



UNIVERSITÀ CATTOLICA DEL SACRO CUORE
MILANO

Dottorato di ricerca in
BIOTECNOLOGIA DEGLI ALIMENTI

ciclo XIX
S.S.D: AGR/15-ING-IND/25

**STUDIO DELLA PRESENZA DI
POLICLOROFENOLI E POLICLOROANISOLI
NEL SUGHERO PER USO ENOLOGICO**

Tesi di Dottorato di Luana Maggi

Matricola: 3280007

Anno Accademico 2005/2006





**UNIVERSITÀ CATTOLICA DEL SACRO CUORE
MILANO**

Dottorato di ricerca in
BIOTECNOLOGIA DEGLI ALIMENTI

Ciclo XIX
S.S.D: AGR/15-ING-IND/25

**STUDIO DELLA PRESENZA DI
POLICLOROFENOLI E POLICLOROANISOLI
NEL SUGHERO PER USO ENOLOGICO**

Coordinatore: Ch.mo Prof. D. Marco De Faveri

Tesi di Dottorato di Luana Maggi

Matricola: 3280007

Anno Accademico 2005/2006

RINGRAZIAMENTI

Ringrazio di cuore tutte le persone che mi hanno aiutato ed hanno contribuito alla realizzazione di questa tesi.

Desidero esprimere la mia gratitudine all'Istituto di Enologia e Ingegneria agro-alimentare, in particolare al Prof. D. Marco De Faveri, coordinatore del Corso di dottorato, e alla Prof. Valeria Mazzoleni, che mi hanno permesso di portare a termine questi tre anni di dottorato.

Ringrazio inoltre l'azienda DANI Instruments S.p.A. per la collaborazione ed il supporto strumentale e tecnico.

Desidero ringraziare la Prof. M^a Rosario Salinas e tutto il gruppo della Cátedra de Química Agrícola de la Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos di Albacete (Universidad de Castilla-La Mancha) per avermi messo a disposizione i mezzi necessari per terminare la tesi di dottorato ed avermi fatto sentire come a casa. Un grazie particolare ad Ana e ad Antonio.

INDICE

1. INTRODUZIONE	1
1.1. Cenni storici sul sughero	1
1.2. Processo di elaborazione del sughero	3
1.3. Il sughero e il vino	13
1.3.1. Interazione chimiche tra sughero e vino - Il gusto di tappo	14
1.3.2. Policloroanisoli e policlorofenoli nel sughero	20
1.4. La determinazione di policloroanisoli e policlorofenoli nel sughero - Test analitici e sensoriali	24
1.5. Caratteristiche di TCA e TCP	28
1.5.1. 2,4,6-Tricloroanisolo	28
1.5.2. 2,4,6-Triclorofenolo	30
1.6. Aspetti microbiologici del sughero	31
2. OBIETTIVI	37
3. PARTE SPERIMENTALE	40
3.1. Valutazione dell'impatto sensoriale del TCA in differenti tipologie di vini	40
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	56
3.3. Confronto tra SBSE e SPME 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)	65
3.4. Caratterizzazione di microrganismi naturalmente presenti nel sughero in base alle loro capacità di degradare TCP e formare TCA	77
4. CONCLUSIONI GENERALI	89
5. BIBLIOGRAFIA	92

1. INTRODUZIONE

1.1. Cenni storici sul sughero

Gli alberi di sughero hanno costituito senza dubbio buona parte delle foreste in parecchie zone del mondo per molte migliaia di anni. Grazie ad alcune proprietà peculiari del sughero, per secoli questo materiale ha avuto varie applicazioni: gli antichi Greci e Romani avevano notato che il sughero galleggiava così lo utilizzarono per costruire imbarcazioni, galleggianti e boe per le reti da pesca.

Il sughero veniva usato anche come suola per i sandali, le scarpe invernali erano interamente fabbricate con questo materiale per la sua caratteristica di isolante termico (Maga et al., 2005; Magalit, 1997).

Anche l'utilizzo del sughero per la chiusura dei recipienti vinari risulta essere molto antico: il più lontano reperto è rappresentato da un'anfora chiusa con sughero scoperta in Atene e risalente al V secolo a.C. Esistono inoltre notizie del suo impiego da parte dei Greci e dei Romani che lo usavano per la tappatura delle anfore durante il trasporto di vino e di olio.

A partire dal III secolo d.C., le anfore furono sostituite con recipienti fatti in legno e questo fece sì che il sughero fosse dimenticato fino alla seconda metà del XVII secolo quando cominciò ad essere utilizzato nel distretto di Reims (Francia), pare a seguito dell'invenzione dello Champagne da parte del monaco benedettino Dom Pèrignon. Si racconta che il monaco ebbe l'idea di sostituire i vecchi pezzi di legno avvolti di

canapa oliata osservando i pellegrini spagnoli che visitavano l'Abbazia D'Hautvillers: essi infatti usavano il sughero per chiudere le loro borracce.

Il sughero come materiale di chiusura venne reintrodotta dopo la nascita della bottiglia da vino moderna risalente all'inizio del XVII secolo (con l'invenzione da parte dell'inglese Sir Kenelm Digby, nel 1630), mentre la prima fabbrica di tappi in sughero fu fondata nel 1750, presso il confine franco-spagnolo.

Il ricorso alle bottiglie di vetro e al sughero ha consentito una chiusura ermeticamente sicura ed ha rappresentato una vera e propria rivoluzione in campo enologico: infatti bottiglie e tappi hanno permesso di allungare la vita del vino, che fino ad allora era una merce deperibile e che obbligava i commercianti a liberarsene il più presto possibile.

A partire da allora il sughero è stato utilizzato in maniera continua ed industrializzata per la chiusura dei vini e di altre bevande alcoliche e non, grazie alle sue straordinarie caratteristiche quali la bassa densità, la flessibilità, l'impermeabilità e la durata nel tempo.

Attualmente l'industria europea del sughero produce 340000 tonnellate di sughero ogni anno, per un valore di due milioni e mezzo di euro, dando lavoro a 30000 persone. I tappi di sughero per uso enologico rappresentano solo il 15 % dell'utilizzo del sughero in peso, ma ben il 70 % del business (<http://blauweiderich.de.xanax-order.be>).

1.2. Processo di elaborazione del sughero

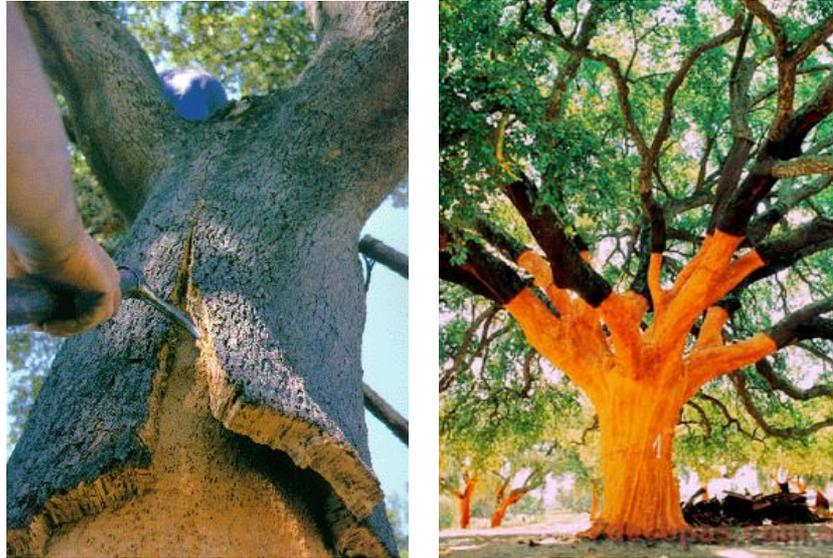
Il sughero utilizzato per la fabbricazione dei tappi è il tessuto esterno della quercia da sughero (*Quercus Suber L.*), che protegge i tessuti vivi contro il disseccamento e le condizioni ambientali dannose pur non intervenendo nelle funzioni attive di vegetazione.

Le caratteristiche chimico-fisiche e strutturali del sughero sono molto variabili e possono essere modificate durante il processo di trasformazione in seguito all'applicazione di differenti tecnologie ed attrezzature. Già in origine la natura del sughero viene determinata dalla regione di produzione, ma anche dalla foresta e dall'albero dal quale proviene (Caldentey, 1994).

La prima decortica della pianta si fa a 18-25 anni e si ottiene il cosiddetto “sughero maschio”, un materiale molto grossolano; dopo di che la quercia inizierà a produrre un nuovo strato di sughero sulla superficie rimasta scoperta. Viene così prodotta una nuova corteccia con caratteristiche più adatte alla fabbricazione dei tappi di sughero, che viene chiamata “sughero femmina” e si ottiene con una frequenza di 9-10 anni. I turni di decortica sono funzione fondamentale del calibro raggiunto dalla massa sugherosa, costituita da una serie di strati o anelli di accrescimento di diverso spessore (Colagrande, 1996).

In Figura 1 sono mostrate alcune immagini relative alla fase di decortica.

Figura 1 – Fase di decortica.



Il sughero appena raccolto possiede un'umidità naturale piuttosto elevata che varia da un minimo del 10-12 % ad un massimo del 40-45 %; questa umidità è contenuta quasi interamente nell'ultimo anello suberoso.

Dopo la raccolta il sughero viene sottoposto ad un periodo di stagionatura all'aria della durata di 6-24 mesi (Figura 2); con l'esposizione all'aria il sughero si essicca, fino ad equilibrarsi con l'umidità dell'ambiente intorno a valori variabili tra l'8 e il 10 %. Durante questa fase, per fenomeni di contrazione ed espansione, perde gran parte della polvere rossa contenuta nelle lenticelle, migliorando le caratteristiche tecnologiche ed in particolare la morbidezza e l'elasticità.

Figura 2 – Fase di stagionatura.



Segue la fase di bollitura (Figura 3), che dura circa un'ora e mezza, con lo scopo di ridurre la flora microbica, estrarre le sostanze idrosolubili (tannini, sali minerali) e migliorare le caratteristiche fisiche (Rosa et al., 1990).

Figura 3 – Fase di bollitura.



Dopo la bollitura, alcune industrie sugheriere hanno introdotto un processo di disinfezione ed estrazione di composti volatili associabili al “gusto di tappo” (vedere capitolo 1.3.1). Il processo consiste nell’autoclavaggio delle plance per 18-20 minuti, a 130 °C ed alla pressione di 180 kPa. Nel primo autoclavaggio si estrae il 46.4 % dei composti volatili; nel secondo autoclavaggio l’efficienza cresce ma aumenta anche la formazione di composti indesiderati: furani, benzaldeide e alcool benzilico (prodotti della degradazione della lignina), 1-ottanolo (probabilmente formato alla degradazione termica di alcuni acidi grassi). Poichè il trattamento termico prolungato può causare modificazioni chimiche al polimero suberoso, viene consigliato un solo autoclavaggio (Rocha et al., 1996).

Le plance di sughero vengono poi suddivise nelle diverse categorie di qualità e conservate in ambiente aerato e asciutto. Non esistono norme precise per cui la classificazione viene effettuata in maniera diversa, puramente soggettiva nei vari paesi produttori e gli scambi commerciali avvengono sulla base di campioni di materia prima. La qualità più apprezzata e ricercata è quella densa, liscia, omogenea, senza nodi, senza ineguaglianze, senza fori né crepe (Colagrande, 1996).

In Tabella 1 sono schematizzate le fasi di lavorazione della plancia grezza.

Tra i trattamenti elencati, la bollitura è particolarmente importante ai fini del comportamento fisico del tappo, in quanto provoca l’espansione della cellula suberosa soprattutto nella direzione radiale, poichè diminuisce l’ampiezza della corrugazione delle pareti cellulari laterali. Esse infatti, imbibendosi di acqua calda, si

ammorbidiscono e, sotto la pressione delle cellule contigue, si distendono perdendo in parte le ondulazioni che le caratterizzano prima della bollitura (Rosa et al., 1990).

Tabella 1 – Fasi di lavorazione della plancia grezza.

PLANCIA GREZZA		
Fase di lavorazione	Accorgimenti pratici	Effetti del cattivo trattamento
SUGHERO SULLA PIANTA	Evitare trattamenti delle foreste con prodotti fitosanitari contenenti clorofenoli.	Formazione di composti clorurati (gusto di tappo).
DECORTICA DELLA PIANTA (ogni 9-10 anni)	Selezione delle plance scartando quelle difettose (attaccate da <i>Armillaria mellea</i> , verdonate o perforate da formiche o altri insetti).	Gusto di tappo. Scarsa tenuta del tappo (colosità) con conseguente ossidazione del vino.
STAGIONATURA (6-24 mesi all'aria aperta)	Evitare il contatto con il terreno; sufficiente areazione.	Possibile sviluppo di microrganismi.
1° BOLLITURA (in acqua per 1-1.5 ore)	Controllo della purezza dell'acqua di bollitura (residuo tannico, ecc.). Ricambio frequente dell'acqua.	Cessione di sostanze tanniche al vino (gusto di sughero).
IMMAGAZZINAMENTO (non più di 2-3 settimane)	In ambiente ad umidità ed aerazione controllate per evitare che le muffe sviluppate sulla superficie penetrino all'interno del tessuto suberoso.	Gusto di muffa.

Dopo questo processo le plance perdono la forma ricurva originaria che presentavano sull'albero.

Nella fase di immagazzinamento, è stato anche proposto di inoculare le plance di sughero con i ceppi antagonisti della microflora responsabile delle anomalie gusto-olfattive (Hoffmann et al., 1997).

In Figura 4 sono mostrate alcune immagini relative alle fasi di produzione del tappo.

Figura 4 – Fasi di produzione del tappo.



In Tabella 2 sono schematizzate relative le principali fasi di produzione del tappo.

Il lavaggio è un'altra fase critica del processo di trasformazione e deve essere efficace tanto in superficie quanto all'interno delle lenticelle ma deve rispettare l'integrità naturale del sughero. I lavaggi troppo aggressivi distruggono la tessitura superficiale ed esercitano un'azione traumatizzante nell'interno della massa suberosa, alterando le qualità naturali ed intrinseche del sughero quali la comprimibilità, l'aderenza e l'elasticità (Colagrande, 1996).

Tabella 2 – Fasi di produzione del tappo.

PRODUZIONE DEL TAPPO		
Fase di lavorazione	Accorgimenti pratici	Effetti del cattivo trattamento
2° BOLLITURA	(vedere 1° bollitura-Tabella 1)	(vedere 1° bollitura-Tabella 1)
TIRATURA IN BANDE E FUSTELLATURA	Il diametro dei turaccioli deve essere simile allo spessore delle plance.	Scarsa tenuta.
LAVAGGIO	Effettuare un ultimo lavaggio con acqua per evitare la presenza di residui di lavaggio nei tappi.	Formazione di cloroanisoli (gusto di tappo). Ossidazione dei vini.
ESSICAZIONE	Tenore di umidità finale del 3-6 %	Possibile sviluppo di microrganismi
CLASSIFICAZIONE (in classi di qualità decrescente)	Tenere conto del numero e diametro delle lenticelle, delle parti legnose, della polvere rossa in eccesso, dei sugheri verdonati, delle macchie sospette.	Problemi: - colatura; - ossidazione; - cessione.

Fino agli anni '80 i tappi erano lavati e disinfettati con soluzioni contenenti prodotti ossidanti a base di cloro (generalmente ipocloriti). È in quegli anni che diversi ricercatori hanno messo in evidenza la presenza nei tappi di molecole aromatiche contenenti cloro derivanti dalla reazione del cloro con i composti fenolici del sughero: i composti clorurati ceduti al vino conferiscono odori e sapori anomali (Tanner et al., 1981).

L'uso di perossidi (acqua ossigenata, acido peracetico, perossido di sodio, ecc.) per il lavaggio è di grande efficacia disinfettante (Puerto, 1992); questo tipo di trattamento ha però bisogno di un accurato controllo per evitare la possibile presenza di residui di perossidi nei tappi (Michellod, 1993).

L'azione disinfettante può anche essere ottenuta mediante il trattamento con calore secco a 115 °C per un'ora, che permette di eliminare completamente la microflora nei tappi senza danneggiare la struttura del sughero (Fumi et al., 1988); infatti le alterazioni strutturali e compositive si verificano solo quando il sughero è trattato a temperature di 150-200 °C per lungo tempo (Rosa et al., 1994; Pereira, 1992). Infine l'essiccazione a temperatura relativamente bassa (80 °C), e per un tempo sufficientemente lungo, consente di estrarre anche l'umidità contenuta all'interno del tappo, portando il tenore di umidità ad una percentuale inferiore al 6-7 %: oltre questo valore si potrebbero sviluppare le muffe.

Infine i tappi vengono sottoposti ad una serie di trattamenti finali (Tabella 3), tra cui la lubrificazione che permette l'estrazione del tappo dal collo della bottiglia e migliora l'impermeabilità del sughero. Il trattamento deve essere scelto in funzione del tipo di vino da imbottigliare, del tempo di conservazione del vino in bottiglia e della zona geografica di destinazione. I prodotti utilizzati devono essere chimicamente inerti, inodori, non tossici e rispettare le normative di legge stabilite per i materiali in contatto con gli alimenti. Esistono numerosi prodotti usati per questa operazione: paraffine, silicone, emulsioni polimeriche, cere naturali, ecc. L'impiego di paraffine rende il tappo più ermetico ed impermeabile, anche se esiste la possibilità della incollatura del tappo al collo della bottiglia, difetto che si può evitare con l'uso di paraffine ad alto punto di fusione. Il trattamento più diffuso è con lubrificanti di natura siliconica, il cui utilizzo non presenta inconvenienti e consente di stappare la bottiglia agevolmente (Lefebvre, 1988).

Tabella 3 – Fasi relative ai trattamenti finali sul tappo.

TRATTAMENTI FINALI SUL TAPPO		
Fase di lavorazione	Accorgimenti pratici	Effetti del cattivo trattamento
LUBRIFICAZIONE E TIMBRATURA	Trattamenti superficiali con prodotti di qualità garantita che mantengono le loro proprietà anche con elevati sbalzi termici.	Scarsa tenuta.
STERILIZZAZIONE (con SO ₂ , raggi γ o β)	Evitare trattamenti eccessivi di sterilizzazione con SO ₂ o con altri prodotti.	Gusti anomali.
IMBALLAGGIO E SPEDIZIONE	Stoccaggio dei tappi in locali adatti (disinfettati, ventilati, con tenore di umidità di 50-60% e temperatura di 15-20 °C). Utilizzare i tappi entro 12 mesi.	Adsorbimento di sostanze volatili dall'ambiente

Tra i possibili trattamenti dei tappi al confezionamento, l'anidride solforosa (Davis et al., 1982) ha un buon effetto fungicida ma non battericida, inoltre può provocare la degradazione della lignina con menomazioni delle caratteristiche strutturali del tappo (Tanner et al., 1980; Castera-Rossignol, 1983).

Un tempo la sterilizzazione dei tappi veniva fatta anche con ossido di etilene (Garcia, 1979) ma oggi questa sostanza pericolosa è vietata dalle leggi comunitarie (Uijl, 1992); l'irradiazione con raggi UV o con raggi γ o β può essere un'alternativa (Heinzel et al., 1984; Borges, 1985; Marais et al., 1975; Mazzoleni et al., 1999a; Mazzoleni et al., 1999b).

Inoltre è opportuno conservare i tappi nelle loro confezioni originarie sigillate per evitare danni da parte di muffe e batteri: l'irraggiamento permette la sterilizzazione

del prodotto già confezionato, evitando il rischio di ricontaminazione durante il confezionamento.

1.3. Il sughero e il vino

La chiusura delle bottiglie con il tappo in sughero ha effetti rilevanti sulle caratteristiche del vino al punto che può potenziare o vanificare le note qualitative che l'enologo ha cercato di esaltare nelle varie fasi della vinificazione. In una bottiglia ben chiusa, si completano i fenomeni di tipo chimico ed enzimatico che coinvolgono diversi gruppi di sostanze già presenti nel mosto o formati nelle fasi di fermentazione e di post-fermentazione e si perfezionano le infinite varietà di sentori che caratterizzano le differenti tipologie di vino. Se il tappo in sughero non chiude perfettamente la bottiglia, si facilita la comparsa di fenomeni indesiderati che provocano un'evoluzione anomala degli aromi del vino.

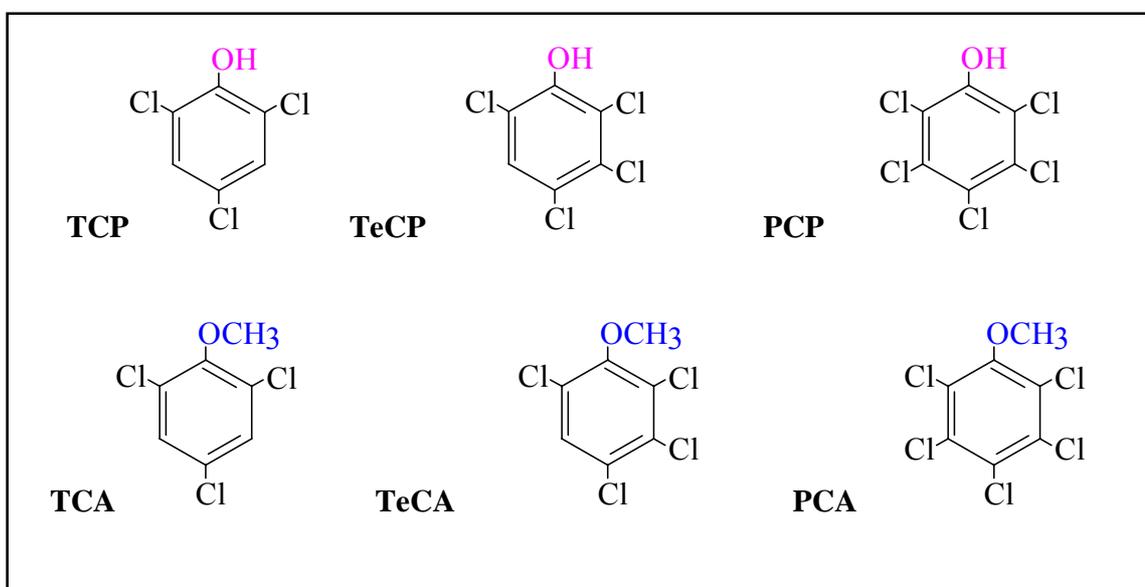
In ogni caso non bisogna sottovalutare l'aspetto psicologico, in base al quale la chiusura con il tappo di sughero oggi è associata alla qualità del vino. Uno studio effettuato dal Natural Cork Quality Council (<http://www.corkqc.com>) mostra che l'84% dei consumatori abituali di vino e degli addetti alla ristorazione, ha privilegiato l'aspetto della tradizionalità associato alla tappatura con il sughero. Questo aspetto risulta essere molto articolato, visto che deriva da un campione di persone comprese tra i 25 ed i 64 anni, e perciò non è riconducibile solamente al binomio "vecchi ricordi-tradizione", ma coinvolge anche un'atmosfera di romanticismo e di gusti sofisticati.

1.3.1. Interazioni chimiche tra sughero e vino – Il gusto di tappo

Le interazioni chimiche che avvengono tra il vino e il tappo di sughero sono normalmente trascurabili, sia per la piccola superficie di contatto sia per la difficoltà di diffusione dei costituenti del vino all'interno del tappo, sia perchè i costituenti maggioritari del sughero non hanno affinità chimica con il vino.

In alcuni casi però tali cessioni possono provocare anomalie gusto-olfattive, la più comune delle quali è stata identificata con il cosiddetto “gusto di tappo” (cork taint): i policlorofenoli e, soprattutto, i policloroanisoli (Figura 5) sono tra le principali sostanze responsabili di questo difetto nel vino (Dubois et al., 1981).

Figura 5 - Formula di struttura dei principali policlorofenoli e policloroanisoli responsabili del gusto di tappo.



TCP: 2,4,6-triclorofenolo; TeCP: 2,3,4,6-tetraclorofenolo; PCP: pentaclorofenolo;
TCA: 2,4,6-tricloroanisolo; TeCA: 2,3,4,6-tetracloroanisolo; PCA: pentacloroanisolo.

In particolare i policloroanisoli presentano una soglia di percezione molto bassa, soprattutto nel caso del 2,4,6-tricloroanisolo (TCA), e possono provocare la comparsa di un forte odore e gusto di muffa nei vini.

I policlorofenoli presentano un odore dello stesso tipo, ma meno intenso. D'altra parte va considerato che questi composti, a differenza dei cloroanisoli, presentano il rischio di tossicità per l'uomo: il 2,4,6-triclorofenolo (TCP) è stato classificato come agente B2 (probabile cancerogeno per l'uomo) (IRIS, 1998) e livelli pari a 5µg/l nell'acqua potabile vengono indicati come ad alto rischio.

Oltre a queste sostanze ne sono state identificate altre che possono contribuire a rendere difettoso il sughero, quali la geosmina, il guaiacolo, 1-otten-3-one, 2-metossi-3,5-dimetilpirazina. Quest'ultimo composto, secondo un recente studio, è considerato la seconda causa del gusto di tappo dalla maggior parte delle aziende vitivinicole australiane (Simpson et al., 2004).

In Tabella 4 sono riportati i principali composti che, secondo la letteratura, sono responsabili di anomalia gusto-olfattive nel sughero e nel vino, con le relative soglie di percezione e di riconoscimento. La soglia di percezione rappresenta il valore minimo di uno stimolo sensoriale in grado di suscitare una sensazione che però non può essere identificata. La soglia di riconoscimento rappresenta il valore minimo di uno stimolo sensoriale che permette di identificare la sensazione percepita.

Tabella 4 - Composti responsabili di anomalie gusto-olfattive e le relative soglie di percezione e di riconoscimento. Le soglie non specificate, nei rispettivi riferimenti bibliografici, sono state indicate come soglia di percezione.

COMPOSTO	Medium	Soglia Percez. (ng/l)	Soglia Riconosc. (ng/l)	Descrittore	Bibl.
Anisolo	acqua	50000		medicinale, fenolico	g
2-clorofenolo	acqua	1			f
2,4-diclorofenolo	acqua	1000			f
2,4-dicloroanisolo	acqua	400		muffa, frutta dolciastra	g
2,6-diclorofenolo	acqua	1000			f
2,6-dicloroanisolo	acqua	40		muffa, medicinale	g
2,3,6-tricloroanisolo	acqua	0.0004		muffa	r
2,4,6-triclorofenolo	vino bianco fermo	43000		chimico, solvente	b
2,4,6-tricloroanisolo	acqua	0.03			g
	acqua minerale	0.8	1	muffa	b
	vino	1.4			c
	vino bianco fermo	1.5	4.2	muffa	b
	vino bianco secco	4			e
	vino bianco	4-10			h
	vino	10			i
	vino rosso	22			o
	brandy	600			p
2,4,6-tribromoanisolo	acqua	0.02		muffa	s
	vino rosso	7.9		muffa	z
	uva sultanina	2 ng/kg			s
2,3,4,6-tetracloroanisolo	acqua	4			g
	acqua	4		muffa	r
	vino	4-11			m
Pentaclorofenolo	acqua	32000			r
	acqua	30000			n
Pentacloroanisolo	acqua	4000			g
	acqua	4000		muffa	r
1-otten-3-one	vino	20		metallico	d
	vino	20			l

Continua nella pagina successiva
 Continuazione – Tabella 4

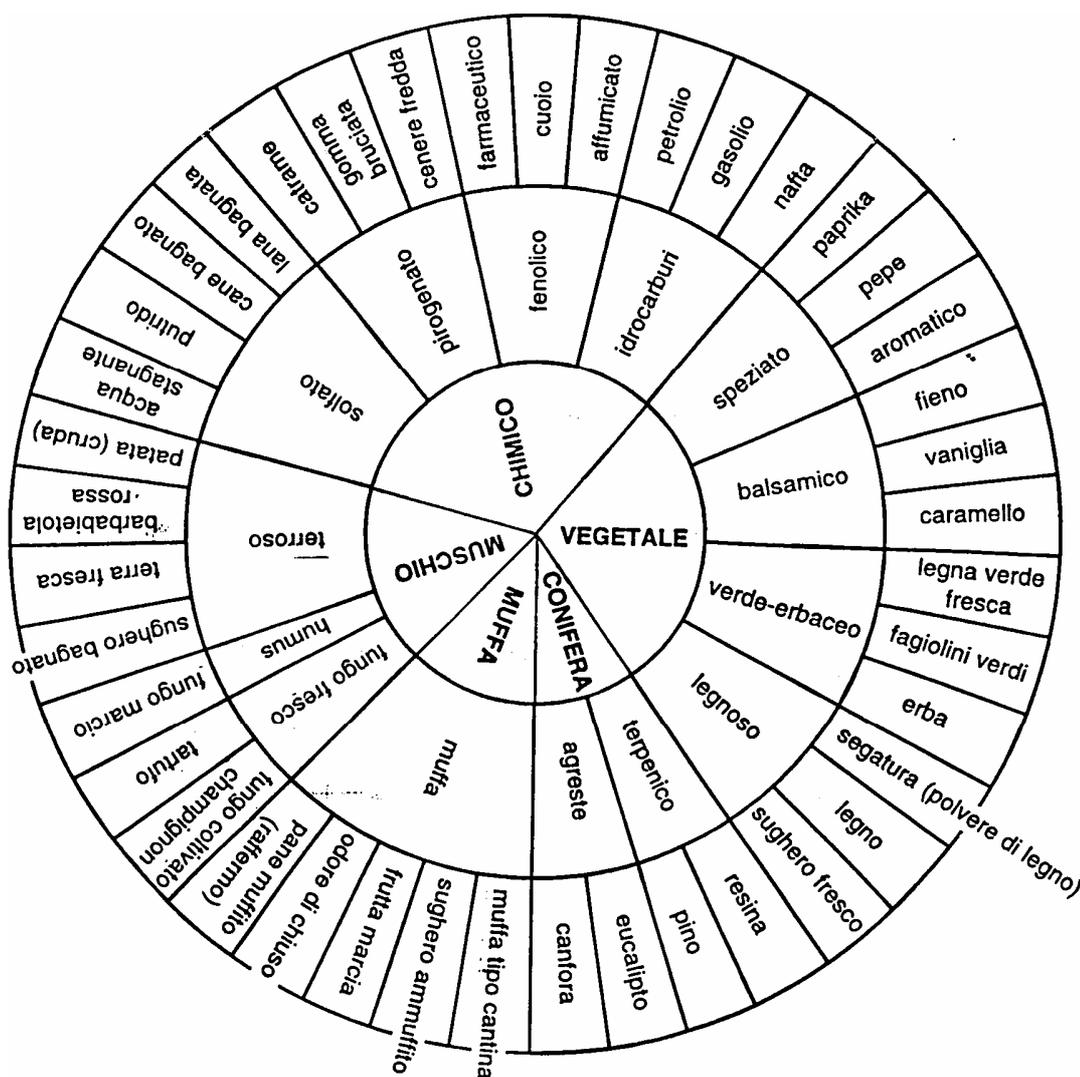
1-otten-3-olo	acqua	1000		fungo	t
	vino	20000		fungo	d
Guaiacolo	vino bianco secco	20000		medicinale, affumicato	a
	vino bianco fermo	15000	200000	eucalipto, affumicato	b
2-metossi-3,5-dimetilpirazina	vino bianco	2,1		fungo, muffa	v
3-metossi-2-isopropilpirazina	vino	0.002		peperone, terra, muffa	u
3-metossi-2-isobutilpirazina	vino	0.002		peperone, terra, patata	u

(a) Simpson et al., 1986; (b) Progetto Quercus, 1996; (c) Simpson, 1990; (d) Amon et al., 1986; (e) Amon et al., 1989; (f) Maarse et al., 1988; (g) Griffith, 1974; (h) Sanvicens et al., 2003; (i) Silva Pereira et al., 2000; (l) Valade et al., 1993; (m) Tanner et al., 1981; (n) Environmental Protection Agency; (o) Alvarez-Rodriguez et al., 2002; (p) Cantagrel et al., 1990; (r) Curtis et al., 1972; (s) Whitfield et al., 1997; (t) Forss, 1972; (u) Colagrande, 1996; (v) Simpson et al., 2004; (z) Chatonnet et al., 2004.

Attualmente il “gusto di tappo” é uno dei problemi piú seri per l’industria del vino e del sughero: ogni anno provoca pesanti perdite economiche e danni all’immagine delle aziende che operano nel settore enologico. Si stima che siano contaminate dall’1 al 5% delle bottiglie in commercio (Sefton et al., 2005).

Per l’importanza economica della filiera del sughero per uso enologico, gli operatori europei dell’industria sugheriera, riuniti nella Confederazione Europea del Sughero (C.E.Liège), in collaborazione con l’Unione Europea, hanno avviato nel 1993 il Progetto Quercus per rafforzare la conoscenza del sughero e dell’interazione sughero/vino (Progetto Quercus, 1996). Una parte considerevole del lavoro ha riguardato la stesura di un elenco di riferimento di descrittori delle anomalie del sughero.

Figura 6 - Ruota dei descrittori responsabili delle anomalie gusto-olfattive del sughero.



Si sono delimitate cinque grandi famiglie di gusti che possono essere legate al tappo: vegetale, conifera, muffa, muschio e chimico. Queste famiglie sono state a loro volta

suddivise in sottofamiglie che permettono di dettagliare le note organolettiche percepite.

I difetti indicati dai consumatori come “gusto di tappo” appartengono soprattutto ai gruppi “muschio/muffa” e, ad un livello inferiore, a quelli “terroso” e “vegetale/legnoso”.

La presentazione sotto forma di ruota (Figura 6) può essere utile ai degustatori per standardizzare l’uso dei descrittori.

1.3.2. Policloroanisoli e policlorofenoli nel sughero

I composti che tradizionalmente sono considerati causa del gusto di tappo sono TCA e 2,3,4,6-tetracloroanisolo (TeCA) e appartengono al gruppo dei policloroanisoli (Buser et al., 1982; Amon et al., 1989; Chatonnet et al., 1994; Silva Pereira et al., 2000b). Queste sostanze si producono con il metabolismo microbico, fondamentalmente di funghi filamentosi, per metilazione dei loro precursori clorofenolici. Il pentaclorofenolo (PCP) in presenza di etanolo e umidità relativa alta si trasforma in pentacloroanisolo (PCA), che con il tempo diventa TeCA e successivamente TCA. Questa trasformazione è essenzialmente un meccanismo di detossificazione con il quale i funghi rimuovono dal loro ambiente i clorofenoli, tossici per la maggior parte di loro (Alvarez-Rodriguez et al., 2002).

I policlorofenoli sono largamente usati nell'ambiente da più di 50 anni e si continuano ad utilizzare nel settore domestico, agricolo e industriale. Essi possono causare contaminazioni accidentali degli alimenti, giacchè i derivati del PCP si impiegano come fungicidi, erbicidi, insetticidi e preservanti del legno (Pollnitz et al., 1996), nonostante l'uso di PCP sia regolato in quasi tutto il mondo, e in alcuni casi proibito, come nel caso dell'Europa (CEE, 1991).

D'altra parte, il sughero naturale contiene come suoi costituenti composti fenolici non clorurati che proteggono l'albero dagli attacchi microbici, e che possono trasformarsi in clorofenoli al contatto con sostanze contenenti cloro, per alogenazione e biometilazione (Maujean et al., 1985; Codina et al., 1993). Per questo motivo, il

sughero può contenere clorofenoli nella parte inferiore dell'albero, dove si concentrano i funghi, o zone attaccate da *Amillaria mellea*.

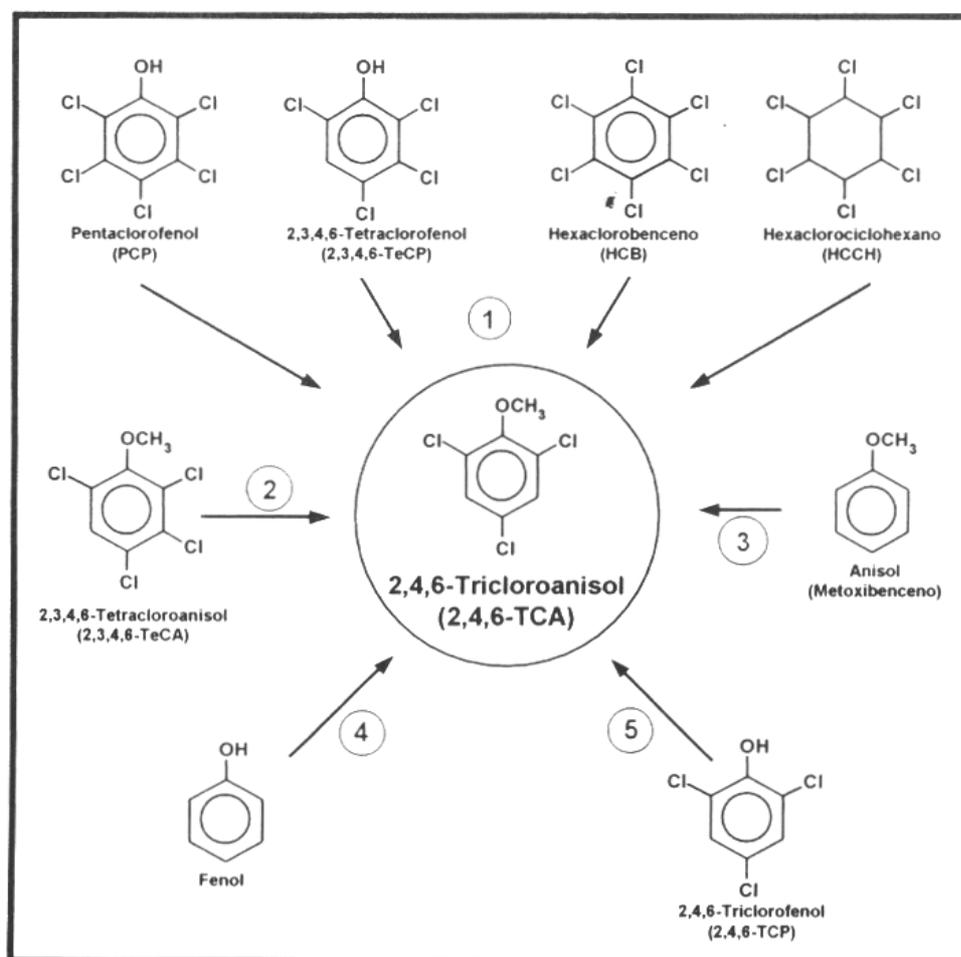
Per quanto detto sopra, il TCA, metabolita fungino con uno sgradevole odore di muffa, può essere presente già nella foresta sul sughero grezzo (*Quercus suber L.*) o può formarsi successivamente in qualunque fase del processo di produzione dei tappi in sughero o durante il trasporto e lo stoccaggio del prodotto finito (Ducan et al., 1997). In Figura 7 sono riportati alcuni dei possibili meccanismi responsabili della formazione di TCA.

E' stato anche dimostrato da alcuni autori (Tanner et al., 1981) che il TCA può formarsi durante il processo di sbianca del sughero con sostanze clorurate.

Per questa ragione, volendo preservare la qualità del sughero, l'uso di cloro durante il processo di lavorazione è stato fortemente scoraggiato dal "Codice Internazionale delle Pratiche per la Produzione dei Tappi di Sughero" messo a punto dalla Confederazione Europea del Sughero (C.E.Liège, 5ª edizione, 2006).

Oltre ad essere presenti nel sughero, i clorofenoli possono anche contaminare l'atmosfera di cantina se sono contenuti in agenti preservanti per il legno, vernici o materiali utilizzati per imballaggi quali pallets, cartoni, film plastici, ecc. In seguito queste sostanze possono passare nei materiali immagazzinati, come coadiuvanti di lavorazione, bottiglie, tappi di sughero, i quali a loro volta entrano in contatto con il vino, causandone così la contaminazione (Barker et al., 2001). Da qui la necessità di controllare l'idoneità dei prodotti impiegati in cantina, oltre alle condizioni igieniche dei locali, in particolare delle zone di immagazzinamento dei materiali enologici.

Figura 7 – Possibili meccanismi di formazione del 2,4,6-TCA: 1) sintesi per catabolismo di composti contenenti cloro (Maarse et al., 1989; Tanner et al., 1981; Neidleman et al., 1986; Nicholson et al., 1992; Mohn et al., 1992); 2) sintesi per dealogenazione di anisoli altamente clorurati (Maarse et al., 1989; Tanner et al., 1981); 3) alogenazione dell'anisolo mediante lavaggio del sughero con ipoclorito (Neidleman et al., 1986; Sponholtz et al., 1994; Maujean et al., 1985); 4) sintesi endogena del nucleo fenolico e successiva alogenazione e biometilazione (Maujean et al., 1985); 5) biometilazione diretta del 2,4,6-TCP (Kun et al., 1989; Silva Pereira et al., 2000a).



(Tratto da: Informe tecnico "Anisoles y Brettanomyces. Causas, efectos y mecanismos de control" Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, 2003)

Recentemente Chatonnet et al. (2004) hanno osservato che il 2,4,6-tribromoanisolo (TBA) può essere responsabile del “gusto di tappo” quando non si determinano quantità sufficienti di cloroanisoli. Come per i policloroanisoli e policlorofenoli, il TBA può formarsi dalla degradazione microbiologica del 2,4,6-tribromofenolo (TBP) nell’ambiente di cantina; l’uso di TBP e dei suoi derivati per trattare il legno, in materiali plastici o come agente ignifugo fa temere il rischio di contaminazioni ambientali (Chatonnet et al., 2004). Inoltre il suo utilizzo non è soggetto a restrizioni, come nel caso del PCP.

1.4. La determinazione di policloroanisoli e policlorofenoli nel sughero e nel vino – Test analitici e sensoriali

Numerosi studi sono stati dedicati alla messa a punto di metodiche di dosaggio del TCA nel sughero e nel vino, tuttavia non esiste ancora un metodo ufficiale di estrazione e di analisi a cui si possa fare riferimento per il controllo qualità del sughero. I metodi analitici relativi alla determinazione dei policlorofenoli e dei policloroanisoli riguardano soprattutto il vino e sono basati principalmente sull'analisi gas cromatografica con rivelatore a cattura di elettroni (GC/ECD) o con spettrometro di massa (GC/MS), e sull'uso di tecniche di microestrazione in fase solida (SPME) o con spazio di testa (HS-SPME) (Evans et al., 1997; Riu et al., 2002; Lizarraga et al., 2004; Martinez-Urunuela et al., 2004; Insa et al., 2006; Jönsson et al., 2006) oppure con metodo di estrazione con CO₂ supercritica (SFE) (Taylor et al., 2000), o più recentemente con stir bar sorptive extraction (SBSE) (Zalacain et al., 2004; Lorenzo et al., 2006). Altre tecniche impiegate per questa determinazione sono l'estrazione liquido-liquido (LLE) (Pena-Neira et al., 2000; Buser et al., 1982), l'estrazione liquido-liquido (LLE) combinata con un sistema purge-and-trap (PT) (Campillo et al., 2004), l'estrazione in fase solida (SPE) (Soleas et al., 2002; Martinez-Urunuela et al., 2005). In letteratura sono riportati anche metodi per il dosaggio del TCA nel sughero basati sull'estrazione con solventi organici con successive fasi di concentrazione e analisi GC/MS o GC/ECD (Juanola et al., 2002; Campillo et al., 2004). Come già evidenziato da alcuni autori, il metodo di estrazione

con solvente dà buoni risultati sia in termini di riproducibilità sia di ripetibilità; è un metodo semplice e nelle possibilità di molti laboratori (Juanola et al., 2002). Inoltre utilizzando un solvente opportuno (es. soluzione idroalcolica similvino) per estrarre la frazione facilmente rilasciabile di TCA, è possibile la stima della quantità di analita che potrebbe andare successivamente in contatto con il vino, e quindi contaminarlo.

La tecnica di microestrazione in fase solida (SPME) si può impiegare direttamente sul vino e sull'estratto di macerazione del sughero ma non sui tappi, risulta essere un metodo rapido, senza uso di solventi, automatizzabile ma ci possono essere problemi di riproducibilità e quantificazione (Juanola et al., 2002).

L'uso di stir bar sorptive extraction (SBSE) è una tecnica semplice, senza uso di solventi, dà buoni risultati di riproducibilità e di ripetibilità, ma per il momento non risulta essere economico. A differenza dell'SPME si può utilizzare anche per l'analisi diretta del tappo in sughero (Lorenzo et al., 2006).

Invece il metodo di estrazione con CO₂ supercritica (SFE) utilizza ridotti volumi di solvente ed è una tecnica abbastanza rapida.

L'analisi strumentale del TCA, come metodo sistematico per controllare la qualità del sughero è utilizzata attualmente nelle grandi realtà industriali, sia enologiche, sia sugheriere e anche in molti laboratori privati di analisi.

Nella maggior parte delle realtà produttive medio-piccole è invece diffuso l'uso di test sensoriali sui tappi finiti, anche se le indicazioni che si ottengono sono solo generali. Tale analisi consiste nel valutare la presenza di odori e sapori anomali in

tappi mantenuti in contatto con soluzioni come acqua distillata, soluzioni idroalcoliche o vini bianchi neutri per un determinato periodo di tempo (dalle 24 alle 48 ore), a differenti temperature (usualmente a temperatura ambiente o 30°C).

Una recente norma ISO 22308 (2005) riporta i seguenti parametri da seguire per il controllo organolettico dei tappi in sughero: periodo di contatto 24 ore in acqua alla temperatura di 21 ± 4 °C.

Esistono anche altre normative ISO che danno indicazioni sulle modalità con cui dovrebbero essere eseguiti i diversi test sensoriali: la norma ISO 8589 (1994) stabilisce i criteri relativi all'equipaggiamento e all'applicazione di adeguate condizioni ambientali per lo svolgimento delle prove sensoriale; la sensibilità dei degustatori può essere testata seguendo le norme ISO 8586 (1993) e ISO 6658 (2005).

Inoltre nel "Disciplinare sulla produzione ed utilizzo del tappo di sughero in enologia" (1996) sono riportate, oltre ai metodi di analisi dei tappi in sughero, anche le procedure di campionamento dei lotti di tappi. Per l'analisi sensoriale il Disciplinare indica un periodo di contatto di 24 ore del singolo tappo con una soluzione idroalcolica (8 % v/v) alla temperatura di 25 °C. Nonostante la norma ISO 22308 (2005), l'Istituto di Enologia continua ad utilizzare la soluzione idroalcolica, come indicato dal Disciplinare, poichè questo test risulta essere più vicino alle reali condizioni in cui si trova il tappo.

Per comprendere l'effettivo valore delle informazioni fornite da questo tipo di test, è bene puntualizzare alcuni aspetti legati alla valutazione sensoriale del TCA. L'identificazione corretta della presenza di TCA nel vino in base a test sensoriali presenta delle difficoltà soprattutto a basse concentrazioni, perchè la sua percezione è influenzata dalla sensibilità del degustatore che dipende da diversi fattori quali fisiologia ed esperienza dell'individuo, stanchezza degli organi di senso, persistenza temporale della sensazione caratteristica, nonché dalla variabilità della matrice vino (tipo di vino, sistemi di produzione con o senza invecchiamento, ecc.) (Clarke et al., 2004). Tutto ciò può far variare ampiamente la percezione olfattiva e gustativa del TCA (Mazzoleni et al., 2004).

1.5. Caratteristiche di TCA e TCP

Per fornire un quadro il più completo possibile dei composti che saranno oggetto del presente lavoro di tesi, di seguito sono riportate le principali caratteristiche chimico-fisiche (The Merck Index, 12° ed., 1996) e sensoriali di TCA e TCP.

1.5.1. – 2,4,6-Tricloroanisolo

- *Proprietà chimico-fisiche*

Formula bruta: $C_7H_5Cl_3O$ (C 39.75%, H 2.38%, Cl 50.30%, O 7.57%)

Peso molecolare: 211.49

Punto di fusione: 60 °C

Punto di ebollizione: 240 °C (a 738.2 mmHg)

Si prepara mediante la reazione tra il 2,4,6-triclorofenolo e il dimetilsolfato. Sublima lentamente a temperatura ambiente. E' volatile con il vapore. Risulta praticamente insolubile in acqua, è invece solubile in metanolo, etanolo, diossano, benzene e cicloesano.

- *Proprietà sensoriali*

Il 2,4,6-tricloroanisolo, come già detto, presenta una soglia di percezione molto bassa. In Tabella 5 sono elencati i dati bibliografici, le diverse soglie di percezione del TCA, in considerazione del panel e dei corrispondenti substrati; tuttavia la procedura di determinazione della soglia del TCA e il tipo di vino spesso non sono chiari. Altri

valori di soglia per il TCA nel vino sono riportati da Sefton et al. (2005), che fanno la distinzione tra soglia di determinazione (il minimo valore di uno stimolo sensoriale capace di far percepire una sensazione) e di riconoscimento (il minimo valore di uno stimolo sensoriale che permette di identificare la sensazione percepita). La soglia di determinazione varia da 1.4 a 4.6 ng/l, mentre quella di riconoscimento è nell'intervallo tra 4.2 e 10 ng/l. Recentemente diversi autori hanno proposto un nuovo approccio per valutare i livelli di TCA che iniziano a rendere un New Zealand Chardonnay un vino inaccettabile per i consumatori, misurando una soglia di rigetto del consumatore "consumer rejection threshold" di 3.1 ng/l (Prescott et al. 2005). Le prove effettuate mostrano che l'uso di questo metodo può fornire le basi razionali per stabilire il reale impatto del TCA nel vino, nonostante sia la varietà dell'uva sia la tipologia del vino possano avere un effetto significativo.

Tabella 5 – Livelli di soglia relativi al TCA in acqua e in vino riportati in letteratura.

Medium	Livello soglia (ng/l)	Bibliografia
Acqua	0.03 ^a	Griffith (1974)
acqua minerale	0.8 ^c	Progetto Quercus (1996)
Vino	1.4 ^b	Simpson (1990)
vino bianco fermo	1.5 ^c	Progetto Quercus (1996)
vino bianco secco	4 ^a	Amon et al. (1989)
vino bianco	4-10 ^a	Sanvicens et al. (2003)
vino	10 ^a	Silva Pereira et al. (2000)
vino rosso	22 ^a	Alvarez-Rodriguez et al. (2002)

Modo di valutazione : (a) orthonasale ; (b) retronasale ; (c) sconosciuto

1.5.2. – 2,4,6-Triclorofenolo

- *Proprietà chimico-fisiche*

Formula bruta: $C_6H_3Cl_3O$ (C 36.49%, H 1.53%, Cl 53.87%, O 8.10%)

Peso molecolare: 197.46

Punto di fusione: 69 °C

Punto di ebollizione: 246 °C (a 760 mmHg)

Si prepara direttamente dalla clorurazione del fenolo. E' volatile con il vapore ma non in soluzioni alcaline. Solubilità (g/100g di solvente): acetone 525; benzene 113; tetracloruro di carbonio 37; etere 354; alcool denaturato (formula 30) 400; metanolo 525; toluene 100; acqua < 0.1.

- *Proprietà sensoriali*

La soglia sensoriale del TCP in vino risulta essere di 43 µg/l quindi sono necessarie quantità molto più elevate rispetto a quelle di TCA, perchè questo composto sia rilevato mediante l'analisi sensoriale.

1.6. Aspetti microbiologici del sughero

Come attestato dai numerosi lavori riguardanti la microflora presente nel sughero (Tabella 6), questo materiale è associato ad una grande diversità di forme microbiche (Fumi et al., 1985).

Tabella 6 – Microflora presente nel sughero.

Microorganismi	Bibliografia
<i>Penicillium:</i>	f, g, i, k, l, n
<i>Frequentans</i>	a, c, d, e, g, k, l, m, o
<i>Spinolosum</i>	a, b
<i>Granulatum</i>	a, b
<i>Citreo-viride</i>	a
<i>Espansum</i>	c, e, g, o
<i>Echinulatum</i>	e
<i>Corylophilum</i>	e
<i>Roqueforti</i>	a, e, g
<i>Glabrum</i>	b
<i>Aspergillus:</i>	f, n, o
<i>Conicus</i>	a, b
<i>Nidulans</i>	c, d, l
<i>Glaucus</i>	a, c, d, l
<i>Fumigatus</i>	c
<i>Repens</i>	g, k
<i>Versicolor</i>	g, k, l
<i>Multicolor</i>	l
<i>Trichoderma:</i>	b, i, n
<i>Viride</i>	a, o
<i>Longibrachiatum</i>	e
<i>Hamatum</i>	e
<i>Monilia:</i>	b, i, n, o
<i>Chysonilia chrassa</i>	e
<i>Mucor</i>	b, i, n, o
<i>Cladosporium</i>	a, b, e, l, n

Continua nella pagina successiva

continuazione - Tabella 6

Microorganismi	Bibliografia
<i>Monodictys sp.</i>	e
<i>Sistotrema sp.</i>	e
<i>Ulocladium</i>	e
<i>Eurotium herbariorum</i>	e, g, k
<i>Botytis cinerea</i>	e
<i>Bacillus</i>	b, e, i, n
<i>Micrococcus</i>	b, n
<i>Staphylococcus</i>	e
<i>Listeria</i>	i
<i>Rothia</i>	i
<i>Rhodococcus</i>	e
<i>Coryneformi</i>	b, i
<i>Streptomyces</i>	g, k
<i>Candida</i>	b, g, h, i
<i>Rhodotorula</i>	b, g, h
<i>Sporobolomyces</i>	b
<i>Rhizopus</i>	o
<i>Cryptococcus</i>	b, e
<i>Saccharomyces</i>	b, i

(a) Moreau, 1978; (b) Davis et al., 1981; (c) Moreau, 1977; (d) Moreau et al., 1976; (e) Castera-Rossignol, 1983; (f) Marais et al., 1975; (g) Lefevbre et al., 1983; (h) Charpentier, 1977; (i) Davis et al., 1982; (k) Riboulet, 1982; (l) Schaeffer et al., 1979; (m) Neradt, 1982; (n) Fumi et al., 1985; (o) Codina et al., 1993.

Questa microflora trova nel sughero, materiale naturale con un elevato tasso di umidità, le condizioni ottimali per il suo sviluppo. Esiste una flora microbica naturale, già presente nel sughero sulla pianta, che si sviluppa all'interno del tessuto suberoso, principalmente nelle cavità lenticolari che presentano una maggiore umidità. Altri microorganismi si sviluppano durante la stagionatura delle plance, il ciclo di lavorazione e lo stoccaggio dei turaccioli.

Muffe appartenenti ai generi *Penicillium*, *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Chrysonilia* (*Monilia*), *Mucor*, *Cladosporium* sono state molto spesso isolate dai sugheri, anche se la loro frequenza e distribuzione varia molto a seconda dell'origine, qualità, tenore di umidità e condizioni di lavorazione del sughero.

In Tabella 7 viene riportato l'andamento della carica microbica sul sughero durante le diverse fasi di lavorazione, dalla foresta al tappo pronto per l'utilizzo.

Tabella 7 – Andamento della carica microbica sul sughero durante le varie fasi di lavorazione.

FASE DI LAVORAZIONE	Plancia grezza	Plancia bollita	Plancia essiccata	Tappi grezzi	Tappi lavati	Tappi essiccati	Tappi pronti per l'uso
MUFFE (UFC/g)	2*10 ⁵ - 3*10 ⁶	2*10 ⁵ - 2*10 ⁷	1*10 ⁶ - 1*10 ⁸	3*10 ⁵ - 2*10 ⁷	1*10 ² - 1*10 ⁶	1*10 ² - 1*10 ⁵	≤10
BATTERI (UFC/g)	5*10 ³ - 7*10 ⁵	2*10 ² - 3*10 ³	3*10 ² - 5*10 ³	1*10 ² - 2*10 ³	≤10 ²	≤10 ²	≤10

Alcuni lavori riportano che le muffe in un mezzo liquido hanno differente capacità di metilare TCP e produrre TCA, attraverso un processo di detossificazione (Silva Pereira 2000a). Tuttavia l'abilità di alcuni funghi nel produrre TCA in presenza di TCP fu dimostrata da diversi autori (Alvarez-Rodriguez et al., 2002; Silva Pereira et al., 2000a).

In un precedente studio, differenti ceppi di microorganismi isolati dal sughero furono identificati e fu testata la loro capacità di produrre composti volatili sia in mezzo

sintetico sia sul sughero ma nessun ceppo testato mostrò l'abilità di produrre TCP o TCA da precursori naturali (Caldentey et al., 1998).

Per quanto riguarda la presenza di lieviti e batteri, i sugheri presentano tenori molto variabili. I batteri ritrovati più frequentemente sono *Bacillus*, *Streptococcus*, *Micrococcus*. I lieviti comprendono fundamentalmente il genere *Rhodotorula*, *Sporobolomyces*, *Cryptococcus*, *Saccharomyces* e *Candida*.

Alcuni tipi di microorganismi, che si sviluppano a spese del sughero o su colle, siliconi possono produrre sostanze volatili odoranti che possono poi essere cedute al vino provocando alterazioni sensoriali. Ciò ha spinto numerosi autori ad interessarsi alle possibili vie microbiche di formazione di questi metaboliti, come già illustrato nel capitolo 1.3.2 del presente lavoro.

Già nel 1900 Mathieu aveva ipotizzato che i difetti sensoriali ritrovati nei vini e definiti come gusto di tappo o gusto di muffa, avessero un'origine microbica (Mathieu, 1900).

Numerose specie fungine sono state ritenute responsabili di queste anomalie sensoriali nel sughero, senza che sia ancora stata dimostrata una chiara ed univoca relazione tra microorganismo inquinante e metabolita prodotto.

Penicillium frequentans, *Penicillium multicolor*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus niger*, *Trichoderma* sono stati isolati in tappi di sughero responsabili di difetti sensoriali nei vini (Moreau et al., 1976; Moreau et al., 1978; Schaeffer et al., 1979; Castera-Rossignol, 1983).

Anche alcuni lieviti e batteri sono stati segnalati come responsabili di queste anomalie (Bureau et al., 1974; Charpentier, 1977; Davis et al., 1981). Lieviti del genere *Rhodotorula* e *Candida* sono stati frequentemente isolati in tappi difettosi.

I lavori di Lefevre et al. (1983) confermano l'esistenza nei tappi di sughero grezzi di questi lieviti e di muffe del genere *Penicillium*, i quali danno luogo ad odori di terra e di muffa, però segnala l'*Aspergillus versicolor* come il vero responsabile del tipico odore di tappo.

Tabella 8 – Composti volatili prodotti da differenti microrganismi isolati dal sughero grezzo.

COMPOSTO	FREQUENZA SU 11 CEPPI TESTATI
Clorobenzene	11
Ottan-3-one	8
Anisolo	11
1,3-diclorobenzene	11
1-otten-3-olo	5
A-santalene	1
Cariofillene	8
A-bergamotene	11
B-bergamotene	10
Isocariofillene	11
A-curcumene	8
B-bisabolene	10

Uno studio condotto sui composti volatili prodotti da microrganismi isolati dal sughero grezzo ha mostrato che i ceppi fungini si sviluppano con difficoltà sul sughero sterilizzato e solo 12 composti vengono con certezza metabolizzati dagli

stessi microrganismi, visto che queste sostanze sono presenti solo dopo l'accrescimento sul sughero (Tabella 8). Questi composti volatili sono formati dalla maggior parte dei ceppi fungini provati e più della metà appartengono alla famiglia dei sesquiterpeni. Il numero delle sostanze prodotte dall'accrescimento su sughero risulta molto limitato se confrontato con la quantità di composti formati (più di 60 sostanze identificate) dagli stessi microrganismi su mezzo sintetico (Caldentey et al., 1998). Il sughero è quindi un substrato piuttosto povero, anche per i microrganismi che fanno parte della microflora naturalmente presente su questo materiale. Lo studio rivela che l'incidenza dei tappi difettosi causati dai funghi è piuttosto ridotta se relazionata alla loro presenza, che è documentata in tutte le fasi di lavorazione del tappo.

2. OBIETTIVI

Oggi la letteratura scientifica offre un buon numero di lavori di ricerca relativi agli argomenti sughero e vino, tuttavia determinati aspetti di questi temi non sono stati presi ancora in considerazione o necessitano di un approfondimento. Il lavoro svolto durante il dottorato ha avuto l'obiettivo di fornire un ulteriore contributo alle conoscenze attualmente esistenti sul sughero per uso enologico, prendendo in esame aspetti legati alla presenza di policloroanisoli e policlorofenoli, ed in particolare TCA e TCP.

Nei capitoli precedenti si è sottolineato come i policloroanisoli e i policlorofenoli siano tra le sostanze responsabili direttamente od indirettamente del "gusto di tappo", uno dei problemi più sentiti dall'industria enologica e sugheriera.

E' stata inoltre messa in luce l'importanza della microflora associata al sughero per la formazione di anomalie gusto-olfattive, che possono essere trasmesse anche al vino. Così la capacità delle muffe presenti sul sughero di produrre TCA dalla biodegradazione del TCP è un'importante caratteristica. Tuttavia, fino ad oggi, non sono stati effettuati studi esaustivi per identificare i microorganismi responsabili della bioconversione del TCP a TCA ed i meccanismi biochimici che portano alla formazione di quest'ultima sostanza.

Uno degli obiettivi di questo lavoro è stato quello di caratterizzare ceppi fungini sia in mezzo sintetico solido sia sul sughero, in funzione della loro abilità di biodegradare TCP e produrre TCA.

Per la realizzazione di questo studio ed in mancanza di una norma a cui fare riferimento, è stata messa a punto un metodo di estrazione ed analisi del TCA nel sughero; i risultati ottenuti sono stati confrontati con altre metodiche di determinazione del TCA reperibili in letteratura.

Anche per quanto riguarda la determinazione di policloroanisoli e policlorofenoli nel vino non esiste ancora un metodo ufficiale di estrazione e di analisi così è stata messa a punto una metodica di analisi gas cromatografica con l'uso in tandem dello spettrometro di massa (GC/MS/MS) ed è stato effettuato un confronto tra le tecniche di estrazione più attuali quali SPME e SBSE.

Infine, si è constatata la frammentarietà e, a volte, la difformità dei dati esistenti circa l'impatto sensoriale del TCA nei vini e pertanto si è cercato di approfondire questo aspetto, valutando come la percezione del TCA da parte di uno stesso panel di assaggio poteva variare a seconda della tipologia del vino.

L'attività di ricerca del dottorato si è svolta prendendo in esame diversi aspetti:

- aspetto sensoriale: - valutazione dell'impatto sensoriale del TCA in differenti tipologie di vini;
- aspetto analitico: - messa a punto del metodo di estrazione e di analisi del TCA in tappi da sughero per il controllo di qualità, mediante estrazione solido-liquido e determinazione per GC/ECD;

- confronto tra SBSE (Stir Bar Sorptive Extraction) e SPME (Solid Phase Micro Extraction) per la determinazione di policlorofenoli e policloroanisoli nel vino con metodo gas cromatografico (GC/MS/MS);
- aspetto microbiologico: - caratterizzazione dei microorganismi naturalmente presenti nel sughero in base alle loro capacità di degradare il TCP, producendo sostanze a basso impatto organolettico.

Il lavoro relativo al confronto di tecniche di estrazione, SBSE e SPME, associato all'analisi GC/MS/MS di policlorofenoli e policloroanisoli e parte dello studio riguardante la caratterizzazione della microflora naturalmente presente sul sughero sono stati svolti presso la Sezione di Chimica Agraria dell'Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos – Universidad de Castilla-La Mancha (Albacete, Spagna).

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 oronasale 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 espellere. 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. %)	Zucche ro (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 oronasale 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 maggiore 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 maggiore 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 orthonasale sia a quello retronasale del TCA, come illustrato sopra.

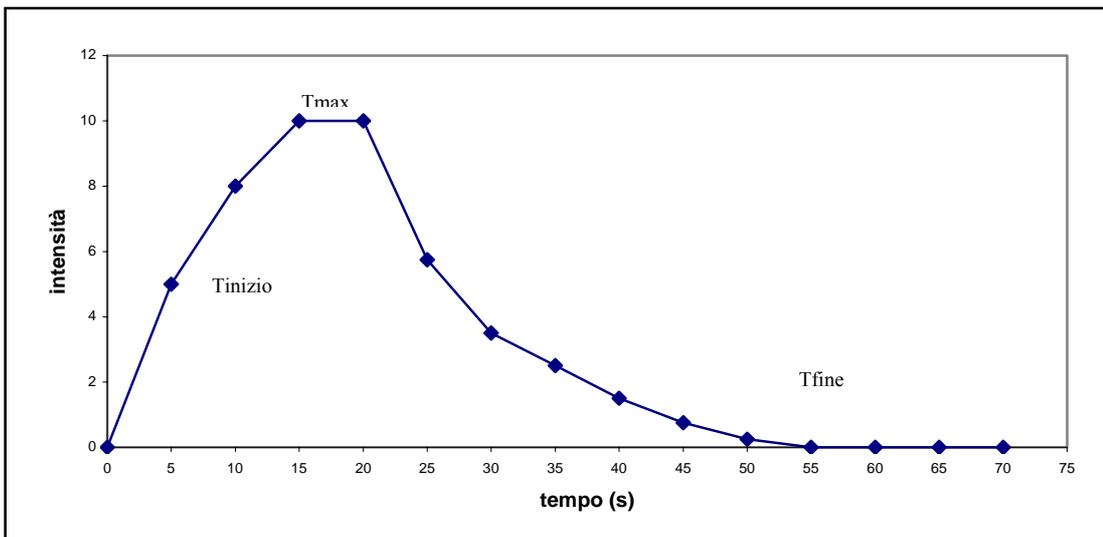
- **Curva tempo-intensità**

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 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
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 aggiungendo 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 Analitica 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 µl) in una colonna capillare EC-5 (30 m x 0.25 mm i.d.; 0.25 µm 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 µg/l), e un'altra a basse concentrazioni (nell'intervallo da 0.1 a 1 µg/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'analogia 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***

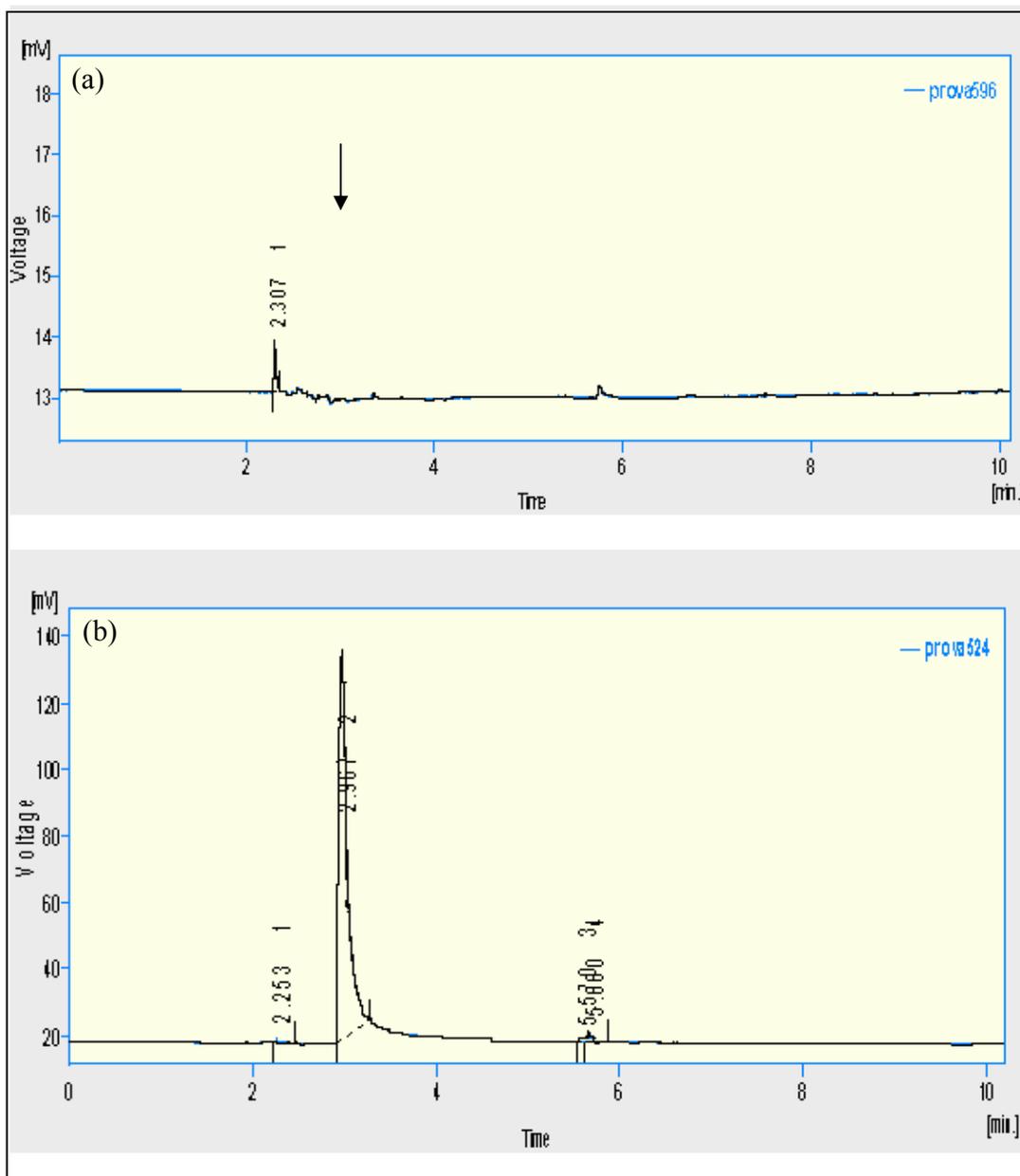
Per valutare la ripetibilità, tre differenti campioni di sughero contaminato (contenenti 250 ng/g di TCA) furono analizzati consecutivamente; invece la riproducibilità fu stimata analizzando tre campioni identici di sughero contaminato (contenente 250 ng/g di TCA) preparati in tre giorni diversi. I valori 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'SBSE 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.

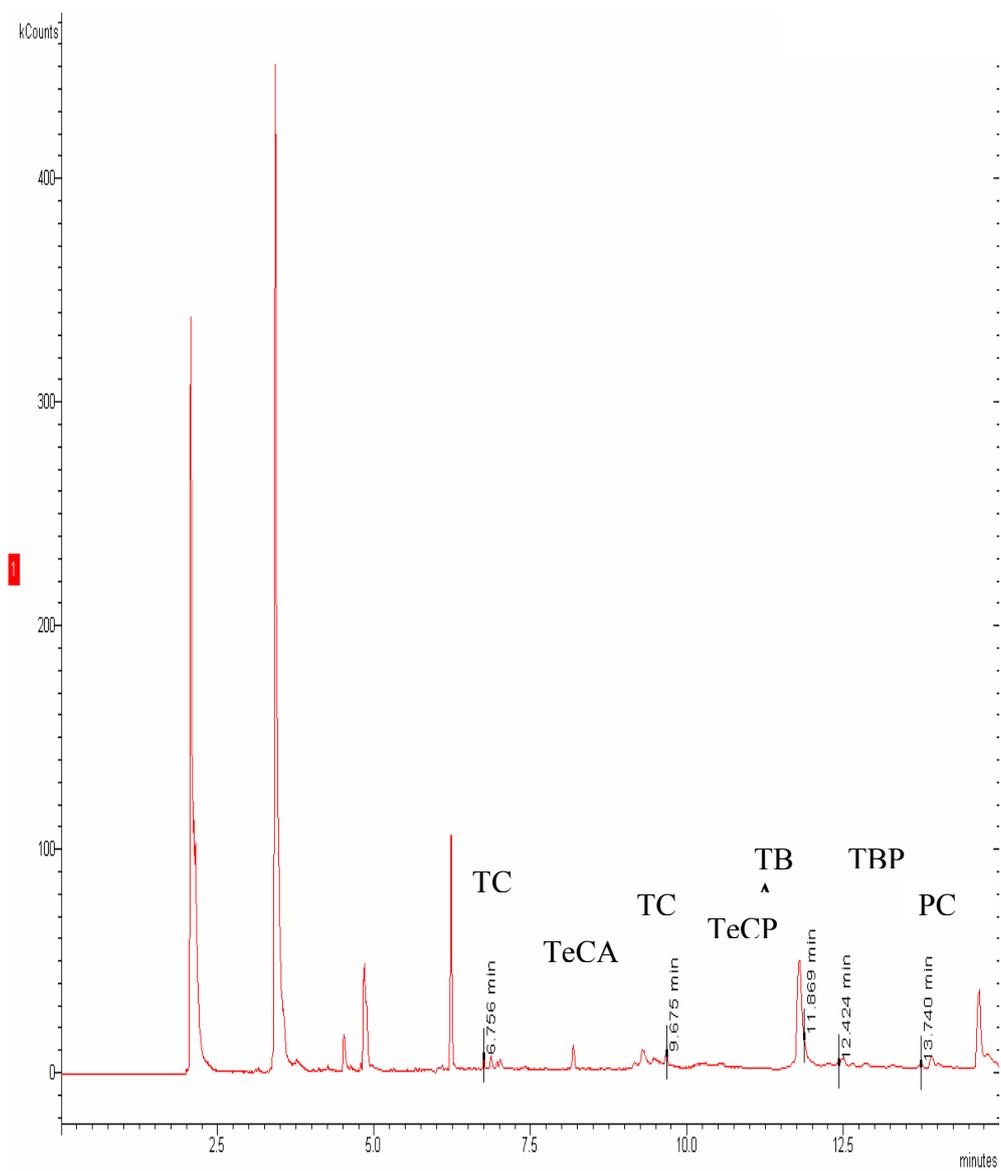
Tabella 15 – Caratteristiche analitiche del metodo SBSE e analisi GC/MS/MS.

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.

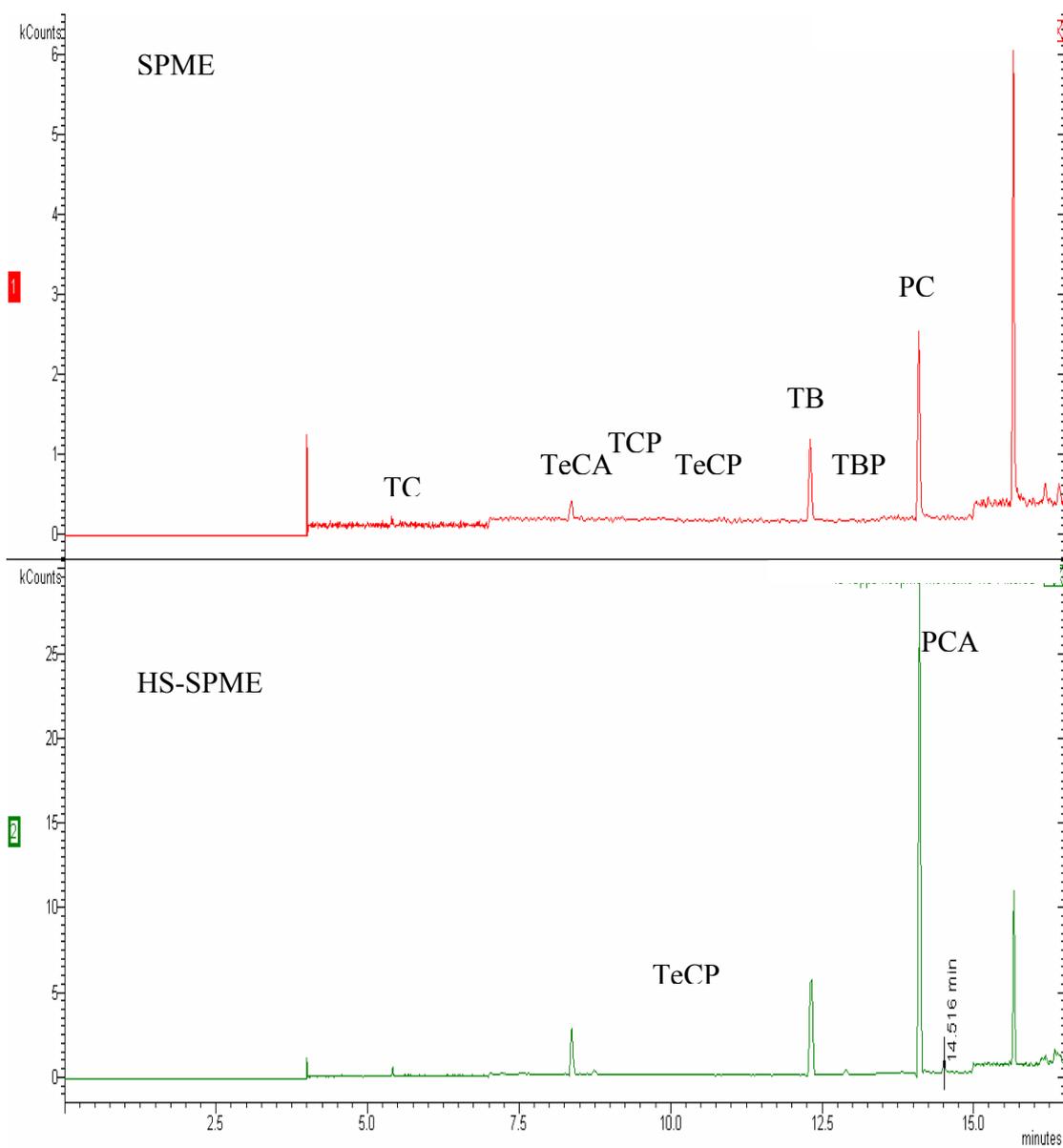
HS-SPME	TCA	TeCA	PCA	TCP	TeCP	TBA	TBP
Ioni composto (<i>m/z</i>)	195, 197, 210, 212	203, 231, 246	237, 265, 280	132, 160, 196	166, 232	329, 344	332
Ione selezionato (<i>m/z</i>)	195	246	280	196	232	344	332
Intervallo conc. ($\mu\text{g/l}$)	0.25-10	0.25-10	0.25-10	0.25-10	0.25-10	0.25-10	0.25-10
Intercetta	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.

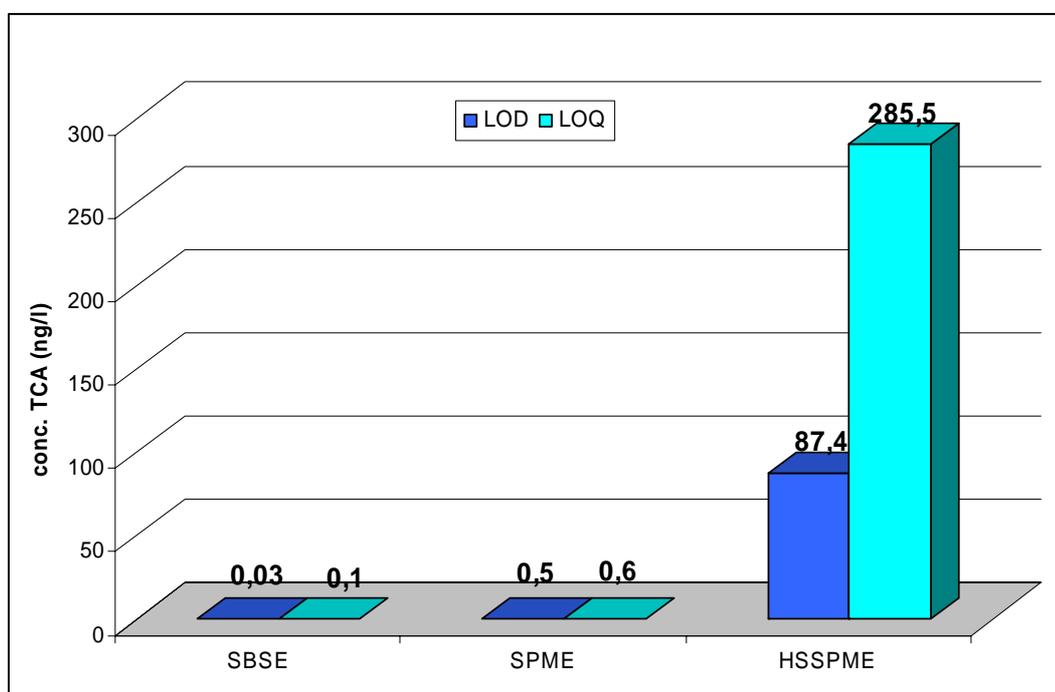
Figura 11 sono riportati i cromatogrammi ottenuti rispettivamente con i metodi SPME e HS-SPME alla concentrazione di 100 $\mu\text{g/l}$ e successiva analisi GC/MS/MS.

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 microrganismi 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*

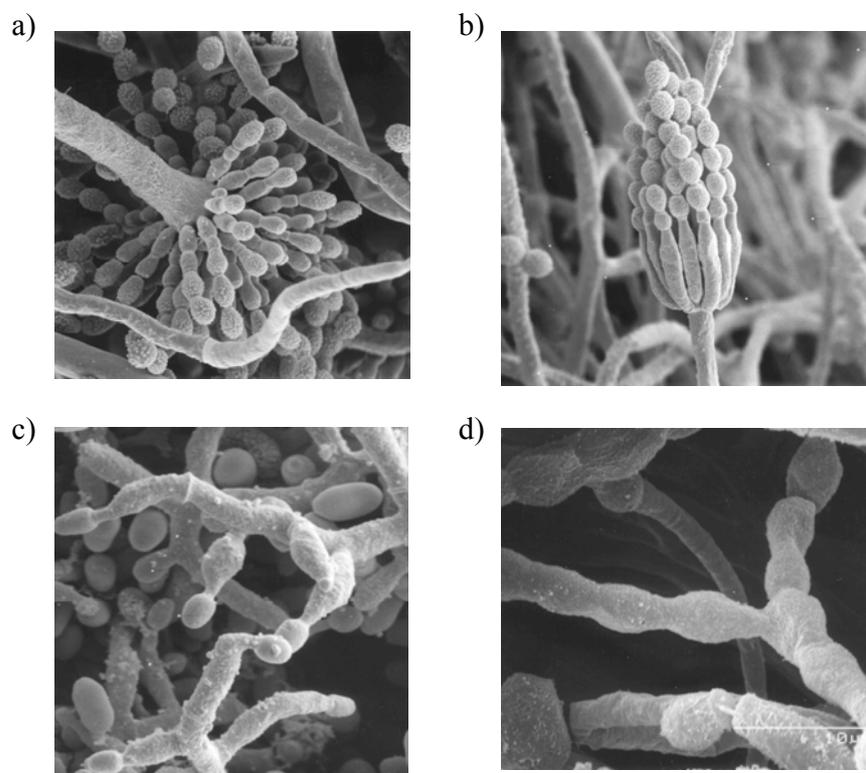
I microorganismi furono isolati da sughero grezzo e i generi furono assegnati morfologicamente, come riportato in un precedente lavoro (Caldentey et al., 1998). I funghi furono conservati in frigorifero alla temperatura di 4 °C.

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.

a)



b)



c)



d)



- ***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 alcoolica fu filtrata su filtro di carta e addizionata con 100 ml di acqua distillata (soluzione idroalcoolica 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 alcoolica 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 µl) in una colonna capillare EC-5 (30 m x 0.25 mm i.d.; 0.25 µm 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 μ l) 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 μ m 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 temperature 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.</i> 1	60.3±0.7	98.7±0.8	93.2±1.3
<i>Penicillium spp.</i> 2	68.2±0.7	62.2±1.3	65.1±1.6
<i>Penicillium spp.</i> 3	76.8±1.1	46.9±2.4	49.7±1.8
<i>Aspergillus spp.</i> 1	45.1±1.6	80.1±1.1	85.1±1.0
<i>Aspergillus spp.</i> 2	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*.

4. CONCLUSIONI GENERALI

Dall'insieme delle attività di ricerca, riportate in dettaglio nel presente lavoro di tesi, si possono trarre le seguenti conclusioni:

A) Aspetti sensoriali

- Le prove effettuate su soluzioni di TCA in acqua, vini bianchi e rossi hanno fornito, nel caso dei vini, risultati congruenti a quelli pubblicati in letteratura (Tabella 5) e hanno confermato la differente sensibilità individuale del nostro panel.
- Per i vini non invecchiati in barrique, il riconoscimento del TCA è risultato più semplice nei vini bianchi piuttosto che in quelli rossi.
- L'effetto del TCA per i vini bianchi fu mascherato maggiormente in quelli con caratteristiche varietali più intense e con un contenuto alcolico più elevato.
- Per i vini rossi, si può dire che la tipologia sembra avere un impatto sensoriale più forte nel riconoscimento del TCA addizionato. Alcuni dei composti volatili e non presenti nei vini rossi considerati, possono interagire con la percezione del TCA, giustificando il comportamento osservato anche se sulla base delle conoscenze attuali circa le interazioni gusto-olfattive nei vini rossi, non è possibile identificare le sostanze responsabili di questi differenti livelli di riconoscimento del TCA.

- 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.
- Questi risultati mostrano l'importante effetto della tipologia di un vino nell'identificazione del TCA, così come l'ineguadeguato utilizzo di un generico valore soglia per la percezione di questo composto nel vino.

B) Aspetti analitici

- Lo studio relativo alla messa a punto di un metodo di estrazione e analisi di policlorofenoli e policloroanisoli ha evidenziato 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 tra le tecniche di estrazione prese in esame in questo lavoro SPME, HS-SPME la tecnica SBSE ha dimostrato di essere la più efficace nella determinazione di questi composti, a parità di condizioni di estrazione e di analisi, fornendo i risultati migliori a livello di LOD, LOQ, riproducibilità e ripetibilità. Così questa tecnica di estrazione unita all'analisi gas cromatografica con l'uso in tandem dello spettrometro di massa risulta essere un'ottima alternativa alla metodologia classica per la determinazioni di policlorofenoli, policloroanisoli, TBA e TBP nel vino, dato che consente di determinare sia concentrazioni di questi composti inferiori alle soglie di percezione sia contaminazioni più importanti.

Inoltre si esegue senza manipolare il campione, non richiede l'uso di solventi organici, è rapido e semplice.

C) Aspetti microbiologici

- 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 ottenuti suggeriscono che una crescita controllata dei microorganismi sul sughero può influenzare la formazione di TCA, il principale composto associato al gusto di tappo nel vino.
- Questo lavoro conferma quanto già proposto da altri ricercatori che hanno ipotizzato l'utilizzo, durante specifiche fasi di lavorazione del sughero, di ceppi fungini dotati di una elevata abilità di degradare TCP ed incapaci di sintetizzare TCA.
- Il risultato più importante messo in evidenza da questa ricerca e prima d'ora non segnalato in letteratura, è la "moderata" capacità di metilare TCP da parte della *Botrytis cinerea*. Dal momento che questo microrganismo si trova facilmente negli ambienti di cantina, la sua capacità può in parte spiegare la presenza del "gusto di tappo" a volte segnalata in vini non ancora imbottigliati.

5. BIBLIOGRAFIA

ALVAREZ-RODRIGUEZ, M.L.; LOPEZ-OCAÑA, L.; LOPEZ-CORONADO, J.M.; RODRIGUEZ, E.; MARTINEZ, 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. *Applied and Environmental Microbiology*. 68: 5860-5869.

AMON, J. M.; SIMPSON, R. F. (1986). Wine corks: A review of the incidence of cork-related problems and the means for their avoidance. *Australian Grapegrower and Winemaker*. 268: 63-72.

AMON, J. M.; VANDEPEER, J. M.; SIMPSON, R. F. (1989). Compounds responsible for the cork taint in wine. *Australian and New Zealand Wine Industry Journal*. 4: 62-69.

BARKER, D. A.; CAPONE, D. L.; POLLNITZ, A. P.; MCLEAN, H. J.; FRANCIS, I. L.; OAKEY, H.; SEFTON, M. A. (2001). Absorption of 2,4,6-trichloroanisole by wine corks via the vapour phase in an enclosed environment. *Australian Journal of Grape and Wine Research*. 7: 40-46.

BORGES, M. (1985). New trends in cork treatment and technology. *Beverage Rev.* 5, 15, 16, 19, 21.

BUREAU, G.; CHARPENTIER, M.; PANSU, M. (1974). Etude des goût anormaux apportés par le bouchon sur le vin de Champagne. *Rev. Fr. oenol.* 13(56) : 22-24.

BUSER, H.R.; ZANIER, C.; TANNER, H. (1982). Identification of 2,4,6-trichloroanisole as potent compound causing cork taint in wine. *J. Agric. Food Chem.* 30: 359-362.

CALDENTEY, P. (1994). Studio di alcuni componenti chimici del sughero per uso enologico, con particolare riferimento ai composti volatili. Tesi Dottorato di Ricerca in "Biotecnologia degli Alimenti" - VII ciclo (1991-1994).

CALDENTEY, P.; FUMI, M.D.; MAZZOLENI, V.; CARERI M. (1998). Volatile compounds produced by microorganisms isolated from cork. *Flavour and Fragrance Journal*. 13: 185-188.

CAMPILLO, N.; AGUINAGA, N.; VINAS, P.; LOPEZ-GARCIA, I.; HERNANDEZ-CORDOBA, M. (2004). Purge and trap preconcentration system coupled to capillary GC with AED detection for 2,4,6-trichloroanisole determination in cork stoppers and wines. *Journal of Chromatography A*. 1061: 85-91.

CANTAGREL, R.; VIDAL, J.P. (1990). Recherche des composés responsables du goût de bouchon dans le Cognac. *Bull. OIV* 63 (709-710): 253-277.

CASTERA-ROSSIGNOL, A. (1983). Contrôle microbiologique des bouchons. Bouchons stériles conditions de conservation des bouchons. *Vigne Vin*. 17(3) : 183-193.

CATICE (2003). Centro de Asistencia Técnica e Inspección del Comercio Exterior, Ministerio de Economía y Hacienda.

CEE (1991). *Journal Officiel des Communautés Européennes*. Directive du conseil du 21 mars 1991. 91/173/CEE.JO N° L 85/34 du 5/04/1991.

CHARPENTIER, M. (1977). Apparition des goûts de bouchon en relation avec le développement des levures dans le liège. *Rev. Fr. Oenol.* 16(66): 60-62.

CHATONNET, P.; GUIMBERTEAU, G. ; DUBOURDIEU, D. ; BOIDRON, J.N. (1994). Nature et origine des odeurs de moisi dans les caves. Incidences sur la contamination des vins. *J. Intern. Sci. Vigne et du Vin*. 28 : 131-151.

CHATONNET, P.; BONNET, S.; BOUTOU, S.; LABADIE, M.D. (2004). Identification and responsibility of 2,4,6-tribromoanisole in musty, corked odors in wine. *J. Agric. Food Chem.* 52: 1255-1262.

CLARKE, R.J.; BAKKER, J. (2004). Factors influencing sensory perception. In *Wine Flavour Chemistry*. Blackwell Publishing: Oxford, UK; pp. 202-204.

CODINA, J.; ESTEBAN, C.; CALVO, A.; AGUT, M. (1993). Influence of microorganisms in cases of cork taint. In *Proceedings 5th International Symposium on Cork in Oenology*; Chiriotti Editori: Pinerolo, Italy; pp. 114-116.

COLAGRANDE, O. (1996). *Il tappo di sughero*. Chiriotti Editori.

CONFEDERAZIONE EUROPEA DEL SUGHERO. (2006). *Codice Internazionale delle Pratiche per la Produzione dei Tappi di Sughero* Confederazione Europea del Sughero (C.E.Liège, 5^a edizione, 2006).

CURTIS, R.F.; LAND, D.G.; GRIFFITHS, N.M.; GEE, M.; ROBINSON, D.; PEEL, J.L.; DENNIS, C.; GEE, J.M. (1972). 2,3,4,6-TeCA association with musty taint in chickens and microbiological formation. *Nature (Lond.)*. 235: 223-224.

DAVIS, R.; FLEET, G.H.; LEE, T.H. (1981). The microflora of wine cork. *Australian Grapegrower Winemaker*. 208: 42-44.

DAVIS, R.; FLEET, G.H.; LEE, T.H. (1982). Inactivation of wine cork microflora by a commercial sulfur dioxide treatment. *Am. J. Enol. Vitic.* 3: 124-127.

DISCIPLINARE SULLA PRODUZIONE ED UTILIZZO DEL TAPPO DI SUGHERO IN ENOLOGIA. (1996). *Stazione Sperimentale del Sughero (Tempio Pausania), Istituto di Enologia - Università Cattolica del Sacro Cuore (Piacenza)*. Ed. Stazione Sperimentale del Sughero. Tempio Pausania.

DUNCAN, B.C.; GIBSON, R.L.; OBRADOVIC, D. (1997). 2,4,6-trichloroanisole and cork production. *Australian and New Zealand Wine Industry Journal*. 12: 180-184.

DUBOIS, P. ; RIGAUD, J. (1981). A' propos de goût de bouchon. *Vignes et vins*. 301: 48-49.

ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY, office of water:
<http://www.epa.gov/ogwdw000/dwh/t-soc/pentachl.htm>.

EU OFFICIAL METHODS FOR WINE ANALYSIS. (1990). Commission Regulation N° 2676/1990.

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. *Journal of Chromatography A*. 786: 293-298.

FORSS, D.A. (1972). Odour and flavour compounds from lipids. In: R.T. Holman, ed. *The Chemistry of fats and other lipids*. Oxford: Pergamon Press. 13: 177-215.

FUMI, M.D.; COLOMBI, M.G., BIANCHI F. (1985). Microflora presente nei tappi di sughero non sterilizzati: esame al microscopio elettronico. *Industrie delle bevande*. 14: 450-455.

FUMI, M.D.; COLAGRANDE, O. (1988). Inactivation thermique de la microflora dans les bouchons de liège. *Rev. Œnologues*. 50: 28-30.

FUNDACIÓN PARA LA CULTURA DEL VINO. (2003). Informe tecnico. Anisoles y Brettanomyces. Causas, efectos y mecanismos de control. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentacion: <http://www.culturadelvino.org>.

GARCIA, D.R. (1979). *Sem. Vitivinic*. 34: 945, 947, 949.

GRIFFITH, N. M. (1974). Sensory properties of the chloroanisoles. *Chemical Senses Flavor*. 1: 187-195.

GROSSMAN, M. (1993). Positive and negative effects of microorganisms on the cork production. In *Proceedings 10th International Oenological Symposium on International Association for Winery technology and Management*, 3-5 May 1993, Montreux, Suisse.

HEINZEL, M.; HAGEN, M.; BOUSSER, C. (1983). Desinfection des bouchons par l'eau oxygénée active. *Rev. Fr. Oenol.* 23: 77-81.

HOFFMANN, A.; SPONHOLZ, W.R.; GROSSMANN, M.K.; MUNO, H. (1997). The distribution of chlorophenols and chloroanisoles in cork and a microbiological method to prevent their formation. *Industria delle bevande* – XXVI- dicembre.

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.

IRIS. (1998). Integrated Risk Information System. U.S.Environmental Protection Agency Washington, DC.

ISHIKAWA, T.; NOBLE, A.C. (1995). Temporal perception of astringency and sweetness in red wine. *Food Quality Preference.* 6: 27-33.

ISO 4120. (2004). Sensory analysis – Methodology – Triangle test.

ISO 6658. (2005). Sensory analysis – Methodology – General Guidance.

ISO 8586-1. (1993). Sensory analysis – General guidance for the selection, training and monitoring of assessors. Selected assessors.

ISO 8589. (1994). Sensory analysis – General guidance for the design of test rooms.

ISO 22308. (2005). Cork stoppers - Sensory analysis.

JÖNSSON, S.; UUSITALO, T.; VAN BAVEL, B.; GUSTAFSSON, I.B.; LINDSTRÖM, G. (2006). 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. *Journal of Chromatography A.* 1111: 71-75.

JUANOLA, R.; SUBIRÀ, D.; SALVADÓ, V.; GARCIA REGUEIRO, J.A.; ANTICÓ, E. (2002). Evaluation of an extraction method in the determination of the 2,4,6-trichloroanisole content of tainted cork. *Journal of Chromatography A*. 953: 207-214.

JUANOLA, R.; SUBIRÀ, D.; SALVADÓ, V.; GARCIA REGUEIRO, J.A.; ANTICÓ, E. (2005). Migration of 2,4,6-trichloroanisole from cork stoppers to wine. *Eur. Food Res. Technol.* 220: 347-352.

KUN, E.P.; SUFLITA, J.M. (1989). Dehalogenation of pesticides by aerobic microorganisms in soil and groundwater – A review. In: *Reactions and movements of organic chemical soils*. Ed. Soil Science Society of America and American Society of Agronomy; pp.111-180.

LEFEBVRE, A.; RIBOULET, J.M.; BOIDRON, J.N.; RIBEREAU-GAYON, P. (1983). Incidence des microorganismes du liège sur les altérations olfactives du vin. *Sci. Aliment.* 3: 265-278.

LEFEBVRE, A. (1988). Le bouchon liege des vins tranquilles. *Connaiss. Vigne Vin*. Numéro hors Série : 13-33.

LIZARRAGA, E.; IRIGOYEN, A.; BELSUE, V.; GONZÁLEZ-PENAS, E. (2004). Determination of chloroanisole compounds in red wine by head-space solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 1052: 145-149.

LORENZO, C.; ZALACAIN, A.; ALONSO, G.L.; SALINAS, M.R. 2006. Non-destructive method to determine halophenols and haloanisoles in cork stoppers by headspace sorptive extraction. *Journal of Chromatography A*. 1114: 250-254.

MAARSE, H.; NIJSSEN, L.M.; ANGELINAS, S. (1988). Halogenated phenols and chloroanisole: occurrence, formation and prevention. In: M. Rothe (Ed.), *Characterization, Production and Application of Food Flavours*, Akademie Verlag, Berlin, 1988: 43-63.

MAARSE, H.; NIJSSEN, L.M.; ANGELINAS, S. (1989). Halogenated phenols and chloroanisole: occurrence, formation and prevention. *Atti del 2nd Wartburg Aroma Symposium*.

MAGA, J.A.; PUECH, J.-L. (2005). Cork and alcoholic beverages. *Food Reviews International*. 21: 53-68.

MARGALIT, Y. (1997). Oak products (Cooperage and cork). In: Crum, J., ed. *Concepts in Wine Chemistry*. San Francisco, CA: The Wine Appreciation Guild; pp. 236-252.

MARAIS, P.G.; GRUGER, M.M. (1975). Fungus contamination of corks responsible for unpleasant odours in wine. *Phytophylactica*. 7(3):115-116.

MARTINEZ-URUNUELA, A.; GONZALEZ-SAIZ, J.M.; PIZARRO, C. (2004). Optimisation of a headspace SPME method for the determination of chloroanisoles related to cork taint in red wine. *Journal of Chromatography A*. 1056: 49-56.

MARTINEZ-URUNUELA, A.; RODRÍGUEZ, I.; CELA, R.; GONZALEZ-SAIZ, J.M.; PIZARRO, C. (2005). Development of a solid-phase extraction method for the simultaneous determination of chloroanisoles and chlorophenols in red wine using gas chromatography-tandem mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*. 549: 177-123.

MATHIEU, L. (1900). Les gout de bouchon dans le vins mousseux. *Rev. Viticulture*. 1: 273-278.

MAUJEAN, A.; MILLERY, P.; LEMARESQUIER, H. (1985). Explications biochimiques et metaboliques de la confusion entre goût de bouchon et goût de moisi. *Rev. Franc. Oenol*. 24: 55-62.

MAZZOLENI, V.; FUMI, M.D.; MOLTENI, R. (1999). Use of electron beam irradiation in the manufacturing of cork stoppers. Effects on cork quality as affected by irradiation

doses. *Actualités Oenologiques – VI Symposium International d’Oenologie – Bordeaux* 10-12 giugno 1999 (Faculté d’Oenologie, Talence), 551-554.

MAZZOLENI, V.; CARERI, M.; MUSCI, M.; MOLTENI, R. (1999). Effects of electron beam irradiation on cork volatile compounds by gas-chromatography-mass spectrometry. *Chromatographia*, 3-4/53, 166-172.

MAZZOLENI, V.; MAGGI, L. (2004). Impatto sensoriale del 2,4,6-tricloroanisolo in differenti tipologie di vino. *Atti 3^a Giornata di studio sul sughero in enologia*.

MICHELLOD, R.; FABRE, S. (1993). Traitement des bouchons et détection de résidus oxydants. In: *Atti del 5^o Simposio Internazionale sul vino: Il sughero in Enologia*. 13-14 maggio, Pavia ; Chiriotti Ed., Pinerolo, 83-91.

MOHN, W.W.; KENNEDY, K.J. (1992). Reductive dehalogenation of chlorophenols by desulfomonile tiedjei DCB-1. *Applied and Environmental Microbiology*. 58: 1367-1370.

MOREAU, M.; MOREAU, C.; LE BRAS, M.A. (1976). Quelques moisissures responsables d’altérations de bouchons de Champagne. *Ind. Alim. Agric.* 93(3): 317-320.

MOREAU, M. (1977). Alterations de bouchons par quelques moisissures. *Rev. Franc. Oenol.* 16(6): 63-67.

MOREAU, M. (1978). La mycoflore des bouchons de liège. Son évolution au contact du vin, conséquences possibles du métabolisme des moisissures. *Rev. Mycol.* 42(3): 155-189.

NATURAL CORK QUALITY COUNCIL, Santa Rosa California,
<http://www.corkqc.com>

NEIDLEMANN, S.L.; GEIGERT, J. (1986). Biohalogenation: principles, basic roles and applications. Ellis Harwood, Chichester chapters.

NERADT, T. (1982). Sources of reinfections during cold-sterile bottling of wine. *Am. J. Enol. Vitic.* 33(3): 140-144.

NICHOLSON, D.K.; WOODS, S.L.; ISTOK, J.D.; PEEK, D.C. (1992). Reductive dechlorination of chlorophenols by a pentachlorophenol acclimated methanogenic consortium. *Applied and Environmental Microbiology.* 58: 2280-2286.

PENA-NEIRA, A.; DE SIMON, B.F.; GARCIA-VALLEJO, M.C.; HERNANDEZ, T.; CADAHIA, E.; SUAREZ, J.A. (2000). Presence of cork-taint responsible compounds in wines and their cork stoppers. *European Food Research and Technology.* 211: 257-261.

PEREIRA, H. (1992). The thermochemical degradation of cork. *Wood Sci. Technol.* 26: 259-269.

POLLNITZ A.P. ; PARDON, K.H. ; LIACOPOULOS, D. ; SKOUROUMOUNIS, G.K. ; SEFTON, M.A. (1996). The analysis of 2,4,6-trichloroanisole and other chloroanisoles in tainted wines and corks. *Australian Journal of Grape and Wine Research.* 2: 184-190.

PROGETTO QUERCUS. (1996). Confederazione Europea del Sughero. Parigi, 22 novembre 1996.

PRESCOTT, J.; NORRIS, L.; KUNST, M.; KIM, S. (2005). Estimating a “consumer rejection threshold” for cork taint in white wine. *Food Quality Preference.* 16: 345-349.

PUERTO, F. (1992). Traitement des bouchons: lavage au peroxyde controlé. *Rev. Œnologues.* 18(64): 21-26.

RIBOULET, J.M. (1982). Contribution à l'étude chimique et microbiologique des “goûts de bouchon” dans les vins. Thèse a l'Université de Bordeaux II.

RIU, M.; MESTRES, M., BUSTO, O.; GUASCH, J. (2002). Determination of 2,4,6-trichloroanisole in wine by headspace SPME and GC-ECD. *Journal of Chromatography A*. 997: 1-8.

RIU, M.; MESTRES, M., BUSTO, O.; GUASCH, J. (2006). Quantification of chloroanisoles in cork using headspace solid-phase microextraction and gas chromatography with electron capture detection. *Journal of Chromatography A*. 1107: 240-247.

ROCHA, S; DELGADILLO, I.; FERRER-CORREIA, A.J. (1996). Improvement of the volatile components of cork from *Quercus suber* L. by an autoclaving procedure. *J. Agric. Food Chem.* 44: 872-876.

ROSA, M.E.; PEREIRA, H; FORTES, M.A. (1990). Effects of hot water treatment on the structure and properties of cork. *Wood and Fiber Science*. 22(2): 149-164.

ROSA, M.E.; PEREIRA, H. (1994). The effect of longterm treatment at 100-150 °C on structure, chemical composition and compression behaviour of cork. *Holzforschung*. 48: 226-232.

SANVICENS, N.; SANCHEZ-BAEZA, F.; MARCO, M. P. (2003). Immunochemical determination of 2,4,6-trichloroanisole as the responsible agent for the musty odor of food. 1. Molecular modeling studies for antibody production. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 51: 3924-3931.

SCHAEFFER, A; MEYER, J.P. (1979). Etude sur l'origine du "goût de bouchon" dans les vins. *La presse du Vin Vinetec*; nov.-dic.: 32-34.

SEFTON, M.A.; SIMPSON, R.F. (2005). Compounds causing cork taint and the factors affecting their transfer from natural cork closures to wine – a review. *Australian Journal of Grape and Wine Research*. 11: 226-240.

SILVA PEREIRA, C.; PIRES, A.; VALLE, M.J.; VILAS BOAS, L.; FIGUEIREDO MARQUES, J.J.; SAN ROMAO M.V. (2000a). Role of *Chrysonilia sitophila* in quality

of cork stoppers for sealing wine bottles. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*. 24: 256-261.

SILVA PEREIRA, C.; FIGUEIREDO MARQUES, J. J.; SAN ROMAO, M.V. (2000b). Cork taint in wine: scientific knowledge and public perception. A critical review. *Critical Reviews in Microbiology*. 26: 147-162.

SIMPSON, R.F.; AMON, J.M.; DAW, A.J. (1986). Off-flavour in wine caused by guaiacol. *Food Technology Australian*. 38: 31-33.

SIMPSON, R.F. (1990). Cork taint in wine: a review of the causes. *Australian and New Zealand Wine Industry Journal*. 5: 286-293.

SIMPSON, R.F.; CAPONE, D.L.; SEFTON, M.A. (2004). Isolation and identification of 2-methoxy-3,5-dimethylpyrazine, a potent musty compound from wine corks. *J. Agric. Food Chem.* 52: 5425-5430.

SOLEAS, G.J.; YAN, J.; SEAVER, T.; GOLDBERG, D.M. (2002). Method for the gas chromatographic assay with mass selective detection of trichloro compounds and wines applied to elucidate the potential cause of cork taint. *J. Agric. Food Chem.* 50: 1032-1039.

SPONHOLZ, W.R.; MUNO, H. (1994). Corkiness: a microbiological problem? In: *The cork in oenology. Proceedings of 5th International Congress of Wine*. Chiriotti Editori Pinerolo; pp. 100-106.

SUPRENANT, A. ; BUTZKE, C. E. (1996). Implications of odor threshold variations on sensory quality control of cork stoppers. In *Proceedings 4th International Symposium on Cold Climate Viticulture and Enology*; Communication Service, New York Service Agricultural Experimental Station: Geneva , NY; pp. 70-74.

TANNER, H.; ZANIER, C.; WURDING, G. (1981). Zur analytischen differenzierung von muffton und korkgeschmack in wein. *Schweiz. Z. Obst Weinbau*. 117: 752-757.

TAYLOR, M.K.; YOUNG, T.M.; BUTZKE, C.E.; EBELER, S.E. (2000). Supercritical Fluid Extraction of 2,4,6-trichloroanisole from cork stoppers. *J. Agric. Food Chem.* 48: 2208-2211.

THE MERCK INDEX, 12^o ed. (1996). Merck & Co., Inc. Whitehouse Station, NJ.

TINDALE, C.R.; WHITFIELD, F.B.; LEVINGSTON, S.D.; NGUYEN, T.H.L. (1989). Fungi isolated from packaging materials: their role in the production of 2,4,6-trichloroanisole. *Journal Science Food Agriculture.* 49: 437-447.

UIJL, C.H. (1992). Heat treatment of spices. Beating the bugs ! *international Food Ingredients.* 3: 9-11.

VALADE, M.; PANAIOTIS, F.; TRIBAUT-SOHIER, I. (1993). Les problemes organoleptiques lies au bouchon liege. *Le Vigneron Champenois.* 3/3/93.

VERENITCH, S.S.; LOWE, C.J.; MAZUMDER, A. (2006). Determination of acidic drugs and caffeine in municipal wastewaters and receiving waters by gas chromatography-ion trap tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A.* 1116: 193-203.

WHITFIELD, F.B.; HILL, J.L.; SHAW, K.J. (1997). 2,4,6-Tribromoanisole : a potencial cause of mustiness in packaged food. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 45: 889-893.

ZALACAIN, A.; ALONSO, G.L.; LORENZO, C.; IÑIGUEZ, M.; SALINAS, M.R. (2004). Stir bar sorptive extraction for the analysis of wine cork taint. *Journal of Chromatography A.* 1033: 173-178.