

3. PARTE SPERIMENTALE

3.1. Valutazione dell'impatto sensoriale del TCA in differenti tipologie di vini

Per questo lavoro, fu selezionato un panel per valutare sia la sensibilità olfattiva sia quella gustativa al TCA in acqua e in vino. Fu determinata anche una curva tempo-intensità per il TCA in acqua per vedere se forniva qualche indicazione sulla percezione sensoriale del TCA. Il panel selezionato ha valutato l'effetto della tipologia del vino sul riconoscimento del TCA mediante test triangolare, test sensoriale usato per evidenziare delle differenze, sia su vini bianchi sia su vini rossi D.O.C., tutti liberi da TCA o con quantità note di questo contaminante appositamente addizionate.

Materiali e metodi

- *Selezione del panel*

Diciotto assaggiatori (5 maschi e 13 femmine), con età compresa tra 25 e 60 anni (72% avevano tra 25-32 anni; età media: 34 anni), furono scelti tra il gruppo di lavoro e gli studenti dell'Istituto di Enologia e Ingegneria agro-alimentare. Le prove furono effettuate da gennaio a maggio 2004. La sensibilità dei degustatori fu testata secondo le norme ISO 8586 (1993) e ISO 6658 (2005). Le prove di analisi sensoriali furono effettuate secondo i criteri relativi all'equipaggiamento e all'applicazione di adeguate condizioni ambientali, come riportato dalla norma

ISO 8589 (1994). Tutti i test triangolari eseguiti in questo studio furono effettuati seguendo la norma ISO 4120 (2004); i criteri per la determinazione significativa di TCA furono basati sulle tabelle relative alla distribuzione binomiale per test triangolare. Per tutti i test triangolari eseguiti in questo studio, i risultati sono stati considerati significativi per $\alpha \leq 0.05$. In accordo con le norme citate in precedenza, considerando il numero di prove, e $\alpha \leq 0.05$, fu determinato un valore di $\beta < 0.01$. Così il potere statistico del test è $p \geq 99\%$.

Inizialmente, fu eseguito un test di riconoscimento, nel quale venivano preparati campioni a concentrazioni crescenti ed esaminati in serie. Questa prova è raccomandata dalla norma ISO 6658 (2005) per una prima selezione dei degustatori. Questo test fu effettuato in tre giorni differenti, e ogni giorno veniva esaminata una serie diversa: le tre serie erano composte rispettivamente da acqua, vino bianco e vino rosso con 0.5 - 1 - 5 - 10 - 15 ng/l di TCA aggiunto (Aldrich - 99%). A ciascun assaggiatore ogni giorno fu presentata una serie di cinque campioni in ordine crescente. Per questa prova furono utilizzati vini neutri italiani da tavola, bianco e rosso, confezionati in cartoni laminati. Furono forniti anche campioni di controllo di acqua e di vino non contaminati. Per ciascuna serie, il degustatore riceveva un nuovo campione dopo un intervallo 10 di minuti. Il volume di ogni campione era di 20 ml, servito in un bicchiere di vetro trasparente alla temperatura di 20 ± 1 °C. Ai degustatori fu chiesto di identificare la più bassa concentrazione di TCA percepito rispettivamente all'odore e al gusto (percezione orthonasale e retronasale) fra i campioni di ciascuna serie. Sullo stesso campione veniva valutato sia l'olfatto sia il gusto nella medesima sessione.

Tuttavia, la selezione del panel fu effettuata via test triangolare in acqua, nel quale uno o due dei tre campioni di ciascuna terna contenevano in modo casuale 5 ng/l of TCA. Ai degustatori fu chiesto di identificare il campione che era differente dagli altri, sia all'odore sia al gusto. La percezione olfattiva e gustativa di ciascun campione fu valutata ad intervalli di 10 minuti. Il volume di ciascun campione era di 20 ml, servito in bicchieri di vetro trasparente alla temperatura di $20 \pm 1^\circ\text{C}$; ad ogni assaggiatore furono presentate sei terne di campioni con intervalli di 10 minuti.

Inoltre per il panel selezionato fu determinata la soglia di determinazione del TCA mediante test triangolare in soluzione acquosa addizionata rispettivamente con 3, 4 e 5 ng/l di TCA. Le prove furono eseguite seguendo la stessa procedura utilizzata per la selezione del panel.

- *Curva tempo-intensità*

Ai sei degustatori, che avevano mostrato una maggiore sensibilità all'olfatto per il TCA in acqua, fornendo sei risposte esatte su sei replicati, furono presentati 10 ml di acqua contenente 10 ng/l di TCA in un bicchiere di plastica da 30 ml alla temperatura di $20 \pm 1^\circ\text{C}$. Ogni assaggiatore fece tre replicati e un nuovo campione veniva presentato a intervalli di 10 minuti. Fu chiesto di mettere in bocca il campione, tenerlo in bocca per 10 secondi e poi espettorare. I degustatori segnavano l'intensità del gusto di muffa ad intervalli di 5 secondi dopo l'espettorazione fino all'estinzione della sensazione, in accordo con Ishikawa et al. (1995). Le risposte furono registrate con un registratore a carta e gli intervalli

di tempo furono indicati ai degustatori attraverso un cronometro dotato di un segnale sonoro. I risultati ottenuti per ciascun assaggiatore furono elaborati per ottenere un andamento medio, usando la media geometrica e i dati furono poi riportati in un grafico tempo-intensità.

- ***Prove sui vini***

L'impatto sensoriale del TCA fu verificato su vini D.O.C. bianchi e rossi provenienti dalla vendemmia 2003, mentre i vini invecchiati in legno provenivano dalla vendemmia 2000. Tra i vini bianchi: Frascati, Chardonnay dei Colli piacentini e Trebbiano di Romagna (da uve neutre); Malvasia dei Colli piacentini, sia di tipo dolce sia secco, prodotta dallo stesso mosto (da uve aromatiche); Moscato di Pantelleria (da uve aromatiche seccate); Picolit dei Colli orientali del Friuli (invecchiato in legno per 2 anni). Tra i vini rossi utilizzati: Bardolino, Valpolicella, Rosso San Severo, Barbera dei Colli tortonesi e Cabernet Sauvignon dei Colli piacentini. Invece tra i vini maturati in legno: Cabernet di Lison-Pramaggiore (L-P) e Montepulciano d'Abruzzo. Le principali caratteristiche dei vini sono riportate in Tabella 9.

Tabella 9 – Principali caratteristiche analitiche dei vini D.O.C. utilizzati per le prove; le analisi furono eseguite in accordo alle procedure EU Official Methods (1990).

	Contenuto alcolico (vol. %)	Zucchero (g/l)	pH	Acidità volatile (g acido acetico/l)	Acidità totale (g acido tartarico/l)	Indice F.C. (*)
Vini bianchi						
Frascati	11.75	2.10	3.28	0.35	5.75	
Chardonnay dei Colli piacentini	11.70	7.60	3.48	0.17	5.62	
Trebbiano di Romagna	10.75	1.80	3.56	0.22	4.86	
Vini bianchi da uve aromatiche						
Malvasia dei Colli piacentini (sweet)	8.55	67.60	3.49	0.22	6.08	
Malvasia dei Colli piacentini (dry)	10.93	12.20	3.58	0.28	5.68	
Moscato di Pantelleria	15.96	147.70	3.54	0.25	3.85	
Vini rossi						
Rosso San Severo	11.53	2.70	3.88	0.44	5.66	46
Bardolino	12.70	2.50	3.50	0.21	5.60	28
Valpolicella	12.70	2.50	3.40	0.25	5.70	37
Barbera dei Colli tortonesi	13.35	13.30	3.20	0.27	7.37	34
Cabernet Sauvignon dei Colli piacentini	13.93	3.40	3.76	0.35	5.04	67
Vini rossi e bianchi invecchiati in legno						
Cabernet di Lison-Pramaggiore	12.78	6.60	3.64	0.61	5.05	49
Montepulciano d'Abruzzo	12.65	6.50	3.48	0.49	6.22	61
Picolit dei Colli orientali del Friuli	14.00	7.50	3.61	0.56	5.39	

(*) Dopo aver fatto reagire il vino diluito con il reattivo di Folin-Ciocalteu, è stata misurata la OD a 750 nm: $I_{FC} = OD \times \text{diluizioni} \times 20$. E' la stima globale del contenuto di tannini presenti nel vino.

I test triangolari furono effettuati sui vini tal quali sia su quelli addizionati con quantità note di TCA. In ogni terna, uno o due dei tre campioni contenevano TCA, e la posizione del o dei campioni addizionati era messa a caso in ciascuna serie. Ai degustatori fu chiesto di identificare il campione che era diverso, sia all'odore sia al gusto. La percezione gustativa e olfattiva dei campioni fu valutata nella stessa sessione. Ciascun vino fu testato in un giorno differente, e ad ogni assaggiatore furono presentate tre terne dello stesso vino con intervalli di 10

minuti. Il volume del campione era di 20 ml, servito in un bicchiere di vetro trasparente alla temperatura di 20 ± 1 °C.

Il test triangolare e la significatività dei risultati ottenuti sono stati eseguiti in accordo alle norme ISO citate.

Risultati e discussione

- *Selezione del panel*

I test di riconoscimento, effettuate dai 18 assaggiatori, hanno dato informazioni relative alla loro sensibilità all'olfatto e al gusto del TCA (percezione orthonasale e retronasale) in acqua e in vino (Tabella 10).

Tabella 10 – Test di riconoscimento del TCA in acqua, vino bianco e rosso: per ciascun livello di riconoscimento (ng/l di TCA), è riportata la percentuale di degustatori che hanno identificato la presenza di TCA (panel composto da 18 assaggiatori; numero di replicati: 3).

Livello di riconoscimento		0.5	1	5	10	15
Acqua	olfatto	6	22	44	28	
	gusto	16	28	50	6	
vino bianco	olfatto	#	0	17	55	28
	gusto	#	0	55	39	6
vino rosso	olfatto	#	0	55	45	
	gusto	#	0	78	22	

(#) il livello di riconoscimento di 0.5 ng/l TCA non fu testato nei vini.

Per quanto riguarda l'acqua, la soglia di riconoscimento del TCA fu identificata tra 0.5 e 5 ng/l dal 94 % dei degustatori al gusto, e dal 72 % all'olfatto. Per i vini rossi tutti gli assaggiatori hanno identificato il TCA tra 5 e 10 ng/l, e anche per i vini bianchi i risultati della prova hanno dato un andamento analogo, pur con una

maggior dispersione. Come ci aspettavamo, il TCA, sia al gusto che all'odore, è stato riconosciuto meglio in acqua che in vino, probabilmente per l'assenza di interazione tra l'etanolo ed i composti aromatici presenti nel vino. In accordo con Suprenant et al. (1996), i degustatori mostrano una sensibilità verso il TCA variabile; tuttavia il nostro panel si è dimostrato sempre più sensibile al gusto del TCA, nell'intervallo di concentrazioni considerate. La maggior sensibilità retronasale potrebbe essere spiegata dal fatto che la volatilità del TCA potrebbe essere esaltata dalla temperatura presente nella bocca. Nella selezione del panel, effettuata mediante test triangolare, furono considerati solo i degustatori che diedero almeno 5 risposte corrette su 6 replicati sia all'olfatto sia al gusto. Così per tutte le prove successive il panel fu composto da 14 assaggiatori.

La soglia di determinazione del TCA in acqua fu determinata mediante test triangolare e i risultati sono riportati in Tabella 11. Il riconoscimento fu considerato statisticamente significativo ($\alpha \leq 0.001$) per concentrazioni di 4 e 5 ng/l di TCA sia al gusto sia all'olfatto, mentre per 3 ng/l non fu considerato significativo ($\alpha \leq 0.10$). Tuttavia, la soglia di determinazione del panel fu stabilita in 4.5 ng/l e 4.7 ng /l, rispettivamente per il gusto e l'olfatto, calcolato applicando una regressione lineare ai dati riportati in Tabella 11.

Tabella 11 – Soglie di determinazione del TCA mediante test triangolare in acqua. Il panel era composto da 14 degustatori; per le tre concentrazioni di TCA, a ciascun assaggiatore furono presentate 6 terne di replicati. Sono stati riportati la percentuale di identificazione corretta e i livelli di significatività.

TCA (ng/l)	Olfatto		Gusto	
	identificazione corretta %	α	identificazione corretta %	α
3	45	n.s.	45	n.s.
4	70	0.001	71	0.001
5	90	0.001	94	0.001

n.s. = non significativo

Confrontando i nostri risultati con le soglie di percezione per l'acqua riportate in Tabella 5, il nostro panel risulta meno sensibile al TCA in acqua anche se il test di riconoscimento mostra un buon livello di sensibilità dei degustatori sia allo stimolo ortonasale sia a quello retronasale del TCA, come illustrato sopra.

- ***Curva tempo-intensità***

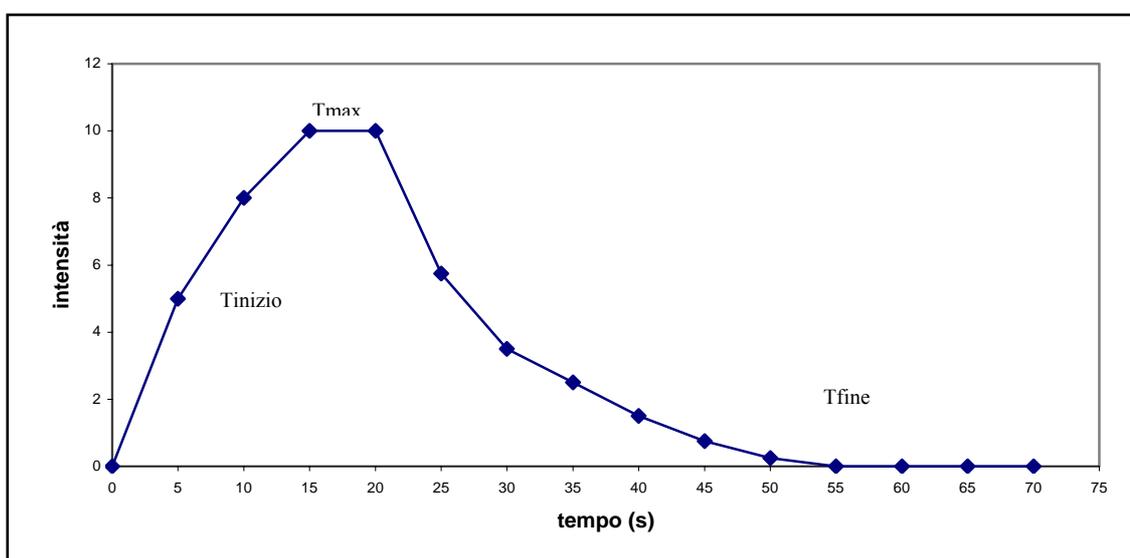
In Figura 8, viene riportata la curva tempo-intensità per il gusto del TCA (percezione retronasale) ed è rappresentata come una media delle risposte dei 6 degustatori.

La massima intensità è stata raggiunta dopo 15 secondi dall'espettorazione; il tempo totale di durata era di 55 secondi. Per le nostre conoscenze, è la prima volta che viene rappresentata una curva T-I per il TCA, e tuttavia ulteriori studi sono necessari per migliorare la correlazione di questa curva con la percezione del TCA nel vino. Il

tempo di saturazione e la persistenza della sensazione potrebbero parzialmente spiegare perchè i degustatori si adattano all'aroma del TCA molto rapidamente.

Per questo motivo, tutti i test sensoriali sono stati effettuati ad adeguati intervalli di tempo (10 minuti) tra prove successive furono fissate per evitare l'effetto saturazione.

Figura 8 – Curva tempo-intensità curve per 10 ng/l di TCA in acqua (media su 6 misure). Parametri rilevanti della curva: T_{inizio} (tempo che rileva il primo valore non zero) = 5 s; T_{max} (tempo dove si ha il primo valore massimo) = 15 s; T_{fine} (tempo che rileva il primo valore zero dopo l'ultimo massimo) = 55 s.



- **Prove sui vini**

L'effetto sensoriale del TCA addizionato ai diversi tipi di vino fu controllato mediante test triangolare dal panel precedentemente selezionato e costituito da 14 assaggiatori. La percentuale di risposte corrette nell'identificazione del TCA e i livelli di significatività (α) sono riportati nelle Tabelle 12 e 13.

Come si può vedere, la maggiore sensibilità retronasale del panel al TCA, osservata in acqua, è molto meno evidente nel vino, soprattutto nei vini rossi. Questa differenza può essere spiegata con la diversa esperienza dei degustatori nell'analisi sensoriale del vino.

- *Vini bianchi* (Tabella 12)

Il vino Frascati con 5 ng/l di TCA addizionati ha ottenuto il 50 % e 52 % di identificazioni corrette, rispettivamente all'olfatto e al gusto (percezione orthonasale e retronasale); questi risultati sono significativi ($\alpha < 0.01$), ma danno valori più bassi se confrontati con i risultati ottenuti per il TCA in acqua alla stessa concentrazione (Tabella 11). Come ci aspettavamo, lo stimolo del TCA interagisce con le caratteristiche sensoriali dei composti presenti nel vino come l'etanolo, così viene prodotto un effetto mascherante.

Il panel ha mostrato una buona abilità nell'identificare il TCA nel vino, fino alla quantità di 5 ng/l (addizionati al vino Frascati), che rientra nelle soglie di determinazione citate in letteratura (Sefton et al., 2005) e i dati riportati in Tabella 5 per i vini bianchi. A causa del livello più basso di significatività nel caso del vino Frascati, per i vini successivi fu aggiunta una quantità di 7 ng/l di TCA o maggiore.

Tabella 12 – Effetto sensoriale del TCA addizionato ai vini bianchi, testati dai 14 panellisti mediante test triangolare (3 replicati per ciascun assaggiatore). Sono riportate la percentuale di identificazione corretta e i relativi livelli di significativà. La denominazione completa dei vini e le caratteristiche analitiche sono elencati in Tabella 9.

Vini	TCA (ng/l)	Olfatto		Gusto	
		identificazione corretta %	α	identificazione corretta %	α
Frascati	5	50	0.01	52	0.01
Chardonnay	7	79	0.001	79	0.001
Trebbiano	7	64	0.001	65	0.001
Malvasia (dolce)	7	60	0.001	60	0.001
Malvasia (secco)	7	50	0.01	55	0.01
Moscato	7	71	0.001	71	0.001
Picolit	10	45	n.s.	45	n.s.
Picolit	15	62	0.001	64	0.001

n.s. = non significativo

Tra i vini addizionati di 7 ng/l TCA, furono osservate alcune differenze: Chardonnay è risultato il vino più sensibile con il 79 % di identificazioni corrette sia al gusto sia all'odore, il vino Malvasia secco è stato il meno sensibile con 55 e 50 % di assegnazioni corrette rispettivamente al gusto e all'olfatto. La minore sensibilità del vino Malvasia all'effetto del TCA può essere correlato con i suoi caratteri aromatici che hanno per certi versi un effetto coprente del TCA contaminante. Una differenza fu osservata nei livelli di significatività per la percezione orthonasale e retronasale del TCA tra i vini Malvasia dolce e secco, prodotti dallo stesso mosto e con le stesse caratteristiche aromatiche. Questo potrebbe essere spiegato con il maggior contenuto alcolico del vino Malvasia secco che deprime la volatilità e, di conseguenza, la sua percezione sensoriale. Queste differenze nei livelli di riconoscimento tra i vini Malvasia dolce e secco

sono risultate più alte all'olfatto che al gusto, senza influire sui livelli di significatività. Questo suggerisce una maggiore influenza del contenuto alcolico sulla percezione orthonasale piuttosto che su quella retronasale del TCA in questi vini. Il vino Moscato, prodotto da uve aromatiche lasciate maturare sulla vigna, era molto più sensibile al TCA del vino Malvasia e aveva un comportamento simile a quello dei vini Chardonnay e Trebbiano, anche se le loro caratteristiche sensoriali e chimiche (contenuto alcolico, acidità volatile) erano differenti. Nel caso del Picolit, vino bianco invecchiato in barrique, furono addizionati 10 ng/l di TCA ma l'identificazione non fu significativa ($\alpha < 0.10$); tuttavia, un'aggiunta di 15 ng/l fu percepita in modo significativo ($\alpha < 0.001$). La minore sensibilità del panel a questo vino dipende probabilmente dall'effetto congiunto dell'alto contenuto alcolico e dell'aroma legnoso.

- *Vini rossi* (Tabella 13)

Le prove effettuate addizionando una quantità di TCA pari a 10 ng/l e, in alcuni casi, di 15 ng/l ai vini. Sebbene la quantità di TCA aggiunta era superiore in confronto ai vini bianchi (ad eccezione del Picolit), l'identificazione del TCA risultò, in generale, più difficile. Questo dovrebbe essere dovuto ad un maggiore effetto mascherante dei caratteri sensoriali dei vini rossi rispetto alla percezione del TCA, che potrebbe essere correlato con le differenze generalmente esistenti tra i profili aromatici dei vini rossi e i vini bianchi.

Tabella 13 – L'effetto sensoriale del TCA addizionato nei vini rossi, testati dai 14 assaggiatori mediante test triangolare (3 replicati per ciascun degustatore). Vengono riportata la percentuale di identificazioni corrette e i relativi livelli di significatività. La denominazione completa dei vini e le caratteristiche analitiche sono elencati in Tabella 9.

Vini	TCA (ng/l)	Olfatto		Gusto	
		identificazione corretta %	α	identificazione corretta %	α
Rosso San Severo	10	50	0.01	57	0.001
Bardolino	10	79	0.001	79	0.001
Valpolicella	15	55	0.01	55	0.01
Barbera	10	43	n.s.	43	n.s.
Barbera	15	52	0.01	52	0.01
Cabernet Sauvignon	10	74	0.001	74	0.001
Cabernet L.-P.	15	55	0.01	55	0.01
Montepulciano	10	36	n.s.	36	n.s.
Montepulciano	15	69	0.001	71	0.001

n.s. = non significativo

Tra i vini rossi non invecchiati in legno con 10 ng/l di TCA addizionati, l'identificazione fu significativa per i vini Rosso San Severo ($\alpha < 0.01$ e $\alpha < 0.001$ rispettivamente per la percezione orthonasale e retronasale), Bardolino e Cabernet Sauvignon (per entrambi i vini $\alpha < 0.001$ sia per la percezione orthonasale sia retronasale). Cabernet Sauvignon si differenziò solo leggermente dal Bardolino nel corretto riconoscimento del TCA addizionato (74 e 79 % rispettivamente) mostrando che la percezione del panel non era affetta dalla diversa composizione chimica dei due vini. Per i vini Barbera e Valpolicella, furono raggiunti valori significativi di identificazione solo con 15 ng/l di TCA addizionati, e così la tipologia di questi vini sembra avere un effetto mascherante maggiore nel riconoscimento del TCA, se confrontati con gli altri vini rossi studiati.

I vini invecchiati in barrique, Cabernet Lison-Pramaggiore e Montepulciano d'Abruzzo, mostrano un livello significativo di determinazione del TCA (rispettivamente $\alpha < 0.01$ e $\alpha < 0.001$) solo alla concentrazione di 15 ng/l. Un'interazione tra l'aroma legnoso e il sentore di muffa può aver luogo anche in questi vini, come già osservato per il vino bianco Picolit invecchiato in legno, nonostante per alcuni vini rossi testati l'influenza dell'aroma legnoso mostra una minore influenza sul riconoscimento del TCA. Infatti, se confrontiamo i vini rossi non invecchiati in barrique: Barbera e Valpolicella con quelli invecchiati in legno, Cabernet Lison-Pramaggiore e Montepulciano, con la stessa quantità di TCA aggiunto (15 ng/l), i livelli di riconoscimento sono confrontabili o leggermente migliori nel caso dei vini maturati in legno.

Confrontando il comportamento dei vini Barbera e Montepulciano, sembra che l'aroma legnoso abbia un'influenza minore sul riconoscimento del TCA rispetto alla tipologia del vino. Per il vino Barbera, la corretta identificazione passò dal 43 al 52 % (sia per la percezione oronasale sia retronasale) se la concentrazione del TCA veniva incrementata da 10 a 15 ng/l, e così fu osservata una debole correlazione tra la quantità di TCA aggiunto e la capacità di identificazione del panel. Nel vino Montepulciano, quando la concentrazione del TCA passò da 10 a 15 ng/l, le risposte corrette passarono da un livello non significativo (36 % sia per percezione oronasale sia retronasale) ad un valore significativo di α inferiore a 0.001 (69 e 71 % rispettivamente per la percezione oronasale e retronasale).

Conclusioni

Le prove effettuate su soluzioni di TCA in acqua, vini bianchi e rossi hanno confermato la differente sensibilità individuale del nostro panel. Nel caso dei vini, la sensibilità del panel allo stimolo del TCA è risultato congruente ai dati pubblicati in letteratura (Tabella 5).

Per i vini testati non invecchiati in barrique, il riconoscimento del TCA è risultato più semplice nei vini bianchi piuttosto che in quelli rossi. Per quanto concerne i vini bianchi, l'effetto del TCA fu mascherato maggiormente nei vini con caratteristiche varietali più intense e con un contenuto alcolico più elevato; per quanto riguarda i vini rossi, si può dire che la tipologia sembra avere un impatto sensoriale più forte nel riconoscimento del TCA addizionato.

Tra i composti volatili e non volatili dei vini rossi testati, alcuni possono interagire con la percezione del TCA, spiegando il comportamento osservato. Tuttavia, sulla base delle conoscenze attuali circa le interazioni gusto-olfattive nei vini rossi, non è possibile identificare le sostanze che producono differenti livelli di riconoscimento del TCA nei vini Rosso di San Severo, Cabernet Sauvignon, e Bardolino se confrontati con Barbera e Valpolicella.

L'aroma legnoso interagisce con il riconoscimento del TCA sia nei vini bianchi sia nei rossi, ma in questi ultimi lo stile sembra avere un'influenza prevalente.

Nonostante il ridotto numero di vini testati, questi risultati suggeriscono che la tipologia di un vino ha un importante effetto nell'identificazione del TCA, così come l'uso generico delle soglie di percezione per tutti i vini non sembra abbastanza accurato.

I risultati sono stati oggetto di un poster presentato durante il convegno In Vino Analytica Scientia 2005 (INRA, Montpellier). Il lavoro è in corso di revisione sulla rivista *Food Research International*.

3.2. Messa a punto del metodo di estrazione e di analisi del TCA nel sughero, mediante estrazione solido-liquido e determinazione per GC/ECD

Nel campo del controllo qualità, sono stati svolti numerosi studi dedicati alla messa a punto di metodi di determinazione del TCA nel sughero e nel vino, tuttavia non esiste ancora un metodo ufficiale di estrazione e di analisi.

Come già evidenziato da alcuni autori, il metodo di estrazione con solvente da buoni risultati sia in termini di riproducibilità sia di ripetibilità; inoltre è un metodo semplice e nelle possibilità di molti laboratori (Juanola et al., 2002). Questo aspetto va sottolineato, visto che la determinazione del TCA nei tappi di sughero si sta diffondendo come metodo di controllo qualità non solo nell'industria sugheriera ma in tutto il settore enologico. Inoltre utilizzando l'estrazione con solvente è possibile estrarre la frazione facilmente rilasciabile di TCA, che permette la stima della quantità di analita che potrebbe andare successivamente in contatto con il vino, e quindi contaminarlo.

L'obiettivo di questa ricerca è stata la messa a punto di un metodo di estrazione e di analisi del TCA per il controllo qualità di tappi in sughero.

Materiali e metodi

- ***Reagenti e prodotti chimici***

Tutti i solventi, etanolo assoluto e *n*-esano RPE furono ottenuti da Carlo Erba Reagenti (Italia). 2,4,6-tricloroanisolo 99 % fu fornito da Sigma-Aldrich (Italia). Inoltre fu preparata una soluzione madre alla concentrazione di 250 mg/l di TCA in esano.

Furono usati anche solfato sodio anidro (Carlo Erba Reagenti, Italia) e filtri di carta (Schleicher & Schuell, Germania).

- ***Sughero***

Il sughero grezzo fu fornito in forma di tappi e prima di effettuare le prove fu analizzato e risultò non contaminato da TCA. Visto che non sono disponibili materiali di riferimento per la validazione del metodo, il sughero per le prove fu preparato iniettando 0.1 ml di una soluzione di TCA (10 mg/l in esano) in differenti posizioni sotto la superficie dei tappi (250 ng/g di sughero). In accordo con quanto riportato da Juanola et al. (2005), la migrazione del TCA iniettato nel sughero con questa procedura risulta essere molto simile alla migrazione del TCA che si ha con il sughero naturalmente contaminato, almeno per brevi tempi di contatto.

Furono analizzati anche sei campioni di tappi di sughero contaminati naturalmente.

- ***Metodo di estrazione***

Per quanto riguarda il metodo di estrazione sono stati presi in considerazione diversi parametri ed è stata valutata l'influenza di questi nelle varie fasi. Di seguito sono riportati i parametri considerati: - il tempo di contatto (6, 12, 24, 48 ore); - la modalità di contatto statico o dinamico (agitazione con movimento orbitale o alternato); - il tempo (3, 6, 12, 24, 48 ore) e la velocità di agitazione (100, 200 rpm); - il tipo di solvente (etanolo assoluto, etanolo assoluto/acqua 1:1).

Le condizioni ottimali scelte per effettuare l'estrazione del TCA sono le seguenti: 3 tappi di sughero (circa 12 g) furono messi in contatto con una opportuna quantità di etanolo assoluto in una bottiglia di vetro chiusa per 48 ore a temperatura ambiente. La procedura di contaminazione e le condizioni di estrazione furono fissate in modo tale da poter estrarre e quantificare il TCA facilmente rilasciabile presente nel sughero cercando di simulare il più possibile le reali condizioni del fenomeno e al tempo stesso con lo scopo di minimizzare l'estrazione di alcuni componenti come le paraffine.

La frazione organica fu separata filtrando su filtro di carta e fu aggiunta acqua distillata (1:1 v/v). La soluzione idroalcolica risultante fu estratta per tre volte con 15 ml di *n*-esano. La frazione esanica fu filtrata su filtro di carta con sodio solfato anidro per eliminare eventuali residui acquosi e concentrata a 0.5 ml, alla temperatura di 40°C e alla pressione di 335 mbar con un rotavapor BÜCHI B – 171 (BÜCHI, Switzerland) e poi analizzato con GC-ECD.

- ***Analisi gas cromatografica***

Le analisi furono effettuate con un gas cromatografico GC 1000 (DANI Instruments S.p.A., Italia) equipaggiato con un rivelatore a cattura di elettroni (DANI Instruments S.p.A., Italia). Il campione è stato iniettato in modalità splitless (0.5 μ l) in una colonna capillare EC-5 (30 m x 0.25 mm i.d.; 0.25 μ m spessore film; Alltech, Italia). Le condizioni operative erano le seguenti: temperatura dell'iniettore 200 °C, temperatura del rivelatore 300 °C, carrier gas N₂ con flusso 1.0 ml/min, flusso gas ausiliario N₂ 30 ml/min. La programmata di temperature del forno era la seguente: 5 min a 60°C, 5°C/min fino a 200°C e poi 30°C/min fino a 280°C ed infine 5 min a 280°C. L'identificazione del TCA estratto fu effettuata comparando il tempo di ritenzione con quello di uno standard commerciale. Per la quantificazione, fu utilizzato il metodo dello standard esterno preparando delle diluizioni dalla soluzione madre in esano: furono costruite due curva di calibrazione, una ad alte concentrazione di TCA (soluzioni in esano da 0.5 a 5 μ g/l), e un'altra a basse concentrazioni (nell'intervallo da 0.1 a 1 μ g/l). Per ciascun punto della retta di calibrazione, furono analizzati cinque replicati. I dati cromatografici furono analizzati mediante il programma Clarity software di DANI Instruments S.p.A.

Risultati e discussione

- **Curve di calibrazione**

Furono costruite due curve di calibrazione facendo il grafico della concentrazione di TCA rispetto all'area del picco di TCA corrispondente. I parametri della curva di calibrazione sono riportati in Tabella 14. I coefficienti di determinazione ottenuti sono risultati buoni ($r^2 = 0.998$ e 0.999 , rispettivamente). La minore quantità di TCA rilevata per il metodo utilizzato, considerando le fasi di estrazione e di concentrazione, fu di 5 pg/g di sughero o, considerando il peso medio di un tappo di sughero pari a 4 g, di 0.02 ng/tappo di sughero.

Tabella 14 - Parametri delle curve di calibrazione ($y = a + bx$) costruite per la quantificazione del TCA. Per ciascun punto sono stati eseguiti cinque replicati.

TCA $\mu\text{g/l}$	a	S_a	b	S_b	r²
0.1 – 1	0.59	0.36	119.36	10.87	0.999
0.5 – 5	31.73	5.75	79.73	8.56	0.998

- **Limite di determinazione (LOD) e limite di quantificazione (LOQ)**

Una soluzione esanica di TCA (0.1 $\mu\text{g/l}$) fu utilizzata per stabilire i limiti di determinazione e di quantificazione del metodo. Furono considerati cinque replicati.

Assumendo come limite di determinazione tre volte il rapporto tra segnale e rumore di fondo e come limite di quantificazione 10 volte questo rapporto, il

limite di determinazione è di 1 ng/l mentre il limite di quantificazione è risultato pari a 3.5 ng/l. Inoltre il valore di LOQ ottenuto è congruente con i limiti riportati da Jönsson et al. (2006) riguardo alla determinazione del TCA con GC/ECD nel vino che variano da 2.9 a 18 ng/l.

- ***Recupero***

Il recupero del metodo fu determinato considerando la fase di estrazione e di analisi di tappi di sughero contaminati da 250 ng/g di TCA. La percentuale di recupero fu calcolato come rapporto percentuale tra la concentrazione di TCA estratto, determinata dalla curva di calibrazione, e la concentrazione di TCA iniettata nel sughero. Il recupero medio fu del 70 % con una deviazione standard (RSD %) pari all'8 %. Questi dati sono buoni, se si considera che la procedura di contaminazione consiste nell'iniettare TCA con una siringa nel sughero e che l'estrazione fu eseguita su una matrice solida. Inoltre si deve considerare che nel sughero naturalmente contaminato, il TCA spesso è concentrato nella parte più esterna, quindi la sua estrazione risulta più facile. In letteratura, utilizzando un'analoga procedura di contaminazione e metodo di estrazione con solvente fu ottenuto un recupero del 76 % (Juanola et al., 2002). Valori molto più alti (98-100 %) furono riportati in altri studi basati su SFE e SPME: in questi casi, la procedura di contaminazione constava in un'aggiunta esterna di TCA al vino (Taylor et al., 2000; Ezquerro et al., 2005).

In un recente studio, anche lo HSSE (Head Space Sorptive Extraction) da alti recuperi (98%) su sughero contaminato per iniezione (Lorenzo et al., 2006).

- ***Ripetibilità e riproducibilità***

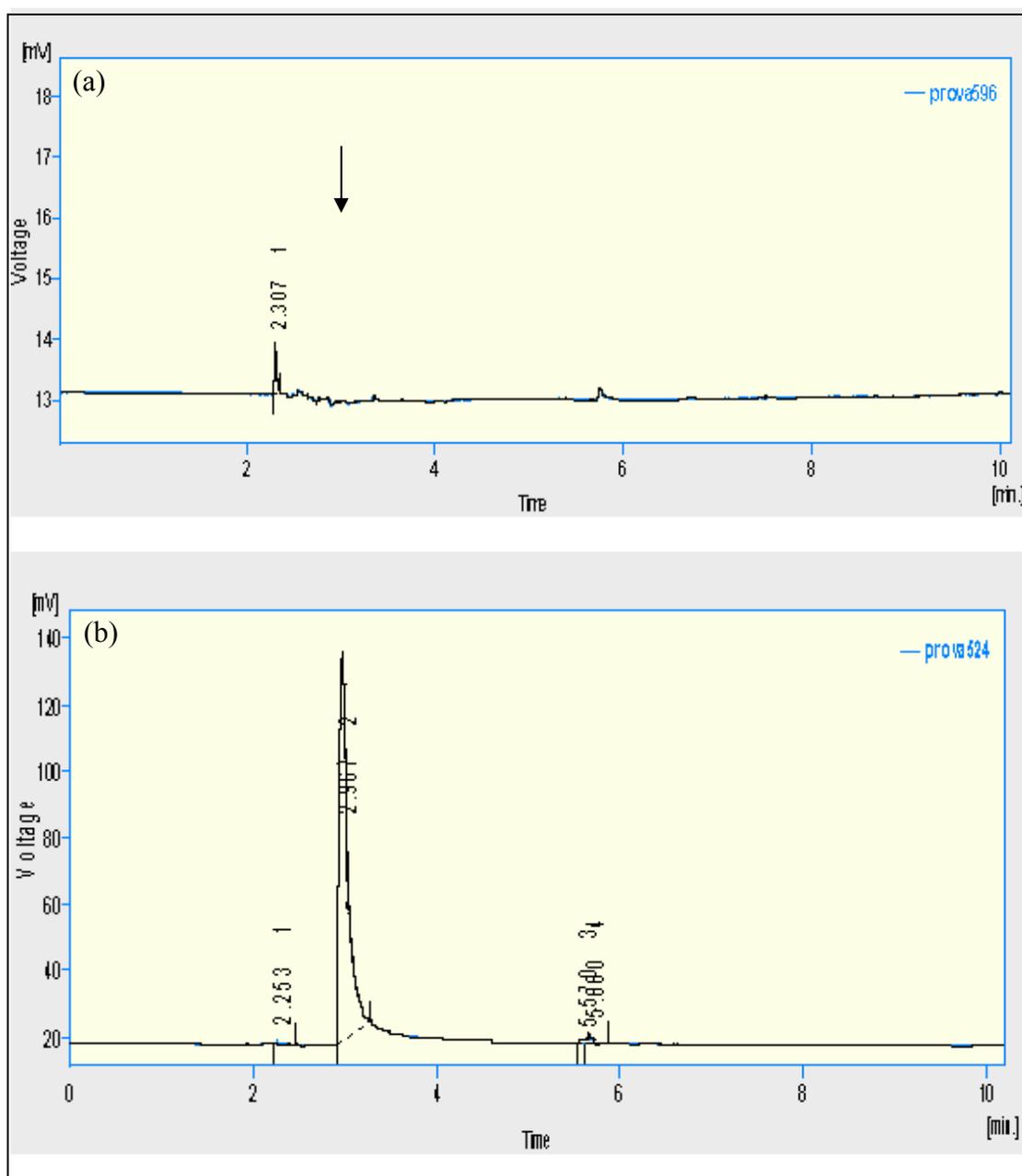
Per valutare la ripetibilità, tre differenti campioni di sughero contaminato (contenenti 250 ng/g di TCA) furono analizzati consecutivamente; invece la riproducibilità fu stimata analizzando tre campioni identici di sughero contaminato (contenente 250 ng/g di TCA) preparati in tre giorni diversi. I valori di RSD ottenuti rispettivamente per la ripetibilità e la riproducibilità furono di 4.5 % e di 6.7 %.

- ***Applicazione del metodo***

Il metodo proposto fu applicato all'analisi di tappi in sughero. La Figura 9 mostra esempi di cromatogrammi ottenuti da tappi di sughero non contaminati da TCA e naturalmente contaminate.

Il limite di contaminazione può essere stimato considerando che il livello di riconoscimento del TCA nel vino varia nell'intervallo tra 4 e 10 ng/l (Sefton, 2005), che rappresenta circa 4-10 ng/tappo se tutto il TCA presente nel tappo di sughero fosse estratto dal vino. La minima quantità rilevabile con questo metodo risulta essere adeguata per effettuare una prima analisi della contaminazione da TCA dei tappi in sughero.

Figura 9– Cromatogrammi ottenuti con la ottimizzazione del metodo: (a) campione di sughero non contaminato da TCA; (b) campione di tappi in sughero contaminato naturalmente con TCA (0.04 ng/g sughero).



Conclusioni

Questo metodo presenta una buona alternativa ai metodi basati sull'SPME e sull'LBSE per la determinazione del TCA nei tappi in sughero, visto che è in grado di identificare e di quantificare concentrazioni di questo composto più basse di quelle necessarie a produrre il cosiddetto "cork taint". Questo livello è molto basso se paragonato con le soglie di TCA nei vini (4-10 ng/l), considerando il rapporto tra sughero e vino esistente nella bottiglia. Il limite di determinazione è 1 ng/l e il limite di quantificazione è di 3.5 ng/l; i recuperi sono buoni (70 %) con un RSD % accettabile (8 %), considerando che l'estrazione fu eseguita su tappi in sughero. Così il metodo proposto sembra essere adeguato per il controllo qualità dei tappi in sughero.

I risultati sono stati oggetto di un poster presentato durante il "29th Symposium International on Capillary Chromatography" (Riva del Garda, 29 maggio-2 giugno 2006). Il lavoro è in fase di revisione sulla rivista *Italian Journal of Food Science*.

3.3. Confronto tra SBSE (Stir Bar Sorptive Extraction) e SPME (Solid Phase MicroExtraction) per la determinazione di policlorofenoli e policloroanisoli in vino con analisi gas cromatografica e l'uso in tandem dello spettrometro di massa (GC/MS/MS).

Mentre l'estrazione con SPME nello spazio di testa (HS-SPME) e l'uso di stir bar sorptive extraction (SBSE) combinata con l'analisi GC/MS e GC/ECD è stata utilizzata da diversi autori per l'analisi di policlorofenoli e policloroanisoli nel vino (Evans et al., 1997; Lizarraga et al., 2004; Riu et al., 2002; Martínez-Uruñuela et al., 2004; Jönsson et al., 2006; Zalacain et al., 2004), in letteratura non sono stati trovati lavori relativi all'uso della microestrazione in fase solida ad immersione (SPME). Inoltre la bibliografia scientifica non offre dati relativi alla comparazione di queste tecniche, ma solo indicazioni relative ai singoli metodi di estrazione (Martínez-Uruñuela et al., 2004; Riu et al., 2006; Jönsson et al., 2006). Pertanto, uno degli obiettivi di questa parte del lavoro di tesi è stato quello di confrontare le tecniche SPME, utilizzandola nella modalità ad immersione e nello spazio di testa, e SBSE, per valutare il metodo più adeguato, rapido ed efficiente per l'estrazione di policlorofenoli e policloroanisoli nel vino. L'uso della microestrazione in fase solida nello spazio di testa è consigliata dalle case produttrici rispetto a quella ad immersione, perchè la fibra utilizzata nella modalità HS-SPME dà minori problemi di interferenza e dura più a lungo. Inoltre considerando la complessità della matrice vino, è stato ottimizzato un metodo gas cromatografico per la determinazione di policlorofenoli e policloroanisoli con

sistema GC/MS/MS. Per la prima volta l'analisi di questi composti è stata effettuata mediante SBSE e l'uso in tandem dello spettrometro di massa, che consente di ridurre sia l'effetto del rumore di fondo sia le potenziali interferenze nella quantificazione. I vantaggi di questo metodo, confrontandolo con il singolo spettrometro di massa, sono l'incremento di sensibilità e il notevole miglioramento della selettività (Verenitch et al., 2006).

Materiali e metodi

- ***Reagenti e prodotti chimici***

L'etanolo assoluto RPE fu ottenuto da Merck (Germania), mentre l'acqua fu purificata mediante il sistema Milli-Q System (Millipore, USA).

2,4,6-triclorofenolo, 2,3,4,6-tetraclorofenolo, 2,4,6-tribromofenolo, 2,4,6-tricloroanisolo, 2,3,4,6-tetracloroanisolo, 2,4,6-tribromoanisolo e lo standard interno (IS) γ -esalattone furono forniti da Sigma-Aldrich (Spagna) ed il pentacloroanisolo fu acquistato da LGC Promochem (Francia).

- ***Soluzioni standard***

Fu preparata una soluzione madre alla concentrazione di 200 mg/l in etanolo contenente i seguenti composti: 2,4,6-triclorofenolo, 2,3,4,6-tetraclorofenolo, 2,4,6-tribromofenolo, 2,4,6-tricloroanisolo, 2,3,4,6-tetracloroanisolo, pentacloroanisolo e 2,4,6-tribromoanisolo. Inoltre fu preparata una soluzione idroalcolica al 12 % (v/v) alla quale furono aggiunti 5 g/l di acido tartarico (Panreac, Spagna). Il pH della soluzione fu portato a 3.6 con una soluzione di

idrossido di sodio 1 M (Panreac, Spagna). La soluzione idroalcolica fu usata per diluire la soluzione madre e preparare le soluzioni contenenti gli standard (0.4 ng/l – 40 µg/l) per la determinazione delle curve di calibrazione per le diverse modalità di estrazione.

L'identificazione è stata condotta mediante la libreria NIST e la quantificazione si è basata sulle curve di calibrazione dei rispettivi standard in soluzione idroalcolica.

Per lo studio della linearità, le curve di calibrazione furono determinate con soluzioni di vino sintetico addizionato di sette differenti concentrazioni di analiti. Per ciascun livello di concentrazione furono analizzati quattro replicati. Il limite di determinazione (LOD) e di quantificazione (LOQ) furono calcolati secondo la metodologia stabilita dal CATICE (2003).

- ***Procedura di estrazione***

Sono stati esaminati diversi parametri che possono influire sull'efficacia dell'estrazione, quali il tipo di fibra, l'aggiunta di sale, il volume del campione, il tempo di estrazione e di desorbimento.

Secondo alcuni studi la fibra in polidimetilsilossano (PDMS) 100 µm è risultata la più efficace per l'estrazione di policlorofenoli e policloroanisoli in vino, mostrando una buona sensibilità e ripetitività (Evans et al., 1997; Riu et al., 2002; Jönsson et al., 2006), così questo tipo di fibra fu impiegato sia per SPME (Supelco, Bellefonte, USA) sia per SBSE (PDMS, 0.5 mm spessore film, 10 mm

lunghezza, Twister, Gerstel, Germany). Per tutte le tecniche utilizzate il volume del campione fu di 5 ml, contenenti 25 µl di standard interno.

Per le tre modalità di estrazione il tempo di agitazione fu fissato in 60 minuti con un'agitazione costante a 250 rpm, a temperatura ambiente per SPME (Martínez-Uruñuela et al., 2004) e per SBSE, ed alla temperatura di 35 °C per HS-SPME (Lizarraga et al., 2004), mentre il tempo di desorbimento fu di 5 minuti.

Per SPME e HS-SPME la procedura di estrazione e di analisi viene eseguita in modo automatizzato dal sistema gas cromatografico. Per quanto riguarda le stir bar sorptive extraction furono inserite in matracci da 5 ml contenenti la soluzione idroalcolica e lo standard interno lasciate in agitazione (250 rpm) a temperatura ambiente per 60 minuti, poi furono rimosse, lavate con acqua distillata, asciugate con carta assorbente e trasferite in un tubo per il desorbimento termico e successivamente analizzate con GC/MS/MS.

- ***Analisi GC/MS/MS***

È stato utilizzato un gas cromatografo Varian CP-3800 (Palo Alto, CA, U.S.A.) equipaggiato con uno spettrofotometro di massa a trappola ionica Saturn 2200 ed un autocampionatore Varian CP-8200 (Palo Alto, CA, U.S.A.) con una colonna capillare Factor four (30 m x 0.25 mm i.d.; 0.25 µm spessore film; Varian, U.S.A.). Il desorbimento termico dei tubi contenenti le stir bar è stato effettuato con un sistema di desorbimento termico Perkin-Elmer Turbo Matrix ATM (Norwalk, CT, U.S.A.).

Le condizioni di desorbimento termico sono state le seguenti: temperatura trappola 310 °C; tempo di desorbimento, 5 min; temperatura raffreddamento

trappola, -30 °C; flusso elio 45 ml/min. Le condizioni dell'analisi gascromatografica sono state le seguenti: temperatura dell'iniettore 280°C, temperatura del rivelatore 300°C, flusso carrier gas He 1.0 ml/min; la programmata di temperature del forno: 2 min a 70°C, 20 °C/min fino a 150 °C (2 min) e poi 10 °C/min fino a 300 °C per 5 minuti.

La capacità della tecnologia a trappola ionica di manipolare la popolazione ionica seguendo gli ioni in creazione ma con priorità allo ione di analisi, è molto vantaggioso soprattutto quando devono quantificare livelli molto bassi di sostanze con alti livelli di interferenze, come in questo caso. E' stato necessario mettere a punto un metodo di preparazione dello ione (IPM). I parametri di preparazione dello ione controllano le funzioni basiche della ionizzazione elettronica e come possono essere modificate nel preparare gli ioni per la scansione; questi parametri permettono inoltre il controllo degli ioni espulsi, di quelli trattenuti, e di quelli che saranno sottoposti alla collisione indotta generando la dissociazione (CID). La tecnica di preparazione degli ioni determina come la funzione scansione viene costruita e il tipo di impatto che si va a creare per la dissociazione dello ione.

Le condizioni MS/MS per la dissociazione dei precursori ionici selezionati furono ottimizzati mediante l'uso del metodo di sviluppo automatizzato (AMD) disponibile nel software di Varian Saturn. Una volta ottimizzata l'energia per la dissociazione dello ione selezionato sono state effettuate le analisi mediante l'uso in tandem dello spettrometro di massa.

Risultati e discussione

- ***SBSE***

Per ciascun composto è stata calcolata la curva di calibrazione, costruendo il grafico della concentrazione della sostanza da determinare rispetto all'area del picco corrispondente. In Tabella 15 sono riportati i principali parametri analitici determinati mediante estrazione con stir bar sorptive extraction e analisi GC/MS/MS.

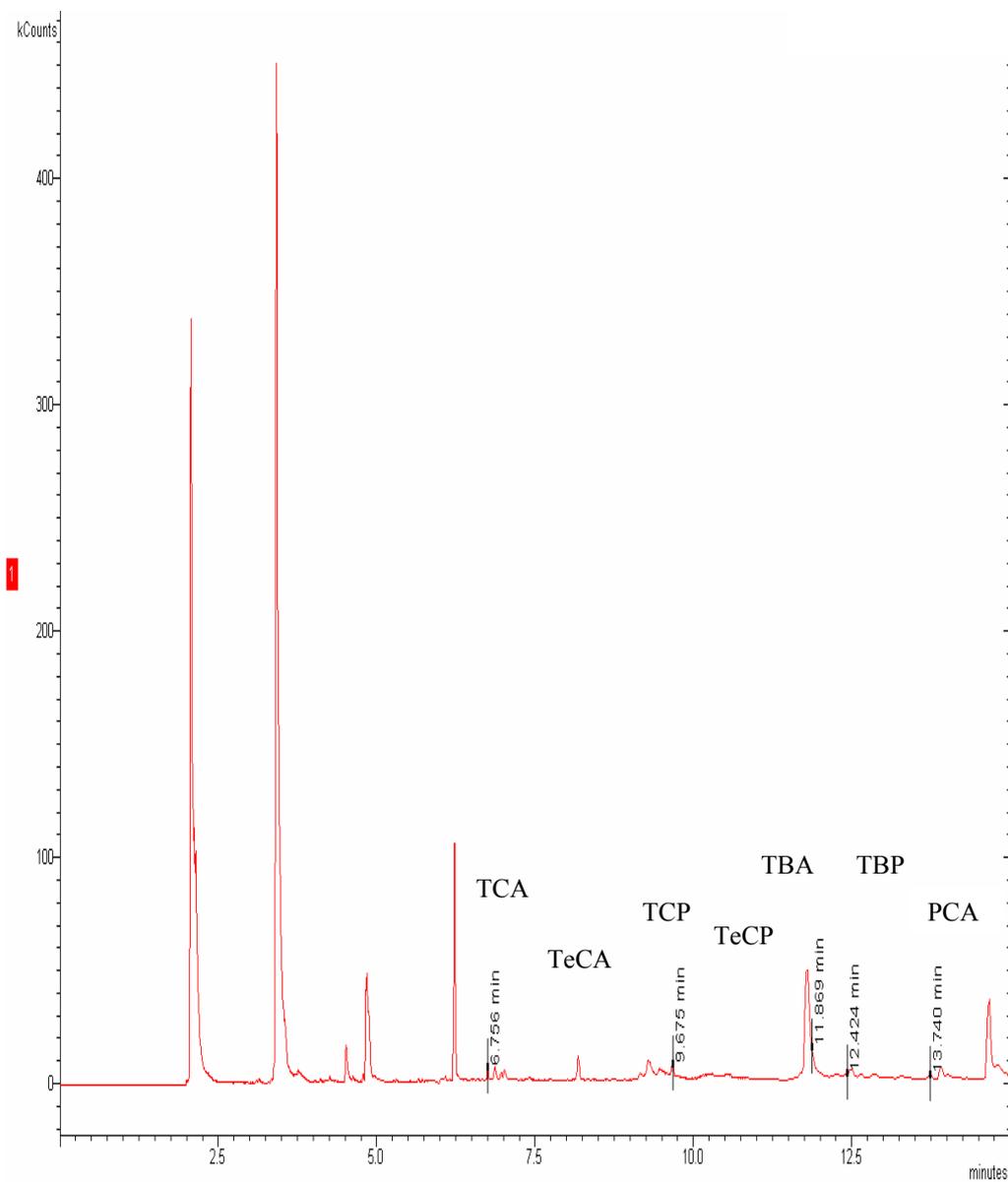
Tabella 15 – Caratteristiche analitiche del metodo SBSE e analisi GC/MS/MS.

SBSE	TCA	TeCA	PCA	TCP	TeCP	TBA	TBP
Ioni composto (<i>m/z</i>)	195, 197, 210, 212	203, 231, 246	237, 265, 280	132, 160, 196	166, 232	329, 344	332
Ione selezionato (<i>m/z</i>)	195	246	280	196	232	344	332
Intervallo conc. (ng/l)	0.4-500	1.0-500	0.4-500	0.4-500	0.4-500	0.4-500	0.4-500
Intercetta	110.1	307.3	74.8	17.1	77.0	277.5	31.0
Pendenza retta	19072.0	657.3	2468.7	346.1	1454.6	1229.9	9212.5
Linearità curva (r^2)	0.995	0.999	0.991	0.989	0.978	0.988	0.999
LOD (ng/l)	0.034	0.711	0.046	0.064	0.240	0.226	0.004
LOQ (ng/l)	0.099	1.278	0.084	0.097	0.557	0.226	0.005
Riproducibilità (%)	0.231	0.126	0.063	0.022	0.121	0.004	0.019
Ripetibilità (% RDS)	0.133	0.073	0.036	0.013	0.086	0.002	0.011

TCA: 2,4,6-tricloroanisolo; TeCA: 2,3,4,6-tetracloroanisolo; PCA: pentacloroanisolo; TCP: 2,4,6-triclorofenolo; TeCP: 2,3,4,6-tetraclorofenolo; TBA: 2,4,6-tribromoanisolo; TBP: 2,4,6-tribromofenolo.

I risultati ottenuti con questo metodo permettono di identificare e quantificare sia concentrazioni inferiori alle soglie di percezione dei composti presi in esame (vedi Tabella 4, es. soglia di percezione del TCA nei vini: 4-10 ng/l) sia concentrazioni maggiori in grado di causare gravi contaminazioni. In Figura 10 è mostrato un cromatogramma ottenuto con il metodo di estrazione SBSE ed analisi GC/MS/MS alla concentrazione di 10 ng/l.

Figura 10 – Cromatogramma ottenuto con il metodo SBSE e analisi GC/MS/MS.



- **SPME**

Sono state costruite le curve di calibrazione relative a TCA, TeCA, PCA, TCP, TeCP, TBA e TBP determinate mediante analisi GC/MS/MS con il metodo SPME, e le caratteristiche analitiche sono mostrate in Tabella 16.

Tabella 16 – Caratteristiche analitiche ottenute mediante SPME ed analisi GC/MS/MS.

SPME	TCA	TeCA	PCA	TCP	TeCP	TBA	TBP
Ioni composto (<i>m/z</i>)	195, 197, 210, 212	203, 231, 246	237, 265, 280	132, 160, 196	166, 232	329, 344	332
Ione selezionato (<i>m/z</i>)	195	246	280	196	232	344	332
Intervallo conc. ($\mu\text{g/l}$)	0.5-40	0.5-40	0.5-40	0.5-40	0.5-40	0.5-40	0.5-40
Intercetta	186.3	586.6	1850.9	2.9	2.8	959.9	3.4
Pendenza retta	439.3	1345.8	2780.9	9.8	11.3	1831.5	16.0
Linearità curva (r^2)	0.965	0.978	0.991	0.994	0.983	1.000	0.991
LOD (ng/l)	0.464	0.664	0.883	0.302	0.252	0.524	0.216
LOQ (ng/l)	0.556	1.149	1.392	0.324	0.253	0.525	0.224
Riproducibilità (%)	0.042	0.175	0.201	0.003	0.000	0.008	0.002
Ripetibilità (% RDS)	0.024	0.101	0.116	0.002	0.000	0.005	0.001

TCA: 2,4,6-tricloroanisolo; TeCA: 2,3,4,6-tetracloroanisolo; PCA: pentacloroanisolo; TCP: 2,4,6-triclorofenolo; TeCP: 2,3,4,6-tetraclorofenolo; TBA: 2,4,6-tribromoanisolo; TBP: 2,4,6-tribromofenolo.

Nonostante i parametri ottenuti con la microestrazione in fase solida ad immersioni non siano così buoni se confrontati con SBSE, anche questa metodologia analitica consente di identificare e quantificare concentrazioni dei composti presi in esame inferiori a quelle necessarie per causare il cosiddetto gusto di tappo.

- **HS-SPME**

In Tabella 17 sono riportati i parametri analitici delle sostanze esaminate con analisi GC/MS/MS e mediante estrazione con HS-SPME.

Tabella 17 – Caratteristiche analitiche del metodo HS-SPME e analisi

GC/MS/MS.

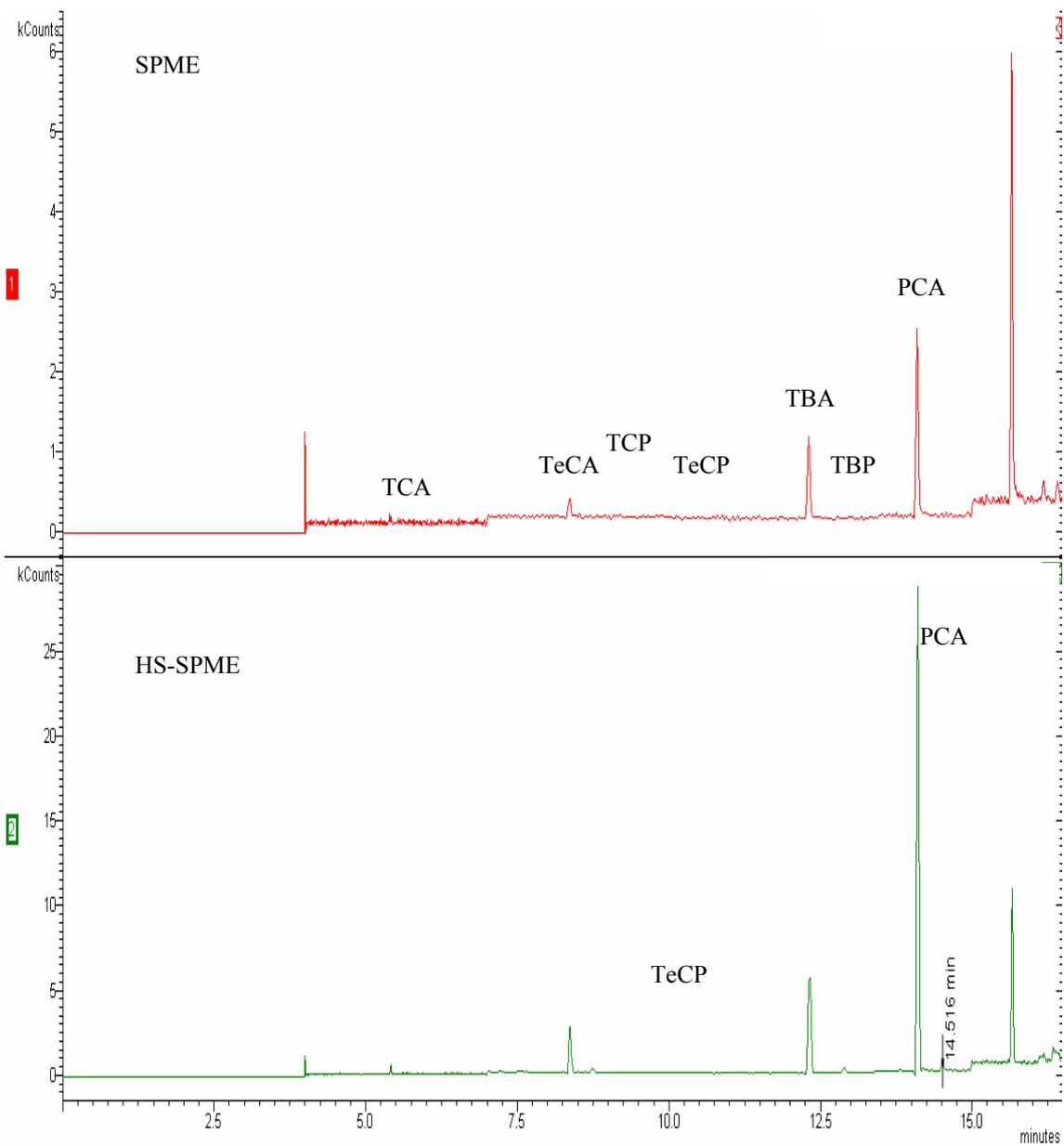
HS-SPME	TCA	TeCA	PCA	TCP	TeCP	TBA	TBP
Ioni composto (<i>m/z</i>)	195, 197, 210, 212	203, 231, 246	237, 265, 280	132, 160, 196	166, 232	329, 344	332
Ione selezionato (<i>m/z</i>)	195	246	280	196	232	344	332
Intervallo conc. ($\mu\text{g/l}$)	0.25-10	0.25-10	0.25-10	0.25-10	0.25-10	0.25-10	0.25-10
Intercetta	1010.3	2108.6	2262.1	1402.1	1878.9	8332.7	102.3
Pendenza retta	405.4	739.6	382.7	523.8	741.9	2738.9	33.2
Linearità curva (r^2)	0.998	0.998	0.994	0.998	0.997	0.995	0.997
LOD (ng/l)	87.4	107.4	243.1	150.2	106.7	221.9	7.6
LOQ (ng/l)	285.5	351.2	796.4	494.6	349.8	732.7	18.0
Riproducibilità (%)	1.515	2.270	3.012	1.931	5.364	6.322	0.122
Ripetibilità (% RDS)	1.071	1.605	1.739	4.318	3.097	4.470	0.070

TCA: 2,4,6-tricloroanisolo; TeCA: 2,3,4,6-tetracloroanisolo; PCA: pentacloroanisolo; TCP: 2,4,6-triclorofenolo; TeCP: 2,3,4,6-tetraclorofenolo; TBA: 2,4,6-tribromoanisolo; TBP: 2,4,6-tribromofenolo.

In questo caso i risultati ottenuti non sono buoni come per SBSE e SPME, e non vengono raggiunti i livelli di LOD e LOQ proposti da altri autori (Martinez-Uruñuela et al., 2004), questo può essere spiegato dal fatto che utilizzarono temperature di estrazione più elevate (70 °C) e furono utilizzate fortificazioni dei campioni. L'obiettivo di questo studio constava nel confronto di diverse modalità di estrazione a parità di condizioni analitiche e non nell'ottimizzazione di questi metodi: confrontando le tecniche prese in esame l'estrazione con stir bar (SBSE) ha dato i valori migliori, fornendo livelli di LOD e LOQ dell'ordine dei pg/l, una buona riproducibilità e ripetibilità.

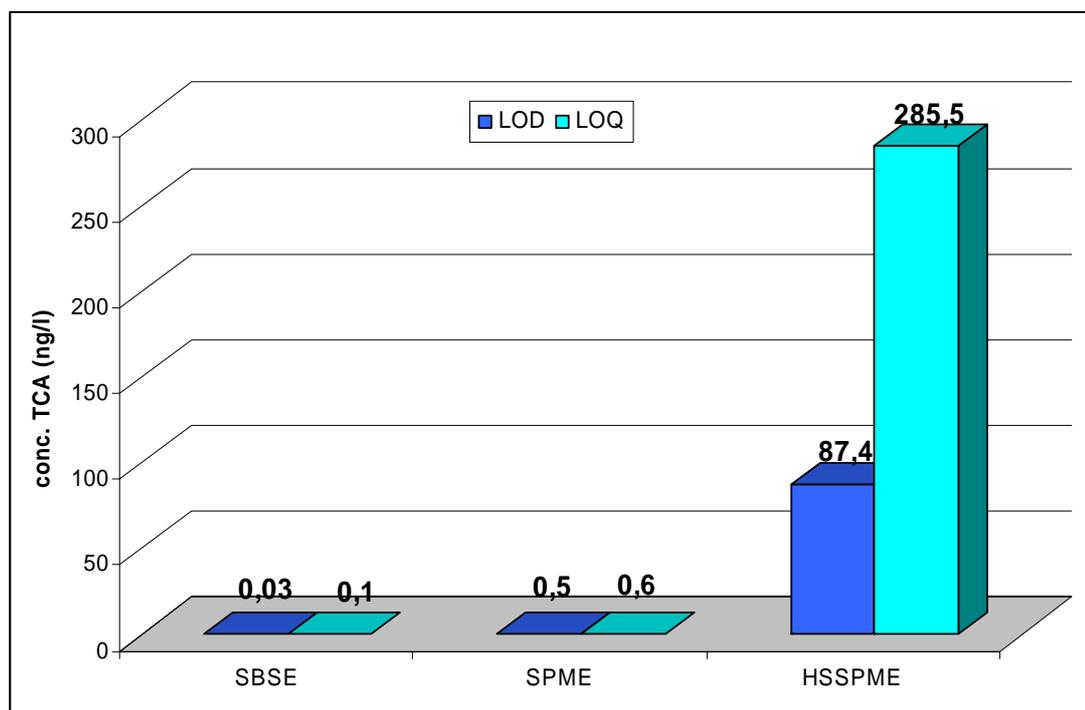
Figura 11 sono riportati i cromatogrammi ottenuti rispettivamente con i metodi SPME e HS-SPME alla concentrazione di 100 $\mu\text{g/l}$ e successiva analisi GC/MS/MS.

Figura 11 – Cromatogrammi ottenuti rispettivamente con il metodo SPME ed HS-SPME ed analisi GC/MS/MS.



Per rendere più facile il confronto tra queste tecniche di estrazione in Figura 12 sono mostrati i livelli di LOD e LOQ per il TCA, principale responsabile del cork taint nei vini.

Figura 12 – Livelli di LOD e LOQ per il TCA ottenuti rispettivamente con SBSE, SPME e HS-SPME e successiva analisi GC/MS/MS.



Conclusioni

Il presente lavoro conferma l'efficacia dell'uso in tandem dello spettrometro di massa per l'analisi di bassi livelli di policlorofenoli, policloroanisoli, TBA e TBP nel vino.

Dal confronto effettuato in questo studio, la tecnica SBSE ha dimostrato di essere la più efficace nella determinazione di questi composti, a parità di condizioni di estrazione e di analisi. Inoltre questo metodo risulta essere una buona alternativa alla metodologia classica per l'identificazione e la quantificazione di queste sostanze nel vino sia per livelli inferiori alla soglia di determinazione sia per contaminazioni più importanti: non richiede manipolazioni del campione né l'uso di solventi organici, è rapido e semplice, e sembra adeguato per l'analisi di routine. Il lavoro è in fase di revisione sulla rivista *Journal of Chromatography A*.

3.4. Caratterizzazione di microorganismi naturalmente presenti nel sughero in base alla loro capacità di degradare TCP e formare TCA.

I microorganismi presenti sulle plance di sughero (*Quercus suber L.*) possono influire negativamente sulla qualità dei tappi, se il loro metabolismo consente la formazione di sostanze capaci di produrre anomalie gusto-olfattive, che in seguito potrebbero essere trasmesse anche al vino. La contaminazione del sughero, causata dai metaboliti microbici, è un grave problema per le industrie del settore enologico e sugheriero.

Fino ad oggi non sono stati effettuati studi esaustivi per identificare i microorganismi responsabili della bioconversione del TCP a TCA e i meccanismi biochimici che portano alla formazione di questa sostanza. Così sono stati presi in considerazione sette ceppi fungini isolati da sughero grezzo e uno da uve.

L'obiettivo di questo lavoro è stato quello di caratterizzare questi microorganismi sia in mezzo sintetico solido (condizioni ottimali di accrescimento) sia sul sughero (sotto stress), in funzione della loro abilità di biodegradare TCP e produrre TCA.

Le spore di ciascun ceppo sono state inoculate su malt extract agar e su polvere di sughero umidificata in presenza di una quantità nota di TCP per valutare le loro capacità degradative nei due diversi terreni di coltura.

Il metodo di estrazione e l'analisi gas cromatografica furono ottimizzate per la determinazione del TCP consumato e del TCA prodotto.

Materiali e metodi

- **Reagenti e prodotti chimici**

Tutti i solventi, etanolo assoluto e *n*-esano RPE furono ottenuti da Carlo Erba Reagenti (Italia). 2,4,6-tricloroanisolo 99% fu fornito da Sigma-Aldrich (Italia) e 2,4,6-triclorofenolo 97% da Fluka (Svizzera).

Furono usati anche solfato sodio anidro (Carlo Erba Reagenti, Italia) e filtri di carta (Schleicher & Schuell, Germania).

Malt Extract Agar (MEA) fu fornito da Oxoid (U.K.) per il mantenimento e l'accrescimento dei microorganismi.

Il sughero grezzo fu analizzato e risultò non contaminato da TCP e TCA, poi fu polverizzato con un mulino (Model 4, Thomas-Wiley, U.S.A.) dopo averlo congelato sotto azoto liquido; fu utilizzata solo la frazione con un diametro ≤ 1 mm.

- **Microorganismi**

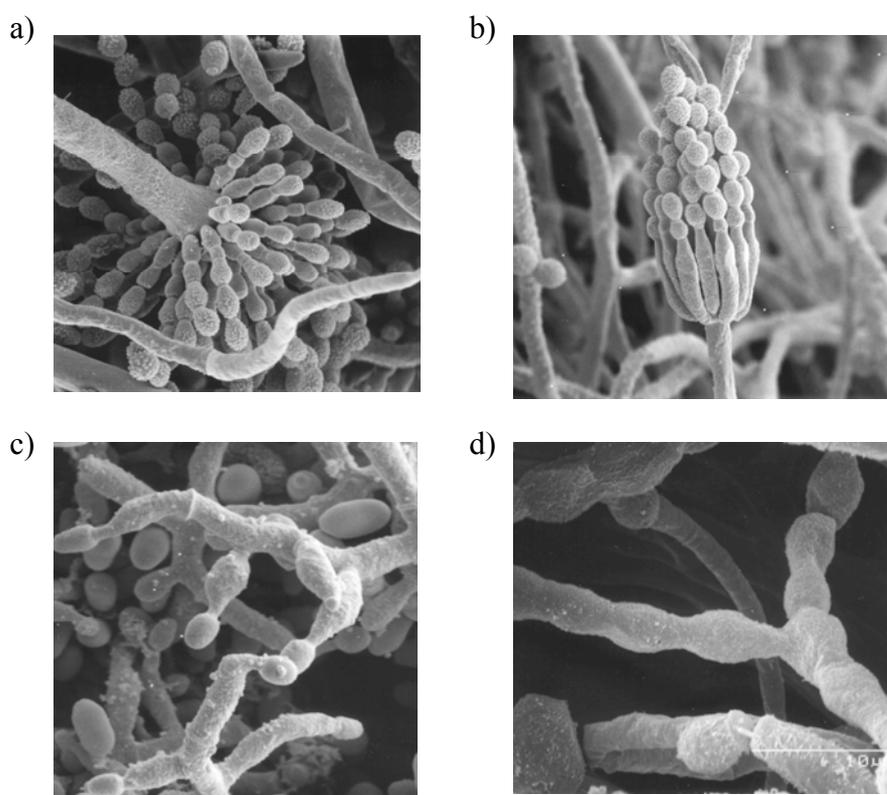
I microorganismi furono isolati da sughero grezzo e i generi furono assegnati morfologicamente, come riportato in un precedente lavoro (Caldentey et al., 1998). I funghi furono conservati in frigorifero alla temperatura di 4 °C.

I microrganismi considerati appartenevano ai seguenti generi: *Penicillium spp.* (3 ceppi), *Aspergillus spp.* (2 ceppi), *Trichoderma spp.* e *Chrysonilia spp.* (1 ceppo).

Inoltre è stata presa in considerazione la *Botrytis cinerea*, isolata da uve, per valutare il comportamento in caso di contaminazione visto che questo ceppo fungino si può trovare facilmente sulle uve e in ambiente di cantina.

La purezza di ciascun ceppo fu osservata al microscopio elettronico a scansione effettuando un controllo morfologico della struttura riproduttiva (Philips XL-30 ESEM). Le foto di alcuni ceppi fungini utilizzati sono mostrate in Figura 12.

Figura 12 – Micrografie ottenute dall’analisi SEM per alcuni dei ceppi utilizzati durante lo studio: a) Aspergillus ; b) Penicillium ; c) Trichoderma; d) Chrysonilia.

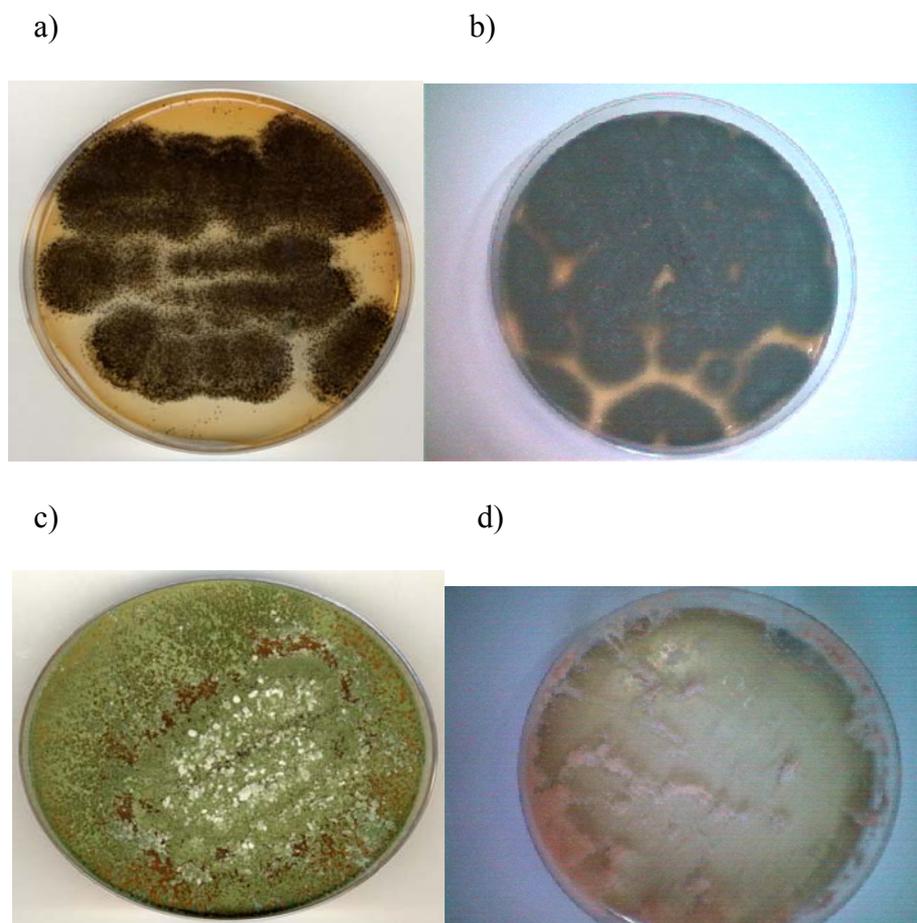


- ***Biosintesi del 2,4,6-tricloroanisolo da 2,4,6-triclorofenolo per accrescimento fungino su mezzo sintetico (MEA)***

Le spore di ciascun ceppo fungino furono inoculate in un becker contenente 100 ml di MEA e TCP alla concentrazione di 1 mg/l. I becker furono incubati staticamente per 20 giorni a 25 °C. Furono effettuati due esperimenti indipendenti

per ciascun microorganismo. Furono eseguite anche le prove in bianco, come descritto sopra, con MEA, con MEA senza aggiungere TCP e con inoculo di microorganismi, e con MEA addizionata di TCP ma senza inoculare alcun ceppo fungino. In Figura 13 sono riportate le foto relative all'accrescimento su mezzo sintetico di alcuni ceppi utilizzati per le prove.

Figura 13 - Foto relative all'accrescimento su mezzo sintetico di alcuni ceppi utilizzati durante lo studio: a) Aspergillus ; b) Penicillium ; c) Trichoderma; d) Chrysonilia.



- *Biosintesi del 2,4,6-tricloroanisolo da 2,4,6-triclorofenolo per accrescimento fungino su sughero*

20 g di polvere di sughero furono posti in un becker contenenti 20 ml di acqua distillata e 20 µg di TCP e inoculati separatamente con il ceppo fungino (Figura 14). I becker furono incubati staticamente per 110 giorni a 25 °C. Furono eseguite anche le prove in bianco, con polvere di sughero e acqua, con polvere di sughero e acqua senza aggiungere TCP e con inoculo di microorganismi, e con polvere di sughero e acqua addizionata di TCP ma senza inoculare alcun ceppo fungino.

Figura 14 - Foto relativa all'accrescimento su polvere di sughero di un ceppo di Trichoderma.



- ***Procedura di estrazione***

Ciascun becker fu estratto con 200 ml di etanolo assoluto per 48 ore a 25 °C; poi la soluzione alcolica fu filtrata su filtro di carta e addizionata con 100 ml di acqua distillata (soluzione idroalcolica 1). Successivamente fu eseguita una seconda estrazione degli stessi becker, con 100 ml di etanolo assoluto per 48 ore a 25 °C e la soluzione alcolica fu filtrata e addizionata con 50 ml di acqua distillata (soluzione idroalcolica 2). Le due soluzioni idroalcoliche risultanti (1 e 2) furono estratte separatamente per due volte con 20 ml di n-esano. Ciascuna

frazione esanica fu analizzata separatamente, come descritto di seguito, mediante analisi gas cromatografica.

- ***Analisi di TCA e TCP***

Gli estratti esanici furono analizzati con un gas cromatografico GC 1000 (DANI Instruments S.p.A., Italia) equipaggiato con un rivelatore a cattura di elettroni (ECD) fornito da DANI Instruments S.p.A. (Italia). Il campione è stato iniettato in modalità splitless (0.5 μ l) in una colonna capillare EC-5 (30 m x 0.25 mm i.d.; 0.25 μ m spessore film; Alltech, Italia). Le condizioni operative erano le seguenti: temperatura dell'iniettore 200 °C, temperatura del rivelatore 300 °C, flusso carrier gas N₂ 1.0 ml/min, flusso gas ausiliario N₂ 30 ml/min. La programmata di temperature del forno era: 5 min a 60 °C, 5 °C/min fino a 200 °C e poi 30 °C/min fino a 280 °C ed infine 5 min a 280 °C. I dati cromatografici furono analizzati mediante il programma Clarity software di DANI Instruments S.p.A. L'identificazione e la quantificazione del TCP e del TCA estratti fu effettuata mediante le rette di calibrazione costruite con il metodo dello standard esterno e comparando il tempo di ritenzione con quello di uno standard commerciale. Per ciascun punto della retta di calibrazione, furono analizzati cinque replicati.

Il recupero globale del TCP, calcolato su tre replicati sia per il mezzo sintetico sia per il sughero, fu rispettivamente del 72 % (RSD 4 %) e del 61 % (RSD 4%) considerando sia la fase di estrazione sia il metodo di analisi.

Per conferma, gli estratti esanici provenienti dall'accrescimento su sughero furono analizzati anche con un sistema di desorbimento termico (STD) e analisi GC/MS

presso l'E.T.S.I.Agrónomos (Università di Castilla-La Mancha, Albacete, Spagna). Un'aliquota degli estratti esanici (10 µl) fu iniettata in un tubo di acciaio inox per il desorbimento termico, contenente lana di vetro precedentemente condizionata alla temperatura di 300 °C per un minuto sotto flusso di azoto (100 ml/min). Fu utilizzato un desorbitore termico Perkin-Elmer ATD 400 (Norwalk, CT, U.S.A.) combinato con un gas cromatografo Hewlett-Packard 6890 accoppiato con uno spettrometro di massa Hewlett-Packard LC 3D mass detector (Palo Alto, CA, U.S.A.) con una colonna capillare BP21 (50 m x 0.22 mm i.d., 0.25 µm spessore film; SGE, Ringwood, Australia). Le condizioni di desorbimento termico impiegate erano le seguenti: temperatura trappola 330 °C; tempo di desorbimento, 4 min; temperatura raffreddamento trappola, -30 °C; flusso elio 45 ml/min. La programmata di temperature del forno era: 5 min a 50 °C, 2.5 °C/min fino a 180 °C (2 min) e poi 5 °C/min fino a 230 °C ed infine 20 min a 230 °C. Per l'analisi con lo spettrometro di massa, fu usata la modalità impatto elettronico (EI) a 70 eV. L'intervallo delle masse variava da 35 a 500 u e la temperatura del detector era di 150 °C. L'identificazione fu effettuata mediante la libreria NIST e la quantificazione fu basata sulle curve di calibrazione dei rispettivi standard in esano. Inoltre per le analisi con lo spettrometro di massa fu utilizzata la modalità SIM (Selective Ion Monitoring) ed i seguenti ioni: 2,4,6-tricloroanisolo, m/z 195, 197, 210, 212; e 2,4,6-triclorofenolo, m/z 132, 160, 196 (Zalacain et al., 2004).

Risultati e discussione

I dati riportati in Tabella 16 mostrano l'abilità dei microorganismi testati a trasformare il TCP su mezzo sintetico (MEA) determinata mediante GC/ECD, e su sughero ottenuta con GC/ECD e STD-GC/MS.

Tutti i ceppi hanno la capacità di degradare il TCP sia su mezzo sintetico sia su sughero. Nel mezzo sintetico i tre ceppi di *Penicillium* isolata e *Botrytis cinerea* sono risultati i più attivi; *Aspergillus* isolata mostrano una capacità degradativa media; *Chrysonilia spp.* e *Trichoderma spp.* sono stati i meno attivi.

Tabella 16 – Percentuale di TCP degradato dall'accrescimento fungino su mezzo sintetico (MEA) e su sughero.

	% TCP trasformato		
	MEA	Sughero	
Ceppo fungino	GC/ECD	GC/ECD	STD-GC/MS
<i>Penicillium spp. 1</i>	60.3±0.7	98.7±0.8	93.2±1.3
<i>Penicillium spp. 2</i>	68.2±0.7	62.2±1.3	65.1±1.6
<i>Penicillium spp. 3</i>	76.8±1.1	46.9±2.4	49.7±1.8
<i>Aspergillus spp. 1</i>	45.1±1.6	80.1±1.1	85.1±1.0
<i>Aspergillus spp. 2</i>	55.5±1.3	78.5±1.6	75.8±1.4
<i>Trichoderma</i>	35.6±1.7	87.0±1.3	88.7±1.3
<i>Chrysonilia</i>	35.4±1.8	95.7±1.0	92.9±1.1
<i>Botrytis cinerea</i>	65.9±1.1	71.6±1.6	74.3±1.4

I valori sono la media di due esperimenti indipendenti effettuati per ciascun ceppo fungino. Nel sughero tutti i funghi hanno mostrato una maggiore abilità di degradazione del TCP rispetto al mezzo sintetico, ad eccezione di 2 ceppi di *Penicillium spp.* che presentano uguale (*Penicillium spp. 2*) o minore (*Penicillium spp. 3*) capacità di consumare TCP. *Botrytis cinerea* e *Penicillium spp. 2* degradano quantità simili di TCP nei due terreni di coltura.

Confrontando il comportamento dei microorganismi testati su mezzo sintetico con quelli appartenenti alla stessa specie usati da Silva Pereira et al. (2000a), i ceppi di

Penicillium spp. che abbiamo impiegato mostrano una capacità più omogenea di consumare alti livelli di TCP, mentre la nostra *Chrysonilia* presenta una minore abilità nel degradare il TCP.

Confrontando i risultati ottenuti dall'accrescimento su sughero dei ceppi fungini con i due differenti metodi di analisi, si hanno dati congruenti che mostrano lo stesso andamento.

In Tabella 17 è riportata l'abilità a produrre TCA per i microorganismi testati in mezzo sintetico (MEA) determinata mediante GC/ECD, e su sughero ottenuta con i metodi GC/ECD e STD-GC/MS.

La capacità di formare TCA varia tra i ceppi utilizzati: *Chrysonilia* non è capace di produrre TCA, né in mezzo sintetico né sul sughero, come già dimostrato da altri lavori (Silva Pereira et al., 2000a).

Un basso livello di TCA fu ottenuto da tutti i tre ceppi di *Penicillium spp.*, ma *Penicillium spp.1* e *Penicillium spp. 2* sono risultati più attivi su MEA mentre *Penicillium spp. 3* mostra un comportamento opposto. Per questi funghi la metilazione del TCP non è il principale processo di detossificazione. *Aspergillus spp. 1*, *Trichoderma spp.* e *Botrytis cinerea* hanno mostrato la maggiore abilità nel produrre TCA su MEA, ma presentano un comportamento differente su sughero: *Botrytis cinerea* produce gli stessi livelli di TCA nei due mezzi, *Aspergillus spp. 1* è risultato meno attivo su sughero, e *Trichoderma spp.* mostra un comportamento molto differente con livelli bassi di TCA formato su sughero rispetto a quello prodotto su mezzo sintetico.

Tabella 17 – Percentuale di TCA formato dall'accrescimento fungino su mezzo sintetico (MEA) e su sughero.

	% TCA		
	MEA	Sughero	
Ceppo fungino	GC/ECD	GC/ECD	STD-GC/MS
<i>Penicillium spp. 1</i>	5.4±1.1	1.2±0.7	1.3±0.6
<i>Penicillium spp. 2</i>	7.2±1.0	1.1±0.4	1.9±0.7
<i>Penicillium spp. 3</i>	1.3±0.6	7.5±1.4	5.8±1.1
<i>Aspergillus spp. 1</i>	16.5±1.7	10.4±1.0	9.1±1.3
<i>Aspergillus spp. 2</i>	10.6±1.8	10.3±1.1	11.4±1.0
<i>Trichoderma</i>	18.8±1.3	1.2±0.6	1.1±0.3
<i>Chrysonilia</i>	0.0±0.0	0.1±0.0	0.2±0.1
<i>Botrytis cinerea</i>	19.0±1.3	16.3±1.1	15.5±0.8

I valori sono la media di due esperimenti indipendenti effettuati per ciascun ceppo fungino.

Aspergillus spp. 2 è risultato meno attivo su MEA rispetto all'*Aspergillus spp. 1*, ma sul sughero i due ceppi di *Aspergillus spp.* producono gli stessi livelli di TCA. Anche per quanto riguarda il TCA formato dall'accrescimento dei microorganismi sul sughero, i risultati ottenuti con i due metodi di analisi mostrano un andamento analogo.

Come proposto da Tindale et al. (1989) nel caso dei funghi coltivati su mezzo sintetico, i nostri ceppi possono essere classificati secondo la loro abilità di metilare TCP, formando TCA (Tabella 18).

Tabella 18 – I microorganismi testati sono stati classificati in funzione della loro abilità di metilazione sia in mezzo sintetico (MEA) sia su sughero.

Ceppo fungino	Metilazione su MEA	Metilazione su sughero
<i>Penicillium spp. 1</i>	debole	Debole
<i>Penicillium spp. 2</i>	debole	Debole
<i>Penicillium spp. 3</i>	debole	Debole

<i>Aspergillus spp. 1</i>	moderato	moderato
<i>Aspergillus spp. 2</i>	moderato	moderato
<i>Trichoderma spp.</i>	moderato	debole
<i>Chrysonilia spp.</i>	debole	debole
<i>Botrytis cinerea</i>	moderato	moderato

Debole: TCA prodotto <10 %; moderato: TCA prodotto tra 10 e 45%; forte: TCA prodotto >45%.

La capacità di metilare trovata per i ceppi fungini da noi testati in entrambi i mezzi di accrescimento si è risultata uguale, ad eccezione del caso del *Trichoderma spp.* che è risultato più attivo su MEA.

In accordo con la classificazione riportata da Tindale et al. (1989) e quanto riferito nel lavoro di Silva Pereira et al. (2000a), *Penicillium spp.* e *Chrysonilia spp.* hanno confermato una debole abilità di metilare.

Conclusioni

Si può osservare che i microorganismi isolati dal sughero mostrano una diversa capacità di biodegradare TCP, e nella maggior parte dei casi solo una piccola percentuale di TCP è trasformata in TCA. I risultati suggeriscono che una crescita controllata dei ceppi fungini sul sughero può influenzare la formazione di TCA, il composto che più spesso viene associato con il gusto di tappo nel vino.

I nostri risultati confermano quanto già proposto da altri ricercatori che hanno ipotizzato l'utilizzo, durante le varie fasi di lavorazione del sughero, di ceppi fungini dotati di una elevata abilità di degradare TCP ed incapaci di sintetizzare TCA (Silva Pereira et al., 2000a; Grossman, 1993).

Il presente studio mette in evidenza un importante risultato, prima d'ora non segnalato in letteratura e cioè la “moderata” capacità di metilare della *Botrytis*

cinerea. Dal momento che questo microorganismo è facilmente riscontrabile negli ambienti di cantina e sulle uve, la sua capacità di produrre TCA in presenza di TCP potrebbe in parte spiegare la presenza del “gusto di tappo” segnalata anche in vini non ancora imbottigliati (Sefton et al., 2005; Chatonnet et al., 1994).

Il lavoro è in fase di revisione sulla rivista *Journal of Agriculture and Food Chemistry*.