitat d'extracció per molècules de més de cinc àtoms de carboni i requereix un temps d'anàlisi relativament moderat (entre 30 minuts i varies hores). Les desavantatges que es poden nombrar són l'aparició de nous compostos per reaccions d'hidròlisi, reaccions tèrmiques i oxidacions. L'aparició d'artefactes es pot minimitzar treballant a baixes pressions [41,42].

Aquesta tècnica es va utilitzar en les primeres determinacions de cloroanisoles en aliments, l'any 1971, en la determinació de 2,3,4,6-tetracloroanisoles en pollastres [43] i l'any 1974, en ous i pollastres [44]. Pel que fa al món enològic, aquesta tècnica s'ha emprat en la determinació de cloroanisoles en taps de suro [45-48] tot emprant, en la majoria dels cassos, n-pentà [45-47]. Prèviament cal posar la mostra en aigua.

Però no només s'ha utilitzat en la determinació d'aquests compostos en el suro, sinó que també es troba l'aplicació de l'extracció i destil·lació simultànies en la determinació de cloroanisoles en materials d'empaquetament d'aliments [49-52], cafè [53], panses [54] i tribromoanisoles en aliments envasats i el seu embalatge [55]. En aquests exemples els dissolvents utilitzats per a dur a terme el procés són una mescla de n-pentà, èter dietílic i toluè [49-51,54], una mescla de n-pentà i èter dietílic [52,55] o diclorometà [53].

2.4.- Hidrodestil·lació al buit

El fonament de la hidrodestil·lació al buit, tal com diu el seu nom, és bàsicament una destil·lació d'un producte immers en un medi aquós, portada a terme en condicions de buit. Els compostos d'interès són extrets quan l'aigua condensa mitjançant el sistema de refrigeració o mitjançant una sèrie de trampes refrigerades amb nitrogen líquid [40]. Els principals avantatges d'aquesta tècnica és la possibilitat de dur a terme l'extracció sense aplicar altes temperatures i la seva possibilitat d'aïllar compostos tant de baix com d'alt punt d'ebullició. És especialment útil per anàlisis de compostos de productes frescos ja que, en no haver d'escalfar la mostra, es minimitza la formació d'artefactes. Entre els principals desavantatges cal citar que una vegada obtinguda la fase aquosa rica en els compostos d'interès, generalment caldrà una segona extracció per passar aquests compostos a una fase orgànica, la qual cosa allarga el temps d'anàlisi i augmenta el risc de pèrdues d'analits [54,56].

Aquesta tècnica ha estat utilitzada en la identificació d'aromes a humitat i terra en cafès, entre els quals apareix el TCA [57], però no ha tingut aplicacions ni en vins ni en suros fins al moment.

2.5.- Espai de cap

2.5.1.- Espai de cap estàtic

Aquesta tècnica es basa en el fet que quan es diposita una mostra en un recipient sense omplir-lo totalment i es tanca, s'aconsegueix un sistema amb dues fases: una de sòlida o líquida (mostra) i una de gasosa (o espai de cap). Aquest sistema, com qualsevol altre, tendeix a assolir l'equilibri de manera que els compostos més volàtils passaran de la mostra cap a l'espai de cap o *headspace*. Per tant, es podrà procedir a l'anàlisi dels compostos més volàtils de la mostra tot prenent una alíquota d'aquest espai de cap (entre 1-2 ml [58,59]) i injectant-la a un cromatògraf de gasos. Cal dir que com més volum d'espai de cap es pren, més quantitat d'analit A s'obté.

$$A_a = \frac{V_S}{V_T} \cdot A_{HS} \quad \text{Eq. IV. 1}$$

on A_a és la quantitat d'A analitzada, V_S és el volum analitzat, V_T és el volum total de l'espai de cap del recipient i A_{HS} és la quantitat de mostra A en l'espai de cap.

Les principals variables que afecten a l'espai de cap estàtic són la quantitat de mostra inicial, la volatilitat dels compostos a analitzar, la solubilitat d'aquests compostos en la matriu de la mostra, la temperatura del recipient, el temps d'equilibri i el volum de l'espai de cap [58].

Pel que fa als avantatges d'aquesta tècnica cal remarcar que permet la possibilitat d'analitzar compostos volàtils de baix pes molecular sense la presència del pic del solvent, és fàcilment automatizable, és relativament econòmica, la preparativa de la mostra és simple i no cal utilitzar reactius addicionals [58]. Però també presenta una sèrie de desavantatges entre els quals podem destacar que només és aplicable a compostos molt volàtils que presentin una concentració en l'espai de cap superior a 1 ppm. Cal esmentar, també, que la reproductibilitat de la tècnica dependrà de si l'anàlisi té lloc en l'equilibri o no (arribar a l'equilibri pot suposar un temps llarg) [58,59].

L'espai de cap estàtic s'ha utilitzat poc en la determinació d'haloanisoles en vins i suros. Una aplicació d'aquesta tècnica es comentarà en el Capítol 6 d'aquesta Tesi Doctoral.

2.5.2.- Espai de cap dinàmic. Purga i trampa

Tal i com el seu nom indica, en l'espai de cap dinàmic es produeix una transferència de manera continuada dels analits de la mostra a la fase gasosa amb l'ajuda d'un gas portador. L'equilibri entre la fase gasosa i la mostra es restableix constantment, de manera que s'aconsegueix una disminució exponencial dels analits en la mostra. Aquest procés es pot veure afavorit mitjançant agitació de la mostra però, sobretot, amb escalfament de la mateixa.

El gas portador arrossega els compostos que han passat a l'espai de cap a una trampa, on queden retinguts. Aquesta etapa pot involucrar la retenció dels analits per adsorció en un material o per condensació dels mateixos en una trampa criogènica. Finalment es produeix la desorció tèrmica dels analits. D'aquesta manera, el gas portador, ara ric en analits, podrà ser directament dirigit cap al cromatògraf de gasos [58,60,61].

Un dels paràmetres més crítics en aquesta tècnica és l'elecció de la trampa, la qual dependrà de la naturalesa química i estabilitat tèrmica dels analits, de les característiques de sorció i desorció de la trampa, del volum de ruptura de l'analit en la trampa, de la disponibilitat i cost de l'agent criogènic i de la presència de contaminants, inclòs el vapor d'aigua en la mostra [58].

Les trampes més utilitzades en aquesta tècnica són els sorbents sòlids i les trampes criogèniques tot i que molt sovint s'utilitzen de manera conjunta.

- Sorbents sòlids:

Els compostos volàtils arrossegats pel gas portador són atrapats en un material empaquetat porós. Com a regla general, es pot dir que com més alta sigui la capacitat de retenció del material (generalment inversament proporcional al tamany de les molècules retingudes) més temperatura serà necessari aplicar per donar lloc a la desorció dels compostos. Els principals materials emprats són:

- *Materials amb una base de carbó.* Aquest tipus de materials engloba al carbó negre, carbó grafitat (per exemple *Carbotrap*, *Carbopack*), tamisos de carbó molecular (per exemple *Carbosieves*, *Carboxen*, *Ambersorb*) i carbó activat. Tots ells tenen molta afinitat pels compostos orgànics i són molt utilitzats per a mostres gasoses. Aquests adsorbents poden ser escalfats a altes temperatures (400-450°C) sense degradació però també necessiten altes temperatures per a la desorció, donant lloc a possibles processos de degradació dels analits d'interès [58,62,63].

- *Materials inorgànics basats en sílice i alumina.* Els materials basats en sílice són utilitzats per l'extracció de volàtils procedents de mostres líquides i gasoses. Aquests materials són estables a temperatures entre 400-600°C. La selectivitat d'aquests es pot veure modificada mitjançant el recobriment de la seva superfície amb grups orgànics (per exemple, ODS), tot i que la seva estabilitat tèrmica disminueix fins als 100°C. El gel de sílice també té una gran capacitat d'adsorció d'aigua [58,62,63].
- *Adsorbents polimèrics.* Aquest grup engloba diversos tipus de materials formats, bàsicament, per polímers sintètics. Entre els més destacats hi ha el *Tenax* (òxid de poli-2,6-difenil-p-fenilè) i el *Chromosorb*. Aquests adsorbents també tenen grups actius que poden interaccionar amb l'analit. Depenent de les característiques del mateix, aquesta interacció pot ser dèbil (interaccions de van der Waals, per exemple) o molt fortes (interaccions iòniques). Aquestes interaccions condicionaran el procés de desorció [58,62,63].
- **Trampa criogènica:**

En aquest cas es disposa d'una trampa amb perles de vidre, llana de vidre o qualsevol altre element inert, el qual constituirà la superfície de contacte per donar lloc a la condensació dels analits d'interès, mitjançant l'aplicació de fred, generalment amb nitrogen líquid o diòxid de carboni sòlid. Aquest tipus de trampa permet recollir compostos molt volàtils, sense la formació d'artefactes. El principal desavantatge d'aquest tipus de trampa és que qualsevol compost amb punt d'ebullició similar als compostos d'interès serà recollit [58,62].

Cal dir, però, que aquesta tècnica no ha estat massa utilitzada en l'estudi d'haloanisoles en vins o suros. Tot i així es troba alguna aplicació utilitzant una trampa criogènica [64], una trampa amb *Carbopak*, *Carboxen 100* i *Carboxen 1001* [65] o *Tenax* [66]. El principal problema que es troben els investigadors en l'aplicació d'aquesta tècnica a l'anàlisi de vins és la seva baixa sensibilitat, ja que no s'arriba als nivells de concentració d'interès d'aquests compostos ($\text{ng}\cdot\text{l}^{-1}$). És per això que en aquests estudis només s'aconsegueix identificar el TCA [64] i, per tal d'arribar als $50 \text{ ng}\cdot\text{l}^{-1}$ aconseguits en alguns casos, cal l'ús previ d'una extracció líquid-líquid amb pentà. En suros, també és necessària una extracció sòlid-líquid prèvia [65] per arribar a nivells de $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$ o només s'aconsegueix la identificació dels analits [66]. Aquest problema està directament relacionat amb la complexitat de la matriu, ja

que, quan es treballa amb aigua, es troben estudis de determinació de TCA i altres compostos relacionats amb el defecte d'humitat que arriben a nivells de quantificació molt baixos ($3,3 \text{ ng}\cdot\text{l}^{-1}$ en el cas del TCA) [67].

2.6.- Fluids supercrítics

L'extracció amb fluids supercrítics es basa en la utilització d'un fluid d'aquestes característiques per dur a terme la separació dels compostos d'interès, generalment orgànics, de la mostra. Aquesta extracció pot ser portada a terme *off-line* o *on-line* [68].

Un fluid supercrític pur és una substància que es troba per sobre de la seva temperatura i pressió crítica. En aquestes condicions el fluid no es comporta ni com un gas ni com un líquid, sinó que es comporta com una mescla dels dos: té un comportament de gas, ja que és un fluid compressible que omple el recipient que el conté, i té comportament de líquid, ja que té una densitat i una poder de solvació comparables al líquid [69,70]. Els principals avantatges d'un fluid supercrític com a solvent d'extracció són que es pot controlar el poder de solvació del fluid controlant la pressió i la temperatura, que presenta elevats valors de transferència de massa i que té menors viscositats que els líquids, de manera que els seus fluxos poden ser més elevats [69,70].

A l'hora d'escollir el fluid supercrític per portar a terme l'extracció de l'analit s'ha de tenir en compte, bàsicament, dos factors: el solut ha de ser suficientment soluble en el fluid supercrític i s'ha de difondre ràpidament des de l'interior de la matriu per tal de poder-se alliberar [69,70]. Un dels compostos més utilitzats com a fluid supercrític és el CO_2 , ja que presenta una temperatura crítica moderada, és econòmic, no tòxic i no explosiu. Com que la molècula és apolar, és considerat com un solvent no polar. La seva polaritat pot ser modificada mitjançant l'addició de modificadors [69].

Entre els principals desavantatges de la tècnica cal comentar la dificultat d'extreure compostos polars (en ser el CO_2 el solvent més utilitzat). A més les eficàcies obtingudes al comparar les recuperacions en mostres naturals o mostres addicionades són força diferents i la necessitat, a vegades, d'aplicar una etapa prèvia de neteja i les interferències que pot ocasionar l'aigua [69,71].

Aquesta tècnica ha estat utilitzada per Taylor *et al.* [72] en l'extracció de TCA en suros, tot emprant el CO_2 com a dissolvent, amb l'obtenció de bons nivells de repetibilitat i recuperació. El problema, però, es va trobar en la seva aplicació en taps de suro reals, en els quals es van obtenir valors de TCA entre $0,13 - 2,11 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$,

lluny de les concentracions a les que el tap de suro pot estar contaminat i provocar el defecte que aquí es tracta (nivells de $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$).

2.7.- Extracció amb líquid pressuritzat

L'extracció amb líquid pressuritzat (PLE), coneguda també com a extracció accelerada amb dissolvent (ASE), consisteix en la utilització de dissolvents a altes temperatures (generalment entre 100°C i 180°C) i pressions elevades (entre 1500 psi i 2000 psi) amb l'objectiu d'extreure els compostos d'interès procedents de mostres sòlides o semi-sòlides. Aquesta tècnica va aparèixer com a conseqüència de les investigacions dutes a terme amb l'extracció amb fluids supercrítics. Els dissolvents orgànics sotmesos a les condicions descrites es mostren idonis per dur a terme aquestes extraccions de manera ràpida i completa. A elevades temperatures s'augmenta la solubilitat dels analits, al mateix temps que s'incrementa la capacitat de penetració del dissolvent dins de la matriu sòlida gràcies a les pressions altes aplicades, tot disminuint el temps d'extracció, sobretot si es compara amb tècniques tradicionals com el soxhlet [61,73].

Gómez Ariza *et al.* [74] han utilitzat aquesta tècnica d'extracció en la determinació d'haloanisoles en taps de suro, emprant una mescla de pentà: dietil èter (1:1) com a solvent. Tot i obtenir bones recuperacions, els límits de quantificació dels diferents compostos es referencien respecte a la quantitat de solvent, obtenint valors força elevats. Una altra aplicació de l'extracció amb fluids pressuritzats és la de Ezquerro *et al.* [75], en la que s'utilitza pentà com a dissolvent per a l'extracció de TCA i guaicol. Aquesta tècnica la utilitzen per analitzar mostres reals, tot i que no donen dades sobre els límits de detecció i quantificació. L'inconvenient de l'ús d'aquesta tècnica és que, després de l'extracció amb líquid pressuritzat, és necessària una preconcentració de l'extracte obtingut, utilitzant, per exemple, la rotavaporació al buit i posterior concentració amb corrent de nitrogen [74] o, simplement, una evaporació amb corrent de nitrogen [75].

2.8.- Extracció assistida amb microones

Des que el 1946 Percy Spencer va descobrir la utilitat de les ones microones per escalfar, aquesta tècnica no solament s'ha utilitzat amb aquest propòsit sinó també en el procés d'extracció. De fet, entre el 1980 i 1990 apareixen les primeres aplicacions en extraccions de compostos orgànics [76,77] i, ja al 2000, l'EPA adopta aquesta tècnica com a mètode estàndard en l'extracció de compostos volàtils i semivolàtils en mostres sòlides [78].

Les microones són un tipus d'energia electromagnètica compresa entre 300 i 300.000 MHz, tot i que la freqüència més utilitzada és la 2.450 MHz [79]. Les microones escalfen una mostra transformant l'energia electromagnètica en calor a través de conducció iònica i mitjançant rotació del moment dipolar. Es pot dir que com més gran sigui el moment dipolar de la molècula, més intensa serà l'oscil·lació de la mateixa en ser aplicada una radiació per microones [80,81]. Això fa que solvents polars com l'acetona, el metanol i el clorur de metilè s'escalfin ràpidament en ser sotmesos a aquest tipus de radiació, mentre que dissolvents apolars, com l'hexà, el benzè i el toluè no es calentin [78-80]. Això va fer que, inicialment, les extraccions es duguessin a terme solament utilitzant solvents polars. Aquesta limitació ha estat solventada utilitzant agitadors de weflon™ (politetrafluoroetilè/grafit).

Aquesta tècnica ha estat utilitzada per Pizarro *et al.* [82] en l'extracció d'haloanisoles i halofenols en taps de suro, utilitzant el metanol com a solvent d'extracció i tant els valors dels límits de quantificació com de les recuperacions dels compostos estudiats han estat molt bons. El principal inconvenient d'aquest estudi és que, malgrat que l'extracció assistida per microones es pot considerar ràpida (90 minuts) després és necessari preconcentrar l'extracte obtingut, de manera que s'allarga el temps real de la preparació de la mostra per a ser analitzada per cromatografia.

Una altra aplicació més recent és la duta a terme per Vestner *et al.* [83], els quals han utilitzat una extracció assistida per microones a 40°C com a substitució a la clàssica maceració dels taps de suro per a obtenir el TCA extraïble, la qual cosa suposa un estalvi de temps considerable. Després de l'extracció, duen a terme l'extracció i concentració dels analits presents en l'extracte mitjançant la *stir bar sorptive extraction*, de la que ja se'n parlarà més endavant.

2.9.- Desorció tèrmica directa

En un intent de minimitzar el tractament de mostra i l'ús de dissolvents orgànics, alguns investigadors varen tenir la idea de substituir el *liner* convencional del cromatògraf de gasos per un *liner* que contenia la mostra. D'aquesta manera, quan s'augmentava la temperatura de l'injector, es produïa la desorció tèrmica dels analits, els quals entraven directament a la columna cromatogràfica. Des d'aquells primers intents fins ara s'han produït diferents modificacions en el sistema per tal d'optimitzar-ne el rendiment, com la desorció tèrmica de pas curt. Bàsicament aquest tipus de pretractament és un tipus d'espai de cap dinàmic [84-87].

Així és com, mitjançant un model dissenyat per Gerstel, s'han analitzat fenols halogenats, clorofenols i anisoles en suros [88,89]. En aquest cas, la mostra és introduïda dintre un tub de vidre buit i es diposita en la cambra del sistema de desorció tèrmica. Una vegada l'aire present en el sistema ha estat eliminat, el tub es calenta a la temperatura adequada, al mateix temps que el gas transportador passa a través de la cambra i arrossega els compostos volàtils cap al sistema d'injecció en fred (CIS), on són refredats i concentrats. Una vegada la desorció ha acabat, el sistema CIS es calenta a la temperatura triada per tal de permetre la introducció dels compostos atrapats a la columna analítica del sistema cromatogràfic [88]. El principal avantatge del sistema és el poc tractament de la mostra i el temps curt de l'anàlisi (una hora). El problema d'aquest estudi, però, és que només es parla d'àrea cromatogràfica obtinguda per mg de mostra, de manera que es fa molt difícil avaluar els resultats obtinguts de manera objectiva.

2.10.- Pervaporació i preevaporació

La pervaporació és una tècnica de separació de membrana, grup al que pertanyen també la desalinització, l'osmosi, l'osmosi inversa o la electrodiàlisi. L'ús de les membranes comporta avantatges, ja que es pot dur a terme l'extracció, la concentració i la neteja a la vegada. També permet l'extracció sense mesclar les dues fases, evitant problemes com la formació d'emulsions o l'ús d'una gran quantitat de dissolvent. A més, com que la mostra i l'extractant poden estar contínuament en contacte, té lloc un procés continu a temps real, que permet la seva automatització i la connexió a altres instruments (per exemple, un cromatògraf de gasos) [90].

La pervaporació és un procés en el qual una mescla líquida pot ser separada a partir de la vaporització parcial a través de membranes selectives permeables no poroses. En aquest procés la mostra circula en contacte amb la cara activa no porosa de la membrana, mentre que en l'altre cara de la membrana s'aplica el buit (pervaporació al buit) o un gas d'escombrat (pervaporació d'escombrat). D'aquesta manera els components permeables són desorbitats de la membrana en forma de vapor, els quals podran ser recollits o conduïts cap a on es desitgi.

La separació no es basa en les volatilitats relatives, com passa en un procés tèrmic, sinó en les proporcions relatives de permeabilitat a través de la membra, és a dir, el mecanisme de la separació és el potencial químic existent entre les dues membranes. La membrana facilita el contacte de les dues fases sense que es produeixi una mescla directa. És una combinació entre una evaporació i una

difusió de gas en un únic mòdul. El compost permeable és transportat a través de la membrana perquè la seva pressió de vapor parcial en la cara permeable de la membrana és més baixa que no pas en el vapor saturat. La separació de mesclures s'aconseguirà perquè la membrana transporta uns components més ràpidament que els altres. Es poden utilitzar diferents tipus de membranes: hidrofíliques, hidròfobes i organofíliques. Aquesta tècnica presenta com a avantatge la integració de diferents etapes del procés analític. L'absència, en gran mesura, d'equips comercials és, però, un gran desavantatge [90-93].

La pervaporació és una modificació de la pervaporació. En la pervaporació, el gas difon a través de la membrana donant lloc a un transport selectiu dels analits cap a l'instrument. En el cas de la pervaporació, el analits són transportats per un gas inert a través d'una vàlvula de injecció a alta pressió a una membrana higroscòpica on la matriu (principalment aigua) és eliminada i un posterior transport cap a un injector, per passar finalment a l'instrument analític [94,95]. Les membranes de pervaporació permeten el pas de substàncies orgàniques amb punts d'ebullició baix o moderat amb un mínim transport d'aigua [96].

Aquesta darrera tècnica ha estat aplicada en la determinació d'haloanisoles (2,6-DCA, TCA i TBA) en vins, acoblada a un cromatògraf de gasos amb detector de masses, ja sigui de manera directa [94], amb un espai de cap dinàmic [95], una trampa criogènica en fase sòlida [97,98] o amb un *liner* empaquetat *Carbofrit* [98]. Aquesta tècnica en les diferents modalitats assoleix límits de quantificació pel TCA entre 5–18 ng·l⁻¹, valors una mica elevats tenint en compte els llindars de percepció d'aquest compost.

2.11.- Extracció en fase sòlida

L'extracció en fase sòlida (SPE) és una tècnica preparativa molt utilitzada que es fonamenta en el pas de la mostra o un extracte de la mostra present en una fase mòbil (gas, fluid o líquid) per una fase estacionària (anomenada sorbent), en la qual quedaran retinguts els components de la mostra afins a aquesta, produint-se una distribució entre la fase líquida i la fase sòlida. En alguns casos, el que queda retingut són els analits d'interès però, en d'altres, són els compostos interferents els retinguts de manera que es produeix un *clean-up*. En el primer cas, la recuperació dels analits es duu a terme per elució mitjançant la utilització d'un líquid o un fluid, o mitjançant una desorció tèrmica [99-101]. Els mecanismes d'interacció que s'esdevenen entre els analits i el sorbent són pràcticament idèntics als que tenen lloc en la cromatografia líquida [100].

La SPE es presenta com una alternativa de l'extracció líquid-líquid, ja que solventa alguns dels principals inconvenients d'aquesta tècnica, com és la utilització de grans quantitats de solvent, temps llargs d'anàlisi, dificultat d'automatització, dificultats d'obtenció de bons rendiments i, generalment, poca repetitivitat [100-102]. Tot i així, la SPE també presenta una sèrie d'inconvenients, entre els que es poden destacar que les propietats d'extracció dels sorbents no són tan reproduïbles com les fases líquides, sovint es poden produir mecanismes de retenció mixtos causant interferències amb la recuperació, les fases sòlides solen tenir més impureses que una fase líquida, els casos de sobrecàrrega són més habituals en aquest tipus d'extracció que en la extracció líquid-líquid i, sovint, és necessari una etapa extra de preconcentració [99].

L'elecció de la fase estacionària per la SPE vindrà condicionada per diferents consideracions físico-químiques com són els grups funcionals dels analits, les interaccions secundàries analit-adsorbent, les interaccions adsorbent-components de la matriu i les interaccions matriu-analits de la mostra [101]. Tenint en compte aquestes consideracions es podrà decidir quin és el tipus de sorbent més adequat (polar, no polar o iònic) i també el format més adequat (cartutx, disc, etc.) [99-102].

Tot i ser una de les tècniques preparatives més utilitzades en l'anàlisi química, són poques les aplicacions que es poden trobar per la determinació d'haloanisoles. Així, en el treball de Soleas *et al.* [103], s'utilitza un cartutx de C₁₈ per l'extracció de TCA i TCP de vins i extractes hidroetanòlics de suro. L'inconvenient d'aquest treball és que la validació del mètode es realitza a nivells de concentració de µg·l⁻¹ però la posterior quantificació es duu a terme a nivells de ng·l⁻¹.

Una altra aplicació de la SPE es troba en el treball d'Insa *et al.* [104] on s'utilitza un cartutx amb un adsorbent polimèric de poliestirè-divinilbenzè (*Lichrolut En*), el qual té una elevada àrea superficial específica i una gran capacitat de retenció. Amb la utilització d'aquest adsorbent, els autors aconseguiren separar el TCA i el TBA en vins, arribant a recuperacions molt acceptables (superiors al 80%) i amb un límit de detecció suficientment baix, tot i que no es comenta en quin tipus de vi es van determinar aquests paràmetres. En aquest treball, no es concentra l'extracte obtingut sinó que s'injecta un gran volum d'extracte al cromatògraf de gasos.

Per altra banda, Martínez *et al.* [105] proposen l'ús dels cartutxos Oasis HLB de 200 mg per a dur l'extracció de tres cloroanisoles (TCA, TeCA i PCA) i tres clorofenols (TCP, TeCP i PCP) en vins negres. Cal dir, però, que per poder quantificar cromatogràficament els clorofenols, van haver de derivatitzar-los. A més, per tal d'aconseguir nivells de quantificació adequats, els autors treballen amb volums

grans tot utilitzant l'injector PTV (*programmed temperature vaporization*) i un detector MS/MS. D'aquesta manera arriben a situar els límits de quantificació entre 0,3-2,4 ng·l⁻¹ per als cloroanisoles i 0,2-0,5 ng·l⁻¹ per als clorofenols. El principal inconvenient és l'efecte matriu trobat, el qual es solventa amb el mètode d'addicions estàndard.

Una variant de l'SPE és l'anomenada microextracció en xeringa empaquetada (*microextraction in packed syringe -MEPS-*), que consisteix en una xeringa que porta incorporat un sorbent en un petit cartutx, lloc on es produirà l'extracció. Jönsson *et al.* [106] han aplicat aquesta tècnica, utilitzant un sorbent C18, per extreure TCA i TBA en diferents mostres de vi, arribant en alguns casos a límits de detecció de fins a 0,22-0,75 ng·l⁻¹ pel TCA i TBA.

2.12. Microextracció en fase sòlida

La microextracció en fase sòlida (SPME), essent com és la tècnica analítica d'aquesta tesi doctoral, es comentarà amb més detall.

2.12.1.- Introducció

La microextracció en fase sòlida (SPME) és una tècnica de preparació de mostra desenvolupada per Pawliszyn i els seus col·laboradors a començaments dels anys 90. Aquesta utilitza una fibra de sílice fosa, de molt petites dimensions, recoberta amb una fase estacionària que és la responsable de l'extracció i concentració dels analits d'interès [107-110].

El principal avantatge d'aquesta tècnica és que els processos d'extracció i concentració tenen lloc de manera simultània, la qual cosa suposa un gran estalvi de temps en l'anàlisi de qualsevol producte. A més, aquesta tècnica no requereix la utilització de solvents orgànics, fet de gran importància des del punt de vista del medi ambient. Cal ressaltar que també es pot aplicar tant a mostres sòlides com líquides o gasoses [108,111]. I tot això es pot fer de manera senzilla, doncs no cal la utilització d'aparells ni materials sofisticats. Només es fa necessari l'ús d'un dispositiu especial que consisteix en una mena de xeringa modificada o *holder* [107-110]. A més, la possibilitat d'automatització la fan encara més interessant [112]. El seu disseny petit i compacte la converteix en una tècnica molt adequada per treballs de camp, on el disseny habitual té certes modificacions per a protegir millor la fibra [113].

Alguns autors presenten com a un gran desavantatge de la tècnica la falta de sensibilitat, causada, bàsicament, per la baixa capacitat que tenen les fases estacionàries més usuals així com la petita quantitat en que està present en una

fibra [63]. Tot i així, tal com es veurà més endavant, amb aquesta tècnica es poden assolir límits de detecció molt baixos ($\text{ng}\cdot\text{l}^{-1}$).

2.12.2.- Variants de la tècnica

Bàsicament existeixen tres variants d'aquesta tècnica: extracció en l'espai de cap (*headspace*), extracció directa i extracció amb protecció de membrana [114]. En la primera, que és la que s'utilitza de manera més freqüent, la fibra s'exposa al *headspace* de la mostra (HS-SPME) i, en la segona, la fibra es submergeix a l'interior de la mostra líquida (DI-SPME). D'aquesta manera, l'extracció tindrà lloc en la fase gasosa o bé en la líquida. S'utilitzarà una modalitat o l'altra depenent del tipus de mostra i del tipus d'analit o analits que es vulguin analitzar. La HS-SPME s'emprarà en mostres complexes i analits volàtils mentre que la DI-SPME s'utilitzarà en mostres més netes i en analits poc volàtils [108]. L'extracció amb protecció de membrana no ha estat gaire utilitzada. En aquesta, la fibra està separada de la mostra per una membrana que permet el pas dels analits, però evita la transferència d'elements no desitjats. La seva utilització serà adequada per mostres molt brutes, amb elements que puguin malmetre el recobriment [115]. Cal comentar que en el cas de la determinació d'haloanisoles en vins i suros la tècnica utilitzada, pràcticament de manera exclusiva, ha estat l'HS-SPME.

El procediment que es segueix en la utilització de la microextracció en fase sòlida, en les dues variants més àmpliament utilitzades, es mostra a la Figura IV. 1.

El primer pas de la microextracció en fase sòlida consisteix en introduir la mostra en un vial hermèticament tancat mitjançant un *septum*. Aquest vial es manté a una temperatura determinada, per tal d'afavorir l'extracció. Després de condicionar i/o netejar la fibra, aquesta s'introdueix en el vial tot travessant el *septum* amb l'agulla. Després, prement l'èmbol del *holder*, es desembeina la fibra de l'interior de l'agulla i aquesta queda exposada a la mostra. A partir d'aquest instant la fibra comença a retenir sobre la seva fase estacionària els diferents analits de la mostra, ja sigui per un procés d'absorció o d'adsorció, depenent de si la fase estacionària utilitzada és un líquid o un sòlid. Un cop ha finalitzat el procés de mostreig, es torna a amagar la fibra a l'interior de l'agulla que la protegeix.

La manera com té lloc la transferència al cromatògraf dels diferents analits retinguts sobre la fibra, dependrà bàsicament de si es tracta de cromatografia de gasos o cromatografia líquida d'alta resolució. En el cas de la cromatografia de gasos, una vegada s'ha donat per acabada l'extracció i la fibra ja és a l'interior de l'agulla, aquesta és retirada del vial que la conté i, seguint el mateix procés que amb la mostra, es forada el *septum* de l'injector del GC de manera que, en baixar

l'èmbol, la fibra quedi exposada a una elevada temperatura (200-300°C), la qual cosa provoca la desorció instantània dels analits a l'interior de l'injector des d'on entren directament a la columna cromatogràfica per ser analitzats. Aquestes elevades temperatures utilitzades per a provocar la desorció dels analits, són les mateixes que s'utilitzaran per condicionar la fibra pel seu primer ús, o per netejar la mateixa quan ja ha estat utilitzada.

En el cas de treballar amb cromatografia líquida, el procediment és exactament el mateix, però el condicionament i neteja de la fibra, així com la desorció dels analits es realitza aprofitant la força eluotròpica d'un dissolvent, el qual es tria en base als analits i la fase estacionària utilitzats. Per facilitar aquestes tasques, existeix al mercat un dispositiu, constituït bàsicament per una vàlvula de sis vies, que s'acobla a l'injector de l'HPLC (Figura IV.1) [114].

Una altra variant de la microextracció en fase sòlida és l'anomenada *in-tube SPME*, en la qual l'extracció té lloc a dins d'una columna capil·lar o una micro-columna de cromatografia de gasos. Aquesta tècnica s'utilitza bàsicament en línia amb la cromatografia líquida d'alta resolució (HPLC). En aquesta s'utilitza l'automostrejador per a connectar el capil·lar, en el qual es realitzarà la preconcentració i extracció [114,116,117].

En l'*in-tube SPME* existeixen dues variants d'extracció: l'activa o dinàmica i l'estàtica. En l'activa o dinàmica els analits passen a través del tub, mentre que en l'estàtica els analits són transferits al sorbent mitjançant un procés de difusió [114,116,117].

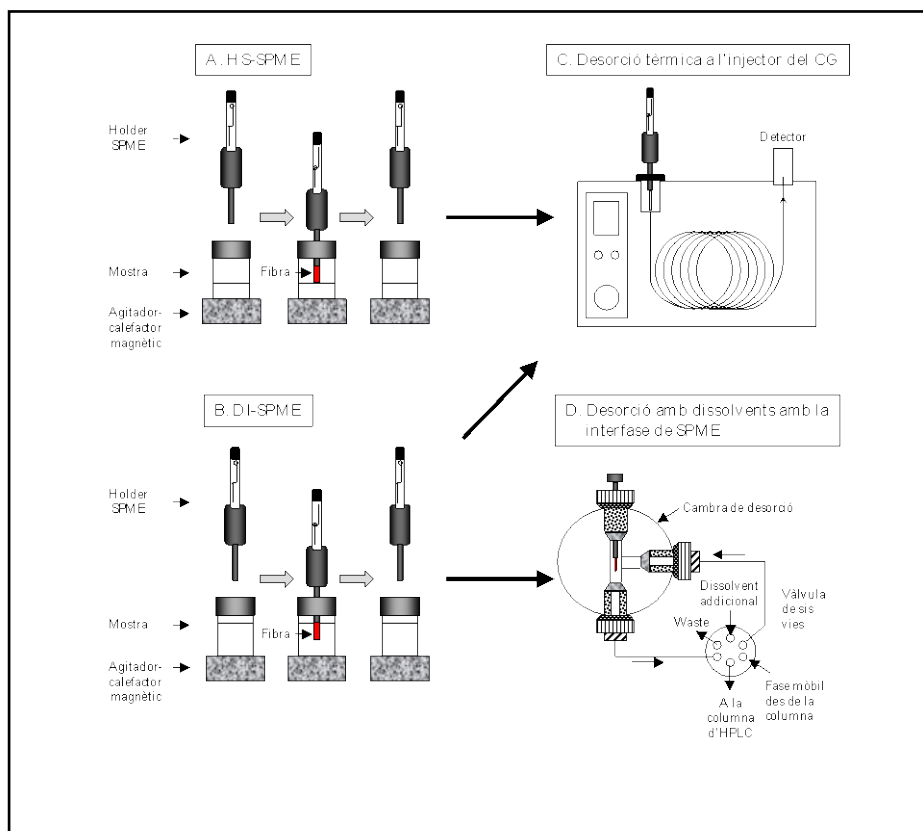


Figura IV.1. Procés seguit per dur a terme la microextracció en fase sòlida A) d'una mostra gasosa (HS-SPME) o B) d'una mostra líquida (DI-SPME), amb la posterior desorció utilitzant C) la cromatografia de gasos o D) la cromatografia líquida

2.12.3.- Fonament de la tècnica

La microextracció en fase sòlida es basa en el principi de partició dels analits entre la matriu i la fibra que actua com a fase estacionària. S'ha de complir que la massa de l'analit al llarg de tot el procés s'ha de mantenir constant [107,108,118-124]:

$$C_o \cdot V_m = C_f^{eq} \cdot V_f + C_m^{eq} \cdot V_m \quad \text{Eq. IV.2}$$

on C_o és la concentració inicial de l'analit a la matriu; C_f^{eq} i C_m^{eq} són les concentracions d'analit a la fibra i a la matriu quan s'arriba a l'equilibri; V_m i V_f són els volums de la mostra i la fibra respectivament.

Es defineix la constant de distribució entre la fibra i la matriu com:

$$K_{fm} = \frac{C_f^{eq}}{C_m^{eq}} \quad \text{Eq. IV.3}$$

Així doncs queda patent que un dels paràmetres de més importància a l'hora de dur a terme la microextracció en fase sòlida serà l'elecció de la fibra, de manera que la constant de distribució K_{fm} sigui el més gran possible, la qual cosa indicarà que la fibra té un efecte de concentració elevat i, per tant, s'obtindrà millor sensibilitat.

En el cas de la microextracció aplicada a l'espai de cap (HS-SPME), cal introduir un nou equilibri ja que, a més del que s'estableix entre la fibra i el *headspace* (K_{fh}), existeix l'equilibri entre la fase líquida i la gasosa, el qual ve determinat per una altra constant K_{hm} , que ve definida com:

$$K_{hm} = \frac{C_h^{eq}}{C_m^{eq}} \quad \text{Eq. IV.4}$$

Per tant doncs, s'ha d'introduir un nou terme a l'equació IV.2, que queda:

$$C_0 \cdot V_m = C_f^{eq} \cdot V_f + C_h^{eq} \cdot V_h + C_m^{eq} \cdot V_m \quad \text{Eq. IV.5}$$

Per a la majoria d'analits, la constant de distribució K_{hm} és relativament petita ($<0,25$) [108,110,125], de manera que l'aplicació de la tècnica al *headspace* no afectarà a la quantitat d'analit extreta per la fase estacionària sempre i quan el volum del *headspace* sigui molt més petit que el de la solució aquosa ($V_h \ll V_m$). Per tant, en general, els límits de detecció obtinguts amb l'HS-SPME i la DI-SPME han de ser força similars [110-118]. La pèrdua de sensibilitat és important només quan la k_{hm} és gran i/o quan s'utilitza un gran volum d'espai de cap.

Pel que fa a la velocitat de l'extracció, aquesta ve controlada pel transport de massa des de la matriu cap a l'interior de la fibra (procés que implica un transport convectiu dels analits des de la mostra cap a la fibra) i una difusió dels analits en la seva fase estacionària (la qual es pot dur en menys d'un minut per a la majoria dels compostos, ja que la fase estacionària sol tenir uns gruixos compresos entre 10 i 100 μm). En el cas de la microextracció en fase sòlida de l'espai de cap s'ha de considerar, a més, el transport dels analits des de la matriu fins al *headspace*, el qual es pot accelerar tot generant, contínuament, una superfície nova mitjançant agitació de la mostra líquida o amb temperatura [107,108,118-122].

2.12.4.- Tipus de fibres

La quantitat d'analit extreta en la microextracció dependrà del tipus de recobriment de la fibra de sílice fosa que s'utilitzi. En la Figura IV. 2 es mostren els diferents tipus de recobriments comercialitzats així com la seva polaritat i gruix.

L'afinitat que té la fase estacionària de la fibra per un analit ve regit pel principi "like dissolves like". Per això la fibra apolar de polidimetilsiloxà (PDMS) és la més utilitzada en el cas que es vulguin extreure analits apolars, tot i que també es pot aplicar de manera satisfactòria a l'anàlisi de compostos amb una certa polaritat, sempre i quan s'hagin optimitzat adequadament les condicions d'extracció. De la mateixa manera, i seguint el mateix principi, la fibra de poliacrilat (PA) -que és polar-, dona molt bons resultats per a l'extracció dels analits més polars, sobretot alcohols i fenols [123]. A part d'aquestes fibres n'existeixen algunes de mesclades que contenen divinilbenzè (DVB) o carbó porós activat (Carboxen, CAR), les quals incrementen la capacitat de retenció degut a la potenciació mútua de l'efecte d'adsorció i distribució a la fase estacionària. Les fases estacionàries constituïdes per la mescla PDMS/DVB, CAR/DVB o Carbowax (CW)/DVB poden utilitzar-se per a l'extracció de volàtils amb una massa molecular petita i analits polars. Pel que fa a la mescla CAR/PDMS, aquesta mostra millor eficàcia en l'extracció que la de PDMS de 100 μm i d'altres similars, però la repetibilitat sol ser inferior i el temps d'equilibri és més llarg [124-127].

També s'ha de considerar el gruix de la fase estacionària. En general, els compostos volàtils requereixen recobriments gruixuts, mentre que les capes primes són efectives per als compostos semivolàtils. Els recobriments més gruixuts requereixen un temps d'equilibri més llarg, però també aporten molta més sensibilitat, doncs tenen la capacitat d'extreure una quantitat més gran d'analit o analits [126-132].

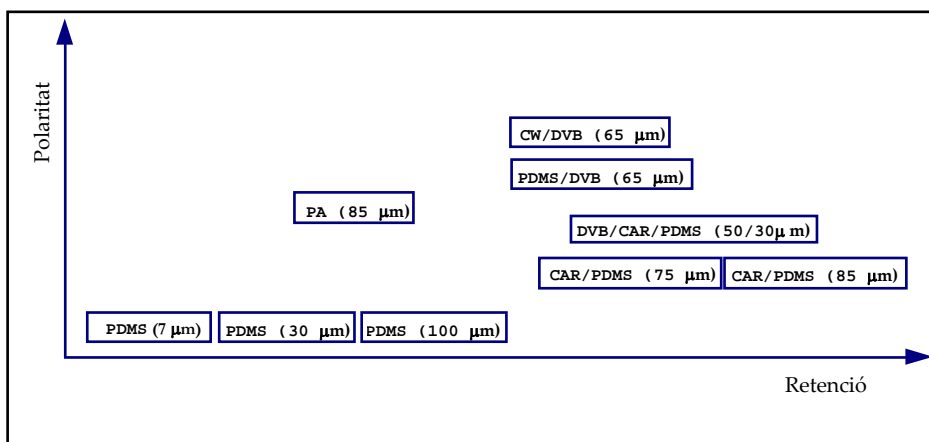


Figura IV. 2. Propietats de les fases estacionàries utilitzades en la SPME: PDMS: polidimetilsiloxà, PA: poliacrilat, DVB: divinilbenzè, CW: Carbowax, CAR: Carboxen

La recerca de nous recobriments per tal de millorar l'extracció i donar solucions als nous problemes actuals es presenta molt interessant. Una dels recobriments més nous són els anomenats *sol-gel*. Mitjançant aquest tipus de preparació s'obtenen recobriments que es caracteritzen per presentar una adhesió més forta sobre la fibra de sílica fosa, de manera que s'incrementa l'estabilitat química i el temps de vida [133].

Les innovacions en les fibres no només s'esdevenen en el recobriment, sinó que també s'optimitza l'interior de la fibra, amb l'objectiu d'augmentar la robustesa. Així, en el temps s'ha passat de les de sílice fosa, a les *stableflex*, fins a arribar a les metàl·liques, molt més elàstiques, les quals tenen un temps de vida més llarg i són més reproduïbles [134,135]. Amb l'entrada de nous recobriments també serà necessari el desenvolupament de nous suports (base interior) on sustentar-los [133].

2.12.5.- Variables experimentals

La termodinàmica dels diferents equilibris que tenen lloc durant el procés de microextracció ve condicionada per una sèrie de variables com són la temperatura, el pH, el volum de mostra, la força iònica i el temps d'extracció. Tots aquests paràmetres hauran de ser optimitzats en cada cas per tal d'obtenir uns resultats adequats en l'aplicació de la tècnica.

La temperatura és un paràmetre que afecta tant a la sensibilitat com a la cinètica de l'extracció [136]. Cal no oblidar que els coeficients de partició són dependents de la temperatura, per la qual cosa caldrà buscar el valor òptim d'aquesta variable per obtenir bons resultats. En el cas de l'HS-SPME, aquest paràmetre provoca dos efectes contraposats ja que, a mesura que la temperatura augmenta, més compostos de la matriu líquida passen cap al *headspace* però, per altra banda, a temperatures elevades els coeficients de partició entre la fibra i la fase gasosa disminueixen ja que el procés d'extracció de la fibra és exotèrmic [137-139]. Per resoldre aquest problema, Zhang i col·laboradors [129] van dissenyar un dispositiu força complex però eficaç, ja que permet refredar la fase estacionària mentre es calenta la mostra simultàniament. Aquest consisteix en un refrigerant intern de la fibra a base de CO₂ líquid. Aquest disseny permet una acumulació més gran d'analits a la fase estacionària, però redueix la seva selectivitat.

L'addició de sals a la mostra pot millorar l'extracció de l'analit depenent de la seva naturalesa i de la quantitat de sal afegida. En general, la sobresaturació és molt efectiva per extreure compostos apolars quan es treballa amb HS-SPME ja que en la modalitat DI-SPME la sal pot dipositar-se en la fibra, la qual cosa pot provocar el seu deteriorament [108,138,140-142]. El valor del pH té un efecte molt important

sobre els equilibris de dissociació en la fase aquosa [130,141,143]. Canvis d'aquest paràmetre poden millorar la sensibilitat de la SPME per analits amb cert caràcter àcid o bàsic. A la pràctica, i sobretot quan es treballa amb DI-SPME, resulta complicat realitzar canvis de pH massa bruscos ja que pH extrems poden malmetre la fase estacionària. El rang usual de pH varia entre els valors de 2 i 10, tot i que en casos concrets es pot sortir d'aquest rang [144]. En general, quan a la mostra hi ha àcids o bases, es sol treballar amb dissolucions amortidores per assegurar una bona reproductibilitat de les anàlisis.

Un altre punt crític és el volum de mostra utilitzat. Aquest ha de ser escollit en base a la constant de distribució K_{fm} ja que la sensibilitat es veu afectada pel volum de mostra, si la constant de distribució de l'analit és molt gran. En el cas de treballar amb valors de K_{fm} elevats, es fa necessari l'ús de volums de mostra també elevats. A més, per augmentar la sensibilitat quan es treballa amb el *headspace*, cal minimitzar el volum de la fase gasosa ja que, així, els compostos volàtils s'acumulen a l'espai de cap [145-147].

Deixant a banda les variables que afavoreixen l'extracció, i tenint en compte que la durada d'una anàlisi és un factor molt important a l'hora de determinar-ne la seva viabilitat, cal considerar també el temps d'extracció. Aquest ve determinat, principalment, per la velocitat de l'agitació i pel coeficient de partició entre la fibra i la mostra. Tot i que l'SPME proporciona una màxima sensibilitat quan s'assoleix l'equilibri, no sempre és necessari arribar a aquest estat per obtenir una anàlisi precisa i acurada, sempre i quan es treballi en unes condicions reproduïbles [131-141,148,149].

L'agitació és un paràmetre que no afecta directament en l'extracció, però redueix el temps per arribar a l'equilibri, doncs facilita que els diferents analits puguin passar de la mostra a la fibra [145-147,149]. Quan es tenen mostres sòlides es fa molt difícil l'aplicació d'aquesta variable [150].

Pel que fa a la manera de treballar amb la microextracció en fase sòlida, si es disposa de mostres suficientment netes com són moltes mostres mediambientals, es podrà intentar treballar amb la tècnica del patró extern, però amb mostres més complexes, com el vi o el suro, aquesta tècnica deixa de ser vàlida. Això es deu a que aquestes mostres presenten un accentuat efecte matriu, el qual afecta a les constants de distribució de manera que es fa necessari l'ús d'altres tècniques, com poden ser la de les addicions estàndard i/o la del patró intern [108,128,151-153]. Així per exemple, en el cas dels vins, caldrà tenir especial atenció al seu contingut

etanòlic ja que aquesta constitueix una interferència molt important en el procés d'extracció dels analits [154-157].

Un altre camí existent per tal de resoldre l'efecte de la matriu és l'aplicació de la microextracció en fase sòlida de l'espai de cap múltiple (MHS-SPME). El fonament de la tècnica es basa en l'extracció exhaustiva mitjançant l'aplicació de successives extraccions, fins a recuperar la totalitat de l'analit. La concentració de l'analit d'interès disminueix exponencialment. En aquest cas es pot considerar que l'àrea total és la suma de les àrees de cadascuna de les extraccions (tres o quatre). Per tal de que es pugui aplicar aquest procés cal que la relació entre l'àrea del pic i la quantitat d'analit en la fibra sigui lineal al llarg de l'interval estudiat, que les constants de distribució fibra-mostra i el volum de les fases es mantinguin constants i que s'estableixi un equilibri total de l'analit en les tres fases per a cadascuna de les extraccions individuals [158].

En aquest cas, l'àrea total (A_T) es calcula amb la següent equació matemàtica [159-162]

$$A_T = \frac{A_1}{1-\beta} \quad \text{Eq IV.6}$$

on A_1 és l'àrea del pic de la primera extracció i β és determinada a partir de la regressió lineal dels logaritmes neperians de les àrees dels pics individuals:

$$\ln A_i = (i - 1) \cdot \ln \beta + \ln A_1 \quad \text{Eq IV.7}$$

on A_i és l'àrea del pic obtinguda en la i extracció. Quan l'extracció és exhaustiva els càlculs es simplifiquen força ja que l'àrea total pot ser directament calculada com la suma de les àrees de cadascuna de les extraccions que han tingut lloc [160].

En general, la precisió que s'obté amb la tècnica de l'SPME és molt bona ja que és el que es defineix com un "*single-step method*" i, per tant, les fonts d'error associades a la transferència d'analits queden minimitzades. Això és el que demostren els valors de desviació estàndard relativa d'aproximadament un 5%, obtinguts en mostres mediambientals quan s'opera manualment, els quals poden arribar a valors tan baixos com l'1% quan s'utilitza un injector automàtic de SPME [108,130].

2.12.6.- Aplicacions de la microextracció en fase sòlida en la determinació d'haloanisoles en vins i taps de suro

Tenint en compte el gran nombre d'avantatges respecte el de desavantatges que presenta aquesta tècnica, s'han desenvolupat diferents propostes en relació a la determinació d'haloanisoles en vins i taps de suro (Taula IV.2). En aquests estudis es proposen diferents vies per tal de resoldre els nombrosos problemes que hom troba en la determinació d'aquests compostos en aquests productes, com el

problema dels baixos nivells de concentració que s'han d'analitzar o l'efecte de la matriu en l'extracció.

Taula IV.2. Aplicacions de l'SPME en la determinació d'haloanisoles en vins i taps de suro. S'indica la fibra que cada autor ha considerat com a òptim i també s'especifica si, amb el mètode presentat, es determinen altres compostos relacionats amb l'olor a humitat (LOQ=límit de quantificació)

Ref.	Recobrint	Matriu	Compostos	LOQ	Detector GC
[163, 164]	PDMS 100 µm	Vi	TCA	5 ng/l	MS
[165]	PDMS 100 µm	Vi i suro	TCA	2,9 ng/l TCA en vi	MS
[166]	PDMS 100 µm	Vi	TCA, 2,3,4,6-TeCA i PCA	2 ng/l per a tots	ECD
[167]	No especificada	Suro (extraïble)	TCA, TeCA i PCA	1 ng/l TCA	MSMS
[168]	PDMS 100 µm	Vi	TCA	5 ng/l TCA vi blanc 8 ng/l TCA vi negre	ECD
[169]	PDMS 100 µm	Vi	TCA	2,9 – 18,0 ng/l	ECD
[170]	Carboxen-PDMS 75 µm	Suro (total)	2,6-DCA, TCA i 24-DCA	No especificat	ITMS
[171]	DVB/CAR/PDMS 50/30 µm	Vi	TCA, 2,3,4,6-TeCA i PCA	8,4 ng/l TCA, 6,2 ng/l 2,3,4,6-TeCA i 4,3 ng/l PCA	ECD
[172]	PDMS 100 µm	Vi	TCA i TeCA	0,4 ng/l TCA, 0,3 ng/l TeCA	MS
[173]	DVB/CAR/PDMS 50/30 µm	Suro (extraïble)	TCA	No especificat	MS i ECD
[160]	DVB/CAR/PDMS 50/30 µm	Suro (total)	2,4,6-TCA, 2,3,4,5-TeCA (guaiacol, 1-octen-3-ol, 1-octen-3-ona) 3-cloroanisole,	Especifiquen els LOD: 0,3 ng/g TCA (1,7 ng/g 1-octen-3-ona, 1,9 ng/g 1-octen-3-ol, 7,5 ng/g guaiacol)	MS
[174]	DVB/CAR/PDMS 50/30 µm	Aigües de rentat de suro	TCA, 2,6-DCA, 2,4,6-TBA, PCA (TCP, TeCP i TBP)	No especificats	MS
[161]	DVB/CAR/PDMS 50/30 µm	Vi	TCA, 2,3,4,6-TeCA, PCA (TCP, TeCP i PCP)	0,035 ng TCA, 0,020 ng TeCA i 0,055 ng PCA (0,015 ng TCP, 0,046 ng 2,3,4,6-TeCP i 0,258 ng PCP)	MS/MS
[175]	PDMS 100 µm	Vi	TCA	No especificat	ECD
[176]	DVB/CAR/PDMS	Suro	2,6-DCA,	8,6 ng/g 2,6-DCA, 0,8	ECD

Ref.	Recobriment	Matriu	Compostos	LOQ	Detector GC
[177]	50/30 µm	(total)	TCA, 2,4-DCA, TeCA i PCA	ng/g TCA, 3,5 ng/g 2,4-DCA, 0,6 ng/g TeCA i 0,8 ng/g PCA GC-NCI-MS: 0,3 ng/l	
[178]	PDMS 100 µm	vi	TCA i TBA	TCA i 0,2 ng/l TBA GC-HRMS: 0,03 ng/l TCA i 0,03 ng/l TBA	NCI-MS i HRMS
[98]	DVB/CAR/PDMS 50/30 µm	Vi	2,6-DCA, TCA i TBA	12 ng/l 2,6-DCA, 7 ng/l TCA i 15 ng/l TBA	MS/MS
[162]	DVB/CAR/PDMS 50/30 µm	Vi	TCA, TeCA, PCA i TBA	30 ng/l TCA, 70 ng/l TeCA, 230 ng/l PCA i 30 ng/l TBA	MS/MS
[179]	DVB/CAR/PDMS 50/30 µm	Suro (total)	2,6-DCA, 2,4-DCA, TCA i PCA	HS-SPME: 6,0 ng/g 2,6-DCA, 5,2 ng/g 2,4-DCA, 3,9 ng/g TCA i 5,3 ng/g PCA CF-HS-SPME: 0,94 ng/g 2,6-DCA, 0,83 ng/g 2,4-DCA, 0,84 ng/g TCA i 1,62 ng/g PCA	TOF-MS
[180]	DVB/CAR/PDMS 50/30 µm	Vi	TCA	HS-SPME-GC-ECD: 1,0 ng/l TCA HS-SPME-GC-MS: 0,8 ng/l	ECD i MS
[181]	DVB/CAR/PDMS 50/30 µm	Vi	TCA, TeCA, PCA, TBA (1-octen-3-ol, geosmina, 2-MIB, IBMP)	0,5 ng/l TCA, 0,1 ng/l TeCA, 0,5 ng/l PCA i 0,2 ng/l TBA	MS
[182]	PA 85 µm	Vi	TCA, TBA, TeCA, PCA, TCP, TBP, TeCP i PCP	1,3 ng/l TCA, 1,1 ng/l TeCA, 1,3 ng/l PCA i 1,7 ng/l TBA (11,0 ng/l TCP, 8,5 ng/l TeCP, 12,3 ng/l PCP i 12,7 ng/l TBP)	ECD
[183]	PDMS 100 µm	Vi i extractes líquids de taps	TCA	0,994 ng/l TCA (vi) 0,478 ng/l (vi sintètic)	ECD
[184]	DVB/CAR/PDMS 50/30 µm	Vi	TCA, 2,3,4,6-TeCA, PCA (TCP, TeCP i PCP)	No especificats	ECD
[185]	DVB/CAR/PDMS 50/30 µm	Vi i altres begudes	4-cloroanisole, 2-cloroanisole,	Especifiquen el LOD (en vi):	AED

Ref.	Recobriment	Matriu	Compostos	LOQ	Detector GC
		alcohòliques	4-bromoanísol, 2,6-DCA, 2-bromoanísol, 2,4-DCA, TCA, 2,4,5-TCA, 2,4-dibromoanísol, 2,4,6-TBA, TeCA i PCA	2,5 ng/l 2,6-DCA, 4,2 2,4-DCA, 2,2 ng/l TCA, 2,6 ng/l TBA, 2,1 ng/l TeCA i 1,2 ng/l PCA	
[186]	PDMS 100 µm	Vi	TCA, TeCA, PCA, TCP, TeCP, TBA i TBP	DI-SPME: 0,56 ng/l TCA, 1,14 ng/l TeCA, 1,39 ng/l PCA, 0,53 ng/l TBA (0,32 ng/l TCP, 0,25 TeCP, 0,22 ng/l TBP) HS-SPME: 285,50 ng/l TCA, 351,20 ng/l TeCA, 796,40 ng/l PCA, 732,70 ng/l TBA (0,80 ng/l TCP, 0,36 ng/l TeCP, 18,00 ng/l TBP) 17,0 ng/g TCA, 20,6 ng/g TBA i 8,3 ng/g PCA	MS/MS
[187]	NiTi-ZrO ₂ -PEG 17 µm	Suro (total)	TCA, TBA i PCA		ECD
[188]	PDMS 100 µm	Vi	TBA	Especifiquen el LOD: 2 ng/l TCA	MS
[189]	PDMS/DVB 65 µm	Vi i suro (total)	2,4-DCA, TCA, TeCA i PCA (TCP, TeCP i PCP)	Es suposa que en el vi: 8,4 ng/l 2,4-DCA, 0,8 ng/l TCA, 0,6 ng/l TeCA i 0,8 ng/l PCA (0,8 ng/l TCP, 1,2 ng/l TeCP i 1,1 ng/l PCP)	ECD
[190]	PDMS 100 µm	Suro (extraïble)	TCA	Especifiquen el LOD: 0,2 ng/l TCA	MS

Dels treballs presentats a la Taula IV.2 s'extreuen una sèrie de conclusions molt interessants i que es presenten, de forma general, tot seguit.

- La SPME és una tècnica adequada per a la determinació d'haloanisoles en vi i en suro, ja que permet arribar a quantificar concentracions molt baixes

(ng·l⁻¹ en vins i macerats i ng·g⁻¹ en suros), de manera suficientment ràpida, econòmica i simple. En tots els casos s'utilitza la variant de l'espai de cap.

- Els recobriments més emprats són bàsicament dos: PDMS 100 µm i DCV/CAR/PDMS 50/30 µm. El recobriment de PDMS ofereix millors robustesa precisió, però l'altre ofereix una major sensibilitat.
- En vins s'observa que l'aplicació d'agitació magnètica i l'addició de sal (efecte salí) facilita l'extracció dels haloanisoles, millorant-ne la sensibilitat. En el cas dels suros, l'agitació es segueix presentant com a efectiva, però l'addició de sal ja no sol ajudar en el procés. En ambdós casos cal tenir en compte l'efecte de la matriu, el qual es resol per diferents vies en els diferents treballs publicats.
- En l'anàlisi de taps del suro s'obren dues vessants diferenciades: la determinació dels haloanisoles totals i la dels haloanisoles extraïbles. El fet de treballar amb un o altre paràmetre portarà a l'obtenció de diferents resultats, de manera que és molt important tenir-ho en compte a l'hora d'extreure a conclusions.

2.13.- Stir bar sorptive extraction (SBSE)

2.13.1.- Principis de l'SBSE

La *stir bar sorptive extraction* (SBSE), que es podria traduir com a extracció per sorció en una barreta d'agitació, és una modificació de la microextracció en fase sòlida. Un dels inconvenients de la SPME és la petita quantitat de sorbent continguda en cadascuna de les fibres [63]. Per aquesta raó, Baltussen *et al.* [191] varen idear aquesta tècnica, en la qual el volum de recobriment és sensiblement major. Amb aquest objectiu, el que es fa és utilitzar barres de metall recobertes de vidre amb un recobriment de 50-200 µl de PDMS, les quals són subministrades comercialment per Gerstel, amb el nom de Twister™ [63].

L'equilibri de la sorció dependrà de la relació de fases i, per tant, de la quantitat de PDMS emprada, tal com mostra l'equació IV.8 [192,193]:

$$K_{o/w} = K_{PDMS/w} = \frac{C_{PDMS}}{C_w} = \frac{m_{PDMS}}{m_w} \cdot \frac{V_w}{V_{PDMS}} = \frac{m_{PDMS}}{m_w} \cdot \beta \quad \text{Eq. IV.8}$$

On $K_{PDMS/w}$ és el coeficient de distribució entre el recobriment de PDMS i la fase aquosa, essent la relació entre la concentració del solut en la fase de PDMS (C_{PDMS}) respecte a la concentració en l'aigua (C_w) en l'equilibri. Aquestes concentracions es poden relacionar amb la massa del solut en les fases descrites i la relació de volums ($\beta=V_w/V_{PDMS}$) [192,193].

Si es defineix la recuperació com la relació entre la quantitat de solut (m_{PDMS}) respecte la quantitat de solut existent en l'inici a la fase aquosa, llavors es pot representar segons l'equació IV.9 [192,194]:

$$Recuperació = \frac{m_{PDMS}}{m_o} = \frac{K_{PDMS/w}/\beta}{1+(K_{PDMS/w}/\beta)} \quad \text{Eq. IV.9}$$

O es pot expressar com [193]:

$$Recuperació = \frac{m_{PDMS}}{m_o} = \frac{K_{PDMS,w}}{K_{PDMS,w}+\beta} \quad \text{Eq. IV.10}$$

D'aquesta manera es pot determinar la recuperació d'un procés, sempre i quan s'arribi a l'equilibri [192].

2.13.2.- Extracció i desorció

Les dues etapes més importants de l'SBSE són l'extracció i la desorció.

En l'etapa d'extracció, de manera similar a l'SPME, es posa en contacte la barra recoberta del polímer amb la mostra. Aquest contacte es pot establir de dues maneres; o bé directa –per immersió– (anomenada SBSE simplement) o indirecta, a l'espai de cap (anomenada HSSE –*headspace sorbent extraction*–). En la modalitat directa, la barreta és submergida dintre de la mostra líquida i exerceix l'agitació, al mateix temps que extreu els compostos, en unes condicions controlades. Una vegada finalitzada aquesta etapa, es retira la barra i es renta amb aigua destil·lada, per tal d'eliminar els possibles contaminants i, posteriorment, s'asseca. En aquest moment, la barra ja està preparada per a la posterior desorció. En la modalitat a l'espai de cap, HSSE, la barra es col·loca en un dispositiu que permet mantenir-la suspesa en l'espai de cap, lloc on es produirà l'extracció dels compostos. Una vegada acabada l'extracció, es procedeix exactament igual que en la modalitat directa [193].

Una vegada acabada l'extracció, cal dur a terme la desorció, ja sigui tèrmica o mitjançant l'ús d'un dissolvent. La desorció tèrmica implica l'ús d'un equip de desorció tèrmic (TD) que es pot acoblar a un cromatògraf de gasos. La utilització d'aquest sistema fa que l'aplicació de la tècnica es vegi reduïda a compostos volàtils i semivolàtils tèrmicament estables. Pels altres compostos menys volàtils, es disposa de l'alternativa de la desorció líquida, de manera que la mostra resultant es podrà analitzar en un cromatògraf líquid o en una electroforesi capil·lar. En aquest cas, cal assegurar la immersió completa de la barra, per la qual cosa el dissolvent utilitzat tindrà molta importància ja que aquest haurà de ser compatible

amb el polímer. Generalment els més emprats són l'acetnitril, el metanol, mescles d'aquests dissolvents o mescles amb aigua o tampons aquosos [191-193].

2.13.3.- Limitacions

Les principals limitacions de la tècnica SBSE són dues. La primera ve relacionada amb el fet que no es pot dur a terme la desorció directament en l'injector del cromatògraf de gasos, com en el cas de l'SPME. Això fa necessari l'ús d'un equip específic de desorció tèrmica, o l'ús de la desorció líquida, la qual implica molta més manipulació de mostra, augmentant el temps d'anàlisi i les possibilitats d'errors. L'altra limitació, i bastant important, és la poca disponibilitat de recobriments ja que, fins el moment, només existeix el de PDMS la qual cosa implica que les aplicacions d'aquesta tècnica es redueixin a compostos apolars [193].

2.13.4.- Aplicacions en la determinació d'haloanisoles en vins i suros

L'SBSE ha estat utilitzada en la determinació de cloroanisoles en vins [186,195-198] i també en taps de suro [199,200].

En els vins la modalitat d'extracció emprada és la d'immersió [186,195-198] i, pels suros, es troben les dues modalitats, per immersió [200] i per espai de cap [199]. En tots els casos la desorció és la tèrmica [186,195-200]. Els límits de quantificació pel TCA aconseguits mitjançant aquesta tècnica són molt baixos, ja que van des de 0,1 ng·l⁻¹ [186] fins a 0,6 ng·l⁻¹ [198] per vins, mentre que per suros es troben valors que van des de 2,7 ng·g⁻¹[200] fins a 3,8 ng·g⁻¹ [199].

2.14.- **Microextracció amb solvent**

La microextracció amb solvent (*solvent microextraction*), també coneguda com a microextracció amb una única gota (*single-drop microextraction*) és una tècnica d'extracció innovadora, que consisteix en situar una petita quantitat d'un solvent d'extracció (d'aquí bé el nom d'única gota) a la punta de l'agulla d'una micro-xeringa o una barra de politetrafluoroetilè (PTFE), la qual es posa en contacte amb la mostra o amb l'espai de cap d'aquesta. Així s'aconsegueix que els analits més afins pel solvent passin a aquesta fase de manera que, un cop ha acabat l'extracció, la gota és injectada directament a l'injector del cromatògraf de gasos. L'extracció i concentració tenen lloc de manera simultània, com en el cas de l'SPME, però té alguns avantatges, com l'absència de fibres, de manera que suposa una disminució de costos, l'anàlisi és ràpida i utilitza material molt simple [201,202].

Martendal *et al.* [202] han utilitzat aquesta tècnica per a la determinació de TCA i TBA en vins, utilitzant la modalitat de l'espai de cap i l'1-octanol com a solvent

d'extracció. D'aquesta manera aconseguixen bons límits de quantificació, de 8,1 $\text{ng}\cdot\text{l}^{-1}$ en el cas del TCA i de 6,1 $\text{ng}\cdot\text{l}^{-1}$ en el cas del TBA. Cal destacar que en aquest estudi es fa especial menció a l'efecte matriu que es manifesta quan les rectes de calibratge de vi blanc i vi negre no són comparables.

3.- TÈCNIQUES CROMATOGRÀFIQUES

Una vegada s'han preconcentrat els compostos, cal aplicar una tècnica per tal de separar-los, detectar-los i quantificar-los. Tenint en compte les propietats dels haloanisoles, la tècnica per excel·lència per dur a terme aquest procés és la cromatografia de gasos (GC) provista d'un detector de captura electrònica (ECD) o d'un detector d'espectrometria de masses (MSD). Tot i amb això, val a dir que hi ha alguna aplicació on també s'utilitza el detector d'emissió atòmica (AED).

De manera molt senzilla, es pot dir que la cromatografia de gasos és un mètode de separació física en el qual els components d'una mescla gasosa (mostra) es distribueixen selectivament entre la fase mòbil, que és un gas inert, i la fase estacionària, que consisteix en un sòlid o un líquid fixat en una columna empaquetada o a les parets d'una columna capil·lar [203].

Instrumentalment, consisteix en una unitat de control del gas, un sistema d'injecció, un forn amb temperatura controlada on es situarà la columna cromatogràfica i un detector, o una línia de transferència en el cas d'un detector d'espectrometria de masses [203].

Els sistemes d'injecció més habituals són els de *split/splitless*, *on-column* i vaporització amb programa de temperatures (PTV). El principal problema d'aquests tipus d'injectors és la poca quantitat de mostra que permeten que entri a la columna cromatogràfica. De fet, les modificacions més importants en els injectors s'han centrat en permetre la introducció d'un volum més gran de mostra, la qual cosa és de gran importància en la determinació de traces o en l'acoblament directe amb tècniques d'extracció. D'aquí el desenvolupament dels injectors de grans volums (LVI). Amb algunes modalitats d'aquest injector es poden introduir volums de varis centenars de microlitres [204].

Pel que fa a la columna cromatogràfica, aquesta s'escollirà en funció dels compostos que es volen analitzar, tot buscant la que proporcioni la separació amb la millor resolució en el mínim temps possible. En el cas de la determinació d'haloanisoles en vins i suros, els diferents autors han fet aquesta tria escollint recobriments de polaritat diversa. Així, en els treballs esmentats en la Taula IV.2, s'han emprat recobriments de baixa polaritat com els de 95% dimetil 5% polisiloxà i equivalents [98,161,169,170-172,174,175,178,179,181,182,184-188,190] o dimetil(oxo)silà [163,164,183], recobriments de polaritat mitja/baixa com el 14% (cianopropil-fenil)-metilpolisiloxà [106] o recobriments d'alta polaritat com els de polietilenglicol [160,162,165,168,176,177,180].

3.1.- Detectores per a cromatografia de gasos

Un detector cromatogràfic és un instrument capaç de mesurar alguna propietat química o física de l'eluat que surt de la columna cromatogràfica, de manera que experimenti una variació quan passa la fase mòbil amb algun altre compost. Això fa que en el moment exacte en què un analit elueix de la columna cromatogràfica, aquest origina un senyal que és proporcional a la quantitat d'analit. Les característiques que ha de tenir un bon detector són: sensibilitat, linealitat, selectivitat i fàcil manipulació [205,206].

Tal com s'ha comentat prèviament a la Taula IV.2, els detectors utilitzats en l'anàlisi d'haloanisoles en vins i taps de suro són, bàsicament, el detector de captura electrònica (ECD) i el detector d'espectrometria de masses (MSD), tot i que alguna aplicació s'ha trobat també amb la utilització del detector d'emissió atòmica (AED).

3.1.1.- Detector de captura electrònica

El detector de captura electrònica (ECD) és el detector selectiu més antic per a cromatografia de gasos. Combina una elevada selectivitat amb una elevada sensibilitat. Principalment proporciona una gran resposta davant compostos halogenats, nitrils, compostos aromàtics nitrogenats, compostos organometàl·lics i compostos carbonílics conjugats, és a dir, respon a molècules amb àtoms o grups electronegatius, que tenen capacitat de captar electrons. És un detector molt selectiu, no destructiu i respon a la concentració [203,207].

En termes generals, l'efluent de la columna cromatogràfica és bombardejada per partícules β emeses per una font radioactiva (^{63}Ni , ^3H o ^{55}Fe). Les col·lisions entre els electrons β d'elevada energia i el gas portador dona lloc a la formació d'un plasma de ions positius, radicals i un gran nombre d'electrons secundaris. Això provocarà la formació d'un corrent estable entre els dos elèctrodes. Però, en presència d'espècies orgàniques amb tendència a capturar electrons, la corrent disminueix [208].

3.1.2.- Detector d'espectrometria de masses

La utilització conjunta d'un cromatògraf de gasos amb un espectròmetre de masses com a detector (MSD) és una de les eines més poderoses que existeixen actualment en el món de l'anàlisi d'aliments, ja que la GC proporciona un alt poder de separació i la MS dona una valuosa informació estructural del compost .

L'anàlisi de masses es basa en el fet que, un cop els diferents analits que elueixen de la columna cromatogràfica arriben al detector, aquests són ionitzats de manera que arriben a l'analitzador de masses i es produeix una separació de ions segons la seva relació massa/càrrega [209-211].

D'analitzadors de masses se'n troben de diferents tipus. Els més populars són [209-211]:

- *De quadrupol*: S'aplica un camp oscil·lant de radiofreqüències en quatre barres metàl·liques paral·leles i els fragments es desvien segons la seva relació càrrega/massa
- *De sector magnètic*: Utilitza un camp electromagnètic per a separar els ions en l'espai en funció dels radis de les seves trajectòries.
- *De trampa iònica*: Els ions són atrapats durant un cert temps en un camp de radiofreqüències, els quals seran alliberats depenent de la seva relació m/z aplicant corrents de radiofreqüències variables.
- *De temps de vol (TOF)*: Separa els ions segons el seu temps de migració en una regió lliure de camp elèctric una vegada s'han accelerat en l'etapa de ionització.

Un cop obtinguts els ions, aquests són detectats (per exemple, a través d'una copa de Faraday, un multiplicador d'electrons o un detector de centelleig) i es genera la informació que serà tractada mitjançant un software adequat. La informació obtinguda pot ser de tot l'espectre (*full-scan*) o es poden escollir uns ions representatius (SIM) de manera que es millora fins a tres ordres de magnitud la sensibilitat del mètode [209-211]. La combinació d'alguns d'ells els farà una eina de gran poder analític.

Tal i com ja s'ha vist a la taula IV. 2, aquest és un dels detectors més emprats en la determinació d'haloanisoles en vins i també en suros.

3.1.3.- Detector d'emissió atòmica

El detector d'emissió atòmica (AED) és molt sensible i selectiu. El seu ús com a detector en la cromatografia de gasos proporciona la detecció simultània multi-canal de més de quatre elements amb molt bons límits de detecció (nivells de ppq per a molts elements), amb respostes lineals entre 3-5 ordres de magnitud. En ser un detector molt selectiu permet que, fins i tot amb mostres molt complexes, es mantinguin els baixos nivells de determinació [212].

En l'emissió atòmica, la mostra és sotmesa a elevades temperatures per tal de no només dissociar les molècules en àtoms, sinó també per causar nombroses col·lisions i ionitzar els àtoms. Una vegada els àtoms o ions estan en el seu estat

excitat, decauen a estats de menor energia, mitjançant l'emissió de transicions energètiques, tèrmiques o radioactives [213].

Una de les grans virtuts d'aquest detector és el que s'anomena calibració universal o calibració independent del compost (CIC). Les altes temperatures que aconseguix el plasma generat per inducció per microones causa una ruptura completa de totes les molècules dels analits en els seus àtoms constituents. Llavors, la resposta per unitat de massa d'un element és més o menys independent de l'estructura de l'analit d'interès. Així doncs, la quantificació d'una sèrie completa de compostos es pot realitzar a través d'un sol analit que contingui un heteroàtom en comú [210-212].

4.- TÈCNiques NO CROMATOGRÀFIQUES

Més enllà de les tècniques cromatogràfiques es poden trobar diferents alternatives que permeten determinar els haloanisoles, de manera directa o indirecta, per tal d'avaluar l'olor a humitat. En aquest apartat es farà un recull de les principals alternatives trobades en la bibliografia, tot dividint-les en dos grans grups: nas electrònic i determinació immunoquímica i biosensors.

4.1.- Nas electrònic

4.1.1.- El sentit de l'olfacte

El sentit de l'olfacte, certament, es té una mica oblidat i no se li dona la importància que es mereix. Es prioritza el que es pot veure, el que es pot tocar, menyspreant, de vegades, la informació que ens pot donar el sistema olfatiu. Segons els antropòlegs, l'olfacte deixa de ser vital per a l'home quan es converteix en *Homo erectus*, de manera que s'allunya del terra. La vista passa llavors a una posició predominant [214].

Quan s'olora un producte, les molècules aromàticament actives arriben a la cavitat nasal i a l'àrea olfactiva (epiteli), situats sota el bulb olfatori. L'olor és deguda a la interacció que té lloc dintre de la cavitat nasal entre les molècules volàtils de la substància que fa olor i les neurones olfactives primàries de l'epiteli olfatori. Per tant, només les molècules que siguin prou volàtils i amb unes propietats determinades podran arribar als receptors olfactoris susceptibles de desencadenar la sensació olfactiva i activar-los.

Les cèl·lules nervioses olfactives pateixen moltes agressions, ja que estan exposades de manera directa al medi extern. Però això no afecta al sentit de l'olfacte, ja que, a diferència de les neurones del cervell, les neurones olfactives primàries es renoven constantment, aproximadament cada dos mesos. Aquestes cèl·lules tenen un cilí que s'introdueix dintre de la mucosa olfactiva, lloc a on es produeix la interacció inicial entre el compost volàtil i el sistema nerviós i, a l'altre extrem, un àxon projectat cap al bulb olfatori. Els punts de contacte entre les neurones sensorials primàries i les cèl·lules del bulb olfatori formen una sèrie d'estructures anomenades glomèruls, lloc on convergeix la informació procedent de totes les cèl·lules que perceben, al mateix temps, un compost volàtil. Així doncs, l'organització del sistema olfatiu es basa, fonamentalment, en un principi de convergència: l'activitat de totes les cèl·lules que porten la mateixa informació olfactiva convergeix en un mateix punt, el glomèrul, i d'allí és enviada a altres parts del sistema nerviós central on és susceptible d'un processament més elaborat,

que està relacionat amb els efectes emocionals i psicològics que ens produeixen certes olors [215-220].

4.1.2.- Què és un nas electrònic?

Els investigadors Dodd i Persaud varen introduir l'any 1982 la idea de nas electrònic com un instrument que intentava emular la capacitat discriminatòria d'olors del sistema olfatiu dels mamífers (veure Figura IV.3).

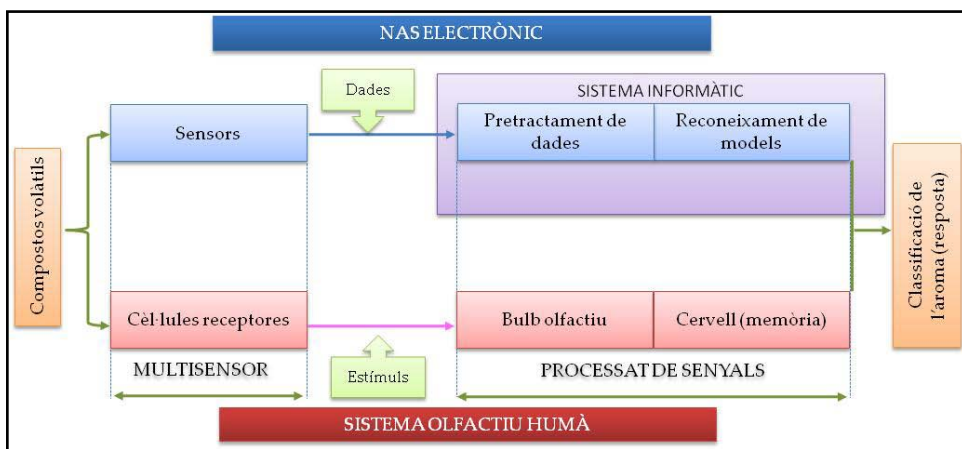


Figura IV.3. Paral·lelisme entre el sistema olfatiu humà i el nas electrònic [220].

Amb aquesta idea, varen utilitzar una sèrie de tres sensors de gasos a base d'òxids metàl·lics per a diferenciar diferents substàncies. A partir d'aquí i al llarg dels anys, s'han presentat diferents propostes amb el gran objectiu d'intentar definir instrumentalment atributs olfactius o obtenir una empremta digital de l'aroma. Tot i així, després de 29 anys, la comparació dels nassos electrònics amb el nas humà és encara un tema que no està del tot resolt [221-223].

Però, què s'entén per nas electrònic? Una definició podria ser que és un sistema de sensors químics o físics, el qual utilitza un programa quimiomètric de reconeixement de models capaç d'analitzar i reconèixer aromes simples i complexes [217]. Aquesta definició ens obre les portes a una classificació dels diferents nassos electrònics depenent del tipus de sensors que utilitzin. Així, clàssicament, els nassos electrònics es dividien entre els instruments que utilitzaven sensors de gasos i els que utilitzaven l'espectrometria de masses. Però,

en els últims anys, l'aplicació de noves tecnologies ha obert el camí a altres tipus d'instruments de manera que aquesta classificació es pot ampliar tot quedant de la següent manera [222]:

a) *Basats en sensors químics de gasos*

Aquests sensors són els més clàssics. Els sensors de gasos tenen la característica de poder modificar alguna de les seves propietats elèctriques quan els compostos aromàtics interaccionen amb la seva superfície. En el mercat es poden trobar diferents tipus de sensors, els quals es poden classificar en [215,222,224]:

- i. *Sensors calents*: principalment òxids de metalls conductors
- ii. *Sensors freds*: polímers conductors, cristalls piezoelèctrics i sensors de radiofreqüència

Aquests tipus de sensors presenten una sèrie de problemes, com la seva alta sensibilitat a compostos com l'etanol (dificultant la seva aplicació en el camp enològic i en la indústria de les begudes alcohòliques en general), CO₂ o a la humitat, provocant l'emascament dels diferents components aromàtics. Aquests inconvenients limiten la seva aplicació al món industrial.

b) *Basats en sensors òptics*

El funcionament d'aquest tipus de sensors és similar als anteriors, però, enlloc de donar la resposta en funció en canvis elèctrics basats en resistència, potencial, corrent o freqüència és mesurada, la modulació de les propietats de la llum. Existeix una gran varietat d'aquests tipus de sensors, des de fotodíodes a càmeres CCD (*charge-coupled device*) i CMOS (*complementary metal oxide semiconductor*) [222].

c) *Basats en espectrometria de masses*

L'espectrometria de masses també pot ser utilitzada també com a sistema de detecció en el nas electrònic. L'espectre que s'obté equival a la resposta d'un multisensor amb tants sensors com ions generats. Aquests instruments presenten una sèrie d'avantatges respecte als que utilitzen sensors de gasos, com són l'elevada reproductibilitat, el poder d'eliminació d'interferències de compostos volàtils majoritaris, els temps d'anàlisi curts i que es pot obtenir informació addicional sobre la composició de l'aroma, gràcies a l'espectre obtingut. Aquest tipus de nas electrònic es presenta com un gran candidat per a ser utilitzat en el món de l'enologia

[220,225-228]. Algun dels seus principals desavantatges és que per funcionar necessiten que s'apliqui el buit, augmentant els costos [222].

d) *Basats en espectrometria de mobilitat iònica*

El principi de l'espectrometria de mobilitat iònica (MIS) és similar al de l'espectrometria de masses: de separació de ions. La diferència entre les dues rau en com es fa aquesta separació. En la MIS aquesta separació es duu a terme en funció de la mobilitat dels ions de manera que la forma i la grandària del ió tindrà influència en la separació [222].

e) *Basats en cromatografia de gasos*

En aquest cas l'avaluació es realitza monitoritzant el senyal en intervals de temps (l'ordre d'elució dels diferents compostos a través de la columna cromatogràfica dependrà de la seva interacció amb la fase estacionària), de manera que es tracta com si fossin respostes d'una sèrie virtual de sensors en línia [222].

f) *Basats en espectroscòpia infraroja*

Els instruments basats en l'espectroscòpia infraroja utilitzen les bandes d'absorció típiques dels enllaços químics (rang comprès entre 4.000 i 200 cm^{-1}). Pel cas de substàncies volàtils, que és el que interessa en aquest cas, es fan servir, bàsicament, dos tipus de tractament. En l'espectroscòpia infraroja fotoacústica, la regulació de la intensitat de la font infraroja crea una variació de temperatura, tot provocant una expansió o contracció del gas, de manera que es poden enregistrar acústicament les freqüències provocades. L'alternativa és la utilització de filtres basats en espectroscòpia infraroja [222].

g) *Basats en sensors específics*

A diferència dels casos anteriors en els que l'interès era l'estudi del conjunt, en aquest tipus de nas electrònic l'objectiu és la detecció d'una única substància d'interès o d'una família de compostos concreta. Això es pot aconseguir fent servir detectors específics com el detector fotomètric de flama (FPD) o el detector de fotoionització (PID), amb detectors no específics com el detector de ionització de flama (FID) o amb cel·les electroquímiques, utilitzades per a la detecció de gasos específics (per exemple, gasos tòxics o oxigen) [222].

Pel que fa al procés de reconeixement de models o patrons, en aquest es solen diferenciar dues etapes: la calibració del sistema i la utilització del propi sistema pel reconeixement de mostres. Aquest procés es farà utilitzant diferent eines quimiomètriques, com són l'anàlisi de components principals (PCA), anàlisi d'agrupacions (CA), SIMCA (*Soft Independent Modelling Class Analogy*), KNN, (K-Nearest Neighbours), regressió per components principals (PCR), mínims quadrats parcials (PLS) o les xarxes neuronals [217,220,223].

4.1.3.- Aplicacions en la determinació d'haloanisoles

Rocha *et al.* [229] van aplicar un nas electrònic, a base de polímers conductors, amb l'objectiu de classificar els taps de suro segons cinc atributs aromàtics: olor estàndard, olor de suro bullit (descripció positiva), olor a podrit, olor a florit moderat i olor a florit intens. Aquestes dues últimes classificacions anirien lligades a la possible presència d'haloanisoles. Els resultats inicials trobats foren positius, però es feia necessari realitzar més estudis sobre aquest tema per a arribar a conclusions més sòlides.

Un dels problemes més comuns en el nas electrònic basat en els sensors de gasos és l'emascament que provoca l'etanol, com ja s'ha comentat prèviament. Santos *et al.* [230] van provar uns sensors d'òxid d'estany, per tal d'avaluar la seva capacitat de detectar la presència de diferents compostos causants de defectes organolèptics (com el TCA) en aigua, etanol i vi, així com estudiar l'efecte de l'etanol en aquesta determinació. Els resultats varen demostrar la necessitat de treballar amb una concentració elevada d'etanol (11-14%), essent imprescindible estudiar més aquest efecte.

En un altre treball, Ragazzo Sánchez *et al.* [231] utilitzaren un nas electrònic basat en cromatografia de gasos amb detector FID acoblat a un sistema format per 18 sensors de gasos amb base d'òxids metàl·lics per diferenciar vins i cerveses que presenten defectes, com la presència de TCA. Aquest mètode presenta inconvenients que el fan ser de molt poca utilitat, com el fet de que el límit de detecció pel TCA en vi és molt alt (de 0,02 mg·l⁻¹), la mostra necessita ser deshidratada i s'ha d'eliminar l'alcohol (de manera que el temps d'anàlisi i la manipulació es veuen incrementats), així com la impossibilitat de fer la diferenciació en mostres desconegudes i l'obtenció de bastants resultats erronis.

4.2.- **Immunoassaig i biosensors**

Un dels grans reptes de la ciència ha estat i segueix sent el fet d'idear mètodes d'assaig simples, sense pràcticament manipulació de la mostra, i ràpids. En aquesta línia s'han proposat els mètodes que es descriuen d'aquest apartat.

Les tècniques d'immunoassaig engloben una sèrie de tests que utilitzen anticossos com a reactius. Els immunoassajos enzimàtics o ELISA (*Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay*) es basen en la utilització d'un antigen immobilitzat sobre una fase mòbil mitjançant anticossos que, directament o indirecta produeixen una reacció, el producte de la qual, per exemple un agent cromogènic, pot ser mesurat espectrofotomètricament [232].

Marti *et al.* [233] van plantejar un mètode ELISA amb l'objectiu de detectar la presència d'espècies d'*Aspergillus* i *Penicillium*, responsables de la metilació del TCP a TCA, en vins blancs, mitjançant la identificació d'una molècula superficial hidrosoluble de les hifes d'aquest fong. Aquest mètode proporciona una molt bona correlació entre TCA i la presència de l'antigen, a partir de concentracions de TCA extraïble del suro de $8 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ (trobades mitjançant HS-SPME-GC-MS). Però la concentració d'aquest antigen no pot predir la concentració de TCA, sobretot si no hi ha TCP en el medi.

Una altra possibilitat és la que ens proposen Sanvicens *et al.* [234,235], en la qual intenten detectar TCA en vins mitjançant el desenvolupament d'una sèrie d'anticossos que responguin, exclusivament, a l'analit d'interès, essent un procés totalment específic. En el cas del TCA, els autors preparen uns derivats anomenats haptens, els quals tenen la propietat d'ésser el màxim de semblants a l'analit pel que fa estructura química, conformació espacial, distribució electrònica i propietats hidrofòbiques. Aquests haptens tenen grups funcionals mitjançant els quals s'uneixen a enzims i proteïnes. El problema de la tècnica en aquest cas és la manca d'especificitat, ja que trobaren diferents compostos presents en el vi que donen resposta, de manera que es feia necessària una etapa prèvia de neteja i concentració. Un problema similar es trobaren Moore *et al.* [236] quan desenvoluparen el seu mètode mitjançant ELISA. Constataven que el vi els inhibia l'anàlisi i arribaven a límits de quantificació molt alts, arribant a la conclusió, també, de que era necessària una etapa de d'extracció i concentració. Així, modificant el mètode, Sanvicens *et al.* [237] afegeixen una etapa d'extracció amb una columna d'immunoafinitat, aconseguint millorar el problema d'especificitat, tot i que encara no es pot arribar als nivells de concentració que interessin.

Una darrera proposta seria la de Moore *et al.* [236] basada en l'ús de biosensors per la determinació de TCA en vins. El problema, però és que els autors es trobaren amb el problema que el vi inhibeix l'anàlisi de TCA, essent necessària, també, una etapa d'extracció i concentració de la mateixa manera que passava en el cas de l'ELISA.

BIBLIOGRAFIA

1. M. Valcárcel, Ángel Ríos. The analytical problem. *Trends Anal. Chem.*, 16 (7) (1997) 385-393
2. D. Mackay, W. Y. Shiu, K. C. Ma, S. C. Lee. *Handbook of physical-chemical properties and environmental fate for organics chemical (oxigen containing compound)*. 1^{era} edició. Boca Raton (USA): CRC Press LLC; 2006. Volume III
3. L. H. Keith, D. B. Walters. *National Toxicology Programm's Chemical Solubility Compendium*. 1^{era} edició. Chelsea (USA): Lewis Publishers; 1992
4. L. H. Nowell, P. D. Capel, P. D. Dileanis. *Pesticides in Stream Sediment and aquatic biota. Distribution, trends and governing factors*. 1^{era} edició. Boca Ratón: CRC Press LLC; 1999
5. <http://www.chemspider.com> (14 de novembre de 2009)
6. J. Pawliszyn. Sample Preparation: Quo Vadis? *Anal. Chem.*, 75 (2003) 2543-2558
7. M. Valcárcel Cases, A. Gómez Henz. *Técnicas Analíticas de Separación*. 1^{era} edició. Barcelona (Catalunya): Editorial Reverté, S.A.; 1988. Capítol 7. 173-208
8. T. P. Wampler. "Analysis of food volatiles using headspace-gas chromatographic Techniques" dins R. Marsili (editor), *Techniques of analyzing Food aroma*. 1^{era} edició. Nova York (USA): Marcel Decker, Inc.; 1997. Capítol 2. 27-58
9. R. W. Frei and K. Zech. *Selective sample handling and detection in high-performance liquid chromatography*. 1^{era} edició. Amsterdam (Holanda): Elsevier; 1988. Journal of Chromatography Library. Volum 39A. Part A
10. T. C. Frank, L. Daharon, B. S. Holden. W. D. Prince, A. F. Seibert, L. C. Wilson. "Liquid-liquid extraction and other liquid-liquid operations and equipments" dins D. W. Green, R. H. Perry (editors), *Perry's Chemical Engineer's handbook*. 8^{ena} edició. Nova York (USA): Mc. Graw-Hill; 2008. Capítol 15, 15-1 – 15-105
11. H. R. Buser, C. Zanier, H. Tanner. Identification of 2,4,6-trichloroanisole as a potent compound causing cork taint in wine. *J. Agric Food Chem.*, 30 (1982) 359-362
12. J. M. Amon, J. M. Vandeppeer, R. F. Simpson. Compounds responsible for cork taint in wine. *Aust. N. Z. Wine Ind. J.*, 4 (1) (1989) 62-69
13. C. Bayonove, F. Leroy. Étude d'une méthode de dosage des chlorophénols dans les vins et les bouchons. *Ind. Bevande*, 23 (1994) 231-242
14. A. P. Pollnitz, K. H. Pardon, D. Liacopoulos, G. K. Skouroumounis, M. A. Sefton. The analysis of 2,4,6-trichloroanisole and other chloroanisoles in tainted wines and corks. *Aust. J. Grape Wine Res.*, 2 (1996) 184-190

15. D. L. Capone, G. K. Skouroumounis, D. A. Barker, H. J. Mc. Lean, A. P. Pollnitz, M. A. Sefton. Absorption of chloroanisoles from wine by corks and by other materials. *Aust. J. Grape Wine Res.*, 5 (1999) 91-98
16. A. Peña Neira, B. Fernández de Simón, M. C. García Vallejo, T. Hernández, E. Cadahía, J. A. Suárez. Presence of cork-taint responsible compounds in wines and their cork stoppers. *Eur. Food. Res. Technol.*, 211 (2000) 257-261
17. A. Bertrand, M. L. Barrios. Contamination de Bouchons par les produits de traitements de palettes de stockage des bouteilles. *Rev. Française Oenol.*, 149 (1994) 29-32
18. P. Chatonnet, S. Bonnet, S. Boutou, M. D. Labadie. Identification and responsibility of 2,4,6-tribromoanisole in musty, corked odors i wine. *J. Agric. Food Chem.*, 52 (2004) 1255-1262
19. S. Sakuma, H. Amano, M. Ohkochi. Identification of off-flavor compounds in beer. *J. Am. Soc. Brew. Chem.*, 58 (1) (2000) 26-29
20. H. S. Shin, H. S. Ahn. Simple, Rapid and Sensitive Determination of Odorous Compounds in Water by GC-MS. *Chromatographia*, 59 (1/4) (2004) 107-113
21. R. Cantagrel, J. P. Vidal. Research on compounds accountable for cork taint in cognac. *Extrait du Bulletin de l'OIV*, 709-710 (1990) 250-277
22. C. Silva Pereira, A. Pires, L. Vilas Boas, J. J. Figueiredo Marques, M. V. San Romao. Role of *Crysonilia sitophila* in the quality of cork stoppers for sealing wine bottles. *J. Ind. Mic. Biotechnol.*, 24 (2000) 256-261
23. J. Costa López, S. Cervera March, F. Cunill García, S. Esplugas Vidal, C. Mans Teixidó, J. Mata Álvarez. *Curso de Ingeniería Química. Introducción a los procesos, las operaciones unitarias y los fenómenos de transporte*. 1^{era} edició. Barcelona (Catalunya): Editorial Reverté; 1991. Capítol 2, 37-95
24. R. T. Toledo. *Fundamentals of Food Process Engineering*. 2^{ona} edició. Nova York (USA): Chapman and Hall; 1991. Capítol 14, 548-566
25. D. E. Vallero. *Engineering the risks of hazardous wastes*. 1^{era} edició. Burlington (USA): Elsevier Science; 2003. Capítol 2, 23-62
26. J. A. Suárez, E. Navascués, F. Calderón, J. Vila, B. Colomo, C. García Vallejo. Presence of fungus and chloroanisole concentration during the manufacturing process of corks for wine bottlin. *Bullete de l'OIV*, 793-794 (1994) 234-245
27. P. R. Howland, A. P. Pollnitz, D. Liacopoulos, H. J. McLean, M. A. Sefton. The location of 2,4,6-trichloroanisole in a batch of a contaminated wine corks. *Aust. J. Grape Wine Res.*, 3 (1997) 141-145

28. R. Juanola, D. Subirà, V. Salvadó, J. A. García Regueiro, E. Anticó. Evaluation of an extraction method in the determination of the 2,4,6-trichloroanisole content in tainted cork. *J. Chromatogr. A*, 953 (2002) 207-214
29. S. Insa, V. Salvadó, E. Anticó. Assays on the simultaneous determination and elimination of chloroanisoles and chlorophenols from contaminated cork samples. *J. Chromatogr. A*, 1122 (2006) 215-221
30. R. Juanola, L. Guerrero, D. Subirà, V. Salvadó, S. Insa, J. A. García Regueiro, E. Anticó. Relationship between sensory and instrumental analysis of 2,4,6-trichloroanisole in wine and cork stoppers. *Anal. Chim. Acta*, 513 (2004) 291-297
31. C. Pizarro, N. Pérez del Notario, J. M. González Sáiz. Optimisation of a microwave-assisted extraction method for the simultaneous determination of haloanisoles and halophenols in cork stoppers. *J. Chromatogr. A*, 1149 (2007) 138-144
32. L. Moio, M. Diana, G. del Prete, G. di Landa, A. A. Valentino. Analisi dei componenti volatili del sughero affetto da "macchia gialla" e "verdone" e di vini con odore di sughero mediante GC/sniffing e GC/MS. *Ind. Bevande*, 27 (1998) 615-619
33. V. Mazzoleni, R. Molteni, M. D. Fumi. Effetto dell'irradiazione con elettroni accelerati sul sughero utilizzato per la produzione di tappi. *Ind. Bevande*, 29 (2000) 247-257
34. C. Pizarro, J. M. González Sáiz, N. Pérez del Notario. Multiple response optimisation based on a desirability functions of a microwave-assisted extraction method for the simultaneous determination of chloroanisoles and chlorophenols in oak barrel sawdust. *J. Chromatogr. A*, 1132 (2006) 8-14
35. E. Hervé, S. Price, G. Burns, P. Weber. *Chemical analysis of TCA as a quality control tool for natural corks*. <http://www.corkqc.com/currentresearch/CorkTaint/ETS%20CQC-SPME.pdf> (14 de novembre de 2009)
36. C. Pereira, L. Gil, L. Carriço. Reduction of the 2,4,6-trichloroanisole content in cork stoppers using gamma radiation. *Rad. Phys. Chem.* 76 (2007) 729-732
37. G. J. Soleas, J. Yan, T. Seaver, D. M. Goldberg. Method for the gas chromatographic assay with mass selective detection of trichloro compounds in corks and wines applied to elucidate the potential cause of cork taint. *J. Agric. Food Chem.*, 50 (2002) 1032-1039
38. H. D. Belitz, W. Grosch, P. Schieberle. *Food Chemistry*. 3^{era} edició. Berlin (Alemanya): Springer-Verlag; 2004. Capítol 5, 342-408
39. D. Kilcast. "Sensory evaluation of taints and off-flavours" dins M. J. Saxby (editor), *Food taints and off-flavours*. 2^{ona} edició. Glasgow (Gran Bretanya): Blackie Academic and Professional; 1996. Capítol 1, 1-41

40. J. L. Le Quéré. "Recent developments in flavor measurements" dins M. L. Nollet (editor), *Handbook of meat, poultry and seafood quality* 1^{era} edició. Ames (USA): Blacwell publishing; 2007. Capítol 3, 101-310
41. J. Adda, H. Richard. "Determination of flavorings" dins J. L. Multon (editor), *Analysis of food constituents*. 1^{era} edició. Nova York (USA): Wiley-VCH, Inc.; 1997. Capítol 10, 293-310
42. R. Self. "Extraction of organic analytes from foods" dins P. S. Belton (editor), *RSC Food Analysis Monograph*. 1^{era} edició. Cambridge (Anglaterra): The Royal Society of Chemistry; 2005. Capítol 5, 153-195
43. R. F. Curtis, D. G. Land, Nerys M. Griffiths, M. Gee, D. Robinson, J. L. Peel, C. Dennis, Jennifer M. Gee. 2,3,4,6-tetrachloroanisole association with musty taint in chickens and microbiological formation. *Nature*, 235 (28) (1971) 223-224
44. J. M. H. Bemelmans, M. C. ten Noever de Brauw. Chloroanisoles as off-flavor components in eggs and broilers. *J. Agric. Food. Chem.*, 22 (6) (1974) 1137-1138
45. S. Rocha, I. Delgado, A. J. Ferrer Correia, A. M. Bastos, I. Roseira, A. Guimarães. Elimination of cork taint in wine in the course of the cork manufacturing process. *Wine Ind. J.* 8 (3) (1993) 223-227
46. S. Rocha, I. Delgado, A. J. Ferrer Correia. GC-MS Study of volatiles of normal and microbiologically attacked cork from *Quercus suber* L. *J. Agric. Food Chem.*, 44 (1996) 865-871
47. S. Rocha, I. Delgado, A. J. Ferrer Correia. Improvement of the volatile components of cork from *Quercus suber* L. by an autoclaving procedure. *J. Agric. Food Chem.*, 44 (1996), 872-876
48. C. Pereira, L. Gil, L. Carriço. Reduction of the 2,4,6-trichloroanisole content in cork stoppers using gamma radiation. *Rad. Phys. Chem.*, 76 (2007) 729-732
49. F. B. Whitfield, K. J. Shaw, T. H. Ly Nguyen. Simultaneous determination of 2,4,6-trichloroanisole, 2,3,4,6-tetrachloroanisole and pentachloroanisole in foods and packaging materials by high-resolution gas chromatography-multiple ion monitoring-mass spectrometry. *J. Sci. Food Agric.*, 37 (1986) 85-96
50. F. B. Whitfield, T. H. Ly Nguyen, J. H. Last. Effect of relative humidity and chlorophenol content on the fungal conversion of chlorophenols to chloroanisoles in fibreboard cartons containing dried fruit. *J. Sci. Food Chem.*, 54 (1991) 595-604
51. F. B. Whitfield, T. H. Ly Nguyen, C. R. Tindale. Effect of relative humidity and incubation time on the o-methylation of chlorophenols in fibreboard by *Paecilomyces variotti*. *J. Sci. Food Agric.*, 55 (1991) 19-26

52. J. L. Hill, A. D. Hocking, F. B. Whitfield. The role of fungi in the production of chloroanisoles in general purpose freight containers. *Food Chem.* 54 (1995) 161-166
53. J. C. Spadone, G. Takeoka, R. Liardon. Analytical Investigation of Rio off-flavour in green coffe. *J. Agric. Food Chem.*, 38 (1990) 226-233
54. L. H. Aung, J. L. Smilanick, P. V. Vail, P. L. Harstell, E. Gómez. Investigations into origin of chloroanisoles causing musty off-flavor raisins. *J. Agric. Food Chem.*, 44 (1996) 3294-3296
55. F. B. Whitfield, J. L. Hill, K. J. Shaw. 2,4,6-tribromoanisole: a potential cause of mustiness in packaged food. *J. Agric. Food Chem.*, 45 (3) (1997) 889-893
56. Bonnie Sue Pan, Jen Min Kuo, Chung May Wu "Flavor components in foods" dins Zdzislaw E. Sikorski (editor), *Chemical and functional properties of food components*. 3^{era} edició. Boca Ratón (Florida): CRC Press; 2007. Capítol 11, 295-328
57. E. Cantergiani, H. Brevard, R. Amador, Y. Krebs, A. Fera Morales, C. Yeretzián. Characterisation of mouldy/earthy defect in green mexican coffe. *Eur. Food Res. Technol.*, 212 (2001) 648-657
58. T. P. Wampler. "Analysis of food volatiles using headspace-gas chromatographic techniques" dins R. Marsili (editor), *Techniques for analyzing food aroma*. 1^{era} edició. Nova York (USA): Marcel Decker, Inc; 1997. Capítol 2, 27-58
59. B. Kolb, L. S. Ettre. *Static Headspace -gas chromatography: Theory and Practice*. 2^{ona} edició. Hoboken (USA): John Wiley and Sons, Inc; 2006
60. F. Mangani, M. Maione, P. Palma. "GC-MS analysis of halocarbons in the environment" dins P. R. Brown, E. Grushka (editors), *Advances in Chromatography*. 1^{era} edició. Nova York (USA): Marcel Decker, Inc; 2003. Volum 42, Capítol 4, 139-240
61. G. C. Slack, N. H. Snow, D. Kou "Extraction of volatile organic compounds from solids and liquids" dins S. Mitra (editor), *Sample preparation techniques in Analytical Chemistry*. 1^{era} edició. New Jersey: (USA) John Wiley and Sons, Inc; 2003. Capítol 4, 194-226
62. L. Pillonel, J. O. Bosset, R. Tabacchi. Rapid preconcentration and enrichment techniques for the analysis of food volatile. A review. *Labensm.-Wiss. U.-Technolog.*, 35 (2002) 1-14
63. E. Baltussen, C. A. Cramers, P. J. F. Sandra. Sorptive sample preparation -a review. *Anal. Bioanal. Chem.*, 373 (2002) 3-22
64. J. Jäger, J. Diekmann, D. Lorenz, L. Jakov. Cork-borne bacteria and yeasts as potential producers of off-flavours in wine. *Aust. J. Grape Wine Res.*, 2 (1996) 35-41
65. N. Campillo, N. Aguinaga, P. Viñas, I. López García, M. Hernández Córdoba. Purgue-and-trap preconcentration system coupled to capillary gas

- chromatography with atomic emission detection for 2,4,6-trichloroanisole determination in cork stoppers and wines. *J. Chromatogr. A*, 1061 (2004) 85-91
66. M. Careri, V. Mazzoleni, M. Musci, R. Molteni. Effects of electron beam irradiation on cork volatile compounds by gas-chromatography-mass spectrometry. *Chromatographia*, 49 (3/4) (1999) 166-172
67. A. Salemi, S. Lacorte, H. Bagheri, D. Barceló. Automated trace determination of earthy-musty odorous compounds in water samples by on-line purge-and-trap-gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, 1136 (2006) 170-175
68. D. Kou, S. Mitra "*Extraction of semivolatile organic compounds from solid matrices*" dins S. Mitra (editor), *Sample preparation techniques in Analytical Chemistry*. 1^{era} edició. Nova Jersey (USA): John Wiley and Sons; 2003. Capítol 3, 139-193
69. A. A. Cliford "*Introduction to supercritical fluid extraction in analytical science*" dins E. D. Ramsey (editor), *Analytical supercritical fluid extraction techniques*. 1^{era} edició. Dordrecht (Holanda): Kluwer Academic Publishers; 1998. Capítol 1, 1-42
70. S. M. Hitchen, J. R. Dean "*Properties of supercritical fluid extraction*" dins J. R. Dean (editor), *Applications of supercritical fluid extraction in industrial analysis*. 1^{era} edició. Glasgow (Gran Bretanya): Blackie Academic and Profesional; 1993. Capítol 1, 1-11
71. M. d F. Alpendurada "*Polinuclear aromatic hidrocarbons in environmental materials: extraction by supercritical fluids extraction*" dins J. Cazes (editor), *Encyclopedia of Chromatography. Update suplement*. 1^{era} edició. Nova York (USA): Marcel Dekker; 2004. 224-228
72. M. K. Taylor, T. M. Young, C. E. Butzke, S. E. Ebeler. Supercritical fluid extraction of 2,4,6-trichloroanisole from cork stoppers. *J. Agric. Food Chem.*, 48 (2000) 2208-2211
73. P. Carabias-Martínez, E. Rodríguez Gonzalo, P. Revilla Ruiz, J. Hernández Méndez. Pressurized liquid extraction in the analysis of food and biological samples. *J. Chromatogr. A*, 1089 (2005) 1-17
74. J. J. Gómez Ariza, T. García Barrera, F. Lorenzo, A. Gustavo González. Optimisation of a pressurized liquid extraction method for haloanisoles in cork stoppers. *J. Chromatogr. A*, 540 (2005) 17-24
75. O. Ezquerro, A. Garrido López, M. T. Tena. Determination of 2,4,6-trichloroanisole and guaiacol in cork stoppers by pressurised fluid extraction and gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, 1102 (2006) 18-24
76. K. Ganzler, A. Salgo, K. Valjo. Microwave extraction: A novel sample preparation method for chromatography. *J. Chromatogr. A*, 271 (1986) 299-306

77. K. Ganzler, I. Szinai, A. Salgo. Effective sample preparation method for extracting biologically active compounds from different matrices by a microwave technique. *J. Chromatogr. A*, 520 (1990) 257-262
78. J. R. Dean. *Methods for environmental trace analysis*. 1^{era} edició. Chichester (Anglaterra): John Wiley and sons; 2003. Capítol 7, 107-140
79. M. J. M. Wells "Principles of extraction and the extraction of semivolatile organics from solid matrices" dins S. Mitra (editor), *Sample preparation techniques in Analytical Chemistry*. Nova Jersey (USA): John Wiley and Sons; 2003. Capítol 3, 139-182
80. J. R. Dean, N. Saim "Modern alternatives to supercritical fluid extraction" dins E. D. Ramsey (editor), *Analytical supercritical fluid extraction techniques*. 1^{era} edició. Dordrecht (Holanda): Kluwer Academic Publishers; 1998. Capítol 10, 392-417
81. G. Cravotto, L. Boffa, S. Mantegna, P. Parego, M. Avogadro, P. Cintas. Improved extraction of vegetable oils under high-intensity ultrasound and/or microwaves. *Ultrason. Sonochem.*, 15 (2008) 898-902
82. C. Pizarro, N. Pérez del Notario, J. M. González Sáiz. Optimisation of a microwave-assisted extraction method for the simultaneous determination of haloanisoles and halophenols in cork stoppers. *J. Chromatogr. A*, 1149 (2007) 138-144
83. J. Vestner, S. Fritsch, D. Rauhut. Development of a microwave assisted extraction method for the analysis of 2,4,6-trichloroanisole in cork stoppers by SIDA-SBSE-GC-MS. *Anal. Chim. Acta*, 660 (2010) 76-80
84. C. C. Grimm, S. W. Lloyd, J. A. Miller, A. M. Spanier "The analysis of food volatiles using direct thermal desorption" dins R. Marsili (editor), *Techniques for analyzing food aroma*. 1^{era} edició. Nova York (USA): Marcel Decker Inc; 1997
85. V. T. Das, T. G. Hartman, J. N. Manos, J. J. Manura, C. W. Baker "Automated, microprocessor controlled short path thermal desorption system for analysis of volatiles in foods" dins R. L. Rouseff, K. R. Cadwallader (editors), *Headspace analysis of foods and flavours*. 1^{era} edició. Nova York (USA): Kluwer Academic; 2001. Volum 488, Capítol 16, 187-213
86. A. Olano, I. Martínez Castro "Nonenzymatic browning" dins L. M. L. Nollet (editor), *Handbook of food analysis. Methods and instruments in applied food analysis*. 2^{ona} edició. Nova York (USA): Marcel Decker; 2004. Volume 3, Capítol 49, 1855-1890
87. G. Reineccius "Instrumental methods of analysis" dins A. J. Taylor, R. S. T. Linforth (editors), *Food flavour technology*. 2^{ona} edició. West Sussex (Gran Bretanya): Blackwell Publishing; 2010. Capítol 2, 229- 265
88. A. Hoffmann, W. R. Sponholz. "Direct thermal analysis of solids – a fast method for the determination of halogenated phenols and anisols in cork" dins P. Sandra, G. Devos (editors) *Global Analytical Solutions. Gerstel*. Riva del Garda (Itàlia): Sixteenth International Symposium on Capillary Chromatography; 27-30 de setembre de 1994

89. W. R. Sponholz, M. K. Grossmann, H. Muno, A. Hoffmann. The distribution of chlorophenols and chloroanisoles in cork and a microbiological method to prevent their formation. *Ind. Bevande*, 26 (1997) 602-607
90. O. S. Khow, S. Mitra. Pervaporation in chemical analysis. *J. Chromatogr. A*, 1217 (16) (2010) 2736-2746
91. F. U. Baig. "Pervaporation" dins N. N. Li, A. G. Fane, W. S. W. Ho, T. Matsuura (editors), *Advanced membrane technology and applications*. 1^{era} edició. Nova Jersey (USA): John Wiley and sons; 2008. Capítol 17, 469-487
92. M. D. Luque de Castro, J. L. Luque García. *Acceleration and automation of solid sample treatment*. 1^{era} edició. Amsterdam (Holanda): Elsevier Science; 2002. Capítol 4, 83-179
93. J. S. Watson. *Separation methods for waste and environmental applications*. 1^{era} edició. Nova York (USA): Marcel Decker Inc; 1999. Capítol 4, 347-382
94. J. L. Gómez Ariza, T. García Barrera, F. Lorenzo. Simultaneous determination, clean-up analysis of musty odorous compounds in wines by on-line coupling of a pervaporation unit to gas chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta*, 516 (2004) 165-170
95. J. L. Gómez Ariza, T. García Barrera, F. Lorenzo. Dynamic headspace coupled to pervaporation for the analysis of anisoles in wine by gas-chromatography-ion-trap tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, 1056 (2004) 243-247
96. M. Davis. "Wastewater treatment, advanced methods" dins J. J. Mcketta (editor), *Encyclopedia of chemical processing and design*. 1^{era} edició. Nova York (USA): Marcel Decker, Inc; 1998. Volum 65, 461-467
97. J. L. Gómez Ariza, T. García Barrera, F. Lorenzo. Analysis of anisoles in wines using pervaporation coupled to gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, 1049 (2004) 47-153
98. J. L. Gómez Ariza, T. García Barrera, F. Lorenzo, R. Beltrán. Use of multiple headspace solid-phase microextraction and pervaporation for the determination of off-flavours in wine. *J. Chromatogr. A*, 1112 (2006) 133-140
99. C. F. Poole. New trends in solid-phase extraction. *Trends Anal. Chem.*, 22 (6) (2002) 362-373
100. N. J. K Simpson. *Solid-phase extraction. Principles, techniques and applications*. 1^{era} edició Nova York (USA): Mercel Decker, Inc; 2000
101. N. Masqué, R. M. Marcé, F. Borrull. New polymeric and other types of sorbents for solid-phase extraction and polar organic micropollutants from environmental water. *Trends Anal. Chem.*, 17 (6) (1998) 384-394

102. M. J. Telepchack, T. F. August, G. Chaney. *Forensic and clinic applications of solid phase extraction*. 1^{era} edició. Nova Yersey (USA): Humana Press, Inc; 2004
103. G. J. Soleas, J. Yan, T. Seaver, D. M. Goldberg. Method for the gas chromatography assay with mass selective detection of trichloro compounds in corks and wines applied to elucidate the potential cause of cork taint. *J. Agric. Food Chem.*, 50 (2002) 1032-1039
104. S. Insa, E. Anticó, V. Ferreira. Highly selective solid-phase extraction and large volume injection for the robust gas chromatography-mass spectrometry analysis of TCA and TBA in wines. *J. Chromatogr. A*, 1089 (2005) 235-242
105. A. Martínez Uruñuela, I. Rodríguez, R. Cela, J. M. González Sáiz, C. Pizarro. Development of a solid-phase extraction method for the simultaneous determination of chloroanisoles and chlorophenols in red wine using gas chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta*, 549 (2005) 117-123
106. S. Jönsson, J. Hagberg, B. van Bavel. Determination of 2,4,6-trichloroanisole and 2,4,6-tribromoanisole in wine using microextraction in packed syringe and gas chromatography-mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.*, 56 (2008) 4962-4967
107. Z. Zhang, J. Pawliszyn. Headspace solid-phase microextraction. *Anal. Chem.*, 65 (1993) 1843-1852
108. J. Pawliszyn. *Solid phase microextraction. Theory and Practice*. 1^{era} edició. Nova York (USA): Wiley-VCH, Inc; 1997
109. H. Prosen, L. Zupancic-Kralj. Solid-phase microextraction. *Trends Anal. Chem.*, 18 (4) (1999) 272-281
110. C. L. Arthur, J. Pawliszyn. Solid-phase microextraction with thermal desorption using fused silica fibers. *Anal. Chem.*, 62 (1990) 2145-2148
111. P. A. Martos, J. Pawliszyn. Sampling and determination of formaldehyde using solid-phase microextraction with on-fiber derivatization. *Anal. Chem.*, 70 (1998) 2311-2320
112. C. L. Arthur, L. M. Killan, K. D. Buchholz, J. Pawliszyn. Automation and optimization of solid-phase microextraction. *Anal. Chem.*, 64 (1992) 1960-1966
113. Y. Chen, J. Pawliszyn. Solid-phase microextraction field sampler. *Anal. Chem.*, 76 (2004) 6823-6828
114. H. Lord, J. Pawliszyn. Evolution of solid-phase microextraction technology. *J. Chromatogr. A*, 885 (2000) 153-193
115. J. Pawliszyn. "Quantitative determination of solid phase microextraction" dins J. Pawliszyn (editor), *Aplicacions of solid phase microextraction*. 1^{era} edició. Cambridge (Gran Bretanya): The Royal Society of Chemistry; 1999. Capítol 1, 3-22

116. H. Kataoka. Automated sample preparation using in-tube solid-phase microextraction and its application—a review. *Anal. Bional. Chem.*, 373 (2002) 31-45
117. R. Eisert, J. Pawliszyn. Automated in-tube solid-phase microextraction coupled to high-performance liquid chromatography. *Anal. Chem.*, 69 (1997) 3140-3147
118. Z. Zhang, J. Pawliszyn. Headspace solid-phase microextraction. *Anal. Chem.*, 65 (1993) 1843-1852
119. J. Ai. Solid phase microextraction for quantitative analysis in nonequilibrium situations. *Anal. Chem.*, 69 (1997) 1230-1236
120. J. Ai. Solid-phase microextraction in headspace analysis. Dynamics in non-steady-state mass transfer. *Anal. Chem.*, 70 (1998) 4822-4826
121. A. Saraullo, P. A. Martos, J. Pawliszyn. Water analysis by solid phase microextraction based on physical chemical properties of the coating. *Anal. Chem.*, 69 (1997) 1992-1998
122. Y. Chen, J. Pawliszyn. Kinetics and the on-site applications of standards in a solid-phase microextraction fiber. *Anal. Chem.*, 76 (2004) 5807-5815
123. D. De la Calle García, M. Reichenbächer, K. Danzer. Investigations on wine bouquet components by solid-phase microextraction-capillary gas chromatography (SPME-CGC) using different fibers. *J. High Resol. Chromatogr.*, 20 (1997) 665-668
124. H. Kataoka, H. L. Lord, J. Pawliszyn. Applications of solid-phase microextraction in food analysis. *J. Chromatogr. A*, 880 (2000) 35-62
125. V. Mani. *"The applications of SPME to pesticides residues analysis"* dins H. Lord, J. Pawliszyn. *Applications of solid-phase microextraction in food analysis*. 1^{era} edició. Cambridge (Gran Bretanya): The Royal Society of Chemistry; 1999. Capítol 5, 57-60
126. M. Mestres, C. Sala, M. P. Martí, O. Busto, J. Guasch. Headspace solid-phase microextraction of sulphides and disulphides using Carboxen-polydimethylsiloxane fibers in the analysis of wine aroma. *J. Chromatogr. A*, 849 (1999) 293-297
127. Alan D. Harmon. *"Solid-phase microextraction for the analysis of flavors"* dins R. Marsili (editor), *Techniques for analyzing food aroma*. 1^{era} edició. Nova York (USA): Marcel Decker Inc; 1997. 81-112
128. B. Page, G. J. Lacroix. Applications of solid-phase microextraction to the headspace gas chromatographic analysis of halogenated volatiles in selected foods". *J. Chromatogr. A*, 648 (1993) 199-211
129. Z. Zhang, J. Pawliszyn. Quantitative extraction using internally cooled solid-phase microextraction device. *Anal. Chem.*, 67 (1995) 34-43

130. R. Eisert, J. Pawliszyn. New trends in solid-phase microextraction. *Crit. Rev. Anal. Chem.*, 27 (1997) 103-135
131. J. Ai. Solid-phase microextraction for quantitative analysis in nonequilibrium situations. *Anal. Chem.*, 69 (1997) 1230-1236
132. J. Ai. Headspace solid-phase microextraction. Dynamics and quantitative analysis before reaching a partition equilibrium. *Anal. Chem.*, 69 (1997) 3260-3266
133. F. Augusto, E. Carasek, R. Gomes Costa Silva, S. Regina Rivellino, A. Domingues Batista, E. Martendal. New sorbents for extraction and microextraction techniques. *J. Chromatogr. A*, 1217 (16) (2009) 2533-2542
134. L. Setkova, S. Risticovic, J. Pawliszyn. Rapid headspace solid-phase microextraction-gas chromatographic-time-of-flight mass spectrometric method for qualitative profiling of ice wine volatile fraction II: Classification of Canadian and Czech ice wines using statistical evaluation of the data. *J. Chromatogr. A*, 1147 (2007) 224-240
135. Recent developments in SPME. http://www.sigmaaldrich.com/etc/medialib/docs/Sigma/General_Information/spme_recent_developments.Par.0001.File.tmp/spme_recent_developments.pdf (10 agost de 2010)
136. L. Tat, P. Comuzzo, I. Stolfo, F. Battistutta. Optimization of wine headspace analysis by solid-phase microextraction capillary gas chromatography with mass spectrometric and flame ionization detection. *Food Chem.*, 93 (2005) 361-369
137. R. S. Whiton, B. W. Zoecklein. Optimization of headspace solid-phase microextraction for analysis of wine aroma compounds. *Am. J. Enol. Vitic.* 51 (4) (2000) 379-382
138. S. Rocha, V. Ramalheira, A. Barros, I. Delgadillo, M. A. Coimbra. Headspace solid phase microextraction (SPME) analysis of flavor compounds in wines. Effect of the matrix volatile composition in the relative response factors in wine model. *J. Agric. Food Chem.*, 49 (2001) 5142-5151
139. A. Fromberg, T. Nilsson, B. Richter Larsen, L. Montanerella, S. Facchetti, J. Øgarrd Madsen. Analysis of chloro- and nitroanilines and -benzenes in soils by headspace solid-phase microextraction. *J. Chromatogr. A*, 746 (1996) 71-81
140. Z. Zhang, J. Pawliszyn. Analysis of organic compounds in environmental samples by headspace solid phase microextraction. *J. High Resol. Chromatogr.*, 16 (1993) 689-692
141. M. R. Lee, R. J. Lee, Y. W. Lin, C. M. Chen, B. H. Hwang. Gas-phase postderivatization following solid-phase microextraction for determining acidic herbicides in water. *Anal. Chem.*, 70 (1998) 1963-1968

142. A. Díaz, F. Ventura, M. T. Galcerán. Determination of odorous mixed chloro-bromoanisoles in water by solid-phase microextraction and gas-chromatography-mass detection. *J. Chromatogr. A*, 1064 (2005) 97-106
143. J. A Ruiz, J. Quilez, M. Mestres, J. Guasch. Solid-phase microextraction method for headspace analysis of volatile compounds in bread crumb. *Cereal Chem.*, 80 (3) (2003) 255-259
144. M. Rong Lee, R. J. Lee, Y. W. Lin, C. M. Chen, B. H. Hwang. Gas-phase postderivatization following solid-phase microextraction for determining acidic herbicides in water. *Anal. Chem.*, 70 (1998) 1963,1968
145. M. Mestres, M. P. Martí, O. Busto, J. Guasch. Analysis of low-volatility organic sulphur compounds in wines by solid-phase microextraction and gas chromatography. *J. Chromatogr. A*, 881 (2000) 583-590
146. M. Mestres, O. Busto, J. Guasch. Application of headspace solid-phase microextraction to the determination of sulphur compounds with low volatility in wines. *J. Chromatogr. A*, 945 (2002) 211-219
147. J. J. Rodríguez Bencomo, J. E. Conde, F. García Montelongo, J. Pérez Trujillo. Determination of major compounds in sweet wines by headspace solid-phase microextraction and gas chromatography. *J. Chromatogr. A*, 991 (2003) 13-22
148. R. J. Bartelt. Calibration of a commercial solid-phase microextraction device for measuring headspace concentrations of organic volatiles. *Anal. Chem.*, 69 (1997) 364-372
149. K. Sukola, J. Koziel, F. Augusto, J. Pawliszyn. Diffusion-based calibration for SPME analysis of aqueous samples. *Anal. Chem.*, 73 (2001) 13-18
150. J. Ruiz, R. Cava, J. Ventanas, M. T. Jensen. Headspace solid phase microextraction for the analysis of volatiles in a meat product: dry-cured iberian ham. *J. Agric. Food Chem.*, 46 (1998) 4688-4694
151. E. Y. Zeng, J. A. Noblet. Theoretical considerations on the use of solid-phase microextraction with complex environmental samples. *Environ. Sci. Technol.*, 36 (2002) 3385-3392
152. S. Hawthorne, D. Miller, J. Pawliszyn. Solvent-less determination of caffeine in beverages using solid-phase microextraction with fused-silica fibers. *J. Chromatogr. A*, 603 (1992) 185-191
153. V. Pino, J. H. Ayala, V. González, A. M. Alfonso. Solid-phase microextraction coupled to gas chromatography/mass spectrometry for determining polycyclic aromatic hydrocarbon-micelle partition coefficients. *Anal. Chem.*, 76 (2004) 4572-4578

154. M. Correia, C. Delerue Matos, A. Alves. Development of a SPME-GC-ECD methodology for selected pesticides in must and wine samples. *Fresenius J. Anal. Chem.*, 369 (2001) 647-651
155. C. Sala, M. Mestres, M. P. Martí, O. Busto, J. Guasch. Headspace solid-phase microextraction method for determining 3-alkyl-2-methoxypyrazines in musts by means of polydimethylsiloxane-divinylbenzene fibres. *J. Chromatogr. A*, 880 (2000) 93-99
156. D. De la Calle, S. Magnaghi, M. Reichenbacher, Klaus Danzer. Systematic optimization of the analysis of wine bouquet components by solid-phase microextraction. *J. High Resol. Chromatogr.*, 19 (1996) 257-262
157. L. Urruty, M. Montury. Influence of ethanol on pesticide extraction in aqueous solutions by solid-phase microextraction. *J. Agric. Food Chem.*, 44 (1996) 3871-3877
158. O. Ezquerro, B. Pons, M. T. Tena. Evaluation of multiple solid-phase microextraction as a technique to remove the matrix effect in packaging analysis for determination of volatile compounds. *J. Chromatogr. A*, 1020 (2003) 189-197
159. D. De la Calle García, M. Reichenbacher, K. Danzer, C. Hurlbeck, C. Bartzsch, K. Heinz Feller. Use of solid-phase microextraction-capillary-gas-chromatography (SPME-CGC) for the varietal characterization of wines by means of chemometrical methods. *Fresenius J. Anal. Chem.*, (1998) 784-787
160. O. Ezquerro, M. T. Tena. Determination of odor-causing volatile organic compounds in cork stoppers by multiple headspace solid-phase microextraction. *J. Chromatogr. A*, 1068 (2005) 201-208
161. A. Martínez Uruñuela, J. M. González Sáiz, C. Pizarro. Multiple solid-phase microextraction in a non-equilibrium situation. Application in quantitative analysis of chlorophenols and chloroanisoles related to cork taint in wine. *J. Chromatogr. A*, 1089 (2005) 31-38
162. C. Pizarro, N. Pérez del Notario, J. M. González Sáiz. Multiple headspace solid-phase microextraction for eliminating matrix effect in the simultaneous determination of haloanisoles and volatile phenols in wines. *J. Chromatogr. A*, 1166 (2007) 1-8
163. Thomas J. Evans, Christian Butzke, Susan E. Ebeler. Analysis of 2,4,6-trichloroanisole in wines by using solid-phase microextraction coupled to gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, 786 (2) (1997) 293-298
164. C. E. Butzke, T. J. Evans, S. E. Ebeler. "*Detection of cork taint in wine using automated solid-phase microextraction in combination with GC/MS-SIM*" dins A. L. Waterhouse, S. E. Ebeler (editor), *Chemistry of wine flavour*. 1^{era} edició. San Francisco (USA): American Chemistry Society; 1999. Capítol 5, 209-215

165. C. Fisher, U. Fisher. Analysis of cork taint in wine and cork material at olfactory subthreshold levels by solid-phase microextraction. *J. Agric. Food Chem.*, 45 (1997) 1995-1997
166. G. Michel. Dosage des chloroanisoles dans les vins par microextraction en phase solide (S.P.M.E.) et chromatographie gazeuse avec détection en capture d'électrons (GC/ECD 63 Ni). *Rev. Oenol.*, 82 (1999) 24-26
167. U. Frey, J. L. Luisier. Chemistry at the Haute Ecole Valaisanne: Recent developments in the analytical field. *Chimia*, 54 (12) (2000) 771-772
168. M. Riu, M. Mestres, O. Busto, J. Guasch. Determination of 2,4,6-trichloroanisole in wines by head-space solid-phase microextraction and gas chromatography-electron-capture-detection. *J. Chromatogr. A*, 977 (2002) 1-8
169. R. Alzaga, L. Ortiz, F. Sánchez Baeza, M. P. Marco, J. M. Bayona. Accurate determination of 2,4,6-trichloroanisole in wines at low parts per trillion by solid-phase microextraction followed by GC-ECD. *J. Agric. Food Chem.*, 51 (2003) 3509-3514
170. F. Bianchi, M. Careri, A. Mangia, M. Musci. Optimization of headspace sampling using solid-phase microextraction for chloroanisoles in cork stoppers and gas chromatography-ion-trap-tandem mass spectrometric analysis. *J. Sep. Sci.*, 26 (2003) 369-375
171. A. Martínez Uruñuela, J. M. González Sáiz, C. Pizarro. Optimisation of a headspace solid-phase microextraction method for the direct determination of chloroanisoles related to cork taint in red wine. *J. Chromatogr. A*, 1056 (2004) 49-56
172. E. Lizarraga, A. Irigoyen, V. Belsue, E. González Peñas. Determination of chloroanisole compounds in red wine by headspace solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, 1052 (2004) 145-149
173. M. Hall, N. Byrd, J. Williams. An assessment of the effect of the ROSA treatment on the level of TCA in naturally-contaminated cork granules. *Aust. N. Z. Grapegrower Winemaker*, 484 (2004) 57-59
174. S. López Vidal, L. Arce. Optimisation of a headspace solid-phase microextraction procedure for the determination of 2,4,6-trichloroanisole and various related compounds in cork washing waste water by use of a gas chromatography-mass spectrometry. *Chromatographia* 62 (9/10) (2005) 527-530
175. R. Juanola, D. Subirà, V. Salvadó, J. A. García, Regueiro, E. Anticó. Migration of 2,4,6-trichloroanisole from cork stoppers to wine. *Eur. Food Res. Technol.*, 220 (2005) 347-352

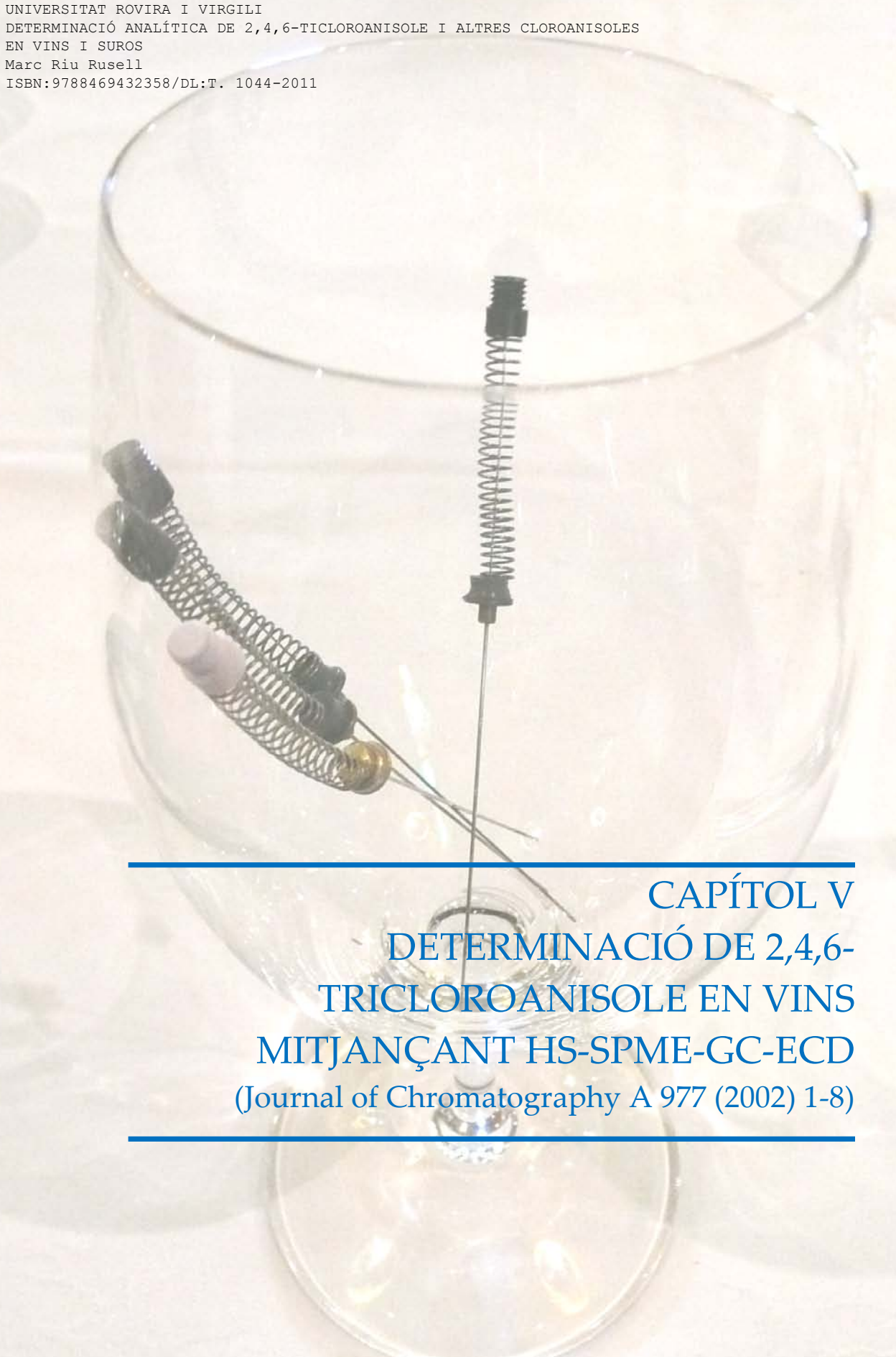
176. M. Riu, M. Mestres, O. Busto, J. Guasch. Quantification of chloroanisoles in cork using headspace solid-phase microextraction and gas chromatography with electron capture detection. *J. Chromatogr. A*, 1107 (2006) 240-247
177. M. Riu, M. Mestres, O. Busto, J. Guasch. Determination of total chloroanisoles in different kinds of cork stoppers. *Anal. Chim. Acta*, 563 (2006) 310-314
178. S. Jönsson, T. Uusitalo, B. van Bavel, I. B. Gustafsson, G. Lindström. Determination of 2,4,6-trichloroanisole and 2,4,6-tribromoanisole on ng L⁻¹ levels in wine by solid-phase microextraction and gas chromatography-high-resolution mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, 1111 (2006) 71-75
179. E. Carasek, E. Cudjoe, J. Pawliszyn. Fast and sensitive method to determine chloroanisoles in cork using an internally solid-phase microextraction fiber. *J. Chromatogr. A*, 1138 (2007) 10-17
180. M. Riu, M. Mestres, O. Busto, J. Guasch. Comparative study of two chromatographic methods for quantifying 2,4,6-trichloroanisole in wines. *J. Chromatogr. A*, 1138 (2007) 18-25
181. S. Boutou, P. Chatonnet. Rapid headspace solid-phase microextraction/gas chromatographic/mass spectrometric assay for the quantitative determination of some of the main odorants causing off-flavours in wine. *J. Chromatogr. A*, 1141 (2007) 1-9
182. C. Pizarro, N. Pérez del Notario, J. M. González Sáiz. Optimisation of a headspace solid-phase microextraction with on-fiber derivatization method for the direct determination of haloanisoles and halophenols in wine. *J. Chromatogr. A*, 1143 (2007) 26-35
183. P. Vlachos, A. Kampioti, M. Kornaros, G. Lyberatos. Matrix effect during the application of a rapid method using HS-SPME followed by GC-ECD for the analysis of 2,4,6-trichloroanisole in wine and cork soaks. *Food Chem.*, 105 (2007) 681-690
184. C. Pizarro, A. Martínez Uruñuela, N. Pérez del Notario, J. M. González Sáiz. Robustness test of a headspace solid-phase microextraction method for the determination of chloroanisoles and chlorophenols related to cork taint in wine using experimental design. *J. Chromatogr. A*, 1208 (2008) 54-61
185. N. Campillo, R. Peñalver, M. Hernández Córdoba. Solid-phase microextraction for the determination of haloanisoles in wines and other alcoholic beverages using gas chromatography and atomic emission detection. *J. Chromatogr. A*, 1210 (2008) 222-228
186. L. Maggi, A. Zalacain, V. Mazzoleni, G. L. Alonso, M. R. Salinas. Comparison of stir bar sorptive extraction and solid-phase microextraction to determine halophenols

- ans haloanisoles by gas chromatography-ion trap tandem mass spectrometry. *Talanta*, 75 (2008) 753-759
187. D. Budziak, E. Martendal, E. Carasek. Application of robust NiTi-ZrO₂-PEG SPME fiber in the determination of haloanisoles in cork stopper samples. *Anal. Chim. Acta* 629 (2008) 92-97
188. G. Giannikopoulos, F. B. Whitfield. Preparation and application of 2,4,6-tribromo-[¹³C₆]-anisole for the quantitative determination of 2,4,6-tribromoanisole in wine. *Food Chem.*, 113 (2009) 307-312.
189. D. Özhan, R. E. Anli, N. Vural, M. Bayram. Determination of chloroanisoles and chlorophenols in cork and wine by using HS-SPME and GC-ECD. *J. Inst. Brew.*, 115 (1) (2009) 71-77
190. C. Macku, L. González, C. Schleussner, A. C. Mesquita, J. W. Herwatt, L. C. Kirch, R. J. Scharwartz. Sensory screening for large-format natural corks by "dry soak" testing and its correlation to head-space solidphase microextraction (SPME) gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS) releasable trichloroanisole (TCA) analysis. *J. Agric. Food Chem.*, 57 (2009) 7962-7968
191. E. Baltussen, P. Sandra, F. David, C. Cramers. Stir bar sorptive extraction (SBSE), a novel extraction technique for aqueous samples; theory and principles. *J. Microcolumn Sep.*, 11 (1999) 737-747
192. F. David, P. Sandra. Stir bar sorptive extraction for trace analysis. *J. Chromatogr. A*, 1152 (2007) 54-69
193. A. Prieto, O. Besauri, R. Rodil, A. Usobiaga, L. A. Fernández, N. Etxebarria, O. Zuloaga. Stir-bar sorptive extraction: A view on method optimisation, novel applications, limitations and potential solutions. *J. Chromatogr. A*, 1217 (16) (2010) 2642-2666
194. N. Ochiai, K. Sasamoto, M. Takino, S. Yamashita, S. Daishima, A. Heiden, A. Hoffman. Determination of trace amounts of off-flavor compounds in drinking water by stir bar sorptive extraction and thermal desorption. *Analyst*, 126 (2001) 1652-1657
195. A. Hoffmann, W. R. Sponholz, F. David, P. Sandra. Corkiness in wine- trace analysis of 2,4,6-trichloroanisole by stir bar sorptive extraction (SBSE) and thermal desorption GC/MS. *Global Analytical Solutions (Gerstel), AppNote 3/2000* (2000)
196. Y. Hayasaka, K. MacNamara, G. A. Baldock, R. L. Taylor, A. P. Pollnitz. Application of stir bar sorptive extraction for wine analysis. *Anal. Bioanal. Chem.*, 375 (2003) 948-955
197. A. Zalacain, G. L. Alonso, C. Lorenzo, M. Iñiguez, M. R. Salinas. Stir bar sorptive extraction for the analysis of wine cork taint. *J. Chromatogr. A*, 1033 (2004) 173-178

198. C. Frank, F. David, G. de Revel. Multi-residue off-flavour profiling in wine using stir bar sorptive extraction-thermal desorption-gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, 1216 (2009) 3318-3327
199. C. Lorenzo, A. Zalacain, G. L. Alonso. M. R. Salinas. Non destructive method to determine halophenols and haloanisoles in cork stoppers by headspace sorptive extraction. *J. Chromatogr. A*, 114 (2006) 250-254
200. R. M. Callejón, A. M. Troncoso, M. L. Morales. Analysis of chloroanisoles and chlorophenols in cork by stir bar sorptive extraction and gas chromatography-mass spectrometry. *Talanta*, 71 (2007) 2092-2097
201. A. L. Theis, A. J. Waldack, S. M. Hansen, M. A. Jeannot. Headspace solvent microextraction. *Anal. Chem.*, 73 (2001) 5651-5654
202. E. Martendal, D. Budziak, E. Carasek. Application of fractional factorial experimental and Box-Behnken designs for optimization of single-drop microextraction of 2,4,6-trichloroanisole and 2,4,6-tribromoanisole from wine samples. *J. Chromatogr. A*, 1148 (2007) 131-136
203. H. M. McNair, J. M. Miller. *Basic gas chromatography*. 2^{ona} edició. Hoboken (USA): John Wiley and sons; 2009
204. E. Hoh, K. Mastovska. Large volum injection techniques in capillary gas chromatography. *J. Chromatogr. A*, 1186 (2008) 2-5
205. M. H. Gordon. *Principles and applications of gas chromatography in food analysis*. 1^{era} edició. Chichester (Gran Bretanya): Ellis Horwood series in food analysis; 1990
206. J. Willet. "Gas Chromatography" dins D. Kealey (editor), *Analytical Chemistry by Open Learning*. 1^{era} edició. Chichester (Gran Bretanya): John Wiley and sons; 1987
207. M. Valcárcel Cases, A. Gómez Henz. *Técnicas Analíticas de Separación*. 1^{era} edició. Barcelona (Catalunya): Editorial Reverté, S.A.; 1988. Capítol 11, 615-654
208. M. Dressler. *Selective gas chromatographic detectors*. 1^{era} edició. Amsterdam (Holanda): Elsevier Science Publishers B.V.; 1986. Journal of Chromatography Library, Volum 36, Capítol 11, 217-274
209. W. M. A. Niessen. *Current practice of gas chromatography-mass spectrometry*. 1^{era} edició. Basel (Suïssa): Marcel Decker AG. Basel; 2001. Chromatographic science series. Volume 86
210. R. L. Grob, E. F. Barry. *Modern practice of gas chromatography*. 4^{arta} edició. Hoboken (USA): John Wiley and sons; 2004
211. M. C. MacMaster. *GC/MS a practical user's guide*. 2^{ona} edició. Hoboken (USA): John Wiley and sons; 2008

212. L. L. P. Van Stee, U. A. Th. Brinkman. Developments in the application of gas-chromatography with atomic emission (plus mass spectrometric) detection. *J. Chromatogr. A*, 1186 (2008) 109-122
213. C. B. Boss, K. J. Fredeen. *Concepts, instrumentation and techniques in inductively coupled plasma optical emission spectrometry*. 3^{era} edició. San Jose (USA): Perkin Elmer; 2004
214. A. Vidal. Olors i perfums. *Diònyos*, 2 (2002) 45-49
215. A. R. Newman. Electronic noses. *Anal. Chem.*, 63 (10) (1991) 585 A-588 A
216. G. Ohloff. *Scent and fragrances*. 1^{era} edició. Berlín (Alemanya): Springer-Verlag; 1994
217. J. W. Gardner, P. N. Bartlett. A brief history of electronic noses. *Sens. Actuat. B*, 18-19 (1994) 211-220
218. J. F. Jackson. "Molecular biology of taste and aroma receptors: implications for taste and aroma". dins J. F. Jackson, H. F. Linskens (editors), *Analysis of taste and aroma*. 1^{era} edició. Berlín (Alemanya): Springer-Verlag; 2002. Molecular methods of plant analysis, Volum 21, Capítol 1,1-6
219. J. C. Leffingwell. *Olfaction—a review*-. Leffingwell and associates. <http://www.leffingwell.com/olfaction.htm> (10 d'agost de 2010)
220. M. P. Martí, M. Mestres, O. Busto, J. Guasch. Aplicación de la nariz electrónica en el control de calidad de vinos. *Alim. Equip. Tecnol.*, (2000) 129-133
221. J. Oullette. Electronic noses sniff out new markets. *The Industrial Physicist*, Febrer (1999) 26-29
222. F. Röck, N. Barsan, U. Weimar. Electronic nose: Current status and future trends. *Chem. Rev.*, 108 (2008) 708-725
223. E. Llobet, J. Brezmes, X. Vilanova, X. Correig. Sistemas de olfato electrónico. Estado y perspectivas de futuro. *Mundo electrónico*, (1998) 64-68
224. P. Mielle. Electronic noses: Towards the objective instrumental characterization of food aroma. *Trends Food Sci. Technol.*, 7 (1996) 432-438
225. B. Dittmann, S. Nitz, G. Horner. A new chemical sensor on a mass spectrometric basis. *Adv. Food Sci (CTML)*, 20 (3/4) (1998) 115-121
226. S. Nitz. Quality control and authenticity profiling of foods with a mass spectrometry based chemical sensor. *New Food*, (1999) 34-37
227. S. Nitz, B. Diettmann, H. Parlar, G. Horner. "A new chemical sensor on a mass spectrometric basis—development and applications" dins W. J. Hurst (editor), *Electronic noses and sensor array based systems*. 1^{era} edició. Lancaster (USA): Technomic Publishing Company Inc; 1999. 185-197

228. M. Pilar Martí, Olga Busto, Josep Guasch. Application of a headspace mass spectrometry system to the differentiation and classification of wines according to their origin, variety and ageing. *J. Chromatogr. A* 1057 (2004), 211-217
229. S. Rocha, I. Delgadillo, A. J. Ferrer Correia, A. Barros, P. Wells. Application of an electronic sensing system to cork stopper quality control. *J. Agric. Food Chem.* 46 (1998), 145-151
230. J. P. Santos, J. Lozano, M. Aleixandre, I. Sayago, M. J. Fernández, L. Arés, J. Gutiérrez, M. C. Horrillo. Discrimination of different aromatic compounds in water, ethanol and wine with a thin film sensory array. *Sens. Actuat. B*, 103 (2004) 98-103
231. J. A. Ragazzo-Sánchez, P. Chalier, D. Chavelier Lucia, M. Calderon Santoyo, C. Ghommidh. Off-flavours detection in alcoholic beverages by electronic nose coupled to GC. *Sens. Actuat. B*, 140 (2009) 29-34
232. John R. Crowther. *The ELISA Guidebook*. 1^{era} edició. Totawa (USA): Humana Press, Inc; 2001. *Methods in Molecular Biology*, Volume 149
233. M. Quan, M. Riu, N. Barda Sánchez, H. Heymann, S. E. Ebeler. ELISA screening assay for identifying mold contamination in cork closures and correlation with TCA level. 2004 ASEV 55th Annual Meeting Abstracts. *Am. J. Enol. Vitic.*, 55(3) (2004) 312A
234. N. Sanvicens, F. Sánchez-Baeza, M. P. Marco. Immunochemical determination of 2,4,6-trichloroanisole as the responsible agent for the musty odor in foods. 1. Molecular modeling studies for antibody production. *J. Agric. Food Chem.*, 51 (2003) 3924-3931
235. N. Sanvicens, F. Sánchez-Baeza, M. P. Marco. Immunochemical determination of 2,4,6-trichloroanisole as the responsible agent for the musty odor in foods. 2. Immunoassay evaluation. *J. Agric. Food Chem.*, 51 (2003) 3932-3929
236. E. Moore, M. Pravda, G. Guilbault. Development of a biosensor for the qualitative detection of 2,4,6-trichloroanisole using screen printed polymers. *Anal. Chim. Acta*, 484 (2003) 15-24
237. N. Sanvicens, E. J. Moore, G. G. Guilbault, M. P. Marco. Determination of haloanisoles in white wine by immunosorbent solid-phase extraction followed by enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Agric. Food Chem.*, 54 (2006) 9176-918



CAPÍTOL V
DETERMINACIÓ DE 2,4,6-
TRICLOROANISOLE EN VINS
MITJANÇANT HS-SPME-GC-ECD
(Journal of Chromatography A 977 (2002) 1-8)

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
DETERMINACIÓ ANALÍTICA DE 2,4,6-TRICLOROANISOLE I ALTRES CLOROANISOLES
EN VINS I SUROS
Marc Riu Rusell
ISBN:9788469432358/DL:T. 1044-2011

1.- INTRODUCCIÓ

El Grup de Recerca de Química Analítica Enològica i dels Aliments es va plantejar entrar en l'estudi de l'olor a humitat en vins i suros arran de la importància d'aquest defecte en el món enològic, el qual reclamava trobar solucions, ja fossin en mesures per evitar el problema o mètodes analítics capaços de determinar els compostos responsables de manera exacta i precisa en aquestes matrius tan diferenciades. En el moment d'iniciar aquesta Tesi Doctoral, a la literatura científica no hi havia cap mètode analític validat que permetés assolir aquest objectiu. Donada l'experiència del grup en l'anàlisi de diferents compostos volàtils de l'aroma del vi tot utilitzant la microextracció en fase sòlida i els bons resultats obtinguts, aquesta tècnica de separació i concentració es plantejava com una bona opció per a la determinació dels cloroanisoles en vins i suros.

La posada a punt d'un mètode de determinació de 2,4,6-tricloroanisol (TCA) en vins (blancs, rosats i negres) utilitzant la tècnica de microextracció en fase sòlida (SPME) de l'espai de cap (HS) seguida d'una separació cromatogràfica i detecció amb captura electrònica (ECD) va constituir el primer repte. Aquest es va assolir tot utilitzant un recobriment per la fibra de SPME de polidimetilsiloxà (PDMS) de 100 µm de gruix i optimitzant les diferents variables que intervenien en el procés d'extracció del TCA. Els bons resultats obtinguts van donar lloc al primer article d'aquesta Tesi, el qual s'adjunta al final d'aquest capítol.

En els següents paràgrafs es presenta una breu descripció dels principals paràmetres experimentals i de com es va procedir al seu estudi, per tal de clarificar i incidir sobretot en aquells punts que no han estat inclosos en l'esmentat l'article.

2.- PARÀMETRES EXPERIMENTALS

Els primers paràmetres experimentals considerats van ser els de caire cromatogràfic. Així, es va optar per la cromatografia de gasos amb detector de captura electrònica per la gran sensibilitat que oferia envers l'analit a estudiar. Una vegada escollit el patró intern més adequat, el 2,3,6-triclorotoluè (TCT), el següent pas fou la tria de la columna cromatogràfica. La que ens va oferir un millor rendiment fou una columna amb recobriment de polietilenglicol (Chrompack CP-Wax 57 CB, 50 m x 0,25 mm, 0,20 µm). Amb aquesta columna no només s'aconseguia una bona resolució entre els pics del patró intern i el TCA, sinó que la separació era bona per altres compostos d'interès, tal com es pot veure en la Figura V.1.

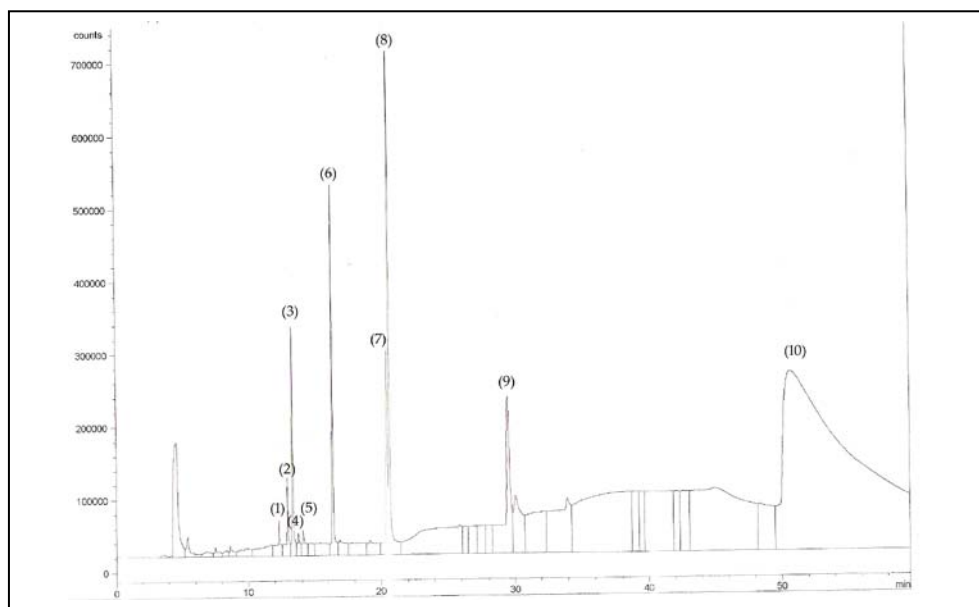


Figura V.1. Separació cromatogràfica. (1) 2,6-dicloroanisole (2) 2,3,6-triclorotoluè (3) 2,4,6-tricloroanisole (4) guaiacol (5) 2,4-dicloroanisole (6) 2,3,4,6-tetracloroanisole (7) 2,4,6-triclorofenol (8) 2,3,4,5,6-pentacloroanisole (9) 2,3,4,6-tetraclorofenol (10) 2,3,4,5,6-pentaclorofenol

Per tal de poder treballar amb una matriu similar a la del vi però constant en el temps (no es pot oblidar que el vi és una mostra viva) es va decidir elaborar un vi sintètic. Per fer-ho es va treballar amb una matriu simple que consistia en una

barreja d'aigua desionitzada amb un 12% d'alcohol i 3,5 g·l⁻¹ d'àcid tartàric. Finalment, el pH s'ajustà a 3,5.

Pel que fa a l'optimització de la tècnica de microextracció en fase sòlida (SPME) per a la determinació de TCA en vins, es varen provar diferents recobriments de fibres de SPME. L'elecció final estava entre dos tipus diferents: la de polidimetilsiloxà (PDMS) o la polidimetilsiloxà/divinilbenzè/carboxen (PDMS/DVB/CAR), les quals oferien dos rendiments diferenciats. Mentre que la de PDMS/DVB/CAR oferia millor resposta, la PDMS oferia millor precisió. En aquest cas, i tenint en compte l'experiència que s'havia adquirit en aquest tipus d'extraccions, es va decidir prioritzar la precisió, tot tenint en compte que la resposta que presentava la PDMS era suficient pels objectius marcats al principi (4% de desviació estàndard relativa per la PDMS enfront al 12% del recobriment PDMS/DVB/CAR).

Un cop triada la fibra, calgué avaluar les diferents variables que influeixen en la SPME: temperatura d'extracció, temps d'extracció, efecte salí i volum de mostra a utilitzar. Per tal d'estudiar-ne el seu efecte es va decidir emprar un disseny factorial complet, ja que amb un nombre mínim d'experiments es podria obtenir la màxima informació. Els resultats obtinguts, tal com es pot veure en l'article que es presenta a continuació, foren que totes les variables avaluades tenien efecte en l'extracció i que, per tant, caldria tenir-les en compte i optimitzar-les. Mentre que, a mesura que s'augmentava la temperatura, l'extracció disminuïa (a causa del procés exotèrmic de l'adsorció en la fibra), l'augment del temps d'extracció, de l'efecte salí i del volum de mostra utilitzada tenien un efecte positiu. Un augment del temps d'extracció permetia una adsorció creixent dels compostos d'interès. L'efecte salí també millorava l'extracció, fent que el TCA i el TCT fossin menys solubles en aigua i passessin més ràpidament i amb més quantitat a l'espai de cap. Calia treballar en la màxima quantitat de mostra, ja que així es disminuïa l'espai de cap, millorant d'aquesta manera l'extracció. L'optimització d'aquestes variables es va fer mitjançant un model Simplex, tot arribant a les condicions finals: 20 ml de mostra amb 5 M de NaCl i duent a terme l'extracció a 25°C durant 30 minuts.

Posteriorment, calgué avaluar el rang de treball i el possible efecte matriu. A l'hora d'estudiar el rang d'aplicabilitat del procediment es decidí estudiar un interval ampli, amb diferents concentracions de TCT i TCA, per tal de veure el seu rendiment, així com si presentaven un comportament similar. Per aquesta raó es seleccionà el rang de 25 ng·l⁻¹ a 1000 ng·. S'emprà vi sintètic i un vi blanc per dur a terme aquest estudi, els resultats del qual es poden veure en la Figura V.2. Tal i com es pot veure, el TCA i el TCT es comporten de la mateixa manera en tot el rang avaluat. En el gràfic queda patent com es generen dos intervals lineals, on la

frontera es situa al voltant dels 600 ng·l⁻¹. Això va fer que es plantegés dur a terme la calibració del mètode fins a 500 ng·l⁻¹.

Per altra banda, però, l'interès era avaluar la presència de TCA tant en vins blancs com en vins negres. Calia determinar, doncs, si existia efecte de la matriu en aquests dos tipus de vins. Es varen fer unes proves preliminars a diferents concentracions de TCA i TCT, en l'interval de 25 ng·l⁻¹ i 400 ng·l⁻¹, trobant que l'extracció del TCA per part de la fibra de SPME era diferent segons si es tractava de vi sintètic, vi blanc o vi negre.

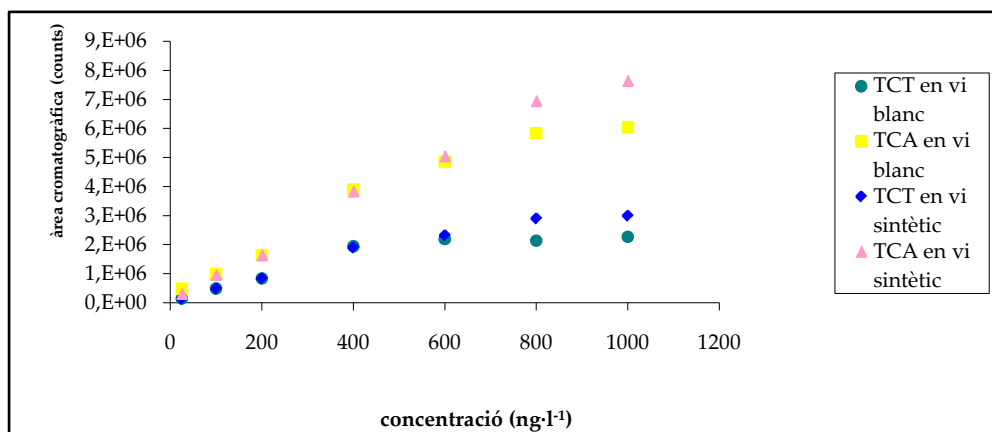


Figura V.2. Avaluació del rang lineal amb vi sintètic i vi blanc

L'extracció del TCA en vi sintètic era comparable a l'extracció en vi blanc, però no era comparable en la del vi negre. Aquest efecte matriu detectat en el vi negre es veu representat a la Figura V.3 i, degut a aquesta raó, no es pogué utilitzar el vi sintètic per la calibració en el cas dels vins negres, fent-se necessària la recerca d'una alternativa viable.

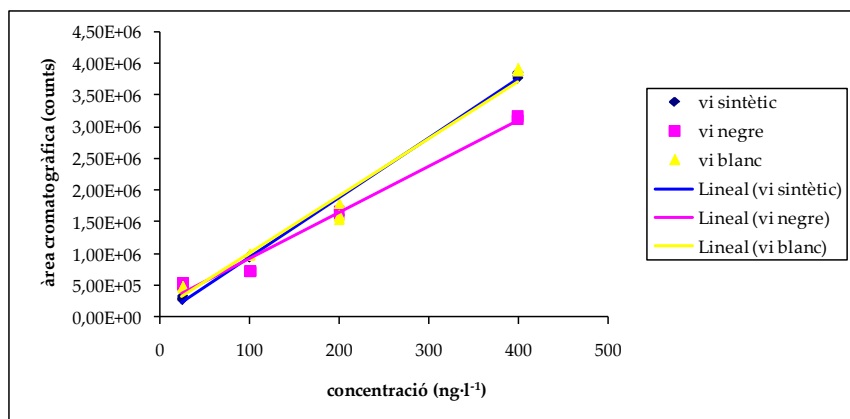


Figura V.3. Relació àrea TCA i concentració en vi sintètic, vi negre i vi blanc entre 25 ng·l⁻¹ i 400 ng·l⁻¹

Un altre efecte matriu avaluat fou el grau alcohòlic dels vins, ja que l'etanol és, després de l'aigua, el component majoritari i, per tant, podia afectar en les constants de distribució. Per tal d'estudiar-ne l'efecte es va avaluar la resposta del TCA i TCT a una concentració de 400 ng·l⁻¹ en vi sintètic amb concentració d'etanol entre 10% i 15%. Aquest estudi permeté comprovar el que ja s'esperava: l'etanol influïa de manera significativa en l'extracció del TCA. Per tal d'evitar el problema que suposava els diferents rendiments de l'extracció amb els diferents continguts d'etanol de les diferents mostres, es decidí fixar la concentració de l'etanol de les mostres que s'haguessin d'analitzar. Es seleccionà el valor de 12% d'etanol per dues raons: la primera era que amb aquest valor s'aconseguia la millor resposta i la segona era que el 12% era un nivell d'alcohol normal, si es tenen en compte vins blancs i vins negres.

Arribat aquest punt es va procedir a la validació pròpiament dita del mètode analític la qual es detalla en l'article que es presenta tot seguit publicat a la revista *Journal of Chromatography A* i que porta per títol "Determination of 2,4,6-trichloroanisole in wines by headspace solid-phase microextraction and gas chromatography-electron capture detection".



ELSEVIER

Journal of Chromatography A, 977 (2002) 1–8

JOURNAL OF
CHROMATOGRAPHY A

www.elsevier.com/locate/chroma

Determination of 2,4,6-trichloroanisole in wines by headspace solid-phase microextraction and gas chromatography–electron-capture detection

M. Riu, M. Mestres, O. Busto*, J. Guasch

Departament de Química Analítica i Química Orgànica (Unitat d'Enologia del CeRTA), Facultat d'Enologia de Tarragona, Universitat Rovira i Virgili, Av. Ramón y Cajal 70, E-43005 Tarragona, Catalonia, Spain

Received 4 February 2002; received in revised form 7 August 2002; accepted 14 August 2002

Abstract

One of the most important problems in the wine world, today, is cork taint, which often has been chemically identified as 2,4,6-trichloroanisole (TCA). The perception limit of this compound is very low (close to 10 and 40 ng/l for white and red wines, respectively), so, even at such low concentrations, its presence becomes a problem in wine quality. A method for the analysis of TCA in white and red wines has been developed in our laboratory, using headspace solid-phase microextraction and gas chromatography with electron-capture detection. The method, which has been optimized using an experimental design, involves the use of fibres coated with polydimethylsiloxane (PDMS) and allows the analysis of TCA at very low concentrations (under 500 ng/l) with good accuracy (RSD \leq 10%). The limits of quantification of the method are 5 and 8 ng/l for white and red wines, respectively, while the limit of detection is 1 ng/l for both types of wine.

© 2002 Elsevier Science B.V. All rights reserved.

Keywords: Wine; Solid-phase microextraction; Headspace analysis; 2,4,6-Trichloroanisole

1. Introduction

There is a growing concern in the wine industry^a about the quality of the products it manufactures, partly motivated by the increasing consumer awareness on quality issues. Nowadays, consumers can detect different organoleptic defects. One of those is cork taint [1].

Among other compounds such as geosmine, guaiacol, 1-octen-3-one, 1-octen-3-ol and 2-methyl-

isoborneol, it has been shown that chloroanisoles can give a musty taint to a variety of foods and beverages, including wine [2–4]. The most odorant of the chloroanisoles is 2,4,6-trichloroanisole (TCA) [5].

In 1996, a study set up by the European Cork Confederation, the QUERCUS project, investigated the causes and origins of taints in corks. It found that TCA was responsible for the musty/mouldy taint in, at least, 80% of cases when it was detected in bottled wines. Taking into account the estimated incidence of cork taint in wine bottles which ranges from 0.5 to 7%, this implies large economic losses [6,7]. However, the true cork taint in wines is rare. This denotation gives the idea that the origin of this defect is only the cork; however there is evidence that the

^aCorresponding author. Tel.: +34-977-250-000; fax: +34-977-250-347.

E-mail address: qaenol@fe.urv.es (O. Busto).

compounds causing cork taint may also appear from other sources [4,8,9].

Several microorganisms such as moulds, yeasts or bacteria are involved in the formation of TCA [1-4,10,11]. There are also many other causes that explain the presence of TCA in wine: use of fungicides, biocides, herbicides and wood preservatives containing pentachlorophenol (PCP), 2,3,4,6-tetrachlorophenol (2,3,4,6-TeCP) and 2,4,6-trichlorophenol (TCP) [4,8,12], contamination coming from the cardboard used in the transport of the corks [13], use of hypochlorite as cork bleaching agent [4,8,12], and so on.

The sensory threshold of TCA is close to 10 ng/l in white wine and 40 ng/l in red wine [1,4,5,7,8]. Taking into account that the usual concentrations of TCA in wines range in ng/l levels, it is necessary to apply a preconcentration technique before analytical determination, because even gas chromatography with electron-capture detection (GC-ECD) is not sensitive enough. The classical methods as distillation [12], solvent extraction [3,5,13], simultaneous distillation-extraction (SDE) [14,15] or Soxhlet [16] are time consuming, require large volumes of samples and solvents and are prone to losses of analytes. So, solid-phase microextraction (SPME) appears as an alternative to these techniques since it is a solvent-free technique, which saves preparation time, solvent use and cost [17,18]. The results found in previous work, which presented some applications for analysing TCA in wine using SPME-GC, coupled either with mass spectrometry [7,19,20] or electron-capture detection [21], encouraged us to validate a method to determine TCA concentration in white and red wines by using headspace (HS) SPME and GC-ECD.

2. Methods and materials

2.1. Instrumental analysis

Chromatographic analyses were carried out on a Hewlett-Packard (HP) 5890 series II gas chromatograph equipped with a HP ECD system. The injection was made in the splitless mode for 1 min at 250 °C using an inlet of 0.75 mm I.D. that improved the GC resolution. Separation was made using a

Chrompack CP-Wax 57 CB (50 m×0.25 mm, 0.20 μm) fused-silica column. Carrier gas was high-purity helium flowing through the column at 0.8 ml/min (head pressure, 175 kPa). The injector was held at 250 °C and the detector at 300 °C. The oven temperature was 60 °C for 2 min, then it was raised at 8 °C/min to 200 °C. Finally, the temperature was raised at 30 °C/min to 220 °C (10 min).

2.2. Chemicals and reagents

TCA ([87-40-1], 99%) was supplied by Aldrich. The internal standard (I.S.) used was 2,3,6-trichlorotoluene (TCT [2077-46-5], 97%), supplied by Riedel-de Haën. An individual stock solution of 1000 mg/l for each compound was prepared in ethanol and stored at 4 °C. From these stock solutions, we prepared standard solutions of 100 and 1 μg/l, by diluting with ethanol, which were also stored at 4 °C. Working solutions used in further studies were prepared by diluting different amounts of the standard solutions in either synthetic wine or real wine (white and red wine). The synthetic wine was obtained dissolving 3.5 g/l of L-(+)-tartaric acid and 120 ml/l of ethanol in a suitable amount of deionised water to 1 l. Finally the pH was adjusted to 3.5 with 1 M NaOH.

2.3. HS-SPME

The manual SPME device used was purchased from Supelco. We tested fibres coated with different kinds of stationary phases, all of them also supplied by Supelco. The fibres were conditioned before use according to the instructions of the supplier.

2.3.1. SPME procedure

Headspace sampling was done using 50-ml vials, each containing 20 ml of liquid sample (either commercial or synthetic wine), with addition of a suitable amount of NaCl (99.8%) to get 5 M. The vials were tightly capped with a PTFE-faced silicone septum and placed in a thermostatic bath. SPME was carried out under constant magnetic stirring (300 rpm). The sample vials were preequilibrated for 30 min at 25 °C. Afterwards, the stainless steel needle, in which the fibre is housed, was pushed through the vial septum, allowing the coating to be

exposed to the headspace over the sample for 30 min. Then, the fibre was pulled into the needle sheath and the SPME device was removed from the vial and inserted into the injection port for thermal desorption at 250 °C during 3 min.

2.4. Statistical package

The statistical package used for the optimization of the method was Multisimplex 2.0 [22]. The ULC (univariate linear calibration) computer programme [23] was used to calculate, by linear least-squares regression, the slope and intercept with the determination coefficient (r^2), the standard errors of the coefficients and to compare the slopes of the calibration lines.

3. Results and discussion

3.1. Nature of fibre

We checked different fibres commercially available coated with: polydimethylsiloxane (PDMS) 100 μm , PDMS-divinylbenzene (DVB) 65 μm , polyacrylate (PA) 85 μm , Carboxen (CAR)-PDMS 75 μm , Carbowax (CW)-DVB 65 μm and StableFlex DVB-CAR-PDMS 50/30 μm . To determine which of these coatings gave the best results we compared the results of the experiments that were carried out using two fibres (to verify the repeatability of the response using different fibres) of each kind and making duplicates with every one. The samples analysed were identical and obtained from 20 ml of synthetic wine spiked with 400 ng/l of TCA and TCT, in a 50-ml vial. The HS-SPME conditions used in this study were taken from the bibliography (30 min of extraction at 25 °C, with magnetic stirring and sample saturation with NaCl) [7,19-21]. The two most suitable coatings for TCA extraction are the PDMS and the DVB-CAR-PDMS. The DVB-CAR-PDMS coating presents better sensitivity (100% better than PDMS), but the repeatability becomes better with PDMS coating (4 versus 12%, expressed in RSD terms), so we decided to use the PDMS stationary phase.

3.2. Optimization of the method

First of all we checked the experimental parameters which could affect the extraction process. These parameters are temperature and time of extraction, sample volume and ionic strength. It is well known that sample magnetic stirring is another parameter that influences the extraction because it helps the transfer of analytes from sample matrix to the fibre coating [19-21,24], so all the experiments were made under constant magnetic stirring (at the faster speed allowed).

A full two-level factorial design (using duplicated experiments) was applied to check the influence of the four above mentioned factors and to estimate the magnitude of their effects in the suitable experimental domain specified in Table 1. The number of experiments required was 16 (2^4) [25,26]. Every experiment was carried out twice using two different fibres and analysing identical samples of synthetic wine spiked with 400 ng/l of TCA.

The results obtained can be graphically seen in the Pareto chart (Fig. 1). This chart shows that the ionic strength, the sample volume and the extraction time play a positive influence on the process when their values increase, but the temperature of extraction has a negative effect, because the higher the temperature the lower the peak area. Furthermore it can be also observed that the effect of each factor has an absolute value larger than the confidence interval (in the chart this interval is pointed out with a dotted line) which was calculated from the variance of each effect, 16 degrees of freedom and $\alpha=0.05$ [25]. This fact illustrates that the effect of each of the four experimental parameters checked are significant so the four experimental parameters must be really taken into account for the extraction process. On the

Table 1
Factors and levels studied to check the influence of the experimental parameters on the TCA extraction

Factor	Level	Level	
		Low (-)	High (+)
Extraction temperature (°C)	(A)	10	40
Extraction time (min)	(B)	10	60
Ionic strength (M)	(C)	0	6
Sample volume (ml)	(D)	10	25

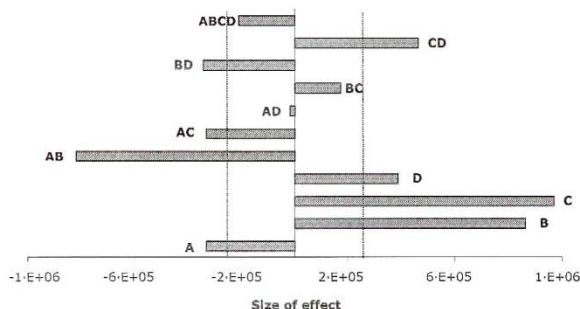


Fig. 1. Pareto chart showing the magnitude of the effects on the extraction of TCA by HS-SPME. The x-axis shows the absolute magnitude of the effect of each factor determined by the statistical analysis and the y-axis shows the different factors: (A) extraction temperature (10–40 °C); (B) extraction time (10–60 min); (C) ionic strength (0–6 M); (D) sample volume (10–25 ml). The confidence limits of the effects are represented graphically by a dotted line ($\alpha=0.05$ and 16 degrees of freedom).

other hand, in this Pareto chart it can also be observed that there is an interaction between the different factors (mainly between A and B factors) so, all of them should be studied together.

Once we knew which parameters had to be taken into account, we applied a mathematical model based on a Simplex method (Multisimplex 2.0) to optimize the extraction conditions. The experimental matrix used by this mathematical model was defined according to the literature [7,19–21] and some previous experiments. The experimental parameters and their working intervals, given in parentheses, to develop the Simplex method are: temperature of extraction (10 to 40 °C, step of 10 °C), extraction time (15 to 60 min, step of 15 min), ionic strength (0 to 6 M, step of 2 M) and sample volume (5 to 25 ml, step of 5 ml). The results showed that the optimal conditions were obtained when 20 ml of sample with addition of 5 M NaCl was poured into a 50-ml glass vial and the TCA was extracted by means of SPME fibre from its headspace for 30 min at 25 °C (conditions described in Section 2.3).

The distribution constants between the liquid phase and the coating are strongly dependent on the matrix [17]. In wine analysis we have to take into account the ethanol, because since it is a majority component of wine, it can interfere with the extraction of TCA by the fibre. In order to determine

its contribution we analysed synthetic wine, with different ethanol contents between 10 and 15% (v/v) (four replicates for every level using two fibres), and we found that when the ethanol content increased, the extraction extent of TCA decreased (Fig. 2). Taking into account that 12% is one of the most usual contents of ethanol in wines we fixed this value in order to minimize the sample handling, so we worked with a constant ethanol content of 12% (v/v).

Some authors state that matrix effects are different for red and white wine, because the presence in red wine of some characteristic substances as polyphenolic compounds can induce changes on the distribution constants [24,27,28], so, it seemed important to check if any difference between synthetic, white and red wines appeared. Therefore we evaluated the chromatographic response of TCA in spiked synthetic, white and red wines at concentrations under 400 ng/l by comparing the slopes (and their confidence intervals) of the regression lines synthetic wine vs. white wine, synthetic wine vs. red wine and white wine vs. red wine, two on two. The slopes of the first comparison (synthetic vs. white) were statistically comparable for a significance level of 0.05. The other two were not statistically comparable for the same significance level. So, we have to work with different methods to build the calibration lines

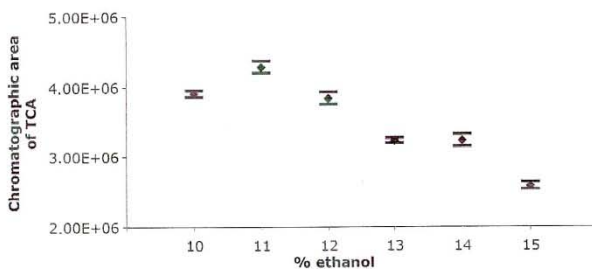


Fig. 2. Influence of ethanol concentration on the extraction of TCA in a synthetic wine.

for every kind of wine. With white wine we could use spiked synthetic wine, but for red wine we have to use the standard addition technique. To avoid this laborious technique for each different kind of red wine it is also possible to build the calibration lines

by using a spiked mixture of different red wines from different origins and ethanol contents, as it has been done in previous studies [27]. In this way, a matrix of red wine as representative as possible was obtained.

Figs. 3 and 4 show, respectively, examples of

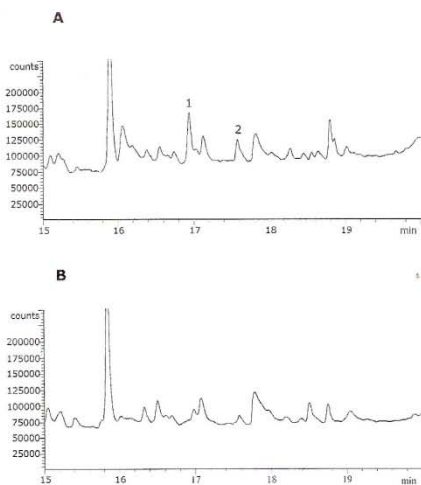


Fig. 3. Chromatograms obtained under the optimized conditions of the method. (A) White wine with an addition of 75 ng/l TCT (1) and 10 ng/l TCA (2). (B) Blank chromatogram of the white wine.

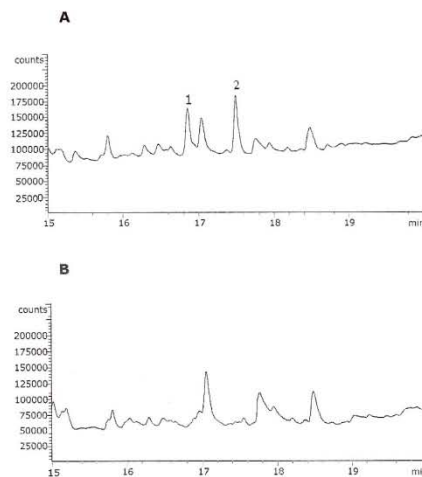


Fig. 4. Chromatograms obtained with the optimized conditions of the method. (A) Red wine with an addition of 50 ng/l TCT (1) and 40 ppt TCA (2). (B) Blank chromatogram of the red wine.

chromatograms (white and red wine with/without addition of TCA) obtained under the optimized conditions of the method described.

4. Parameters of quality

4.1. Limits of detection and quantification

According to the IUPAC recommendations, limits of detection and quantification were determined considering the standard deviations of the lines at concentration 0 and considering α and β errors [29,30], so calibration lines at low concentrations should be built.

For white wine, the calibration line was calculated with synthetic wine spiked with six different concentrations of TCA, in the range of 0–15 ng/l, with an I.S. concentration of 25 ng/l. For red wine, the calibration line was calculated by using the mixed red wine described in Section 3.2. The mixture was spiked with five different concentrations of TCA, in the range of 0–15 ng/l, with an I.S. concentration of 50 ng/l. In both cases four replicates using two fibres were done. The determination coefficients were good ($r^2=0.976$ for white wine and $r^2=0.964$ for red wine), taking into account the low concentration range of these lines. The calculated values of limits of detection for both kind of wines are 1 ng/l. As for calculated values of limits of quantification, these are 5 ng/l in white wines and 8 ng/l in red wines. All these values were experimentally checked.

4.2. Calibration lines

In all cases, the calibration lines were constructed by plotting the peak-area ratios (TCA area/I.S. area) against the concentration ratios (TCA concentration/I.S. concentration). The parameters of the calibration lines are shown in Table 2. For white wine, the calibration line was built with synthetic wine spiked with seven different concentrations of TCA in the range of 5–500 ng/l and with an I.S. amount of 75 ng/l. Each point of the calibration line was obtained from four replicates analysed using two fibres. The determination coefficient of the calibration line obtained is good ($r^2=0.990$).

Table 2
Parameters of the calibration lines ($y=a+bx$) built for quantification of TCA (white wine and red wine)

Wine	<i>a</i>	<i>S_a</i>	<i>b</i>	<i>S_b</i>	<i>r</i> ²	<i>S_{y/x}</i>
White wine	0.12	0.05	2.49	0.15	0.990	0.57
Red wine (low concentrations)	-0.12	0.05	2.32	0.05	0.994	0.14
Red wine (high concentrations)	0.28	0.04	1.98	0.03	0.995	0.17

For red wine, we had to built two calibration lines (two linear ranges observed): one at high levels of TCA and another at low levels, but both were constructed using the mixed red wine described in Section 3.2. For high concentrations of TCA calibration line, we analysed four replicates of samples spiked with six different concentration levels in the range of 30–500 ng/l, all of them with an I.S. content of 150 ng/l and working with two fibres. For low concentrations of TCA calibration line we also used four replicates of a mixed wine spiked with six different concentration levels. The concentration range of the samples was 8–100 ng/l, with an I.S. content of 50 ng/l. The determination coefficients obtained in this study were also good (0.995 and 0.994, respectively).

4.3. Recoveries

The recovery of the method was determined by addition of different quantities of TCA to four red and four white commercial wines, all of them adjusted to 12% (v/v). The TCA was added to each wine at three different concentrations: at lower, middle and higher levels of the calibration range. Four samples of each level were extracted using two fibres. The recoveries were calculated as the percentage ratio between the total concentration of TCA found, using the calibration lines, and the real concentration added to wine (matched matrix standard). Table 3 shows the recoveries obtained. As can be seen, the values are good (up to 90%) with good standard deviation (RSD \leq 10%).

4.4. Repeatability and reproducibility (intermediate precision)

To evaluate the repeatability we analysed, con-

Table 3
Recoveries of TCA in commercial wines (white and red wine) of different origins

	TCA spiked (ng/l)	TCA found (ng/l)	Recovery (%)	RSD (%)
White wine	10	10	100	7.8
	200	186	93	4.2
	450	409	91	0.5
Red wine (high concentrations)	40	37	92	4.6
	200	192	96	5.2
	450	491	109	10.0
Red wine (low concentrations)	10	9	90	6.1
	40	40	100	6.3
	75	74	99	4.6

secutively, six different samples (synthetic and mixed red wine) spiked with 40 ng/l of TCA and with I.S. concentrations of 75 ng/l (synthetic wine) and 50 ng/l (red wine). The intermediate precision was evaluated analysing a pair of identical samples prepared as it has been described before, on 3 different days, at different hours [25,31]. For white wine we found an RSD of 2% for both parameters. For red wine, RSDs of 5 and 7% were found for repeatability and intermediate precision, respectively.

The method proposed was successfully applied to wines produced in the experimental cellar (Mas dels Frases) of the Faculty of Enology of Tarragona. Wines analysed presented low quantities of TCA, all of them below the perception limit of TCA in wine. The main causes of the absence of this organoleptic defect in these wines were the control of every production step and the good handling and storage of these wines in the cellar.

5. Conclusions

This method presents a good alternative to the classical methods for analysing TCA in red and white wines at subthreshold levels, with good repeatability and intermediate precision (2–7%), in the range of concentrations between 5 and 500 ng/l (white wine) or 8–500 ng/l (red wine). The detection limit is 1 ng/l for both white and red wine and the quantification limits are 5 and 8 ng/l, respectively. The recoveries found are good (up to 90%) with acceptable RSDs ($\leq 10\%$). Because of the simplicity

and speed of the technique used without the use of organic solvents, this method seems to be adequate for routine analysis.

Acknowledgements

We wish to thank the Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología/CICYT (project ALI97-0765) and Ministerio de Ciencia y Tecnología/INIA (project VIN00-045) for the financial support given.

References

- [1] P. Ribéreau-Gayon, Y. Glories, A. Maujean, D. Dubordieu, in: *Handbook of Enology: The Chemistry of Wine Stabilisation and Treatments*, Vol. 2, Wiley, Chichester, 2000, p. 209, Chapter 8.
- [2] S.E. Jensen, C.L. Anders, L.J. Goatcher, T. Perley, S. Kenefick, E. Hrudehy, *Water Res.* 28 (1994) 1393.
- [3] J.M. Amon, J.M. Vandepuer, R.F. Simpson, *Australian New Zealand Wine Ind J.* 4 (1989) 62.
- [4] T.H. Lee, R.F. Simpson, in: G.H. Fleet (Ed.), *Wine Microbiology and Biotechnology*, Harwood Academic Press, Chur, 1993, p. 353, Chapter 12.
- [5] H.R. Buser, C. Zanier, H. Tanner, *J. Agric. Food Chem.* 30 (1982) 359.
- [6] C.E. Liège, in: *European Communities Directorate—General XII Science, Research and Development*, 1996, p. 1.
- [7] C.E. Butzke, T.J. Evans, S.E. Ebeler, in: A.L. Waterhouse, S.E. Ebeler (Eds.), *Chemistry of Wine Flavour*, American Chemistry Society, Washington, DC, 1998, p. 209, Chapter 15.
- [8] C. Silva Pereira, J.J. Figueiredo Marques, M.V. San Romao, *Crit. Rev. Microbiol.* 26 (2000) 147.

- [9] A. Mas, J. Puig, N. Lladó, F. Zamora, *ACE Rev. Enol.* 54 (2001) 12.
- [10] J.A. Suárez, *Aliment. Equipos Tecnol.* 10 (1997) 67.
- [11] J. Jäger, J. Diekmann, D. Lorenz, L. Jakob, *Ind. Delle Bevande.* 26 (1997) 628.
- [12] R. Cantagrel, J.P. Vidal, *Bull. OIV* 709-710 (1990) 253.
- [13] A. Peña Neira, B. Fernández de Simón, M.C. García Vallejo, T. Hernández, E. Cadahía, J.A. Suárez, *Eur. Food Res. Technol.* 211 (2000) 257.
- [14] J.L. Hill, A.D. Hocking, F.B. Whitfield, *Food Chem.* 54 (1995) 161.
- [15] F.B. Whitfield, K.J. Shaw, T.H. Ly Nguyen, *J. Sci. Food Agric.* 37 (1986) 85.
- [16] C. Bayonove, F. Leroy, *Ind. Delle Bevande.* 23 (1994) 231.
- [17] J. Pawliszyn, *Solid Phase Microextraction—Theory and Practice*, Wiley-VCH, New York, 1997.
- [18] H. Kataoka, H.L. Lord, J. Pawliszyn, *J. Chromatogr. A* 880 (2000) 35.
- [19] C. Fisher, U. Fisher, *J. Agric. Food Chem.* 45 (1997) 1995.
- [20] T.J. Evans, C.E. Butzke, S.E. Ebeler, *J. Chromatogr. A* 786 (1997) 293.
- [21] G. Michel, *Rev. Oenol.* 82 (1996) 24.
- [22] <http://www.multisimplex.com>
- [23] R. Boqué, F.X. Rius, *J. Chem. Educ.* 71 (1994) 230.
- [24] M. Mestres, M.P. Martí, O. Busto, J. Guasch, *J. Chromatogr. A* 881 (2000) 583.
- [25] D.L. Massart, B.G.M. Vandeginste, L.M.C. Buydens, S. De Jong, P.W. Lewi, J. Smeyers-Verbeke, in: B.G.M. Vandeginste, S.C. Ruton (Eds.), *Data Handling in Science and Technology*, Vol. 20A, Elsevier, Amsterdam, 1997.
- [26] D.C. Montgomery, *Design and Analysis of Experiments*, Wiley, New York, 1984.
- [27] M. Mestres, O. Busto, J. Guasch, *J. Chromatogr. A* 945 (2002) 211.
- [28] C. Dufour, C.L. Bayonove, *J. Agric. Food Chem.* 47 (1999) 678.
- [29] L.A. Currie, *Pure Appl. Chem.* 67 (1995) 1699.
- [30] C.A. Clayton, J.W. Hines, P.D. Elkins, *Anal. Chem.* 59 (1987) 2506.
- [31] EURACHEM, *The Fitness for Purpose of Analytical Methods. A Laboratory Guide To Method Validation and Related Topics*, EURACHEM Secretariat, Teddington, 1998.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
DETERMINACIÓ ANALÍTICA DE 2,4,6-TRICLOROANISOLE I ALTRES CLOROANISOLES
EN VINS I SUROS
Marc Riu Rusell
ISBN:9788469432358/DL:T. 1044-2011

CAPÍTOL VI
DETERMINACIÓ DE 2,4,6-
TRICLOROANISOLE EN VINS
MITJANÇANT HS-MS

(Analytical and Bioanalytical Chemistry 376 (2003)
497-501)

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
DETERMINACIÓ ANALÍTICA DE 2,4,6-TRICLOROANISOLE I ALTRES CLOROANISOLES
EN VINS I SUROS
Marc Riu Rusell
ISBN:9788469432358/DL:T. 1044-2011

1.- INTRODUCCIÓ

Vivim en un món on es requereix que la informació sigui subministrada de manera ràpida i efectiva. Aquesta mateixa filosofia és la que va portar a la cerca d'alternatives per a determinar l'olor a humitat emprant el mínim temps possible. Per aconseguir aquest objectiu, la cromatografia de gasos clàssica no era l'adequada, per la qual cosa es va pensar en l'ús d'una tècnica ràpida com és el nas electrònic basat en l'espectrometria de masses. Aquest equip havia estat àmpliament emprat pel grup de recerca però, fins al moment d'iniciar aquest estudi, no s'havia dut a terme cap aplicació de caire quantitatiu. No obstant, sabem que la informació subministrada per aquests equips podia donar aquest tipus d'informació, si érem capaços d'aplicar les eines estadístiques adequades, com les tècniques de calibració multivariant. Així va ser com es va desenvolupar el treball que s'exposa en aquest capítol.

En la posada a punt d'aquest mètode per a la determinació quantitativa de 2,4,6-tricloroanisole (TCA) en vins mitjançant l'aplicació del nas electrònic es van tenir en compte diferents paràmetres i consideracions que es comenten tot seguit i que constitueixen un pròleg a l'article resultant d'aquesta recerca i que s'adjunta al final del capítol.

2.- PARÀMETRES EXPERIMENTALS

El primer problema amb el que ens vàrem trobar al treballar amb un nas electrònic basat en l'espectrometria de masses era que aquest equip ens ofería la possibilitat de treballar en mode SIM o en mode SCAN. Tenint en compte que en el mode SIM es guanya en sensibilitat, es cregué que aquesta era la modalitat més adequada per l'objectiu que es perseguia. Els ions escollits foren els de m/z 195, 197 i 210, ja que eren els més abundants.

El nas electrònic estàtic del que disposa el grup de recerca té un sistema automàtic mostrejador d'espai de cap, per la qual cosa calia optimitzar les variables que inflüen en aquest. Els paràmetres que s'avaluaren foren la força iònica, el volum de mostra, la relació entre el volum de mostra i l'espai de cap, la temperatura i el temps d'extracció. Per fer aquesta optimització s'escollí una concentració de 500 $\text{ng}\cdot\text{l}^{-1}$ de TCA en una matriu de vi blanc comercial. El criteri adoptat a l'hora d'escollir les condicions òptimes fou la màxima abundància dels ions seleccionats. La força iònica i el volum es fixaren a saturació de clorur sòdic i 5 ml respectivament, mentre que la temperatura i temps d'extracció s'avaluaren utilitzant un disseny factorial de dos factors a dos nivells i amb un punt central. Així, el rang de temps estudiat fou entre 15 i 120 minuts, i la temperatura d'extracció seleccionada comprenia els valors de 45°C i 80°C, essent el punt central 60 minuts i 60°C. Les condicions òptimes van resultar ser 30 minuts d'escalfament, a 80°C.

Tot i que amb aquest sistema d'anàlisi no és necessària una separació cromatogràfica, aquesta pot ajudar a minimitzar l'efecte de les interferències. Aquest és el cas de l'estudi que ens ocupa ja que, optimitzant el sistema, es va aconseguir un cromatograma de només cinc minuts i que permetia separar els compostos menys volàtils, com el TCA, d'altres més volàtils, entre els que es pot destacar l'etanol. D'aquesta manera, seleccionant solament els ions d'interès, s'augmentava la sensibilitat en un 20% i, a més, en no considerar l'etanol, es protegia els filaments de la font d'ionització, sensibles als dissolvents.

Tenint en compte els coneixements sobre l'efecte de l'etanol, avaluats en el capítol anterior, es va creure oportú avaluar si amb aquest detector es podia obviar l'efecte d'aquest compost. Es va comprovar que no era així ja que, en augmentar la concentració d'etanol, disminuïa l'abundància dels ions. A causa d'aquest efecte es decidí introduir la variable concentració etanòlica en el model que es va construir tot analitzant vins amb diferent contingut d'etanol.

Per tal d'obtenir un model robust s'utilitzaren diferents tipus de vins, de diferents orígens i amb continguts d'etanol compresos entre 10,5% i 12,0%, tot utilitzant la calibració multivariant mitjançant PLS (mínims quadrats parcials).

Comentats els punts més rellevants a l'hora de posar a punt la metodologia, tot seguit es presenta l'article publicat a la revista *Analytical and Bioanalytical Chemistry* titulat "*Fast screening method for determining 2,4,6-trichloroanisole in wines using a headspace-mass spectrometry (HS-MS) system and multivariate calibration*".

M. P. Martí · R. Boqué · M. Riu · O. Busto · J. Guasch

Fast screening method for determining 2,4,6-trichloroanisole in wines using a headspace–mass spectrometry (HS–MS) system and multivariate calibration

Received: 22 November 2002 / Revised: 14 February 2003 / Accepted: 24 March 2003 / Published online: 24 May 2003

© Springer-Verlag 2003

Abstract The system based on coupling a headspace sampler to a mass spectrometer (HS–MS), which is considered one kind of electronic nose, is an emergent technique for ensuring and controlling quality in industry. It involves injecting the headspace of the sample into the ionization chamber of the mass spectrometer where the analytes are fragmented. The result is a complex mass spectrum for each sample analyzed. When several samples are analyzed the data matrix generated is processed with chemometric techniques to compare and classify the substances from their volatile composition, in other words, to compare and classify their flavor. So far, information from electronic nose applications has mainly been qualitative. In this paper we present a quantitative study that uses a multivariate calibration. We analyzed several white wines using HS–MS to determine 2,4,6-trichloroanisole (TCA). This is an off-flavor that is a serious problem for the wine industry. The method is simple because it does not require sample preparation, only addition of sodium chloride being necessary for sample conditioning. Also, it provides a fast screening (10 min/sample) of the quantity of TCA in wines at ultratrace (sub $\mu\text{g L}^{-1}$) levels.

Keywords Wine · Off-flavour · 2,4,6-Trichloroanisole · HS–MS · Multivariate calibration · Electronic nose

Introduction

Since the first articles about electronic noses were published in the 1980s [1], there has been much more research into achieving a fast, objective system for evaluating aromas. Many companies are becoming increasingly interested because of the limitations of the techniques that are currently available. Sensory analysis by a panel of trained judges, which is the most common aroma-evaluation technique, has a number of disadvantages. For example, it is subjective and repeatability of the panelists is poor.

Today, several electronic nose systems are available. Most are based on gas-sensor technology [2, 3, 4, 5]. A few years ago, a new type of electronic nose based on mass spectrometry (MS) was developed [6]. With this instrument, the volatile compounds of the sample are introduced into the mass spectrometer with no prior separation, so that a complex mass spectrum is obtained. The data matrix generated after analyzing several samples is treated with multivariate analysis techniques.

In wine research, only a few studies have been done with electronic noses [7, 8, 9, 10, 11]. This is mainly because major compounds of the headspace of the sample, e.g. ethanol in alcoholic beverages, cause interference in the gas sensor. This limitation does not exist with HS–MS electronic noses. HS–MS therefore seems to have great potential for controlling the quality of wines and other alcoholic beverages.

In the wine industry, a serious off-odor problem that causes huge financial losses every year is cork taint [12, 13]. This off-flavor, generally perceived as a musty, earthy and moldy aroma, is mainly associated with the use of cork stoppers. Several compounds have been identified as possible contributors to cork taint, but 2,4,6-trichloroanisole (TCA) is the major impact component [14]. In fact, the problem is so great mainly because of the extraordinarily low sensory threshold of this compound – around 50 ng L^{-1} in red wines and 10 ng L^{-1} in white wines [15]. Gas chromatography, after extraction and preconcentration of the sample, is the most common technique for determining TCA [15,

M. P. Martí · M. Riu · O. Busto · J. Guasch (✉)
Departament de Química Analítica i Química Orgànica,
Unitat d'Enologia (CeRTA), Facultat d'Enologia,
Universitat Rovira i Virgili,
Av. Ramón y Cajal 70, 43005 Tarragona, Spain
e-mail: qaelnol@fe.urv.es

R. Boqué
Departament de Química Analítica i Química Orgànica,
Facultat de Química, Universitat Rovira i Virgili,
Pl. Imperial Tàrraco 1, 43005 Tarragona, Spain

16, 17, 18, 19, 20, 21]. In quality control, however, electronic nose systems are a good alternative to chromatographic analysis because the analysis is quick and simple. This technology has already been used to qualitatively discriminate between acceptable aroma and unacceptable taint in cork stoppers [22].

In this study we developed a simple, quick, and automatable method for determining TCA in white wines using an HS-MS electronic nose and multivariate calibration.

Experimental

2,4,6-Trichloroanisole (CAS number: [87-40-1]) was supplied by Aldrich (Beerse, Belgium) with a purity of over 99%. HPLC-grade ethanol absolute and reagent-grade sodium chloride were used.

We prepared three stock solutions of about 1000 mg L^{-1} (932, 1192 and 1432 mg L^{-1} were the exact concentrations) of TCA in ethanol and stored them at 5°C . We also prepared three standard solutions of around 1 mg L^{-1} (A1, A2 and A3) and three standard solutions of around $100 \mu\text{g L}^{-1}$ (B1, B2 and B3) by diluting the stock solutions in ethanol. We prepared calibration samples by adding different amounts of the corresponding standard solutions in a concentration range between 0.09 and $14.32 \mu\text{g L}^{-1}$ of TCA to eight commercial white wines of different origin and different ethanol content (10.5, 11.0, 11.5 and 12.0% v/v). We chose solutions A1–A3 and B1–B3 alternately to detect systematic errors in sample preparation. Before preparing the calibration samples, we analyzed wines by a chromatographic method (HS-SPME-GC-ECD) that we developed and validated in-house [18]. Our results showed the absence of TCA above the detection limit of this method (0.9 ng L^{-1}). We built a validation set using ten more commercial white wines, which were also spiked with TCA in the same interval as the calibration samples.

All analyses were carried out on a HS-MS electronic nose composed of a Hewlett-Packard 7694 headspace sampler, a Hewlett-Packard 6890 gas chromatograph and a Hewlett-Packard 5973 quadrupole mass spectrometer. The chromatographic column was basically to transfer the volatiles to the MS, not to resolve chromatographic peaks.

In the optimized conditions, 5 mL of sample and 1.46 g of NaCl were placed in a 10-mL vial that was hermetically sealed with a PTFE/silicone septum. The sample was thermostatted for 30 min at 80°C under constant stirring.

Afterwards, the headspace of the sample was introduced into the injection port of the gas chromatograph. The loop and transfer line temperatures were 95°C and 110°C , respectively, and the pressurization and injection times were 0.30 and 0.60 min, respectively. Chromatographic injection was made in splitless mode for 1.6 min

at 200°C using an inlet of 1.5 mm i.d. We used an HP-5MS chromatographic column (30 m \times 0.25 mm i.d., 0.25 μm film thickness) with an oven temperature program of 70°C (1 min) at $70^\circ \text{ min}^{-1}$ to 180°C (2.5 min). The carrier gas was helium with a flow-rate of 1.8 mL min^{-1} .

Mass spectra were recorded by electronic impact (EI) ionization at 70 eV and with an electron multiplier voltage of 2694 V. The analyses were done in selected-ion monitoring (SIM) mode and the fragment ions 195, 197 and 210 were monitored. The measurements were taken with a dwell time of 100 ms per ion. The ion source and mass quadrupole temperatures were 230°C and 150°C , respectively. The software we used for multivariate analysis was Pirouette 2.6 from Infometrix (Woodinville, WA, USA).

Results and discussion

As the sensory threshold of TCA is very low (ng L^{-1} level), we studied several experimental parameters to achieve the highest sensitivity. We performed the experiments with a commercial white wine spiked with 500 ng L^{-1} of the target analyte. Our criterion for obtaining the optimal conditions was the abundance of the TCA ions monitored.

Adding a salt to the sample can modify the headspace composition. The first parameter we examined, therefore, was ionic strength. Different amounts of sodium chloride were added to 5 mL of sample and then, in the extraction process, the vials were shaken for 60 min at 65°C . The results were best when the sample was saturated with salt.

Other important parameters that affect the headspace composition are the extraction time and the extraction temperature. As these are closely related, we studied them simultaneously. We therefore carried out a two-factor two-level factorial design with a central point [23]. The temperature and time levels tested were 45°C and 80°C and 15 and 120 min. The optimal conditions were 80°C and 120 min. We could not check more experimental points at higher temperatures because of wine degradation, but we performed other experiments to reduce the time of analysis. The new set of experiments was carried out in the time interval of 15–120 min, while the temperature was kept at 80°C . Results at extraction times of 30 and 120 min were the same, so we chose the shortest time.

As we have explained in the experimental section, the function of the chromatographic column was only the trans-

Fig. 1 Chromatogram obtained in scan mode

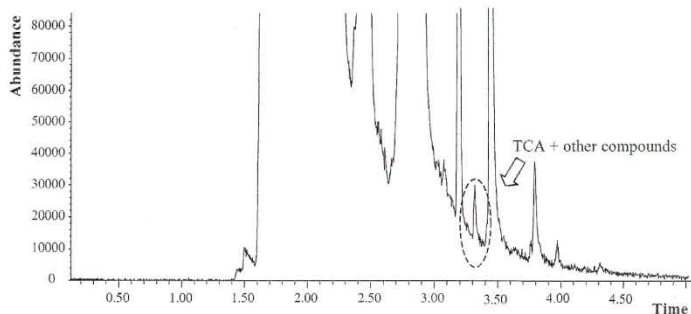
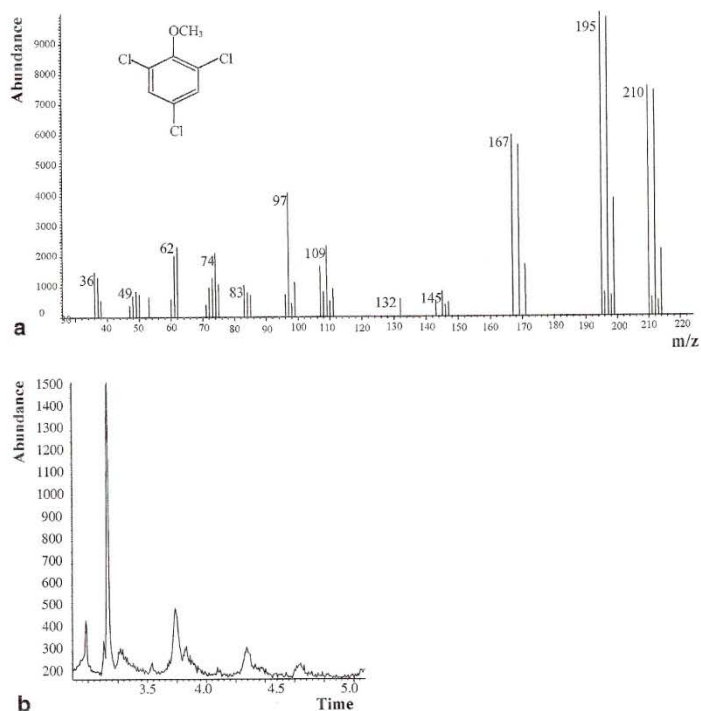


Fig. 2 (a) Mass spectrum of 2,4,6-trichloroanisole. (b) Chromatographic response of a real sample of wine analyzed using the proposed procedure



fer of the volatile compounds to the mass detector, not to resolve chromatographic peaks. With the chromatographic temperature program used, in only 5 min we were able to transfer all the compounds to the detector, with minimum separation. If this approach is compared with classical determination methods, where a good resolution of the chromatographic peaks is required, the time saving that it offers is very important. Also, and because TCA is less volatile than other compounds in the sample headspace, this minimum separation was enough to separate the TCA and the other low volatility compounds from the high volatility compounds such as ethanol. Figure 1 shows the region of the chromatogram where TCA elutes together with other compounds. The mass spectra were recorded in a chromatographic time range between 3 and 5 min. In this way, the MS signal increased by 20% and the detection limit of the method improved significantly. Furthermore, if the acquisition of spectra starts when the ethanol has eluted, the detector life increases because it is well-known that the solvents damage the filament.

Another strategy for achieving a better sensitivity was the use of the mass spectrometer in SIM mode. We chose three ions of TCA with high abundance (m/z 195, 197 and 210). Figure 2a shows the mass spectrum of TCA. How-

ever, wine has other compounds that can also give the same fragment ions as those selected. This can be observed in Fig. 2b where the chromatogram of a real wine in SIM mode is shown. Multivariate calibration can handle these interferences avoiding the use of conventional time-consuming chromatographic analysis.

Ethanol is the major volatile component in wine, so it is reasonable to think that it may interfere in the extraction process. To evaluate how the content of ethanol affects the analysis, we used the optimized method to analyze a white wine (10.5% v/v) spiked with different amounts of ethanol and different amounts of TCA. Figure 3 shows the abundance of fragment ion 195 vs TCA concentration. Clearly, when the ethanol content increases, the slope of the graph decreases. The same behavior was found for the other two ions monitored. We can conclude, therefore, that ethanol interferes in the determination. In a second experiment, as well as the three ions of TCA, we monitored two ions of ethanol (m/z 45 and 46) in order to model the alcoholic content. The results from multivariate calibration using partial least squares (PLS) were slightly better in terms of average precision, but sensitivity decreased by 50%. As interference by ethanol could not be avoided without a loss of sensitivity, to prepare the calibration samples

500

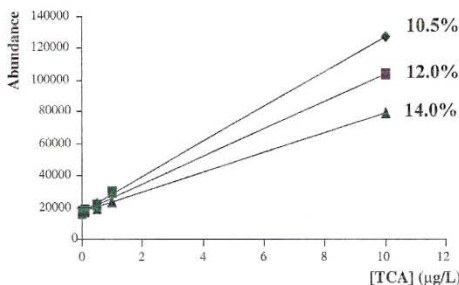


Fig. 3 Abundance of fragment ion 195 vs TCA concentration for various amounts of ethanol (v/v)

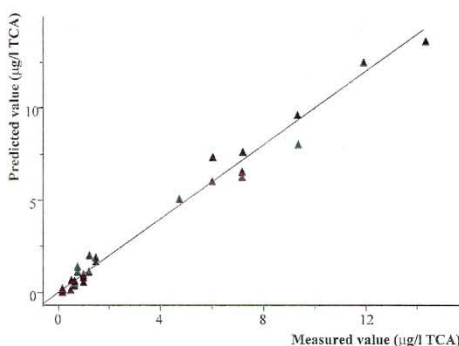


Fig. 4 TCA concentrations predicted by the PLS model vs TCA concentrations present in the calibration samples

we chose wines whose alcohol content ranged from 10.5 to 12.0% v/v. In this way, all the variability was included in the model because these values are typical for most commercial white wines.

We built a PLS model using the three ions of TCA monitored as independent variables and TCA concentration as dependent variable. Calibration data comprised a matrix of spectra (40 samples \times 3 variables) and a vector of 40 TCA concentrations. Original data were mean-centered before we ran the PLS algorithm. In the preliminary models, four samples were detected as outliers and were therefore removed. The final PLS model was cross-validated by the classic leave-one-out procedure [24]. Figure 4 shows that there was a good fit between the concentrations predicted by the final one-factor PLS model and the concentrations of TCA in the calibration samples.

Table 1 shows the parameters of the PLS model. The accuracy of the model, expressed in terms of root mean squared error of cross-validation (RMSECV) was $0.48 \mu\text{g L}^{-1}$ (16% in relative average terms), which is quite acceptable at these concentration levels. We checked bias by building a joint confidence interval of the slope and the intercept of

Table 1 Parameters of the PLS model

	Calibration	Validation
Slope	0.99	0.98
Intercept	0.04	0.05
r	0.993	0.992
RMSEC	$0.44 \mu\text{g L}^{-1}$	–
RMSECV	–	$0.48 \mu\text{g L}^{-1}$
SECV	–	$0.48 \mu\text{g L}^{-1}$
Bias	Non-significant	Non-significant

Table 2 Results of external validation (uncertainties given in brackets)

Sample	Reference value ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Predicted value ($\mu\text{g L}^{-1}$)
A	0.31 (0.04)	0.31 (0.32)
B	0.61 (0.06)	0.71 (0.34)
C	0.83 (0.08)	1.20 (0.53)
D	1.34 (0.14)	1.40 (0.51)
E	7.73 (0.85)	5.38 (0.18)
F	2.98 (0.32)	4.23 (0.26)
G	5.45 (0.59)	5.04 (0.24)
H	6.60 (0.72)	8.06 (0.73)
I	5.32 (0.58)	4.42 (0.12)
J	2.03 (0.21)	2.41 (0.42)

the concentration found vs concentration added regression line [25]. The bias was not statistically significant at a 95% confidence level either for the calibration set or for the validation set. The intermediate precision of the method, estimated as the standard error of cross-validation (SECV) was $0.48 \mu\text{g L}^{-1}$ (equal to RMSECV because the bias was practically zero). We calculated repeatability – $0.31 \mu\text{g L}^{-1}$ (9.4% in relative average terms) – from duplicate analysis of the samples of the external validation set. Finally, we calculated the limit of detection (LOD) by analyzing 10 blank samples – i.e. samples with a TCA content below the detection limit of the chromatographic method [18] – with the final PLS model. The standard deviation of the predicted TCA concentrations was multiplied, in accordance with IUPAC recommendations [26], by a coverage factor that took into account α and β probabilities of error. The LOD for $\alpha=\beta=10\%$ was $0.2 \mu\text{g L}^{-1}$.

The calibration model was also externally validated using a new set of samples. The TCA concentration of these samples was determined by the chromatographic method (HS-SPME-GC-ECD), which was considered as an internal reference method [18]. Table 2 shows the concentration values found with the reference chromatographic method and the concentration values predicted by the model. We excluded sample E from the prediction set because it was detected as an outlier. The accuracy of the predictions, evaluated as the root mean square error of prediction (RMSEP), was $0.74 \mu\text{g L}^{-1}$ (25% in relative average terms). This value may be considered acceptable at the average concentration level of the predicted samples and is appreciably lower than the theoretical precision predicted by the Horwitz equation (38%) for the same concentration

level. Table 2 shows the individual predicted concentrations of the external validation set, together with their uncertainties, which were determined using the expression proposed by Faber [27]. We can see that the predictions were fairly good and in most cases the predicted values lie within the interval of the reference value \pm uncertainty. As expected, the predictions of samples whose TCA content was close to the limit of detection have the largest relative uncertainties. However, the cross-validation results (Fig. 4) are slightly better than the external validation results. This could be attributed to the higher number of samples used in the cross-validation.

The performance parameters of the classical chromatographic methods [15, 16, 17, 18] are slightly better than the ones for the method developed. The accuracy and repeatability of chromatographic methods found in the literature are around 10% and 5%, in relative average terms, respectively. However, an important improvement provided by the proposed method is the speed of the analysis. Whereas the mass spectrum of each sample is obtained in only 5 min, the chromatographic time of the classical methods is more than 30 min, despite use of a selective detector. On the other hand, the analytical method developed is very simple since it is only necessary to add sodium chloride to the sample. So, because of the speed and the simplicity of the technique, this method can be very useful in quality control of wines. The limit of detection of the proposed method is higher than the sensory threshold of TCA. However, this limitation could be solved by using extraction techniques with a larger capacity of concentration.

Conclusions

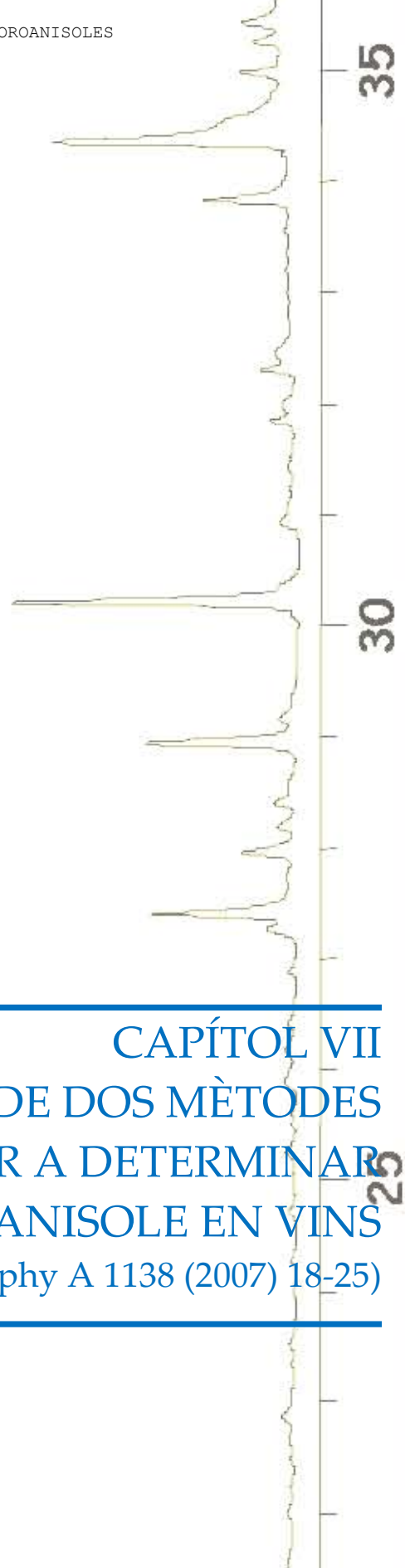
We have shown that the HS-MS electronic nose can be used satisfactorily in quantitative analysis, even at very low levels of concentration. Although the limit of detection is higher than the sensory threshold of TCA, this can be a very useful method for screening wines whose TCA content is above 100 ng L^{-1} . Moreover, as it is quick and simple, it is also suitable for controlling wine quality.

We are currently studying whether solid-phase microextraction (SPME) can be used instead of the static headspace as the extraction and preconcentration technique. Our aim is to reach a lower limit of detection than the sensory threshold of TCA. SPME may be suitable for this application because it has a large capacity of concentration and because it requires little sample preparation.

Acknowledgments The authors wish to thank the Ministerio de Ciencia y Tecnología (project AL197-0765) for providing Mrs Marti's doctoral fellowship, the Universitat Rovira i Virgili for providing Mr Riu's doctoral fellowship and the Ministerio de Ciencia y Tecnología/INIA (project VIN00-045) for their financial support.

References

1. Gardner JW, Bartlett PN (1994) *Sens Actuators B* 18/19:211–220
2. Newman AR (1991) *Anal Chem* 63:585–588
3. Strike DJ, Meijerink MGH, Koudelka-Hep M (1999) *Fresenius J Anal Chem* 364:499–505
4. Zubritsky E (2000) *Anal Chem* 72:421A–426A
5. García C, Fernández ME, Pérez JL, Moreno B (2001) *Quím Anal* 20:3–11
6. Dittmann B, Nitz S, Horner G (1998) *Adv Food Sci* 20:115–121
7. Di Natale C, Davide F, D'Amico A, Sberveglieri G, Nelli P, Faglia G, Perego C (1995) *Sens Actuators B* 24/25:801–804
8. Di Natale C, Davide F, D'Amico A, Nelli P, Groppelli S, Sberveglieri G (1996) *Sens Actuators B* 33:83–88
9. Guadarrama A, Fernández JA, Iñiguez M, Souto J, de Saja JA (2000) *Anal Chim Acta* 411:193–200
10. Heberle I, Liebming A, Weimar U, Göpel W (2000) *Sens Actuators B* 68:53–57
11. Guadarrama A, Fernández JA, Iñiguez M, Souto J, de Saja JA (2001) *Sens Actuators B* 3894:1–8
12. Cassey JA (1999) *Aust NZ Wine Ind J* 14:49–56
13. Silva C, Figueiredo J, San Romao MV (2000) *Crit Rev Microb* 26:147–162
14. Buser HR, Zanier C, Tanner H (1982) *J Agric Food Chem* 30:359–362
15. Fischer C, Fischer U (1997) *J Agric Food Chem* 45:1995–1997
16. Evans TJ, Butzke CE, Ebeler SE (1997) *J Chromatogr A* 786:293–298
17. Michel G (1996) *Rev Oenol* 82:24–26
18. Riu M, Mestres M, Busto O, Guasch J (2002) *J Chromatogr A* 977:1–8
19. Aung LH, Smilanick PV, Vail PV, Preston LH, Gómez E (1996) *J Agric Food Chem* 44:3294–3296
20. Pollnitz AP, Pardon KH, Liacopoulos D, Skouroumounis GK, Sefton MA (1996) *Aust J Grape Wine Res* 2:184–190
21. Hoffmann A, Sponholz WR, David F, Sandra P (2000) *App-Note* 3/2000. Gerstel, Mülheim an der Ruhr
22. Rocha S, Delgadillo I, Ferrer Correia AJ, Barros A, Wells P (1998) *J Agric Food Chem* 46:145–151
23. Massart DL, Vandeginste BGM, Buydens LMC, de Jong S, Lewi P J, Smeyers-Verbeke J (1997) (eds) *Handbook of Chemometrics and Qualimetrics: Part A*. Elsevier, Amsterdam
24. Osten DW (1988) *J Chemom* 2:39–48
25. Mandel J, Linning FJ (1957) *Anal Chem* 29:743–749
26. Currie LA (1995) *Pure Appl Chem* 67:1699–1723
27. Faber NM (2000) *Chemom Intell Lab Syst* 52:123–134



CAPÍTOL VII
COMPARATIVA DE DOS MÈTODES
CROMATOGRÀFICS PER A DETERMINAR
2,4,6-TRICLOROANISOLE EN VINS
(Journal of Chromatography A 1138 (2007) 18-25)

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
DETERMINACIÓ ANALÍTICA DE 2,4,6-TRICLOROANISOLE I ALTRES CLOROANISOLES
EN VINS I SUROS
Marc Riu Rusell
ISBN:9788469432358/DL:T. 1044-2011

1.- INTRODUCCIÓ

Un cop desenvolupats dos mètodes diferents per a la determinació de 2,4,6-tricloroanisole (TCA) en vins, el següent objectiu d'aquesta Tesi Doctoral era resoldre els principals problemes i limitacions trobats en aquests. En el cas del mètode de HS-SPME-GC-ECD (*headspace-solid-phase microextraction-gas chromatography-electron capture detection*) utilitzant la fibra de 100 µm de polidimetilsiloxà (PDMS) s'havia identificat un efecte matriu important en vins negres, de manera que la determinació del TCA s'havia de fer utilitzant una recta de calibració diferent depenent de si es tractava de vi blanc o vi negre. En el cas del mètode de HS-MS (*headspace-mass spectrometry*), el principal desavantatge és que no arriba a quantificar el TCA a nivells de concentració de pocs ng·l⁻¹.

Aquests inconvenients foren solucionats mitjançant alguns canvis als mètodes inicials. En el cas del mètode HS-MS, es va optar per afegir un pas previ d'extracció i concentració utilitzant la microextracció en fase sòlida (SPME) amb una fibra recoberta de 50/30 divinilbenzè/carboxen/polidimetilsiloxà d'1 cm. En el cas del mètode HS-SPME-GC-ECD es va construir una recta de calibració emprant un vi sintètic molt semblant a un vi real, el qual s'aconseguia tot afegint una sèrie de compostos volàtils pertanyents a diferents famílies químiques i que apareixen en els vins reals, a la vegada que s'utilitzava el mateix recobriment de SPME que en l'altra metodologia.

2.- PARÀMETRES EXPERIMENTALS

El punt de partida fou l'optimització del mètode HS-SPME. Tenint en compte l'experiència adquirida en els treballs anteriors, es decidí treballar amb saturació de clorur sòdic i un volum de 20 ml de mostra en un vial de 50 ml de capacitat. Per l'estudi de la temperatura i el temps d'extracció, paràmetres que estan íntimament lligats, es decidí treballar utilitzant un disseny experimental de dos factors i dos nivells amb un punt central. Així, els intervals escollits foren entre 10°C i 55°C per la temperatura i entre 10 i 90 minuts pel temps d'extracció. El criteri escollit fou la màxima resposta cromatogràfica del TCA, utilitzant vi sintètic amb 50 ng·l⁻¹ de TCA i 2,3,6-triclorotoluè (TCT). S'arribà a les condicions òptimes de 40°C i 90 minuts. Donat que aquest era un temps d'anàlisi llarg es va intentar reduir-lo, per la qual cosa es va fer un estudi de la resposta obtinguda treballant a 40°C durant diferents temps. Aquesta avaluació pot veure's en la Figura VII.1., de manera que es pot comprovar que un temps de 70 minuts era suficient per assolir l'equilibri.

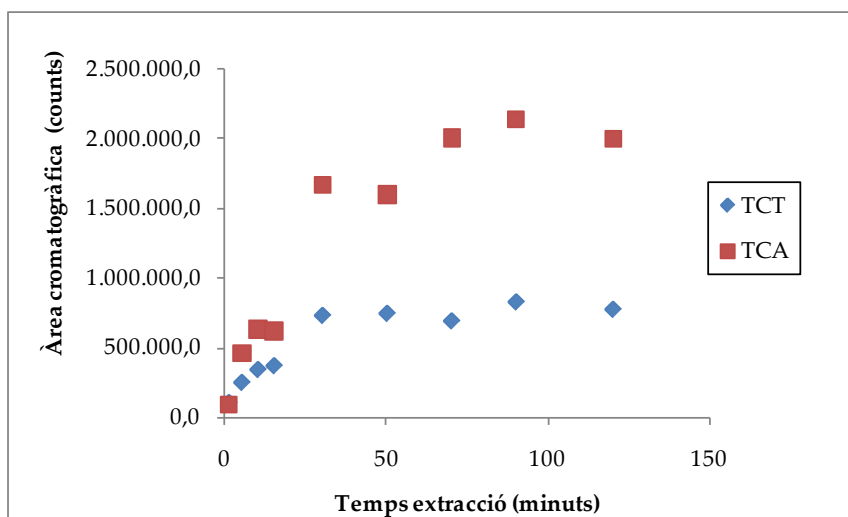


Figura VII.1. Estudi del temps d'extracció del TCA i TCT

Seguidament es va estudiar el problema de l'efecte de la matriu sobre la determinació de TCA en vins, cavall de batalla d'aquest treball, el qual estava relacionat, per una banda amb el contingut d'etanol, i per l'altra amb la matèria

colorant del vi. Amb aquest fi s'analitzaren 15 vins de diferents procedències (5 vins blancs, 5 vins rosats i 5 vins negres), 2 vins sintètics (els quals anomenàrem vi sintètic i vi sintètic complex) i uns caves, en els quals es feren addicions de TCA entre $10 \text{ ng}\cdot\text{l}^{-1}$ i $100 \text{ ng}\cdot\text{l}^{-1}$. Amb els resultats de les àrees cromatogràfiques, es va construir una recta per cada tipus de vi i es compararen les pendents (i el seu interval de confiança) per avaluar-ne la similitud o diferència (amb un grau de significança del 0,05). Amb això s'arribà a la conclusió que amb el vi sintètic complex es solucionava el problema de la matriu, almenys la causada pel color. En el cas del cava, la influència del diòxid de carboni provocava molts problemes i les respostes eren molt diferents en comparació als altres tipus de vins.

Cal dir que per dur a terme l'estudi comparatiu de la resposta dels diferents vins avaluats feia falta assegurar-se que aquests estiguessin nets de TCA ja que només així es podia assegurar que la resposta que s'obtenia era deguda al TCA addicionat. Donada la dificultat que suposà trobar vins completament nets d'aquest compost, es decidí eliminar-lo. Amb aquest objectiu es va posar a punt un mètode d'extracció en fase sòlida que permetia eliminar de manera eficaç el TCA del vi tot emprant cartutxos d'extracció en fase sòlida. D'aquesta manera s'aconseguia una matriu blanca.

Un cop s'aconseguí resoldre els problemes que presentava cadascun dels mètodes desenvolupats, es va procedir a la comparació dels resultats que proporcionaven. Aquesta comparació es troba descrita de manera detallada en l'article que segueix, que fou publicat a la revista *Journal of Chromatography A* i que es titula "*Comparative study of two chromatographic methods for quantifying 2,4,6-trichloroanisole in wines*".



Comparative study of two chromatographic methods for quantifying 2,4,6-trichloroanisole in wines

M. Riu, M. Mestres, O. Busto, J. Guasch*

Departament de Química Analítica i Química Orgànica, Unitat d'Enologia del CeRTA, Facultat d'Enologia de Tarragona, Universitat Rovira i Virgili, C/ Marcel·lí Domingo, s/n 43007 Tarragona, Catalonia, Spain

Received 27 July 2006; received in revised form 10 October 2006; accepted 17 October 2006
Available online 15 November 2006

Abstract

Here we present the validation and the comparative study of two chromatographic methods for quantifying 2,4,6-trichloroanisole (TCA) in wines (red, rosé and white wines). The first method involves headspace solid-phase microextraction and gas chromatography with electron-capture detection (ECD). The evaluation of the performance parameters shows limit of detection of 0.3 ng l^{-1} , limit of quantification of 1.0 ng l^{-1} , recoveries around 100% and repeatability of 10%. The second one implies a headspace solid-phase microextraction and gas chromatography with mass spectrometric detection. The performance parameters of this second method are limit of detection of 0.2 ng l^{-1} , limit of quantification of 0.8 ng l^{-1} and repeatability of 10.1%. From the comparative study we can state that both methods provide similar results and the differences between them are the better sensitivity of the GC-ECD method and the very shorter chromatogram running time of the GC-MS method. The two methods are able to quantify TCA below the sensorial threshold in red, rosé and white wines using just a calibration graph, thus they could be a very good tool for quality control in wineries.

© 2006 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: 2,4,6-Trichloroanisole; Musty taint; Comparative study; Solid-phase microextraction; Electron capture detector; Mass spectrometer detector

1. Introduction

The quality of wine is highly dependent on their flavor. So, it is very important to avoid the presence of compounds which could give organoleptic defects to wine. One of them is the *musty taint*, which has classically been known as *cork taint* [1]. The main responsible for this organoleptic defect is 2,4,6-trichloroanisole (TCA) [2], although other compounds can also be involved such as other chloroanisoles, guaiacol, 1-octen-3-one, 1-octen-3-ol, 2-methylisoborneol [3] and even 2,4,6-tribromoanisole [4].

The most common technique for analyzing TCA in wines is gas chromatography (GC) coupled with either electron-capture (ECD) [5–9] or mass spectrometry (MS) detection [11–20], although the atomic emission detector has also been recently used [21]. However, these techniques are not sensitive enough to detect the low threshold perception of TCA in wines (between 1 and 50 ng l^{-1} depending on the wine and the sensitivity and

training of the judge) [9,10,22]. Therefore, the analyte first needs to be extracted and concentrated, so it is essential to choose a suitable technique in order to obtain good results. Classical methods of extraction, such as liquid–liquid extraction [13] or solid-phase extraction (SPE) [14] have been used to quantify TCA in alcoholic beverages. The main disadvantages of these techniques are that they require large volumes of organic solvent, are time consuming and prone to lose analytes. Recently, other extraction techniques have been also used but, according to the literature, they present some problems as well; for instance, the purge and trap technique requires a previously solvent extraction [21] and pervaporation [16,17] provides high limits of quantification for TCA.

Regarding the solid-phase microextraction (SPME), it carries out the extraction and concentration of the analytes in just one step, it is easier to handle and it does not need any organic solvent [3,5,12,18,20]. Some techniques related with SPME have been used, as multiple solid-phase microextraction [19] or stir bar sorptive extraction [15]. However, the first one requires multiple extractions that imply long times of analyses, and, the second one, requires a special device to make possible both desorption

* Corresponding author. Tel.: +34 977 55 84 96; fax: +34 977 55 84 46.
E-mail address: qanolo@urv.net (J. Guasch).

and injection of the analytes on the GC. Thus, taking into account all these disadvantages, the SPME is presented as the most suitable technique to extract and concentrate TCA present in wine.

The purpose of this paper was to compare the results obtained with two different chromatographic methods for quantifying TCA in wines by using the two most widely used detectors. The first method (SPME-GC-ECD) can be described as a classical gas chromatography coupled with electron capture detection that uses a polar chromatographic column to separate TCA peak from other wine aromas. The second method (SPME-GC-MS) is also a gas chromatography but coupled with mass spectrometry detector in selected-ion monitoring (SIM) and using a non polar column. Due to the specificity of the SIM mode provides, it was not necessary a total chromatographic separation which results in a shortening of the running time.

2. Material and methods

2.1. Chemicals and reagents

TCA ([87-4-1], 99%) was supplied by Sigma-Aldrich (Madrid, Spain). The internal standard (I.S.) used was 2,3,6-trichlorotoluene (TCT [2077-46-5], 97%), which was supplied by Fluka (Buchs, Switzerland). An individual stock solution of 1000 mg l⁻¹ of each compound was prepared in ethanol and stored at 4 °C. From these stock solutions we prepared standard solutions of 100, 10 and 1 µg l⁻¹ by diluting with ethanol. They were also stored at 4 °C. Working solutions used in further studies were prepared by diluting different amounts of the standard solutions in either synthetic or real wine (red, rosé and white wine). All these working solutions were freshly prepared.

To validate the method we prepared two kinds of synthetic wine in order to get a matrix for emulating wine: the first one was called "synthetic wine" and the second one "complex synthetic wine". The synthetic wine was prepared by diluting 3.5 g l⁻¹ of L-(+)-tartaric acid and 120 ml l⁻¹ of ethanol in Milli-Q grade water. Finally, the pH was adjusted to 3.5 using NaOH. Regarding to the complex synthetic wine, it was made in order to obtain another matrix much more similar to real wine. With this purpose we added some of the main wine volatiles [25] to the synthetic wine: methanol (125 mg l⁻¹), ethanal (75 mg l⁻¹), ethyl acetate (100 mg l⁻¹), isoamyl acetate (10 mg l⁻¹), 3-methyl-1-butanol (200 mg l⁻¹), 2-methyl-1-butanol (50 mg l⁻¹) and potassium metabisulphite (275 mg l⁻¹), all of which had a purity of over 98% and were supplied by Aldrich.

2.2. SPME fibers

The manual SPME device and 50/30 µm divinylbenzene/carboxen/polydimethylsiloxane (DVB/CAR/PDMS) (1 cm) fibers used in this study were purchased from Supelco (Bellefonte, PA, USA). These were conditioned before use according to the supplier's instructions.

2.3. Headspace (HS)-SPME procedure

To prepare the samples, 20 ml of commercial, synthetic or complex synthetic wine were placed into a 50 ml vial

(43 mm × 73 mm), with a magnetic stirring and a suitable amount of NaCl to get a saturated sample. The vials were tightly capped with a PTFE-faced silicone septum and placed in a thermostatic bath. SPME was carried out under constant magnetic stirring (500 rpm). Before the extraction step, samples were equilibrated for 30 min at 40 °C. Then, the fiber was exposed to the headspace over the sample for 70 min at the same temperature (40 °C). Finally, the fiber was removed from the sample headspace and inserted into the injection port of the gas chromatograph for the thermal desorption of the analytes at 270 °C for 1 min in splitless mode.

Although the ruggedness of the fibers has highly improved in the last years, to carry out the different studies and experiments we used different fibers in order to consider their response variability [3,6].

2.4. Samples

To carry out the different studies, we used 45 different wines (red, rosé and white) from different origins (different Spanish regions) which is representative of the degree of variability of wines within Spain.

For the validation procedure it was necessary to get wines absolutely free of TCA. However, sometimes, these were difficult to obtain so, when needed, we applied an SPE method to completely eliminate native TCA. The C₁₈ cartridges of SPE (500 mg) used were supplied by Varian (Harbor City, USA). These were first conditioned with 2 ml of ethyl acetate, 2 ml of absolute ethanol and 2 ml of 10% (v/v) ethanol in Milli-Q grade water. Then, the cartridge was ready to pass an aliquot of 20 ml of wine [14].

2.5. Statistical analysis

We used the ULC (univariate linear calibration) [26] computer program to calculate the slope and intercept of the calibration curve, the determination coefficient (*r*²) and the standard errors of the coefficients via linear least-squares regression. We also used ULC and linear least-squares regression to calculate the analysis of variance to determine the linearity of the calibration curves and compare their slopes. The analysis of the variance to determine the repeatability and intermediate precision was calculated by the statistical package supplied in Excel®. The comparisons of the slope and intercept using linear regression with errors in both axes (BLS) [23] were calculated using home-made subroutines (Matlab for Microsoft Windows ver. 5.3, the Mathworks, Natick, MA, USA).

2.6. Instrumental analysis

2.6.1. GC-ECD

A Hewlett-Packard (HP, Palo Alto, CA, USA) 5890 series II gas chromatograph equipped with a HP ECD system was used. The injection and thermal desorption of the analytes inside the GC injector port were made in the splitless mode for 1 min at 270 °C. Separation was made using a Chrompack (Middel-

burg, The Netherlands) CP-Wax 57 CB (50 m × 0.25 mm I.D., 0.20 μm film thickness) fused-silica column. The flow of the carrier gas (helium) was 0.8 ml min⁻¹ with a column head pressure of 175 kPa, and the septum purge flow was 2 ml min⁻¹. The detector was held at 300 °C. To get the best resolution of the TCA peak, the oven temperature was programmed as follows: 40 °C (2 min), 4 °C min⁻¹ to 150 °C (1 min), 40 °C min⁻¹ to 200 °C (7 min), 25 °C min⁻¹ to 220 °C.

2.6.2. GC-MS

A HP 6890 gas chromatograph with a HP 5973 quadrupole mass spectrometer system was used. The injection and thermal desorption of the analytes inside the GC injector port were made in the splitless mode for 1 min at 270 °C. We used a HP-5MS chromatographic column (30 m × 0.25 mm I.D., 0.25 μm film thickness) with an oven temperature program of 70 °C (1 min), 70 °C min⁻¹ to 180 °C (3 min). The carrier gas was helium with a flow-rate of 1.8 ml min⁻¹. As can be seen, the chromatographic conditions are not the optimum to get a good separation between the different peaks of the wine volatile compounds. However, this separation was not necessary because the analyses were done in the SIM mode by using specific TCA ions. In that way, we avoided the interferences due to other compounds. The quantification ions selected were 194 for TCT (123 and 159 as qualifying ions) and 210 (195 and 212 as qualifying ions) for TCA and we kept the detector on from 2.83 min to 2.87 min for 194 ion and from 2.87 min to 2.92 min for 210 ion. Mass spectra were recorded by electron impact (EI) ionization at 70 eV.

3. Results and discussion

3.1. HS-SPME procedure optimization

First of all it was necessary to optimize the TCA extraction in order to obtain the maximum efficiency of the SPME process and, therefore, to get the maximum sensitivity on the TCA signal detected. The procedure optimization was carried out by using GC-ECD. The SPME fiber coating was the first parameter to study because it affects the whole extraction process. We checked several commercially available fibers and we verified that the most sensitive was the DVB/CAR/PDMS coating (for instance, this coating gave a TCA extraction extent 50% higher than when PDMS was used), so we chose this fiber to develop the analytical method [24].

Then, we optimized the experimental parameters that could affect the SPME process on the extraction of synthetic wine spiked with 50 ng l⁻¹ of TCT and 50 ng l⁻¹ of TCA. The most important ones were the extraction temperature, time, sample volume and ionic strength. We applied constant magnetic stirring (500 rpm) because this helps to transfer analytes from the sample matrix to the fiber coating [6]. Ionic strength is known to have a positive effect in TCA extraction in wines, so we added NaCl up to saturating the sample [6]. Regarding sample volume, we checked that smaller the headspace, the higher the extraction extent we got so, all the analyses for optimizing the procedure were made in 50 ml vials with the suitable volume of synthetic

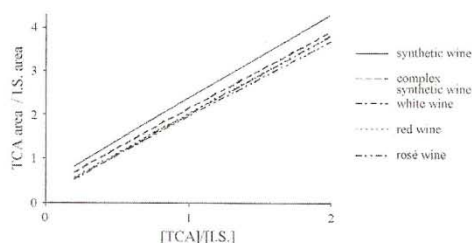


Fig. 1. GC-ECD relative response of TCA obtained using commercial wines (shown only 1 red, 1 rosé and 1 white as example) and synthetic (synthetic and complex synthetic) wines.

wine, but taking into account that it should be avoided the contact between the liquid and the fiber. The optimum volume of sample (synthetic wine or commercial wine) was 20 ml.

The next parameters studied were time and temperature of extraction. Since these variables are intimate related and they are the most critical parameters in SPME extraction, we optimized both together. To achieve this goal, we applied an experimental design consisting of a 2² factorial design plus an experiment in the center of the domain [28]. We built three consecutive domains from 10 °C to 55 °C for temperature and from 10 min to 90 min for time. We found the optimum point in 40 °C and 70 min.

Since ethanol – which is the main volatile component in wines – is known to compete with TCA and other analytes for the fiber coating [6,27], we also considered this parameter as another variable to be studied. To evaluate this effect, we analyzed triplicates of a synthetic wine with different ethanol contents (from 10.0 to 14.0% (v/v)). The maximum response was found in the range between 10.0 and 12.0% of ethanol. As we had to set the percentage of ethanol, we adjusted all future samples to 12.0% of ethanol – which is a usual content of ethanol in commercial wines – in order to minimize the sample handling.

The TCA distribution constants between the sample and the headspace, and between the headspace and the coating, depend strongly on the matrix [27]. To assess this effect, we built calibration curves using the internal standard technique by plotting peak-area ratios against concentration ratios. We took commercial TCA-free wines (5 red wines, 5 rosé wines and 5 white wines, all of which were adjusted at 12.0% ethanol), and two kinds of synthetic wines (synthetic wine and complex synthetic wine), all of them spiked with TCA (10.0, 50.0 and 100.0 ng l⁻¹) and 50.0 ng l⁻¹ of I.S. We analyzed every sample twice and, from the results, built a calibration curve for each of the 17 wines. After comparing the slopes (and their confidence interval) of each calibration curve, one to one, we concluded that all the calibrations curves were statistically comparable for a significance level of 0.05. However, as we can see in Fig. 1, the best adjustment was achieved when the complex synthetic wine was used as wine matrix. Therefore, this was selected to construct the calibration curve.

3.2. Wine blanks

Method validation required wines that were absolutely free of TCA. Therefore, as we explained in the samples section, when required, we used an SPE method to completely eliminate the native TCA from these wines. However, we first had to check whether this process involved any other change in wine composition due to loss of compounds in the cartridge during the extraction step.

With this purpose, two white wines, two rosé wines and two red wines without TCA (we previously checked the absence of the TCA peak) were chosen and passed them through a C₁₈ SPE cartridge. Then, we built a calibration curve for each wine spiked with different concentrations of TCA (10.0, 50.0 and 100.0 ng l⁻¹) and with 50.0 ng l⁻¹ of I.S. (duplicates) and compared the slopes (and their confidence interval) of these new calibrations curves against those obtained with the spiked complex synthetic wine and also against those obtained with the spiked untreated wine.

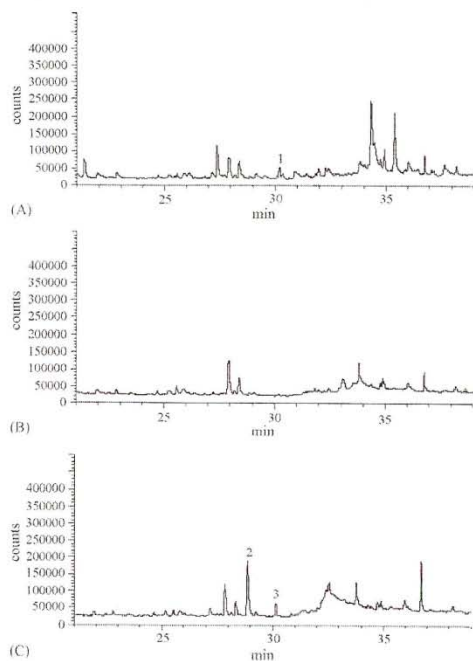


Fig. 2. Chromatograms obtained by application of SPE with C₁₈ cartridges to remove the native TCA in wines. (A) Red wine where TCA (1) is naturally present. (B) The same red wine after eluting through the C₁₈ cartridge. (C) The same cleaned wine spiked with 50.0 ng l⁻¹ of TCT (2) and 4.0 ng l⁻¹ of TCA (3). All these chromatograms were obtained using the HS-SPME-GC-ECD method described in text.

Table 1
 Analytical performance parameters of both proposed methods

Method	Calibration curve				Repeatability (% RSD)			Intermediate precision (% RSD)			LOQ (ng l ⁻¹)	Time (min)			
	a	S _r	b	S _b	S _{y/x}	r ²	15.5 (5.0 ng l ⁻¹)	11.4 (50.0 ng l ⁻¹)	15.5 (5.0 ng l ⁻¹)	11.4 (50.0 ng l ⁻¹)			8.7 (90.0 ng l ⁻¹)		
HS-SPME-GC-ECD	0.113	0.030	2.073	0.032	0.085	0.990	10.1 (50.0 ng l ⁻¹)	10.1 (50.0 ng l ⁻¹)	6.5 (90.0 ng l ⁻¹)	6.5 (90.0 ng l ⁻¹)	10.1 (40.0 ng l ⁻¹)	10.1 (40.0 ng l ⁻¹)	0.3	1.0	35
HS-SPME-GC-MS	0.042	0.059	1.242	0.036	0.115	0.995	10.4 (20.0 ng l ⁻¹)	10.4 (20.0 ng l ⁻¹)	10.1 (40.0 ng l ⁻¹)	10.1 (40.0 ng l ⁻¹)	10.1 (40.0 ng l ⁻¹)	10.1 (40.0 ng l ⁻¹)	0.2	0.8	5

a: intercept, b: slope, r²: determination coefficient, S_r: standard error of the intercept, S_b: standard error of the slope, S_{y/x}: standard error of the residuals, LOD: limit of detection, LOQ: limit of quantification, RSD (%): relative standard deviation.

All the slopes of the calibration curves were statistically comparable for a significance level of 0.05. We can therefore conclude that the cleaning process proposed did not affect the TCA extraction. Fig. 2 shows the chromatograms obtained when a red wine with TCA (2A) was cleaned by SPE (2B) and then was spiked with TCA (2C).

3.3. Analytical performance parameters

3.3.1. HS-SPME-GC-ECD

3.3.1.1. Calibration curve. We built a calibration curve using complex synthetic wine spiked with 6 different concentrations of TCA (1.0–100.0 ng l⁻¹) and an I.S. concentration of 50.0 ng l⁻¹. The calibration curve was built by plotting the peak-area ratios (TCA area/I.S. area) against the concentration ratios (TCA concentration/I.S. concentration). Each point of the calibration curve was obtained from the analysis of four replicates. Regarding to the limits of detection (LOD) and the limits of quantification (LOQ), these were calculated as 3 times and 10 times the standard deviation, respectively, of the measures of ten blank samples [28,29]. The parameters of the calibration curve were shown in Table 1.

3.3.1.2. Recovery. To study the recoveries we decided to use TCA-free wines. We used five naturally TCA-free wines (two red, one white and two rosé wines) and seven wines cleaned by SPE (two red, three white and two rosé wines). The recoveries were calculated as the percentage ratio between the concentrations of TCA found, using the calibration curve and the concentration added to wine. To evaluate the recovery along all the linear range, this value was calculated at three different concentration levels (low, medium and high level). The results of the study of recoveries are shown in Table 2. As it can be seen, and taking into account the low concentrations of TCA added, we found values of recoveries around 100% and also acceptable standard deviations.

3.3.1.3. Repeatability and intermediate precision. Repeatability and intermediate precision were estimated together by applying a single experiment set up with duplicates [28–30]. Two analyses of three samples of complex synthetic wine spiked with three different amounts of TCA (5.0 ng l⁻¹, 50.0 ng l⁻¹ and 90.0 ng l⁻¹) and 50.0 ng l⁻¹ of TCT were measured on

ten different days. An analysis of variance (ANOVA) of one factor was then applied. The results obtained (Table 1) were very good because the repeatability values were below 15% and intermediate precision values below 16% even at low levels of concentration (5.0 ng l⁻¹).

Fig. 2A shows a chromatogram of a red wine with naturally presence of TCA which was analyzed according to this method.

3.3.2. HS-SPME-GC-MS

3.3.2.1. Calibration curve. To obtain the calibration curve we proceeded as for the HS-SPME-GC-ECD method. The calibration curve was also built by using complex synthetic wine spiked with six different concentrations of TCA and an I.S. concentration of 50.0 ng l⁻¹. However, since we checked that up to 50 ng l⁻¹ the TCA response showed a change on its linearity, we decided to build the calibration curve along the concentration range of 1.0–50.0 ng l⁻¹. Although this concentration range was shorter than the one considered for GC-ECD method, it needs to be said that, due to the low perception threshold of TCA, only very poor quality wines would contain concentrations over 50, so this range is also acceptable to analyze TCA in wines. The parameters of the calibration curve and both LOD and LOQ are shown in Table 1.

3.3.2.2. Recovery. To evaluate the recovery value of this GC-MS method, we took in advantage the fact that we already had a GC method perfectly validated: the GC-ECD method. Therefore, we calculated this recovery values as the ratio between the concentration of TCA found by applying the GC-MS method and the concentration of TCA found by applying the GC-ECD method (we took this method as an internal reference method) and the concentration of TCA found by applying the GC-MS method. To get values as representative as possible, we calculated the recovery by analyzing duplicates of different wines with different levels of TCA concentration (low, medium and high level). Table 2 shows the good recovery results obtained which are between 79 and 107% and with relative standard deviations, around 10%.

3.3.2.3. Repeatability and intermediate precision. To obtain the repeatability and intermediate precision values we proceeded as HS-SPME-GC-ECD. So, we analyzed two samples of complex synthetic wine spiked with 5.0 ng l⁻¹, 20.0 ng l⁻¹

Table 2
Recovery percentages of TCA using the HS-SPME-GC-ECD method and the HS-SPME-GC-MS method

Kind of wine	TCA concentration level	% Recovery (HS-SPME-GC-ECD)	% RSD	% Recovery (HS-SPME-GC-MS)	% RSD
White wine (n=6)	Low	112.5	18.2	107.1	0.0
	Medium	124.8	12.1	86.3	3.4
	High	106.1	3.3	88.3	10.7
Rosé wine (n=6)	Low	100.0	32.9	98.2	32.3
	Medium	103.7	20.6	88.6	11.6
	High	100.8	12.6	88.4	7.5
Red wine (n=6)	Low	72.5	30.9	78.6	6.4
	Medium	96.0	17.3	97.4	12.0
	High	104.7	3.8	82.6	11.5

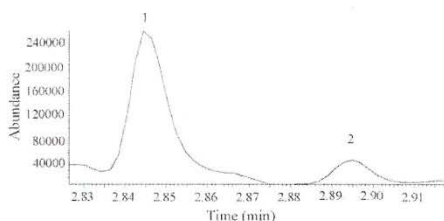


Fig. 3. Chromatogram obtained with the proposed HS-SPME-GC-MS method. 15.0 ng l^{-1} of TCT (1) (194 m/z ion) and 1.8 ng l^{-1} of TCA (2) (210 m/z data) in SIM mode.

and 46.0 ng l^{-1} and 50.0 ng l^{-1} of TCT on 10 different days. An ANOVA of one factor was then applied. The values obtained (Table 1) are around 10% for both parameters irrespective of the concentration level of TCA analyzed.

Fig. 3 shows a chromatogram obtained when the HS-SPME-GC-MS was used to analyze a red wine that contained naturally present TCA.

3.4. Comparative study of both methods using BLS

Once we evaluated both chromatographic methods and determined their analytical performance parameters, we proceeded with the comparative study. To accomplish this goal, we analyzed duplicates of 18 different wines (6 white, 6 rosé and 6 red wines) into the range of TCA concentrations of 1.0 ng l^{-1} and 50.0 ng l^{-1} , by using both methods and then, we compared the results obtained.

To get a comparison as exhaustive as it was possible, we could not forget that the real analysis is affected by the errors of both chromatographic methods and also by random errors which also must be included in the comparison. Therefore, we could not use ordinary least squares (OLSs) to make a typical comparison, because it only considers the error in the dependent variable (y) and it does not evaluate the error in the variable x . To be able to solve the OLS limitations, we compared the results by using bivariate least squares (BLSs). With this method it was possible

to make the comparative study taking into account errors in both axes, it is to say, the errors of both methods which was adjusting perfectly to our real problematic.

BLS takes the uncertainties in both axes into account to find the joint confidence interval for the slope and the intercept of the regression line. This test defines an elliptical surface where the coefficients of the calibration curve are the center of the ellipse. The ellipse limits are calculated by taking into account the size of the experimental error, the variances of the regression coefficients and the significance level chosen.

In that way we represented on x-axis the mean of the TCA concentration (and its variance) found using the HS-SPME-GC-ECD method and y-axis the mean of the TCA concentration (and its variance) found using HS-SPME-GC-MS (Fig. 4). If the two methods gave comparable results, the regression line would provide an intercept that would not significantly differ from 0 and a slope that would not significantly differ from 1. Table 3 shows the intercept and slope values provided by BLS method ($\alpha = 0.05$) when we compared the results of TCA contents obtained from both methods (we made a comparison for each kind of wine (white, rosé and red). From these values we can state that the results obtained on the analysis of TCA by using the GC-ECD method did not show statistically differences with those obtained on the analysis of TCA by using the GC-MSD method, because both methods provide comparable results.

So, we conclude that we have two suitable methods available for determining TCA in all kind of wines (white, rosé and red). Moreover, having both methods validated as it has been explained in previous sections, these can provide TCA quantification results with excellent accuracy and precision. In fact, as it is shown in Table 1, the parameters of the calibration graphs obtained for both methods are very good and, regarding the repeatability and intermediate precision, both methods show similar values for both parameters and, although the lower levels of concentration gave the higher standard deviations, all of these values are around 10%. Taking into account we are quantifying TCA at low ng l^{-1} levels, these values should be considered really suitable.

The main differences between both methods are the sensitivity and the running chromatogram time. Concerning the

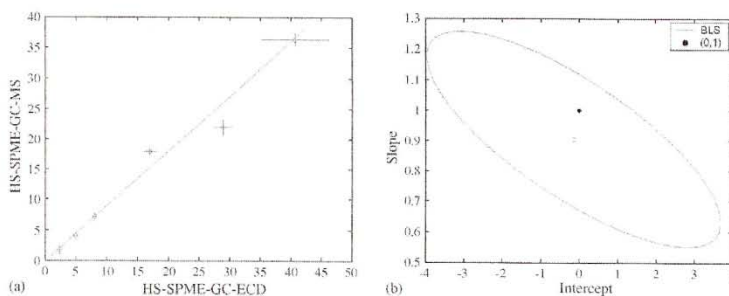


Fig. 4. (a) Calibration curve using bivariate linear squares (BLS) to compare the HS-SPME-GC-ECD method and HS-SPME-GC-MS method. The individual points and their uncertainties are all marked. (b) Joint confidence interval based on BLS techniques. Empty points indicate the ellipse centroid while the solid one indicates the theoretical point of zero intercept and unity slope. Values obtained using red wine samples.

Table 3

Slope and intercept values provided by bivariate least squares (BLS) when we compared the results of TCA contents by using both chromatographic methods

	Red wine (n=6)	White wine (n=6)	Rosé wine (n=6)
Slope	0.905	0.921	0.817
Standard deviation of slope	0.095	0.064	0.085
Intercept	-0.135	-0.594	1.432
Standard deviation of intercept	1.028	0.328	0.618
Estimation of random errors (variance)	2.424	1.879	4.182

Table 4

TCA concentration found in different commercial wines using both methods proposed

Kind of wine	HS-SPME-GC-ECD		HS-SPME-GC-MS	
	TCA (ng l ⁻¹)	% RSD	TCA (ng l ⁻¹)	% RSD
Red Wine (n=6)	2.4	6.3	1.8	48.6
	5.0	11.5	4.1	18.4
	8.1	4.3	7.2	8.2
	17.0	6.4	17.9	4.2
	28.9	5.4	22.0	5.6
	40.7	13.6	36.3	2.6
Rosé Wine (n=6)	3.2	1.7	2.4	20.1
	4.6	1.7	5.6	3.8
	8.7	1.9	8.4	13.9
	17.8	8.9	14.5	4.0
	28.8	1.0	24.1	5.1
	45.0	9.6	41.9	2.0
White wine (n=6)	1.1	27.3	0.0	0.0
	1.7	11.8	1.8	18.6
	9.8	9.0	8.3	14.7
	20.6	3.9	18.2	4.0
	27.7	1.6	22.6	15.1
	43.5	2.5	41.3	14.7

sensitivity, the HS-SPME-GC-ECD method shows a slope of its calibration graph higher than that obtained for the HS-SPME-GC-MS (Table 1) so the GC-ECD method is the most sensitive. Regarding to the running chromatogram time, it has to be said that when working with the GC-MS method, we obtained a chromatogram in scarcely 5 min, whereas with the GC-ECD method the chromatograms took about 35 min. Therefore, it is obvious that depending on the requirements of each analysis it can be better to use one or other method.

Table 4, shows the results obtained on the application of developed methods to different wine samples. The similar values of concentration, as well as the low values of RSD obtained, give a numerical confirmation of what it had been demonstrated when we carried out the comparative study with BLS: both methods are comparable and suitable for quantifying TCA in wines (red, rosé and white wines).

4. Conclusions

Here we present two suitable methods to quantifying TCA in wines. Both methods are able to quantifying this compound in all kind of wines (red, rosé and white). The use of complex synthetic wine solved the matrix problem, therefore only one calibration curve is required. Both methods are able to quantify-

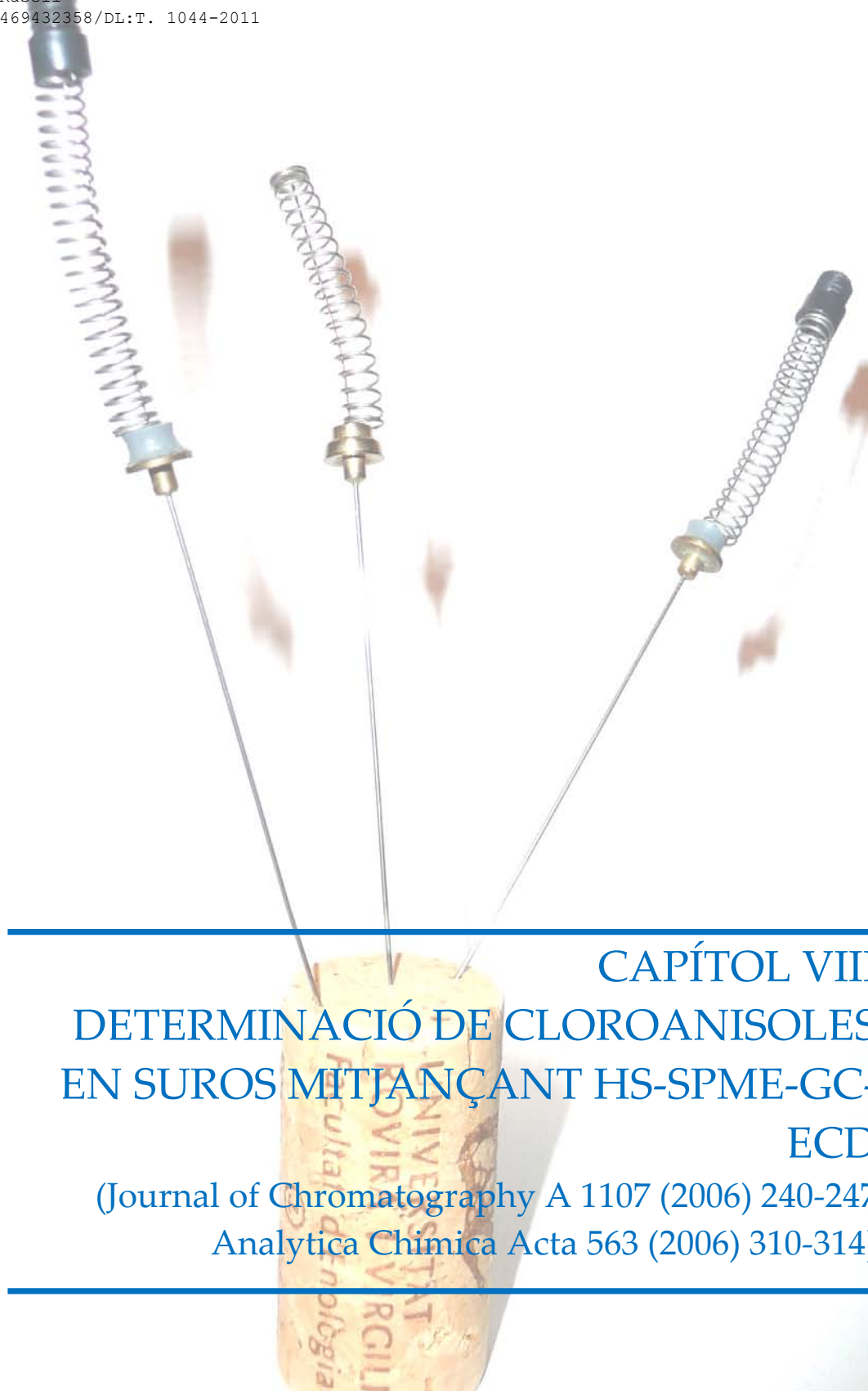
ing TCA below the sensorial threshold, so they could be a very good tool for quality control in wineries. From the comparative study we can state that both detectors used – mass spectrometry detector and electron capture detector – provide similar results. The difference between the developed methods lays on the best sensitivity of the GC-ECD method and on the very shorter chromatogram running time of the GC-MS method.

References

- [1] P. Ribéreau-Gayon, Y. Glories, A. Maujean, D. Dubordieu (Eds.), *Handbook of Enology: The Chemistry of Wine and Stabilisation and Treatments*, vol. 2, Wiley, Chichester, 2000, p. 209.
- [2] H.R. Buser, C. Zanier, H. Tanner, *J. Agric. Food Chem.* 30 (1982) 359.
- [3] M. Riu, M. Mestres, O. Busto, J. Guasch, *Anal. Chim. Acta* 563 (2006) 310.
- [4] S. Insa, E. Anticó, V. Ferreira, *J. Chromatogr. A* 1089 (2005) 235.
- [5] G. Michel, *Rev. Oenologues* 82 (1999) 24.
- [6] M. Riu, M. Mestres, O. Busto, J. Guasch, *J. Chromatogr. A* 977 (2002) 1.
- [7] R. Alzaga, L. Ortiz, F. Sánchez-Baeza, M.P. Marco, J.M. Bayona, *J. Agric. Food Chem.* 51 (2003) 3509.
- [8] R. Juanola, L. Guerrero, D. Subirà, V. Salvadó, S. Insa, J.A. García-Regueiro, E. Anticó, *Anal. Chim. Acta* 513 (2004) 291.
- [9] A. Martínez-Uruñuela, J.M. González-Sáiz, C. Pizarro, *J. Chromatogr. A* 1056 (2004) 49.
- [10] A.P. Pollnitz, K.H. Pardon, D. Liacopoulos, G.H. Skourounounis, M.A. Sefton, *Aust. J. Wine Res.* 2 (1996) 184.
- [11] T.J. Evans, C.E. Butzke, S.E. Ebeler, *J. Chromatogr. A* 786 (1997) 293.
- [12] S. Jonson, T. Uusitalo, B. van Bavel, I.-B. Gustafsson, G. Lindström, *J. Chromatogr. A* 1111 (2006) 71.
- [13] A. Peña-Niera, B. Fernández, M.C. García, T. Hernández, E. Cadahía, J.A. Suárez, *Eur. Food Res. Technol.* 211 (2000) 257.
- [14] G.J. Soleas, J. Yan, T. Sarver, D.M. Goldberg, *J. Agric. Food Chem.* 50 (2002) 1032.
- [15] A. Zalacain, G.L. Alonso, C. Lorenzo, M. Íñiguez, M.R. Salinas, *J. Chromatogr. A* 1033 (2004) 173.
- [16] J.L. Gómez-Ariza, T. García-Barrera, F. Lorenzo, *Anal. Chim. Acta* 516 (2004) 165.
- [17] J.L. Gómez-Ariza, T. García-Barrera, F. Lorenzo, *J. Chromatogr. A* 1049 (2004) 147.
- [18] E. Lizarraga, A. Irigoyen, V. Belsue, E. González, *J. Chromatogr. A* 1052 (2004) 145.
- [19] A. Martínez-Uruñuela, J.M. González-Sáiz, C. Pizarro, *J. Chromatogr. A* 1089 (2005) 31.
- [20] S. Jonson, T. Uusitalo, B. van Bavel, I.-B. Gustafsson, G. Lindström, *J. Chromatogr. A* 1111 (2006) 71.
- [21] N. Campillo, N. Aguinaga, P. Viñas, I. López-García, M. Hernández-Córdoba, *J. Chromatogr. A* 1061 (2004) 85.
- [22] M.A. Sefton, R.F. Simpson, *Aust. J. Grape Wine* 11 (2005) 226.
- [23] J. Riu, F.X. Rius, *Anal. Chem.* 68 (11) (1996) 1851.
- [24] Y.-H. Sung, T.-Y. Li, S.-D. Huang, *Talanta* 65 (2005) 518.
- [25] M. Mestres, C. Sala, M.P. Martí, O. Busto, J. Guasch, *J. Chromatogr. A* 835 (1999) 177.
- [26] R. Boqué, F.X. Rius, D.L. Massart, *J. Chem. Educ.* 71 (1994) 230.

- [27] J. Pawliszyn, *Solid-Phase Microextraction: Theory and Practice*, Wiley-VCH, New York, 1997.
- [28] M. Riu, M. Mestres, O. Busto, J. Guasch, *J. Chromatogr. A* 1107 (2006) 240.
- [29] D.L. Massart, B.G.M. Vandeginste, L.M.C. Buydens, S. De Jong, P.W. Lewi, J. Smeyers-Verbeke, in: B.G.M. Vandeginste, S.C. Ruton (Eds.), *Handbook of Chemometrics, Data Handling in Science and Technology*, vol. 20A, Elsevier, Amsterdam, 1997.
- [30] ISO (International Organization for Standardization), *ISO Guide 5725, Accuracy (Trueness and Precision) of Measurements Methods and Results –Part 3: Intermediate Measures of the Precision of a Standard Measurement Method* ISO, Geneva, 1994.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
DETERMINACIÓ ANALÍTICA DE 2,4,6-TRICLOROANISOLE I ALTRES CLOROANISOLES
EN VINS I SUROS
Marc Riu Rusell
ISBN:9788469432358/DL:T. 1044-2011



CAPÍTOL VIII
DETERMINACIÓ DE CLOROANISOLES
EN SUROS MITJANÇANT HS-SPME-GC-
ECD

(Journal of Chromatography A 1107 (2006) 240-247
Analytica Chimica Acta 563 (2006) 310-314)

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
DETERMINACIÓ ANALÍTICA DE 2,4,6-TRICLOROANISOLE I ALTRES CLOROANISOLES
EN VINS I SUROS
Marc Riu Rusell
ISBN:9788469432358/DL:T. 1044-2011

1.- INTRODUCCIÓ

Una vegada s'havia resolt el problema de la determinació de 2,4,6-tricloroanisolet (TCA) en vins, quedava pendent encara determinar els cloroanisolet en els taps de suro. El problema, però, radicava en quins eren els cloroanisolet que eren interessants de determinar: els totals, és a dir, el contingut real de cloroanisolet presents en el suro, o bé els cloroanisolet extraïbles, que es defineixen com la quantitat de cloroanisolet alliberats en una solució a l'equilibri. Fins al moment, a la bibliografia hi havia mètodes per determinar el contingut de 2,4,6-tricloroanisolet (TCA) i/o altres cloroanisolet en vins però, en el cas del suro, la literatura científica feia referència sobretot a mètodes que determinaven els cloroanisolet extraïbles.

Des del nostre punt de vista, els cloroanisolet extraïbles proporcionaven una informació que variava en funció del mètode emprat per obtenir-los. Per contra, el contingut real de cloroanisolet permetia saber la quantitat d'analit que tenia una mostra de manera inequívoca. Per aquesta raó ens endinsarem en aquest tema d'estudi, tot utilitzant la microextracció en fase sòlida (SPME) per fer el pas de extracció i concentració, ja que els resultats obtinguts en el vi foren molt positius. Tot i així, el pas d'una matriu líquida a una matriu sòlida obria uns interrogants importants, com és la preparació de patrons i el comportament de la microextracció en aquesta matriu.

En aquest capítol serà interessant fer una descripció de l'optimització i l'estudi dels paràmetres més crítics en la determinació de cloroanisolet en suro i, també, fer un desenvolupament teòric de la microextracció en fase sòlida per entendre millor aquest procés d'extracció.

2.- MICROEXTRACCIÓ DE CLOROANISOLES EN SUROS

Quan té lloc el procés d'extracció d'una mostra de suro utilitzant la microextracció en fase sòlida (SPME), els diferents equilibris que s'esdevenen entre les diferents fases es poden veure representats en la Figura VIII.1.

En aquest plantejament es considera que el pas directe dels compostos del suro a l'espai de cap, sense passar per l'aigua, es considera negligible. Tot compost alliberat del suro passa primer per l'aigua abans d'arribar al *headspace*. Aquesta consideració té lloc ja que el suro està immers en l'aigua.

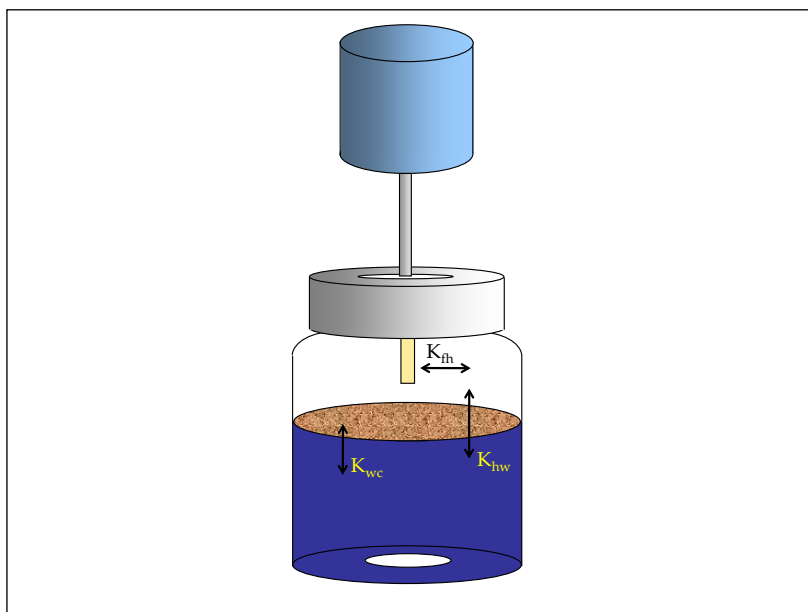


Figura VIII.1. Equilibris que s'esdevenen entre les diferents fases implicades en la extracció d'una mostra de suro en el procés de SPME

La quantitat final de l'analit es pot definir de la següent manera:

$$n = C_f^\infty \cdot V_f \quad \text{Eq. VIII.1}$$

La concentració final en l'equilibri en tots els possibles medis o fases a on pugui estar els compostos d'interès serà igual a la concentració inicial que hi havia al suro

$$C_0 \cdot V_c = C_f^\infty \cdot V_f + C_h^\infty \cdot V_h + C_w^\infty \cdot V_w + C_c^\infty \cdot V_c \quad \text{Eq. VIII.2}$$

on,

$V_c = \text{volum del suro}$

$V_f = \text{volum de la fibra}$

$V_h = \text{volum del headspace}$

$V_w = \text{volum d'aigua}$

Per altra banda, es poden definir una sèrie de constants de distribució:

- Constant distribució fibra - headspace: $K_{fh} = \frac{C_f^\infty}{C_h^\infty}$ Eq. VIII.3

- Constant distribució headspace - aigua: $K_{hw} = \frac{C_h^\infty}{C_w^\infty}$ Eq. VIII.4

- Constant distribució aigua - suro: $K_{wc} = \frac{C_w^\infty}{C_c^\infty}$ Eq. VIII.5

Es considera que la concentració final dels analits en cada una de les fases és la concentració en l'equilibri:

$C_f^\infty = \text{concentració final a la fibra}$

$C_h^\infty = \text{concentració final al headspace}$

$C_w^\infty = \text{concentració final a l'aigua}$

$C_c^\infty = \text{concentració final al suro}$

Si es gira l'equació VIII.3

$$C_h^\infty = \frac{C_f^\infty}{k_{fh}}$$

I es substitueix en l'equació VIII.4:

$$C_w^\infty = \frac{C_h^\infty}{k_{hw}} = \frac{C_f^\infty}{k_{hw} \cdot k_{fh}} \quad \text{Eq. VIII.6}$$

Es substitueix l'equació VIII.6 a l'equació VIII.5:

$$C_c^\infty = \frac{C_w^\infty}{k_{wc}} = \frac{C_f^\infty}{k_{hw} \cdot k_{fh} \cdot k_{wc}} \quad \text{Eq. VIII.7}$$

Es substitueix les equacions VIII.3, VIII.4 i VIII.5 a VIII.2, donant lloc a:

$$C_0 \cdot V_c = C_f^\infty \cdot V_f + \frac{C_f^\infty \cdot V_h}{k_{fh}} + \frac{C_f^\infty \cdot V_w}{k_{hw} \cdot k_{fh}} + \frac{C_f^\infty \cdot V_c}{k_{hw} \cdot k_{fh} \cdot k_{wc}} \quad \text{Eq. VIII.8}$$

Es multiplica l'equació anterior per $k_{hw} \cdot k_{fh} \cdot k_{wc}$ numerador i denominador:

$$C_0 \cdot V_c = \frac{C_f^\infty \cdot V_f \cdot k_{hw} \cdot k_{fh} \cdot k_{wc}}{k_{hw} \cdot k_{fh} \cdot k_{wc}} + \frac{C_f^\infty \cdot V_h \cdot k_{hw} \cdot k_{wc}}{k_{hw} \cdot k_{fh} \cdot k_{wc}} + \frac{C_f^\infty \cdot V_w \cdot k_{wc}}{k_{hw} \cdot k_{fh} \cdot k_{wc}} + \frac{C_f^\infty \cdot V_c}{k_{hw} \cdot k_{fh} \cdot k_{wc}} \quad \text{Eq. VIII.9}$$

$$C_0 \cdot V_c \cdot k_{hw} \cdot k_{fh} \cdot k_{wc} = C_f^\infty \cdot V_f \cdot k_{hw} \cdot k_{fh} \cdot k_{wc} + C_f^\infty \cdot V_h \cdot k_{hw} \cdot k_{wc} + C_f^\infty \cdot V_w \cdot k_{wc} + C_f^\infty \cdot V_c \quad \text{Eq. VIII.10}$$

Si es multiplica cada terme de la igualtat per V_f i es treu factor comú $C_f^\infty \cdot V_f$

$$C_0 \cdot V_c \cdot k_{hw} \cdot k_{fh} \cdot k_{wc} \cdot V_f = C_f^\infty \cdot V_f \cdot [V_f \cdot k_{hw} \cdot k_{fh} \cdot k_{wc} + V_h \cdot k_{wc} \cdot k_{hw} + V_w \cdot k_{wc} + V_c] \quad \text{Eq. VIII.11}$$

Es substitueix aquesta equació a l'equació VIII.1, donant lloc a

$$n = \frac{C_0 \cdot V_c \cdot k_{hw} \cdot k_{fh} \cdot k_{wc} \cdot V_f}{V_f \cdot k_{hw} \cdot k_{fh} \cdot k_{wc} + V_h \cdot k_{wc} \cdot k_{hw} + V_w \cdot k_{wc} + V_c} \quad \text{Eq. VIII.12}$$

Es pot definir una altra constant de distribució, k_{fc} , constant de distribució entre la fibra i el suro, la qual s'expressarà com:

$$k_{fc} = k_{hw} \cdot k_{fh} \cdot k_{wc} \quad \text{Eq. VIII.13}$$

Al ser substituïda l'equació VIII.13 en VIII.12 s'obté:

$$n = \frac{C_0 \cdot V_c \cdot k_{fc} \cdot V_f}{V_f \cdot k_{fc} + V_h \cdot k_{wc} \cdot k_{hw} + V_w \cdot k_{wc} + V_c} \quad \text{Eq. VIII.14}$$

Tenint en compte que la concentració inicial dels analits d'interès (ja siguin inherents o afegits) es pot definir a partir de la següent equació:

$$C_o = \frac{m}{M} \quad \text{Eq. VIII.15}$$

on m és la quantitat de d' analits presents en M grams de suro, i que la densitat del suro δ_c es defineix com

$$\delta_c = \frac{M}{V_c} \quad \text{Eq. VIII.16}$$

on M són els grams de suro, tal com s'ha definit anteriorment i V_c representa el volum del suro.

Si ara es fa la substitució de les equacions VIII.15 i VIII.16 a VIII.14 s'arriba a l'equació final de:

$$n = \frac{m \cdot k_{fc} \cdot V_f}{V_f \cdot k_{fc} \cdot \delta_c + V_h \cdot k_{wc} \cdot k_{hw} \cdot \delta_c + V_w \cdot k_{wc} \cdot \delta_c + M} \quad \text{Eq. VIII.17}$$

Una altra hipòtesis que es pot adoptar és considerar que el compostos passen del suro a l'espai de cap directament, sense tenir en compte en cap instant el solvent utilitzat (aigua). És a dir, l'aigua només actua com a mitja homogeneïtzador, no extractor.

En aquest cas:

$$k_{hc} = k_{cw} \quad \text{Eq. VIII.18}$$

En desenvolupar les equacions de la mateixa manera que abans s'arriba a una equació final, molt similar a la VIII.17, però una mica més simplificada:

$$n = \frac{m \cdot k_{fc} \cdot V_f}{V_f \cdot k_{fc} \cdot \delta_c + V_h \cdot k_{hc} \cdot \delta_c + M} \quad \text{Eq. VIII.19}$$

Tant en les equacions VIII.17 i VIII.19 s'arriba a les mateixes conclusions. Si augmenta m , és a dir, la quantitat d'analits addicionats o inherentment presents en el suro, augmenta n , el número d'analits extrets. Es desprèn que, a l'augmentar M , s'afecta a diferents paràmetres de l'equació, especialment en el denominador, de manera que un augment proporcional d' m i M no s'ha de veure traduït en un augment en el mateix nivell d' n . Això implica que, per augmentar la sensibilitat de la tècnica, un augment de la massa de suro analitzat no es presenta com una bona opció.

Si es considera que la constant de distribució k_{hc} és relativament petita ($<0,25$), l'aplicació de la tècnica del headspace no afecta a la quantitat d'analit extreta per la fase estacionària, sempre i quan el volum del headspace sigui molt més petit que el de la solució aquosa ($V_h \ll V_m$). Per tant, en general, els límits de detecció obtinguts amb l'HS-SPME i la DI-SPME han de ser força similars. La pèrdua de sensibilitat és important només quan la k_{hc} és gran i/o quan s'utilitza un gran volum d'espai de cap. Per tant, l'espai de cap serà una variable que es podrà modificar per tal d'augmentar la sensibilitat. Interessa un espai de cap el més petit possible, però suficient per introduir-hi la fibra.

3.- PARÀMETRES EXPERIMENTALS

Tot i que inicialment es pretenia obtenir un mètode comú d'anàlisi dels cloroanisoles, clorofenols i guaiacol, els diferents estudis que es van dur a terme van demostrar que aquesta anàlisi simultània no era recomanable. De fet, tot i que, tal i com mostra la figura VIII.2, era possible una separació cromatogràfica dels cloroanisoles i clorofenols, la diferent resposta dels compostos considerats feia difícil treballar amb tots ells en la mateixa anàlisi, de manera que era preferible treballar amb aquests compostos de manera separada. Per tant, doncs, l'estudi es centrà en els cloroanisoles, ja que eren els que realment tenien un interès des del punt de vista de l'olor a humitat.

A diferència de la matriu del vi, la qual és un líquid homogeni, quan es treballa amb el suro, la matriu canvia de manera radical. Aquest fet condiciona en gran mesura el tractament de la mostra. Per dur a terme els primers estudis es va optar per treballar amb suro molt. Una bona moltura ens oferia la possibilitat d'una major homogeneïtzació del producte, a més de facilitar l'extracció dels compostos sense haver de plantejar-nos l'efecte de la distribució dels cloroanisoles en el material. Per moldre el suro era necessari congelar la mostra amb nitrogen líquid. Utilitzant aquesta metodologia era més fàcil el procés, a l'hora que s'evitava la pèrdua de compostos per culpa de l'escalfament de la mostra que provoca el molinet elèctric emprat.

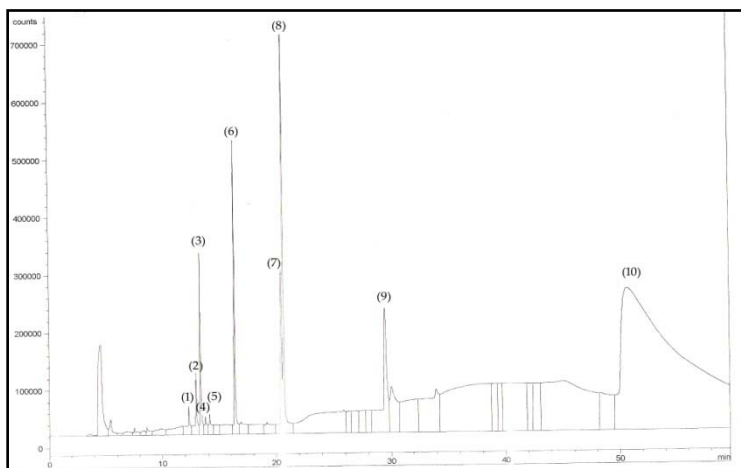


Figura VIII.2. Separació cromatogràfica. (1) 2,6-dicloroanisole (2) 2,3,6-triclorotoluenè (3) 2,4,6-tricloroanisole (4) guaiacol (5) 2,4-dicloroanisole (6) 2,3,4,6-tetracloroanisole (7) 2,4,6-triclorofenol (8) 2,3,4,5,6-pentacloroanisole (9) 2,3,4,6-tetraclorofenol (10) 2,3,4,5,6-pentaclorofenol

Tal i com s'havia fet ja en treballs previs, el primer pas fou l'elecció del recobriment de la fibra d'SPME. Se n'avaluaren de diferents. Concretament: 100 μm polidimetilsiloxà (PDMS), 65 μm polidimetilsiloxà/divinilbenzè (PDMS/DVB), 85 μm poliacrilat (PA), 75 μm carboxen/polidimetilsiloxà (CAR/PDMS), 65 μm carbowax/divinilbenzè (CW/DVB) i 50/30 μm stableflex divinilbenzè /carboxen/polidimetilsiloxà (DVB/CAR/PDMS) de 1 cm. Els millors resultats foren obtinguts amb la fibra de 50/30 μm stableflex divinilbenzè /carboxen/polidimetilsiloxà (DVB/CAR/PDMS) d'1 cm tal com es pot veure en la Figura VIII.3 i, per tant, aquesta fou el recobriment escollit.

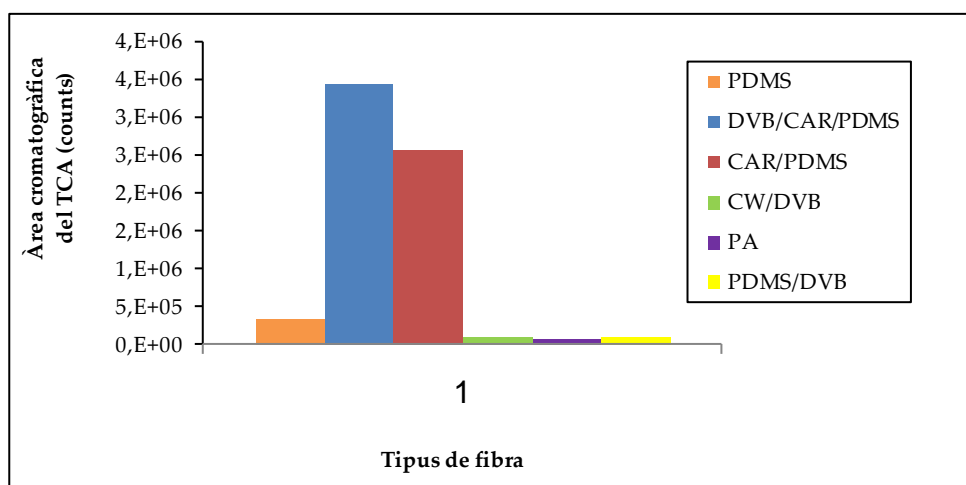


Figura VIII.3. Eficàcia dels diferents recobriments testats

El següent pas era decidir quina era la quantitat de suro molt més adequada per tal de quantificar els compostos d'interès. En un principi, es creia que s'obtingria major resposta cromatogràfica a l'analitzar més quantitat de suro. Aquest estudi es dugué a terme amb vials de 20 ml de capacitat, utilitzant 10 ml d'aigua ultrapura com a solvent d'extracció i saturació de clorur sòdic, i amb vials de 50 ml de capacitat, utilitzant 20 ml d'aigua ultrapura com a solvent d'extracció i saturació de clorur sòdic. En tots els casos s'addicionaren 25 $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$ de cloroanisoles, guaiacol i els clorofenols d'interès, amb excepció del pentaclorofenol (PCP) del qual s'addicionà 625 $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$ (compost que proporcionava una resposta més baixa). Els resultats obtinguts foren bastant sorprenents i es poden veure en la Figura VIII.4 i la Figura VIII.5, respectivament.

Tal com es pot veure en les figures presentades, el fet d'augmentar la quantitat de suro, tot mantenint la concentració d'analits, no es tradueix en un augment de la resposta cromatogràfica. Tot el contrari: en augmentar el pes de mostra s'observà una disminució dels compostos d'interès. Aquest comportament era degut a què quan es depositaven grans quantitats de suro en el vial, com que aquest sura, el barret que es forma sobre l'aigua formava una capa impedint que els analits passessin de l'aigua cap a l'espai de cap.

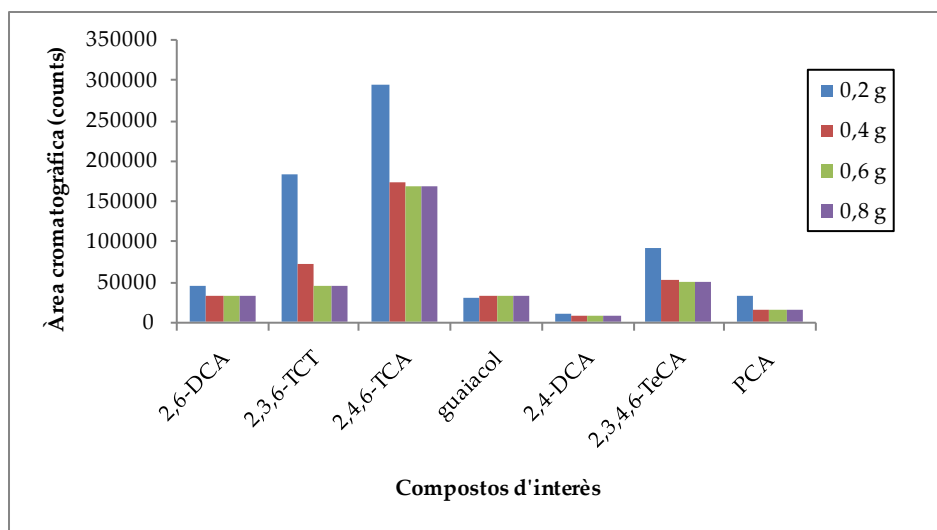


Figura VIII.4. Resposta cromatogràfica dels compostos d'interès. Vial 20 ml, 10 ml d'aigua ultrapura

Totes aquestes proves s'havien dut a terme treballant amb aigua, però la pregunta era si algun altre dissolvent ens podria oferir millor rendiment. Davant d'aquest interrogant es decidí provar altres solvents, tot i que l'experiència ens deia que els resultats haurien de ser menys favorables, ja que els solvents solen constituir una interferència en l'extracció. Els solvents testats van ser l'aigua (MQ), l'etanol (ETOH), el tetrahidrofurà (THF), l'acetonitril (ACN), l'acetona, l'acetat d'etil (EtAC) i mesclades d'etanol, de tetrahidrofurà i acetat d'etil amb aigua, amb diferents proporcions. Els resultats es poden comprovar en la Figura VIII.6 on es pot veure que l'aigua presentava les millors característiques per a dur a terme aquesta analítica.

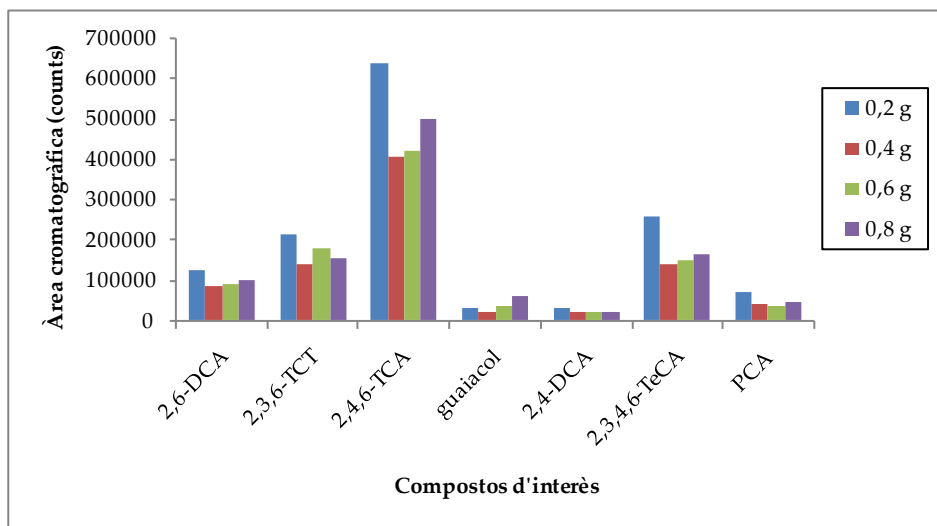


Figura VIII.5. Resposta cromatogràfica dels compostos d'interès. Vial 50 ml, 20 ml d'aigua ultrapura

El tema del dissolvent fou tractat encara més extensament quan es decidí avaluar si realment era necessària l'addició d'aigua ultrapura per tal de facilitar l'extracció. També fou convenient avaluar l'efecte salí, ja que en matriu sòlida l'efecte no era tan patent. Es provaren diferents volums d'aigua ultrapura i diferents concentracions de clorur sòdic. Els resultats obtinguts demostraren que calia un volum òptim de 25 ml d'aigua, però que l'addició de clorur sòdic no ajudava en l'extracció dels compostos. Així doncs, l'aigua ens facilitava l'homogeneització de la mostra, tot actuant també en la disminució del volum de l'espai de cap, paràmetre important a controlar en l'extracció utilitzant fibres de microextracció en fase sòlida. Respecte al clorur sòdic, a l'augmentar la força iònica, es provocava una disminució de la solubilitat dels compostos d'interès en l'aigua, de manera que era menys probable el seu pas del suro a l'aigua i, posteriorment, cap a l'espai de cap, lloc on es produiria l'extracció.

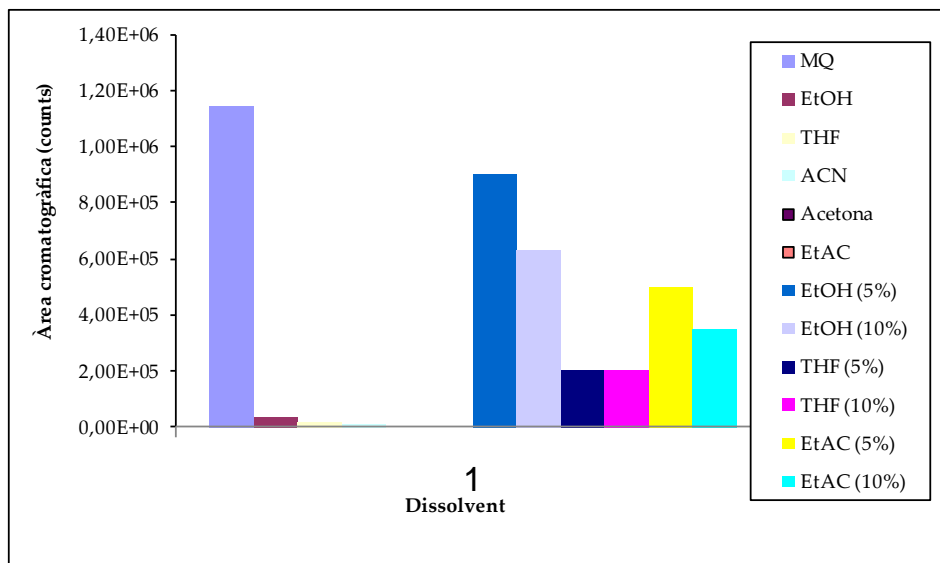


Figura VIII.6. Resposta cromatogràfica del TCA utilitzant diferents dissolvents

Arribats a aquest punt, es tenia clar la quantitat de suro amb la que treballar, el dissolvent d'extracció i la seva quantitat. Ara calia optimitzar les condicions d'extracció. Per fer-ho, com altres vegades, es decidí treballar amb un disseny factorial amb dos factors i dos nivells i un punt central. Per arribar a les condicions òptimes, es construïren diferents dominis per arribar al final a les condicions de 90 minuts d'extracció a 65°C.

Quan s'analitzen simultàniament diferents compostos, pot sorgir el dubte de si la possible competència entre ells. Per estudiar-ho, es feu una recta de calibrat de TCA, tot modificant les concentracions dels altres compostos. Es comprovà que la recta obtinguda era bona ($r^2 > 0,99$), de manera que l'extracció dels altres compostos no afectava, almenys, al TCA.

Finalment, donat que alguns treballs parlaven de que aquest tipus d'extracció podia arribar a ser exhaustiva, es va decidir comprovar-ho. Per fer-ho es va analitzar diferents vegades un mateix suro contaminat, per tal de determinar-ne les àrees cromatogràfiques, tal com es pot veure en la Figura VIII.7.

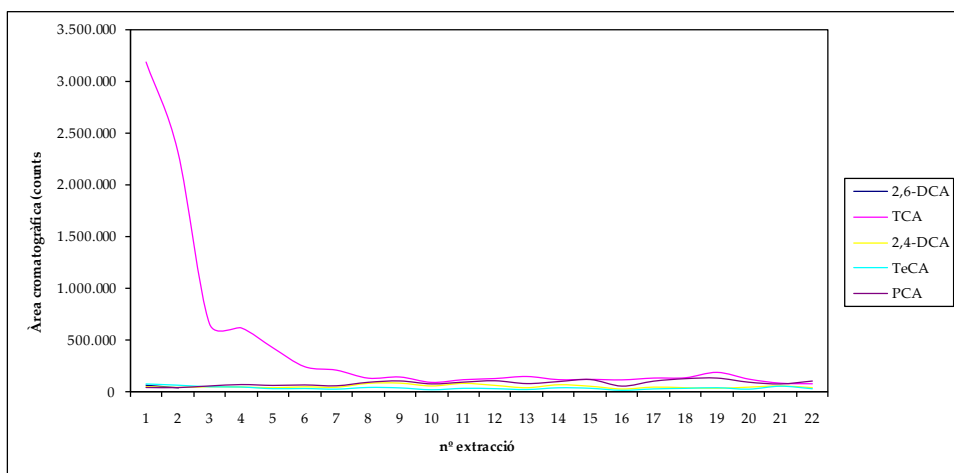


Figura VIII.7. Extraccions successives sobre una mateixa mostra

Tal com es pot veure en la Figura VIII.7 després de la primera extracció encara queda una quantitat considerable de cloroanisoles. No és fins a partir de la vuitena extracció que hi ha menys d'un 5% de TCA respecte el valor inicial. Aquestes dades ens informen de que l'extracció no és exhaustiva, però no és necessari. És important treballar, però, en la situació d'equilibri, ja que és el punt a on s'obté una millor precisió. Aquesta prova es repetí amb suros contaminats artificialment per comprovar si el mateix efecte s'observava, essent la resposta positiva.

4.- PREPARACIÓ DE PATRONS SÒLIDS

L'estudi de com preparar els patrons de suro fou un dels punts crítics del treball. El primer problema trobat fou l'obtenció de blancs per dur a terme la validació. Tots els suros avaluats presentaven, en més o menys grau, TCA i altres cloroanisoles, de manera que calia obtenir una matriu lliure d'aquests compostos o bé, com a mínim, tenir la certesa de tenir suficient suro blanc per tal de no tenir problemes durant la validació. Per tal de fer-ho, es decidí eliminar els cloroanisoles mitjançant una extracció sòlid-líquid. El mètode consistia en extraccions de porcions de 1 gram de mostra durant 60 minuts mitjançant agitació magnètica, utilitzant com a dissolvent l'n-pentà (25 ml). Però, tot i que la neteja era efectiva, calia avaluar si el tractament efectuat provocava altres canvis (com presència de petites traces de n-pentà que alteressin l'extracció posterior). Aquest estudi es feu comparant les àrees cromatogràfiques dels cloroanisoles conjuntament, mitjançant una recta de calibratge d'un suro lliure de cloroanisoles naturalment i un altre suro que s'havia sotmès a una extracció amb n-pentà. La hipòtesis a complir era que si l'ordenada a l'origen i la pendent de la recta de calibratge no diferien significativament de 0 i 1 respectivament, amb un nivell de significança de 0,05, es podia considerar que el procés d'extracció amb n-pentà no provocava canvis significatius en el producte i no afectava en el resultat final. Per dur a terme la comparativa, s'aplicà la regressió lineal amb errors en ambdós eixos (BLS), enlloc de la regressió lineal clàssica (OLS), ja que, d'aquesta manera, es tenia en compte l'error dels dos casos a comparar. El resultat obtingut ens demostrà que l'extracció no afectava al procés de determinació de cloroanisoles i, per tant, es podia utilitzar per aquest propòsit.

Però la problemàtica de com preparar els patrons sòlids no estava resolta. Els principals paràmetres que es decidí optimitzar foren: el tipus de mostra (mostra molta o no), el gruix de la partícula, l'estabilitat dels patrons i de les mostres -avaluant l'afecte del procés de moldre-, i el moment propici d'addició de cloroanisoles. Tots aquests paràmetres s'avaluaren amb addicions de 25 ng·g⁻¹ i una comparativa de tots els compostos d'interès simultàniament, tot aplicant BLS. Estudiant tots aquests paràmetres, s'arribà a la conclusió que les condicions propícies eren moldre el suro i tamisar-lo (llum de malla de 1 mm). El procés de congelació i mòlt de la mostra no provocava pèrdues significatives dels compostos d'interès.

Durant el procés de validació de la tècnica analítica, diferents qüestions sobre la relació dels cloroanisoles i els taps de suro ens despertaren la curiositat. Una d'elles fou la distribució d'aquests compostos en un tap. Per tal d'estudiar aquest

tema, encara que fos a nivell superficial, s'agafaren 5 taps diferents de cava i es dividiren en tres seccions longitudinals. Cada secció es dividí per la meitat. Una part es triturà i s'analitzà i l'altra s'analitzà directament. Cada mostra s'analitzà per duplicat. Els resultats obtinguts ens informaren que no hi havia cap patró de distribució del cloroanisoles, almenys en les mostres avaluades. És a dir, no es trobava cap fracció que presentés sempre més quantitat de TCA (en unitats d'àrea cromatogràfica). Aquests experiments foren útils per confirmar que amb suro mòlt la resposta obtinguda presentava dispersions més petites. L'altre pregunta que ens despertava gran interès era si els compostos estaven més presents en la part exterior o en la interior de la peça. Per dur a terme aquesta avaluació es mostrejaren tres taps diferents i es dividiren en tres seccions com abans però, a més, es dividiren entre interior i exterior. En aquest cas només s'analitzà el suro mòlt. Si s'observa la proporció entre l'exterior i l'interior (veure Taula VIII.1) es pot comprovar que, els cloroanisoles es concentren, bàsicament, a l'exterior del suro, almenys en les mostres analitzades.

Taula VIII.1. Distribució dels cloroanisoles en un tap de suro. Expressat en proporció (àrea cloroanisoles exterior/àrea cloroanisoles interior)

Suro	2,6-DCA	TCA	2,4-DCA	TeCA	PCA
1	-	7,52	1,81	1,91	10,26
1	-	0,97	1,59	3,54	2,37
1	-	1,18	1,53	0,95	1,99
2	-	0,97	1,70	0,88	3,10
2	-	0,97	1,33	0,71	2,32
2	-	0,65	0,31	0,77	0,15
3	1,91	1,16	1,35	1,06	3,15
3	1,22	1,58	1,48	0,80	3,84
3	1,49	1,96	1,76	1,88	10,61

Tal i com es pot veure, a l'exterior es concentra fins a 11 vegades més de cloroanisoles que no pas en l'interior.

Tot i que aquestes últimes dades s'hagin donat com a exemple testimonial d'altres estudis portats a terme durant aquest procés, els resultats obtinguts obren importants interrogants, noves vies d'estudi.

Totes les consideracions efectuades fins aquest punt foren les que van permetre desenvolupar el mètode d'anàlisi per la determinació quantitativa de cloroanisoles en suros. Els resultats obtinguts i la seva discussió quedaren plasmats en els

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
DETERMINACIÓ ANALÍTICA DE 2,4,6-TRICLOROANISOLE I ALTRES CLOROANISOLES
EN VINS I SUROS
Marc Riu Rusell
ISBN:9788469432358/DL:T. 1044-2011

articles titulats "*Quantification of chloroanisoles in cork using headspace solid-phase microextraction and gas chromatography with electron capture detection*" i "*Determination of chloroanisoles in different kind of cork stoppers*", els quals van ser publicats al *Journal of Chromatography A* i *Analytica Chimica Acta*, respectivament.



Quantification of chloroanisoles in cork using headspace solid-phase microextraction and gas chromatography with electron capture detection

M. Riu, M. Mestres, O. Busto, J. Guasch*

Departament de Química Analítica i Química Orgànica, Unitat d'Enologia del CeRTA, Facultat d'Enologia de Tarragona,
Universitat Rovira i Virgili, c./Marcel·lí Domingo s/n, 43007 Tarragona, Catalonia, Spain

Received 23 August 2005; received in revised form 12 December 2005; accepted 19 December 2005

Available online 6 January 2006

Abstract

Chloroanisoles can migrate from the cork stopper in wine bottles to the wine and give it a musty taint so it is important to find a method by which they can be determined. The aim of this paper is to develop a method for quantifying 2,4-dichloroanisole, 2,6-dichloroanisole, 2,4,6-trichloroanisole, 2,3,4,6-tetrachloroanisole and 2,3,4,5,6-pentachloroanisole in cork using headspace solid-phase microextraction and gas chromatography with electron capture detection. After we had prepared the cork standards that were so essential to the work we optimised the parameters that most influence headspace solid-phase microextraction: fibre coating, vial volume, cork, kind and volume of solvent to help the extraction, extraction temperature and time, ionic strength and stirring. The method quantifies the total amount of chloroanisoles in cork stoppers (natural, agglomerated, agglomerated with disks and sparkling wine stoppers), at suitable concentrations so that the capacity of these compounds to give wine a musty taint can be evaluated. The quantification limits are: 2,6-dichloroanisole (8.6 ng/g), 2,4,6-trichloroanisole (0.8 ng/g), 2,4-dichloroanisole (3.5 ng/g), 2,3,4,6-tetrachloroanisole (0.6 ng/g), 2,3,4,5,6-pentachloroanisole (0.8 ng/g). The other quality parameters are: recoveries (90.3–105.8%), repeatability (4–13% (RSD expressed)) and intermediate precision (5–14% (RSD expressed)).

© 2005 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Cork; Chloroanisoles; 2,4-Dichloroanisole; 2,6-Dichloroanisole; 2,4,6-Trichloroanisole; 2,3,4,6-Tetrachloroanisole; 2,3,4,5,6-Pentachloroanisole; Solid-phase microextraction; Headspace analysis; Gas chromatography and electron capture detection; Cork taint

1. Introduction

Ever since Dom Perignon, a French Benedictine monk, began to use bark oak (*Quercus suber*) to close wine bottles, the cork-wine combination has prevailed, because the cork stopper has been regarded as the most suitable material to preserve wine because of its physical properties and quality aspects. However, cork is a natural product and not inert, so it can interact with wine, sometimes modify its flavour and even give it organoleptic defects [1]. This is the case of the *musty/mouldy taint*, traditionally known as *cork taint*. Some of the compounds involved in this defect may originate in the cork stopper [2] (for instance, 1-octen-3-ol, 1-octen-3-one, 2-methylisoborneol, geosmine, guaiacol and/or chloroanisoles) [3]. The main responsible is 2,4,6-trichloroanisole [4] (in at least 80% of the cases) but also, to a lesser extent 2,3,4,6-tetrachloroanisole (TeCA)

and 2,3,4,5,6-pentachloroanisole (PCA) are responsible as well [5–6]. Chloroanisoles usually arise from *O*-methylation of chlorophenols, as a detoxification method, by different microorganisms, especially fungi, under particular conditions of temperature and humidity [7]. Chlorophenols are often present because of the packaging [8], the fungicides, herbicides or wood preservatives that are used in wineries, or some cork stopper manufacturers' practises, such as using hypochlorite as a cork bleaching agent [9]. The wines could be contaminated in the cellar as well. For instance, the chlorophenol contamination could exist in the pallet crates used for bottle storage. These chlorophenols may develop to chloroanisoles, which could contaminate the cellar atmosphere and, consequently, contaminate the wine during the winery operations [1].

The presence of chloroanisoles in wine is due to the fact that, if they are present in contaminated cork, they can migrate from cork to wine. Although there are some studies related to this migration [10], these are not conclusive so, until now, there is not a specific value of chloroanisoles concentration in cork which could be considered the minimum to result in musty taint to wine.

* Corresponding author. Tel.: +34 977 55 84 96; fax: +34 977 55 84 46.
E-mail address: qaenol@urv.net (J. Guasch).

Taking into account the bad odour (off-flavours) and low sensorial perception threshold of these compounds, between 1 ng/l and 50 ng/l [1,3,11], this migration will imply serious consequences on wine organoleptic properties undermining its quality. Therefore, the determination of chloroanisoles in wines has originated an extensive research over the last decade to develop methods as sensitive as human sensory threshold [12–20]. However, to avoid the economical losses that this musty off-flavour promotes, it is very important to prevent this defect with an effective control of chloroanisoles in cork.

This control requires appropriate analytical methods which must provide enough sensitivity and selectivity as well as good repeatability and recovery. Gas chromatography is the most common technique used in these studies usually coupled to either a mass spectrometer detector [12,16–20], or to an electron capture detector (ECD) [13,15] and, recently, to an atomic emission detector [21]. However, due to low chloroanisole contents in cork, a previous extraction and concentration step is necessary. Thus, it is that several different techniques have been employed: supercritical fluid extraction [22], liquid extraction [23], solid phase extraction [24], purge and trap [21], headspace solid-phase microextraction [25] or multiple headspace solid-phase microextraction [26]. In most of the studies, the researchers have only analysed the releasable chloroanisoles [27], which means the chloroanisoles extracted when the cork is soaked in a solvent (water, wine or others). However, although there is no information about the relationship between the internal structure of cork and the migration of chloroanisoles to the extraction solvent, it is known that depending on the kind of cork (agglomerated, natural) the chloroanisoles release into the wines to a different extent [21]. Therefore, this parameter is not suitable for the quality control, because it must be evaluated in a different way depending on the sample. Thus, we thought that the parameter which should be determined as a quality control was the total content of chloroanisoles in the cork closures, because the value of this parameter will always be the same, with no dependence of the method used for its determination.

From these premises, the main purpose of this paper was to develop a fast, accurate, precise, effective and low-cost method for quantifying the total endogenous chloroanisoles in the different kinds of cork by using a 50/30 µm stableflex divinylbenzene/carboxen/polydimethylsiloxane (DVB/CAR/PDMS) solid-phase microextraction fibre and gas chromatography with electron capture detector. Moreover, in order to achieve this goal, it was essential to study and develop a way of preparing cork standards with a known amount of chloroanisoles, taking into account the lack of reference materials and the absence of other studies in this field.

2. Methods and materials

2.1. Chemicals and reagents

The chloroanisoles studied were: 2,4-dichloroanisole (2,4-DCA) [553-82-2], 2,6-dichloroanisole (2,6-DCA) [1984-

65-2], 2,4,6-trichloroanisole (TCA) [87-40-1], 2,3,4,6-tetrachloroanisole (TeCA) [938-22-7] and 2,3,4,5,6-pentachloroanisole (PCA) [1825-21-4]. The internal standard (IS) used was 2,3,6-trichlorotoluene (TCT) [2077-46-5].

2,4-DCA and 2,6-DCA were supplied by Acros Organics (Geel, Belgium). They were 99% pure. TCA was supplied by Sigma-Aldrich Quimica, SA (Madrid, Spain) and its purity was of 99%. TeCA was supplied by UltraScientific (North Kingstown, RI, USA) with a purity of 95+%. PCA (98.9% pure) was supplied by Supelco (Bellefonte, USA) and TCT (98% pure) was supplied by Flucka (Buchs, Switzerland).

An individual stock solution of 1000 mg/l of each compound in HPLC-grade ethanol was prepared and stored at 4 °C from which we prepared standard solutions of 100 and 10 µg/l by dilution with HPLC-grade ethanol, which were also stored at 4 °C.

The solvents used (*n*-hexane, *n*-pentane, ethanol (EtOH), tetrahydrofuran (THF), acetonitrile (ACN), acetone and ethyl acetate (EtAc) were HPLC grade. They were all supplied by Scharlab (Barcelona, Spain), who also supplied NaCl (99.8% pure) and NaOH (99% pure). The water was MilliQ grade.

2.2. Cork sample preparation

The cork (stoppers or sheets) was first cut into small portions, which were frozen by being immersed in nitrogen liquid. Then, these frozen bits of cork were ground using a blender and, finally, the ground cork was passed through a sieve (1 mm of diameter) to get the most homogeneous sample possible. By freezing the cork, we made the blending easier and also prevented the compounds of interest from being lost due to volatilising during the blending.

Because we needed chloroanisole-free cork for some of the following studies, we developed the following cleaning process: one gram of ground cork was placed in a 70 ml glass tube. The sample was shaken by rotary mixer with 25 ml of *n*-pentane for 60 min. Then, the cork and *n*-pentane were separated by vacuum filtration. We repeated the process three times and the *n*-pentane that still remained in the clear cork sample was evaporated under a gentle N₂ stream. Then we experimentally verified that the cleaning process had been successful, i.e. no presence of chloroanisole chromatographic peaks.

2.3. SPME fibres

The different fibres tested to develop the method were: 100 µm polydimethylsiloxane (PDMS), 65 µm polydimethylsiloxane/divinylbenzene (PDMS/DVB), 85 µm polyacrylate (PA), 75 µm carboxen/polydimethylsiloxane (CAR/PDMS), 65 µm carbowax/divinylbenzene (CW/DVB) and 50/30 µm stableflex divinylbenzene/carboxen/polydimethylsiloxane (DVB/CAR/PDMS) of 1 cm. They were all purchased from Supelco (Bellefonte, USA) with a SPME fibre holder for manual sampling.

2.4. HS-SPME procedure

In a 50 ml vial (43 mm of diameter \times 73 mm of large), we weighed 0.2000 g (± 0.0001 g) of ground cork (with chloroanisoles and/or TCT spiking when necessary) and we added 25 ml of water. Then the vials were tightly capped with a PTFE-faced silicone septum and placed in a thermostated bath. SPME was carried out under constant magnetic stirring (700 rpm) using a stir bar. The sample vials were pre-equilibrated for 30 min at 65 °C. Afterwards, the stainless steel needle, in which the fibre was housed, was pushed through the vial septum, allowing the coating to be exposed to the headspace over the sample for 90 min, at 65 °C. After the extraction, the fibre was pulled again into the needle sheath and the SPME device was removed from the vial. It was ready to be inserted into the injection port for thermal desorption at 270 °C for 1 min in splitless mode.

Although the reproducibility of fibres has considerably been improved, we used more than one in order to take into account the variability response between the fibres [28].

2.5. Statistical analysis

The slope and intercept of the calibration graph, calculated by linear least-squares regression, with the determination coefficient (r^2) and the standard errors of the coefficients was determined by the ULC (Univariate Linear Calibration) [29] computer program. The analysis of the variance (ANOVA) to determine the repeatability and intermediate precision was carried out by the statistical package supplied in Excel. The comparisons of the slope and intercept using linear regression with errors in both axes [30] were calculated using home-made subroutines (Matlab for Microsoft Windows ver. 5.3., the Mathworks, Natick, MA).

2.6. Instrumental analysis

All the chromatographic analyses were carried out using a Hewlett-Packard (HP, Palo Alto, USA) 5890 series II gas chromatograph equipped with a HP electron capture detector. The injection and the thermal desorption of the analytes inside the GC injection port, equipped with a straight glass liner of 0.75 mm I.D., were carried out in the splitless mode for 1 min at 270 °C. The GC was equipped with a Chrompack (Middelburg, The Netherlands) CP-Wax 57 CB (50 m \times 0.25 mm I.D., 0.20 μ m film thickness) fused-silica column. Carrier gas was high-purity helium flowing through the column at 0.8 ml/min (head pressure, 175 kPa). The detector was held at 300 °C. The oven temperature program was: 40 °C (2 min), 13 °C/min to 150 °C (15 min), 15 °C/min to 200 °C (9 min), 5 °C/min to 220 °C.

3. Results and discussion

3.1. HS-SPME parameters optimisation

To proceed with the HS-SPME optimisation, we carried out different experiments in 50 ml vials into which we poured 0.2000 g (± 0.0001 g) of ground cork spiked with 25.0 ng/g of

chloroanisoles and TCT, 20 ml of water of 6 M NaCl. The experiments had been done twice. The whole mixture was stirred magnetically. The extraction conditions were 25 °C and 30 min, with 30 min at 25 °C of previous pre-equilibration [13]. The values of these parameters were modified depending on the parameter studied.

The choice of the SPME fibre coating was the first parameter considered and the coatings checked are listed in Section 2.3. The extraction efficiency of the 1 cm 50/30 stableflex DVB/CAR/PDMS was measured as the TCA chromatographic peak and was 25% higher than the CAR/PDMS and 90% higher than all the other fibres. Therefore, this fibre was selected as the optimum for the extraction.

It was also very important to study whether adding a solvent to cork (solid sample) could improve the SPME extraction. The solvents studied are listed in Section 2.1 and we also tested some solvent mixtures: water with 5% ethanol, 10% ethanol, 5% acetonitrile, 10% acetonitrile, 5% tetrahydrofuran or 10% tetrahydrofuran. The results showed that the higher the polarity of the solvent was, the higher the chromatographic response of the chloroanisoles. Therefore, MQ grade water was considered to be the most suitable solvent for extracting the analytes.

Once we had found the best solvent for the extraction, we had to determine which volume optimised the extraction. The volume of solvent depends on the volume of headspace and it is well known that the volume of headspace affects the extraction when SPME is used [31]. We also determined which vial (20 ml (23 mm of diameter \times 75 mm of large) or 50 ml) was best and whether the addition of salt had any positive influence on the chloroanisole extraction.

The quantities of water studied were 0 ml, 5 ml, 10 ml, 15 ml, 20 ml, 25 ml and 30 ml (greater volumes mean that the fibre is partially immersed in the water). The response was best when the experiments were carried out with 25 ml of water in a 50 ml vial with no salt addition. The main purpose of the water was to homogenise the sample and accelerate the extraction. As far as the water volume is concerned, the lower the headspace volume, the higher the extraction is. Related to ionic strength, greater ionic strength decreases the solubility of neutral molecules in the water [32]. So the higher the ionic strength in water, the lower the solubility of the chloroanisoles, and the less likely they are to pass from the cork to the water. Consequently, fewer chloroanisoles can pass to the headspace and to the fibre.

We also studied the time and temperature of extraction. As these two parameters are related, we applied an experimental design to evaluate time and temperature together. It consisted of a 2² factorial design plus an experiment in the centre of the domain [33]. To get to the optimised point we built three consecutive domains. The first one was from 60 min to 180 min and from 20 °C to 50 °C. The second one was from 90 min to 270 min and from 35 °C to 65 °C, and the third was from 60 min to 120 min and from 50 °C to 80 °C. Although responses were higher for the less volatile chloroanisoles, such as TeCA and PCA at temperatures up to 65 °C, the response for the other compounds decreased. We also extracted other compounds, which led to bad resolution of the chloroanisole peaks and the internal standard. Since the TCA was the most interesting compound, we

chose the conditions in which it was extracted most efficiently: 90 min and 65 °C.

3.2. Preparation of cork standards

The absence of cork reference materials makes it necessary to study how to prepare the cork standards. We checked the effect of the size of the cork sample (ground or not ground) and the way in which the analytes had to be added. Moreover, it was important to check if the method for obtaining cork blanks causes changes in the structure of the cork or not. All the analyses carried out to get the reference cork samples were made using natural cork, sheets and stoppers. The SPME conditions are those described in Section 2.4.

3.2.1. Cork blanks

It was very important to determine whether the process using *n*-pentane for obtaining cork blanks (that is to say, cork without chloroanisoles), as we explained in Section 2.2 (cork sample preparation), changes the cork structure, and therefore, involves changes in chloroanisole extraction.

To evaluate this cleaning process, we compared the analyses run under the current SPME optimal conditions in two ways. We analysed ground cork that was naturally free of chloroanisoles (checked first) and the same cork previously cleaned. In both cases we spiked 25.0 ng/g of each chloroanisole and TCT throughout the surface of the ground cork and immediately analysed it. We ran duplicates of each analysis.

If the results obtained without the cleaning method were the same as those obtained with, the cleaning method was a suitable option for making contaminated cork chloroanisole free. As all chloroanisoles and TCT had different sensitivities (and different chromatographic areas), we decided to apply a statistical analysis using linear calibration to compare the areas of all the compounds evaluated together. The results of the methods compared were regressed against one another. If the two

methods being compared gave comparable results, the regression line had an intercept that did not significantly differ from 0 and a slope that did not significantly differ from 1. Taking into account that real analyses are affected by random errors, we decided to include these random errors in the comparison so, we considered the standard deviation of both methods (ground cork that was both naturally free of, and spiked with, chloroanisoles; and ground cork cleaned using *n*-pentane and spiked with the compounds of interest). To make this atypical comparison, we could not use the ordinary least squares (OLS) because OLS only considers the error in the dependent variable (*y*). Instead we used a linear regression that took into account the uncertainties in both axes ($\alpha = 0.05$): the bivariate least squares (BLS) [30]. BLS finds the joint confidence interval for the slope and the intercept of the regression line taking the uncertainties in both axes into account. This test defines an elliptical surface where the coefficients of the calibration curve are the centre of the ellipse. The ellipse limits are calculated taking into account the magnitude of the experimental error, the variances of the regression coefficients and the significance level chosen.

On the *x*-axis we placed the response mean of each chloroanisole and TCT (and its variance) obtained from the cork that was naturally free of chloroanisoles and on the *y*-axis we placed the response mean of each chloroanisole and TCT (and its variance) obtained from the samples which had undergone the cleaning process. Fig. 1 shows an example of the regression curve and the joint confidence interval obtained by applying the joint confidence interval. Fig. 1a shows the regression curve for the comparison carried out. It can be seen that the correlation is excellent. Fig. 1b shows the ellipse built. If the theoretical point 0.1 (intercept 0 and slope 1) was inside the elliptical surface (as in the figure), the regression coefficients of the curve are not significantly different from the theoretical coefficients, so the two methods are comparable.

The results show that the cleaning process did not affect the extraction of chloroanisoles, since there were no significant

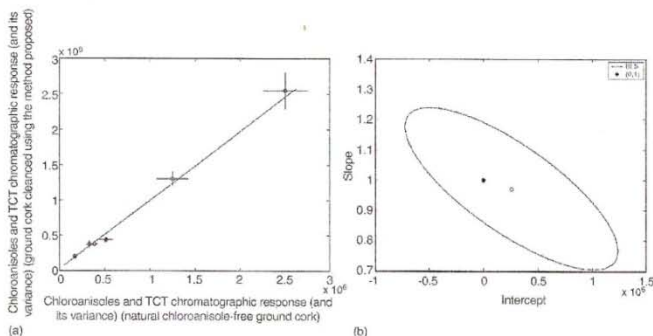


Fig. 1. (a) Calibration curve using bivariate linear squares (BLS) to compare the chromatographic areas of the natural chloroanisole-free ground cork and the chromatographic areas of the ground cork cleaned using the method proposed. The individual points and their uncertainties are all marked. (b) Joint confidence interval based on BLS techniques. Empty points indicate the ellipse centroid while the solid one indicates the theoretical point of zero intercept and unity slope.

differences between the chromatographic responses of the two samples.

3.2.2. Ground or unground cork

We decided to evaluate if the size of the cork particle had any influence by grinding the cork and passing it through a sieve. To carry out the study, we used cork ground in a blender and pieces of cork that could be put into the vial (around 0.5 cm × 0.5 cm × 0.5 cm). Then we took 0.2000 g (±0.0001 g) of the ground cork or 0.200 g (±0.001 g) of the unground cork (the difficulties to accurately weigh increased considerably) of these different corks and spiked both samples with 25.0 ng/g of each chloroanisole and TCT in a 50 ml vial with 25 ml of water. Then we carried out the extraction following the process explained in Section 2.4. Chloroanisoles and TCT were added to the pieces of cork in such a way that the compounds were distributed evenly throughout the cork (both on the surface and inside, not just in one point of the cork), to make the sample as homogeneous as possible. The chloroanisoles and TCT were added to the surface of the ground cork and immediately analysed. We analysed duplicates for both cases.

The results gave slightly higher responses when pieces of cork were used. This behaviour may be because the ground cork was floating on the water, forming a surface layer of cork that made it difficult for the analytes to pass into the headspace and, therefore, to the fibre coating [34]. However, we preferred to use ground cork because the response was high enough to achieve the levels of concentration of interest, it was easier to prepare, the sample was more homogeneous and it gave more repetitive results.

3.2.3. Addition of chloroanisoles

Another experimental parameter studied was when the chloroanisoles had to be added (before or after grinding the cork), so that we could evaluate whether the grinding action causes loss of analytes. We roughly weighed four different pieces of cork (2–4 g) and spiked them, as before, with 25.0 ng/g of each chloroanisole and TCT. Each piece was then kept separately at 4 °C for 7 days inside a brown glass bottle. We considered 7 days, to be long enough for the compounds to be distributed throughout the cork. After this period of time, the cork was ground following the procedure explained in Section 2.2, and analysed by using the optimised HS-SPME-GC-ECD method.

The results of analysing these four spiked pieces of cork were compared with the results of analysing six freshly prepared replicates of 0.2000 g (±0.0001 g) of ground cork spiked with 25.0 ng/g of each chloroanisole and TCT. This comparison was made by applying the BLS (see Section 3.2.1). On the x-axis we placed the response mean of each chloroanisole and TCT (and its variance) of the six freshly prepared replicates and on the y-axis we placed the response mean of each chloroanisole and TCT (and its variance) of each of the four samples (pieces of cork) that we spiked and stored at 4 °C for 7 days.

All the regressions were comparable for an $\alpha = 0.01$ or lower. From these results we can conclude that the grinding action caused no loss of analytes, because the composition of the cork before and after it was ground was the same. Furthermore, from

the results obtained we can also conclude that it is possible to prepare the cork standard several days before analysis because the results are similar to those obtained when fresh standards are analysed.

On the other hand, and in order to complement the studies made, we attempted to find if the grinding step had an effect on the stability of the cork spiked analytes. We attempted to find whether the method used to spike the cork with compounds could emulate their natural state in the cork bark. We also tried to evaluate the size of the ground cork and determine whether it needed to be sieved. To carry out this study, we roughly weighed four different pieces of cork (2–4 g) and spiked them with 25.0 ng/g of each chloroanisole and TCT. Then they were immediately ground following the procedure presented in Section 2.2. Moreover, to check if the size of the ground cork had any influence, for instance, on the homogeneity of chloroanisoles in the cork, we divided the sample in two and kept each part separately. The first fraction was passed through a sieve (1 mm in diameter) and the second was not. We kept the sieved and the unsieved cork separately in brown glass bottles. Then, both samples were analysed on different days: 0, 1, 4 and 7.

As before, we applied the BLS test ($\alpha = 0.05$) [30]. The results were regressed against the results of analysing six replicates of 0.2000 g (±0.0001 g) of freshly prepared ground cork spiked with 25.0 ng/g of each chloroanisole and TCT.

In the case of sieved cork (four samples on four different days), all the regressions were comparable with the six replicates that represented the proposed method, but when we compared the unsieved ground cork (four samples on four different days), only 66% of the regressions were comparable, independent of the day. So, we concluded that it was necessary to have the ground cork sieved, because it was the most homogeneous and representative sample. Likewise, the time when the compounds were added did not affect the following analyses and, as there were no significant differences at time 0 between the different kinds of samples, we can state that the grinding action caused no loss of analytes.

3.3. Analytical performance parameters

3.3.1. Calibration curves

Because the perception levels of chloroanisoles are low, it is very important that the determination and quantification limits also be as low as possible. Both limits were determined by analysing blank samples of each analyte. We took the limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ) to be three times and ten times the standard deviation, respectively, of the measures of the blank samples. Then, the measurement signal was re-expressed in concentrations by applying the slope of the calibration curve [35,36].

So, first, we built a calibration curve for every analyte (seven points, quadruplicates in every one) in the following ranges: 2,6-DCA and 2,4-DCA (1.0–500.0 ng/g), TCA (0.3–100.0 ng/g), TeCA (0.3–200.0 ng/g) and PCA (1.0–500.0 ng/g) and 12.0 ng/g of internal standard.

Then we analysed 10 cork samples (optimal conditions) that were completely free of chloroanisoles and spiked with 12.0 ng/g

Table 1
 Parameters of the different calibration curves ($y = a + bx$) built to quantify the chloroanisoles in cork stoppers

Chloroanisole	<i>a</i>	<i>Sa</i>	<i>b</i>	<i>Sb</i>	<i>r</i> ²	LOD (ng/g)	LOQ (ng/g)	<i>Sy/x</i>
2,6-DCA	-0.019	0.3049	0.3249	0.0130	0.9920	2.6	8.6	0.4917
TCA	0.6341	0.2109	2.9367	0.2109	0.9986	0.2	0.8	0.3735
2,4-DCA	0.0766	0.0716	0.0839	0.0031	0.9934	1.1	3.5	0.1161
TeCA	0.0211	0.2459	1.8448	0.0321	0.9985	0.2	0.6	0.4479
PCA	-0.0547	0.2311	0.6429	0.0171	0.9992	0.2	0.8	0.2970

of TCT. We measured the baseline of every chloroanisole and determined the peak ratio of every compound (chromatographic area of the chloroanisole/chromatographic area of TCT). We calculated the mean and the standard deviation of every compound. The LOD and LOQ are presented in Table 1.

Once both limits had been determined, we were able to recalculate the definitive calibration curve of every compound studied. The first point of each calibration curve was the quantification limit. The other points were the same as those used in the calibration curve built before. The parameters of the calibration curve are shown in Table 1.

3.3.2. Recoveries

To calculate the different recovery values, we used three samples of each kind of cork evaluated (natural cork stopper, agglomerated cork stopper and stopper with disks), used for wine and sparkling wine. First we determined the quantity of chloroanisoles naturally present in every cork in quadruplicate. Then, we spiked the corks with different quantities of chloroanisoles (three levels: low, middle and high concentration), throughout the range of concentrations in quadruplicate. The recovery values (%) were calculated as the ratio of the concentration of the chloroanisole found in the cork by using the calibration graph and the concentration of the chloroanisole

naturally present in cork plus the spiked chloroanisole concentration. All the recoveries (Table 2) were between 90% and 105% with RSD (%) of 4–11%, depending on the kind of chloroanisole and its concentration. Fig. 2 shows an example of a cork chromatogram used to study the recoveries. The values found demonstrate that the chloroanisole-spiked cork behaved in a similar way to cork that naturally contained chloroanisoles. That is to say, the method for spiking cork with chloroanisoles presented here is suitable for preparing cork standards with a known concentration of chloroanisoles.

3.3.3. Repeatability and intermediate precision

The repeatability and the intermediate precision were estimated together by applying a single experiment set-up with duplicates [35–37]. We made measurements in all the three kinds of cork studied (natural cork stopper, agglomerated cork stopper and stopper with disks, used for wine and sparkling wine) throughout the range of concentrations. For every case, we ran duplicates on six different days. The results are presented in Table 3.

Table 2
 Recoveries in three different kinds of cork stoppers (natural cork stoppers, agglomerated cork stoppers and sparkling wine cork stoppers)

Chloroanisole	Kind of cork stopper	Recovery (%)	Intermediate precision (RSD (%))
2,6-DCA	Natural cork	95.0	11.4
	Agglomerated cork	97.6	7.4
	Sparkling wine cork	96.7	8.9
TCA	Natural cork	105.8	8.7
	Agglomerated cork	103.4	5.5
	Sparkling wine cork	103.2	7.4
2,4-DCA	Natural cork	100.5	10.0
	Agglomerated cork	105.8	7.7
	Sparkling wine cork	99.7	9.8
TeCA	Natural cork	97.9	7.5
	Agglomerated cork	104.4	6.1
	Sparkling wine cork	99.4	3.9
PCA	Natural cork	90.3	6.4
	Agglomerated cork	97.9	7.6
	Sparkling wine cork	95.3	6.8

Seventy-two analyses were carried out.

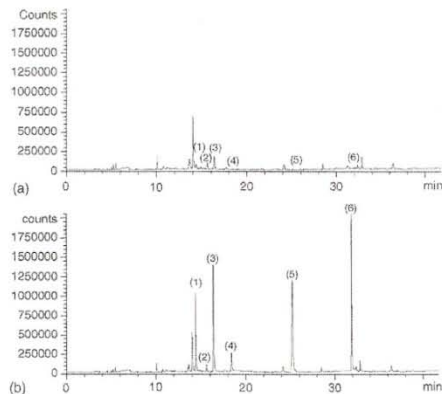


Fig. 2. Chromatograms obtained from studying the recoveries of the method using an agglomerate cork stopper. (a) Chromatogram of the cork naturally contaminated with chloroanisoles: 2,6-DCA: (1) 27.2 ng/g, TCT; (2) 12.0 ng/g; TCA: (3) 39.0 ng/g, 2,4-DCA: (4) 14.6 ng/g, TeCA: (5) 3.4 ng/g, PCA: (6) 10.0 ng/g. (b) Chromatogram obtained by spiking cork with different concentrations of chloroanisoles: 2,6-DCA: (1) 76.6 ng/g, TCT; (2) 12.0 ng/g, TCA: (3) 100.6 ng/g, 2,4-DCA: (4) 67.2 ng/g, TeCA: (5) 48.8 ng/g, PCA: (6) 51.1 ng/g.

Table 3
Repeatability and intermediate precision values of the method

Chloroanisole	Kind of cork stopper	Concentration (ng/g)	Repeatability (RSD (%))	Intermediate precision (RSD (%))
2,6-DCA	Natural cork	104.6	4.7	6.6
	Agglomerated cork	27.2	7.4	8.2
	Sparkling wine cork	476.2	9.1	10.9
TCA	Natural cork	83.5	5.2	7.5
	Agglomerated cork	39.0	5.2	5.9
	Sparkling wine cork	64.4	8.4	8.4
2,4-DCA	Natural cork	80.0	6.6	10.4
	Agglomerated cork	14.6	13.6	14.0
	Sparkling wine cork	450.0	5.1	9.7
TeCA	Natural cork	80.0	4.0	5.8
	Agglomerated cork	3.4	4.4	5.3
	Sparkling wine cork	150.0	3.9	8.0
PCA	Natural cork	84.5	9.3	9.3
	Agglomerated cork	10.0	8.1	9.0
	Sparkling wine cork	453.3	12.0	14.1

One hundred and eighty analyses were carried out.

4. Conclusions

In this paper, we present a new method for quantifying the total concentration in several kinds of cork of 2,4-dichloroanisole, 2,6-dichloroanisole, 2,4,6-trichloroanisole, 2,3,4,6-tetrachloroanisole, 2,3,4,5,6-pentachloroanisole. The performance parameters (calibration lines, recoveries, LOD, LOQ repeatability and intermediate precision) were excellent.

The greatest advantage of the method is that it determines a parameter whose value is not dependent on the method used for its determination: the total chloroanisoles in cork. Moreover, the method developed uses shorter extraction times than those needed for the determination of the releasable chloroanisoles.

We also present an easy way to prepare cork standards which requires no special instruments and simulates the behaviour of chloroanisoles that are naturally present in cork, as the various experiments and the statistical analyses demonstrated.

Therefore, we conclude that the method presented here, is a very good option for quantifying of 2,4-dichloroanisole, 2,6-dichloroanisole, 2,4,6-trichloroanisole, 2,3,4,6-tetrachloroanisole, 2,3,4,5,6-pentachloroanisole in cork stoppers and preventing wines from having a musty taint from cork.

Acknowledgements

The authors wish to thank the Ministerio de Ciencia y Tecnología/INIA (VIN00-045) for their financial support and Dr. Jordi Riu for his help in the statistical analysis.

References

[1] P. Ribéreau-Gayon, Y. Glories, A. Maujean, D. Dubordieu (Eds.), *Handbook of Enology: The Chemistry of Wine and Stabilisation and Treatments*, vol. 2, John Wiley & Sons Ltd., Chichester, 2000, p. 209.
[2] C. Silva Pereira, J.J. Figueiredo Marques, M.V. San Romão, *Crit. Rev. Microbiol.* 26 (3) (2000) 147.

[3] C.E. Butzke, T.J. Evans, S.E. Ebeler, in: A.L. Waterhouse, S.E. Ebeler (Eds.), *Chemistry of Wine Flavour*, American Chemistry Society, Washington, DC, 1999, p. 209.
[4] H.R. Buser, C. Zanier, H. Tanner, *J. Agric. Food Chem.* 30 (1982) 359.
[5] T.H. Lee, R.F. Simpson, in: G.H. Fleet (Ed.), *Wine Microbiology and Biotechnology*, Harwood Academic Press, Chur, 1993, p. 353.
[6] Quercus-Qualitative Experiments to Determine the Components Responsible and Eliminate the Causes of Undesirable Sensory Characteristics in Drinks Stopped with Cork, European Union and C.E. Liège contract No. AIR1-CT92-0372, 1996.
[7] M.L. Álvarez, L. López, J.M. López, E. Rodríguez, M.J. Martínez, G. Larriba, J.J.R. Coque, *Appl. Environ. Microbiol.* 68 (12) (2002) 5860.
[8] J.L. Hill, A.D. Locking, F.B. Whitfield, *Food Chem.* 54 (1995) 161.
[9] J.M. Amon, J.M. Vandepuer, R.F. Simpson, *Wine Ind. J.* 4 (1) (1989) 62.
[10] R. Juanela, D. Subirà, V. Salvadó, J.A. García, E. Anticó, *Eur. Food Res. Technol.* 220 (2005) 347.
[11] C. Fisher, U. Fisher, *J. Agric. Food Chem.* 45 (1997) 1995.
[12] T.J. Evans, C.E. Butzke, S.E. Ebeler, *J. Chromatogr. A* 786 (1997) 293.
[13] M. Riu, M. Mestres, O. Busto, J. Guasch, *J. Chromatogr. A* 977 (2002) 1.
[14] M.P. Martí, R. Boqué, M. Riu, O. Busto, J. Guasch, *Anal. Bioanal. Chem.* 376 (2003) 497.
[15] A. Martínez, J.M. González, C. Pizarro, *J. Chromatogr. A* 1056 (2004) 49.
[16] J.L. Gómez, T. García, F. Lorenzo, *Anal. Chim. Acta* 516 (2004) 165.
[17] J.L. Gómez, T. García, F. Lorenzo, *J. Chromatogr. A* 1049 (2004) 147.
[18] A. Zalacain, G.L. Alonso, C. Lorenzo, M. Iñiguez, M.R. Salinas, *J. Chromatogr. A* 1033 (2004) 173.
[19] E. Lizarraga, A. Irigoyen, V. Belsue, E. González, *J. Chromatogr. A* 1052 (2004) 1052.
[20] S. Insa, E. Anticó, V. Ferreira, *J. Chromatogr. A* 1089 (2005) 235.
[21] N. Campillo, N. Arguimaga, P. Viñas, I. López, M. Hernández, *J. Chromatogr. A* 1061 (2004) 85.
[22] M.K. Taylor, T.M. Young, C.E. Butzke, S.E. Ebeler, *J. Agric. Food Chem.* 48 (6) (2000) 2208.
[23] R. Juanela, D. Subirà, V. Salvadó, J.A. García, E. Anticó, *J. Chromatogr. A* 953 (2002) 207.
[24] G.J. Soleas, J. Yan, T. Server, D.M. Goldberg, *J. Agric. Food Chem.* 50 (2002) 1032.
[25] F. Bianchi, M. Careri, A. Mangia, M. Musci, *J. Sep. Sci.* 26 (2003) 369.
[26] O. Ezquerro, M.T. Tena, *J. Chromatogr. A* 1068 (2005) 201.
[27] S. Insa, V. Salvadó, E. Anticó, *J. Chromatogr. A* 1047 (2004) 15.

- [28] M. Mestres, C. Sala, M.P. Martí, O. Busto, J. Guasch, *J. Chromatogr. A* 835 (1999) 137.
- [29] R. Boqué, F.X. Rius, D.L. Massart, *J. Chem. Educ.* 70 (1994) 230.
- [30] J. Riu, F.X. Rius, *Anal. Chem.* 68 (11) (1996) 1851.
- [31] J. Pawliszyn, *Solid Phase Microextraction: Theory and Practice*, Wiley-VCH, Inc., New York, 1997.
- [32] L. Malleret, J. Dugay, A. Bruchet, M.C. Hennion, *J. Chromatogr. A* 999 (2003) 135.
- [33] M. Mestres, O. Busto, J. Guasch, *J. Chromatogr. A* 945 (2002) 211.
- [34] J.A. Ruiz, J. Quilez, M. Mestres, J. Guasch, *Cereal Chem.* 80 (3) (2003) 255.
- [35] D.L. Massart, B.G.M. Vandeginste, L.M.C. Buydens, S. De Jong, P.W. Lewi, J. Smeyers-Verbeke, in: B.G.M. Vandeginste, S.C. Ruton (Eds.), *Data Handling in Science and Technology*, 20A, Elsevier, Amsterdam, 1997.
- [36] EURACHEM, *The Fitness for Purpose of Analytical Methods, A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics*, EURACHEM Secretariat, Teddington, 1998.
- [37] International Organization for Standardization (ISO), *ISO Guide 5725, Accuracy (Trueness and Precision) of Measurements Methods and Results. Part 3. Intermediate Measures of the Precision of a Standard Measurement Method ISO*, Geneva, 1994.



Determination of total chloroanisoles in different kinds of cork stoppers

M. Riu, M. Mestres, O. Busto, J. Guasch*

Departament de Química Analítica i Química Orgànica, Unitat d'Enologia del CeRTA, Facultat d'Enologia de Tarragona, Universitat Rovira i Virgili, c./Marcel·lí Domingo s/n, 43007 Tarragona, Catalonia, Spain

Received 12 August 2005; received in revised form 10 October 2005; accepted 19 October 2005
Available online 1 December 2005

Abstract

This paper deals with the application of a new headspace solid-phase microextraction (HS-SPME) method developed in order to analyse the total amount of chloroanisoles in different kinds of cork stoppers (natural, agglomerated and sparkling wine stoppers). This parameter must be determined because these compounds can migrate from cork to wine giving it unpleasant musty taint and, therefore, undermine its organoleptic quality. Unlike the releasable amount of chloroanisoles, the total amount of chloroanisoles has no dependence of the method used for its determination so it can be used as a quality control parameter. The application of this method allowed the simultaneous determination of 2,4-dichloroanisole, 2,6-dichloroanisole, 2,4,6-trichloroanisole, 2,3,4,6-tetrachloroanisole and 2,3,4,5,6-pentachloroanisole.
© 2005 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Cork; Chloroanisoles; Solid-phase microextraction; Gas chromatography; Total amount of chloroanisoles; Quality control

1. Introduction

Musty taint, traditionally known as cork taint, is a serious problem for both wine and cork industries worldwide. It affects between 0.1 and 10% of European bottled wines [1]. Several compounds have been identified as possible contributors to cork taint, but chloroanisoles, specially 2,4,6-trichloroanisole (TCA), are the mayor impact components [2–4]. Chloroanisoles usually arise from *O*-methylation of chlorophenols, as a detoxification method, by different microorganisms, especially fungi, under particular conditions of temperature and humidity. Chlorophenols are often present because of the packaging, the fungicides, herbicides or wood preservatives that are used in wineries or some cork stopper manufacturers' practices, such as using hypochlorite as a cork bleaching agent [5].

Although there are studies that demonstrate the migration of chloroanisoles from cork to wine is not very high [6,7], this migration is enough to undermine the quality of wine. This fact is due to the musty off-flavour of these compounds and also to

their low sensory thresholds (i.e. TCA sensory threshold in wine is between 1 and 50 ng l⁻¹ [3]).

This serious and costly problem is raising the awareness of researchers who have developed several methods for determining chloroanisoles in wines [5,8–16]. However, since chloroanisoles are introduced to wine via defective cork closures, it becomes necessary an effective control of chloroanisole contents in cork stoppers as well.

Several authors analysed the TCA content in contaminated wine and in its cork stopper [17–19]. The values of TCA found by these different researchers in wine ranged between 0.2 and 41.0 ng l⁻¹, whereas the concentration of this compound in the cork stopper ranged from 1.0 to 125 ng cork⁻¹. Other authors reported the results on percentage, but in these studies the values also ranged between large intervals. For instance, Tanner and Zannier [20] reported that 50% of the TCA present in a cork stopper could be transferred to wine; Châtonnet et al. [21] found that this value was less than 6% and, on their own, Juanola et al. [7] got migration values from 1 to 54%, depending on the spiking method. Therefore, there are not conclusive results related to the relationship between the total chloroanisoles content in wine and in its cork stopper.

Because of their volatility, gas chromatography (GC) is the most suitable technique for determining chloroanisoles,

* Corresponding author. Tel.: +34 977 55 84 96; fax: +34 977 55 84 46.
E-mail address: qaenol@urv.net (J. Guasch).

usually coupled to either mass spectrometer detector (MSD) [8,12–16,22] or to an electron capture detector (ECD) [5,11] and, recently, coupled to atomic emission detector (AED) [22]. However, the concentration of chloroanisoles in cork stoppers is beyond the sensitivity of GC, so an extraction and concentration step is needed. Thus, several techniques have been used: liquid–liquid extraction [2], ultrasound-assisted extraction [1], solid–liquid extraction [1], purge and trap [22], pressurised liquid extraction [23], solid-phase extraction [18], supercritical fluid extraction [24], soxhlet [25], headspace solid-phase microextraction [26] or multiple headspace solid-phase microextraction [25]. In these studies the researchers have analysed different kinds of cork stoppers but, currently, there is not a method that can be applied to different kinds of cork stoppers nor can it ensure the results on the chloroanisoles analysis.

On the other hand, most of the researchers have only analysed the chloroanisoles extracted when the cork is soaked in a solvent (water, wine or others). These analytes are called releasable chloroanisoles [27]. In that way, the researchers try to emulate the behaviour of chloroanisoles when a contaminated cork is used as wine bottle stopper. However, to ensure good results on the evaluation of the releasable chloroanisoles, this value should be determined under real conditions. Therefore, we thought the total amount of chloroanisoles would be a more suitable parameter for the quality control because, unlike the releasable chloroanisoles, its value does not depend on the method used for its determination.

Therefore, the main purpose of this paper is the analysis of the total concentration of chloroanisoles in different kinds of cork stoppers (natural, agglomerated and sparkling wine) either naturally or artificially contaminated (the preparation of these last samples takes into account the problem arising from the lack of reference materials). To achieve this goal, we used a fast, sensitive, precise and robust method developed in our laboratory, which implies headspace solid-phase microextraction technique (HS-SPME) and gas chromatography with electron capture detector. By using the SPME with a 50/30 μm stableflex divinylbenzene/carboxen/polydimethylsiloxane fibre, we solved the problem that poses the use of multistep extraction and concentration techniques.

2. Experimental

2.1. Chemicals and reagents

The chloroanisoles studied were: 2,4-dichloroanisole (2,4-DCA) [553-82-2], 2,6-dichloroanisole (2,6-DCA) [1984-65-2], 2,4,6-trichloroanisole (TCA) [87-40-1], 2,3,4,6-tetrachloroanisole (TeCA) [938-22-7] and 2,3,4,5,6-pentachloroanisole (PCA) [1825-21-4].

The internal standard (IS) used was 2,3,6-trichlorotoluene (TCT) [2077-46-5].

2,4-DCA and 2,6-DCA were supplied by Acros Organics (Geel, Belgium). They were 99% pure. TCA was supplied by Sigma-Aldrich Química, SA (Madrid, Spain) and its purity was of 99%. TeCA was supplied by UltraScientific (North Kingstown, RI, USA) with a purity of >95%. PCA (98.9% pure)

was supplied by Supelco (Bellefonte, USA) and TCT (98% pure) was supplied by Flucka (Buchs, Switzerland).

An individual stock solution of 1000 mg l^{-1} of each compound in ethanol HPLC grade was prepared and stored at 4 °C from which we prepared standard solutions of 100 and 10 $\mu\text{g l}^{-1}$ by dilution with HPLC grade ethanol, which were also stored at 4 °C.

2.2. Samples

The cork (stoppers or sheets) was first cut into small portions, which were frozen by being immersed in nitrogen liquid. Then, these frozen bits of cork were ground using a blender and, finally, the ground cork was passed through a sieve (1 mm of diameter) to get the most homogeneous sample possible. By freezing the cork, we made the blending easier and also prevented the compounds of interest from being lost due to volatilising during the blending.

Different kinds of corks were used: natural cork (sheets or stoppers), agglomerated cork stoppers and agglomerated with disks stoppers, used for wine and for sparkling wine. All these different cork stoppers were from different cellars and sources, so that the variety of samples was huge.

Depending on the study, it was necessary the use of cork blanks (cork free of chloroanisoles), corks naturally contaminated or corks artificially contaminated (corks spiked with the chloroanisoles studied) so, different procedures are used in each case. For obtain cork free of chloroanisoles we added to 1 g of cork 25 ml of *n*-pentane which, after 60 min of rotatory agitation (three times), was eliminated by vacuum filtration and, lately, under N_2 stream. To get artificially contaminated cork which behaves in a similar way to cork naturally contaminated we used a specific procedure developed in our laboratory. According to this procedure, the cork must be frozen, ground and passed through a sieve of 1 mm of diameter. Regarding to the addition of chloroanisoles, this step can be carried out either before or after the grinding step, because it was checked that the grinding action caused no loss of analytes.

2.3. HS-SPME procedure

The SPME holder for manual sampling and the different fibres tested (PDMS, PDMS/DVB, PA, CAR/PDMS, CW/DVB and DVB/CAR/PDMS) were purchased from Supelco (Bellefonte, PA, USA). The fibre selected was DVB/CAR/PDMS (divinylbenzene/carboxen/polydimethyl siloxane of 1 cm) because it gave responses up to 90% higher than the others.

The different parameters that influenced the HS-SPME analyses were studied carefully in a preliminary study. The optimal conditions were as follows: in a 50 ml vial, we weighed 0.2000 g of ground cork (with chloroanisoles and/or TCT spiking when necessary) and we added 25 ml of water (the main purpose of the water was to homogenise the sample and accelerate the extraction). Then the vials were tightly capped with a PTFE-faced silicone septum and placed in a thermostated bath. SPME was carried out under constant magnetic stirring (700 rpm). The sample vials were pre-equilibrated for 30 min at 65 °C. The

SPME fibre was then inserted manually through the vial septum and exposed to the headspace over the sample for 90 min, at 65 °C. Higher temperatures or longer times implied a background increase. Afterwards, the fibre was pulled into the needle sheath and the SPME device was removed from the vial. It was ready to be inserted into the injection port for thermal desorption at 270 °C for 1 min in splitless mode.

In order to take into account the variability of the response between fibres, several fibres were used in the different studies and experiments [5].

2.4. GC/ECD analysis

Chromatographic analyses were made on a Hewlett-Packard (HP, Palo Alto, USA) 5890 series II gas chromatograph equipped with a HP electron capture detector (ECD). The injection and the thermal desorption of the analytes inside the GC injection port, equipped with a straight glass liner of 0.75 mm I.D., were carried out in the splitless mode for 1 min at 270 °C. The GC was equipped with a Chrompack (Middelburg, The Netherlands) CP-Wax 57CB (50 m × 0.25 mm I.D., 0.20 µm film thickness) fused-silica capillary column. Carrier gas was high-purity helium flowing through the column at a flow-rate of 0.8 ml min⁻¹ (head pressure, 175 kPa). The detector was held at 300 °C. The oven temperature program was: 40 °C (2 min), 13 °C min⁻¹ to 150 °C (15 min), 15 °C min⁻¹ to 200 °C (9 min), 5 °C min⁻¹ to 220 °C.

3. Results and discussion

The different performance parameters of the analytical method were evaluated in order to ensure the results obtained when the method is applied to real samples.

Thus, we built a calibration curve for every analyte (seven points, quadruplicates in every one) using the internal standard method. The fit of the response to the linear calibration was good as demonstrated the regression coefficients values higher than 0.992 and the low standard deviations of the intercept and slope values. Regarding to the limits of detection (LOD) and the limits of quantification (LOQ), these were calculated as three times and 10 times the standard deviation, respectively, of the measures of 10 blank samples [28,29]. The values of all these parameters are shown in Table 1. On the other hand, we also estimated the repeatability and the intermediate precision. These parameters were estimated together by applying a single experiment set-up with duplicates [28–30]. We run duplicates on 6 different

Table 1
Performance parameters of the HS-SPME-GC-ECD method

Chloroanisole	Linearity (ng g ⁻¹)	r ²	LOD (ng g ⁻¹)	LOQ (ng g ⁻¹)
2,6-DCA	9.0–500.0	0.9920	2.6	8.6
TCA	1.0–100.0	0.9986	0.2	0.8
2,4-DCA	4.0–500.0	0.9934	1.1	3.5
TeCA	1.0–200.0	0.9985	0.2	0.6
PcA	1.0–500.0	0.9992	0.2	0.8

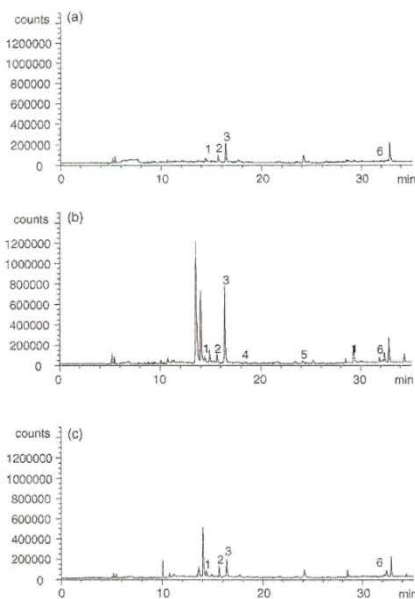


Fig. 1. Examples of chromatograms obtained when analysing naturally contaminated corks. (a) Natural cork stopper with 2,6-dichloroanisole (1) 24.6 ng g⁻¹, 2,3,6-trichlorotoluene; (2) 12.0 ng g⁻¹, 2,4,6-trichloroanisole; (3) 8.3 ng g⁻¹, 2,3,4,5,6-pentachloroanisole; (6) 1.8 ng g⁻¹. (b) Agglomerated cork stopper with 2,6-dichloroanisole (1) 26.1 ng g⁻¹, 2,3,6-trichlorotoluene; (2) 12.0 ng g⁻¹, 2,4,6-trichloroanisole; (3) 40.7 ng g⁻¹, 2,4-dichloroanisole; (4) 16.3 ng g⁻¹, 2,3,4,6-tetrachloroanisole; (5) 3.4 ng g⁻¹, 2,3,4,5,6-pentachloroanisole; (6) 10.1 ng g⁻¹. (c) Sparkling wine cork stopper with 2,6-dichloroanisole (1) 25.6 ng g⁻¹, 2,3,6-trichlorotoluene; (2) 12.0 ng g⁻¹, 2,4,6-trichloroanisole; (3) 3.6 ng g⁻¹, 2,3,4,5,6-pentachloroanisole; (6) 1.7 ng g⁻¹.

days. We obtained values of repeatability and intermediate precision between 4.0 and 14.1 (R.S.D. (%)) in all the concentration range.

Once these parameters were evaluated, we applied the method to determine the total amount of chloroanisoles in different kinds of cork stoppers. That is to say, we analysed three different kinds of natural cork stoppers, three different kinds of agglomerated cork stoppers and three different kinds of sparkling wine cork stoppers. Fig. 1 presents an example of chromatograms obtained when we analysed several cork stoppers.

Each determination was made in quadruplicate and the results with their relative standard deviation (R.S.D. (%)) were presented in Table 2. As can be seen, regarding to the chloroanisoles found (which have been confirmed using a gas chromatograph equipped with a mass-selective detector (GC-MS)), all the samples analysed were naturally contaminated with more than two of the analytes studied and, in some samples, we even found all the chloroanisoles studied. However, it is important to high-

Table 2
 Total concentration of chloroanisoles in different kinds of cork stoppers (before and after the addition in naturally contaminated stoppers)

Cork	Chloroanisole	Natural concentration (ng g ⁻¹)	R.S.D. (%)	Spiked concentration	Total concentration (ng g ⁻¹)	Concentration found (ng g ⁻¹)	Recovery	R.S.D. (%)	
Natural cork stoppers	1	2,6-DCA	25.2	4.4	25.0	50.2	47.6	95.0	10.8
		TCA	8.4	2.9	25.0	33.4	34.0	101.7	12.7
		2,4-DCA	<3.5 (LOQ)		25.0	25.0	23.8	95.2	15.4
		TeCA	<0.6 (LOQ)		25.0	25.0	25.1	100.4	11.2
		PCA	1.8	2.3	25.0	26.8	23.1	86.2	5.9
	2	2,6-DCA	22.4	8.4	250.0	272.4	270.9	99.5	12.9
		TCA	2.0	9.9	5.0	7.0	8.1	115.7	9.5
		2,4-DCA	7.8	31.3	250.0	257.8	257.0	99.7	7.5
		TeCA	1.0	9.1	125.0	126.0	133.6	106.0	6.8
		PCA	6.7	5.6	250.0	256.7	253.8	98.9	9.8
	3	2,6-DCA	24.6	3.9	80.0	104.6	94.6	90.4	10.6
		TCA	3.5	6.4	80.0	83.5	83.6	100.1	4.0
		2,4-DCA	<3.5 (LOQ)		80.0	80.0	85.3	106.6	7.2
		TeCA	<0.6 (LOQ)		80.0	80.0	69.8	87.2	4.5
		PCA	4.5	10.7	80.0	84.5	72.4	85.7	3.4
Agglomerated cork stoppers	1	2,6-DCA	27.2	5.7	50.0	77.2	76.6	99.2	5.8
		TCA	39.0	5.4	50.0	89.0	100.6	113.0	3.2
		2,4-DCA	14.6	13.4	50.0	64.6	67.3	104.2	5.1
		TeCA	3.4	3.4	50.0	53.4	48.8	91.4	4.8
		PCA	10.0	6.0	50.0	60.0	51.1	85.2	2.8
	2	2,6-DCA	58.7	3.5	350.0	408.7	413.3	101.1	5.5
		TCA	44.6	2.4	15.0	59.6	60.5	101.5	10.3
		2,4-DCA	52.5	7.2	350.0	402.5	419.2	104.1	9.5
		TeCA	<0.6 (LOQ)		25.0	25.0	29.6	118.4	7.7
		PCA	2.7	10.0	350.0	352.7	384.7	109.1	6.8
	3	2,6-DCA	26.1	13.6	350.0	376.1	347.5	92.4	10.8
		TCA	40.7	13.1	25.0	65.7	62.8	95.6	3.1
		2,4-DCA	<3.5 (LOQ)		350.0	350.0	381.5	109.0	8.5
		TeCA	<0.6 (LOQ)		125.0	125.0	129.4	103.5	5.9
		PCA	3.4	13.8	350.0	353.4	351.4	99.4	13.1
Sparkling wine cork stoppers	1	2,6-DCA	23.7	12.5	9.0	32.7	33.1	101.2	6.4
		TCA	6.4	16.8	9.0	15.4	16.6	107.8	7.6
		2,4-DCA	<3.5 (LOQ)		9.0	9.0	8.5	94.4	10.3
		TeCA	<0.6 (LOQ)		9.0	9.0	9.6	106.7	2.2
		PCA	1.8	5.1	9.0	10.8	10.4	96.3	9.0
	2	2,6-DCA	26.2	13.7	450.0	476.2	443.6	93.1	8.4
		TCA	4.4	21.0	60.0	64.4	66.7	103.6	6.5
		2,4-DCA	<3.5 (LOQ)		450.0	450.0	469.1	104.2	5.8
		TeCA	<0.6 (LOQ)		150.0	150.0	153.2	102.1	3.5
		PCA	3.3	58.6	450.0	453.3	474.1	104.6	8.5
	3	2,6-DCA	26.9	16.7	40.0	66.9	64.1	95.8	11.9
		TCA	8.1	12.1	40.0	48.1	47.3	98.3	8.0
		2,4-DCA	<3.5 (LOQ)		40.0	40.0	40.2	100.5	13.2
		TeCA	<0.6 (LOQ)		40.0	40.0	35.8	89.5	6.1
		PCA	1.7	2.5	40.0	41.7	35.4	84.9	2.9

light that TCA was present in all the samples studied and that 2,6-DCA is almost always the chloroanisole with the greatest concentration in cork stoppers and TeCA always presented the lowest concentration. These results are in agreement with the ones obtained for other authors [4,6,31]. Related to the different kinds of cork analysed, we observed that the agglomerated cork stoppers presented the higher concentration of TCA whereas the natural cork stoppers presented the lowest. These

values are also in agreement with the results found in literature [18].

On the other hand and, in order to demonstrate that the behaviour of the chloroanisoles naturally present in these corks was similar to the behaviour of the chloroanisoles spiked following the procedure developed in our laboratory, we proceeded as follows. We took 0.2000 g of each one of the previous samples and we spiked them with known amounts of the different

chloroanisoles studied. This spiking was carried out in such a way that we got three samples of each kind of cork stoppers at three levels of concentration (low, middle and high-concentration) for each chloroanisole studied (Table 2). These spiked samples were also analysed in quadruplicate (this study implied 36 additional analyses).

From the results obtained we defined the recovery parameter as the percentage ratio between the concentration of the chloroanisoles found in the cork by using the calibration graphs and the concentration of the chloroanisoles naturally present in cork plus the chloroanisoles concentration added. If the chloroanisoles added behaved in a similar way than those naturally present in cork, the recovery values should be around 100%. The results of this study are also presented in Table 2 and they show values of recovery between 85 and 118%. Taking into account the low levels of concentration evaluated, these values can be considered as excellent and ensure the applicability of the method described to real samples.

From all these results we can conclude that the method developed can be very useful for the quality control of musty taint in cork stoppers. It is a fast and accurate way for quantifying a parameter whose value is neither dependent on the method used for its determination nor is it on the characteristics of every individual cork stopper: the total amount of chloroanisoles.

References

- [1] R. Juanola, D. Subirà, V. Salvadó, J.A. García Regueiro, E. Anticó, J. Chromatogr. A 953 (2002) 207.
- [2] H.R. Buser, C. Zanier, H. Tanner, J. Agric. Food Chem. 30 (1982) 359.
- [3] P. Ribéreau-Gayon, Y. Glories, A. Maujean, D. Dubordieu (Eds.), *Handbook of Enology: The Chemistry of Wine and Stabilisation and Treatments*, vol. 2, John Wiley & Sons Ltd., Chichester, 2000, p. 209.
- [4] D.L. Capone, G.K. Skouroumounis, D.A. Barker, H.J. McLean, A.P. Pollnitz, M.A. Sefton, Aust. J. Grape Wine Res. 5 (1999) 91.
- [5] M. Riu, M. Mestres, O. Busto, J. Guasch, J. Chromatogr. A 977 (2002) 1.
- [6] D.L. Capone, G.K. Skouroumounis, M.A. Sefton, Aust. J. Grape Wine Res. 8 (3) (2002) 196.
- [7] R. Juanola, D. Subirà, V. Salvadó, J.A. García, E. Anticó, Eur. Food Res. Technol. 220 (2005) 347.
- [8] T.J. Evans, C.E. Butzke, S.E. Ebeler, J. Chromatogr. A 786 (1997) 293.
- [9] M.P. Martí, R. Boqué, M. Riu, O. Busto, J. Guasch, Anal. Bioanal. Chem. 376 (2003) 497.
- [10] R. Alzaga, L. Ortiz, F. Sánchez, M.P. Marco, J.M. Bayona, J. Agric. Food Chem. 51 (2003) 3509.
- [11] A. Martínez, J.M. González, C. Pizarro, J. Chromatogr. A 1056 (2004) 49.
- [12] J.L. Gómez, T. García, F. Lorenzo, Anal. Chim. Acta 516 (2004) 165.
- [13] J.L. Gómez, T. García, F. Lorenzo, J. Chromatogr. A 1049 (2004) 147.
- [14] A. Zalacain, G.L. Alonso, C. Lorenzo, M. Ifiguez, M.R. Salinas, J. Chromatogr. A 1033 (2004) 173.
- [15] E. Lizarraga, A. Irigoyen, V. Belsue, E. González, J. Chromatogr. A 1052 (2004) 1052.
- [16] S. Insa, E. Anticó, V. Ferreira, J. Chromatogr. A 1089 (2005) 235.
- [17] A.P. Pollnitz, K.H. Pardon, D. Liacopoulos, G.K. Skouroumounis, M.A. Sefton, Austr. J. Grape Wine Res. 2 (1996) 184.
- [18] G.J. Soleas, J. Yan, T. Server, D.M. Goldberg, J. Agric. Food Chem. 50 (2002) 1032.
- [19] P.R. Howland, A.P. Pollnitz, D. Liacopoulos, H.J. McLean, M.A. Sefton, Austr. J. Grape Wine Res. 3 (1997) 141.
- [20] H. Tanner, C. Zannier, Schweiz. Z. Obst-Weinbau 117 (1983) 468.
- [21] P. Châtonnet, G. Guimberteau, D. Dubordieu, J.N. Boidron, J. Int. Sci. Vigne Vin. 28 (2) (1994) 131.
- [22] N. Campillo, N. Aguinaga, P. Viñas, I. López, M. Hernández, J. Chromatogr. A 1061 (2004) 85.
- [23] J.L. Gómez, T. García, F. Lorenzo, A. Gustavo, Anal. Chim. Acta 540 (2005) 17.
- [24] M.K. Taylor, T.M. Young, C.E. Butzke, S.E. Ebeler, J. Agric. Food Chem. 48 (2000) 1032.
- [25] O. Ezquerro, M.T. Tena, J. Chromatogr. A 1068 (2005) 201.
- [26] F. Bianchi, M. Careri, A. Mangia, M. Musci, J. Sep. Sci. 26 (2003) 369.
- [27] S. Insa, V. Salvadó, E. Anticó, J. Chromatogr. A 1047 (2004) 15.
- [28] D.L. Massart, B.G.M. Vandeginste, L.M.C. Buydens, S. De Jong, P.W. Lewi, J. Smeyers-Verbeke, in: B.G.M. Vandeginste, S.C. Ruton (Eds.), *Data Handling in Science and Technology*, vol. 20A, Elsevier, Amsterdam, 1997.
- [29] EURACHEM. *The Fitness for Purpose of Analytical Methods. A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics*, EURACHEM Secretariat, Teddington, 1998.
- [30] ISO (International Organization for Standardization). *ISO Guide 5725, Accuracy (Trueness and Precision) of Measurements Methods and Results – Part 3: Intermediate Measures of the Precision of a Standard Measurement Method* ISO, Geneva, 1994.
- [31] A.P. Pollnitz, K.H. Pardon, D. Liacopoulos, G.K. Skouroumounis, M.A. Sefton, Austr. J. Grape Wine Res. 2 (1996) 184.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
DETERMINACIÓ ANALÍTICA DE 2,4,6-TRICLOROANISOLE I ALTRES CLOROANISOLES
EN VINS I SUROS
Marc Riu Rusell
ISBN:9788469432358/DL:T. 1044-2011



CAPÍTOL IX
APLICACIÓ DE LA NORMA UNE
56930:2005
(Enólogos 44 (2006) 30-33)

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
DETERMINACIÓ ANALÍTICA DE 2,4,6-TRICLOROANISOLE I ALTRES CLOROANISOLES
EN VINS I SUROS
Marc Riu Rusell
ISBN:9788469432358/DL:T. 1044-2011

1.- INTRODUCCIÓ

En el capítol anterior es defensava la determinació del 2,4,6-tricloroanisol (TCA) total per sobre de la de l'extraïble, però sense comprovar l'efectivitat de la determinació d'aquest darrer. Per això, aquest va ser l'objectiu d'aquest capítol. Donat que existeix una norma UNE 56930:2005 "*Tapones de corcho. Determinación del 2,4,6-tricloroanisol transferible*" per a determinar el 2,4,6-tricloroanisol extraïble en control de qualitat de taps de suro, es va creure adient utilitzar aquest mètode i més tenint en compte que aquesta norma marca unes condicions experimentals en intervals molt amplis. Precisament per això, el que es pretenia amb aquest treball era comprovar si la laxitud en les condicions proposades podria influir en el resultat final.

2.- PART EXPERIMENTAL

Tal i com s'ha vist fins ara, quan es treballa amb microextracció en fase sòlida (SPME) com a tècnica de preparació de mostra, les variables que influeixen en els diferents equilibris han d'estar perfectament optimitzades o, si més no, controlades, per tal d'obtenir resultats reproduïbles. No obstant, la norma UNE 56930:2005 "*Tapones de corcho. Determinación del 2,4,6-tricloroanisol transferible*" especifica que les condicions experimentals són: $20^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ de temperatura; 20 hores \pm 4 hores de temps de maceració del tap amb la solució hidroalcohòlica; i entre 15 i 30 minuts d'extracció amb la fibra d'SPME. Per això, es va decidir avaluar si aquest rang tan ampli en el valor de les variables podia afectar al resultat final.

Per dur a terme aquesta valoració, es va utilitzar un disseny d'experiments factorial complet de tres factors a dos nivells. El problema, però, estava en aconseguir vuit mostres de taps completament idèntics. S'arribà al compromís d'agafar vuit unitats de taps del mateix lot, els quals s'havien analitzat prèviament i es coneixia que contenien TCA. Cadascun d'aquests vuit taps es tallaren en vuit parts. D'aquesta manera, mitjançant la reconstitució d'una part provinent de cada un dels taps originals, s'aconseguien vuit taps teòricament idèntics.

Algunes condicions experimentals, de gran importància, no estaven contemplades en aquesta norma, com el temps de pre-equilibri de la mostra abans d'aplicar l'extracció o el volum de macerant a utilitzar. En aquest cas es decidí adoptar 5 minuts de pre-equilibri i 100 ml de macerant. El punt que es cregué crucial era assegurar que els taps estiguessin perfectament immersos en el líquid extractor, per tal d'assegurar que l'extracció fos el més completa possible.

Utilitzant aquesta metodologia s'arribà a la conclusió que els paràmetres que tenen influència en el resultat són: la temperatura de maceració, el temps de maceració i el conjunt dels tres factors avaluats, quan es refereix la concentració de TCA extraïble a la solució hidroalcohòlica. Quan es refereix el TCA extraïble a la quantitat de suro analitzada, els paràmetres que tenen influència en el resultat són el temps de maceració i la interacció dels tres factors. Així doncs, la variable experimental que té més importància és el temps de maceració. A l'augmentar el temps de maceració, s'incrementa l'extracció de TCA. Quan es té en compte el contingut de TCA en la solució hidroalcohòlica, la temperatura de maceració també adquireix un paper predominant, que desapareix, però, quan es refereix el contingut a la quantitat de suro pesada. Es dedueix, així, que el control del volum del macerant i el pes del suro analitzat també és important i influeix en el resultat final.

Arribats en aquest punt, el nostre interès es centrà en comprovar l'aplicació d'aquest mètode, però aplicant unes condicions experimentals fixes. D'aquesta manera, també s'avaluava si l'elaboració de taps a partir de trossets per dur a terme l'experiment inicial es podia considerar una bona pràctica. Per tal d'avaluar-ho, s'agafaren cinc taps desconeguts, els quals es tallaren en cinc parts, reconstituïnt-los posteriorment per fer cinc taps el més homogenis possible. Aquests es maceraren durant 24 hores, aplicant una temperatura de 22°C. L'extracció es dugué a terme considerant les condicions optimitzades en altres treballs: 70 minuts i 40°C d'extracció, amb la fibra de polidimetilsiloxà/divinilbenzè/carboxen (PDMS/DVB/CAR). Els resultats trobats poden veure's en la Taula IX.1.

Taula IX.1. Resultats obtinguts en la maceració dels cinc taps

SURO	ng·l ⁻¹ TCA	s	ng·kg ⁻¹ TCA	s
1	3,92	1,015	110,35	28,585
2	3,84	1,019	110,49	29,361
3	5,76	1,111	150,71	29,073
4	4,74	1,651	120,76	42,039
5	5,79	0,079	159,94	2,180

Per tal de comprovar si presentaven o no diferències significatives els resultats obtinguts, s'aplicà un test t, amb un grau de significança de 0,05, un a un. No es trobà cap diferència significativa entre ells. Si el mateix test s'aplica als resultats obtinguts en la comprovació de la norma UNE 56930:2005 "*Tapones de corcho. Determinación del 2,4,6-tricloroanisol transferible*", es troba que un 20% dels resultats difereixen significativament entre ells. En aquests experiments no comparables, el temps de maceració es presentava com un dels paràmetres crítics.

Això ens permeté arribar a la conclusió que, per tenir uniformitat amb els diferents laboratoris que utilitzen aquest mètode, és convenient utilitzar unes úniques condicions experimentals.

Els detalls sobre aquest estudi i les conclusions a les que es van arribar van ser publicats a la revista *Enólogos* en un article titulat "*Estudio de la aplicación de la norma UNE 56930:2005 para la determinación del 2,4,6-tricloroanisol (TCA) transferible*" i que es presenta tot seguit.

ORIGINAL

Estudio de la aplicación de la norma UNE 56930:2005 para la determinación del 2,4,6-tricloroanisol (TCA) transferible

Riu Rusell, M.; Mestres Solé, M.; Busto Busto, O.; Guasch Torres, J.

Grupo de Química Analítica y Enológica de los Alimentos. Departamento de Química Analítica y Química Orgánica, Unidad de Enología del CeRTA, Facultad de Enología, Universitat Rovira i Virgili, Campus Sescelades, c/ Marcel·lí Domingo, s/n, 43007 - Tarragona-

*Teléfono: 977 55 84 96; Fax: 977 55 84 46; e-mail: qaeln@urv.net
http://www.quimica.urv.es/w3qaea*

Grupo certificado según norma UNE-EN ISO 9001-2000

RESUMEN

La determinación del 2,4,6-tricloroanisol (TCA) transferible es el procedimiento usual que se utiliza en el control de calidad de los tapones de corcho. Recientemente AENOR ha publicado la norma UNE 56930:2005, en la cual se detalla la determinación analítica del TCA transferible. Esta norma propone la extracción del TCA mediante la maceración del corcho en una solución hidroalcohólica, y una posterior separación y concentración del TCA mediante la microextracción en fase sólida (SPME). La cuantificación final del TCA se lleva a cabo mediante cromatografía de gases, ya sea con detector de espectrometría de masas o de captura electrónica.

Sin embargo, la norma no concreta de forma explícita el valor de las variables experimentales del ensayo, estableciendo unos amplios intervalos de tiempo y temperatura para la maceración inicial del corcho y para la posterior extracción por SPME. Por ello se ha creído necesario llevar a cabo un estudio de estas variables experimentales, dentro de los intervalos especificados por la norma, para comprobar cómo afectan en la determinación del TCA transferible. Los resultados del estudio efectuado demuestran la importancia de utilizar unas condiciones experimentales estrictas para la obtención de resultados fiables y reproducibles.

INTRODUCCIÓN

El vino debe estar libre de todo defecto organoléptico y por ello el sistema de control de calidad de las bodegas tiene que ser capaz de detectar estas posibles alteraciones antes de que el producto sea puesto en el mercado. Por su gran repercusión económica, uno de los defectos más importantes es el llamado sabor a corcho, aunque la denominación *sabor a humedad* sea más correcta [1]. El principal responsable de transferir al vino este desagradable aroma de cartón mojado o humedad es el 2,4,6-tricloroanisol (TCA) [2], aunque otros compuestos se ven también involucrados [3].

La aparición de los cloroanisoles puede ser debido a varias causas, aunque la principal vía de formación es a partir de los clorofenoles, a través de una O-metilación mediada por microorganismos, especialmente hongos, a ciertas condiciones de temperatura y humedad [4-5].

El origen del TCA en el vino es controvertido, aunque es evidente que si está presente en el corcho puede migrar al vino [6-7]. De todas formas ésta no es la única causa de aparición de este defecto, ya que vinos que nunca han estado en contacto con corcho pueden presentar este defecto [8]. La proporción de TCA que pasa del tapón al vino es muy variable, ya que depende de muchos factores [7]. Pero, a pesar de esto, el control de calidad de corcho se fundamenta en esta migración, macerando el tapón de corcho y analizando el TCA transferido al macerante [9].

El límite de percepción sensorial del TCA en vinos varía, normalmente entre 1-50 ng/l [10-14]. La cuantificación de este compuesto a tan baja concentración ha supuesto un reto analítico importante. La cromatografía de gases (GC), ya sea con detector de captura electrónica (ECD) [14-16] o de espectrometría de masas (MSD) [17-18], se ha presentado como la técnica analítica más utilizada. Pero la GC no es suficientemente sensible para detectar estos extremadamente bajos niveles de concentración, siendo necesaria la aplicación previa de una técnica de extracción y concentración. La microextracción en fase sólida (SPME) [14, 19] se presenta como la idónea para realizar esta etapa previa, ya que realiza la extracción y concentración de los compuestos sobre un fibra de pequeñas dimensiones en un solo paso, no requiere la adición de ningún solvente orgánico, es fácilmente automatizable y es moderadamente económica. La extracción mediante esta técnica se puede realizar de manera directa, es decir, por inmersión de la fibra en la muestra a analizar o mediante análisis del espacio de cabeza o headspace (HS) [14, 19]. Esta última es la modalidad normalmente aplicada en

este tipo de análisis, presentando, como grandes ventajas, una menor influencia de la matriz, una mejor selectividad y sensibilidad.

Recientemente AENOR ha publicado la norma UNE 56930:2005 [9], proponiendo un método para la determinación del TCA transferible. Éste se basa en una maceración del tapón de corcho en una solución hidroalcohólica al 12 %. Posteriormente se lleva a cabo una extracción del TCA presente en la solución macerante por SPME utilizando una fibra de polidimetilsiloxano (PDMS). Finalmente, el extracto retenido sobre la fibra es inyectado directamente en el GC. La cuantificación se lleva a cabo a partir de una recta de calibrado construida previamente con patrones de concentración conocida y mediante la técnica del patrón interno.

El método propuesto por la norma no concreta el valor de las variables experimentales, sino que propone unos amplios intervalos: 20°C ± 2°C para la temperatura de maceración, 20 horas ± 4 horas para el tiempo de maceración y entre 15 minutos y 30 minutos respecto el tiempo de extracción con SPME. El único parámetro del cual se concreta su valor es la temperatura de extracción: 35°C. Dada la importancia de estas variables experimentales en el resultado analítico se ha considerado necesario estudiar su influencia para poder asegurar la fiabilidad y representatividad de este método analítico.

Otro aspecto a tener en cuenta es que la norma UNE 56930:2005 no precisa los parámetros de calidad del método ya que no especifica ni la repetibilidad, ni las recuperaciones, ni los límites de detección y cuantificación. Estos parámetros son imprescindibles cuando se presenta un método ya que son los que garantizan que la aplicación del mismo, dentro de unos intervalos concretos, proporcionará resultados fiables y representativos [20]. A título de ejemplo, a continuación se presentan los parámetros de calidad de un método desarrollado en nuestro laboratorio, el cual permite

cuantificar el TCA en vino, ya sea tinto, rosado o blanco. Este método es aplicable en el rango de concentraciones de 1,0 ng/l y 100,0 ng/l. La recta de calibrado, construida con vino sintético, presenta un coeficiente de correlación de 0,994. El límite de detección y cuantificación son 0,3 ng/l y 1,0 ng/l, respectivamente. La repetibilidad y precisión intermedia son 10,1% y 11,4%, respectivamente. Finalmente, las recuperaciones del método son de alrededor el 100%, en todos los niveles de concentración.

La falta de concreción en la descripción del método propuesto por AENOR hizo que nuestro grupo de investigación decidiera comprobar el efecto de las variables experimentales dentro de los intervalos de trabajo propuestos por la norma para evaluar su influencia en el resultado final, es decir, en la concentración del TCA transferible.

MATERIALES Y MÉTODOS

Maceración del corcho: De acuerdo con la norma UNE 56930:2005, se ha efectuado en una solución hidroalcohólica al 12%. Se ha utilizado etanol de calidad HPLC.

SPME: De acuerdo con la norma UNE 56930:2005 se ha utilizado una fibra recubierta de polidimetilsiloxano (PDMS) de 100 mm.

Calibración del método: Para la construcción de la recta de calibrado se ha utilizado la técnica del patrón interno utilizando el 2,3,6-triclorotolueno (TCT). Para ello se prepararon distintas disoluciones de 2,4,6-tricloroanisole (TCA) en una mezcla hidroalcohólica al 12%, de concentraciones entre 1,0-50,0 ng/l con una concentración constante de TCT de 75 ng/l. Concretamente, se han preparado 7 niveles de concentración de TCA dentro del rango especificado y se llevaron a cabo análisis por triplicado de cada solución patrón.

Condiciones cromatográficas: Dado que la norma no especifica éstas, se optó por utilizar las correspondientes al método desarrollado en nuestro laboratorio y comentado anteriormente. Así pues, todos los análisis se realizaron en un cromatógrafo de gases (GC) Hewlett-Packard 5890 series II equipado con un detector de captura electrónica (ECD) de la misma casa comercial. Se ha utilizado una columna de polietilenglicol Chrompack CP-Wax 57 CB (50 m x 0,25 mm I.D., 0,20 µm). Como gas portador se ha utilizado helio de alta pureza (0,8 ml/min). La rampa de temperaturas fue: 40°C (2 min), 13°C/min hasta 150°C (10 min), 15°C/min hasta 220°C. La temperatura del inyector fue de 250°C y la del detector de 300°C.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De acuerdo con la norma UNE 56930:2005 [9] se construyó una recta de calibrado, la cual proporcionó un coefi-

ciente de correlación de 0,994. El paso siguiente fue proceder al estudio de las tres variables experimentales que se pretendían evaluar: tiempo y temperatura de maceración y tiempo de extracción con SPME. Para llevar a cabo el estudio del efecto de estos parámetros sobre el resultado final, existen diferentes alternativas. Una de ellas es el método clásico de variar el valor de una de las variables mientras se mantiene constante el valor de las demás, y así sucesivamente. El principal problema de esta manera de trabajar es la necesidad de realizar muchos experimentos para estudiar todas las variables, implicando mucho tiempo de experimentación. Sin embargo, existe otra alternativa, llamada dise-

ño como matriz de experimentos la representación de los experimentos a realizar, mediante la codificación (+) y (-). La denominación (+) corresponde al valor máximo del factor (variable) considerado y la denominación (-) al valor mínimo. En las filas se representan los experimentos a realizar y en las columnas los factores. Si sustituimos los signos (+) y (-) por los valores experimentales concretos de cada factor obtenemos el plan de experimentación. Al utilizar esta estrategia es importante llevar a cabo duplicados, como mínimo, de cada análisis. De esta manera se puede determinar la influencia de cada variable a partir de la desviación estándar de las repeticiones y calcular su límite de confianza. Mediante

Matriz de experimentos				Matriz de experimentación		
Experimento	A	B	C	A	B	C
1	+	+	+	22°C	24 h	30 min
2	+	+	-	22°C	24 h	15 min
3	+	-	+	22°C	16 h	30 min
4	+	-	-	22°C	16 h	15 min
5	-	+	+	18°C	24 h	30 min
6	-	+	-	18°C	24 h	15 min
7	-	-	+	18°C	16 h	30 min
8	-	-	-	18°C	16 h	15 min

Tabla 1. Matriz de experimentos y plan de experimentación para estudiar el efecto de los tres factores a evaluar: A: temperatura de maceración, B: tiempo de maceración, C: tiempo de extracción con SPME.

ño experimental, que nos permite estudiar todas estas variables al mismo tiempo en un intervalo de valores predeterminado, mediante la utilización de un número mínimo de experimentos [20].

En el estudio realizado se ha utilizado el diseño experimental denominado factorial completo, el cual ya había sido utilizado con éxito en nuestro laboratorio [14]. Este tipo de diseño de experimentos permite determinar qué variables experimentales (factores), y cuáles de las interacciones entre ellas, influyen en la respuesta analítica. También nos permite valorar estadísticamente la influencia de cada variable [20].

En el diseño experimental se han estudiado tres variables: La temperatura de maceración (A), el tiempo de maceración (B) y el tiempo de extracción con SPME (C). El número de experimentos a realizar es 2 elevado al número de factores (en este caso 3), es decir, 8 experimentos. En la tabla 1 aparece la matriz de experimentos así como su traducción a lo que sería el plan de experimentación para este caso concreto. Se entien-

este último se podrá determinar si el factor tiene o no una influencia en los resultados, es decir, evaluar si su influencia es estadísticamente significativa y si su variabilidad no se debe solamente al error experimental. Otra manera de decirlo es que si el valor de las variables está dentro del límite de confianza, su efecto no es mayor que el error experimental, de manera que no puede decirse que tenga influencia en el resultado [20].

Una vez identificados los experimentos a realizar, había que resolver el problema de las muestras. Para poder llegar a resultados concluyentes era necesario disponer de 8 muestras de corcho idénticas, es decir, con la misma cantidad de TCA en ellas, para poder realizar los 8 experimentos. La obtención de estas muestras era imprescindible para asegurar que las diferencias entre los experimentos no eran causadas por la diferencia de concentración del TCA entre los diferentes tapones. Pero la obtención de estas muestras era totalmente imposible, ya que no existen tapones idénticos. Así

Experimento	TCA transferible (referido al macerante)		TCA transferible (referido al corcho)	
	Media (ng/l)	s	Media (ng/kg)	s
1	40,1	3,7	711,7	66,6
2	36,0	2,4	628,8	42,4
3	35,2	2,3	565,4	37,7
4	34,1	2,7	586,0	46,7
5	32,9	1,9	595,3	33,8
6	39,6	2,9	718,0	52,0
7	29,7	1,9	531,4	34,5
8	25,1	0,1	506,0	2,7

Tabla 2. Concentración de TCA transferible en el macerante y referido al corcho.

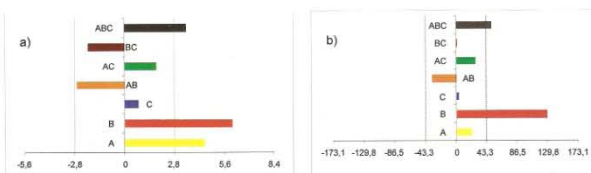


Figura 1. Cuadros Pareto que muestran los efectos de la maceración del corcho con solución hidroalcohólica y posterior extracción cuantificación con HS-SPME-GC-ECD. 1.a) Efecto de los factores al referir la concentración de TCA a la solución hidroalcohólica. 1.b) Efecto de los factores al referir la concentración de TCA a la cantidad de corcho. (A) temperatura de maceración, (B) tiempo de maceración, (C) tiempo de extracción con SPME; y la interacción entre ellos. El intervalo de confianza aparece representado por un línea (a = 0,05 y 8 grados de libertad).

pues, para solventar este problema se escogieron 8 tapones de los que se sabía que contenían TCA. Cada uno fue cortado en 8 partes iguales. Se escogió, al azar, una parte de cada corcho de manera que se obtuvieron 8 nuevas muestras constituidas, cada una de ellas, por 8 trozos de corcho.

Para la maceración, la norma [9] propone el uso de un frasco con cierre, de 100 ml, de material inerte, inodoro e insípido. El tapón de corcho debe ser introducido dentro del recipiente y llenarlo completamente con la solución macerante, asegurando no dejar ninguna cámara de aire. Sin embargo, desde un punto de vista experimental, este modo de trabajar puede afectar al resultado final ya que, dependiendo del volumen del corcho, el volumen de la solución macerante será distinto. Por ello, para realizar el estudio se utilizó exactamente 100 ml de solución macerante y nos cercioramos de que los tapones quedaban totalmente sumergidos. De esta manera, controlando el volumen de solución macerante y conociendo el peso exacto de cada muestra, era posible conocer la cantidad de TCA transferible respecto a la cantidad de corcho con el que se había llevado a cabo la maceración.

Tal y como puede comprobarse en la tabla 2, el TCA transferible depende de las condiciones experimentales. Así pues, si comparamos los experimentos realizados en las condiciones extremas [experi-

mentos 1 y 8], podemos ver que mientras en el experimento 1 se obtiene un TCA transferible de 40,1 ng/l, en el experimento 8 sólo se obtiene un 25,1 ng/l, lo que representa una diferencia del 62% respecto al valor máximo. Por lo tanto, queda patente que el valor de las variables estudiadas (factores) tiene un claro efecto sobre el resultado final.

Para ver el efecto de cada una de estas variables se ha representado gráficamente (Figura 1). En este gráfico se puede observar que en el eje de ordenadas se representa cada una de las variables estudiadas y en el eje de abscisas se representa la magnitud de esta variable. Mediante una línea vertical discontinua se representa el intervalo de confianza, de manera que las variables que tengan una magnitud superior al intervalo de confianza se podrán considerar influyentes en la obtención del TCA transferible, ya que, como se ha comentado anteriormente, en este caso la variación no puede atribuirse solamente al error experimental del método. De esta manera se deduce que los factores que tienen una influencia directa en el TCA transferible (Figura 1.a) son el tiempo y la temperatura de maceración, así como la interacción simultanea de las tres variables estudiadas. Estos factores presentan un valor superior al límite de confianza - establecido en $\pm 2,82$, para un nivel de confianza del 95%-. Concretamente, la temperatura y el tiempo de

maceración tienen un efecto positivo (su respuesta es positiva), es decir, al incrementar sus valores se obtienen mejores resultados de extracción de TCA. Sin embargo, a partir del gráfico se puede deducir también que el tiempo de extracción de la SPME no influye. Así pues, parece que al aumentar el tiempo y la temperatura de maceración, aumenta la migración de TCA desde el corcho a la solución hidroalcohólica. El aumento del tiempo de extracción mediante SPME no produce un incremento en la cuantificación del TCA. Esto puede ser debido a que ya se ha llegado a un equilibrio en la extracción.

Respecto a los valores de TCA transferible referidos al peso de corcho (Figura 1.b) se puede verificar que el tiempo de maceración y la interacción de los tres factores conjuntos influyen en la respuesta, ya que sólo estos tienen una magnitud superior al límite de confianza - establecido en $\pm 43,3$, para un nivel de confianza del 95%-. Por ello deben ser considerados estadísticamente significativos. Es importante destacar que cuando se refiere el TCA transferible a la cantidad de corcho, la influencia de la temperatura de maceración no es estadísticamente significativa.

Así pues, el estudio realizado y aquí presentado demuestra la importancia de controlar los parámetros utilizados durante la maceración del corcho con el objetivo de determinar el TCA transferible. A partir de los resultados obtenidos queda patente que la norma UNE 56930:2005 tendría que presentar unos parámetros más concretos con el objetivo de obtener valores de TCA transferible representativos y comparables.

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en este estudio nos demuestran la importancia de controlar los distintos parámetros experimentales en la determinación del TCA transferible ya que, dependiendo de este valor, el resultado final puede variar considerablemente (hasta un 62%). Concretamente hay que controlar el tiempo y temperatura de maceración, ya que condicionan la extracción del TCA en el proceso de la maceración con el solvente. Además, también es importante controlar el volumen del macerante y registrar el peso del corcho para proporcionar valores de concentración exactos del TCA transferible. De los resultados obtenidos se puede extraer que las condiciones óptimas para determinar el TCA transferible, dentro de los intervalos estudiados, son: 22°C y 24-24 horas de maceración. Con estas condiciones se obtienen las concentraciones de TCA transferible más altas. Los autores de este trabajo agradecen la colaboración de Marie Manon Herrero por su participación en la parte experimental del trabajo.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] Silva, C.; Figueiredo, J. J.; San Romao, M. V. (2000) Cork taint in wine: Scientific knowledge and public perception – a critical review. *Crit. Rev. Microbiol.*, 26 (3), 147-162.
- [2] Buser, H. R.; Zanier, C.; Tanner, H. (1982) Identification of 2,4,6-trichloroanisole as a potent compound causing cork taint in wine. *J. Agric. Food Chem.*, 30, 359-362.
- [3] Lee, T.H.; Simpson, R. Microbiology and chemistry of cork taints in wine, en Fleet, G. H (editor) Wine microbiology and biotechnology. (1992) Ed. Harwood Academic Publishers, Chur (Suiza).
- [4] Álvarez, M. L.; López, L.; López, J. M.; Rodríguez, E.; Martínez, M. J.; Larriba, G.; Coque, J. J. R. (2002) Cork taint of wines: Role of the Filamentous fungi isolated from cork in the formation of 2,4,6-trichloroanisole by O-methylation of 2,4,6-trichlorophenol. *Appl. Environ. Microbiol.*, 68 (12), 5860-5869.
- [5] Navascués, E.; Calderón, F.; Suárez, J. A. (2001) El metabolismo microbiano en el binomi suro-vi. *ACE Revista d'Enologia*, 18, 8-11.
- [6] Capone, D.L.; Skouroumounis, G. K.; Sefton, M. A. (2002) Permeation of 2,4,6-trichloroanisole through cork closures in wine bottles. *Aust. J. Grape W. Res.*, 8 (3), 106-109.
- [7] Juanola, R.; Subirà, D.; Salvadó, V.; García, J. A. (2005) Migration of 2,4,6-trichloroanisole from cork stoppers to wine. *Eur. Food Res. Technol.*, 220, 347-352.
- [8] Hermosín, I.; Peña, A. I. (2002) Los tapones para botellas de vino: eficacia de cierre, control de calidad sensorial y microbiológica, y relación con el defecto de "gusto a corcho" del vino. *Tecnología del vino*, 4, 64-78.
- [9] AENOR (2005). UNE 56930. Determinación del 2,4,6-tricloroanisol (TCA) transferible.
- [10] Fisher, C.; Fischer, U. (1997) Analysis of cork taint in wine and cork at olfactory subthreshold levels by solid phase microextraction. *J. Agric. Food Chem.*, 45, 1995-1997.
- [11] Gómez, J. L.; García, T.; Lorenzo, F.; González, A. G. (2005) Optimisation of a pressurised liquid extraction method for haloanisoles in cork stoppers. *Anal. Chim. Acta*, 540, 17-24.
- [12] Marfí, M. P.; Boqué, R.; Riu, M.; Busto, O.; Guasch, J. (2003) Fast screening method for determining 2,4,6-trichloroanisole in wines using a headspace-mass spectrometry (HS-MS) system and multivariate calibration. *Anal. Bioanal. Chem.*, 376, 497-501.
- [13] Prescott, J.; Norris, L.; Kunst, M.; Kim, S. (2005) Estimating a "consumer rejection threshold" for cork taint in white wine. *Food Quality and Preference*, 16, 345-349.
- [14] Riu, M.; Mestres, M.; Busto, O.; Guasch, J. (2002) Determination of 2,4,6-trichloroanisole in wines by headspace solid-phase microextraction and gas chromatography-electron-capture detection. *J. Chromatograph. A*, 977, 1-8.
- [15] Martínez, A.; González, J. M.; Pizarro, C. (2004) Optimisation of a headspace solid-phase microextraction method for the direct determination of chloroanisoles related to cork taint in red wine. *J. Chromatograph. A*, 1056, 49-56.
- [16] Alzaga, R.; Ortiz, L.; Sánchez, F.; Marco, M. P.; Bayona, J. (2003) accurate determination of 2,4,6-trichloroanisole in wines at low parts per trillion by solid-phase microextraction followed by GC-ECD. *J. Agric. Food Chem.*, 51, 3509-3514.
- [17] Insa, S.; Anticó, E.; Ferreira, V. (2005) Highly selective solid-phase extraction and large volume injection for the robust gas chromatography-mass spectrometric analysis of TCA and TBA in wines. *J. Chromatograph. A*, 1089, 235-242.
- [18] Evans, T. J.; Butzke, C. E.; Ebeler, S. E. (1997) Analysis of 2,4,6-trichloroanisole in wines using solid-phase microextraction coupled to gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatograph. A*, 786, 293-298.
- [19] Pawliszyn, J. *Solid Phase Microextraction* (1997) Ed. Wiley-VCH, Inc. New York (USA).
- [20] Massart, D. L.; Vandeginste, B. G. M.; Buydens, L. M. C.; De Jong, S.; Lewi, P. J.; Smeyers-Verbeke, en Vandeginste, B. G. M. Ruten, S. C. (editores) *Handbook of Chemometrics and Qualimetrics: Part A (Volumen 20A) en Data Handling in Science and Technology* (1997) Ed. Elsevier Science B. V. Amsterdam (Holanda).

Revolución en el envasado del Vino

*** CABINA, con atmósfera controlada.**
*** CIP, integral para todo el grupo.**
*** REGULACIÓN, automática de alturas para distintos envases.**

ENJUAGADO **LLENADO** **TAPADO**

Fábrica y oficinas: Pol. Ind. La Mora • Avda. de la Acacia, 6 • 47193 La Cistèrnia (Valladolid - España).
Dirección postal: Apartado de correos 267 • 47080 Valladolid • Tel.: (34) 983 403 010 • Fax: (34) 983 403 015
www.gyminternacional.es e-mail: gym@gyminternacional.es

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
DETERMINACIÓ ANALÍTICA DE 2,4,6-TRICLOROANISOLE I ALTRES CLOROANISOLES
EN VINS I SUROS
Marc Riu Rusell
ISBN:9788469432358/DL:T. 1044-2011

CAPÍTOL X
ANÀLISI SENSORIAL, CLOROANISOLES
TOTALS I CLOROANISOLES EXTRAÏBLES
(enviat a Food Additives and Contaminants)

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
DETERMINACIÓ ANALÍTICA DE 2,4,6-TRICLOROANISOLE I ALTRES CLOROANISOLES
EN VINS I SUROS
Marc Riu Rusell
ISBN:9788469432358/DL:T. 1044-2011

1.- INTRODUCCIÓ

Arribats en aquest punt, i mirant enrere tot el treball efectuat sobre el tema de l'olor a humitat en els vins, tot i que s'havien validat diferents mètodes de determinació de cloroanisoles en vins i taps de suro, no n'hi havia prou. Ara tocava anar més lluny, tot aplicant aquestes metodologies per intentar esbrinar la relació d'aquests compostos en aquestes dues matrius tan diferents, però, com s'ha vist, tan lligades entre elles. I, a més, també era important intentar relacionar el contingut total de cloroanisoles en un tap amb el que altres metodologies anomenen com a cloroanisoles extraïbles, al mateix temps que correlacionar-los amb el defecte organolèptic. Amb aquesta idea, es començà a idear una comparativa que ens permetés entreveure si alguna de les metodologies proposades oferia millor garantia o si realment totes eren equivalents i perfectament utilitzables ja que, fins al moment, no s'havia dut a terme cap estudi comparatiu similar.

2.- PART EXPERIMENTAL

Una vegada ja s'havien posat a punt i validat els diferents mètodes per determinar cloroanisoles, tant en vins com en taps de suro, es feia interessant esbrinar la relació entre els principals mètodes de control de qualitat de l'olor a humitat aplicats avui en dia en la indústria surera: anàlisi sensorial i anàlisi química (tant cloroanisoles totals com cloroanisoles extraïbles). Amb aquesta premissa, es buscaren taps de suro que varen ser analitzats sensorialment pels experts d'una companyia surera i classificats segons la seva resposta aromàtica: no defecte, especiat, vegetal, humit, terrós i amb presència de 2,4,6-tricloroanisol (TCA). En aquest cas, i pel nostre interès, es dividiren els taps en tres grups: no defecte, TCA i altres defectes. Cadascun dels taps fou analitzat per trobar el contingut de cloroanisoles total i extraïble, donant especial atenció al principal compost que ens preocupava, que era el TCA.

Tot i que la informació extreta d'aquest experiment respecte el TCA es podrà consultar al final del capítol, presentada en format d'article, la informació referent a altres cloroanisoles es presenta a la Taula X.1. La nomenclatura de les mostres analitzades és idèntica a la presentada en l'article.

Taula X.1. Cloroanisoles en el macerant i el suro. La denominació od, wt i nd, en el número de la mostra, significa, respectivament, altres defectes, defecte de TCA i no defecte, determinats en l'anàlisi sensorial. Unitats de concentració: ng·g⁻¹

Mostra	Cloroanisol extraïble	Cloroanisol extraïble	Cloroanisol romanent	Cloroanisol total
2,4-DCA				
5OD	<400,00	-	11,46	11,46
3OD	<400,00	-	41,66	41,66
4OD	<400,00	-	12,11	12,11
1WT	<400,00	-	44,34	44,34
2,6-DCA				
3ND	<100,00	-	10,69	10,69
6WT	<100,00	-	14,21	14,21
13WT	<100,00	-	12,27	12,27
11OD	<100,00	-	31,15	31,15
13OD	<100,00	-	14,91	14,91
8OD	<100,00	-	11,57	11,57
5OD	<100,00	-	31,42	31,42
3OD	<100,00	-	31,96	31,96
6OD	<100,00	-	33,08	33,08
9WT	<100,00	-	32,51	32,51
9ND	<100,00	-	14,30	14,30
2OD	<100,00	-	57,49	57,49

9 _{OD}	<100,00	-	11,94	11,94
5 _{ND}	<100,00	-	15,09	15,09
6 _{ND}	<100,00	-	29,38	29,38
2,3,4,6-TeCA				
13 _{ND}	<15,00	-	2,56	2,56
PCA				
10 _{WT}	<5,00	-	3,47	3,47
8 _{WT}	<500	-	6,12	6,12

Tal com es pot veure, la tècnica de cloroanisole extraïble no ha estat capaç de quantificar cap dels cloroanisoles, fet que fa pensar que cal una optimització del procés individual per aquests compostos. Tot i així, en aquesta taula es pot veure que apareixen diversos cloroanisoles en el suro diferents al TCA. La presència d'aquests compostos pot donar informació sobre l'origen del TCA, de manera que aquesta informació podria ser de gran importància per a poder eradicar el problema o tenir-lo sota control.

Tot seguit, es presenta en format d'article i de manera més detallada l'estudi efectuat, així com els resultats obtinguts. El títol d'aquest és "*Releasable trichloroanisole, total trichloroanisole or sensory analysis. What is the best method to assess the cork taint?*", el qual s'ha enviat a la revista *Food Additives and Contaminants*.

Releasable trichloroanisole, total trichloroanisole or sensory analysis. What is the best way to assess the cork taint?

*Marc Riu, Olga Busto, Montserrat Mestres**

Research Group of Analytical Chemistry of Wine and Food
Department of Analytical Chemistry and Organic Chemistry
Campus Sescelades. Facultat d'Enologia de Tarragona
Universitat Rovira i Virgili. 43007 Tarragona (Spain)

*To whom correspondence should be addressed

Tel: +34977558494

Fax: +34977558446

e-mail: montserrat.mestres@urv.cat

Abstract

In the present study we tested and compared the three main ways to assess the cork taint related to the presence of chloroanisoles, specially, 2,4,6-trichloroanisole (TCA) in wine cork stoppers: the sensory analysis, the determination of releasable chloroanisoles and the determination of total chloroanisoles. This comparison demonstrated that there is a good correlation between the sensory analysis, releasable trichloroanisole and total trichloroanisole when the cork stoppers have a high contamination of these analytes. However, when the levels of trichloroanisole contamination is low, it has been found that some corks that contain a total amount of TCA susceptible to give to wine musty taint, have been labelled as "cork with no content of TCA" when using the sensory analysis or the releasable trichloroanisole method. The improvement that implies the discrimination with higher accuracy demonstrates the greater utility of the determination of the Total Content of Trichloroanisole over the other two methods.

KEYWORDS: 2,4,6-trichloroanisole; releasable trichloroanisole; total trichloroanisole; sensory analysis; head-space solid-phase microextraction; gas chromatography with electron capture detection

Introduction

One of the most important problems in the wine industry today is the organoleptic defect known as musty taint, also called cork taint. This defect is mainly due to the presence in wine of, 2,4,6-trichloroanisole (TCA) and other chloroanisoles, even at very low concentrations (Buser et al. 1982; Chatonnet et al. 2004; Simpson et al. 2004; Prat et al. 2009). If these analytes contaminate wine, nothing can be done to eliminate them, so it is very important the control of all wine production steps in order to avoid their appearance. Taking into account that one of the main transmitters of these compounds to wine is the contaminated cork stopper, the determination of chloroanisoles in the cork becomes one of the best ways to control musty taint (Insa et al. 2006).

According to the literature, up to now, the main methods to assess the presence of TCA and other chloroanisoles in cork stoppers are the sensory analysis (Sefton et al. 2005), the determination of releasable chloroanisoles (Sefton et al. 2005; Hervé et al. 2008; AENOR 2004; AENOR 2005; Ezquerro et al. 2006; Riu et al.

2006a; Macku et al. 2009) and the determination of total chloroanisoles content (Riu et al. 2006b and 2006c).

The sensory assessments are carried out by a trained panel of judges and, usually, it can be done in three different ways: direct assessment of the cork stopper, assessment of the cork after warming (to help the volatilization of the aromatic compounds) and assessment of the solvent used to macerate the cork (to evaluate the aromatic compounds extracted) (AENOR 2004). The main advantages of this kind of analysis are the low cost, the absence of instrumental requirements, it is easy to be used in any cork industry and, moreover, it allows detecting other defects than musty taint. However, it presents also some disadvantages as can be the judge subjectivity, the dependence on the external conditions (odour contamination, distraction of the judge, ...) and the difficulty to discriminate between similar odours (Sefton et al., 2005).

The determination of releasable chloroanisoles in cork stoppers is based on the maceration of these stoppers in a solvent (usually wine, hydroalcoholic solution or water) for a scheduled period of time. Then, the contents of chloroanisoles in the macerate are determined by gas chromatography (GC) with either electron capture detection (ECD) or mass-spectrometry detector (MSD) (AENOR 2005; Ezquerro et al. 2006; Macku et al. 2009; Bianchi et al. 2003; Vlachos et al. 2007). This method tries to emulate the interaction cork-wine in a bottled wine and defines the Releasable TCA as "the equilibrium value that a given cork imparts to a soak solution" (Sefton et al. 2005; Hervé et al. 2008). The main drawback of this method is the high dependence between the results obtained and the conditions used on the analysis such as the time and solvent used during the maceration, manipulation of the cork sample (whole cork or cut cork) or position of cork inside the solvent (partially or totally immersed) (AENOR 2005). This wide range of possibilities makes difficult the comparison between the results obtained in different laboratories. Moreover, the time of maceration is too short to extrapolate conclusions from this macerate to real conditions so, Sefton et al., (2005) proposed to refer this term as "Rapidly Releasable TCA".

Regarding to Total Chloroanisoles Content (TCC), in previous studies we have already presented this determination as an alternative method to the analysis of the releasable chloroanisoles (Riu et al. 2006b and 2006c). The advantage of this method is that TCC make easier the comparison between laboratories because this is an objective parameter. However, there is not a constant relationship between the TCC and the chloroanisole amount that will be transferred to wine (Peña-Neira et al. 2000; Soleas et al. 2002; Juanola et al. 2005).

Thus, since all three methods (sensory analysis, determination of releasable chloroanisoles and determination of total chloroanisoles content) have advantages and disadvantages, the aim of this study was to compare them in order to find out which was the best method to assess the presence of trichloroanisole in cork stoppers.

Materials and methods

Chemicals and reagents

2,4,6-trichloroanisole (TCA) [87-40-1] was obtained from Sigma-Aldrich Química, SA (Madrid, Spain) and its purity was of 99%. The internal standard (IS) used was 2,3,6-trichlorotoluene (TCT) [2077-46-5] supplied by Fluka (Buchs, Switzerland) and its purity was of 98%.

An individual stock solution of 1000 mg/l of each compound in ethanol HPLC grade was prepared and stored at 4°C. By dilution of these solutions, with HPLC grade ethanol, we prepared freshly standard working solutions of 100 and 10 µg/l.

The maceration of the corks was carried out by soaking them in a synthetic wine with a matrix as similar as possible to a real wine. To prepare it, firstly, we dissolved 3,5 g/l of L-(+)-tartaric acid and 120 ml/l of ethanol in Milli-Q quality water. Then, the pH was adjusted to 3,5 with 1 M NaOH and, lately, the main volatile compounds of wine were added (Mestres et al. 1999): methanol (125 mg/l), ethanal (75 mg/l), ethyl acetate (100 mg/l), isoamyl acetate (10 mg/l), 3-methyl-1-butanol (200 mg/l), 2-methyl-1-butanol (50 mg/l) and potassium metabisulphite (275 mg/l), all of them with a purity above 98% and supplied by Aldrich.

Other reagents and solvents used in this study were of analytical or HPLC grade.

Regarding to the solid-phase microextraction (SPME) procedure, both the manual SPME device and the fibres used in this study (50/30 µm divinylbenzene/carboxen/polydimethylsiloxane (DVB/CAR/PDMS) (1 cm)) were purchased from Supelco (Bellefonte, PA, USA). This kind of fibre was selected taking into account our experience in previous studies (Riu et al., 2006b and 2006c; Mestres et al., 1999).

Cork samples

To carry out this study, we worked with 46 different cork disks. These were supplied by a cork stopper producer that has a sensory panel of experts for quality control of its cork products and, together with the disks, the producer also provided us the information regarding the sensory analysis of each.

The training of this expert panel consisted of several sessions where solutions of chloroanisoles and other compounds with similar odours, both in water and in

wine, were assessed. The tasters were asked to evaluate qualitatively the corks by using the descriptors they thought necessary. The order of presentation on the different sessions was randomised. The treatment of the samples prior to sensory analysis was only a slightly warming in order to help the volatilization of the aromatic compounds and to make easier the recognition of the different odours.

Sample Preparation

Figure 1 shows, in a schematic way, the sample preparation that allows the subsequent analysis of the Releasable TCA and also of the Total TCA. As can be seen, in both cases, the first step is the soaking of the disk corks in a solvent for the maceration.

The disk corks were macerated individually in a 125 ml flask, using 100 ml of synthetic wine. It was very important to ensure the completely immersion of the cork into the solvent, in order to get the highest extraction of TCA (the higher the superficial area of contact, the higher the extraction efficiency). The maceration was carried out for 24 hours at 20°C (Hervé et al. 2008; AENOR 2004 and 2005) and, after that, the cork was separated from the macerated. In this way, the macerated was ready to be analyzed by SPME for determining the contents of Releasable TCA.

For determining the Total TCA, it was necessary to quantify also the TCA contents that remained in cork after the maceration. With this aim, the cork separated from the macerated was rinsed with ethanol to eliminate the residues of synthetic wine and left to air dry inside a perfectly clean hood to avoid any contamination that may lead interferences in the analysis. Once the cork disk was dried, this was cut into small portions and frozen by immersion in liquid nitrogen in order to make easier the subsequent grinding and to prevent losses of any of the compounds of interest by volatilisation during this process (Riu et al. 2006b and 2006c). To ensure that the TCA contents remained in cork would be totally extracted, the grinding should be prolonged until the resulting ground cork was of 1 mm of diameter.

Headspace solid-phase microextraction procedure

Analysis of macerated

For analysing the contents of TCA in the macerated, 20 ml of this solution were placed into a 50 ml vial, with a magnetic stirrer bar, a suitable amount of NaCl to

saturate the solution (6 M) and the internal standard (TCT) was then added (50.0 ng l⁻¹) (Riu et al. 2002 and 2007). The vials were tightly capped with a PTFE-faced silicone septum and placed in a thermostatic bath with constant magnetic stirring (500 rpm). Before the extraction step, samples were equilibrated for 30 min at 40°C. Afterwards, the stainless steel needle, in which the fibre is housed, was pushed through the vial septum, allowing the coating to be exposed to the headspace over the sample for 70 min, at the same temperature of 40°C. Finally, the fibre was removed from the sample headspace and inserted into the injection port of the gas chromatograph for the thermal desorption of the analytes, at 270°C, during 1 min.

Analysis of cork disk

For analysing the contents of TCA in the cork disk, 0.2000 g (± 0.1 mg) of ground cork were weighed in a 50 ml vial and 25 ml of water were added. The addition of water made easier the transfer of volatile compounds from solid cork to the headspace and, therefore, the extraction process was accelerated and homogenized. The internal standard (TCT) was also added to the vial (12.0 ng g⁻¹) and this was tightly capped with a PTFE-faced silicone septum and placed in a thermostated bath with constant magnetic stirring (700 rpm). The sample vials were preequilibrated for 30 min at 65°C and the SPME fiber was then inserted manually through the vial septum and exposed to the headspace over the sample for 90 min, at 65°C. Afterwards, the fibre was pulled into the needle sheath and the SPME device was removed from the vial and inserted into the injection port for thermal desorption at 270°C for 1 min in splitless mode (Riu et al. 2006b and 2006c).

Instrumental analysis

All the chromatographic analyses were made on a Hewlett-Packard (HP, Palo Alto, USA) 5890 series II gas chromatograph equipped with a HP electron capture detector (ECD). The injection of the SPME fibre for the thermal desorption of the analytes inside the GC injection port was carried out in the splitless mode for 1 min at 270°C. Since the diameter of the GC injection liner has an important influence on the peak shape (Mestres et al. 1999), a straight glass liner of 0.75 mm ID was used. The fused-silica capillary column used was a Chrompack (Middelburg, The Netherlands) CP-Wax 57CB (50 m x 0.25 mm I.D., 0.20 μ m film thickness) and the carrier gas was high-purity helium with a flow-

rate of 0.8 ml min⁻¹ (head pressure, 175 kPa). The oven temperature that allowed the best resolution when analysing the macerated was: 40°C (2 min), 4°C min⁻¹ to 150°C (1 min), 40°C min⁻¹ to 200°C (7 min), 25°C min⁻¹ to 250°C (Riu et al., 2006a). Since when analysing the cork disks the number of compounds extracted was higher than the number found in macerate, it was necessary to change the oven program as follows, in order to improve the chromatographic separation (Riu et al. 2006b and 2006c): 40°C (2 min), 13°C min⁻¹ to 150°C (15 min), 15°C min⁻¹ to 200°C (9 min), 5°C min⁻¹ to 220°C. The temperature of the detector in both analyses was held at 300°C.

Quantification of TCA

For quantifying the amount of TCA in the macerated, we built a calibration curve using synthetic wine. However, for quantifying this compound in corks, the calibration curve was made using cork standards with known amount of TCA, which were prepared and analyzed following the procedure developed in previous studies (Riu et al. 2006b). In both cases we used the internal standard method, so the calibration curves were built by plotting the peak-area ratios (TCA area/I.S. area) against the concentration ratios (TCA concentration/I.S. concentration). The fit of the response to the linear calibration was good as demonstrated the regression coefficients values higher than 0.99 and the low standard deviations of the intercept and slope values that we obtained in previous studies (Riu et al. 2006a, 2006b and 2006c).

Results and discussion

As explained above, the analyses of the corks studied were carried out in different ways so various terms and parameters were defined. Since the terms used may result confusing, we provide a schema (Figure 1) and also a glossary (Table 1) with the terms used and their definitions in order to further facilitate the understanding and the interpretation of the different parameters.

On the other hand, when assessing all the results obtained, it was very difficult to make comparisons or draw conclusions because it was too much information. Therefore, it was necessary to establish a first classification of the corks to facilitate this task. With this aim, we considered the descriptors used by the sensory panel, and the 46 corks were classified into three groups: a) defective corks with TCA, b) corks with no defects and c) corks with other defects (this group includes defects described as vegetal, earthy, musty, etc.). From this

criterion 14 cork disks were classified in the group of cork disks with TCA, other 14 cork disks belonged to the group of cork disks with no defect and the 18 remaining were classified in the group called other defects. So, in this way we achieved three groups with similar number of samples and characteristics which could make easier the evaluation of the results because each group was considered separately.

Corks disks with TCA

The samples defined in the sensory analysis as corks with TCA were analysed following the above described methods in order to determine both releasable TCA contents and total TCA contents. Before the analyses, blank controls were carried out in order to check possible contaminations of the material used. Table 2 shows the results obtained for each sample and, as can be seen, all of them presented TCA contamination. The contents of releasable TCA ranged between 0.2 ng g^{-1} (LOD) and 4.1 ng g^{-1} and the contents of total TCA ranged between 2.2 ng g^{-1} and 74.4 ng g^{-1} , although it has to be noted that if the sample 2_{WT} is not considered, in all cases the concentration of total TCA was higher than 6.3 ng g^{-1} . From these values it could be interesting to check the correlation between these two parameters (Figure 2). Although the equation obtained showed a acceptable correlation (and better when the total TCA in ng g^{-1} is plotted front releasable TCA in ng l^{-1}) it can be seen in Figure 2 that the good determination coefficients are due to the presence of two samples with a very high TCA concentration. In fact, if these two samples were not taken into account, the coefficient value decreased drastically. These results agree with other performed by other researchers (Peña-Neira et al. 2000; Hervé et al. 2008) that also found that there was a poor correlation between these two terms. This behaviour can be also observed when the migration values were considered because, if there was a correlation between the two terms, the migration values should remain constant as it is defined as the ratio between the two. However, as can be seen in table 2, this value presents different values ranging from 2.6 % to 15.5 %, and only half of the samples showed similar values of migration.

On the other hand, there is not a clear relationship between the content of TCA present in this kind of contaminated cork and migration (Juanola et al. 2005) as shown by the fact that high levels of total TCA not always involve high migration values (e.g. samples 11_{WT} or 14_{WT}) or the fact that low concentrations of total TCA do not imply low values of migration (e.g. samples 2_{WT} or 4_{WT}). Therefore, the migration will depend on other factors such as can be the

structure of the cork or the localization of TCA in the cork stopper (Amon and Simpson 1986; Howland et al. 1997). In any case, the lower the migration of TCA, more time is required to pass to wine, which is of special interest for wines that should be stored for a long period of time.

Corks with no defect

Like in previous section, the corks belonging to this group were analysed to determine the values presented in Table 3. As it can be seen from the values of total content of TCA, although all of them were sensory described as cork disks with no defect, all of them contained TCA. This is because all natural bark closures contain TCA (Sefton et al. 2005; Howland et al. 1997; Pollnitz et al. 1996; Capone et al. 1999) but, sometimes, the concentration levels of TCA that migrated to the solution are not high enough to be sensory perceived.

However, it has to be noted that, in consonance with the results reported in the literature (Peña-Neira et al. 2000; Soleas et al. 2002; Hervé et al. 2008), it can be observed that there is an important number of these corks with no defects that did not present releasable TCA. This fact demonstrates that the method used to extract the releasable TCA does not work in all cases; sometimes because the concentration of total TCA is too low and other times because, due to intrinsic characteristics of the cork, it is difficult to extract the TCA from this matrix.

On the other hand, also with these samples, the values of migration were in a wide range (between 0% and 11%) and similar to those found in literature (Juanola et al. 2005), but this time we only found three samples with similar values of migration. So, in this case the correlation between total TCA and releasable TCA does not exist.

Related to the concentration of TCA in the corks analysed, as showed in table 3, the values of releasable TCA (ng l^{-1}) ranged from 0.0 ng l^{-1} to 7.6 ng l^{-1} and the values of total TCA (ng g^{-1}) ranged between 2.0 ng g^{-1} and 10.4 ng g^{-1} . However draws attention the fact that the great part of the disks presented a concentration of total TCA lower than 7.3 ng g^{-1} , value very close to 6.3 ng g^{-1} which, in previous section, indicated a first line of separation. Thus we compared the values of Table 2 and Table 3 and, although there was no relationship between releasable TCA and sensory analysis, when comparing total TCA and sensory analysis, it can be established a concentration range of total TCA between 6.0 and 8.0 ng g^{-1} as a boundary that allows the sensory classification of the cork disks between defective and not defective.

Corks defined as other defects

Although the cork disks classified in this group were defined on the sensory analysis as “corks with other defects different to TCA”, their analysis showed the presence of TCA in all of them. This confirms the difficulty to classify the corks by using the sensory analysis when there are other odorous compounds that can interfere or create confusion on the TCA perception (Sefton et al. 2005).

The results obtained on the determination of total TCA and releasable TCA of these samples showed a similar behaviour to that of the samples classified as “cork disks with no defects” (see Table 4). This means that we found TCA in all the samples but not all of them gave releasable TCA (Hervé et al. 2008). In fact, the values of releasable TCA (ng l^{-1}) were from not detected to 13.0 ng l^{-1} and the values of total TCA (ng g^{-1}) were between 1.5 ng g^{-1} and 8.2 ng g^{-1} . But, the most surprising was that, when comparing the values of sensory analysis and the values of total TCA by using tables 2, 3 and 4, we found again the range $6.0\text{-}8.0 \text{ ng g}^{-1}$ as the boundary that allows the classification of the cork disks.

Related to migration, in this case the values were between 0 % and 18.4 % like those obtained in literature (Peña-Neira et al. 2000; Juanola et al. 2005; Hervé et al. 2008).

Conclusions

From all the results presented and discussed we can conclude that, although it is said that releasable TCA is a good way to determine the musty taint, this parameter can be not useful when cork contains low concentrations of TCA or when the cork also contains other aromatic defects. This is due to the fact that, sometimes, the conditions used to extract the releasable TCA are not similar enough to the actual conditions under which the cork can contaminate a bottled wine so, depending on these conditions, the cork stopper could be able or not to give musty taint to wine.

On the other hand and related to sensory analysis, we have checked that this kind of analysis is not always reliable because, though TCA concentration is below the sensory perception threshold, if cork have TCA we have no warranties that the cork will not contaminate the wine, especially when we considered wines that will remain in the bottle for a long period of time.

However when we considered the total TCA, we have an objective way to determine the presence of TCA and, from the results obtained, this parameter

allows to establish a boundary around the range of 6.0-8.0 ng g⁻¹ that allows the sensory classification of the cork disks in an objective way. So, the total TCA is presented as the better parameter to assess the corks in order to determine which of them can give the musty taint to wine

Finally, it has to be pointed that, a part from TCA, some other chloroanisoles have been determined in the samples analysed because, these could give us information about the origin of TCA in cork (Ribéreau-Gayon et al. 2000). The results showed that, although only three samples presented quantifiable amounts of 2,3,4,6-tetrachloroanisole or pentachloroanisole, almost a 50% of corks presented dichloroanisoles -mainly 2,4-dichloroanisole-. However, there is no correlation between the presence of these compounds and the sensory perception analysis and only in one case the migration value was different to 0. Therefore, the presence of these other chloroanisoles could not be extrapolated to the TCA concentration.

Acknowledgements

The authors acknowledge the Spanish Ministerio de Educación y Ciencia (project AGL2007-61550) for the financial support.

References

- AENOR. 2004. Tapones de corcho. Análisis sensorial. UNE 56928.
- AENOR. 2005. Determinación del 2,4,6-trichloroanisol (TCA) transferible. UNE 56930.
- Amon JM, Simpson RF. 1986. Wine corks: a review of the incidence of cork related problems and the means for the avoidance. Aust. Grapegrow. and Winemak. 268: 63-80.
- Bianchi F, Careri M., Mangia A, Musci M. 2003. Optimization of headspace sampling for chloroanisoles in cork stoppers and gas chromatography-ion-trap-tandem mass spectrometric analysis. J. Sep. Sci. 26 (5): 369-375.
- Buser HR, Zanier C, Tanner H. 1982. Identification of 2,4,6-Trichloroanisole as a Potent Compound Causing Cork Taint in Wine. J. Agric. Food Chem. 30: 359-382.

Capone DL, Skouroumounis GK, Barker DA, McLean HJ, Pollnitz AP, Sefton MA. 1999. Absorption of chloroanisoles from wines to corks and by other materials. *Austr. J. Grape Wine Res.* 5: 91-98.

Chatonnet P, Bonnet S, Boutou S, Labadie MD. 2004. Identification and responsibility of 2,4,6-tribromoanisole in musty, corked odors in wine. *J. Agric. Food Chem.* 52: 1255-1262.

Ezquerro O, Garrido-López A, Tena MT. 2006. Determination of 2,4,6-trichloroanisole and guaiacol in cork stoppers by pressurised fluid extraction and gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A.* 1102: 18-24.

Hervé E, Price S, Burns G, Weber P. 2008. Chemical analysis of TCA as a quality control tool for natural cork. <http://www.corkqc.com/asev/asev2-2htm>.

Howland PR, Pollnit, AP, Liacopoulos D, McLean HJ, Sefton MA. 1997. The location of 2,4,6-trichloroanisole in a batch of a contaminated wine corks. *Austr. J. Grape Wine Res.* 3: 141-145.

Insa S, Besalú E, Iglesias C, Salvadó V, Anticó E. 2006. Ethanol/water extraction combined with solid-phase extraction and solid-phase microextraction concentration for the determination of chlorophenols in cork stoppers. *J. Agric. Food Chem.* 54: 627-632.

Juanola R, Subirà D, Salvadó V, García Regueiro JA, Anticó E. 2005. Migration of 2,4,6-trichloroanisole from cork stoppers to wine. *Eur. Food Res. Tech.* 220: 347-352.

Macku C, González L, Schleussner C, Mesquita AC, Herwatt JW, Kirch LC, Schwartz RJ. 2009. Sensory screening for large-format natural corks by "Dry Soak" testing and its correlation to headspace solid-phase microextraction (SPME) gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS) releasable trichloroanisole (TCA) analysis. *J. Agric. Food Chem.* 57: 7962-7968.

Mestres M, Sala C, Martí MP, Busto O, Guasch J. 1999. Headspace solid-phase microextraction of sulphides and disulphides using Carboxen-polydimethylsiloxane fibers in the analysis of wine aroma. *J. Chromatogr. A.* 835: 137-144.

Peña Neira A, Fernández B, García MC, Hernández T, Cadahía E, Suárez JA. 2000. Presence of cork-taint responsible compounds in wines and their cork stoppers. *Eur. Food Res. Tech.* 211: 257-261.

- Pollnitz AP, Pardon KH, Liacopoulos D, Skouroumounis GK, Sefton MA. 1996. The analysis of 2,4,6-trichloroanisole and other chloroanisoles in tainted wines and corks. *Austr. J. Grape Wine Res.* 2: 184-190.
- Prat C, Trias R, Culleré L, Escudero A, Anticó E, Bañeras L. 2009. Off-odor compounds produced in cork by isolated bacteria and fungi: A gas chromatography-mass spectrometry and gas chromatography-olfactometry study. *J. Agric. Food Chem.* 57: 7473-7479.
- Ribéreau Gayon P, Glories Y, Maujean A, Dubordieu D. 2000. Handbook of enology: The Chemistry of wine Stabilization and Treatments, Vol.2, Wiley, Chapter 8.
- Riu M, Mestres M, Busto O, Guasch J. 2002. Determination of 2,4,6-trichloroanisole in wines by headspace solid-phase microextraction and gas chromatography-electron capture detection. *J. Chromatogr. A.* 977: 1-8.
- Riu M, Mestres M, Busto O, Guasch J. (2006a). Estudio de la aplicación de la norma UNE 56930:2005 para la determinación del 2,4,6-tricloroanisol (TCA) transferible. *Enólogos*, 44, 30-33.
- Riu M, Mestres M, Busto O, Guasch J. (2006b). Quantification of chloroanisoles in cork using headspace solid-phase microextraction and gas chromatography with electron-capture detection. *J. Chromatogr. A.* 1107: 240-247.
- Riu M, Mestres M, Busto O, Guasch J. (2006c). Determination of chloroanisoles in different kinds of cork stoppers. *Anal. Chim. Acta.* 563: 310-314.
- Riu M, Mestres M, Busto O, Guasch J. (2007). Comparative study of two chromatographic methods for quantifying 2,4,6-trichloroanisole in wines. *J. Chromatogr. A.* 1138: 18-25.
- Sefton MA, Simpson RF. 2005. Compounds causing cork taint and the factors affecting their transfer from natural cork closures to wine – a review. *Austr. J. Grape Wine Res.* 11: 226-240.
- Simpson RF, Capone DL, Sefton MA. 2004. Isolation of 2-methoxy-3,5-dimethylpyrazine, a potent musty compound from wine corks. *J. Agric. Food Chem.* 52: 5425-5430.
- Soleas GJ, Yan J, Sarver T, Goldberg DM. 2002. Method for the gas chromatographic assay with mass selective detection of trichloro compounds in corks and wines applied to elucidate the potential cause of cork taint. *J. Agric. Food Chem.* 50: 1032-1039.

Vlachos P, Kampioti A, Kornaros M, Lyberatos G. 2007. Matrix effect during the application of a rapid method using HS-SPME followed by GC-ECD for the analysis of 2,4,6-TCA in wine and corks soaks. Food Chem. 105 (2): 681-690.

TABLES

Term	Definition
Sensory defect	A negative perception on the sensory analysis
Releasable TCA (ng l ⁻¹)	Amount of TCA found into the solvent of maceration, once the cork soaking process is finished. The result is expressed taking into account the volum of the solvent.
Releasable TCA (ng g ⁻¹)	Amount of TCA found into the solvent of maceration, once the cork soaking process is finished. The result is expressed taking into account the cork weigh.
Remaining TCA (ng g ⁻¹)	Amount of TCA found in the analysis of the cork disks after the soaking process. This value refers to the fraction of TCA not extracted during the maceration.
Total TCA (ng g ⁻¹)	Initial contents of TCA in the cork disks, before any treatment. This value is derived from the sum of the releasable TCA plus the remaining TCA, both expressed in ng g ⁻¹ .
Migration	Percentage of releasable TCA (in ng g ⁻¹) over the total TCA content

Table 1. Glossary of the terms used.

Cork sample	Cork weight (g)	Releasable TCA (ng l ⁻¹)	Releasable TCA (ng g ⁻¹)	Remaining TCA (ng g ⁻¹)	Total content of TCA (ng g ⁻¹)	Migration (%)
1 _{WT}	1.0311	3.0	0.3	10.9	11.2	2.6
2 _{WT}	0.9588	3.2	0.3	1.8	2.2	15.5
3 _{WT}	1.5188	3.3	0.2	6.9	7.1	3.1
4 _{WT}	1.1426	4.5	0.4	5.9	6.3	6.3
5 _{WT}	2.0543	4.9	0.2	8.4	8.6	2.8
6 _{WT}	1.1016	5.5	0.5	16.1	16.6	3.0
7 _{WT}	1.7362	6.1	0.4	8.5	8.8	4.0
8 _{WT}	1.2516	7.2	0.6	12.9	13.5	4.3
9 _{WT}	2.2167	11.7	0.5	10.2	10.7	4.9
10 _{WT}	5.1750	13.5	0.3	13.6	13.8	1.9
11 _{WT}	5.2256	15.2	0.3	22.3	22.6	1.3
12 _{WT}	2.0783	29.1	1.4	10.6	12.0	11.7
13 _{WT}	1.5866	64.9	4.1	60.9	64.9	6.3
14 _{WT}	1.9782	70.8	3.6	70.9	74.4	4.8

Table 2. Values of the different parameters of TCA in the cork disks classified as defective corks with TCA (WT).

Cork sample	Cork weight (g)	Releasable TCA (ng l ⁻¹)	Releasable TCA (ng g ⁻¹)	Remaining TCA (ng g ⁻¹)	Total content of TCA (ng g ⁻¹)	Migration (%)
1 ND	1.8481	0.0	0.0	2.0	2.0	0.0
2 ND	1.9594	0.0	0.0	2.2	2.2	0.0
3 ND	1.7878	0.0	0.0	3.7	3.7	0.0
4 ND	2.0538	0.0	0.0	4.4	4.4	0.0
5 ND	2.1141	2.0	0.1	4.0	4.1	2.4
6 ND	1.8904	2.4	0.1	10.3	10.4	1.3
7 ND	1.9401	3.0	0.2	4.4	4.6	3.5
8 ND	1.9657	3.4	0.4	5.2	5.6	6.8
9 ND	2.0308	4.7	0.2	6.2	6.4	3.6
10 ND	1.8436	4.9	0.3	4.4	4.7	5.8
11 ND	1.4457	6.6	0.5	6.8	7.3	6.3
12 ND	1.1728	5.3	0.5	4.2	4.7	9.8
13 ND	1.0152	5.2	0.5	4.3	4.8	10.4
14 ND	1.9657	7.6	0.4	3.1	3.4	11.2

Table 3. Values of the different parameters of TCA in the cork disks classified as corks with no defect (ND).

Cork sample	Cork weight (g)	Releasable TCA (ng l ⁻¹)	Releasable TCA (ng g ⁻¹)	Remaining TCA (ng g ⁻¹)	Total content TCA (ng g ⁻¹)	Migration (%)
1 _{OD}	1.7814	0.0	0.0	1.5	1.5	0.0
2 _{OD}	1.5979	0.0	0.0	2.7	2.7	0.0
3 _{OD}	1.6307	0.0	0.0	3.9	3.9	0.0
4 _{OD}	1.7356	0.0	0.0	4.2	4.2	0.0
5 _{OD}	1.3786	0.0	0.0	4.8	4.8	0.0
6 _{OD}	1.5517	0.0	0.0	5.5	5.5	0.0
7 _{OD}	0.9155	2.6	0.3	4.3	4.5	6.2
8 _{OD}	1.8395	2.8	0.2	5.0	5.2	2.9
9 _{OD}	1.9782	3.8	0.3	2.0	2.2	11.6
10 _{OD}	1.0548	4.0	0.4	4.2	4.7	7.9
11 _{OD}	1.8726	4.4	0.2	4.6	4.9	4.8
12 _{OD}	1.1700	4.9	0.4	4.2	4.6	9.1
13 _{OD}	1.1088	5.7	0.5	4.7	5.2	9.9
14 _{OD}	0.8959	5.8	0.6	3.8	4.4	14.6
15 _{OD}	1.6046	6.9	0.4	5.1	5.5	7.7
16 _{OD}	0.9932	7.2	0.7	7.4	8.2	8.9
17 _{OD}	1.5543	8.0	0.5	6.9	7.4	7.0
18 _{OD}	2.2067	13.0	0.6	2.60	3.2	18.4

Table 4. Values of the different parameters of TCA in the cork disks classified as corks with other defects (OD).

FIGURE CAPTIONS

Figure 1. Schematic diagram of the sample preparation and the subsequent analyses by SPME to obtain the contents of releasable TCA and the total TCA.

Figure 2. Correlation between the contents of Total TCA (ng g^{-1}) and Releasable TCA (A: ng l^{-1} ; B: ng g^{-1}) in cork disks with TCA

Figure 1

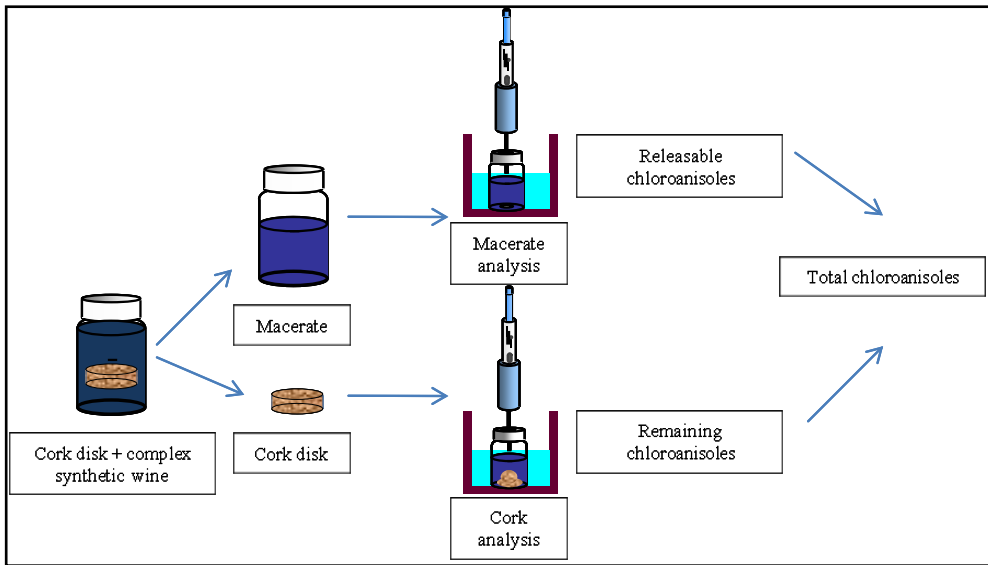
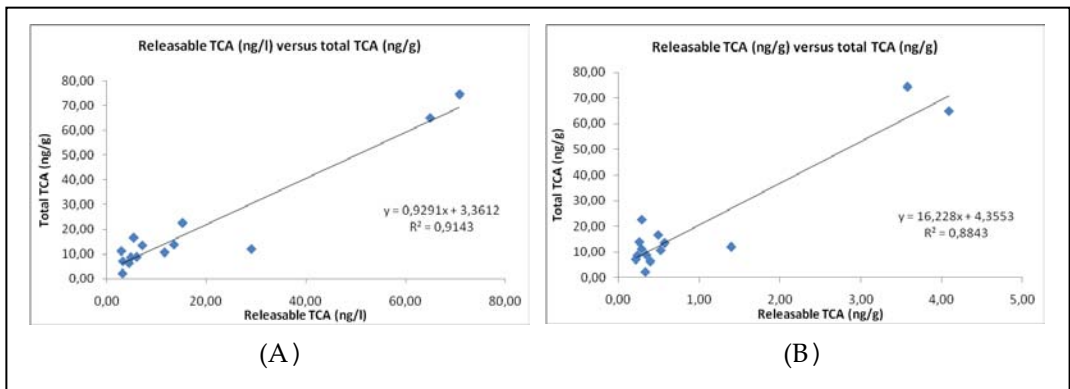


Figure 2



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
DETERMINACIÓ ANALÍTICA DE 2,4,6-TRICLOROANISOLE I ALTRES CLOROANISOLES
EN VINS I SUROS
Marc Riu Rusell
ISBN:9788469432358/DL:T. 1044-2011

CONCLUSIONS

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
DETERMINACIÓ ANALÍTICA DE 2,4,6-TRICLOROANISOLE I ALTRES CLOROANISOLES
EN VINS I SUROS
Marc Riu Rusell
ISBN:9788469432358/DL:T. 1044-2011

Tal com ja s'ha comentat en els objectius de la present Tesi Doctoral, així com en els capítols que s'han desenvolupat, la importància del 2,4,6-tricloroanisol (TCA) i dels cloroanisoles és focalitzada en la contribució negativa que poden aportar a la seva aroma global, implicant una pèrdua en la qualitat del producte. Resulta evident, doncs, la necessitat de mètodes d'anàlisis que permetin quantificar aquests compostos, no solament en el vi, sinó també en el suro, per tal d'evitar-ne la posterior contaminació de la beguda.

Tots els treballs presentats en aquesta Tesi Doctoral pretenen ser una petita contribució a aquest camp de recerca, ja que, amb aquests, s'ha avançat en la línia d'obtenció de mètodes de quantificació de cloroanisoles en el vi i en el suro i també s'ha progressat en el coneixement i en l'aplicació de les tècniques de microextracció en fase sòlida a mostres complexes, com són el vi i el suro.

De tot el treball que aquí s'ha exposat se'n deriven les conclusions que tot seguit es presenten. Tenint en compte que són diversos els mètodes analítics que s'han descrit en la present Tesi Doctoral, s'ha considerat oportú dividir en aquesta secció en una sèrie d'apartats que s'avaluen per separat.

EXTRACCIÓ I PRECONCENTRACIÓ

1. La tècnica de microextracció en fase sòlida de l'espai de cap (HS-SPME) permet l'extracció simultània de cloroanisoles sense manipulació de la mostra, per la qual cosa la pèrdua d'analits durant el procés és pràcticament negligible.
2. Les fibres de SPME que presenten una base de carbó porós en la seva fase estacionària, proporcionen la millor sensibilitat en l'anàlisi de cloroanisoles.
3. La tècnica del patró intern resulta imprescindible a l'hora d'utilitzar fibres de microextracció en fase sòlida.

CROMATOGRAFIA

1. Les columnes de polietilenglicol permeten la separació de cloroanisoles, ja sigui en vi o en suro, tot aconseguint una gran eficàcia i una bona resolució dels pics cromatogràfics.
2. El detector de captura electrònic permet la determinació específica de cloroanisoles amb una elevada sensibilitat, de manera que resulta de gran utilitat en l'anàlisi de vins i suros.

3. El detector de masses, amb un analitzador de quadrupol, es presenta com una bona alternativa al detector de captura electrònica, sobretot en la seva modalitat SIM, tot permetent la quantificació dels compostos d'interès encara que no hi hagi una total separació dels pics.

PREPARACIÓ DE MOSTRA I PATRONS

1. La trituració del suro prèviament congelat en nitrogen líquid, tot controlant el gruix de partícula del suro mòlt, resulta la tècnica més adient per l'obtenció de mostres homogènies.
2. L'extracció amb n-pentà dels cloroanisoles del suro permet l'obtenció de suros lliures d'aquests compostos, de manera que pot ser utilitzat com a blanc analític.
3. L'addició de quantitats conegudes d'analit sobre aquest blanc analític de suro permet utilitzar aquest com a material de referència del tipus "*in-house reference material*".
4. L'extracció amb fase sòlida amb cartutxs de C₁₈ es presenta com una bon sistema de neteja de cloroanisoles en vins, la qual cosa permet utilitzar els vins resultats com a blanc analític.

MÈTODES

1. La utilització d'una matriu sintètica el més semblant possible a un vi real es presenta com una bona manera de simular la matriu vínica i solucionar el problema de l'efecte matriu, almenys dels compostos polifenòlics responsables del color del vi.
2. L'etanol es presenta com un dels principals responsables de l'efecte matriu, de manera que es fa imprescindible controlar-ne la seva concentració, per tal d'obtenir resultats exactes i precisos en l'anàlisi dels vins.
3. Per a la determinació de 2,4,6-tricloroanisoles (TCA) amb el mètode desenvolupat, tot utilitzant fibres de pòlidimetilsiloxà (PDMS) i cromatografia de gasos (GC) amb detector de captura electrònica (ECD), s'obtenen unes recuperacions entre 90% i 100% amb una repetibilitat que presenten valors no superiors al 5%. Els límits de quantificació del mètode oscil·len entre 5 i 8 ng·l⁻¹, depenent de si es tracta de vi blanc o vi negre respectivament.

4. Amb el mètode d'SPME utilitzant fibres de polidimetilsiloxà/divinilbenzè/carboxen (PDMS/DVB/CAR) i cromatografia de gasos (GC) amb detector de captura electrònica (ECD) per a la determinació de TCA en vins blancs, rosats i negres s'obtenen unes recuperacions entre 80% i 100% amb una repetibilitat que oscil·la entre el 6% i el 14%. El límit de quantificació del mètode es situa a 1,0 ng·l⁻¹.
5. Amb el mètode d'SPME utilitzant fibres de polidimetilsiloxà/divinilbenzè/carboxen (PDMS/DVB/CAR) i cromatografia de gasos (GC) amb detector de masses (MS) per a la determinació de TCA en vins blancs, rosats i negres s'obtenen unes recuperacions entre 80% i 100% amb una repetibilitat que oscil·la al voltant del 10%. El límit de quantificació del mètode es situa a 0,8 ng·l⁻¹.
6. Amb el mètode d'SPME utilitzant fibres de de polidimetilsiloxà/divinilbenzè/carboxen (PDMS/DVB/CAR) i cromatografia de gasos (GC) amb detector de captura electrònica (ECD) per a la determinació de cloroanisoles en suros s'obtenen unes recuperacions al voltant del 100% amb unes repetibilitats entre 4% i 14%, depenent del compost. Els límits de quantificació del mètode oscil·len entre 0,6 ng⁻¹ i 8,6 ng·l⁻¹.
7. El mètode desenvolupat utilitzant el nas electrònic, sistema d'espai de cap i espectrometria de masses, com a tècnica ràpida per dur a terme la determinació del TCA en vins presenta un error mitjà de predicció de 0,74 µg·l⁻¹ (25% en termes relatius). La repetibilitat de les mesures és de 0,31 µg·l⁻¹ (9,4% en termes relatius). Tot i que els paràmetres de qualitat obtinguts són acceptables tenint en compte el nivell de concentració en el qual es treballa, presenta com a limitació el límit de detecció de 0,2 µg·l⁻¹, ja que aquest és 100 cops superior al límit de detecció sensorial.

CLOROANISOLES TOTALS I CLOROANISOLES EXTRAÏBLES

1. La determinació dels cloroanisoles totals es presenta com una bona alternativa de control de qualitat dels suros.
2. És important diferenciar entre cloroanisoles totals, romanents i extraïbles, ja que cada un dóna una informació diferent.
3. La normativa UNE 56930:2005 "*Tapones de corcho. Determinación del 2,4,6-tricloroanisol transferible*" dóna resultats de TCA diferents, depenent de les condicions experimentals aplicades. Això fa que sigui important arribar a una uniformitat en les condicions experimentals en els diferents laboratoris

que utilitzen aquesta metodologia per tal de que es puguin comparar resultats.

4. El TCA extraïble no es presenta com la millor opció quan els nivells de TCA en el suro són baixos o quan el suro té altres defectes diferents a l'olor a humitat.
5. L'anàlisi sensorial pot no ser sempre efectiu per a localitzar taps amb TCA. Aquest tipus de metodologia es veu afectada per la subjectivitat del catador, la dependència de les condicions externes (contaminacions odoríferes, distraccions de la persona) i la dificultat de discriminar entre olors similars, entre altres.
6. No s'observa una correlació clara entre TCA extraïble i TCA total del suro.
7. S'ha pogut establir que un valor límit de TCA en el suro, al voltant de 6-8 ng·g⁻¹, és la concentració crítica a partir de la qual es pot generar el defecte organolèptic en el vi.
8. El TCA total es presenta com un valor més objectiu, en comparació al TCA extraïble o a l'anàlisi sensorial, en el control del contingut de TCA en el suro com a mitjà per evitar la incidència de l'olor a humitat en el vi.

PERSPECTIVES DE FUTUR

1. La implantació de mètodes de determinació de cloroanisoles en el vi i suro més ràpides es presenta com un dels reptes més importants en els pròxims anys. Els sensors, entre ells els nanosensors, es poden presentar com una eina a tenir en compte en aquest camp.
2. Un estudi més profund de com apareix aquest defecte en el vi pot ajudar a previndre i, fins i tot, eradicar aquest defecte aromàtic. La relació del TCA amb els altres cloroanisoles pot donar informació addicional sobre com apareix aquest compost, ja sigui en el suro com en el vi.
3. Calen eines objectives en el control de qualitat de les empreses, tant en el sector enològic com en el surer, en relació a la determinació dels cloroanisoles. Només amb la utilització de metodologies harmonitzades es podran comparar resultats entre diferents laboratoris.

AED	Detector d'emissió atòmica
ASE	Extracció accelerada amb dissolvent
CA	Anàlisi d'agrupacions
CAR/PDMS	Carboxen/polidimetilsiloxà
CW/DVB	Carbowax/divinilbenzè
DCA	Dicloroanisole
2,4-DCA	2,4-dicloroanisole
2,6-DCA	2,6-dicloroanisole
2,4-DCP	2,4-diclorofenol
2,6-DCP	2,6-diclorofenol
DI-SPME	Microextracció en fase sòlida directe
DVB/CAR/PDMS	Divinilbenzè/carboxen/polidimetilsiloxà
ECD	detector de captura electrònica
EtOH	Etanol
ELISA	<i>Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay</i>
GC	cromatografia de gasos
FID	Detector de ionització de flama
FPD	Detector fotomètric de flama
HS	Espai de cap (<i>headspace</i>)
HS-SPME	Microextracció en fase sòlida de l'espai de cap
LC	Cromatografia líquida
LVI	Injector de gran volum
MDMP	2-metoxi-3,5-pirazina
MHS	Espai de cap múltiple
MIS	Espectrometria de mobilitat iònica
MS	Espectrometria de masses
MSD	Detector d'espectrometria de masses
NaCl	Clorur sòdic
PA	Poliacrilat
PCA	Pentacloroanisole
PCA	Anàlisi de components principals
2,3,4,5,6-PCA	2,3,4,5,6-pentacloroanisole
2,3,4,5,6-PCP	2,3,4,5,6-pentaclorofenol
PCR	Regressió per components principals
PDMS	Polidimetilsiloxà
PDMS/DVB	Polidimetilsiloxà/divinilbenzè
PLS	Mínims quadrats parcials
PTFE	Politetrafluoroetilè

PID	Detector de fotoionització
PTV	<i>Programmed temperature vaportization</i>
KNN	<i>K-nearest neighbours</i>
SBSE	<i>Stir bar sorptive extraction</i>
SDE	Extracció i destil·lació simultànies
SIM	<i>Selective ion monitoring</i>
SIMCA	<i>Soft independent modelling class analogy</i>
SPE	Extracció en fase sòlida
SPME	Microextracció en fase sòlida
2,4,6-TBA	2,4,6-tribromoanisole
2,3,6-TCT	2,3,6-triclorotoluè
2,4,6-TBP	2,4,6-tribromofenol
TeCA	Tetracloroanisole
2,4,5,6-TeCA	2,4,6-tetracloroanisole
TCA	2,4,6-tricloroanisole
2,4,6-TCP	2,4,6-triclorofenol
TD	Desorció tèrmica

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
DETERMINACIÓ ANALÍTICA DE 2,4,6-TRICLOROANISOLE I ALTRES CLOROANISOLES
EN VINS I SUROS
Marc Riu Rusell
ISBN:9788469432358/DL:T. 1044-2011

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
DETERMINACIÓ ANALÍTICA DE 2,4,6-TRICLOROANISOLE I ALTRES CLOROANISOLES
EN VINS I SUROS
Marc Riu Rusell
ISBN:9788469432358/DL:T. 1044-2011