



Universitat de Girona

**DETECCIÓ DE COMPOSTOS VOLÀTILS,  
CLOROFENOLS, CLOROANISOLES I 2,4,6-  
TRIBOMOANISOLE, RELACIONATS AMB EL  
“GUST DE SURO”**

**Sara INSA AGUILAR**

**ISBN: 84-690-0356-9  
Dipòsit legal: GI-858-2006**



Departament de Química  
Àrea de Química Analítica

**Tesi Doctoral**

**DETECCIÓ DE COMPOSTOS VOLÀTILS, CLOROFENOLS,  
CLOROANISOLES I 2,4,6-TRIBROMOANISOLE, RELACIONATS  
AMB EL “GUST DE SURO”**

Memòria presentada per **Sara Insa  
Aguilar** per optar al grau de Doctora  
en Ciències Químiques.

**Girona, 2006**





Departament de Química  
Àrea de Química Analítica

La sotasignant Enriqueta Anticó Daró, Professora Titular del Departament de Química de la Universitat de Girona,

CERTIFICA, que la memòria que porta per títol **Detecció de compostos volàtils, clorofenols, cloroanisoles i 2,4,6-tribromoanisoles, relacionats amb el “gust de suro”** recull el treball realitzat, sota la meua direcció per Sara Insa Aguilar, Llicenciada en Química, i que constitueix la seva memòria de Tesi Doctoral per optar al grau de Doctora en Ciències, especialitat Química, per la Universitat de Girona.

I perquè així consti, signa la present certificació.

Girona, 17 de Gener del 2006.

Dra. Enriqueta Anticó Daró

La present Tesi doctoral s'ha dut a terme al Departament de Química (Àrea de Química Analítica) de la Universitat de Girona, gràcies a una beca predoctoral (referència: AP2001-0989) per a la Formació de Professorat Universitari (FPU) concedida pel Ministerio de Educación, Cultura y Deporte (MECD). La realització del conjunt de treballs desenvolupats durant el primer període d'aquesta Tesi doctoral ha estat possible gràcies al finançament del projecte d'investigació concedit pel Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (Proyecto N° VIN00-020-C2-1). Els estudis recollits a la secció 4.5 han estat realitzats al Departamento de Química Analítica de la Universidad de Zaragoza com a resultat de dues estades breus concedides dins del Programa Nacional de becas de FPU.

# *Índex*

---

<b>1. Introducció general .....</b>	<b>1</b>
1.1. L'AROMA DEL VI .....	3
1.2. EL TAP DE SURO.....	5
1.2.1. Morfologia i composició química del suro.....	5
1.2.2. Propietats físiques del suro.....	7
1.2.3. Localització i producció de la indústria surera. Catalunya en el marc surer..	9
1.2.4. Procés d'elaboració del taps de suro natural. Normativa.....	10
1.2.5. Alternatives al tap de suro.....	14
1.3. EL "GUST DE SURO" .....	18
1.3.1. Compostos relacionats amb el "gust de suro".....	20
1.3.2. Origen del defecte "gust de suro".....	30
1.3.3. La migració dels compostos relacionats amb el "gust de suro" procedents del tap de suro al vi.....	37
1.3.4. Prevenció i eliminació del "gust de suro".....	40
1.3.5. Testos de control del "gust de suro" en la indústria tapera.....	46
1.4. REFERÈNCIES.....	49
<b>2. Metodologies .....</b>	<b>55</b>
2.1. LA PROBLEMÀTICA DE L'ANÀLISI DE CLOROANISOLES I CLOROFENOLS EN VI I SURO.....	57
2.2. PRETRACTAMENT DE LA MOSTRA .....	59
2.2.1. L'extracció amb dissolvent.....	59
2.2.2. L'extracció en fase sòlida (SPE).....	64
2.2.3. La microextracció en fase sòlida (SPME).....	72
2.2.4. Altres tècniques de pretractament de mostres de vi i suro per a l'anàlisi de cloroanisoles i clorofenols.....	91
2.3. MÈTODES D'ANÀLISI: LA CROMATOGRÀFIA DE GASOS (GC).....	94
2.4. REFERÈNCIES.....	100
<b>3. Objectius.....</b>	<b>109</b>
<b>4. Publicacions.....</b>	<b>113</b>

4.1. Development of solid-phase extraction and solid-phase microextraction methods for the determination of chlorophenols in cork macerate and wine samples.....	115
4.2. Ethanol/water extraction combined with solid-phase extraction and solid-phase microextraction for the determination of chlorophenols in cork stoppers.....	123
4.3. Assays on the simultaneous determination and elimination of chloroanisoles and chlorophenols from contaminated cork samples.....	131
4.4. Assessment of the matrix effect on the headspace solid-phase microextraction (HS-SPME) analysis of chlorophenols in wines.....	161
4.5. Highly selective solid-phase extraction and large volume injection for the robust gas chromatography-mass spectrometric analysis of TCA and TBA in wines.....	193
<b>5. Discussió dels resultats .....</b>	<b>203</b>
<b>6. Conclusions .....</b>	<b>225</b>
<b>7. Agraïments .....</b>	<b>233</b>

## ***Abreviatures***

---

<b>AED</b>	Detector d'emissió atòmica
<b>ASE</b>	Extracció accelerada amb dissolvent
<b>BI</b>	Bescanvi iònic
<b>BSTFA</b>	N,O-bis(trimetilsilil)-trifluoroacetamida
<b>Carboxen/PDMS</b>	Carboxen/polidimetilsiloxà
<b>CP</b>	Clorofenols
<b>CW/DVB</b>	Carbowax/divinilbenzè
<b>CW/TPR</b>	Carbowax/resina templada
<b>DCA</b>	Dicloroanisole
<b>DVB</b>	Divinilbenzè
<b>DVB/CAR/PDMS</b>	Divinilbenzè/carboxen/polidimetilsiloxà
<b>DVB-VP</b>	Divinilbenzè-vinilpirrolidona
<b>ECD</b>	Detector de captura d'electrons
<b>ED</b>	Detector electroquímic
<b>FID</b>	Detector d'ionització de flama
<b>FN</b>	Fase normal
<b>FR</b>	Fase reversa
<b>GC</b>	Cromatografia de gasos
<b>HS-MS</b>	Headspace-Espectrometria de masses
<b>HS-SPME</b>	Headspace-Microextracció en fase sòlida
<b>ICP-MS</b>	Espectrometria de masses amb ionització mitjançant plasma induït per alta freqüència
<b>LC</b>	Cromatografia líquida
<b>LOD</b>	Límit de detecció
<b>LLE</b>	Extracció líquid-líquid
<b>LVI</b>	Injecció de grans volums
<b>MDGC</b>	Cromatografia de gasos multidimensional
<b>MDMP</b>	2-Metoxi-3,5-pirazina
<b>MHS-SPME</b>	Headspace-Microextracció en fase sòlida múltiple
<b>MS</b>	Espectrometria de masses
<b>PA</b>	Poliacrilat
<b>PAHs</b>	Hidrocarburs aromàtics policíclics
<b>PCA</b>	Pentacloroanisole
<b>PCP</b>	Pentaclorofenol
<b>PDMS</b>	Polidimetilsiloxà
<b>PDMS/DVB</b>	Polidimetilsiloxà/divinilbenzè
<b>PS-DVB</b>	Poliestirè-divinilbenzè
<b>PTV</b>	Vaporitzador de temperatura programada
<b>RSD</b>	Desviació estàndard relativa
<b>SBSE</b>	Stir bar sorptive extraction
<b>SLE</b>	Extracció sòlid-líquid
<b>SPE</b>	Extracció en fase sòlida
<b>SPME</b>	Microextracció en fase sòlida



<b>TBA</b>	2,4,6-tribromoanisole
<b>TBP</b>	2,4,6-tribromofenol
<b>TCA</b>	2,4,6-tricloroanisole
<b>TCP</b>	2,4,6-triclorofenol
<b>TeCA</b>	2,3,4,6-tetracloroanisole
<b>TeCP</b>	2,3,4,6-tetraclorofenol
<b>TMCS</b>	Trimetilclorosilà
<b>UV-Vis</b>	Detector ultraviolat-visible
<b>VOCs</b>	Compostos orgànics volàtils

## ***Publicacions***

---

A continuació exposo la memòria que constitueix la meva tesi doctoral, la qual es presenta com a compendi de publicacions. Tot i que els articles que s'adjunten en l'apartat 4 conformen el cos central d'aquesta memòria, faig constar que, durant el període d'investigació corresponent al programa de doctorat, he participat activament en la realització d'altres projectes estretament vinculats a la recerca que es desenvolupa en el grup. Fruit d'aquestes col·laboracions n'han sorgit les següents publicacions:

R. Juanola, L. Guerrero, D. Subirà, S. Insa, V. Salvadó, J.A. Garcia Regueiro, E. Anticó, Relationship between sensory and instrumental analysis of 2,4,6-trichloroanisole in wines and cork stoppers, *Anal. Chim. Acta*, 513 (2004) 291.

Enriqueta Anticó, Sara Insa, Roser Juanola, Victoria Salvadó, El tricloroanisol: nuevas perspectivas en la investigación sobre su presencia y eliminación. *Congrés internacional suredes, fàbriques i comerciants. Passat, present i futur del negoci surer*. En preparació.



## ***1. Introducció general***

---



## **1.1. L'AROMA DEL VI**

L'aroma del vi és una mescla complexa de compostos orgànics volàtils que pertanyen a famílies químiques diferents i presenten característiques organolèptiques particulars. Si bé els primers estudis van estar encaminats a la recerca de la composició global del vi, en els darrers anys els treballs realitzats es centren en un coneixement més minuciós del seu perfil aromàtic, amb el desenvolupament de metodologies analítiques que permeten identificar i quantificar centenars de substàncies volàtils que en formen part. Molts d'aquests constituents provenen del most, o millor dit de la seva matèria primera: el raïm. D'altres s'originen al llarg de la seva elaboració, ja sigui durant la fermentació, o en el posterior procés d'envelliment [1]. Són, per tant, aquestes molècules les que conformen el perfil aromàtic del vi, que tants esforços ha requerit per a la seva caracterització, tant a nivell sensorial com instrumental. Malgrat tot, la dificultat a l'hora d'interpretar l'aroma del vi va més enllà. Tot i conèixer la seva composició, el vi no es pot reconstituir mitjançant la mescla dels components individuals. Aquest fet s'explica a través de la multidimensionalitat de la percepció de l'aroma. Substàncies que es troben a molt baixa concentració poden originar una contribució molt significativa aportant unes aromes molt característiques, mentre que d'altres a concentracions superiors no contribueixen a l'olor. No és suficient la identificació i quantificació dels compostos que intervenen en l'aroma sinó que és necessari determinar-ne la seva rellevància per així poder-ne jerarquitzar les notes aromàtiques.

La percepció de l'aroma és un dels criteris més considerables a l'hora d'avaluar un producte com és el vi, i que sovint determina les preferències d'un individu. L'anàlisi sensorial així esdevé una eina clau per examinar les propietats organolèptiques del vi. De fet qualsevol classificació d'un producte alimentari implica la seva valoració sensorial. Si bé en l'anàlisi sensorial del vi hi intervenen tots els sentits, el gust i l'olfacte resulten essencials per definir-ne i caracteritzar-ne l'aroma. Possiblement és l'olfacte el sentit que més contribueix en el gaudiment del vi. Una part de l'aroma es rep durant l'olfacció, mentre que una altra part es manifesta durant la ingestió i correspon al sabor. El terme "aroma retronasal" fa referència al retorn de compostos volàtils presents en la boca durant la degustació i produeix simultàniament una reacció olfactiva. Quan s'empren persones com a instruments de mesura, la subjectivitat del tastador té un pes

específic. Una determinada olor despertarà sensacions, emocions i records propis a cada individu. Per tal de normalitzar el procés del tast de vi s'han elaborat normatives per estandarditzar l'anàlisi sensorial [2]. En aquest recull de directrius s'especifiquen les condicions en les quals s'ha de dur a terme el tast: les condicions de la cambra on tindrà lloc, les copes emprades, la selecció i formació dels jutges, la metodologia, etc. Sens dubte, un dels majors reptes en l'anàlisi sensorial ha estat la descripció de les olors. L'elecció de la terminologia més adequada no resulta una tasca fàcil. Els descriptors escollits han de ser pertinents al cas d'estudi i a la vegada el màxim de precisos i discriminants. Concretament, l'any 1987, Noble et al. [3] van proposar una terminologia estandarditzada per descriure les aromes del vi, que modificava i ampliava la coneguda "roda de les aromes" [4]. Aquesta classificació va ser creada per facilitar la comunicació entre els professionals del sector i permet caracteritzar la sensació aromàtica en base a tres termes, de general a particular. D'aquesta manera, es pot realitzar una rigorosa avaluació de l'aroma, que en determinades ocasions s'utilitzarà per recomanar favorablement un vi. Ara bé, tot aquest coneixement sensorial no assegurarà l'acceptació del consumidor ja que, al cap i a la fi, la percepció no deixa de ser una interpretació individual.

Sota la mirada d'un consumidor cada vegada més expert i exigent, els paràmetres de qualitat del vi vénen principalment establerts per l'aroma. Com a resultat dels avenços científics i tecnològics, s'ha aconseguit elaborar vins molt complexes i amb aromes molt delicades. Tota aquesta innovació ha estat fruit d'una major coneixença del vi, els seus constituents i les transformacions que hi tenen lloc. El vi és un producte que evoluciona i, conseqüentment, el seu aroma també es modifica. Alguns compostos odorífers que es troben en vins joves poden desaparèixer, mentre que d'altres es poden generar al llarg del temps. A vegades aquests canvis desencadenen en un exalçament de les notes aromàtiques, però en determinades ocasions apareixen olors desagradables. Seria incomplet parlar de l'aroma del vi sense incloure els anomenats "*off-flavours*", o substàncies que aporten aromes indesitjables i que, per tant, perjudiquen la qualitat. La naturalesa i procedència d'aquestes olors pot ser molt diversa, però la seva presència en el vi és un indicador que les condicions d'elaboració i/o conservació no han estat les adequades.

La intersecció entre el sector vitivinícola i el surer la constitueixen els taps. L'associació vi - suro està subjecta a uns antecedents mil·lenaris. Els fenicis ja tapaven les àmfores amb suro però no fou fins a la segona meitat del segle XVIII quan es va començar a emprar de forma generalitzada pel tapament de vins, sempre en receptacles de vidre que evolucionaren fins a les ampolles actuals. La història considera Pierre Perignon (1639-1715), un frare benedictí de l'abadia d'Hautvillers, com el pare de la utilització del suro pel tapament del Champagne i a partir d'aquest moment, progressivament, s'utilitzà per a la resta de vins. L'ús tan extens que s'ha destinat al tap de suro en l'enologia és fruit de les seves característiques, que el fan un material idoni pel tapament de les ampolles de vi. No obstant, el suro és un material que no es troba exempt de polèmica. De forma generalitzada es considera que el tapament és decisiu en l'evolució aromàtica durant l'emmagatzematge. El tapament ideal seria aquell que permetés mantenir les propietats organolèptiques del producte tot permetent la seva evolució natural. Atès que el tap està en contacte directe amb el vi, compostos volàtils i no-volàtils que són solubles en solucions hidroalcohòliques poden migrar al vi i contribuir positivament o negativament en les seves propietats sensorials. El contingut soluble del suro ha estat escassament estudiat [5]. Certs polifenols de baix pes molecular procedents del suro i que també s'han identificat en fustes de roure destinades a l'envelliment del vi, han estat considerats susceptibles a transferir-se [6]. Per altra banda, l'aparició d'olors i gustos estranys que es consideren cedits pel tap ha posat en entredit les pràctiques de la indústria tapera [7,8,9,10]. A causa de la controvèrsia generada envers el tap de suro, es fa imprescindible introduir nocions que permetin comprendre la funcionalitat del tapament per excel·lència dels vins.

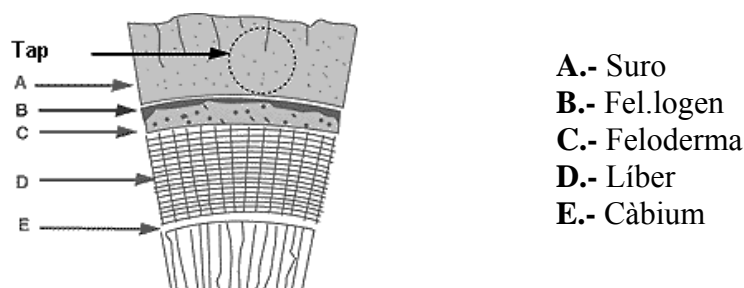
## **1.2. EL TAP DE SURO**

### **1.2.1. Morfologia i composició química del suro.**

El tap de suro és un producte natural que prové de l'escorça de l'alzina surera (*Quercus suber*). El suro o suber deriva d'un teixit meristemàtic d'origen secundari, el fel·logen, que substitueix l'epidermis en el creixement secundari de la planta. L'arbre produeix cada any un espessor de suro que varia d'un a 10 mm segons l'edat de l'escorça, de l'arbre, la seva salut i les condicions ambientals on s'ubica. Cada creixement anual



queda separat pel precedent per una franja ben definida de color més fosc. Un tall transversal de l'arbre presenta els següents teixits de l'exterior a l'interior [11]:



**Figura 1.1.** Disposició transversal dels teixits de l'alzina surera.

El suro està constituït per gairebé 40 milions de cèl·lules prismàtiques, unitats hexagonals o pentagonals, allargades i disposades en estrats, que formen un teixit sense espais intercel·lulars. D'altra banda, el teixit suberós presenta sempre una estructura típica de discontinuïtat: la lenticel·la o porus que recorre radialment la massa de suro. Macroscòpicament les lenticel·les es presenten en el tap en forma de forats i són transversals al creixement dels anells. En concret, són més nombroses en els anells de major edat, on, fins i tot, es poden perllongar per tota l'amplada del tap [12]. Les lenticel·les són permeables als gasos i permeten regular l'intercanvi gasós entre els teixits vius del tronc i el medi ambient, a l'hora que són fàcilment envaïdes per microorganismes [13].

La composició química del suro és difícil d'establir a causa de la seva complexitat, la dificultat d'extreure els seus constituents i la seva variabilitat, fins i tot entre arbres d'un mateix bosc. Els principals components del suro, els quals majoritàriament són polímers, es mostren a la **Taula 1.1**, on també s'especifiquen les propietats físiques que se'ls atribueixen [14]. Les ceres i la suberina representen més de la tercera part del total i posseeixen un caràcter lipofílic. Les ceres es troben constituïdes per una mescla de hidrocarburs alifàtics, cadenes llargues d'alcohols i triterpens. D'altra banda, estructuralment la suberina és similar a la lignina essent un polímer d'elevat pes molecular format per glicerol, cadenes llargues d'àcids grassos, alcohols i hidroxiaïcids que confereixen al suro propietats impermeables que permeten a les cèl·lules de l'escorça omplir-se d'aire i assumir un fort poder aïllant i protector.

Component	Estructura	Propietats físiques	Contingut (%)
Suberina	Àcids grassos, alcohols <sup>a</sup>	Resilència, impermeabilitat	33-53
Lignina	Alcohols aromàtics <sup>a</sup>	Resistència a la compressió	18-34
Polisacàrids	Monosacàrids <sup>a</sup>	Resistència a l'elongació	12-30
Ceres	Alcohols, hidrocarburs <sup>b</sup>	Impermeabilitat	4-8
Tanins	Àcid el·làgic, proantocianides <sup>a</sup>		5-7

<sup>a</sup>Estructura polimèrica

<sup>b</sup>Mescla

**Taula 1.1.** Propietats, estructura i contingut dels principals components del suro.

En general, els components majoritaris del suro resulten força inerts i per tant no contribueixen directament en les propietats aromàtiques del suro. D'altra banda, s'han pogut identificar més de cent compostos volàtils minoritaris procedents de taps de suro, com el benzaldehyd, àcid acètic, 1-etil-2,3-metoxibenzè, 2,4,6-tricloroanisole, entre d'altres [15]. Aquestes substàncies procedeixen del propi suro o deriven de la degradació enzimàtica o química produïda durant el procés de manufactura. Com a conseqüència de la climatologia, el sòl i les possibles diferències mediambientals entre planxes de suro procedents de diverses regions, la corresponent fracció volàtil resultarà característica fent possible així determinar-ne l'origen geogràfic. Per exemple, el contingut de volàtils de planxes de suro espanyoles és considerablement més elevat que el contingut en planxes de procedència portuguesa [16]. Addicionalment, si la comparació es realitza entre taps nous i usats, en aquests darrers s'hi poden distingir substàncies com alcohols, etil èsters i d'altres compostos volàtils que comunament es troben al vi. Aquest fet posa de manifest la capacitat del suro per adsorbir substàncies depenent de la seva volatilitat, la temperatura i la humitat.

### 1.2.2. Propietats físiques del suro.

L'estructura cel·lular del suro li confereix certes propietats físiques molt valuoses per les aplicacions enològiques a les quals es destina i que en fa difícil la seva substitució per altres productes sintètics. Si es duu a terme un correcte embotellat utilitzant taps de suro d'elevada qualitat, el temps útil d'aquests es pot allargar fins als 40-50 anys. L'exclusiva estructura de les seves cèl·lules permet que el seu contingut d'aire variï entre el 60-85% del seu volum total, fet que li proporciona una gran lleugeresa i la capacitat de ser fàcilment comprimit sense perdre la seva flexibilitat. Conjuntament amb

la compressibilitat, el tap de suro presenta també excel·lents propietats elàstiques o resiliència. El diàmetre de l'interior del coll de les ampolles que habitualment s'empren per l'embotellat de vi és d'uns 18 mm aproximadament, mentre que el diàmetre del tap abans de la inserció acostuma a ser d'uns 24 mm. Un cop s'ha introduït el tap, el seu diàmetre es veu reduït un 25%, que representa el 45% del seu volum total [16]. L'elasticitat inherent del suro permet mantenir un tapament òptim durant llargs períodes de temps. Després d'una compressió recupera gairebé el 85% del seu volum inicial i el 94% d'aquest, passades les 24 hores. En el cas de vins escumosos, el tap de suro pot resistir les pressions de 5 a 6 atmosferes que hi ha a l'interior de les ampolles. A més, el suro és un bon esmorteïdor de vibracions, té un gran poder de fricció, és resistent al desgast i inert als reactius químics al mateix temps que presenta una elevada tolerància a canvis de pressió i temperatura, que és la clau per mantenir un tapament uniforme.

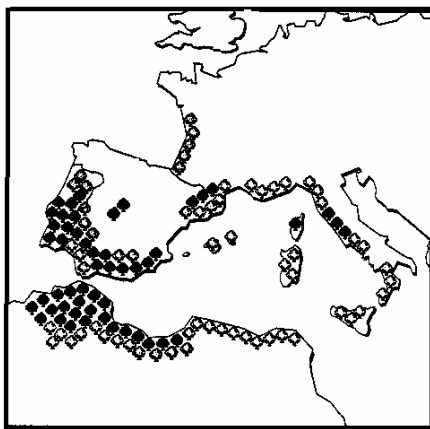
Una altra propietat essencial del tap de suro és la seva impermeabilitat als líquids, que és fruit de l'alternança de capes de suberina i ceres. Contràriament, el suro permet una migració lenta de gasos a través dels microscòpics canals situats en les parets cel·lulars. Les dimensions d'aquests canals només permeten el pas de gasos i eviten així qualsevol pèrdua el líquid. Un cop el tap de suro es col·loca a l'ampolla, la pressió de l'aire que es troba de forma natural en les cèl·lules del suro esdevé una eficient barrera per prevenir l'entrada de l'oxigen ambiental. D'aquesta manera es protegeix el vi de l'oxidació. D'altra banda, l'àrea superficial interna del tap és de 2-3 m<sup>2</sup>. Aquesta propietat evita la pèrdua de molècules volàtils del vi a la vegada que obstaculitza l'entrada de compostos procedents de l'exterior que podrien alterar el seu perfil aromàtic.

Com a resultat d'aquestes inusuals propietats físiques, el suro s'ha convertit en un material idoni per al tapament de vins ja que permet satisfer els requeriments associats a la seva funcionalitat, que en aquest cas són [17,18]:

- 1.- Protegir el vi amb la finalitat de facilitar l'emmagatzematge, evitant possibles modificacions degudes a agents externs (olors, oxidacions, llum, etc.).
- 2.- Aconseguir un tapament efectiu del vi per tal que no es produeixin fuites.
- 3.- No impartir gustos ni olors que rebaixin la qualitat del vi.
- 4.- Facilitar la seva introducció i extracció de manera que aquestes operacions no requereixin un gran esforç o que el propi tap quedi introduït dins l'ampolla.
- 5.- No cedir partícules a l'interior de l'ampolla.

**1.2.3. Localització i producció de la indústria surera. Catalunya en el marc surer.**

L'alzina surera és un arbre típic i autòcton de la mediterrània occidental i d'una part de l'atlàntica. Per tant, es pot relacionar la localització d'aquesta indústria a indrets de clima suau i humit, com són: Portugal, Espanya, Itàlia, França, Marroc, Algèria i Tunísia (vegeu **Figura 1.2**). La plantació d'alzina surera també s'ha efectuat en altres zones incloent la mediterrània oriental, Argentina, Uruguai, Xile, Sud Àfrica, Austràlia, Califòrnia i Arizona. En moltes d'aquestes regions però no es produeix suro en quantitats importants ni amb la qualitat requerida.



País	Superfície (ha) (x1000)	Producció de suro (t) (x1000)
Portugal	859	136
Espanya	725	75
Algèria	440	10
Marroc	377	12
Itàlia	144	11
Tunísia	99	8
França	44	4
<b>Total</b>	<b>2688</b>	<b>256</b>

**Figura 1.2.** Localització de l'alzina surera. Superfície de bosc i estimació de la producció de suro [14].

La producció de suro és de vital rellevància per l'economia d'aquests països, essent Portugal el major productor (el 30% del valor total de les exportacions portugueses és conseqüència dels productes derivats del suro) seguit d'Espanya. Els productes derivats del suro generen uns ingressos al voltant de 1.5 bilions d'euros anualment, i per tant, el suro natural representa un dels més importants productes forestals a nivell mundial [19]. El suro s'empra en la fabricació de gran varietat d'articles, materials per a la construcció, per l'envasat i l'embalatge, calçats, etc., no obstant, la manufactura de taps constitueix l'activitat més significativa. Aproximadament el 90% del procés de producció del suro es destina a l'elaboració de taps, tant per a vins tranquils com escumosos.

El sector surer a Espanya es centra bàsicament a Andalusia, Extremadura i Catalunya. En especial, Catalunya i, principalment la província de Girona, disposa d'un gran

potencial de fabricació de productes de suro. La indústria surera catalana compta amb gran prestigi en els mercats nacionals i internacionals. Concretament la indústria dedicada a la fabricació de taps és la més important del sector surer català. La província de Girona fou el bressol de les primeres empreses sureres lligades a l'elaboració de taps i de material aïllant aprofitant els residus dels primers. La indústria surera catalana, està estructurada en petites i mitjanes empreses, en molts casos d'àmbit familiar, que es troben organitzades a través d'Aecork (Associació d'Empresaris Surers de Catalunya) i que es caracteritzen per un elevat nivell d'autoexigència. És precisament el factor de qualitat l'element diferenciador dels productes i empreses sureres catalanes.

### **1.2.4. Procés d'elaboració del taps de suro natural. Normativa.**

El procés de manufactura del tap de suro es troba íntimament lligat a una antiga tradició. Aquest fet però no ha obstaculitzat la implantació de controls i noves tecnologies fruit del coneixement científic i la voluntat d'oferir un producte competitiu que satisfaci les necessitats actuals. L'objectiu final ha esdevingut garantir un producte de qualitat. Amb la finalitat d'aprofundir en el procediment de fabricació de taps per a vins tranquils, a continuació se'n detallen les principals etapes.

### **La pela del suro, rentat, emmagatzematge i classificació**

El primer estadi del procés de fabricació de taps de suro implica l'extracció manual del suro del tronc, i ocasionalment de les branques de major diàmetre. La part de l'arbre més pròxima a la base es descarta. El suro s'extreu aplicant talls horitzontals i posteriorment verticals a l'escorça. L'alzina surera té una vida productiva de 100 a 150 anys, la qual s'inicia amb la primera pela o lleva, que a Catalunya s'acostuma a realitzar als 40 anys d'edat de l'arbre. No obstant, en aquesta primera extracció s'obté el suro "mascle" o "pelegrí", molt irregular, de gran duresa, i com que no és apte per la manufactura de taps es destina a altres usos. Les lleves posteriors de suro "femella", de superfície més regular, s'han de fer cada 9 a 16 anys, durant els mesos d'estiu, i a partir de la tercera s'obté una escorça amb propietats per ser explotada. El millor suro és el que s'obté de la tercera a desena lleva; a partir d'aquest moment disminueix la qualitat. Tanmateix, cal assegurar la "procedència del suro", mitjançant el coneixement de la producció, factors ambientals i l'edat de l'arbreda [20].

Per tal de mantenir l'alzina surera protegida de l'atac de microorganismes i altres agents sovint s'apliquen productes químics. Aquesta mesura de prevenció pot desencadenar però altres problemes greus, com la posterior aparició de substàncies contaminants.

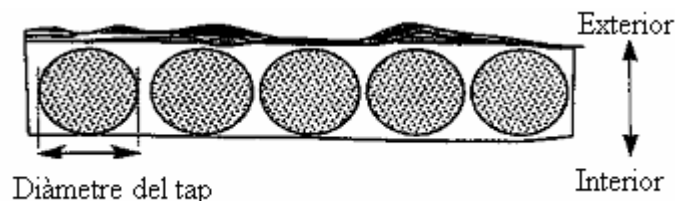
Un cop obtingudes les planxes i sotmeses a un primer rentat, aquestes s'apilen i es deixen reposar, amb la part interior encarada a terra, a l'aire lliure, tot i que també es poden emmagatzemar sota cobert, durant 10 o 12 mesos. Passat aquest període, les planxes es classifiquen visualment en funció de la seva qualitat i es transporten fins a la fàbrica per ser processades.

### **Elaboració del taps de suro natural: bullit, estabilització, llescat i perforat**

Generalment, el primer tractament que es realitza a la fàbrica és la segona bullida. Amb aquesta operació s'aconsegueix eliminar del suro la càrrega de microorganismes i substàncies contaminants com tanins i polifenols solubles, al mateix temps que confereix flexibilitat i ductilitat a les planxes per tal de facilitar-ne la seva manipulació. És recomanable el recanvi de l'aigua freqüentment, atès que aquesta queda plena d'impureses que poden constituir focus de contaminació en els bullits successius.

Després de la bullida, les planxes s'emmagatzemen durant 2 o 4 setmanes sota un ambient airejat que permeti equilibrar el contingut d'humitat (15-18%). Aquesta etapa de maduració o estabilització es considera essencial en el desenvolupament de les propietats del producte final i ha de ser controlada per prevenir el creixement incontrolat de microorganismes.

Arribats a aquest punt, i després d'una nova tria, les planxes es llesquen amb un gruix que ve determinat per la seva utilitat posterior. Si l'objectiu de l'operació implica l'encunyat de taps, la perforació es realitza segons s'indica a la **Figura 1.3**.



**Figura 1.3.** Perforació de la planxa de suro per obtenció de taps.

Els taps es perforen amb un cilindre buit que té el mateix diàmetre que el tap. Normalment aquesta operació es troba totalment automatitzada. Un cop obtingut el tap brut aquest s'esmerila per tal de proporcionar-li la llargada exacte, a la vegada que es deixen les superfícies perfectament llises i sense impureses. A continuació té lloc la selecció, segons les corresponents classes i qualitat, però sempre en funció de la seva major o menor porositat. Per tal que la qualitat del tap sigui major cal una densitat de porus baixa. Aquesta classificació, encara que es pot realitzar de forma manual, actualment també es troba mecanitzada.

### **Acabat dels taps de suro: tria, rentat, marcatge, tractament de superfície i embalatge**

Els taps que hauran estat classificats, se sotmeten a l'etapa de rentat, que té com a objectiu desinfectar (esterilitzar) i desodoritzar, sense oblidar l'aspecte estètic. Amb el rentat s'intenta blanquejar el tap perquè adquireixi una aparença més uniforme i amb una coloració clara per tal de satisfer els cànons de qualitat visual. L'elecció dels productes per realitzar aquesta funció (peròxids, metasulfit de potassi, etc.) ha estat motiu de discussió, ja que probablement molts dels problemes associats al tap han derivat de rentats amb reactius inadequats. Després és necessari assecar el suro fins a un contingut d'humitat del 6-8% (nivells superiors permetrien el creixement de microorganismes, aportant aromes no desitjades al tap) [21].

Un cop s'efectua la darrera tria, té lloc el marcatge de la superfície mitjançant tinta o amb instruments metàl·lics calents. Finalment, s'apliquen els tractaments de superfície per tal de [22]:

- facilitar el tapament i l'extracció del tap dins l'ampolla,
- millorar la impermeabilitat restaurant les ceres que es perden durant les etapes de bullit i rentat,
- omplir imperfeccions de la superfície del suro,
- disminuir el potencial de fuites i evitar que el tap s'introdueixi dins l'ampolla.

Pel tractament de superfície habitualment s'utilitzen dos tipus de productes: parafina, hidrocarburs de cadenes llargues, que no reaccionen ni amb el suro ni amb el vi i que incrementen la capacitat de tapament i silicones, polímers oxigenats que redueixen la fricció entre el tap i l'ampolla i presenten diferents propietats depenent de la llargada de la cadena.

Els taps acabats s'empaqueten en bosses sota buit i SO<sub>2</sub> per mantenir les condicions asèptiques durant els mesos d'emmagatzematge.

A partir d'aquest moment ja es disposa del tap acabat que pot ésser transportat i emmagatzemat al seu destí final: el celler.

### **Normativa**

Les directives europees són molt rigoroses amb els productes que s'han de posar en contacte amb els aliments. Segons l'article 2 de la directiva 89/109/CEE, s'estableix que:

*“Els materials i objectes hauran d'estar fabricats conforme les bones pràctiques de fabricació per tal que, en les condicions normals o previsibles d'ús, no cedeixin components als productes alimentaris en la quantitat que pugui: representar un perill per a la salut humana o ocasionar una modificació inacceptable de la composició dels productes alimentaris o una alteració de les seves característiques organolèptiques”.*

Amb la finalitat d'assegurar la qualitat i la higiene dels taps al llarg de tota la seva cadena d'elaboració, emmagatzematge i distribució, la Confederació Europea del Suro (CE-Liège), entitat que agrupa indústries i organismes especialitzats de 6 països europeus amb més influència en el sector surer, va crear el 1996 un Codi Internacional de Bones Pràctiques Taperes (SYSTECODE). Es tracta d'un compendi de directrius aplicades a tot el procés de producció del tap de suro, que inclouria des de l'entrada de la matèria primera fins a l'obtenció del producte. Els països que s'han acollit a aquest programa de certificació són Portugal, Espanya, França, Itàlia, Alemanya i Marroc. El caire voluntari d'adopció d'aquestes pràctiques ha posat de manifest l'interès del sector surer en vetllar per la qualitat dels taps, ja que el nombre d'empreses adscrites a aquest programa ha passat de 177 en la primera campanya (1999-2000) a 439 en l'actualitat (2004-2005) [23]. Aquest procés de certificació implica realitzar una auditoria o avaluació sistemàtica segons els requisits establerts en el SYSTECODE per part d'un expert en el sector d'elaboració de taps i un auditor de l'entitat externa. Es poden certificar tant activitats com seria la “Fabricació de taps de suro natural per a vins tranquils” com operacions com el “Rentat”. En general, la indústria surera manté un elevat compliment del SYSTECODE, malgrat que en cada campanya el nivell d'exigència requerit és superior.



Adicionalment, s'han anat implantant altres sistemes amb l'objectiu de garantir de forma imparcial la qualitat del tap de suro pel seu posterior ús a la bodega. En aquest marc s'englobarien les normes ISO 9000 que es centren en l'eficàcia del sistema de gestió. El procés d'estandardització i normalització de productes de suro també s'acompleix mitjançant l'elaboració d'unes normes a nivell nacional (UNE) o autonòmic (Normes Catalanes del Suro). Aquestes mesures estan constituïdes per unes referències tècniques, escrites per i per a la indústria dedicada a l'explotació del suro. Amb l'elaboració de nous projectes, aquestes normes van evolucionant per tal d'adequar-se als resultats obtinguts. Finalment, caldria esmentar l'Anàlisi de Perills i Punts Crítics de Control (APPCC), que és un sistema recomanat per la FAO (*"Food and Agriculture Organization"*). Aquest sistema permet identificar, avaluar i controlar aquells perills, físics, químics o biològics que poden afectar a un producte provocant-ne algun efecte perjudicial per a la salut o bé una disminució de la seva qualitat [24].

### **1.2.5. Alternatives al tap de suro.**

El tap de suro és l'opció més acceptada a l'hora d'embotellar vins, a causa de les seves inusuals propietats físiques que permeten una correcta estanquitat i per la llarga vinculació amb el vi. No obstant, el suro és un producte natural i com a tal presenta certa heterogeneïtat que a l'hora de l'embotellat es pot traduir en:

- precipitats (pòsits) de suro dins el vi,
- aparicions d'olors i gustos estranys al vi, com l'anomenat "gust de suro", del qual se'n parlarà en l'apartat següent,
- fuites que donen lloc a pèrdues i oxidacions del vi. Generalment, les fuites són el resultat de taps defectuosos o de baixa qualitat (contenen esquerdes, presenten dimensions inadequades, elevada humitat, porositat, i altres deficiències físiques). Pel que fa a l'oxidació, aquesta es manifesta amb l'aparició d'una coloració marró en el vi al cap de 6 a 18 mesos d'emmagatzematge i va acompanyada de la disminució del contingut en SO<sub>2</sub> i àcid ascòrbic.

Aquestes mancances juntament amb el fet que el suro és un material escàs, difícil de produir i de preu elevat, han portat al desenvolupament de línies de recerca encaminades a elaborar taps que posseïxin propietats equiparables o superiors a les del genuí tap de suro. D'aquesta necessitat sorgeixen els taps de suro aglomerats, fabricats a partir de suro triturat unit per resines de diferents característiques, o bé de perforació de planxes

d'aglomerats. Normalment presenten una densitat superior al tap de suro natural i conseqüentment presenten menor capacitat d'expansió quan es comprimeixen a l'interior de l'ampolla. Aquest tipus de tapament ha generat moltes reticències en la seva utilització atès que, malgrat que en determinades ocasions mostren propietats físiques i eficàcia de tapament similar al tap de suro natural, es poden alliberar substàncies que desencadenen defectes sensorials en el vi. Per això, es limita el seu ús a productes on la tolerància d'aparició d'alteracions és elevada.

Una altra tècnica usada pels productors de suro consisteix en perforar planxes de més baixa qualitat, i posteriorment omplir els forats i esquerdes del tap resultant amb una combinació de pols de suro obtinguda durant el processament i adherida mitjançant adhesius. Els taps resultants s'anomenen colmatats.

De la idea de combinar suro amb materials sintètics neix un nou concepte de tap, el tap tècnic o semisintètic, al qual el suro aporta les seves propietats inherents. Exemples representatius són el tap Cortex, que conté un element de silicona que forma una junta d'estanquitat amb el vidre i permet una correcta evolució del vi, i l'Altec que l'elabora l'empresa francesa Sabaté i que es defineix com el producte resultant de la unió de micropartícules de suro i microesferes de naturalesa polimèrica, les quals proporcionen elasticitat al tap [25]. Recentment, i com a conseqüència de la necessitat de disminuir l'aparició de gustos i olors estranyes al vi a causa del tapament emprat, els taps Altecs han estat sotmesos a un tractament revolucionari anomenat Diamant que es basa en l'ús de fluids supercrítics per a l'extracció selectiva de compostos volàtils del suro.

Un altre tipus de tap és l'aglomerat amb arandales de suro natural, similar al tap de tipus Champagne. Ambdós disposen de discs de suro natural a l'extrem en contacte amb el vi però difereixen pel que fa la forma i l'àmbit d'utilització. Addicionalment s'han introduït al mercat taps que presenten discs als dos extrems (1+1). Aquest tap representa un compromís entre l'aglomerat i el de suro d'una peça, i per tant, pot oferir els avantatges d'ambdós tipus de tapament.

Com a total contraposició al producte natural apareixen els taps sintètics que presenten el gran avantatge de la uniformitat i homogeneïtat i això permet que la evolució del vi en diferents ampolles sigui la mateixa. La seva natura no biològica redueix tota

possibilitat de creixement de microorganismes. A part, són difícils de trencar durant l'obertura de l'ampolla i no adsorbeixen humitat ni tampoc la perden. Malgrat tot, aquests materials acostumen a ser susceptibles a adsorbir i desorbir substàncies volàtils odoríferes, el tapament pot no ser del tot perfecte i poden ser químicament inestables. Finalment, cal fer esment de la càpsula metàl·lica de rosca (“*screw cap*” o “*pilferproof*”), que d'una banda presenta els avantatges de la seva consistència, bona conservació, absència de fuites i fàcil obertura, però se l'associa a vins de baix prestigi.

Aquests taps alternatius al suro poden ser més econòmics a la vegada que poden posseir propietats molt aptes per a la funció de tapament i evitar l'aparició de certs problemes de tipus sensorial. Sens dubte representen una important competència pel tap de suro tradicional. Existeixen pocs estudis comparatius de l'eficiència del tipus de tapament a l'hora de permetre una correcta evolució del vi. Un grup d'investigadors de la Facultat d'Enologia de Tarragona (URV) conjuntament amb l'Institut Català del Suro van estudiar el canvi de coloració, la concentració d'acetaldehid i l'oxidació d'un vi blanc en funció de diferents tapament i la posició d'emmagatzemat de les ampolles (horitzontalment i verticalment) [26]. Mentre el tap sintètic va presentar pitjors prestacions en relació a l'oxidació, els altres (taps de suro natural, semisintètics, etc.) van oferir resultats semblants. Pel que fa a la posició de l'ampolla, en general, es va comprovar que la vertical donava lloc a una major oxidació en gairebé tots els sistemes de taponat. El procés d'oxidació provocat per l'oxigen dissolt en el vi, és un paràmetre que ha estat objecte d'anàlisi comparant diferents classes de taps i condicions ambientals [27]. Resultats més representatius s'han obtingut examinant aspectes físics de 14 tipus de taps i la composició i propietats sensorials del corresponent vi blanc després d'un període de 20 mesos [28]. En aquest treball es va determinar que el millor comportament enfront l'evolució oxidativa del vi el proporcionava la càpsula de rosca seguit del tap de suro natural. Com a resposta a la necessitat de demostrar les aptituds dels taps sintètics per a la correcta conservació del vi, Silva i col·laboradors [29] van assajar-ne els seus paràmetres mecànics (força d'extracció, elasticitat) i la interacció amb la matriu (contingut de SO<sub>2</sub>, acidesa volàtil). Es va concloure que els taps sintètics mantenien les seves propietats mecàniques i asseguraven una correcta preservació del vi en un període de temps d'un a 2 anys. Finalment, un altre aspecte a tenir en compte és la capacitat del tipus de tapament per adsorbir compostos que formen part del perfil aromàtic del vi. Aquest fenomen, que rep el nom de “*flavour scalping*”, va ser examinat

per Capone i col·laboradors [30]. Per establir la capacitat d'adsorció es varen addicionar a un vi blanc diferents compostos (iso-butilmetoxipirazina, guaiacol, vanillina, 4-etilfenol, etc.) a concentracions prou elevades per poder distingir-ne els possibles canvis; el vi es va embotellar i posteriorment es va realitzar el tapament. Després d'un període de dos anys es va observar que la quantitat de certs compostos aromàtics afegits al vi s'havia modificat significativament, fet que, a vegades, es podia atribuir a l'adsorció per part del tap emprat. Tan sols quan es va usar un tapament de rosca metàl·lica no es van donar lloc processos d'adsorció de les substàncies considerades.

Com a conclusió es pot afirmar que no existeix un tap perfecte ja que tots presenten certs avantatges però també mancances. Per tal de sintetitzar les qualitats dels diferents taps d'una forma global s'adjunta la **Taula 1.2**.

Tipus de tap	Avantatges	Inconvenients
Tap de suro	<ul style="list-style-type: none"> <li>* tradicional</li> <li>* bona imatge</li> <li>* eficàcia comprovada</li> <li>* fàcil extracció</li> <li>* fàcil mecanització</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>* 2,4,6-tricloroanisole?<sup>TCA</sup></li> <li>* material heterogeni; gran variabilitat</li> <li>* oxidació?</li> <li>* necessitat d'un obridor</li> <li>* les ampolles s'han d'emmagatzemar horitzontalment</li> </ul>
Taps tècnics i/o semisintètics	<ul style="list-style-type: none"> <li>* semblança al suro</li> <li>* consistència</li> <li>* extracció fàcil</li> <li>* fàcil adaptació a les tapadores de suro</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>* 2,4,6-tricloroanisole?<sup>TCA</sup></li> <li>* oxidació?</li> <li>* necessitat d'un obridor</li> <li>* les ampolles s'han d'emmagatzemar horitzontalment</li> </ul>
Taps sintètics	<ul style="list-style-type: none"> <li>* consistència</li> <li>* lliures de 2,4,6-tricloroanisole<sup>TCA</sup></li> <li>* fàcil adaptació a les tapadores de suro</li> <li>* les ampolles es poden emmagatzemar verticalment</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>* problemes d'imatge?</li> <li>* oxidació?</li> <li>* olor de plàstic?</li> <li>* necessitat d'un obridor</li> <li>* s'han descrit problemes en l'extracció</li> </ul>
Càpsula metàl·lica	<ul style="list-style-type: none"> <li>* consistència</li> <li>* eficàcia comprovada en vi blanc</li> <li>* manté la frescor</li> <li>* fàcil extracció</li> <li>* les ampolles es poden emmagatzemar verticalment</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>* problemes d'imatge?</li> <li>* no s'ha comprovat en envelliments per a vi negre</li> <li>* olors de reducció?</li> <li>* requereix ampolles i equips adequats</li> </ul>

<sup>TCA</sup>: 2,4,6-tricloroanisole, compost associat al defecte organolèptic del vi anomenat "gust de suro" que es descriurà en el següent apartat.

**Taula 1.2.** Comparació entre diferents sistemes de tapament [26,31].

Dels estudis comparatius entre diferents tipus de taps s'observa que, en general, el tap de suro natural acostuma a oferir els millors resultats en gairebé tots els paràmetres considerats. Malgrat les alternatives que han intentat desplaçar el tap de suro, la resposta del consumidor encara es manté fidel a la litúrgia suro-vi. El tap de suro forma part de la imatge del vi sense restar-li protagonisme ja que té la missió de preservar-ne la identitat. De la mateixa manera que resultaria estrany i en certa manera inadmissible degustar un vi de qualitat en una copa de plàstic, no es pot oblidar que el tap de suro també participa en el ritual.

### **1.3. EL “GUST DE SURO”**

Com s'ha dit en el primer apartat d'aquesta memòria, la preservació del perfil aromàtic del vi sovint esdevé sinònim de qualitat. Així doncs, l'aparició de gustos/olors desplaents no només perjudica la comercialització directa del producte sinó que també el prestigi del celler se'n veu afectat. Les alteracions més freqüents en el vi es relacionen amb canvis incontrolats i indesitjables en el seu aspecte visual, olfatiu o gustatiu. Existeixen nombrosos factors, com l'estat de maduració i l'estat sanitari del raïm, la varietat, el sistema de vinificació i les condicions d'envelliment del vi que poden transformar la seva composició aromàtica. Malgrat que algunes d'aquestes desviacions olfactivas poden ser reparades, n'hi ha d'altres que malauradament fan impossible el consum del producte. En general, aquests defectes es poden classificar en dos grans grups en funció de la seva naturalesa: les alteracions biològiques o malalties, produïdes per microorganismes, llevats i bacteris, i alteracions químiques.

D'entre els defectes organolèptics associats al vi, el que ha generat més interès, a causa de la seva complexitat, és el “gust de suro”. Aquesta és la denominació que s'ha emprat per classificar certs compostos volàtils de caràcter contaminant que reverteixen negativament en les característiques sensorials del vi i que d'alguna manera s'associen al tap de suro. Aquestes substàncies pertanyen a famílies químiques molt diferents però posseeixen trets comuns com el fet de ser molècules orgàniques volàtils i que a baixes concentracions produeixen olors desagradables [32].

L'ús indiscriminat del nom “gust de suro” condueix a confusió atès que d'una banda focalitza la responsabilitat del problema al suro quan de vegades n'és simplement el transmissor. D'altra banda, el veritable gust de suro és poc freqüent i fàcilment detectable per les seves característiques odoríferes (olor pútrida) [33]. Tot i que se'n desconeix l'origen, habitualment se l'associa al creixement de l'*Armillaria mellea* o “taca groga”, que pot aparèixer al peu de l'alzina surera, especialment en ambients humits. No obstant, no es pot descartar la vinculació d'aquest defecte a l'anomenat “gust de suro” ja que anàlisis químiques realitzades sobre planxes de suro afectades per la “taca groga” van mostrar la presència de compostos responsables d'“*off-flavours*” en vins [34,35,36]. Les planxes de suro que presenten aquesta alteració es caracteritzen per una degradació del teixit acompanyada d'una descoloració més o menys intensa i mostren modificacions en les seves propietats mecàniques i estructurals. Es tracta d'un defecte fàcilment identificable i, de fet, el suro que el manifesta és potencialment capaç d'impartir olors/gustos no desitjats en el vi per la qual cosa es rebutja per a la fabricació de taps.

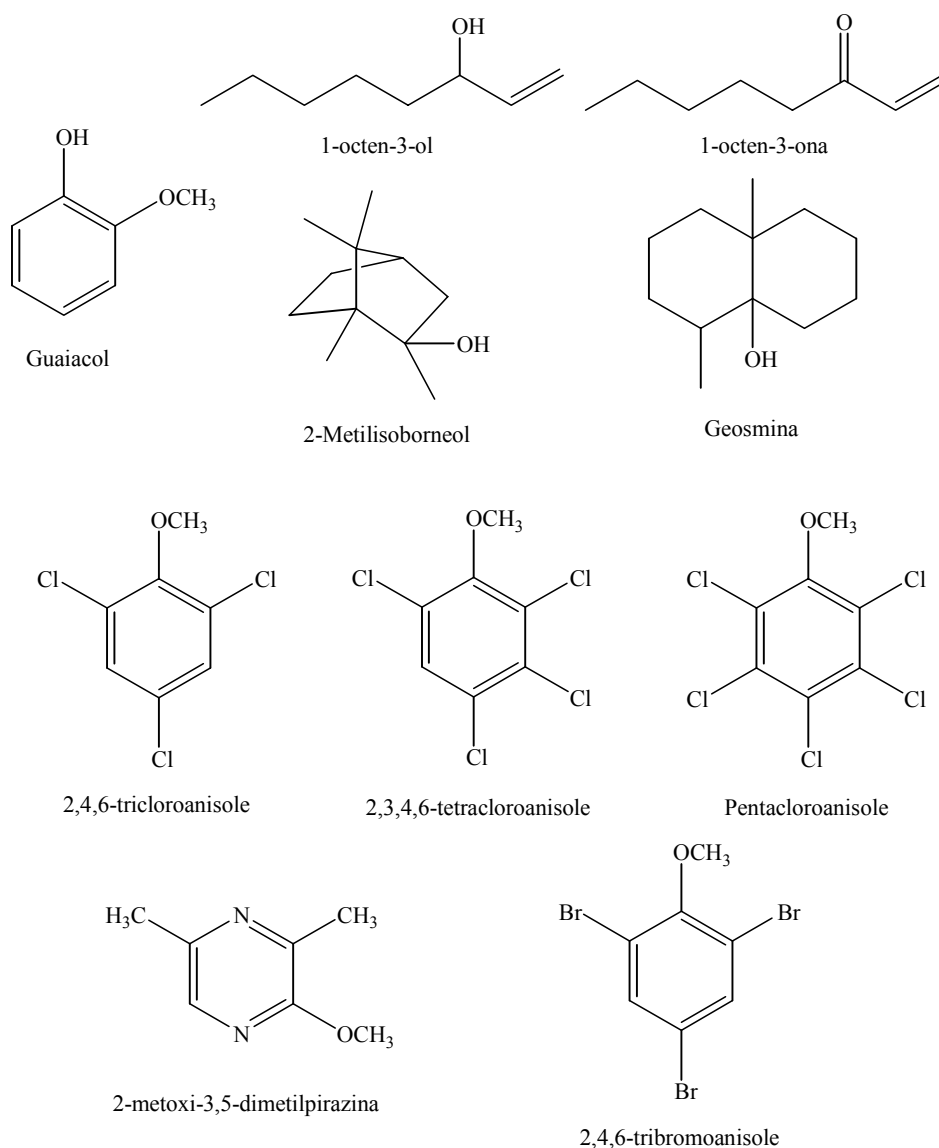
De la necessitat de reduir la incidència d'alteracions gustatives/olfactives, la Confederació Europea del Suro (CE-Liège) va posar en marxa el 1992 el projecte d'investigació QUERCUS [37], un estudi a fons de les olors i gustos estranys del vi. De l'estudi en qüestió s'extreu, entre d'altres conclusions, una metodologia sistemàtica en l'anàlisi sensorial del vi per evitar interpretacions errònies que porten a classificar sota el mateix nom de “gust de suro” defectes sensorials d'origens diferents. Es van detallar una àmplia llista de descriptors d'olors i es van classificar en 5 famílies de desviaments organolèptics: vegetal, conífer, florit, humitat i químic.

Una de les raons per les quals el “gust de suro” ha despertat tant interès ha estat la seva freqüent incidència. Del total d'ampolles de vi, el 2-5% (percentatge que pot variar depenent de l'anyada objecte d'estudi) es rebutgen com a conseqüència de l'aparició d'aquest defecte i aquest fet es tradueix en importants pèrdues econòmiques a la indústria vitivinícola a nivell mundial [9]. Tot i això, el consumidor en limitades ocasions detecta aquest tipus d'alteració però probablement adverteix que el vi no compleix les expectatives esperades i com a resultat no el torna a adquirir. La percepció d'aquesta alteració varia en funció del grau en què es manifesta i la sensibilitat individual.

Apareixen moltes dificultats a l'hora de classificar el “gust de suro” ja que no és possible associar un fenomen tan complex amb una sola molècula. Tal com s'exposarà en l'apartat següent, s'han descrit un gran nombre de compostos que contribueixen a l'aroma global i, a mesura que avança la recerca en aquest camp, es van afegint substàncies al llistat dels compostos responsables del “gust de suro”. Això fa que sigui extremadament complicat correlacionar aquesta alteració amb un únic descriptor aromàtic específic. Les aromes de les substàncies implicades es perceben de diferent manera (en relació a la concentració) i presenten, generalment, llindars o límits de percepció (concentració mínima detectable) molt baixos [38]. Altrament cal mencionar que determinats compostos poden ser detectats malgrat trobar-se en el vi a concentracions inferiors al seu límit de percepció. Així doncs, la seva detecció es justifica mitjançant la combinació amb altres substàncies que presenten similar aroma o a través del fenomen anomenat sinergisme, el qual postula que l'efecte produït per diversos components és major que la suma de les seves interaccions individuals [39].

### **1.3.1. Compostos relacionats amb el “gust de suro”.**

Des que es va identificar per primera vegada en el vi l'alteració organolèptica denominada com a “gust de suro”, s'han dedicat molts esforços per tal definir les substàncies que hi contribueixen. La metodologia de treball bàsicament consisteix en seleccionar vins que presenten els “*off-flavours*” objecte d'estudi, la seva anàlisi mitjançant cromatografia de gasos i detecció olfactomètrica (“*sniffing*”) i, finalment, la confirmació de l'estructura molecular dels compostos detectats emprant cromatografia de gasos acoblada a espectrometria de masses [40]. La correlació d'aquest defecte sensorial a una única molècula en una matriu tan complexa com és el vi resulta totalment impossible. Els compostos que bibliogràficament s'han ressenyat com a responsables del “gust de suro” són els que es mostren a la **Figura 1.4**. Es caracteritzen per ser compostos orgànics volàtils que pertanyen a diferents famílies químiques i la majoria presenten uns llindars de percepció molt baixos (vegeu **Taula 1.3**). Sovint, apareixen a la bibliografia diferents valors de llindar de percepció que depenen del tipus de matriu (aigua o vi), de la metodologia emprada i del pannel d'experts que realitzen l'avaluació sensorial.



**Figura 1.4.** Compostos implicats en l'anomenat "gust de suro".

Compost	Aroma	Llindar de percepció en vi
Guaiacol	fumat, fenòlic, medicinal	20 µg/L
1-octen-3-ol	bolet, metàl·lic	20 µg/L
1-octen-3-ona		20 ng/L
2-metilisoborneol	terròs, fang, florit, càmfora	30 ng/L
geosmina	terròs, fang, florit	25 ng/L
2,4,6-tricloroanisole		< 10 ng/L
2,3,4,6-tetracloroanisole	florit, humitat	> 10 ng/L
pentacloroanisole		n.d.
2,4,6-tribromoanisole	humitat, fong	< 10 ng/L
2-metoxi-3,5-dimetilpirazina	fong	2 ng/L

n.d. no descrit.

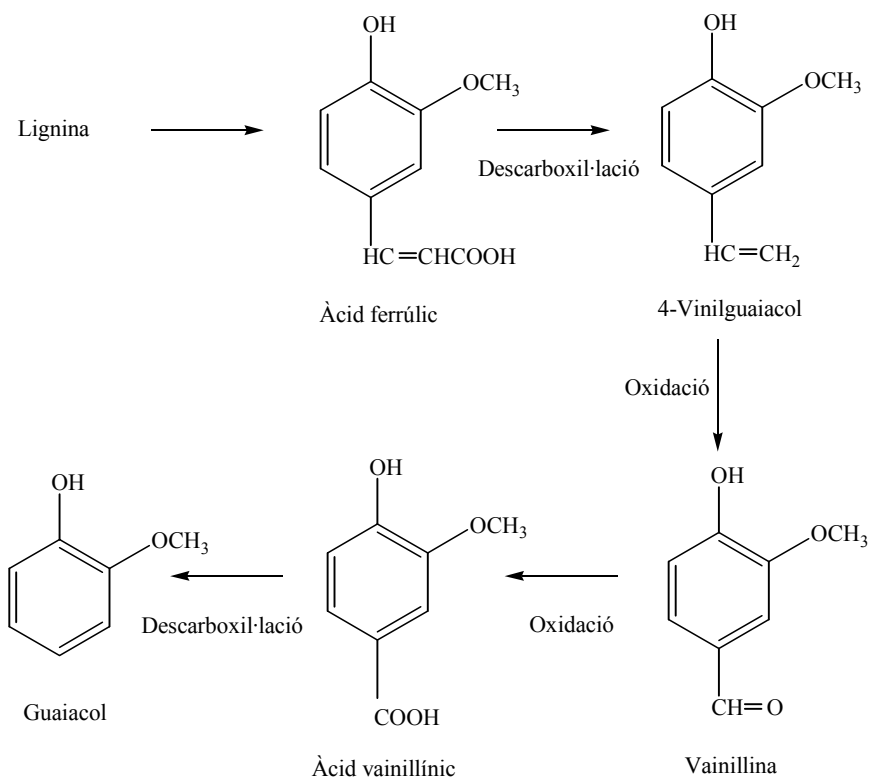
**Taula 1.3.** Descriptors sensorials i llindars de percepció en vi blanc de les substàncies relacionades amb el "gust de suro".



A continuació es detallen les característiques principals de les molècules associades al “gust de suro”.

**\* Guaiacol (2-metoxifenol)**

Fou identificat per Lefebvre el 1983 com a principal metabòlit d'un bacteri del sòl del gènere *Streptomyces*, el qual es troba en escorces afectades pel defecte de "taca groga" [38]. Per tant, l'aparició de guaiacol s'associa a la degradació de la lignina del tap de suro o dels barrils de fusta destinats a l'envelliment del vi, tot i que també pot provenir de la contaminació química dels taps durant l'emmagatzematge o el transport [41]. La ruta biosintètica de formació del guaiacol es mostra a la **Figura 1.5**.

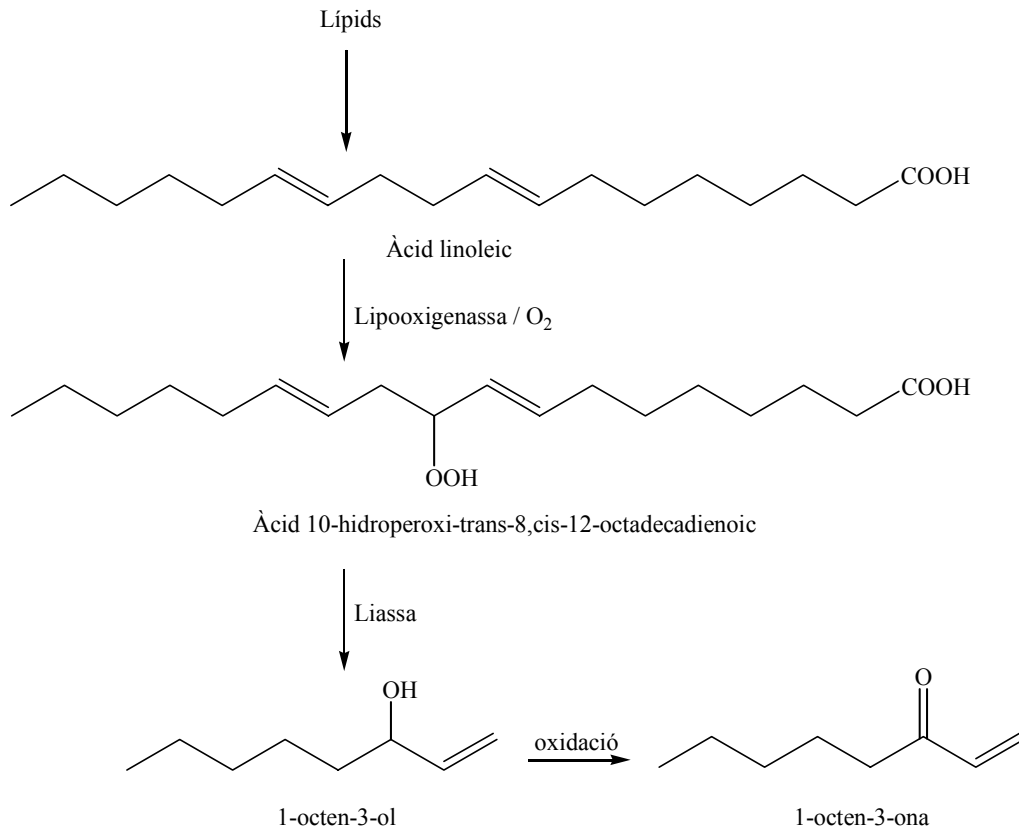


**Figura 1.5.** Formació del guaiacol a partir de la degradació de la lignina.

Malgrat que el guaiacol s'ha detectat en vins catalogats com a alterats, en determinats casos la concentració en què es troba és inferior al llindar de percepció, la qual cosa revela que aquest compost únicament pot contribuir actuant en combinació amb altres substàncies que tinguin una aroma semblant o a través del fenomen de sinèrgia, com s'ha comentat anteriorment [39,40].

**\* 1-octen-3-ol i 1-octen-3-ona**

Aquests compostos són metabòlits de fongs, especialment de *Penicillium spp.* i *Aspergillus spp.* Pel que fa a la cetona també s'ha descrit com a producte de degradació d'àcids grassos insaturats a través de reaccions químiques d'autooxidació [42]. La ruta bioquímica de formació d'aquests compostos es presenta en la **Figura 1.6**, partint dels lípids com a precursors.



**Figura 1.6.** Mecanisme de formació de compostos de 8 àtoms de carboni a partir dels lípids.

L'origen d'aquests dos compostos en vins és desconegut. Després d'analitzar una gran proporció de vins contaminats i els seus respectius taps, es va observar que contenien 1-octen-3-ona i una petita proporció de l'alcohol corresponent [38]. Tal com s'especifica a la **Taula 1.3**, aquests compostos presenten una olor molt característica de bolet i, mentre que a la cetona li correspon un baix llindar de percepció en vi i presenta una elevada contribució (aroma intens), l'1-octen-3-ol relacionat es comporta de forma inversa (el llindar de percepció és 1000 vegades superior). Aquest alcohol posseeix un

carboni asimètric (C-3) en la seva estructura i per tant, existeixen dos diastereoisòmers, dels quals el que presenta un aroma de bolet més intens és el R-(-)-1-octen-3-ol.

### **\* 2-metilisoborneol i geosmina**

Ambdós compostos són metabòlits de bacteris del sòl (Actinomycetes) i algues (Cyanobactèria), però existeix una extensa microflora capaç de realitzar la seva biogènesi. Precisament, com a resultat de l'actuació d'aquests bacteris del sòl es poden contaminar, per contacte, planxes de suro amb la qual cosa, de la mateixa font, s'obtidrien taps alterats i correctes. Aquests anàlits també han estat identificats en aigües, peixos i aliments marins. El 2-metilisoborneol es pot generar a partir d'un monoterpè (C-10) després de l'addició d'un grup metil procedent de la S-adenosilmetionina, mentre que la geosmina pot tenir com a precursor un sesquiterpè cíclic (C-15), el qual perd una cadena d'isopropil. D'altra banda, existeixen fongs associats als taps de suro amb l'habilitat de produir grans quantitats d'aquests dos compostos (*Aspergillius spp.*, *Penicillum spp.* i *Trichoderma spp.*). Per contra, a la geosmina se li pot assignar un origen desvinculat del suro, és a dir, com a metabòlit de *Botrytis cinerea*, fong procedent del raïm. Si bé la presència d'un determinat tipus de microflora afavoreix la formació d'ambdós anàlits, una classe de bacteri (*Pseudomonas spp.*) pot degradar-los, sota condicions controlades, i per tant dur a terme un efecte desodoritzant. La geosmina és menys freqüent detectar-la en vi que no en suro atesa la seva degradació en medi àcid i després d'unes 8 setmanes a pH 3.2 i 25°C dóna com a subproductes substàncies amb poca capacitat odorífica. Tot i això aquest compost ha estat identificat en diferent tipus de vi analitzats després de 7 mesos de la fermentació [43]. Existeixen varis isòmers de la geosmina però només dos d'ells proporcionen una aroma d'humitat/terrós.

### **\* Cloroanisoles**

Aquests compostos són volàtils i molt aromàtics i estan considerats els principals responsables del defecte “gust de suro”, en especial, el 2,4,6-tricloroanisol (TCA), que fou identificat per primera vegada com a responsable d'aquesta alteració per Buser i col·laboradors [44]. Aproximadament en el 80% dels vins rebutjats per presentar aquest defecte s'hi ha comprovat la presència de TCA [36]. A causa de la seva freqüent incidència en vins i taps afectats, sovint s'associa el “gust de suro” exclusivament al TCA, malgrat que seria més correcte la denominació de "gust de florit" d'acord amb el

seu comportament aromàtic. Per aquest motiu en moltes ocasions s'ha sobreestimat la rellevància d'aquesta substància, i sovint s'ha centrat la recerca entorn a la seva identificació en vins contaminats tot i que a baixes concentracions és difícil de distingir-lo d'altres anàlits també relacionats amb el "gust de suro".

El 2,4,6-tricloroanisole és un potent agent odorífer, químicament estable, no tòxic a les concentracions a les quals habitualment es troba i que, a part de a l'enologia i a la indústria surera, s'ha documentat la seva presència en una gran varietat de productes: fruits secs, cafè, fruita, pa, aigua, pollastre, begudes alcohòliques, etc. [33,45,46,47,48]. Atenent a les seves peculiars característiques aromàtiques, olor de **florit/humitat**, el baix llindar de percepció, i la repercussió que implica la seva presència en productes alimentaris, s'han desenvolupat nombrosos estudis per tal d'establir-ne l'origen, localització, anàlisi i eliminació. Sens dubte un dels grans reptes és disposar d'una metodologia que permeti detectar el TCA als baixos nivells de concentració en els quals la seva aroma és perceptible, sobretot en aigua. Resulta difícil establir un valor exacte de llindar de percepció i s'han realitzat multitud d'estudis per tal d'establir-lo sensorialment en diferents matrius. A continuació, s'exemplifiquen alguns d'aquests resultats:

Llindars de percepció (ng/L)	Matriu estudiada
1.4	Vi Pinot Noir
1.5	Vi blanc
2.1	Chardonnay
2.2-4.6	Diversos vins blancs i negres
4	Vi blanc no aromàtic
17 <sup>a</sup> /210 <sup>b</sup>	Vi blanc

<sup>a</sup> Pannell expert <sup>b</sup> Pannell d'inexpert

**Taula 1.4.** Valors de llindars de percepció pel TCA en vins [41].

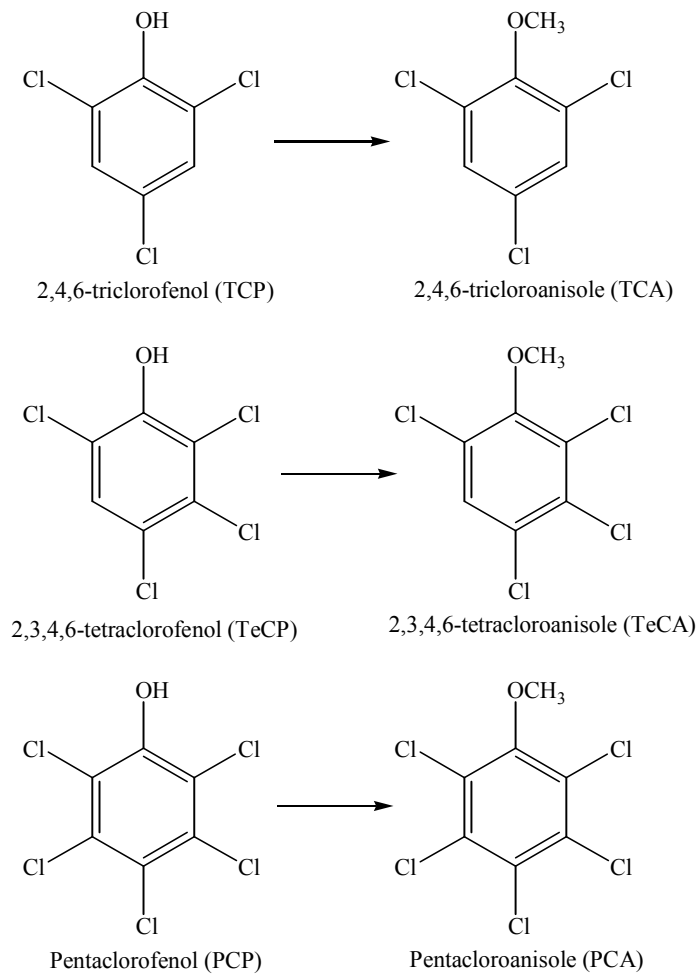
Segons el que es desprèn de la **Taula 1.4**, el llindar de percepció vindrà condicionat per el pannell d'experts, la metodologia i la matriu on es realitza l'anàlisi. Així aquest valor pot variar substancialment segons si el pannell està format per persones entrenades,

familiaritzades amb les característiques odoríferes del compost i la seva sensibilitat individual que es veurà influenciada per diferents factors externs (malaltia, fatiga, etc.). En general, l'experiència adquirida a l'hora de dur a terme aquests tests pot incrementar significativament la sensibilitat envers aquesta aroma i així detectar-lo a concentracions on per la majoria de consumidors resultaria imperceptible. Per aquest motiu, i per tant, per evitar “falses alarmes”, Prescott i col·laboradors van proposar un treball enfocat en la mesura, mitjançant un pannel format per consumidors habituals de vi blanc (no experts), del llindar d'identificació i de rebuig del producte per la presència TCA [49]. Els valors que es van obtenir van ser de 2.1 ng/L i 3.1 ng/L respectivament, la qual cosa posa de manifest que fins i tot un pannel no experimentat és capaç de reconèixer l'aroma del TCA a concentracions extremadament baixes. La correlació entre la percepció sensorial del TCA amb la quantitat de compost present ha estat verificada per diversos autors [39,50]. En aquest sentit, la concentració de TCA en els vins analitzats era superior al seu llindar de percepció. Malgrat tot, no cal oblidar que en certes ocasions es pot donar el cas que la mostra presenti una elevada intensitat del defecte però una baixa quantitat de TCA, indicant així, que altres compostos també participen en dita alteració.

Ocasionalment, en vins contaminats i els seus respectius taps s'han identificat, a part del TCA, altres cloroanisoles com serien: 2,4-dicloroanisole (2,4-DCA), 2,6-dicloroanisole (2,6-DCA), 2,3,4,6-tetracloroanisole (2,3,4,6-TeCA) i pentacloroanisole (PCA) [50]. La majoria d'ells presenten llindars de percepció molt superiors al TCA, exceptuant el TeCA que pot ser detectat a baixa concentració. De totes maneres, no existeixen evidències que aquests cloroanisoles contribueixin significativament en el “gust de suro”.

Establir l'origen dels cloroanisoles ha esdevingut motiu de conflicte entre la indústria surera i la vitivinícola. Ateses les diferents fonts de contaminació que s'han descrit és necessari dedicar un apartat a banda (vegeu apartat 1.3.2 d'aquesta memòria) per ressenyar els possibles focus de formació de cloroanisoles tant en el celler com durant l'elaboració de taps. Malgrat tot, de forma genèrica s'assumeix que els cloroanisoles són productes de la metilació microbiològica dels corresponents **clorofenols** (vegeu correspondència entre compostos en la **Figura 1.7**) com a mecanisme de

descontaminació, on principalment els fongs eliminen els clorofenols, productes tòxics, del seu entorn.



**Figura 1.7.** Estructures que relacionen els clorofenols amb els cloroanisoles.

La relació entre cloroanisoles i clorofenols ha incentivat la determinació d'aquests darrers no com a responsables directes del “gust de suro” sinó com a precursors dels cloroanisoles. D'altra banda, els clorofenols també poden impartir olors desagradables al vi, però presenten llindars de percepció més elevats (per exemple 2 µg/L en el cas del TCP) i confereixen una aroma que es descriu com a química i no de florit com s'associa als cloroanisoles. Com a resultat dels fets explicats, principalment el sector surer ha pres consciència de la problemàtica que es pot desencadenar a partir de la presència de clorofenols. Ha estat aquesta preocupació la que ha portat al desenvolupament d'una metodologia analítica per determinar aquests compostos en suro i vi i que ha estat objecte del treball presentat en aquesta memòria.

### **\* 2,4,6-tribromoanisol**

Aquest compost va ser identificat per primera vegada per Chatonnet i col·laboradors com a responsable del “gust de suro” [51]. Després d’analitzar exhaustivament diferents vins amb defectes aromàtics del tipus florit van concloure que les quantitats de cloroanisoles detectades no eren suficients per provocar tal alteració sensorial i necessàriament havien de contenir altres compostos que contribuïssin en aquest “*off-flavour*”. En gairebé tots aquests vins s’hi va identificar el 2,4,6-tribromoanisol (TBA) que conferia un significant caràcter d’humitat/fong, però que a altes concentracions derivava en una olor “fenòlica” d’intensitat variable. Tot i que, fins al moment, no s’havia documentat la presència de TBA en vins, aquest compost ha estat localitzat en fauna i sediments marins, aliments empaquetats, aigües potables i l’atmosfera [51,52,53]. És especialment en matrius aquoses on el TBA presenta un llindar de percepció extremadament baix, que a l’igual que el TCA, es situa en 30 pg/L.

Es creu que el 2,4,6-tribromofenol (TBP) és el precursor del TBA. La reacció que té lloc és una *O*-metilació (equivalent a la transformació del TCP en TCA) realitzada per fongs com el *Paecilomyces variotti* que al cap de 6 setmanes d’incubació a 30°C produeixen grans quantitats de TBA [52]. El compost fenòlic es troba com a component de fungicides, resines, polímers, retardants de foc, preservants de fustes i també es pot formar en aigües residuals.

Ambdós compostos bromats no sembla que tinguin efectes tòxics greus a les concentracions mesurades en els vins estudiats. La presència de TBA en vins contaminats és deguda a diversos factors. D’una banda pot provenir de l’atmosfera dels cellers, les barriques que contenen el vi i les silicones emprades per a segellar les tines. En general, els materials plàstics també tenen la capacitat de fixar TBA, i en menor proporció TBP, el qual és menys hidrofòbic i volàtil. Els taps de suro tampoc es poden deslligar de l’aparició de TBA, ja que aquests poden ser emmagatzemats en atmosferes, materials d’embalatge o palets de fusta contaminats i, consegüentment, poden transferir-lo al vi.

### **\* 2-Metoxi-3,5-dimetilpirazina**

Com s’ha vist fins ara, el “gust de suro” està constituït per un conjunt d’aromes molt peculiars. D’alguna manera es podria dir que existeixen diferents manifestacions del

defecte en qüestió. En aquest sentit, dins la classificació de “gust de suro” s’hi inclou una olor que s’ha descrit com de fong (“*fungal must*”) i que ha estat detectada en vins considerats no correctes [54]. Segons la intensitat d’aquesta alteració, el corresponent vi pot resultar del tot imbevable, i s’ha considerat la segona forma de “gust de suro” més important després de la que produeix el TCA. S’ha arribat a la conclusió que la substància responsable d’aquesta alteració és la 2-metoxi-3,5-dimetilpirazina (MDMP) i fou identificada per Simpson i col·laboradors [55]. Altres descriptors que han estat utilitzats per caracteritzar-ne l’aroma han estat: humitat, terrós, polsós, i si es troba a altes concentracions també s’han emprat els descriptors xocolata o cafè. El seu baix llindar de percepció (2.1 ng/L en vi blanc i 0.4 ng/L en aigua) en dificulta considerablement la seva anàlisi. També s’ha constatat la seva presència en cafè [56].

Tot i que no s’ha pogut caracteritzar l’organisme responsable de la síntesi de la MDMP, es coneix que certs bacteris (*Pseudomonas* spp.) i fongs (*Aspergillus flavus*) tenen la capacitat de generar pirazines [54]. La presència de la MDMP en el vi es pot atribuir a la contribució del tap però també a contaminacions ambientals. Les màquines perforadores del suro poden representar una possible font de contaminació. Això explicaria que la MDMP es trobi localitzada a la superfície del tap facilitant així la seva posterior migració al vi, una transferència que es veu facilitada per la poca afinitat que presenta el suro envers certes pirazines [30]. A més, els microorganismes capaços de formar el compost poden estar present en les àrees de processament o emmagatzematge del suro. L’elevada volatilitat de la MDMP juntament amb la seva hidrofobicitat suggereixen que l’aplicació de rentats amb aigua bullent o vapor, que habitualment s’utilitzen en la indústria surera per extreure contaminants dels taps, poden constituir una eina molt útil per reduir i, fins i tot, eliminar la presència d’aquesta variant del “gust de suro”.

#### **\* Altres compostos**

D’entre els compostos que s’han proposat com a causants del “gust de suro”, n’hi ha que representen una influència menys significativa. Es tracta d’un grup de pirazines que es combinen amb H<sub>2</sub>S formant-se les metiltiopirazines amb olor de florit, compostos amb àtoms de sofre i sesquiterpens aïllats de l’espècie *Penicillium roqueforti*, fong que pot estar present en el procés de manufactura de taps de suro. D’altres substàncies, com per exemple, el 2,4-dicloro-6-metilanisole, no contribueixen directament en el “gust de



suro” però poden realçar les olors de florit/humitat quan es troben conjuntament amb el TCA.

D'altra banda, en determinades ocasions, alguns cellers rebutgen taps que presenten aromes de fusta molt intenses que podrien transferir-se al vi. Els compostos que imparteixen aquests caràcters de fusta són sèries de monoterpens.

### **1.3.2. Origen del defecte “gust de suro”.**

Malgrat que, com s'ha detallat en l'apartat anterior, existeixen diversos compostos implicats en el “gust de suro”, majoritàriament s'ha atribuït aquest defecte a la presència de cloroanisoles i, en especial, el 2,4,6-tricloroanisolet (TCA). La seva problemàtica, en termes d'incidència i baix llindar de percepció, ha impulsat nombrosos estudis per tal d'esbrinar els seus possibles focus d'aparició tant en la indústria vitivinícola com en la tapera. A continuació es recullen les fonts de contaminació de cloroanisoles en les dues matrius d'interès: el suro i el vi.

#### **El suro**

Sovint la indústria surera ha estat injustament acusada per la utilització de processos d'elaboració que donen lloc a l'aparició d'aromes no desitjades en el tap i, finalment, en el vi. Concretament en el cas del “gust de suro” associat al TCA, es tendeix a assumir que el tap n'és el principal responsable a causa de la seva natura heterogènia. No obstant, l'aplicació d'unes bones pràctiques de manufactura juntament amb un acurat control durant tot processament del suro (incloent tant la matèria primera com el transport i emmagatzematge) garanteixen que la contaminació per TCA sigui poc probable. No es pot assegurar que un tap contaminat sigui l'únic responsable d'alteracions en el vi, però no s'ha de descartar la possibilitat que si el tap conté compostos no desitjables, aquests es transfereixin, migrin, al vi. Del fenomen de la migració se'n parlarà en la secció següent.

La presència de TCA en el suro es justifica fonamentalment mitjançant 3 vies principals:

- Degradació microbiològica dels constituents del suro.
- Adsorció de compostos organoclorats i posterior biometilació.
- Adsorció directa de TCA de materials o ambients contaminats.

El coneixement de la formació dels cloroanisoles en les etapes de transformació del suro proporcionen un millor coneixement de la incidència del “gust de suro” i permet establir protocols per reduir-ne l'aparició.

### L'ESCORÇA DE SURO

En general, els nivells de contaminació de cloroanisoles detectats en l'escorça de l'alzina surera són baixos i no es pot establir una relació amb la situació geogràfica, ni condicions ambientals. Pel que fa al TCA, la incidència i la quantitat que se'n determina varia en funció de l'anatomia de l'arbre. El suro corresponent al tronc i en especial el més proper al terra (el qual no es destina per l'elaboració de taps) conté més proporció de TCA que no el de les branques i dins un mateix bosc, només un nombre reduït d'arbres són els que presenten majors nivells del compost [10].

Una possible explicació de la contaminació de l'escorça per TCA la trobem en la presència de **clorofenols**. Aquests compostos han estat àmpliament utilitzats com a insecticides, herbicides, fungicides i per tractaments de protecció de la fusta a causa de les seves propietats biocides. Els clorofenols s'han aplicat extensament en el món agrícola des del 1950 i, en especial, el pentaclorofenol (PCP), els residus del qual persisteixen en el medi ambient. Des del 1991, per disposició de la directiva europea 91/173 es restringeix l'ús de PCP i els seus derivats. Malgrat aquesta prohibició, hi ha raons que fan que encara s'utilitzi, com ara el seu cost i perquè no es troba implantada en tots els països.

L'aplicació de biocides clorofenòlics en els boscos d'alzines sureres representa un dels orígens del “gust de suro”. Les preparacions comercials de pentaclorofenol contenen 2,3,4,6-tetraclorofenol (TeCP) en un 3-10% i 2,4,6-triclorofenol (TCP) en quantitats menors, els quals poden ser convertits als corresponents cloroanisoles sota l'acció de determinats microorganismes a través d'una reacció de metilació del grup hidroxil. Aquest procés representa una via de descontaminació del medi ja que es generen els cloroanisoles els quals no presenten la toxicitat dels seus precursors. Tanmateix, bacteris del sòl poden degradar el PCP a clorofenols amb menys àtoms de clor, majoritàriament 3,4,5-triclorofenol, afavorint els productes substituïts en les posicions *meta*-. Una altra via de descomposició del PCP és la degradació fotoquímica de la qual en resulten tetraclorofenols [40].

D'altra banda, biocides clorats, com el hexaclorociclohexà (lindà), poden ser convertits a 2,4,6-triclorofenol, mitjançant una deshalogenació microbiològica i una hidroxilació. Plaguicides com l'àcid 2,4-diclorofenoxiacètic, benzens clorats, fenols, etc., en connexió amb microorganismes metiladors, poden també originar TCA [57].

La putrefacció de la fusta es considera una font d'organoclorats. És el cas de la “taca groga” o putrefacció del suro causat pel fong *Armillaria mellea*, que es desenvolupa de forma natural en boscos de les regions amb temperatures tropicals provocant una malaltia en les arrels d'alguns arbres, tant actuant com a paràsit en espècies vives, com a sapròfit en espècies mortes. Durant la degradació de l'àrea infectada es formen compostos clorats, incloent elevades quantitats de TCA [58].

### PROCÉS D'ELABORACIÓ DE TAPS DE SURO

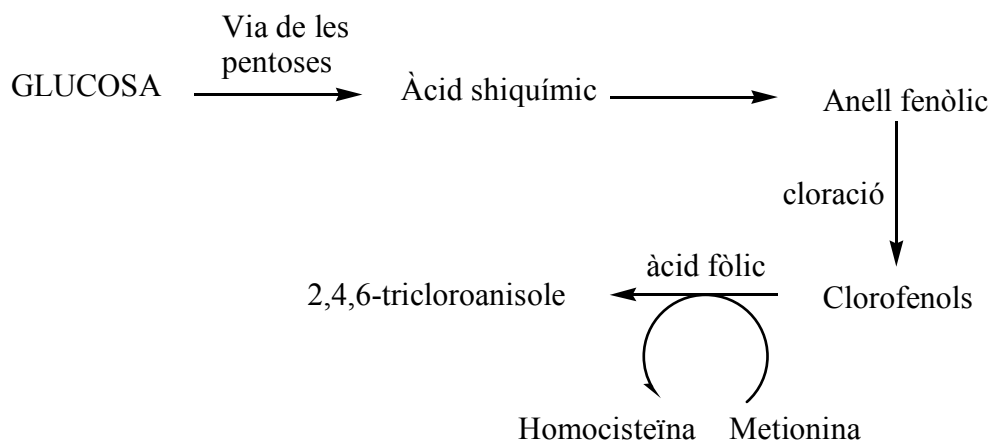
El procés de manufactura dels taps de suro ha sofert diverses modificacions per tal d'obtenir un producte final més uniforme i de major qualitat, lligat a una producció més eficient. La complexitat dels orígens del “gust de suro” obliga a establir un major control, especialment en tres de les etapes del procés: la bullida i posterior estabilització o maduració de les planxes de suro i els rentats.

Durant la bullida, les planxes incrementen la seva llargada i amplada i això s'aconsegueix després de 45 minuts. A l'hora s'aconsegueix extreure tanins, compostos volàtils, polifenols i sucres. També s'observa una reducció de la concentració de TCA detectada a més de la meitat [33]. D'aquest fet deriva la importància d'aquesta operació i la recomanació d'un canvi freqüent de l'aigua destinada a bullir les planxes per evitar problemes de contaminació en els successius bullits.

L'estabilització de les planxes de suro al llarg d'aproximadament 15 dies permet equilibrar el grau d'humitat i és essencial pel desenvolupament de les propietats físiques i químiques del material. Durant aquest període té lloc l'aparició d'un "florit" que cobreix la totalitat de les planxes, però que no afecta la zona que es perfora per a l'obtenció de taps. En determinades ocasions els nivells de TCA i aquest creixement microbià estan clarament relacionats i ambdós augmenten en prolongar l'etapa de maduració, mentre que en d'altres casos el TCA experimenta una biodegradació.

Aquesta variabilitat probablement és deguda a la disponibilitat dels precursors, les condicions ambientals i el tipus de microorganisme present [36].

Un cop es perfora la planxa s'obté el tap d'una peça i el posterior rentat permet netejar-lo, desinfectar-lo i conferir-li una aparença uniforme. Es disposa de diversos mètodes de rentat essent el tradicional el que ha generat més problemàtica. Aquest consisteix en l'ús d'hipoclorit, i ha estat l'estàndard emprat durant dècades ja que proporciona un tap estèril, d'acord amb els cànons visuals (coloració blanca que afavoreix la seva comercialització) i a més és relativament econòmic sense comportar dificultats d'aplicació. No obstant, la possible formació de compostos clorofenòlics, a causa de la cloració dels productes de degradació de la lignina del suro generats durant el creixement microbià, ha impulsat el desenvolupament d'altres mètodes [37]. El tractament amb hipoclorit incrementa principalment el contingut de 2,4,6-triclorofenol però, en absència d'activitat microbiològica no es dona la formació de TCA. El suro conté de forma natural fenols i derivats en baixes proporcions i sota aquestes condicions de rentat es pot produir TCP però no TeCP i PCP. La formació de TCA també és possible en presència de clor actiu o hipoclorit a partir d'una font de carbohidrats i via la ruta de l'àcid shiquímic de la qual en resulten els clorofenols, tal i com s'indica en la **Figura 1.8**. La disponibilitat d'aminoàcids i reguladors del creixement, com l'àcid fòlic, influencien l'etapa de metilació.



**Figura 1.8.** Biosíntesi total del TCA per l'espècie *Penicillium spp.*

D'altra banda l'aparició de compostos clorofenòlics pot estar associada a l'acció de l'espècie fúngica *Bacidimycetes spp.*, la qual és capaç d'introduir un àtom de clor a anells benzènics a través d'una reacció enzimàtica catalitzada per cloroperoxidases. Com a resultat es formen monocloroanisoles que poden evolucionar a TCA mitjançant un tractament amb hipoclorit.

Actualment, gairebé tota la indústria surera elegeix peròxids com a substituïts de l'hipoclorit per als rentats, els quals estan específicament recomanats en el "Codi Internacional de Bones Pràctiques Taperes" [37]. Aquest tractament permet la desinfecció i el blanquejament, tot i que la dosi de peròxid ha de ser controlada ateses les seves propietats oxidants que podrien degradar l'estructura de lignina del suro i la superfície exterior, destruint les ceres naturals i àcids grassos imprescindibles per a la funció de tapament. Aquesta circumstància implica un rentat posterior amb àcid cítric per neutralitzar el peròxid residual.

Altres alternatives suposen la immersió dels taps en una solució d'1-3% de metabisulfit de potassi. Es tracta d'un procediment efectiu a l'hora d'eliminar la microflora associada al suro però és poc estètic des d'un punt de vista comercial ja que no s'aconsegueix un efecte blanquejant. Un fet semblant és el que provoca l'etanol com a agent esterilitzant.

### TRANSPORT I EMMAGATZEMATGE DELS TAPS DE SURO

Les condicions en les quals es realitza el transport i l'emmagatzematge dels taps acabats abans del seu ús són crucials. Pot succeir que taps lliures de contaminació adsorbeixen substàncies generades per via microbiana en altres llocs, i que a través de l'ambient arribin al suro i migrin al vi. En aquest cas es parlaria del suro com a transmissor, però no com a agent causant.

La contaminació del tap de suro es pot donar a partir de fonts ben diverses: palets de fusta, contenidors [59] o caixes de cartró [60], parets o terres del mitjà de transport i/o emmagatzematge. L'extensa utilització dels clorofenols presents en productes per a la protecció de la fusta, components de pintures, materials de construcció, productes cel·lulòsics, etc. en contacte amb una microbiota amb capacitat metiladora generen cloroanisoles. Així s'ha documentat l'aparició de TCA en taps que havien estat en contacte amb materials que contenien nivells elevats de compostos clorofenòlics com

per exemple caixes de cartró o superfícies de fusta [33]. Els factors que influeixen la formació de cloroanisoles són: la concentració inicial de clorofenols, les espècies fúngiques presents i les condicions ambientals (la humitat, la temperatura i el temps d'exposició). Durant el transport i/o emmagatzematge es recomana mantenir un nivell d'humitat entre el 6-9% per eliminar qualsevol possibilitat d'activitat microbiològica. Per aquesta mateixa raó, en molts casos, s'opta per empaquetar els taps sota una atmosfera de SO<sub>2</sub>.

Per tal d'estudiar la cinètica d'adsorció del TCA present en una atmosfera contaminada per part de taps de suro, Barker i col·laboradors [61] van utilitzar recipients tancats en els quals s'hi van col·locar diferents tipus de taps i paper impregnat amb d<sub>5</sub>-TCA. Per aquest estudi es va escollir el compost deuterat per tal de poder distingir-lo del possible TCA endogen que podrien contenir els taps i que, conseqüentment, podria falsejar els resultats. Es va confirmar que el suro adsorbeix el TCA d'una atmosfera circumdant (en absència de contacte directe amb la font de contaminació) en un període de temps relativament curt. En un interval comprès entre un i 35 dies d'exposició, que representaria el temps típic emprat en el transport i emmagatzematge del taps abans de la seva utilització, es va observar una significativa concentració de TCA a la superfície. Contràriament, el procés invers, és a dir, la desorció del TCA adsorbit pel tap mitjançant la injecció de flux d'aire, és un fenomen que, en les condicions descrites, requereix una exposició de més llarga durada.

### **El vi**

El defecte de “gust de suro” pot tenir un origen totalment aliè al tap. Quan una partida d'ampolles de vi contaminades presenten nivells uniformes de TCA, és a dir, la concentració del compost és similar, llavors s'acostuma a admetre que el vi ha sofert una alteració abans d'embotellar-se. Aquesta distribució contrasta amb la que s'observa quan el tap de suro és el responsable de la contaminació, ja que en aquest cas apareix una elevada variabilitat del contingut de TCA entre les ampolles. Si bé la detecció d’“*off-flavours*” en el tap resulta complicada, quan és el vi el que es troba alterat, l'enòleg fàcilment se'n fa ressò i rebutja el producte per a la seva posterior comercialització.

Una de les fonts de contaminació del vi, doncs, és el propi celler. Així, l'ús de canonades i dipòsits no higienitzats o barriques en les quals poden romandre

microorganismes són punts de control crítics que poden afavorir la presència de compostos no desitjables. Però a més també s'haurien d'incloure els mateixos focus de contaminació descrits durant el transport i emmagatzematge dels taps, és a dir, l'ambient del celler, que pot afectar tant al vi com a l'ampolla de vidre que el contindrà, i la proximitat de materials constituïts a base de clorofenols. Cal posar especial atenció en el fet que a la bodega es troba gran quantitat d'elements de fusta: estructures, revestiments, terres, panells, caixes, palets, etc., els quals poden ser susceptibles d'haver estat tractats amb substàncies organoclorades. Considerant aquests potencials focus de contaminació, juntament amb la presència de la humitat ambiental, és possible el desenvolupament de certs microorganismes capaços de transformar els compostos clorofenòlics a cloroansoles. Una vegada aquests compostos es transfereixen, com a conseqüència de la seva elevada volatilitat, a l'atmosfera del celler es difonen mitjançant corrents d'aire i contaminen la totalitat de l'entorn. Aquestes substàncies es poden dissoldre en el vi i penetrar en les barriques, maquinària, o, fins i tot, en els materials utilitzats pel diferent tractament dels vins: terres de filtrat, plaques, productes enològics, etc.

Sovint resulta complicat determinar quin és l'origen de la contaminació. No obstant, en funció del compostos que s'identifiquen tant en el vi com en el tap associat es poden formular les següents hipòtesis [39,50]:

---

<b>Compostos presents</b>	<b>Origen</b>
TCA + 2,4- i 2,6-dicloroanisol (absència de TeCA i PCA)	Rentats amb hipoclorit o ús de biocides basats en TCP
TCA + TeCA + PCA + clorofenols	Biocides constituïts per PCP que inclouen TCP i TeCP
TCA+ quantitats reduïdes de DCA i TeCA	Biocides constituïts per TCP

---

**Taula 1.5.** Relacions entre l'aparició de cloroansoles i clorofenols i el seu origen.

Tal i com es pot veure en la **Taula 1.5** i independentment de si la font de contaminació és el tap o el vi, els clorofenols es troben directament implicats en el “gust de suro” provocat per l'aparició de cloroansoles, fet que ha fomentat el seu estudi en les dues matrius citades.

### **1.3.3. La migració dels compostos relacionats amb el “gust de suro” procedents del tap de suro al vi.**

De tots els compostos associats al “gust de suro”, només la migració del TCA ha estat examinada en detall. Per tant, les consideracions que s'exposaran a continuació bàsicament faran referència a aquest anàlit i poden ésser extensibles a aquelles substàncies que presenten un comportament químic similar.

La transferència dels compostos implicats en el “gust de suro” del tap al vi depèn de diversos factors [41]:

- la solubilitat dels compostos considerats en la matriu vi i la capacitat d'extracció del mateix, que és funció de la seva composició.
- la concentració dels contaminants en el tap de suro.
- la localització d'aquestes substàncies a la superfície o en l'estructura interna del tap de suro.
- la velocitat amb la qual els compostos poden migrar a través del tap.
- el volum de vi en contacte amb el tap.
- les condicions de migració: en ampolla o bé en experiments de control on els taps de suro se submergeixen en un volum determinat de vi (vegeu apartat 1.3.5).

El mecanisme mitjançant el qual es duu a terme aquesta transferència es caracteritza per la seva complexitat, la qual es fa especialment evident a l'hora de ser reproduïda a nivell de laboratori. Una de les grans limitacions en l'estudi de la migració de TCA del tap al vi és la manca de materials que continguin una quantitat perfectament coneguda de contaminant. Això obliga a assajar diferents mètodes de contaminació com, per exemple, la injecció d'una solució que conté el TCA al tap, o la immersió dels taps en una dissolució del compost o bé tallar un disc del tap de suro, injectar-ne el TCA i posteriorment tornar a unir les dues fraccions [62]. D'entre les propostes mencionades, semblaria que la primera permet simular millor la distribució que es donaria lloc en un tap contaminat de forma natural. En el treball esmentat [62], un cop es va disposar dels taps amb un contingut conegut de compost, es va realitzar el tapament i es va concloure que el 8% del TCA va ser transferit al vi després d'un període de 8 mesos. Tot i això resulta problemàtic establir un valor exacte de percentatge de migració i mentre alguns



autors consideren que el 50% del compost present en el suro es pot transferir al vi, d'altres redueixen aquest percentatge a un 6% [33].

Diferents estudis han revelat grans discrepàncies entre el contingut de TCA detectat en el tap i el corresponent vi [50]. És més, en determinades ocasions s'ha observat com alguns taps provocaven la contaminació del vi i d'altres, tot i presentar una concentració similar de TCA, no n'afectaven les qualitats organolèptiques. Tant la distribució irregular del TCA en el tap com el fet que només les parts contaminades del suro que estan en contacte directe amb el vi o en les seves proximitats (espai en cap) són les que potencialment poden transferir compostos, representen les explicacions més lògiques d'aquest fenomen. Per tant, la localització del TCA en el tap i la seva orientació en l'ampolla determinaran l'alteració del vi.

El suro aparentment té la capacitat d'enllaçar fortament el TCA a la seva estructura i si el tap és el responsable del "gust de suro" llavors, no només n'és determinant la quantitat de compost present, sinó que també a on i com aquest es troba unit a la matriu. La disposició dels cloroansoles varia d'un tap a un altre i, fins i tot, no s'observa uniformitat dins un tap individual. En general, es considera que el TCA es concentra en les lenticel·les del suro que contenen nutrients on, conseqüentment, s'afavoreix el creixement microbiològic [63,64]. Si es duu a terme un examen a través del microscopi, s'observa que les colònies de fongs poden estendre's al llarg dels anells de creixement des de les lenticel·les. Per tal d'estimar si el TCA preferentment es localitza a la superfície del tap o bé a la part interna, es van seccionar diversos taps separant la part exterior (gruix de 2 mm) de l'interior [12]. Els resultats d'aquest assaig van indicar que la major proporció de TCA es distribueix a la superfície. Paral·lelament, es va avaluar si existien diferències significatives pel que fa al contingut de TCA entre la zona de més edat i la més jove d'un mateix tap de suro. Així es va demostrar que la secció que conté el suro més vell tendeix a concentrar més TCA que la zona corresponent a l'escorça més jove. Aquesta afirmació ve refermada pel fet que els anells més exteriors poden haver estat més temps en contacte amb biocides policlorats i contenir un nombre elevat de productes de degradació de la lignina, incloent-hi el fenol, precursor del TCP. Amb tot, el que es vol evidenciar és que la migració del TCA al vi es veu afavorida per la seva preferent localització a la part externa del tap, tot i que una certa proporció pot trobar-se a les zones internes.

Un altre mecanisme de migració que ha estat objecte de discussió és la capacitat de permeabilitat que té el suro. És a dir, el TCA pot ésser adsorbit pel tap durant l'emmagatzematge del vi en un ambient contaminat o es pot generar sota l'acció de microorganismes que colonitzen la superfície externa del tap un cop col·locat a l'ampolla i posteriorment migrar a través del suro cap al vi. Per confirmar aquestes hipòtesis i determinar la magnitud de la possible infiltració durant l'emmagatzematge del vi embotellat, es va afegir TCA a la superfície exterior de taps de suro una vegada introduïts en l'ampolla [65]. Cap dels vins analitzats van mostrar contaminació per presència del compost després de 44 mesos, independentment de la natura dels taps emprats. D'aquesta manera es verifica que el suro representa una barrera òptima de transmissió de TCA procedent de fonts externes.

Quan es parla de migració de TCA, freqüentment es considera la transferència del compost del tap al vi. No obstant, el procés invers també és possible. L'adsorció de compostos que constitueixen el vi per part del tap de suro ha estat meticulosament examinada [30]. De la mateixa manera, substàncies contaminants com les que es relacionen amb el "gust de suro" també poden ésser extretes pel tap. Així doncs, dins del llistat d'excel·lents propietats del tap com a tapament es podria incloure la de descontaminar el vi. El suro posseeix una gran afinitat per adsorbir compostos volàtils de natura no polar. Particularment, tal i com s'ha comentat en l'apartat dedicat a l'origen del "gust de suro" provocat pel suro (transport i emmagatzematge), el TCA és fàcilment adsorbit per taps que es troben en una atmosfera contaminada. Per tal d'estudiar si aquest procés d'adsorció és igualment efectiu quan el focus contaminant és el vi, Capone i col·laboradors [66] van realitzar un assaig que consistia en afegir TCA deuterat en el vi prèviament al seu tapament. Després d'un període de 30 mesos, aproximadament la meitat de la quantitat originalment afegida va ser adsorbida pel tap de suro sense tenir en compte el proveïdor, el tractament o de si els taps eren de suro natural o aglomerats. Cal mencionar que mentre la distribució del TCA deuterat en el vi i el tap va resultar relativament uniforme, la repartició del TCA endogen del tap va mostrar una gran variabilitat. Aquest comportament confirma la suposició que quan el nivell de TCA varia d'ampolla a ampolla, és el tap la font de contaminació. Pel que fa als altres cloroanils considerats (TeCA i PCA), es va observar un comportament similar. L'adsorció d'aquests compostos s'incrementa amb el nombre d'àtoms de clor de la molècula, essent així el PCA l'anàlit que més eficientment s'adsorbeix.

A grans trets es pot afirmar que els taps de suro tot i contenir TCA enllaçat a la seva estructura no necessàriament han de transferir-lo al vi. Aquest fet indica que els processos de neteja dels taps realitzats a la indústria surera probablement no requereixen l'extracció exhaustiva de tot el TCA present, sinó d'aquella proporció localitzada prop de la superfície i, per tant, la que més ràpidament es pot intercanviar.

### **1.3.4. Prevenció i eliminació del “gust de suro”.**

La reducció dels riscos d'aparició de compostos associats al “gust de suro” en els taps o/i de contaminació a partir de fonts exògenes exigeix una vigilància de totes les etapes implicades no només en l'elaboració dels taps, sinó també en el període comprès entre la seva fabricació i utilització per a l'embotellat. D'entre les mesures a considerar en destaquen les següents [18]:

- la prohibició de l'ús de plaguicides clorofenòlics,
- la implantació de codis de bones pràctiques en la producció i manipulació del suro,
- evitar el tractament del suro amb hipoclorit,
- millorar la traçabilitat (història del processat) de les partides de suro,
- exercir un control sobre la càrrega microbiana en el suro,
- utilitzar ozó i SO<sub>2</sub> per al control microbià,
- millorar les etapes de rentat i bullit de les planxes de suro,
- reduir la concentració dels compostos volàtils en el suro,
- realitzar correctament el control de qualitat dels taps acabats.

El suro és un material biològic i la diversitat microbiana no roman ni estàtica ni constant al llarg del temps. De tots els microorganismes presents al suro, des del punt de vista del defecte del “gust de suro”, interessa sotmetre a control aquells que tenen capacitat metabòlica per generar compostos amb aromes desagradables. És a dir, utilitzen el suro com a substrat i alliberen els metabòlits al producte final, el tap. En el cas dels cloroanisoles, es consideren aquelles espècies amb capacitat de degradar els clorofenols inactivant la reactivitat del grup hidroxil mitjançant un grup metil. Generalment, els microorganismes presents al suro són fongs i en menor grau llevats i bacteris (vegeu **Taula 1.6**).

Microorganismes	Gèneres
Fongs	<i>Aspergillus, Cladosporium, Monilia, Paecilomyces, Penicillium, Trichoderma</i>
Llevats	<i>Candida, Cryptococcus, Rhodotorula, Saccharomyces, Sporodiobolus</i>
Bacteris	<i>Bacillus, Micrococcus, Streptococcus, Streptomyces</i>

**Taula 1.6.** Gèneres de microorganismes associats al suro [18].

Alguns dels fongs que habitualment es relacionen amb la formació dels compostos volàtils responsables del “gust de suro” es mostren a la **Taula 1.7**.

Compost	Fongs
1-octen-3-ol, 1-octen-3-ona	<i>Penicillium glabrum, Penicillium verrucosum</i>
2-metilisoborneol	<i>Aspergillus niger, Penicillium solitum</i>
geosmina	<i>Penicillium discolor, Penicillium expansum</i>
2,4,6-trichloroanisole	<i>Chrysonilia sitophila, Trichoderma longibrachiatum, Penicillium ssp.</i>

**Taula 1.7.** Exemples de fongs productors d’“*off-flavours*” [33, 67].

Nombrosos estudis han estat enfocats a aclarir la relació entre les colònies de fongs que colonitzen el suro i la biosíntesi de TCA per així disposar d’un coneixement més ampli del procés de *O*-metilació dels compostos clorofenòlics, en especial del TCP [68]. Tant els llevats com els bacteris sovint han estat relegats a un segon terme pel que fa la seva implicació al “gust de suro”, ja que són més sensibles a la temperatura i per tant se suposa que s’eliminen durant l’etapa de bullit. No obstant, es demostra que la part interna del suro assoleix uns 62°C després d’una hora de bullida i per tant seria possible la presència d’aquestes espècies [64].

Al llarg de tot el procés d’elaboració del tap de suro pot tenir lloc la proliferació de microorganismes i, per tant, s’han de prendre mesures per tal d’obtenir un producte final amb garanties, exempt de càrrega microbiana [69]. Durant l’etapa de maduració té lloc una major colonització de les planxes per part dels fongs. El creixement de *Chrysonilia sitophila* (*Monilia sitophila*) és dominant durant el procés d’estabilització i inhibeix la

proliferació d'altres fongs al llarg d'un període de 30 dies [70]. Aquest fet és especialment interessant perquè es tracta d'un fong amb capacitat de degradar el 80% del TCP present però només es produeix un 0,03% de TCA. Es tracta d'un metilador feble enfront el gènere *Penicillum spp.*, predominant en el suro i ambients industrials i també relacionat, juntament amb *Trichoderma spp.*, al defecte de "taca groga" [34]. L'espècie *Penicillum spp.* metabolitza una quantitat inferior de TCP però produeix TCA de forma més eficient. Com a conseqüència de les característiques de *Chrysonilia sitophila*, s'ha proposat afavorir el desenvolupament d'aquest llevat enfront d'altres espècies per tal de restringir la formació de cloroanisoles.

El tractament final dels taps redueix pràcticament les colònies fúngiques a zero. Resulta poc probable que aquests microorganismes puguin créixer quan els taps s'han introduït a les ampolles, ja que són espècies aeròbies que no sobreviuen en condicions àcides i de limitació d'oxigen. No obstant, la idea d'esterilització dels taps de suro ha representat una opció seductora a considerar en la indústria surera. Els requisits que un mètode d'esterilització ha de complir són els que es detallen a continuació [18]:

- manteniment de nivells microbiològics acceptables durant tot el procés de fabricació i absència de metabòlits microbians.
- garantia d'esterilitat del producte elaborat sense pèrdua de les propietats físico-químiques.
- ha de ser un mètode segur, innocu i de gran poder de penetració.

L'ús de la radiació per electrons accelerats ha experimentat una creixent aplicació per a l'esterilització d'una gran varietat de productes, incloent els taps de suro [71]. Es tracta d'una tècnica que tan sols requereix una única font d'energia, l'electricitat, i per tant, no genera cap residu. A més a més es caracteritza per la seva rapidesa, fiabilitat, traçabilitat, àmplia flexibilitat i seguretat. És un procés net, econòmic i no altera el producte. Atenent aquest ampli ventall d'avantatges, es va creure convenient aplicar aquest tipus de tractament per a l'esterilització de taps de suro. Tot i que la dosi energètica a la qual se sotmet el producte és un paràmetre essencial per tal de realitzar una correcta esterilització, factors com les espècies microbianes, el nivell de contaminació o càrrega biològica, ambient d'irradiació, grau d'hidratació, densitat, etc., també resulten determinants. En un primer estudi, es va examinar la influència de diferents dosis de radiació en la composició volàtil de suro [71]. Els resultats van

indicar que només existien diferències significatives entre els taps irradiats a 25 kGy (intensitat necessària per a l'esterilització completa dels taps de suro) i els no irradiats per un petit nombre de substàncies, mentre que a 100 i 1000 kGy el contingut de volàtils diferia significativament. Considerant aquest comportament, es va assajar si la radiació permetia reduir la quantitat de TCA present en un tap de suro aplicant diferents dosis [72]. Es va observar que en incrementar la intensitat de la radiació, disminuïa la concentració d'anàlit i s'afavoria la formació de mono- i dicloroanisoles, compostos menys odorífers i que, conseqüentment, no afecten tan negativament la qualitat del suro.

Com a conseqüència de l'interès generat per la desinfecció del suro, altres mètodes han estat aplicats en la indústria surera. Aquest és el cas de l'empresa portuguesa Champcork que va posar en marxa el procés ABC-1, que es basava en dur a terme el bullit en un receptacle tancat durant 18 minuts a 130°C i a pressió de 180 kPa (autoclau) i suprimir la posterior etapa d'estabilització. Així es garantia una microflora totalment estèril a la vegada que també s'aconseguia l'extracció de compostos volàtils [73]. L'efectivitat d'aquest tractament va ser corroborada per Rocha i col·laboradors [74]. D'altra banda, els processos d'esterilització també es realitzen mitjançant el rentat dels taps suro amb solucions comercials de peròxids, l'aplicació de les quals ha de ser acuradament regulada per tal d'evitar la posterior oxidació del vi [75]. Aquest tipus de rentat ha substituït el que es feia amb hipoclorit ja que, com ja s'ha comentat, facilitava la formació de TCA. Una altra alternativa com a desinfectant és l'ozó, el qual presenta una elevada capacitat de penetració del suro i redueix considerablement la càrrega microbiològica. En concret, un estudi preliminar sobre l'efecte dels rentats de taps de suro amb aigua ozonitzada ha revelat que en alguns casos aquest procediment permet reduir el nombre de microorganismes presents, al mateix temps que s'eliminen algunes aromes intenses (eucaliptus, xampinyó) que podrien comprometre la qualitat del tap [76].

Fins al moment s'han descrit diverses mesures preventives per evitar l'aparició del "gust de suro", l'objectiu principal de les quals és reduir o suprimir la proliferació de microorganismes en el suro, sobretot aquells que tenen l'habilitat de sintetitzar metabòlits amb propietats odoríferes perjudicials per l'aroma del vi. Quan el tap ja ha sofert algun tipus de contaminació, llavors és necessari disposar de metodologies capaces d'eliminar o prevenir que els compostos no desitjats presents en el suro es

transfereixin al vi. En relació a l'aspecte d'impedir la transmissió de TCA al vi, Vasserot i col·laboradors [77] van concloure que la presència d'un recobriments de silicona en els taps de cava, el qual actua com a barrera, juntament amb la lenta migració de l'anàlit a través del suro afavorien la seva retenció, evitant així possibles contaminacions.

Pel que fa a l'eliminació dels precursors dels cloroanisoles, es troba disponible un enzim anomenat fenoloxidasa que catalitza les reaccions d'oxidació dels fenols, provocant la seva polimerització. És necessari assegurar que no queden residus de l'enzim un cop aplicat, ja que podrien alterar el perfil organolèptic del vi.

Les estratègies d'eliminació o reducció de contaminants dels taps de suro bàsicament s'han centrat quasi exclusivament en el TCA, ja sigui actuant durant les etapes de manufactura o bé sobre el tap acabat. Les millores en els sistemes de bullit de les planxes de suro han repercutit positivament en la qualitat del producte final. El canvi freqüent de l'aigua i la disminució del nombre de planxes per rentada han permès evitar contaminacions en els successius rentats, a l'hora que s'augmenta la capacitat d'extracció del procés. El grup Amarin, el productor de suro portuguès amb més rellevància, ha desenvolupat el mètode CONVEX basat en l'extracció contínua de volàtils de les aigües de rentat durant el bullit [78]. L'aigua a elevada temperatura s'impulsa en forma d'esprai cap a una cambra separada del tanc de bullida on un corrent d'aire arrossega els compostos volàtils. Un cop s'ha tractat l'aigua, aquesta pot ser retornada al dipòsit original per a la seva reutilització. L'aplicació d'alta temperatura i pressió durant el rentat de discs de suro (procés INOS II) ha demostrat una gran eficiència per disminuir la quantitat de material extraïble present, en especial els clorofenols [78].

S'han documentat altres sistemes per reduir el contingut de TCA en els taps de suro. És possible disminuir-ne la concentració simplement amb l'aeració del mateix [61]. Aquest procés requereix un extens període de temps i, per esdevenir rentable industrialment, s'haurien de modificar les condicions de realització. Altres mètodes impliquen l'ús de microones [41]. Completant la tasca innovadora adreçada a l'eliminació de TCA, el grup Amarin ha patentat el procés ROSA (*"rate of optimal steam application"*) que es fonamenta en l'aplicació d'una destil·lació per arrossegament de vapor per extreure el

TCA del suro. Mitjançant vapor i aigua a pressió s'afavoreix l'extracció de compostos orgànics a nivell traça continguts dins les cèl·lules del suro. Diferents experiments han revelat que aquesta aproximació redueix en més d'un 80% la quantitat de TCA, sense induir efectes adversos ni en les propietats físiques del suro ni en l'aparença visual [79].

Els avantatges de l'extracció amb fluid supercrític en termes de rapidesa, selectivitat, concentració i ús de baix volum de dissolvents orgànics ha impulsat la seva aplicació en el sector surer com a tècnica d'extracció de TCA. En general, el solvent que habitualment s'utilitza és el CO<sub>2</sub>, atès el seu baix cost, viscositat, tensió superficial, elevat coeficient de difusió, seguretat i a més és respectuós amb el medi ambient al mateix temps que no genera residus. El diòxid de carboni sota unes determinades condicions de pressió (73.8 bar) i temperatura (31.1°C) adquireix simultàniament les propietats d'un gas (transport) i un líquid (densitat i poder de solvatació). Modificant aquests dos paràmetres es possibilita augmentar la capacitat extractiva i la selectivitat envers els anàlits d'estudi. L'eficàcia d'aquesta tècnica va ser corroborada per Taylor i col·laboradors, els quals van aconseguir extreure entre el 97% i el 103% del TCA present en suro fortificat [80]. Tal i com ja s'ha ressenyat en l'apartat 1.2.5, Sabaté aplica aquesta extracció amb CO<sub>2</sub> (temperatura de 40°C i pressió de 100 bars) de forma industrial per l'eliminació de cloroanisoles i clorofenols del suro [81]. Diferents estudis per validar-ne la utilitat han revelat extraccions superiors al 95% sense alterar l'estructura interna ni les propietats mecàniques del tap.

Finalment, cal esmentar el procés Ultracork que es basa en una extracció de molècules orgàniques dels taps acabats emprant ultrasons i l'aplicació d'un revestiment de silicona per proporcionar una barrera entre el tap i el vi. El dissolvent que es col·loca dins el bany és l'hexà, el qual facilita l'eliminació del material sòlid de la superfície i del porus del tap i, el que és més important, solubilitza la majoria de compostos relacionats amb el "gust de suro". L'eficàcia d'aquest sistema és difícil de mesurar ja que implica grans volums de dissolvent, dificultant així la detecció de les substàncies considerades. Tot i això es creu que s'aconsegueix eliminar entre un 95% i un 99% del TCA. Un cop s'ha realitzat l'extracció, el tap lliure de contaminació es col·loca en un bany d'ultrasons que conté el polímer de silicona dissolt en hexà per tal que es formi una barrera superficial. Aquest procés es repeteix dues vegades per obtenir una doble capa de protecció i assegurar la integritat del producte [81].



De totes les possibilitats que s'han descrit, els rentats són els que més fàcilment es poden adaptar a la indústria tapera. Han aparegut diversos productes comercials destinats a millorar l'extracció de contaminants del suro. Tot i que, la utilització de carbó actiu per a l'eliminació d'odorants en aigües potables ha comportat resultats satisfactoris [82], la seva eficàcia no ha estat provada en matrius sòlides com el suro. Sigui quin sigui el mètode de rentat aplicat, és essencial determinar-ne la capacitat d'eliminació tal i com es detalla en les publicacions que s'adjunten en aquest treball de recerca.

Malgrat que cap dels sistemes garanteix al 100% l'obtenció d'un tapament totalment lliure de contaminació ja que els factors externs, sovint difícils de controlar, resulten determinants, val a dir que l'interès per garantir la qualitat del tap de suro ha desembocat en una significativa millora del producte final.

### **1.3.5. Testos de control del “gust de suro” en la indústria tapera.**

Freqüentment, abans de l'adquisició dels taps de suro, el celler interessat exigeix al distribuïdor assegurar la garantia del producte. Tot i que existeixen diferents paràmetres que defineixen la qualitat del tap, entre els més importants hi ha l'assegurament de l'absència de substàncies que poden impartir olors/gustos estranys al vi.

Com a conseqüència d'aquests requeriments, la indústria surera realitza diverses tècniques d'avaluació, majoritàriament dirigides a la detecció de TCA, ja sigui mitjançant una anàlisi sensorial o instrumental. En general, la metodologia aplicada es basa en submergir un grup de taps sencers amb un volum de solució durant un determinat període de temps. En funció l'objectiu de l'examen, s'acostuma a emprar aigua, vi blanc neutre o una dissolució hidroalcohòlica (usualment amb un contingut d'etanol del 12%) que simula la matriu vi (vi sintètic). Principalment, quan es realitzen controls sensorials, s'escull l'aigua per negligir l'efecte de l'alcohol que pot emascarar la percepció de compostos contaminants presents a baixes concentracions, tot i que en determinades ocasions es prefereix emprar un medi que sigui el més similar possible al vi. Transcorregut el temps establert (oscil·la entre unes quantes hores fins a pocs dies, ja que temps d'exposició superiors dona lloc a l'aparició d'aromes interferents), s'obté el macerat corresponent el qual s'analitza per determinar-ne les substàncies que s'hi han transferit.

L'aplicació d'aquest protocol no assegura la completa extracció dels compostos del material de suro sinó que fa referència a la quantitat que es pot "alliberar" de la superfície del tap. L'objectiu d'aquest procediment és simular, a nivell de laboratori, la hipotètica transferència de substàncies procedents del suro al vi embotellat. En el cas del TCA, la migració està governada per un equilibri entre la quantitat d'anàlit present en el tap i en el vi, que s'estableix ràpidament (al cap de 24 hores) [83]. No obstant, aquest equilibri és més aparent que no pas real, ja que el procés que té lloc és força més complex. El TCA que es localitza prop de la superfície del suro o les lenticel·les és extret fàcilment, assolint un màxim que es manté constant dintre d'un període de temps relativament curt. A partir d'aquest punt, i perllongant la maceració durant alguns mesos, es poden donar dos fenòmens que mostren efectes contraris. D'una banda, el TCA que no es troba tan exposat a la superfície pot difondre lentament a través del suro i transferir-se a la solució de contacte [65]. Aquest fet es traduiria en un petit increment en la concentració del compost en el macerat. D'altra banda, i tenint en compte l'afinitat que té el suro pel TCA [66], aquest pot ésser readsorbit pels altres taps, amb la qual cosa la seva concentració disminuiria fins al punt que la seva detecció passés inadvertida (fals negatiu). Per tant, aquests experiments de maceració només són aplicables per determinar el TCA extraïble per el vi durant períodes curts.

El fet que només una petita proporció del TCA total del tap es dissol durant el procés de maceració és degut a la gran afinitat que mostra per el material de suro. La successiva maceració d'un mateix tap produeix la mateixa concentració de TCA en el macerat [83]. Com que només una petita porció del contingut total és extret del suro, la quantitat d'anàlit que roman al tap és més o menys constant després de cada maceració. Si bé la concentració de TCA resulta gairebé independent del volum de solució, el nombre de taps implicats en l'examinació és crucial, sobretot a efectes de readsorció. Idealment s'haurien d'assajar taps individualment, per disposar d'un més ampli coneixement de la natura d'aquesta avaluació. La necessitat d'examinar un gran nombre de taps fa inviable econòmicament aquesta proposta i, per això, es tendeix a realitzar-ne l'estudi conjuntament. La validesa d'aquesta aproximació la trobem en l'estudi realitzat per Hervé i col·laboradors [83], els quals varen comprovar que els nivells de TCA en macerats obtinguts després de posar en contacte 100 taps d'un mateix lot (24 hores) eren comparables amb la mitjana de TCA alliberat per taps individuals. Conseqüentment, la maceració d'un conjunt de taps pot proporcionar una estimació efectiva per distingir

aquells lots defectuosos i així poder-los enretirar del mercat abans d'entrar en contacte amb el vi.

Contràriament a la situació del TCA, la 2-metoxi-3,5-dimetilpirazina (MDMP) es detecta més fàcilment en els testos de control i per tant resulta menys probable la seva aparició en vins embotellats. Com que aquest compost té una pobre afinitat envers el suro, llavors es veu afavorida la seva dissolució en el vi [54]. Macerant diversos taps en relativament petits volums de solució es pot exagerar l'impacte sensorial de la MDMP en comparació amb el TCA, el qual pot ser emmascarat i dificultar-ne la seva detecció. Basant-nos en aquestes consideracions i la polaritat de les altres substàncies relacionades amb el "gust de suro", el guaiacol [30], 1-octen-3-ona i 1-octen-3-ol es preveu que es comportin de manera similar a la MDMP, mentre que la geosmina i el 2-metilisoborneol podrien mostrar una tendència intermèdia entre el TCA i la MDMP [41].

Aquests testos de control no són més que una aproximació per predir la incidència del "gust de suro" i identificar els lots de taps de suro que poden produir aromes inacceptables en el vi. A banda del temps de maceració i el nombre de taps emprats en l'anàlisi, un dels principals inconvenients que es deriven d'aquesta metodologia és la manca de representativitat. Es determina el contingut de alliberables de la superfície del tap, i en el cas real només una part es troba en contacte directe amb el vi, en la qual necessàriament no s'hi han de concentrar els compostos contaminants. Sota aquestes condicions s'exagera la situació que realment es produiria dins l'ampolla, i d'alguna manera es garanteix un assaig més rigorós dels taps de suro.

Finalment, caldria contrastar l'eficiència d'aquests sistemes de control a través d'exhaustives investigacions encaminades a predir, de forma fidedigne, a partir d'anàlisis simples, el comportament del binomi vi-suro. L'interès de la indústria surera per la normalització del producte és una realitat i l'acceptació de les mesures i testos de control que es van implantant permeten que la qualitat del tap esdevingui un fet inqüestionable.

#### 1.4. REFERÈNCIES

---

- [1] F. del Castillo García, V. Ferreira González, M.E. García de la Peña, L. Hidalgo Fernández-Cano, J. Hidalgo Togores, L. Vida Navarro, *Análisis sensorial y cata de los vinos de España*, Editorial Agrícola Española, S.A., Madrid (Espanya) (2001), ISBN 84-85441-60-5.
- [2] AENOR Análisis Sensorial. Tomo 1-Alimentación. Madrid (1997).
- [3] A.C. Noble, R.A. Arnold, J. Buechsenstein, E. Leach, J.O. Schmidt, P.M. Stern, *Am. J. Enol. Vitic.* 38 (2) (1987) 143.
- [4] A.C. Noble, R.A. Arnold, B.M. Masuda, S.D. Pecore, J.O. Schmidt, P.M. Stern, *Am. J. Enol. Vitic.* 35 (2) (1984) 107.
- [5] S.M. Rocha, S. Ganito, A. Barros, H.M. Carapuça, I. Delgadillo, *Anal. Chim. Acta* 528 (2005) 147.
- [6] S. Varea, M.C. García-Vallejo, E. Cadahía, B. Fernández de Simón, *Eur. Food Res. Technol.* 213 (2001) 56.
- [7] P. Galetto, *Aust. N. Z. Wine Ind. J.* 8 (1) (1993) 84.
- [8] R.F. Simpson, L.G Veitch, *Aust. N. Z. Wine Ind. J.* 8 (1) (1993) 89.
- [9] P. Fuller, *Aust. N. Z. Wine Ind. J.* 10 (1) (1995) 58.
- [10] B.C. Duncan, R.L. Gibson, D. Obradovic, *Aust. N. Z. Wine Ind. J.* 12 (2) (1997) 180.
- [11] Pàgina web: <http://www.preteux-bourgeois.com/esp/mise/pourq.htm> (20/12/02)
- [12] P.R. Howland, A.P. Pollnitz, D. Liacopoulos, H.J. McLean, M.A. Sefton, *Aust. J. Grape Wine Res.* 3 (3) (1997) 141.
- [13] J.-M. Riboulet, C. Alegoet, *Aspectos prácticos del taponado de los vinos*, Bourgogne-publications s.a.r.l., Chaintré (França) (1986), ISBN 2-905428-01-5.
- [14] V. Mazzoleni, L. Dallagiovanna, M. Trevisan, M. Nicelli, *Chemosphere* 58 (2005) 1547.
- [15] N. Boudaoud, L. Eveleigh, *J. Agric. Food Chem.* 51 (2003) 1530.
- [16] J.A. Maga, J.-L. Puech, *Food Rev. Int.* 21 (2005) 53.
- [17] J. Northey, *Aust. N. Z. Wine Ind. J.* 8 (1) (1993) 86.
- [18] I. Hermosín Gutiérrez, *Tecnología del vino* (2002) 64.
- [19] T.J.F. Fonseca, B. Parresol, *Forest Ecol. Manag.* 152 (2001) 131.
- [20] D. Cala, C. Monteagudo, *Europacork* (2003) 25.

- [21] P. Vieira Neto, *Australian Society of Viticulture and Oenology*. Oenology Seminar, Corks and Closures, Adelaide (Austràlia) 20 October, 1994.
- [22] K.C. Fugelsang, D. Callaway, T. Toland, C.J. Muller, *Aust. N. Z. Wine Ind. J.* 12 (2) (1997) 185.
- [23] A. Martínez Bazaga, *Experiencia de auditorías realizadas conforme al SYSTECODE (2000-20005)*. Congrés internacional suredes, fàbriques i comerciants. Passat, present i futur del negoci surer, Palafrugell (Espanya) 16-18 febrer, 2005.
- [24] D. Subirà Gusó, *Análisis de Peligros y Puntos Críticos de Control (APPCC) en la industria del corcho*. Congrés internacional suredes, fàbriques i comerciants. Passat, present i futur del negoci surer, Palafrugell (Espanya) 16-18 febrer, 2005.
- [25] Redacció, *ACE Revista d' Enologia*, 1er trimestre (2001) 4.
- [26] F. Zamora Marín, *Enólogos* 33 (2005) 42.
- [27] E.J. Waters, P.J. Williams, *Aust. N. Z. Wine Ind. J.* 12 (2) (1997) 189.
- [28] P. Godden, L. Francis, J. Field, M. Gishen, A. Coulter, P. Valente, P. Høj, E. Robinson, *Aust. N. Z. Wine Ind. J.* 16 (5) (2001) 93.
- [29] A. Silva, M. Lambri, M.D. De Faveri, *Eur. Food Res. Technol.* 216 (2003) 529.
- [30] D. Capone, M. Sefton, I. Pretorius, P. Høj, *Aust. N. Z. Wine Ind. J.* 18 (5) (2003) 16.
- [31] Pàgina web: <http://www.corkwatch.com/> (10/10/05)
- [32] E. Navascues, F. Calderón, J.A. Suárez, *ACE Revista d' Enologia*, 1er trimestre (2001) 8.
- [33] C. Silva Pereira, J.J. Figueiredo Marques, M.V. San Romão, *Crit. Rev. Microbiol.* 26 (2000) 147.
- [34] M. Berbegal, J. Armengol, J. García-Jiménez, J. Roselló, C. Matas, *Enólogos* 17 (2002) 52.
- [35] S. Rocha, I. Delgadillo, A.J. Ferrer Correia, *J. Agric. Food Chem.* 44 (1996) 865.
- [36] M. Hall, *Food Rev.* 24 (6) (1997) 21.
- [37] QUERCUS-Qualitative Experiments to Determine the Components Responsible and Eliminate the Causes of Undesirable Sensory Characteristics in Drinks Stopped With Cork, European Union and C.E. Liège Contract No. AIR1-CT92-0372, 1996.
- [38] R.F. Simpson, *Aust. N. Z. Wine Ind. J.* 5 (1990) 286.

- [39] A. Peña-Neira, B. Fernández de Simón, M.C. García-Vallejo, T. Hernández, E. Cadahía, J.A. Suarez, *Eur. Food Res. Technol.* 211 (2000) 257.
- [40] J.M. Amon, J.M. Vandeppeer, R.F. Simpson, *Aust. N. Z. Wine Ind. J.* 4 (1989) 62.
- [41] M.A. Sefton, R.F. Simpson, *Aust. J. Grape Wine Res.* 11 (2) (2005) 226.
- [42] P. Darriet, M. Pons, R. Henry, O. Dumont, V. Findeling, P. Cartolaro, A. Calonnec, D. Dubourdieu, *J. Agric. Food Chem.* 50 (2002) 3277.
- [43] P. Darriet, M. Pons, R. Henry, S. Lamy, D. Dubourdieu, *J. Agric. Food Chem.* 48 (2000) 4835.
- [44] H.-R. Buser, C. Zanier, H. Tanner, *J. Agric. Food Chem.* 30 (1982) 359.
- [45] L.H. Aung, J.F. Jenner, *J. Stored Prod. Res.* 40 (2004) 451.
- [46] E. Cantergiani, H. Brevard, Y. Krebs, A. Feria-Morales, R. Armadò, C. Yeretzian, *Eur. Food Res. Technol.* 212 (2001) 648.
- [47] P.B.M. Pinheiro, J.C.G. Esteves da Silva, *Anal. Bioanal. Chem.* 382 (2005) 341.
- [48] A. Miki, A. Isogai, H. Utsunomiya, H. Iwata, *J. Biosci. Bioeng.* 100 (2) (2005) 178.
- [49] J. Prescott, L. Norris, M. Kunst, S. Kim, *Food Qual. Prefer.* 16 (2005) 345.
- [50] A.P. Pollnitz, K.H. Pardon, D. Liacopoulos, G.K. Skouroumounis, M.A. Sefton, *Aust. J. Grape Wine Res.* 2 (1996) 184.
- [51] P. Chatonnet, S. Bonnet, S. Boutou, M.-D. Labadie, *J. Agric. Food Chem.* 52 (2004) 1255.
- [52] F.B. Whitfield, J.L. Hill, K.J. Shaw, *J. Agric. Food Chem.* 45 (1997) 889.
- [53] L. Malleret, A. Bruchet, M.-C. Hennion, *Anal. Chem.* 73 (2001) 1485.
- [54] R.F. Simpson, D.L. Capone, B.C. Duncan, M.A. Sefton, *Aust. N. Z. Wine Ind. J.* 20 (1) (2005) 26.
- [55] R.F. Simpson, D.L. Capone, M.A. Sefton, *J. Agric. Food Chem.* 52 (2004) 5425.
- [56] M. Czerny, W. Grosh, *J. Agric. Food Chem.* 48 (2000) 868.
- [57] W.R. Sponholz, H. Muno, *Ind. Bevande XXIII* (1994) 133.
- [58] P. Neto, *Europacork* (2003) 51.
- [59] J.L. Hill, A.D. Hocking, F.B. Whitfield, *Food Chem.* 54 (1995) 161.
- [60] F.B. Whitfield, T.H. Nguyer, J.H. Last, *J. Agric. Food Chem.* 37 (1986) 85.
- [61] D.A. Barker, D.L. Capone, A.P. Pollnitz, H.J. McLean, I.L. Francis, H. Oakey, M.A. Sefton, *Aust. J. Grape Wine Res.* 7 (2001) 40.

- [62] R. Juanola, D. Subirà, V. Salvadó, J.A. Garcia Regueiro, E. Anticó, *Eur. Food Res. Technol.* 220 (2005) 347.
- [63] J.M. Amon, R.F. Simpson, *Aust. N.Z. Grapegrow. Winemak.* 268 (1986) 63.
- [64] J. Jäger, J. Diekmann, D. Lorenz, L. Jakob, *Aust. J. Grape Wine Res.* 2 (1996) 35.
- [65] D.L. Capone, G.K. Skouroumounis, M.A. Sefton, *Aust. J. Grape Wine Res.* 8 (2002) 196.
- [66] D.L. Capone, G.K. Skouroumounis, D.A. Barker, H.J. McLean, A.P. Pollnitz, M.A. Sefton, *Aust. J. Grape Wine Res.* 5 (1999) 91.
- [67] J. Schnürer, J. Olsson, T. Börjesson, *Fungal Genet. Biol.* 27 (1999) 209.
- [68] M.L. Álvarez-Rodríguez, L. López Ocaña, J.M. López-Coronado, E. Rodríguez, M.J. Martínez, G. Larriba, J.-J.R. Coque, *Appl. Environ. Microbiol.* 68 (12) (2002) 5860.
- [69] F. Puerto Puerto, *Ind. Bevande XXII* (1993) 402.
- [70] C. Silva Pereira, A. Pires, M.J. Valle, L. Vilas Boas, J.J. Figueiredo Marques, M.V. San Romão, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 24 (2000) 256.
- [71] M. Careri, V. Mazzoleni, M. Musci, R. Molteni, *Chromatographia* 49 (1999) 166.
- [72] M. Careri, V. Mazzoleni, M. Musci, R. Molteni, *Chromatographia* 53 (2001) 553.
- [73] Redacció, *ACE Revista d' Enologia*, 1er trimestre (1992) 4.
- [74] S. Rocha, I. Delgadillo, A.J. Ferrer Correia, A.M. Bastos, I. Roseira, A. Guimarães, *Aust. N. Z. Wine Ind. J.* 8 (3) (1993) 223.
- [75] E.J. Waters, Z. Peng, K.F. Pocock, P.J. Williams, *Aust. J. Grape Wine Res.* (1996) 191.
- [76] M. Moliner, R. Juanola, M. Rodríguez, C. Bach, *Rev. Oenol.* 117 (2005) 23.
- [77] Y. Vasserot, C. Pitois, P. Jeandet, *Am. J. Enol. Vitic.* 52 (3) (2001) 280.
- [78] M.F.A. Ferreira Cabral, J. Leal Ferreira, *Aust. N.Z. Grapegrow. Winemak.* 449A (2001) 169.
- [79] Pàgina web: <http://www.corkfacts.com/pdf/files/focus3.pdf> (02/11/05)
- [80] M.K. Taylor, T.M. Young, C.E. Butzke, S. Ebeler, *J. Agric. Food Chem.* 48 (2000) 2208.
- [81] D. Rowe, *Aust. N. Z. Wine Ind. J.* 18 (3) (2003) 24.

- [82] C. Liang, D. Wang, M. Yang, W. Sun, S. Zhang, J. Environ. Sci. Health 40 (2005) 767.
- [83] Hervé E., S. Prices, Burns G., *Chemical analysis of TCA as a quality control tool for natural cork*. Pàgina web: <http://www.corkqc.com/asev/asev2-2.htm> (02/11/05).





## ***2. Metodologies***

---



El propòsit de la secció que a continuació es detalla té com a objectiu situar al lector en el marc de les metodologies que s'han proposat per a la determinació del compostos que habitualment es consideren responsables del defecte sensorial “gust de suro” (els cloroanisoles i clorofenols). Bàsicament les matrius d'estudi a les quals es farà referència seran el vi i el suro, tot i que, com a conseqüència de les implicacions negatives dels compostos clorofenòlics en els sistemes naturals, també es citaran breument aquelles matrius ambientals on tendeixen a acumular-se. De la necessitat de disposar de mètodes ràpids, econòmics, sensibles, selectius i simples n'han sorgit diverses línies de recerca que s'han traduït en una àmplia bibliografia que, al cap i a la fi, evidencien la rellevància del problema.

## **2.1. LA PROBLEMÀTICA DE L'ANÀLISI DE CLOROANISOLES I CLOROFENOLS EN VI I SURO**

D'entre els compostos associats amb el “gust de suro”, la determinació de cloroanisoles, tant en vi com en suro, ha despertat un especial interès. Fruit de l'elevada incidència d'aquests anàlits en vins defectuosos que presenten els descriptors aromàtics de “gust de suro”, en moltes ocasions, les mesures de control han estat dirigides a la seva detecció. Si bé l'anàlisi dels precursors directes d'aquests compostos, els clorofenols, havia estat relegada a un segon terme, actualment s'ha pres consciència de la seva implicació en el defecte de “gust de suro”. D'aquest fet en sorgeix la necessitat d'establir metodologies per a la seva correcta determinació en les dues matrius considerades.

El coneixement de la mostra esdevé un punt clau a l'hora de planificar la metodologia analítica. Tant el vi com el suro són matrius extremadament complexes, que contenen un gran nombre de compostos que pertanyen a famílies químiques diverses i es troben a diferents nivells de concentració. Aquest fet exigeix un exhaustiu pretractament de la mostra encaminat principalment a l'aïllament dels anàlits d'estudi i l'eliminació d'interferents que poden dificultar la posterior anàlisi instrumental. Addicionalment, cal esmentar que el suro és una matriu sòlida heterogènia, i per tant no es disposen de materials de referència certificats per a la validació de mètodes.

## 2. Metodologies

Les propietats físico-químiques dels compostos objecte d'estudi (**Taula 2.1**) determinen l'estratègia analítica a desenvolupar. En especial, els cloroansoles es caracteritzen per la seva volatilitat i un caràcter apolar. En contraposició, la química dels seus precursors ve governada per l'existència del grup hidroxil, que els confereix una elevada reactivitat i una relativa polaritat que disminueix amb el nombre d'àtoms de clor de la molècula. Aquest diferent comportament entre les dues famílies de substàncies condicionarà la interacció amb la matriu i justifica la raó per la qual la majoria de mètodes existents es basen en la seva anàlisi per separat.

Compost	Punt d'ebullició °C (760 mmHg)	Punt de fusió °C (760 mmHg)	Pressió de vapor 10 <sup>-3</sup> mmHg	K <sub>ow</sub>	Solubilitat en aigua mg.L <sup>-1</sup>	Constant de Henry 10 <sup>-6</sup> atm (mol.m <sup>3</sup> ) <sup>-1</sup>
TCA	241	61	0.228	4.11	10.0	130.000
TCP	246	69	2.500	3.69	800.0	2.600
TBA*	298	88	0.644	4.74	1.0	20.200
TBP*	286	95	0.303	4.18	70.0	0.035
TeCA		84	3.190	4.65	1.4	96.100
TeCP	232	70	0.666	4.09	23.0	8.840
PCA		108	0.592	5.29	0.4	1930.000
PCP	309	174	0.110	5.12	14.0	0.025

\*S'han inclòs el TBA i el seu precursor fenòlic atesa la seva contribució en el defecte.

**Taula 2.1.** Propietats físico-químiques dels clorofenols i ansoles relacionats amb el “gust de suro” [1].

Els estrictes requeriments en termes de límit de detecció per aquests compostos en ambdues matrius exigeix una preconcentració dels anàlits per tal que els sistemes de detecció instrumentals es puguin equiparar amb la detecció sensorial. Així doncs, abans d'escollir una metodologia de preparació de mostra caldrà sospesar-ne els avantatges i inconvenients ja que, al cap i a la fi, determinarà l'èxit de l'anàlisi.

La selecció de la instrumentació per obtenir una bona separació i quantificació dels compostos depèn de la complexitat de la matriu i la selectivitat del procés d'extracció. Aprofitant les característiques d'elevada volatilitat dels cloroansoles i clorofenols, la majoria de les metodologies proposades per la seva anàlisi es basen en la **cromatografia de gasos**.

## 2.2. PRETRACTAMENT DE LA MOSTRA

El procediment analític està integrat per una sèrie d'etapes interrelacionades entre sí, que s'estenen des del plantejament del problema fins a l'obtenció de resultats. Tot i que totes les etapes influencien la qualitat dels resultats finals, en els treballs que es recullen en aquesta memòria s'ha posat especial èmfasi en el pretractament de la mostra. Tot i que la instrumentació analítica ha experimentat un extraordinari avenç tecnològic, en molts casos, encara no és possible la mesura directa dels anàlits en la pròpia mostra. D'aquesta manera es fa palès la conveniència de disposar de tècniques de preparació i pretractament dirigides a obtenir els anàlits en l'estat més pur possible. Això implica sotmetre la mostra a processos físics i químics per tal d'aïllar les substàncies a determinar separant-les de la matriu (mostres sòlides i líquides). Per tant, la identificació i quantificació de compostos orgànics a nivells traça en matrius complexes es pot aconseguir combinant eficients mètodes de concentració i separació juntament amb tècniques de detecció sensibles i selectives.

S'han descrit gran nombre de tècniques de pretractament en funció dels objectius a assolir. En un principi, aquests procediments resultaven especialment laboriosos perquè requerien un temps massa llarg i una manipulació manual. Malgrat que molts d'ells encara s'utilitzen i que, en determinades ocasions, s'apliquen com a mètodes de referència, la tendència actual és la seva substitució per protocols que comporten beneficis tant pel que fa a la rapidesa, sensibilitat, selectivitat, fàcil automatització i baix consum de reactius cars i que tenen efectes nocius pel medi ambient. La finalitat d'aquest apartat no és aprofundir en els principis que regeixen el conjunt d'aquestes operacions bàsiques sinó que s'ha considerat donar prioritat a aquelles tècniques que han estat majoritàriament aplicades per a la determinació de cloroanisoles i clorofenols en vi i suro i que, de fet, han estat tractades en aquest treball de recerca.

### 2.2.1. L'extracció amb dissolvent.

Fonamentalment, aquesta tècnica consisteix en desplaçar l'anàlit de la matriu que el conté mitjançant el contacte amb un dissolvent extractant. Aquest fet implica que el dissolvent ha de tenir la capacitat de debilitar les interaccions compost-matriu per tal d'afavorir-ne l'extracció. En general, els solvents que s'empren com a extractants s'elegeixen considerant el postulat de "similar dissol similar", és a dir, en funció de la

natura de la substància a extreure s'escull un dissolvent que sigui el màxim d'afí en termes de polaritat. Les propietats del solut són de vital importància a l'hora de realitzar l'extracció i, a banda de la hidrofobicitat, també cal tenir coneixement de la pressió de vapor, la solubilitat, el pes molecular i els equilibris de dissociació àcid-base. Aquestes propietats determinen el transport dels anàlits. Depenent de si la mostra és un líquid (vi) o un sòlid (suro) es parla d'extracció líquid-líquid (LLE) o d'extracció sòlid-líquid (SLE), respectivament.

L'**extracció líquid-líquid** es basa en la transferència dels compostos des de la mostra, que acostuma a ésser aquosa, a un dissolvent orgànic immiscible. El dissolvent orgànic o extractant ha de tenir com a principal característica una baixa solubilitat i reactivitat amb l'aigua. A la pràctica, normalment el contacte amb les dues fases es duu a terme per agitació. Durant el procés, l'anàlit es reparteix entre ambdós líquids fins a assolir l'equilibri: el coeficient de repartició serà diferent per a cada substància i dissolvent. D'entre els paràmetres a optimitzar en destaca la relació de volums (Volum inicial de mostra/Volum final on es recuperarà l'anàlit), ja que en augmentar aquest valor es millora l'eficàcia de l'extracció. A més, emprant un baix volum de solvent orgànic s'afavoreix la concentració del solut. Sovint interessa reduir encara més el volum de l'extracte obtingut, i aquesta operació es realitza evaporant el solvent sempre i quan presenti certa volatilitat. Si es repeteix l'extracció successives vegades es poden aconseguir extraccions més quantitatives. La modificació del pH o la força iònica del medi (addició de sals neutres a la fase aquosa per disminuir la solubilitat del compost) juntament amb la utilització mesclades de dissolvent permeten incrementar la selectivitat. En el cas dels clorofenols, que són compostos relativament àcids, és possible separar-los en diferents fraccions ajustant el pH, fent viable així la seva posterior determinació sense necessitat d'aplicar etapes de purificació dels extractes. Aquesta tècnica és molt versàtil atès que es disposa de gran varietat de dissolvents, i es distingeix per la seva simplicitat i per no requerir una instrumentació sofisticada. No obstant, la formació d'emulsions, la manipulació de grans volums de mostra, la dificultat d'automatització, l'ús de dissolvents tòxics i inflamables, així com els riscos de pèrdues o contaminacions durant les diferents etapes, fan que l'extracció líquid-líquid sigui cara, lenta i tediosa, i consegüentment, es va substituint dels laboratoris com a tècnica de rutina.

En un principi, la majoria dels mètodes d'anàlisi de cloroanisoles i clorofenols en vi empraven l'extracció líquid-líquid per recuperar els anàlits. En la **Taula 2.2** s'especifiquen alguns d'aquests mètodes, els compostos analitzats i el tipus d'agent extractant considerat en cada cas. El dissolvent que habitualment s'escull és el *n*-pentà, ja que d'una banda presenta bona afinitat per les substàncies estudiades i a més és volàtil, fet que facilita la seva evaporació i la posterior concentració de l'extracte.

Família de compostos	Anàlits	Agent extractant	Referència
Cloroanisoles	TCA	<i>n</i> -pentà	[2]
		<i>n</i> -pentà:acetat d'etil (3:1)	[3]
	TCA, TeCA, PCA	<i>n</i> -pentà	[4, 5]
		<i>n</i> -pentà:diclorometà (1:1)	[6]
	2,4-DCA, 2,6-DCA, TCA, TeCA, PCA	<i>n</i> -pentà	[7, 8]
Clorofenols	TCP, TeCP, PCP	<i>n</i> -pentà	[4, 5]
		<i>n</i> -pentà:diclorometà (1:1)	[6]

**Taula 2.2.** Mètodes d'anàlisi de cloroanisoles i clorofenols en vi basats en la LLE.

L'**extracció sòlid-líquid** bàsicament comparteix el mateix principi que l'extracció líquid-líquid i per tant es fonamenta en el contacte d'una quantitat determinada de mostra sòlida amb un dissolvent adequat. És un procés exhaustiu que assegura l'extracció completa de l'anàlit però simultàniament també s'extreuen gran quantitat d'espècies interferents que poden dificultar la determinació final del compost. Per aquest motiu, el procediment ha de ser optimitzat i s'han d'obtenir unes condicions de compromís que comportin una major extracció de les substàncies considerades i la mínima d'altres presents en la mostra. Els paràmetres que influencien el rendiment de l'operació són: el dissolvent, que ha de dissoldre fàcilment el compost a extreure; la solubilitat del solut, que generalment a elevades temperatures augmenten els coeficients de difusió, la capacitat del dissolvent per debilitar les interaccions anàlit-matriu i el temps de contacte que ha de ser el menor possible.

La realització de l'extracció del material de suro es pot plantejar de diferent manera. En certes ocasions es posa en contacte el solvent extractant amb el tap sencer o triturat i, en d'altres, es realitza una maceració, normalment, del tap de suro íntegre. En aquesta segona opció, tal com s'ha exposat en l'apartat 1.3.5, s'utilitza una solució hidroalcohòlica o bé etanol com a medi de maceració, la qual posteriorment se sotmet a



una extracció líquid-líquid o a una altra tècnica seguida d'una preconcentració. En el cas de l'extracció directa amb un dissolvent orgànic es poden aplicar diversos mètodes: aquells que no requereixen la contribució de calor (agitació simple o amb ultrasons) i aquells que es realitzen a temperatures elevades (Soxhlet, extracció accelerada).

L'extracció per agitació simple és un procediment molt suau que té lloc posant en contacte la mostra amb el dissolvent amb l'ajut d'un sistema d'agitació. Per tant, només serà aplicable en aquelles mostres on l'anàlit es trobi enllaçat de forma feble a la matriu. L'eficàcia del procés vindrà condicionada per la polaritat del dissolvent, el temps d'agitació i el tipus de matriu. Un cop extret el solut, se separa el material sòlid del dissolvent o extracte, el qual s'acostuma a evaporar per tal de reduir-ne el volum i així concentrar els anàlits. Sovint per obtenir millors recuperacions en menor temps i volum de mostra i solvent s'empra un bany d'ultrasons, que provoca la vibració de les molècules, de manera que el dissolvent difon més fàcilment en la mostra, afavorint-ne el contacte. Els inconvenients d'aquesta tècnica són el risc de pèrdues d'anàlits com a resultat de la filtració i l'evaporació de l'extracte i l'exposició de l'operador als vapors tòxics dels solvents.

L'extracció Soxhlet ha estat un mètode estàndard d'extracció de mostres sòlides i s'ha convertit en mètode oficial de nombroses anàlisis. S'aplica quan els soluts es troben fortament units a la matriu i l'extracció per agitació no és suficient per recuperar-los. Llavors és necessari escalfar el dissolvent i la mostra de forma contínua evitant qualsevol pèrdua per evaporació. La metodologia emprada és simple, no depèn de la matriu, la temperatura del solvent afavoreix la solubilització dels compostos i s'obtenen excel·lents recuperacions. Aquest sistema d'extracció, però, no es troba exempt de desavantatges com el llarg temps (la recuperació completa implica de 12 a 48 hores), la gran quantitat de dissolvents orgànics tòxics i la degradació d'anàlits termolàbils.

L'extracció accelerada amb dissolvents (ASE) combina l'extracció amb solvents orgànics a temperatura (50-200°C) i pressions elevades (1500-2000 psi) per recuperar ràpidament i de manera eficaç els compostos de matrius sòlides. Les altes temperatures acceleren la cinètica del procés, incrementen la solubilitat dels anàlits, disminueixen la viscositat del dissolvent i la tensió superficial del solvent, soluts i mostra, millorant així la penetració en les partícules de la matriu. L'ús d'altres pressions manté el dissolvent en

estat líquid a temperatures per sobre del seu punt d'ebullició, produeix un moviment ràpid dels fluids a través del sistema i força al solvent a introduir-se dins dels porus de la matriu. El procés complet es pot fàcilment automatitzar, el temps i el volum de dissolvent són baixos, el desenvolupament de mètodes és senzill i ofereix uns resultats similars o millors que els que s'obtenen amb els mètodes clàssics. Aquesta tècnica ha estat explotada principalment per a la recuperació de contaminants presents en mostres ambientals com sòls, sediments, fangs, cendres, etc. No obstant, atenent els beneficis que se'n deriven, s'ha fomentat la seva aplicació en diferents sectors, incloent el farmacèutic, l'alimentari i el biològic [9].

Aquestes tècniques que breument s'han descrit han estat aplicades satisfactòriament a l'anàlisi de cloroansoles i clorofenols en mostres de taps de suro. Tal i com s'indica a la **Taula 2.3**, l'extracció sòlid-líquid es continua utilitzant com a mètode de rutina.

Família de compostos	Anàlits	Tipus d'extracció sòlid-líquid (dissolvent)	Referència
Cloroansoles	TCA	maceració (etanol)	[2]
		maceració ( <i>n</i> -pentà)	[10, 11]
	2,4-DCA, 2,6-DCA, TCA, TeCA, PCA	maceració ( <i>n</i> -pentà)	[7, 8]
		agitació ( <i>n</i> -pentà/acetat d'etil)	[3]
	TCA	agitació ( <i>n</i> -pentà)	[12, 13, 14]
		agitació (etanol 40%)	[15]
	TCA, TeCA, PCA	agitació ( <i>n</i> -hexà)	[5]
	TCA	Soxhlet ( <i>n</i> -pentà)	[12, 16]
		Soxhlet ( <i>n</i> -pentà)	[4]
		Soxhlet (diclorometà)	[6]
	Soxhlet ( <i>n</i> -hexà)	[17]	
	TCA	ultrasons ( <i>n</i> -pentà)	[12]
	TCA	extracció accelerada ( <i>n</i> -pentà)	[16]
	DCA, TCA, (TBA)	extracció accelerada ( <i>n</i> -pentà/dietilèter)	[18]
Clorofenols	TCP	agitació (etanol 40%)	[15]
		agitació ( <i>n</i> -hexà)	[5]
		agitació (diclorometà/àcid acètic)	[6]
	TCP, TeCP, PCP	Soxhlet ( <i>n</i> -hexà)	[17]

**Taula 2.3.** Mètodes d'anàlisi de cloroansoles i clorofenols en taps de suro basats en l'extracció sòlid-líquid.

Exceptuant l'extracció accelerada, els inconvenients d'aquests tipus d'extraccions, anteriorment citats (grans volums de dissolvents tòxics i cars, procediments llargs i difícils d'automatitzar, baixa selectivitat, etc.), han afavorit l'aplicació d'altres tècniques per tal de vèncer aquestes limitacions. Precisament, en la memòria que aquí es presenta també s'ha fet ús de l'extracció sòlid-líquid per a mostres de suro mitjançant

dissolucions hidroalcohòliques i dissolvents orgànics (*n*-pentà) ja sigui per a la determinació del contingut total dels anàlits o de la fracció alliberable.

### 2.2.2. L'extracció en fase sòlida (SPE).

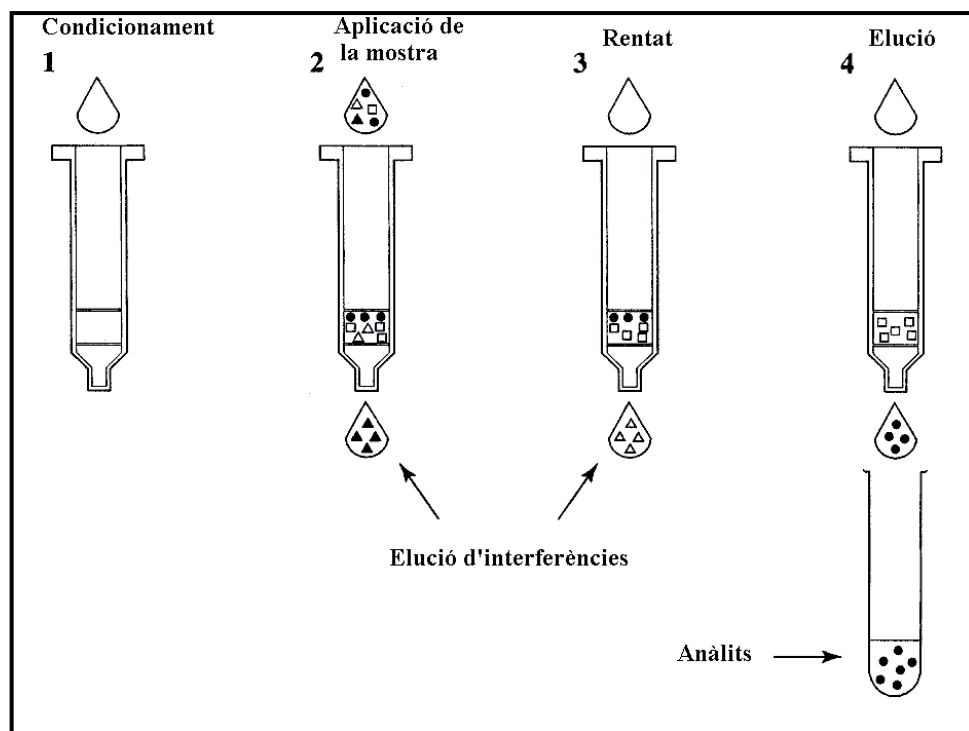
L'extracció en fase sòlida (SPE) és un mètode de preparació i tractament de mostres que principalment concentra i purifica els anàlits d'una matriu líquida mitjançant la retenció en una fase sòlida o sorbent. El seu camp d'aplicació, però, no es limita a matrius líquides ja que també permet l'extracció de compostos de mostres gasoses. El fonament d'aquesta tècnica és similar al de l'extracció líquid-líquid i per tant es basa en la diferència d'afinitat dels components de la mostra entre la matriu i la fase sòlida. No obstant, com a resultat dels avantatges de la SPE, aquesta ha substituït l'extracció líquid-líquid en molts àmbits d'aplicació. D'entre els beneficis que comporta la SPE en destaquen el reduït temps d'anàlisi (requereix una menor manipulació de la mostra), cost i consum de dissolvents orgànics [19]. Presenta una gran flexibilitat que facilita la compatibilitat amb posteriors sistemes d'anàlisi instrumental. La seva facilitat d'automatització incrementa la seva productivitat ja que es poden realitzar múltiples extraccions simultàniament, a la vegada que millora la precisió, l'exactitud, la seguretat al laboratori i simplifica substancialment el desenvolupament de mètodes d'anàlisi [20]. A més, és una tècnica simple, que proporciona elevats factors de preconcentració i recuperacions dels anàlits d'estudi.

Les característiques de la SPE permeten la seva utilització per dur a terme diverses funcions: concentració de compostos a nivell traça, purificació de mostres o eliminació d'interferències, fraccionament de la mostra, conservació i transport de la mostra (compostos inestables en medi líquid, d'elevada volatilitat, gasos, etc.) i canvi de fase quan l'anàlit es troba en una emulsió, suspensió o simplement en un dissolvent inadequat per a la tècnica que es vol emprar per a la seva determinació final. Addicionalment, la SPE s'ha considerat, en determinades aplicacions, el vehicle mitjançant el qual es poden realitzar reaccions de derivatització, a través de l'adsorció del reactiu derivatitzant en la fase sòlida o bé la transformació de l'anàlit un cop es troba retengut en el sorbent [21].

Des de l'aparició de les primeres fases de SPE a finals de la dècada dels 70, s'ha anat modificant la presentació del producte en funció de les diverses necessitats d'aplicació i

automatització. Així doncs, els sorbents de SPE es poden empaquetar en tres formats bàsics: discos, cartutxos i xeringues d'un sol ús. Aquesta darrera configuració, que és la més habitual, consisteix en un cilindre de polipropilè (amb un terminal Luer) a l'interior del qual es disposa la fase sòlida entre dos discos del mateix material o Teflon. Normalment, aquestes xeringues es comercialitzen per a ser utilitzades directament sense cap pretractament excepte els que requereix el propi procés de SPE. No obstant, els diferents components es poden dispensar per separat per tal que l'analista s'elabori la configuració que més s'ajusti a l'aplicació a desenvolupar.

Bàsicament, l'extracció en fase sòlida, quan s'utilitza per a l'aïllament de compostos d'una matriu líquida, consisteix en 4 etapes les quals es representen a la **Figura 2.1**: condicionament, aplicació de la mostra, rentat i elució dels anàlits.

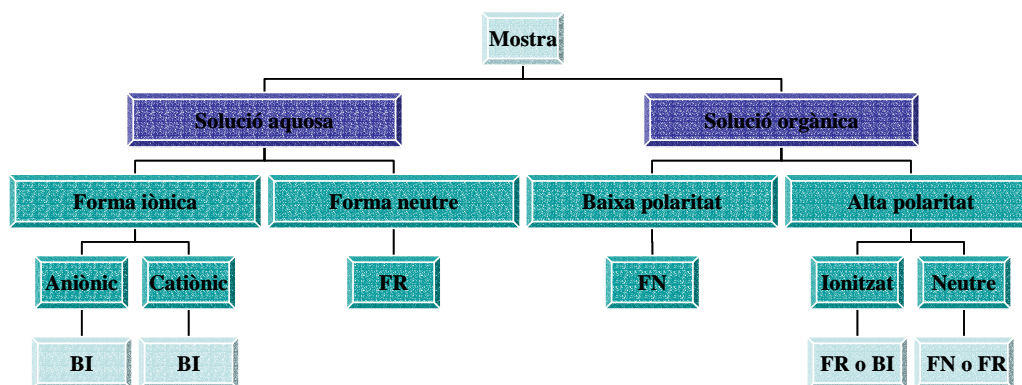


**Figura 2.1.** Etapes del procés d'extracció en fase sòlida [21].

El condicionament de la fase té com a objectiu la solvatació dels grups funcionals de l'adsorbent i l'eliminació de l'aire dels porus mitjançant el pas d'un o més dissolvents. S'ha d'evitar que la fase sòlida s'assequi durant aquesta etapa ja que sinó el mecanisme d'adsorció no serà efectiu i repercutirà negativament en les recuperacions dels compostos. L'aplicació de la mostra es pot realitzar o bé per gravetat, bombejant o aspirant utilitzant buit o un sistema automatitzat. El flux amb el qual s'introdueix la

mostra ha de ser constant i depèn de les dimensions de la configuració del sorbent i de la mida de partícula del mateix. Sovint la velocitat és un paràmetre a optimitzar: s'ha d'arribar a un compromís per tal que hi hagi una bona interacció entre els grups funcionals de la fase sòlida i els de la molècula sense que això impliqui una gran inversió de temps. Al llarg d'aquesta operació, alguns dels interferents de la matriu poden no ésser retinguts, amb la qual cosa s'assoleix certa purificació. Dos dels paràmetres que influencien el bon funcionament del procés són la capacitat de l'adsorbent o màxima quantitat d'anàlit retingut i el volum de trencament o volum màxim de mostra que es pot aplicar sense que es produeixin pèrdues del compost. El rentat de la fase sòlida permet extreure possibles interferències que hagin estat adsorbides. Finalment, l'elució es realitza per extreure els compostos d'interès i retornar-los a la fase líquida, més adequada per a la posterior anàlisi. Per tant, ha d'existir compatibilitat entre l'eluent i el sistema de mesura. El dissolvent que trenca la interacció anàlit-sorbent acostuma a ser orgànic, malgrat que també es pot emprar un gas. Aquest solvent d'elució ha de permetre obtenir recuperacions quantitatives en el mínim volum possible, el qual depèn, a més, de la quantitat de fase sòlida, del format del dispositiu de SPE i de la polaritat de l'anàlit. Per tant, el que es conclou d'aquesta explicació és que perquè es realitzi la SPE de forma eficaç resulta primordial que un elevat i reproducible percentatge d'anàlits quedin retinguts a la fase sòlida, a la vegada que puguin ésser posteriorment eluïts de la mateixa. En d'altres paraules, el procés de SPE ha de ser reversible [22].

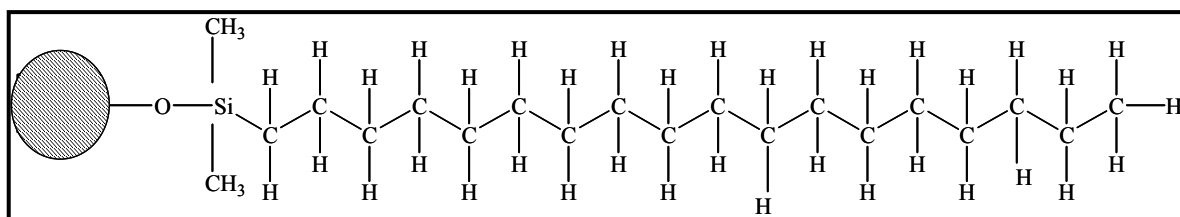
Abans d'escollir un sorbent per SPE, és necessari tenir en compte consideracions fisico-químiques, com els grups funcionals dels anàlits, la natura de la fase sòlida, les energies d'interacció, les interaccions secundàries entre l'anàlit i l'adsorbent, les interaccions sorbent-components de la matriu de la mostra i les interaccions matriu-anàlits de la mostra [23]. Sigui quin sigui l'adsorbent elegit ha de presentar elevada estabilitat química, resistència mecànica i àrea superficial. Les consideracions a l'hora de seleccionar el sorbent que més s'adequa al tipus de mostra a analitzar es recullen en la **Figura 2.2** adjunta. Atenent als mecanismes implicats en l'extracció en fase sòlida que es detallen en el següent esquema, es parla principalment de fase reversa, fase normal i bescanvi iònic.



**Figura 2.2.** Guia per a la selecció del mètode d'extracció en fase sòlida de compostos orgànics. BI = bescanvi iònic, FR = fase reversa, FN = fase normal [24].

Considerant que la majoria de mostres on s'analitzen cloroanisoles i clorofenols (en forma neutre) són de naturalesa aquosa, el mecanisme que més aplicacions ha generat és la **fase reversa**, del qual, a continuació, se'n farà un tractament més exhaustiu. L'extracció en fase reversa implica la distribució dels compostos orgànics d'una fase líquida polar, com són les mostres aquoses, a un sorbent no polar. Les interaccions tenen lloc entre els enllaços C-H dels grups funcionals de l'adsorbent i els enllaços C-H dels anàlits, és a dir, són interaccions de caràcter apolar i de baixa energia que es produeixen per forces de van der Waals o forces de dispersió o partició. Els primers sorbents d'aquest tipus que es van desenvolupar estaven constituïts per una base de sílice, la qual es modificava amb grups funcionals de diferent naturalesa. Els grups funcionals que habitualment s'enllacen són grups etil (C<sub>2</sub>), butil (C<sub>4</sub>), octil (C<sub>8</sub>), octadecil (C<sub>18</sub>), fenil, ciclohexil i cianopropil. La sílice enllaçada més utilitzada és la que conté el grup C<sub>18</sub> a la seva estructura ja que presenta la capacitat de retenir tant anàlits apolars com aquells de polaritat moderada (vegeu **Figura 2.3**). L'aplicació dels sorbents C<sub>18</sub> en l'extracció de clorofenols procedents de matrius aquoses ha generat una extensa bibliografia [25,26,27,28]. L'eficiència d'extracció d'aquesta fase sòlida també s'ha demostrat per a la determinació de certes substàncies en vi, com per exemple, compostos volàtils de diferents famílies [29] o fenòlics [30,31]. D'altra banda, Soleas i col·laboradors [15] van proposar un mètode per a l'anàlisi de TCA i TCP en vi basat en l'extracció amb un cartutx C<sub>18</sub>, el qual va ser també utilitzat per al pretractament d'extractes hidroalcohòlics de suro. Val a dir però que en aquest treball, l'aplicació de la metodologia per a la quantificació dels anàlits en vi resulta força qüestionable, sobretot

pel fet que els patrons de calibratge presenten concentracions tres ordres de magnitud superiors a les que posteriorment es determinen a la mostra.



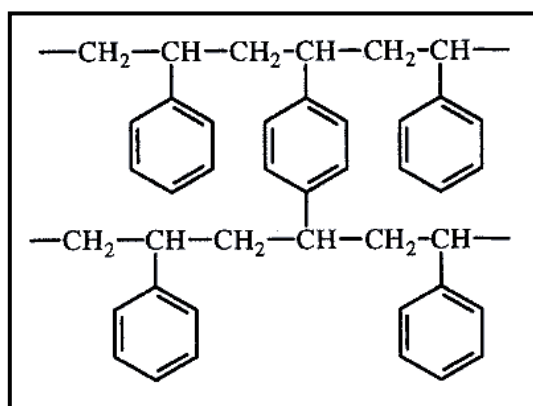
**Figura 2.3.** Estructura de la fase reversa C<sub>18</sub>.

Els principals inconvenients d'aquests sorbents de sílice modificada són la baixa selectivitat i les limitacions de volum màxim que es pot aplicar o volum de trencament, el qual es relaciona amb els coeficients de partició octanol-aigua (per compostos més polars el volum de mostra que es pot introduir és menor). Per incrementar el volum de trencament es pot augmentar la quantitat de sorbent utilitzat o es poden addicionar sals a la solució aquosa (efecte salí), fet que afavoreix la interacció dels anàlits amb la fase sòlida [32]. El pH també és un paràmetre crític per aquest tipus d'adsorbents. Quan es volen extreure compostos àcids (com per exemple el pentaclorofenol) mitjançant SPE amb un sorbent que opera en fase reversa és essencial ajustar el pH de la mostra per tal d'assegurar que les substàncies es trobin en forma neutra. Tot i que existeixen tècniques per reduir el nombre de silanols lliures de la superfície de la sílice (“*endcapping*”), la presència d'aquests grups funcionals pot induir a la formació de ponts d'hidrogen amb els compostos d'interès, generant així adsorcions irreversibles que dificulten el procés d'elució [28].

El carbó grafititzat és una altra classe de sorbent de fase reversa, que es distingeix per permetre extreure i concentrar soluts orgànics altament polars. Es tracta d'un adsorbent no específic i no porós amb una àrea superficial d'aproximadament 100 m<sup>2</sup>/g [33]. Les interaccions que es donen són hidrofòbiques, pròpies de la fase reversa, interaccions  $\pi$ - $\pi$  entre el sorbent i els anells aromàtics de la molècula i, a més, la presència de càrregues positives sobre la seva estructura fan que també es pugui produir un intercanvi aniónic. Per tant, es podria considerar que aquest material actua mitjançant un mecanisme mixt [21]. Aquesta fase es caracteritza per la seva alta resistència tèrmica i química, estabilitat en un ampli interval de pH i l'elevada capacitat d'adsorció, que pot significar

un desavantatge ja que alguns anàlits poden ser retinguts de forma irreversible. La combinació d'aquest tipus de sorbent (ENVI-Carb) amb d'altres fases sòlides contribueix a incrementar l'efectivitat de l'extracció de cloroanisoles a nivells traça en mostres d'aire [34].

Finalment, els polímers orgànics representen un grup important de fases reverses per a SPE, d'entre els quals els copolímers d'estirè-divinilbenzè (PS-DVB) (vegeu **Figura 2.4**) són els que han experimentat un major desenvolupament. Durant molts anys es van emprar reïnes de PS-DVB (Amberlita XAD-2), però com que prèviament a la seva utilització calia dur a terme una exhaustiva etapa de purificació, es van substituir per nous polímers. Els anells aromàtics de la matriu polimèrica permeten interaccions electró-donor entre el sorbent i els enllaços  $\pi$  del solut. Aquestes fases, en comparació amb les de base de sílice, ofereixen una major retenció i són estables en un ampli interval de pH.



**Figura 2.4.** Estructura del poliestirè-divinilbenzè.

Els sorbents de PS-DVB són comercialitzats per diversos proveïdors (consulteu **Taula 2.4**). Tots ells mantenen la mateixa estructura química però es diferencien en el procés de polimerització i el contingut de divinilbenzè. Tots aquests materials tenen un elevat grau d'entrecruament i porositat, fet que incrementa la seva àrea superficial específica i, conseqüentment, la capacitat de retenció.

Un aspecte a tenir en compte de les fase sòlides de SPE és la seva selectivitat, la qual adquireix vital importància quan els compostos han de ser extrets d'una matriu complexa. Donat que els sorbents basats en PS-DVB són poc selectius i presenten volums de trencament baixos, s'han desenvolupat modificacions a l'estructura,



## 2. Metodologies

introduint diferents grups funcionals, per augmentar la polaritat de la superfície [35]. La presència d'unitats polars (acetil, benzoil, àcid sulfònic, carboxílic, etc.) provoca que es donin interaccions secundàries entre elles i els anàlits més hidrofílics, millorant així la seva extracció.

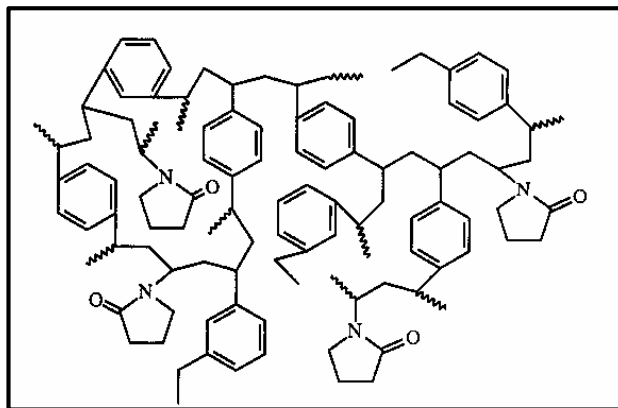
Adsorbent	Proveïdor	Estructura	Diàmetre Porus (Å)	Diàmetre Partícula (µm)	Àrea Superficial (m <sup>2</sup> /g)
Amberlita XAD-2	Supelco	PS-DVB <sup>a</sup>	90	20-60	300
PLRPS	Polymer Lab	PS-DVB	100	15-60	550
Bond Elut ENV	Varian	PS-DVB	450	125	500
Bond Elut PPL	Varian	F-PS-DVB <sup>b</sup>	300	125	700
Envichrom	Supelco	PS-DVB	140	80-160	900
Isolute ENV+	IST	PS-DVB	100	90	1000
Lichrolut EN	Merck	PS-DVB	80	40-120	1200
Porapak RDX	Waters	DVB-VP <sup>c</sup>	55	120	550
Oasis HLB	Waters	DVB-VP	82	30-60	800

<sup>a</sup>Poliestirè-divinilbenzè, <sup>b</sup> Poliestirè-divinilbenzè amb un grup funcional, <sup>c</sup> Divinilbenzè-vinilpirrolidona

**Taula 2.4.** Característiques de diferents adsorbents polimèrics [36].

D'entre els sorbents que es mostren a la **Taula 2.4** en destaca el Lichrolut EN per la seva elevada àrea superficial específica. Aquesta característica es tradueix en alts valors de coeficients de distribució sòlid-líquid i, per tant, major capacitat de retenció. Aquest comportament ha afavorit la introducció d'aquest sorbent per a l'extracció i preconcentració d'anàlits en mostres complexes com aigües residuals [37]. També s'han obtingut resultats satisfactoris en l'anàlisi de compostos volàtils en vi, permetent recuperacions quantitatives d'un gran nombre d'anàlits aromàtics [38].

El sorbent Oasis HLB és un copolímer macroporós constituït per dos monòmers, el divinilbenzè (hidrofòbic) i el *n*-vinilpirrolidona (hidrofílic) (vegeu **Figura 2.5**). A banda de presentar una elevada àrea superficial, la seva doble natura polar i apolar facilita el contacte amb mostres aquoses. Aquesta propietat, a més, és la responsable de la gran versatilitat d'aquest sorbent ja que es pot aplicar per a l'extracció de compostos àcids, neutres i bàsics mitjançant mètodes senzills amb elevades recuperacions [39]. L'estabilitat del sorbent en un ampli interval de pH (pH 1-14) i la compatibilitat amb solvents orgànics són dos factors que possibiliten l'obtenció d'extractes molt purificats. L'amida de l'estructura té la capacitat de romandre humida, fins i tot, després d'assecar-se el cartutx, fet que no implica una pèrdua de l'eficàcia d'adsorció.



**Figura 2.5.** Estructura del sorbent Oasis HLB (divinilbenzè-N-vinilpirrolidona).

Les excel·lents característiques que s'atribueixen a l'Oasis HLB han estimulat el seu ús en un ampli ventall d'aplicacions per determinar diferents compostos en matrius líquides ben diverses. Aquesta fase sòlida ha estat vastament utilitzada per a l'extracció de clorofenols en aigües [40,41,42]. En el cas del vi, s'ha assajat la seva eficiència per a la determinació de fenols i aldehids [43]. L'anàlisi de cloroansoles i clorofenols en vi mitjançant aquest sorbent polimèric ha estat realitzat per Martínez-Uruñela i col·laboradors [44]. En aquest estudi, combinant la concentració de volums de mostra superiors a 1 litre i la introducció de l'extracte en el sistema cromatogràfic usant la tècnica de la injecció de grans volums, s'aconsegueixen assolir límits de detecció compresos entre 0.2 i 2.4 ng/L.

A part dels mecanismes de fase reversa, existeixen altres tipus de sorbents, els quals han estat poc utilitzats en la determinació de cloroansoles i clorofenols. Un exemple el trobem en l'anomenada fase normal, on es donen altres interaccions de tipus polar, com enllaços d'hidrogen, interaccions dipol-dipol, interaccions  $\pi$ - $\pi$  i interaccions dipol-dipol induïdes. I també el bescanvi iònic, on les interaccions entre els anàlits i l'adsorbent són electrostàtiques, és a dir, d'alta energia.

La principal limitació de tots els mecanismes esmentats fins ara és la seva manca de selectivitat. És per això que en els darrers anys s'ha impulsat el desenvolupament de nous materials per a la preconcentració selectiva de compostos orgànics [45]. En aquest grup s'hi englobarien els immunosorbents i els polímers d'impressió molecular [46]. Tot i que no s'han elaborat fases sòlides que estableixin interaccions reversibles antigen-anticòs amb els cloroansoles i clorofenols, cal esmentar el treball de Sanvicens

i col·laboradors, on especifiquen les pautes per a la preparació de derivats capaços de reconèixer el TCA [47], i que, per tant, esdevindria el primer pas per a la introducció de les tècniques immunològiques en el camp de l'anàlisi selectiu dels compostos associats amb el “gust de suro”.

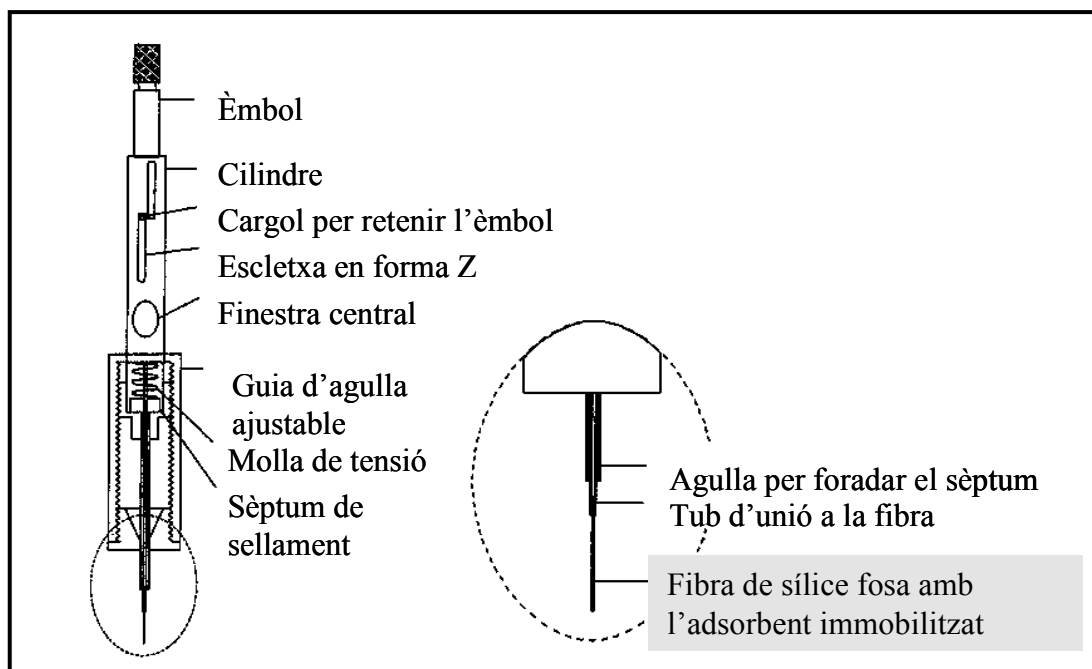
L'innegable potencial de l'extracció en fase sòlida ha estat explotat en diverses disciplines. No obstant això, tal i com es desprèn de l'anterior recull de sorbents de SPE i aplicacions, aquesta metodologia d'extracció no s'ha imposat en la determinació de cloroanisoles i clorofenols en vi o macerats de suro. En aquest sentit, el treball de recerca que es presenta demostra, amb les publicacions que s'adjunten, que l'extracció en fase sòlida representa una clara alternativa als mètodes existents d'anàlisi d'aquests compostos en les dues matrius d'interès.

### 2.2.3. La microextracció en fase sòlida (SPME).

Des que la microextracció en fase sòlida (SPME) va ser introduïda per Janus Pawliszyn el 1989, aquesta tècnica ha estat adaptada per a l'anàlisi d'una gran varietat d'anàlisis procedents de matrius gasoses, líquides i sòlides. El major nombre d'aplicacions s'emmarquen dins del camp mediambiental, encara que s'ha incrementat el seu ús en el sector clínic, alimentari i de les aromes i fragàncies. D'entre les característiques que li han conferit aquesta extensa aplicació en destaquen la rapidesa, simplicitat, sensibilitat (permet assolir grans nivells de preconcentració), selectivitat, baix cost, fàcil integració a sistemes automatitzats i que no requereix l'ús de dissolvents orgànics.

La microextracció en fase sòlida consisteix en dos processos: primer la distribució dels anàlisis entre una fase extractant i la matriu de la mostra, seguit d'una desorció tèrmica o amb dissolvent dels compostos extrets dins l'instrument analític (principalment cromatògraf de gasos o líquids), per tal de dur a terme la separació i quantificació [48]. Tot i que el nom de la tècnica fa pensar que la fase extractant és un sòlid, no sempre el sorbent posseeix una natura sòlida, tal i com es comentarà més endavant. El sorbent que recobreix una fibra de sílice fosa és químicament inert i estable a altes temperatures. El dispositiu més emprat en SPME fou comercialitzat en 1993 per Supelco i la seva configuració, la qual es mostra a la **Figura 2.6**, ha facilitat l'extracció de mostres ambientals *in situ*. En general, el procés extractiu es basa en l'exposició del recobriment o fibra, que es troba a l'interior d'una agulla d'acer inoxidable, en la matriu durant un

període de temps preestablert. El transport dels anàlits des de la matriu al sorbent s'inicia tan bon punt aquest es posa en contacte amb la mostra. Aquells compostos amb elevada afinitat pel sorbent s'extreuran de forma selectiva. Després del mostreig, la fibra es recull dins l'agulla fins a la seva posterior desorció.



**Figura 2.6.** Disseny del dispositiu de SPME distribuït per Supelco.

### **Modes d'extracció en SPME**

En funció de les propietats de la matriu i els compostos de la mostra, s'utilitzen diferents modes d'extracció en SPME. Són els següents: l'extracció directa, la configuració d'espai en cap (“*headspace solid-phase microextraction (HS-SPME)*”) i mitjançant la protecció de la fibra amb una membrana [49]. L'extracció directa implica la immersió de la fibra en el sí de la mostra i per tant aquesta tècnica resulta adient per compostos poc volàtils. En el mode d'espai en cap, els compostos es transporten a través de la barrera d'aire situada sobre la mostra per finalment ser absorbits per l'extractant immobilitzat a la fibra. Els coeficients de difusió en fase gasosa acostumen a ser superiors que en medi líquid i aquest fet afavoreix que el procés d'extracció sigui més ràpid que en la immersió directa i, conseqüentment, es recomana l'espai en cap sempre i quan les substàncies d'estudi posseïxin una volatilitat prou elevada [50]. Aquest tipus de mode d'operació és especialment adequat quan la mostra conté gran nombre d'impureses, les quals es podrien enllaçar a la fibra reduint així la seva capacitat

d'extracció, a la vegada que podrien deteriorar l'instrument on es realitza la desorció. A més aquest mode d'operació permet realitzar modificacions de la mostra, com el canvi de pH, sense alterar la funcionalitat del sorbent. Finalment, la SPME indirecta a través de membrana s'empra en l'anàlisi de mostres amb matrius molt complexes que podrien malmetre la fibra. Els constituents de la membrana poden conferir-li un cert grau de selectivitat en el procés. No obstant, la cinètica d'extracció resulta més lenta ja que els compostos han de difondre a través de la membrana abans d'absorbir-se a la fibra.

### **Fonament teòric**

A diferència de la SPE, en la SPME no té lloc un procés d'extracció exhaustiu, sinó que es tracta d'un procés d'equilibri. Això no implica que s'hagi d'assolir necessàriament l'equilibri, ja que en moltes aplicacions es pot abreujar el temps d'exposició de la fibra sempre i quan s'aconsegueixi la sensibilitat requerida. En condicions d'equilibri, una prolongació del temps d'exposició de la fibra no condueix a extraccions més efectives i per tant la quantitat de compost extreta roman constant dintre dels límits de l'error experimental. La constant de distribució,  $K_{fs}$ , entre la fibra i la mostra ve donada per l'expressió [51]:

$$K_{fs} = \frac{C_f}{C_s} \quad (1)$$

on  $C_f$  és la concentració de l'anàlit a la fibra i  $C_s$  a la solució aquosa. Per obtenir processos analítics més sensibles és necessari que el valor de la constant de distribució sigui elevat. Els valors de  $K_{fs}$  es troben influenciats per la temperatura, el contingut de sals, pH i solvents orgànics [52]. Assumint que la matriu de la mostra és una fase homogènia i no es tracta d'un sistema d'espai en cap, les condicions d'equilibri es poden descriure amb la següent equació:

$$n = \frac{K_{fs} V_f V_s C_0}{K_{fs} V_f + V_s} \quad (2)$$

on  $n$  és el nombre de mols extrets per la fibra,  $V_f$  és el volum de fibra,  $V_s$  és el volum de mostra i  $C_0$  representa la concentració inicial d'un determinat anàlit a la mostra. Quan el  $V_s$  és molt gran, llavors:

$$n = K_{fs} V_f C_0 \quad (3)$$

L'expressió (3) indica que la quantitat de compost extret és independent del volum de la mostra i és directament proporcional a la seva concentració a la matriu. Aquesta relació és el principi que s'aplica en l'anàlisi quantitativa. Addicionalment, a partir de l'equació anterior es pot deduir que quan el valor de  $K_{fs}$  no és suficientment elevat per un determinat anàlit es pot afavorir l'extracció emprant major volum de recobriment de fibra.

La cinètica de l'extracció determina la velocitat del procés i ve governada pel transport de massa des de la matriu de la mostra fins a la fibra. Aquest procés depèn del transport a través de la mostra líquida o gasosa, de la velocitat de desorció dels anàlits de la superfície sòlida de les possibles partícules presents en el medi i de la difusió de la substància en la fibra [48]. La majoria de teories de transport de massa es basen en la segona llei de difusió de Fick, que descriu el balanç de massa en un sistema dinàmic. Al principi, la concentració de l'anàlit en la fibra augmenta ràpidament, i posteriorment de manera més lenta fins a l'equilibri. En el cas de mostres líquides, normalment s'aplica agitació ja que així s'incrementa la difusió. Compostos amb coeficients de difusió baixos requereixen més temps d'extracció. En aquestes situacions s'acostuma a abreujar el temps d'anàlisi mitjançant un estudi del perfil extracció-temps i s'assumeix que s'arriba a l'equilibri quan el 95% de l'anàlit s'ha extret [51]. Una de les estratègies més eficients a l'hora de vèncer les limitacions cinètiques és escalfar la mostra, ja que així s'incrementa la pressió de vapor dels anàlits, proporcionant-los l'energia necessària per alliberar-se de la matriu, al mateix temps que augmenta el transport de massa.

### **Paràmetres que afecten la SPME**

La quantitat d'anàlit extret mitjançant SPME ve determinada per diversos paràmetres tal i com es desprèn de les equacions descrites en l'apartat anterior. Els factors que habitualment s'examinen són: el tipus de fibra, el temps i la temperatura d'extracció, l'efecte salí, addició de dissolvents orgànics, modificació del pH, agitació de la mostra, el volum de mostra i les reaccions de derivatització. La selecció del sorbent més adequat per una aplicació donada esdevé essencial perquè el procés extractiu sigui eficaç. Com a norma general s'aplica el mateix principi que en la SPE, és a dir, "similar dissol similar" i la selectivitat es basa en les diferències de polaritat i volatilitat de les molècules. Tal com es detalla a la **Taula 2.5** existeixen diverses fases estacionàries polimèriques comercials (similars a les emprades en les columnes de cromatografia de gasos) de

## 2. Metodologies

diferents espessors i polaritats. Precisament, el volum de sorbent immobilitzat en la fibra determina la sensibilitat del mètode però recobriments d'elevat gruix porten associades cinètiques lentes.

Sorbent	Gruix (µm)	Ús recomanat	Temperatura màxima (°C)	Mecanisme	Aplicacions
Polidimetilsiloxà (PDMS)	100	GC, HPLC	280	Absorció	Compostos orgànics apolars com VOCs, PAHs, BETX i pesticides organoclorats
	30	GC, HPLC	280		
	7	GC, HPLC	340		
Poliacrilat (PA)	85	GC, HPLC	320	Absorció	Compostos orgànics polars com triazines, pesticides organofosfats i fenols
Polidimetilsiloxà/divinilbenzè (PDMS/DVB)	65	GC	270	Adsorció	Hidrocarburs aromàtics, amines aromàtiques; solvents; anàlisi d'aire
	60	HPLC	-		
Carboxen/polidimetilsiloxà (Carboxen/PDMS)	75	GC	320	Adsorció	VOCS i hidrocarburs
Carbowax/divinilbenzè (CW/DVB)	65	GC	265	Adsorció	Compostos polars com alcohols, cetones
Carbowax/resina templada (CW/TPR)	50	HPLC	-	Adsorció	Surfactants aniònics.

GC = cromatografia de gasos, HPLC = cromatografia de líquids, VOCs = compostos orgànics volàtils, PAHs= hidrocarburs aromàtics policíclics, BETX = benzè/etilbenzè/toluè/xilè

**Taula 2.5.** Sorbents comercials per a la SPME: ús, propietats i aplicacions [53,54].

Alguns autors han desenvolupat mètodes per preparar fibres que posseeixen propietats específiques per a l'extracció dels compostos objecte d'estudi i que incrementen la selectivitat del procés. En aquest sentit, Li i col·laboradors van sintetitzar un sorbent amb elevada estabilitat tèrmica per a l'anàlisi de clorofenols [55]. Liu et al. van preparar una fibra a partir de butil metacrilat, divinilbenzè i oli de silicona per extreure selectivament compostos volàtils en vi [56].

El recobriment de fibra més utilitzat és el polidimetilsiloxà (PDMS) el qual es caracteritza per ser apolar (permet l'extracció principalment d'anàlits hidrofòbics, tot i que optimitzant les condicions experimentals es pot usar per compostos polars) i estable a elevades temperatures. Mitjançant les fases de PDMS l'extracció es produeix via absorció ja que en aquest cas el sorbent és un líquid: els anàlits es dissolen i difonen en el material absorbent. Aquest mecanisme també es dona en les fibres de poliactilat (PA), les qual són adequades pel pretractament de compostos polars com els fenols. Els coeficients de difusió en aquestes fibres de PA són menors que en les de PDMS i es necessita allargar el temps d'extracció [51]. Els altres sorbent que apareixen a la **Taula 2.5** tenen una composició mixta i ofereixen propietats complementàries. El procés

d'extracció es produeix per adsorció dels anàlits a la superfície. Les partícules poroses del divinilbenzè afavoreixen l'adsorció d'espècies volàtils ja que les constants de distribució resulten majors que en el cas de la fibra de PDMS. El principal desavantatge dels sorbents sòlids és la manca de dependència lineal entre la quantitat de substància extreta i la seva concentració a la mostra [57]. Aquest fet és una conseqüència directa del fenomen d'adsorció. El nombre de punts actius de la superfície és limitat, i per tant quan aquests es troben ocupats s'impossibilita l'extracció de l'anàlit. Es tracta d'un mecanisme competitiu: molècules amb elevada afinitat per la superfície poden reemplaçar aquelles que presenten més baixa afinitat. D'aquesta manera s'evidencia que la composició de la matriu pot afectar significativament el procés d'extracció.

L'estudi del temps i la temperatura d'extracció resulta fonamental a l'hora de desenvolupar una metodologia basada en la SPME. Com ja s'ha especificat anteriorment la SPME és un procés governat per l'equilibri de distribució. No sempre és necessari seleccionar les condicions d'equilibri, sobretot per aquells compostos amb valors de constants de distribució baixos, sinó que s'acostuma a establir un compromís entre el temps i la quantitat d'anàlit extreta, la qual ha de ser suficientment elevada per a la seva posterior detecció instrumental. És necessari un control rigorós del temps d'exposició per assegurar resultats reproduïbles. La temperatura afecta la cinètica de l'extracció i té dos efectes oposats. L'increment de la temperatura durant l'extracció afavoreix la difusió de les molècules envers la fibra. A més en la configuració "headspace" ajuda a què els compostos es transfereixin a l'espai en cap. No obstant, l'augment de la temperatura redueix el valor de la constant de distribució atès que l'absorció és un procés exotèrmic.

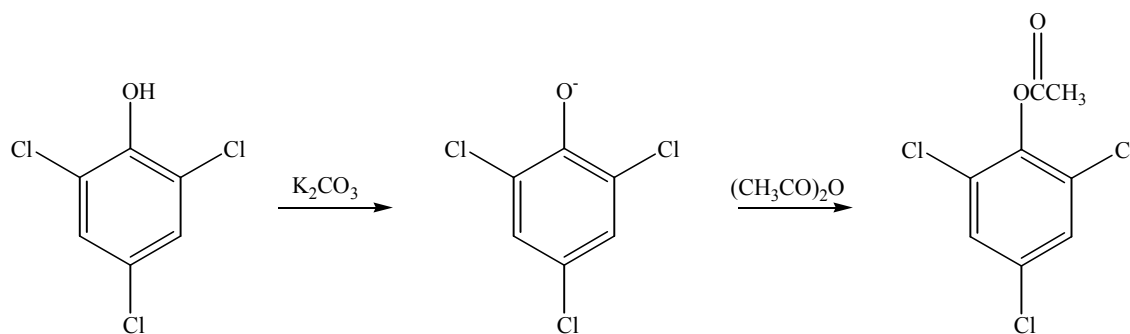
L'addició de sals solubles altera la força iònica de la solució. Normalment, llavors la solubilitat de les substàncies orgàniques disminueix i es millora l'afinitat per la fase estacionària, a la vegada que s'augmenten els coeficients de distribució. Aquest efecte no és general i depèn de la polaritat del compost, la concentració de la sal i la matriu de la mostra. Pel que fa a l'addició de solvents orgànics habitualment s'observa una reducció de la quantitat d'anàlit extret. Aquest paràmetre resulta especialment interessant en el cas de dissolucions hidroalcohòliques com el vi, ja que el contingut d'etanol pot modificar l'equilibri de distribució [58].



Quan les espècies a analitzar posseeixen propietats àcid-base, és necessari ajustar el pH de la matriu per assegurar que els compostos es trobin en forma neutre i així augmentar l'eficiència de l'extracció. L'agitació de la mostra durant la SPME és una pràctica extensament utilitzada ja que comporta una disminució del temps d'extracció com a conseqüència de la major difusió dels anàlits cap a la fibra. El volum de la mostra es troba directament relacionat amb la sensibilitat del mètode. A mesura que el volum de mostra s'incrementa també s'observa un augment d'anàlit extret fins a un determinat valor on el producte  $K_{fs}V_f$  resulta molt més petit que  $V_s$  (vegeu equació (2)) i utilitzar volums majors no representa cap benefici en termes de sensibilitat.

El principal repte en l'anàlisi d'espècies orgàniques són els compostos polars. Malgrat la disponibilitat de fases estacionàries polars per a la SPME, no sempre s'assoleix la sensibilitat desitjada. Per aquest motiu en moltes ocasions es decideix dur a terme la transformació química del compost per tal de convertir-lo en una espècie més apolar. L'ús de la derivatització permet determinar substàncies reactives, volàtils, tèrmicament inestables i amb comportaments cromatogràfics no satisfactoris a la vegada que permet assolir baixos límits de detecció. Tot i que en aquest apartat es presenta un tractament exhaustiu del procés de derivatització cal ressenyar que representa una pràctica molt habitual en altres processos d'extracció, com la SPE, i per tant, alguns dels comentaris es poden fer extensius a altres àrees d'aplicació. Existeixen diverses tècniques de derivatització en SPME en funció del lloc on es dona lloc la reacció entre l'anàlit i el reactiu: en la matriu de la mostra, en la fibra o en el port d'injecció, si l'anàlisi s'executa a través de cromatografia de gasos [59]. La derivatització directa és l'aproximació més utilitzada, on es col·loca el reactiu en el vial que conté la mostra, formant-se els derivats corresponents que s'extreuen mitjançant la SPME i que posteriorment s'analitzen. Per tal que la transformació es produeixi en la fibra es poden emprar dos procediments diferents: o bé exposant primer la fibra sobre la solució d'agent derivatitzant i tot seguit sobre la mostra o un cop extrets els anàlits s'exposen sobre una dissolució de reactiu. Normalment es tracten de tècniques de "headspace" però també es pot immobilitzar el reactiu submergint la fibra en un dissolvent volàtil que conté l'esmentat agent derivatitzant. D'entre les aproximacions de derivatització proposades, la més interessant i potencialment de major utilitat és la simultània conversió i extracció dels compostos directament sobre el sorbent, atès que permet obtenir elevades eficàcies en el procés i amplia el camp d'aplicacions de la SPME.

Si bé l'anàlisi de cloroansoles mitjançant SPME no requereix la introducció d'una etapa addicional de derivatització, la polaritat i reactivitat del grup hidroxil present en les molècules de clorofenols ha fomentat l'aplicació d'aquesta tècnica tant a matrius líquides com sòlides. Malgrat tot, en diversos treballs es realitza l'extracció d'aquests compostos directament, sense prèvia transformació. Això suposa la utilització de sorbents polars com les fibres de poliacrilat [60,61] tot i que també s'ha assajat el comportament d'altres sorbents [62]. A part d'influir en l'extracció mitjançant SPME, el comportament químic dels clorofenols resulta especialment crític quan la separació i detecció es realitza per cromatografia de gasos. La polaritat d'aquests compostos provoca que s'obtinguin pics amples, amb cua, que dificulten la seva quantificació. Aquest és el resultat de l'adsorció dels anàlits a la columna, efecte que es veu incrementat en augmentar el nombre d'anàlisis. Convertint els clorofenols en espècies apolars, a més, es millora la volatilitat, la forma dels pics cromatogràfics, la resolució i la sensibilitat. Els mètodes que habitualment s'empren per la derivatització dels compostos fenòlics són l'acilació, l'alquilació o la sil·lilació. Sigui quin sigui el reactiu escollit, aquest ha de complir una sèrie de requisits: presentar elevada puresa, donar lloc a rendiments de reacció aproximadament del 100%, no generar subproductes i facilitar la seva eliminació si la seva presència dificulta l'anàlisi dels derivats. D'entre els reactius utilitzats en l'alquilació de fenols en destaquen el diazometà [63], encara que se'n desaconsella l'ús atenent a les seves propietats: irritant, carcinogènic, tòxic, explosiu, etc., i el bromur de pentafluorobenzil [64]. Les reaccions de sil·lilació es poden dur a terme utilitzant diferents reactius trimetilclorosilà (TMCS), N,O-bis(trimetilsilil)-trifluoroacetamida (BSTFA), etc. El procediment de transformació és simple i ràpid, fet que ha potenciat la seva utilització com a mètode de derivatització de fenols [65,66,67]. Malgrat tot, l'agent derivatitzant que més extensament s'ha aplicat en l'anàlisi de clorofenols és l'anhídrid acètic, amb el qual s'introdueix a la molècula un grup acil. Les etapes implicades en la reacció d'acetilació es divideixen en una desprotonació del compost clorofenòlic en presència d'una base (es descarta la utilització de barreges tals com  $\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3$  ja que provoquen la formació d'abundant efervescència [68]) i a continuació es produeix l'atac nucleofílic al grup carbonil de l'agent derivatitzant, per finalment generar el derivat acetilat (vegeu **Figura 2.7**).



**Figura 2.7.** Reacció d'acetilació del 2,4,6-triclorofenol (TCP).

L'acetilació dels clorofenols ofereix els següents avantatges:

- és una reacció ràpida i genera compostos aptes per a l'anàlisi per cromatografia de gasos,
- l'addició d'un grup acetil disminueix la polaritat de l'anàlit fenòlic permetent una millor eficiència d'extracció mitjançant les tècniques habituals,
- facilita la derivatització de grans volums de mostra d'una manera factible i econòmica (reduït cost i quantitats petites dels reactius utilitzats),
- els derivats formats posseeixen característiques espectrals que afavoreixen la seva identificació mitjançant un espectròmetre de masses. La presència dels fenols acetilats es veu confirmada per la pèrdua del grup acetil, el qual es reorganitza per donar el fragment característic de l'ió molecular menys 42 unitats (corresponent a l'espècie  $H_2C=C=O$ ).

Aquest tipus de derivatització ha estat l'opció escollida en nombrosos estudis per a l'anàlisi de fenols mitjançant SPME en diverses matrius ambientals [69]. Així per exemple, Buchholz et al. [70] i Llompart et al. [71] van assajar l'extracció de compostos fenòlics acetilats *in situ* en mostres d'aigua utilitzant diferents tipus de fibres. L'aplicació d'aquesta metodologia també ha resultat efectiva en l'extracció de derivats fenòlics de sòls, als quals prèviament se'ls addiciona una certa quantitat d'aigua per afavorir la recuperació dels compostos, desplaçant-los dels punts actius de la matriu [72]. Com a conseqüència dels beneficis d'aquest tipus de derivatització acoblada a la SPME, s'ha extès el seu ús per a l'anàlisi dels clorofenols relacionats amb el "gust de suro". En aquest sentit, Martínez-Uruñela i col·laboradors van optimitzar les quantitats d'anhídrid acètic i base necessàries per realitzar la reacció de forma efectiva en vi negre [73]. En un treball posterior, van dur a terme l'anàlisi conjunta de cloroanisoles i els

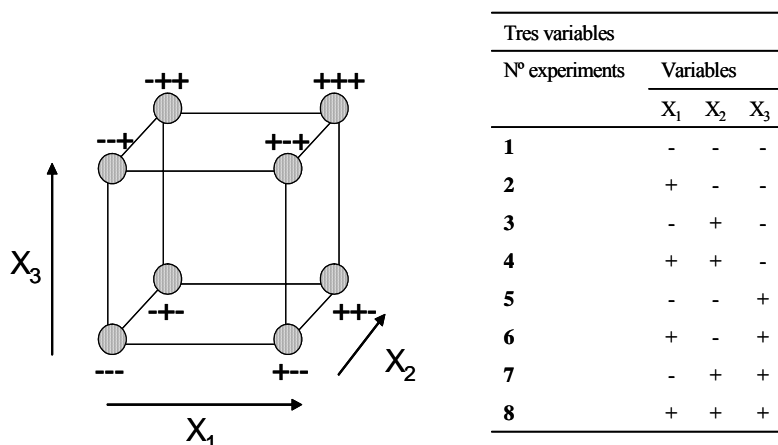
seus precursors derivatitzats segons la metodologia desenvolupada aplicant una modificació de l'habitual HS-SPME [74].

Determinats autors renuncien a les tècniques de derivatització argumentant que impliquen una etapa addicional en el procés analític, que a vegades les reaccions no són completes i que sovint és necessari l'ús de reactius que poden ser tòxics i que si no tenen una puresa adequada poden introduir fonts d'error. A més, en certes ocasions aquestes transformacions poden produir un impacte negatiu en el transport dels anàlits en la fase gasosa ja que generalment els derivats formats tenen pesos moleculars superiors als de les molècules originals [55]. De totes maneres, aquestes limitacions resulten mínimes si es considera la millora que s'aconsegueix tant en el procés extractiu per SPME com en l'anàlisi posterior.

### **Optimització dels paràmetres en SPME**

L'optimització dels paràmetres (factors o variables experimentals) que influeixen la realització de la SPME (temps, temperatura, efecte salí, etc.) ha estat el denominador comú en multitud de treballs relacionats amb l'extracció i preconcentració dels compostos que intervenen en el "gust de suro". Si bé en un principi el mètode tradicional o *variació d'un factor cada vegada* ha estat aplicat a l'hora d'establir les condicions experimentals que condueixen a una major extracció o resposta del sistema, la tendència actual és anar substituint aquest procediment per una metodologia basada en eines estadístiques. L'estratègia tradicional proporciona una estimació de la variable en unes condicions seleccionades i fixes dels altres factors i per tant genera resultats incomplets quan existeix interacció entre variables. Aleshores, per tal d'obtenir informació de qualitat cal planificar la seqüència d'experiments de manera que es satisfacin els objectius plantejats tot minimitzant l'error i el cost associat. El *disseny factorial complet* considera la variació de més d'un factor simultàniament, de manera que cada observació genera informació de tots els factors i si aquests actuen de forma independent o interaccionen entre ells. A efectes de simplificar el nombre d'experiments, s'ha generalitzat l'ús, sobretot en estudis preliminars per indicar tendències, dels dissenys experimentals que contemplin dos nivells per cada factor. És a dir, per a cada  $k$  factor es descriu un domini experimental o regió d'investigació que s'emmarca entre dos valors o nivells (extrem superior (+) o inferior (-)). Si la combinació dels  $k$  factors es realitza a dos nivells, el disseny factorial consistirà en  $2^k$

experiments elementals. Per tal d'obtenir un model vàlid cal efectuar rèpliques de les observacions de forma aleatòria. El fet de repetir l'experiment permet obtenir una estimació més precisa de l'efecte del factor i de l'error experimental. La realització dels experiments a l'atzar evita la introducció d'errors sistemàtics als resultats, i per tant, les estimacions dels tractaments diferiran dels valors reals només per la presència de la variació aleatòria. En el cas concret on s'avaluen tres factors a dos nivells al disseny resultant se l'anomena  $2^3$  i la representació geomètrica de les vuit combinacions de tractaments pot mostrar-se en forma de cub, tal com s'il·lustra a la **Figura 2.8**. Utilitzant la notació (+) i (-) per identificar els nivells alt i baix dels factors (algorisme de Yates) s'obté la corresponent matriu del disseny [75].



**Figura 2.8.** Disseny experimental de tres factors a dos nivells. Els experiments dels vèrtexs són els emprats al disseny factorial complet  $2^3$ . Noteu que totes les variables canvien simultàniament per assegurar que cada experiment és una combinació única dels nivells de variables.

S'entén com a efecte d'un factor el canvi en la resposta en passar del nivell baix a l'alt del factor en qüestió i l'efecte promig de l'efecte calculat considerant les condicions de les altres variables s'anomena efecte principal [76]. Addicionalment, cal tenir en compte les interaccions entre factors que mesuren la influència de la seva combinació en la resposta. Així, segons l'exemple de la **Figura 2.8** existeixen 7 graus de llibertat entre les 8 combinacions de tractaments del disseny  $2^3$ , dels quals 3 s'associen als efectes principals, 3 a les interaccions dobles i 1 a la interacció triple. L'efecte principal d'una variable ha de ser interpretat individualment quan no s'observa evidència d'interacció

amb les restants, ja que en aquest cas s'hauria de realitzar una discussió conjunta. L'efecte de les interaccions acostuma a ser menor que el dels factors principals.

Quan es duen a terme repeticions dels experiments elementals, la variació entre les mesures obtingudes es pot emprar per estimar la desviació típica de la resposta i, conseqüentment, de l'efecte que s'està estudiant. D'aquesta manera es completa l'anàlisi de les dades. Els tests estadístics permeten comprovar si els efectes calculats són significants. L'anàlisi de la variància confirma la magnitud d'aquests efectes. Sovint els resultats obtinguts s'expressen utilitzant els anomenats gràfics Pareto, on es representa els valors dels efectes principals i de les interaccions (normalment estandarditzats) per a un cert nivell de significància.

En moltes ocasions és molt útil presentar els resultats dels experiments en termes d'un model empíric, és a dir, mitjançant una equació derivada de les dades que expressa la relació entre la resposta i els factors importants del disseny. En general, existeixen molts paquets de "*software*" que apliquen mètodes de regressió lineal per ajustar els models a les dades experimentals. L'equació resultant prediu la resposta a nivells intermitjos entre els factors, respecte als que s'utilitzen realment en l'experiment. La representació gràfica que s'obté és la superfície de resposta o gràfica de contorn del model. Un risc potencial de l'ús dels dissenys factorials de dos nivells és el supòsit de la linealitat dels efectes dels factors. Habitualment en el disseny s'inclouen els experiments que correspondrien als valors centrals del domini estudiat. D'aquesta manera es minimitza el risc de perdre informació sobre possibles relacions no lineals a la regió intermitja del domini i la seva repetició permet determinar els intervals de confiança [77]. Les observacions en el centre del disseny no només proporcionen una estimació de l'error experimental sinó també un mecanisme per mesurar el grau de curvatura en la regió experimental.

Sovint quan s'han identificat els diferents factors i interaccions que poden afectar als resultats d'un experiment, interessa aplicar altres mètodes per determinar la combinació dels nivells dels factors que proporcionarà la resposta òptima en el menor nombre d'etapes experimentals. En aquest context s'ha de mencionar que existeixen diversos processos d'optimització capaços de localitzar la resposta màxima que impliquen un estudi més detallat del sistema. Aquests processos s'han utilitzat freqüentment en

l'optimització de les diferents variables experimentals que afecten la SPME de diferents compostos volàtils en diferents matrius, com per exemple el vi o el vinagre [78,79].

### **Aplicacions de la SPME en l'anàlisi de cloroanisoles i clorofenols en vi i suro**

Com a resultat dels avantatges d'aquesta tècnica d'extracció, sobretot pel que fa a la capacitat de preconcentració, la SPME ha estat l'opció escollida a l'hora de realitzar l'anàlisi de nombrosos compostos a nivells traça majoritàriament en matrius aquoses [80]. En el camp de l'enologia aquesta tècnica ha suposat un important avenç per a la determinació de substàncies volàtils que requerien tediosos pretractaments per assolir els graus de concentració desitjats, com per exemple els sulfurs [81]. D'altra banda, la disponibilitat de diferents fibres de SPME ha facilitat l'estudi del perfil aromàtic de diversos vins [82,83,84]. Bonino i col·laboradors van aplicar una fibra de PDMS/DVB per identificar compostos volàtils [85]. El mateix tipus de fase sòlida ha estat emprada per a l'anàlisi de pirazines en mosts [86] i vins [87]. Els fenols volàtils, que es consideren una part de la composició aromàtica del vi, també han estat analitzats mitjançant SPME [78]. Una atenció especial s'ha dedicat a l'anàlisi de plaguicides que pot contenir el vi ja que poden comprometre la seguretat alimentària i necessiten ser detectats a baixos nivells de concentració [88,89,90].

Comprovada l'efectivitat de la SPME per a l'extracció de gran varietat de compostos en vi, no és d'estranyar que l'aplicació d'aquesta tècnica hagi monopolitzat la majoria dels treballs publicats per a la determinació de cloroanisoles en la matriu citada. Un dels primers mètodes per a l'anàlisi de TCA mitjançant SPME fou el proposat per Fischer i col·laboradors [91]. A partir d'aquesta aproximació han anat sorgint modificacions metodològiques que han permès una detecció més acurada dels compostos responsables del "gust de suro" en vi [13]. En aquest sentit Evans et al. van avaluar un procediment d'anàlisi de TCA emprant el seu anàleg deuterat com a patró intern [92]. Alzaga i col·laboradors van assajar la possibilitat d'emprar altres compostos halogenats com a patrons interns per així corregir els possibles efectes matriu produïts pel vi [93]. Riu et al. van estudiar l'extracció de TCA en vi emprant diferents tipus de fibres i van aplicar un disseny factorial complet per establir la influència de la temperatura, temps, força iònica i volum de mostra en la realització de la SPME [94]. Si bé en un principi es va centrar l'atenció en el TCA, diferents autors han descrit mètodes per a la determinació simultània d'altres cloroanisoles en vi. Lizarraga i col·laboradors després de comparar el

comportament de varies fibres van concloure que la de PDMS oferia una major recuperació dels anàlits (TCA i TeCA) en menors temps d'exposició a la vegada que s'obtenia una millor precisió [95]. De fet, en els estudis comentats anteriorment la fibra de polidimetilsiloxà també fou seleccionada per dur a terme l'extracció. Amb la introducció de nous sorbents més selectius s'ha ampliat el ventall de possibilitats a l'hora d'escollir els recobriments de fibra que millor s'ajusten a les propietats químiques dels compostos d'interès. Així, Martínez-Uruñela et al. van comprovar que la fibra de divinilbenzè/carboxen<sup>TM</sup>/polidimetilsiloxà (DVB/CAR/PDMS) mostrava una major resposta pel TCA, TeCA i PCA a altes temperatures (50-80°C) [96]. Val a dir que totes les metodologies esmentades es caracteritzen per la gran sensibilitat i permeten detectar nivells de concentració de l'ordre de pocs ng/L, fet que demostra que la SPME permet assolir els requeriments de límits de detecció establerts.

Una altra matriu on habitualment s'analitzen els cloroansoles són les aigües. Els problemes organolèptics produïts per l'aparició de cloroansoles en aigües potables com a resultat dels processos de cloració (desinfecció) ha fomentat la seva identificació i quantificació, juntament amb d'altres compostos. Cal esmentar que en aquesta matriu el llindar de percepció és inferior al que s'estableix en vi. Per tant, es fa necessari el desenvolupament de mètodes extremadament sensibles per possibilitar-ne la detecció. Després d'optimitzar les condicions d'extracció, Pinheiro i col·laboradors van obtenir un procediment que els permetia detectar concentracions de TCA superiors a 0.7 ng/L [97]. Malgrat tot, les queixes dels consumidors pel que fa a la presència d'olors i gustos indesitjables (terrós, florit) a l'aigua no són fruit exclusivament de la presència de TCA sinó que també hi contribueixen altres compostos que habitualment s'associen amb el "gust de suro" (geosmina, 2-metilisoborneol, pirazines, haloansoles i halofenols). Malleret et al. van avaluar l'eficiència de diferents fibres que incorporaven més d'un polímer per tal d'extreure simultàniament cloroansoles i els seus precursors fenòlics sense derivatitzar [98]. Atès que se suposa que les mostres no presenten un elevat contingut d'interferents, van comprovar que el mostreig de forma directa (immersió del sorbent dins la solució) conduïa a una major extracció [51]. La fibra que oferia un major rendiment fou la DVB/CAR/PDMS, ja que la presència del polímer de DVB afavoreix l'extracció dels compostos aromàtics mitjançant interaccions  $\pi$ - $\pi$ . Aquests resultats s'adiuen amb els obtinguts per Sung i col·laboradors per a la determinació de TCA, geosmina, 2-metilisoborneol i pirazines [99] i per Zhang et al. per a l'anàlisi de



triclороanisoles, geosmina, 2-metilisoborneol i TBA mitjançant HS-SPME [100]. Aquest darrer treball és especialment innovador pel fet d'acoblar la SPME amb la injecció de grans volums en el sistema cromatogràfic, la qual cosa incrementa substancialment la sensibilitat del mètode. Un altre grup de compostos que potencialment poden impartir olors desagradables en les aigües tractades són els cloro-bromo trihaloanisoles mixtes. La dificultat que comporta el seu estudi rau en el fet que es tracten de substàncies que no es troben disponibles comercialment. Díaz i col·laboradors en van proposar la seva síntesi a la vegada que van desenvolupar un procediment d'anàlisi basat en la HS-SPME [101]. A banda, resulta interessant mencionar que l'aplicació de la SPME a un altre tipus de mostres aquoses com poden ser les aigües de rentat dels taps de suro pot significar una eina molt útil a l'hora de controlar el contingut de contaminants, especialment els haloanisoles i els seus precursors fenòlics [102].

Tot i que existeix una àmplia bibliografia on es descriu l'aplicació de la SPME en l'anàlisi de clorofenols en matrius ambientals, no és el cas de les mostres de vi. No obstant això, cada vegada més es tendeix a la monitorització d'aquests compostos ja que s'ha pres consciència de la seva directa implicació en el defecte de "gust de suro". A part dels paràmetres que usualment s'optimitzen en SPME (tipus de fibra, temps, temperatura, etc.), l'anàlisi de clorofenols sovint també requereix examinar les condicions de derivatització. L'acetilació és una reacció que depèn del pH i en una matriu tan complexa com el vi cal adaptar-ne les proporcions dels agents derivatitzants [73]. En aquest mateix estudi es va observar que tant la fibra de PDMS, PDMS/DVB o PA són una excel·lent elecció per a la HS-SPME dels clorofenols acetilats en mostres de vi negre.

Les mostres sòlides resulten particularment complicades a l'hora de ser analitzades mitjançant SPME ja que no permeten la seva extracció directa [48]. S'han d'aplicar diferents aproximacions per facilitar la preparació de la mostra, com per exemple l'anàlisi a través de l'espai en cap. Mentre certes matrius sòlides presenten interaccions febles amb els compostos, d'altres es troben fortament unides amb les substàncies d'interès, dificultant així la seva distribució a la fase gasosa. Per anàlisis tèrmicament estables, generalment s'incrementa la temperatura per millorar el transport des de la matriu a l'espai en cap. La pèrdua de sensibilitat associada a la disminució de la

constant de distribució es pot compensar refredant la fibra [51]. L'addició d'una petita quantitat d'aigua o un altre tipus de solvent orgànic polar afavoreix la difusió del compost de la mostra a la fase estacionària i accelera així l'extracció. Si bé l'anàlisi de cloroanisoles en matrius líquides mitjançant SPME és una pràctica habitual, tal i com ho corroboren l'extens nombre de publicacions, la seva aplicació a mostres sòlides, com el suro, no ha experimentat tal acceptació. Bianchi i col·laboradors van proposar una metodologia per a l'extracció de dicloroanisoles i TCA de taps de suro triturats emprant una fibra de Carboxen/PDMS [103]. Per tal de prevenir un escalfament no homogeni de la mostra es va afegir certa quantitat d'aigua, la qual cosa beneficia també la transferència dels anàlits. En general, el procés d'extracció ve limitat per una cinètica excessivament lenta, probablement com a conseqüència del baix valor del coeficient de partició entre el suro amb un caràcter hidrofòbic i la matriu polar (aigua afegida). Aplicant un disseny factorial, es va comprovar que tant l'augment de la temperatura com el temps afectaven positivament al procés; en canvi el percentatge d'etanol afegit per facilitar l'extracció dels cloroanisoles conduïa a la disminució de la resposta. Malgrat tot, mancava una examinació més exhaustiva pel que fa als paràmetres de qualitat, tal com es mostra en el treball de Riu et al. [104]. Aquests autors van elaborar un mètode per determinar cloroanisoles directament en diferents tipus de taps de suro utilitzant una fibra de DVB/CAR/PDMS. La preparació de patrons sòlids va requerir un estudi minuciós bàsicament dirigit a la selecció de la quantitat i textura del material de suro. El procediment resultant ofereix recuperacions excel·lents per tots els anàlits estudiats, a la vegada que s'obtenen límits de detecció de 0.2 ng/g pel TCA, TeCA i PCA. Aplicant una variant de la configuració de HS-SPME que permet eliminar l'efecte matriu (vegeu la secció referent a les limitacions de la SPME), Ezquerro et al. van aconseguir l'extracció exhaustiva de TCA, 1-octen-3-ol, 1-octen-3-ona i guaiacol de mostres de suro utilitzant una fibra de DVB/CAR/PDMS [105].

En relació a l'anàlisi de clorofenols en suro utilitzant la SPME sobre el sòlid directe, no s'ha trobat, en les fonts consultades, cap estudi documentat. Alguns autors proposen com a aproximació la maceració del material de suro en una solució hidroalcohòlica, de manera similar a com es realitzen els testos de control en la indústria tapera (vegeu apartat 1.3.5), per posteriorment aplicar la tècnica d'extracció sobre el macerat resultant. Aquest procediment, que ha estat objecte d'una de les publicacions que s'adjunten, s'ha utilitzat també per a l'anàlisi de cloroanisoles en taps de suro [106].

### **Limitacions de la SPME**

Tot i els avantatges que s'associen a la SPME, no s'ha d'oblidar les limitacions que porta associades. La qualitat de les fibres depèn del proveïdor i, per això, el rendiment varia en funció del lot emprat. A més, són dispositius fràgils, sovint sotmesos a ruptures i que exposats a altes temperatures poden donar problemes de sagnat de la fase estacionària. Durant l'extracció poden quedar absorbits irreversiblement compostos que modifiquen les propietats del sorbent i donar lloc a mètodes poc reproduïbles i no-lineals [53]. Les interferències de la matriu representen un important desavantatge de la SPME a l'hora de quantificar compostos procedents de mostres complexes. En aquest sentit, Rocha i col·laboradors van observar que incrementant la concentració d'un determinat compost en una mostra de vi es produïa un descens en l'absorció d'altres substàncies [107]. Especialment en vi negre la presència de certs compostos com els polifenols poden induir a canvis en les constants de distribució [94,108]. En les matrius hidroalcohòliques, com el vi i, en general, els macerats de suro, la presència de l'etanol també influeix en l'eficiència de l'extracció: l'augment del contingut d'alcohol, normalment, afecta negativament a la sensibilitat del mètode. No obstant, no s'aconseja diluir la mostra per disminuir-ne el percentatge ja que aquesta operació porta associada la dilució dels anàlits fet que serà més perjudicial que el benefici que es pot aconseguir en el valor dels coeficients de partició. L'ús de la tècnica del patró intern pot resoldre aquest problema però de totes maneres continua essent crítica la comparació de resultats obtinguts de mostres amb diferents continguts d'etanol. El desenvolupament de la teoria de la microextracció en fase sòlida múltiple (MHS-SPME) permet eliminar els problemes associats a l'efecte matriu. Aquesta tècnica implica la realització de extraccions consecutives d'una mateixa mostra fins que es recupera la totalitat de l'anàlit. En aquest procés, la concentració del compost extret disminueix exponencialment i l'àrea total de pic corresponent a l'extracció exhaustiva de la substància es pot estimar com la suma de les àrees per cada extracció individual (tres o quatre). Per tal que el procés MHS-SPME esdevingui efectiu s'han d'acomplir tres condicions [109]:

- la relació entre l'àrea de pic i la quantitat d'anàlit en la fibra ha de ser lineal al llarg de l'interval considerat,
- les constants de distribució fibra - mostra i espai en cap - mostra, i el volum de les tres fases han de romandre constants durant les diverses extraccions,

- s'ha d'establir el total equilibri de l'anàlit en les tres fases per a cada extracció individual.

L'àrea de pic total ( $A_T$ ) correspon a la suma de les àrees de cada extracció individual i s'expressa matemàticament de la següent manera:

$$A_T = \sum_{i=1}^N A_i = \frac{A_1}{1-\beta} \quad (4)$$

on  $A_i$  és l'àrea de pic de la  $i$ èssima extracció,  $A_1$  és l'àrea de pic de la primera extracció i  $\beta$  és una constant. D'acord amb l'equació (4) l'àrea de pic total es pot calcular a partir de dues dades:  $A_1$  que és una mesura experimental i el valor  $\beta$  que es determina mitjançant la regressió lineal dels logaritmes de les àrees de pic individuals:

$$\ln A_i = (i-1) \ln \beta + \ln A_1 \quad (5)$$

Quan el procés es completa després de poques extraccions, els càlculs es simplifiquen. D'aquesta manera, a part d'obtenir una metodologia significativament més sensible, s'eviten els problemes d'efecte matriu. La utilització d'aquesta tècnica ha estat satisfactòriament aplicada a l'anàlisi dels compostos relacionats amb el "gust de suro" en mostres de vi [74] i suro [105]. A efectes pràctics, la MHS-SPME permet quantificar diferents mostres de vi emprant un mateix calibratge o bé mostres de suro interpolant en una recta de regressió construïda usant patrons aquosos sense que això impliqui una pèrdua d'exactitud i precisió en el resultat final.

La sensibilitat que proporciona la SPME és suficient per a un extens nombre d'aplicacions, però ocasionalment es veu limitada per l'escassa quantitat de recobriment de la fibra, la qual cosa provoca una baixa eficiència d'extracció. Per vèncer aquesta mancança, s'ha introduït una modificació que es fonamenta en l'increment del volum de la fase extractant: és l'anomenada "*stir bar sorptive extraction*" (SBSE). En lloc d'una fibra recoberta amb el sorbent, aquesta tècnica de preparació de mostres aquoses utilitza una barra magnètica revestida amb el sorbent (típicament de 50-200  $\mu$ L). Fins al moment, només s'ha utilitzat l'absorbent de PDMS, però en un futur pròxim probablement apareguin recobriments amb característiques polars. L'extracció té lloc mitjançant l'agitació de la mostra amb la barra magnètica durant un temps preestablert, normalment inferior a 60 min depenent del volum de mostra i la velocitat d'agitació. A continuació, es duu a terme la desorció tèrmica en una unitat acoblada al cromatògraf de gasos o bé posant en contacte el dispositiu amb un dissolvent adequat i, després d'un

període d'agitació, s'injecta l'extracte corresponent al cromatògraf de líquids. La constant de distribució entre el PDMS i l'aigua es considera proporcional al coeficient de partició octanol-aigua ( $K_{ow}$ ) [19]. Així, la SBSE comparada amb la SPME mostra una especial sensibilitat per aquells compostos amb valors baixos de  $K_{ow}$ . Tenint en compte els avantatges de la SBSE, és comprensible que el nombre de publicacions que tracten de l'enriquiment d'anàlits amb aquesta tècnica hagi augmentat en els darrers anys. D'entre les aplicacions descrites cal destacar-ne el seu ús per a la concentració de substàncies orgàniques en vi i la caracterització de la seva aroma [110,111,112]. A banda d'analitzar la composició del vi i els contaminants químics que s'hi poden trobar, Hayasaka et al. van avaluar la capacitat de la SBSE per a l'extracció de TCA, obtenint uns límits de detecció al voltant d'un ng/L [113]. En un altre estudi es presenta la validació completa del mètode de SBSE per a l'anàlisi de policloroanisoles i s'estableix la mínima quantitat d'anàlit detectable en 0.4 ng/L pel TCA i 2 ng/L pel TeCA i PCA [114]. Pel que fa a la determinació de cloroanisoles i els clorofenols dels quals provenen, Zalacain i col·laboradors van examinar els paràmetres que influenciaven l'extracció d'aquests compostos en vi (temperatura, temps, pH i l'addició de NaCl) usant la SBSE [115]. El mètode es caracteritza bàsicament pels baixos límits de detecció que s'assoleixen, els quals són de l'ordre dels pg/L, fet que demostra l'elevada sensibilitat del procés. Aquests resultats no deixen de ser sorprenents tenint en compte que l'absorció del sorbent de PDMS no és selectiva i per tant, a part dels anàlits, es concentren alguns compostos interferents de la mostra (efecte matriu). A més a més, l'absorbent de PDMS proporciona baixes recuperacions per substàncies polars com els fenols i per això molts autors opten per derivatitzar-los *in situ* [116]. La SBSE també ha permès la quantificació de TCA i TCP en altres begudes alcohòliques [117]. La particular utilitat d'aquest pretractament de mostra ha fomentat la seva aplicació en camps diversos, incloent l'anàlisi d'"*off-flavours*" (triclороanisoles, 2-metilisoborneol i geosmina, TBA) en aigües [118,119,120]. Fins al moment només s'han citat exemples referents al pretractament mostres líquides, no obstant, és possible l'ús d'aquesta tècnica en matrius sòlides sempre i quan es realitzi una extracció prèvia. Aquest és el cas del mètode que alguns autors han proposat per a l'anàlisi de cloroanisoles i clorofenols en suro, el qual implica la SBSE de l'extracte hidroalcohòlic (75% (v/v)) resultant [121].

#### 2.2.4. Altres tècniques de pretractament de mostres de vi i suro per a l'anàlisi de cloroansoles i clorofenols.

Les limitacions de les etapes d'extracció i preconcentració de les diferents tècniques detallades anteriorment ha fomentat la recerca de nous mètodes per determinar els cloroansoles i clorofenols en vi i suro. Per ambdós tipus de matrius Campillo i col·laboradors van proposar una extracció amb dissolvent (*n*-pentà) i l'extracte resultant es va concentrar usant un sistema de purga i trampa [122]. Un cop optimitzats els paràmetres que regeixen el procés d'extracció (temps d'ultrasons) i de concentració (temperatura i temps de purga i desorció), el mètode oferia unes recuperacions superiors al 85% tant en suro com en diferents tipus de vi i uns límits de detecció de 25 pg/g i 5 ng/L, respectivament.

La comprensió de l'aroma del vi o, millor dit, la identificació dels compostos que contribueixen en el seu característic perfil aromàtic, està estretament vinculada a l'anàlisi sensorial per part d'un pannel d'experts degudament entrenats. Malgrat que els sentits humans són una potent eina de detecció, no deixen d'estar subjectes a seriosos inconvenients, com la subjectivitat i la variació en la sensibilitat entre una persona i una altra. Amb la finalitat de simular el nas humà al mateix temps que s'eviten les limitacions esmentades s'han desenvolupat uns instruments analítics anomenats nassos electrònics. Aquests dispositius, un cop calibrats, permeten realitzar nombroses avaluacions sensorials en un temps mínim i, per tant, aquest fet representa un gran avantatge a nivell econòmic. Tot i que existeixen diferents tecnologies disponibles, en general, un nas electrònic consisteix en l'arranjament de sensors de gasos semi-selectius i un apropiat patró d'identificació capaç de reconèixer olors simples i complexes. La resposta d'aquests sensors normalment es mesura mitjançant el canvi d'algun paràmetre físic com pot ésser la conductivitat. Una de les principals aplicacions d'aquests dispositius és la caracterització i classificació de vins a la vegada que també permeten garantir-ne la qualitat [123,124]. De cada mostra es crea un patró que es processa i s'analitza emprant tècniques de reconeixement avançades. Així, comparant el resultat obtingut amb una base de dades es pot identificar la mostra desconeguda amb un elevat grau d'exactitud. Mitjançant aquests sistemes també és possible la detecció d'"*off-flavours*" presents en el vi, com per exemple el TCA [125]. Cal remarcar que tant l'aigua com l'alt contingut en alcohol dels vins limita l'aplicació d'aquesta tecnologia, ja que provoquen la disminució de la seva vida útil i poden emmascarar la presència de

certes substàncies volàtils. Seguint el mateix principi que el nas electrònic, s'han desenvolupat uns dispositius o llengües electròniques que es basen en sensors per a líquids. No obstant, la seva aplicació per a l'anàlisi de vins ha estat menys freqüent [126]. Un altre tipus de nas electrònic seria aquell que implica l'acoblament d'un mostrejador d'espai en cap a un espectròmetre de masses (HS-MS). És una tècnica emergent que permet assegurar i controlar la qualitat a la indústria. Quan s'analitzen diverses mostres es genera una matriu de dades les quals es processen aplicant mètodes quimiomètrics per comparar i classificar els compostos. Aquest procediment és doncs similar al que es dona lloc mitjançant un nas electrònic però en comptes d'emprar sensors, en aquest cas es fa ús de l'espectrometria de masses. Martí i col·laboradors van utilitzar aquesta metodologia simple i ràpida per a la determinació de TCA en vins; no obstant, la gran limitació que van assenyalar fou l'elevat límit de detecció ( $0.2 \mu\text{g/L}$ ) que supera substancialment els llindars de percepció establerts en aquesta matriu [127]. Una alternativa a les anàlisis en espai en cap és la tècnica anomenada "*pervaporation*", que consisteix en l'aïllament i concentració de compostos volàtils abans de la seva introducció a l'instrument analític (generalment el cromatògraf de gasos). Aquesta aproximació es basa en una membrana hidrofòbica situada entre un mòdul inferior on es carrega la mostra usant una bomba peristàltica i un compartiment superior on un flux d'heli recull les substàncies volàtils i mitjançant una vàlvula d'injecció es transfereixen al sistema de detecció. La cambra inferior es col·loca dins un bany d'aigua per tal d'aportar temperatura al sistema i així els anàlits es desprenen més fàcilment de la matriu. La separació es duu a terme per la diferent pressió de vapor dels components introduïts en la cambra però també per la selectivitat de la membrana. Addicionalment per millorar la sensibilitat es pot col·locar un material de carbó (Carbofrit) en el port d'injecció del cromatògraf de gasos per facilitar la fixació dels compostos. Aquesta configuració no permet la preconcentració dels compostos i per aquesta raó s'ha proposat una alternativa que es fonamenta en l'acoblament d'una unitat on es realitza l'atrapament criogènic de les substàncies a través d'una fase sòlida i una posterior desorció tèrmica. El dispositiu consta d'un receptacle que conté la mostra la qual s'escalfa. Les substàncies volatilitzades són transportades per un flux de nitrogen fins a una minicolumna empaquetada amb un material adsorbent. Durant el procés d'adsorció la columna es submergeix en un bany de gel i en el procés invers s'aporta temperatura per evaporar els anàlits, els quals són arrossegats per un corrent d'heli fins al cromatògraf de gasos. Ambdues configuracions han estat aplicades satisfactòriament a

l'anàlisi de dicloroanisoles, TCA i TBA en mostres de vins [128,129]. No obstant, s'han obtingut millors límits de detecció quan el sistema inclou una etapa de concentració. Finalment també s'ha avaluat un acoblament de la tècnica "*pervaporation*" amb un espai en cap dinàmic per a la quantificació de vins que presentaven el defecte de "gust de suro". Es tracta d'una modificació que consisteix en l'escalfament de la mostra mentre és agitada, el transport dels anàlits per un gas portador fins a una membrana que elimina els interferents i la subseqüent transferència fins a l'injector empaquetat amb Carbofrit [130].

Tal i com s'ha pogut veure en l'apartat precedent, la tendència general del pretractament de la mostra de vi és justament reduir al màxim la manipulació de la mateixa. Aquesta també ha estat la directriu seguida en la preparació de les mostres de suro. Un exemple el constitueix el sistema de termo-desorció acoblat a un dispositiu d'injecció en fred en el cromatògraf de gasos, que ha estat aplicat per a la determinació de TCA i el seu precursor fenòlic directe [131]. La mostra de suro s'introdueix dins un tub de vidre que es va escalfant de manera que els anàlits passen a l'injector que es troba a baixa temperatura i per tant els reté. Finalitzat el procés de desorció s'aplica temperatura a l'injector i així es transfereixen els compostos dins el sistema cromatogràfic. Un altre pretractament per aquest tipus de matriu seria l'extracció amb fluid supercrític, tal i com s'ha especificat en l'apartat 1.3.4 [132]. En aquest cas el CO<sub>2</sub> flueix a través de la mostra de suro triturada per dissoldre el TCA el qual es recull en una trampa criogènica i es recupera mitjançant l'elució amb una petita porció de metanol que generalment s'analitza directament per cromatografia de gasos.

Una altra aproximació on també es tendeix a un mínim pretractament de mostra són les tècniques d'immunoassaig que es basen en la interacció específica entre un anticòs unit covalentment a un suport adequat i l'anàlit i que també han estat aplicades per a la detecció de TCA. Aquest tipus d'anàlisi representa una elecció summament atractiva per la seva elevada selectivitat, simplicitat i baix cost. La possibilitat de disposar d'un biosensor representaria una poderosa eina per monitoritzar la formació dels compostos d'estudi, prevenint així la seva posterior aparició tant en el vi com en el tap de suro. La producció d'anticossos que reconeguin exclusivament l'anàlit d'interès esdevé vital ja que governa l'especificitat del procés. En el cas del TCA, és necessària la preparació de derivats anomenats haptens que es caracteritzen per ésser el màxim de semblants a



l'anàlisi pel que fa a l'estructura química, conformació espacial, distribució electrònica i propietats hidrofòbiques [47,133]. Aquests haptens posseeixen grups funcionals mitjançant els quals s'uneixen a enzims o proteïnes. Una proposta de biosensor per a TCA la va proposar Moore i col·laboradors [134], no obstant la principal limitació de la configuració recau en el fet que no permet assolir la sensibilitat que requereix la seva anàlisi.

### 2.3. MÈTODES D'ANÀLISI: LA CROMATOGRAFIA DE GASOS (GC)

La separació i detecció de cloroanisoles i clorofenols en mostres de vi i suro habitualment es vincula a la cromatografia de gasos (GC), com a resultat de la natura volàtil o semivolàtil dels anàlits. No obstant, en moltes anàlisis de compostos fenòlics en mostres ambientals és freqüent la utilització de la cromatografia líquida ja que no és necessària una etapa prèvia de derivatització i a més la presència de grups conjugats fan possible la seva detecció directa emprant un simple detector ultraviolat-visible (UV-Vis). Acomplir les exigències de sensibilitat per a la determinació dels cloroanisoles i els respectius precursors no és una tasca senzilla i, per tant, juntament amb una acurada estratègia de pretractament de la mostra cal un eficient sistema de detecció. En aquest sentit, la cromatografia de gasos disposa de detectors extremadament sensibles que han facilitat la consecució d'aquest repte. Per a l'aplicació que es considera els més apropiats són el detector de captura d'electrons (ECD) i l'espectròmetre de masses (MS), el primer per la seva elevada resposta enfront molècules que contenen àtoms electronegatius en la seva estructura i el segon perquè ofereix la possibilitat d'identificació. A més, la configuració de trampa iònica permet fàcilment operar en el mode MS/MS que es tradueix en una millora de la sensibilitat i selectivitat. Si bé aquests sistemes són els més habituals, en la bibliografia apareix algun treball on s'utilitza la detecció d'emissió atòmica (AED) [122], que es fonamenta en la introducció dels anàlits eluïts de la columna a un plasma on té lloc l'atomització de manera que s'aporta suficient energia per excitar els electrons dels àtoms de clor en el cas dels cloroanisoles i clorofenols. Al retornar al seu lloc original alliberen aquesta energia en forma llum, la longitud d'ona de la qual és característica de l'element en qüestió. D'entre els diferents tipus de detectors basats en l'espectroscòpia atòmica, l'AED és el més popular en cromatografia de gasos ja que ofereix una òptima

sensibilitat, selectivitat i un ampli interval lineal [135]. No obstant, el gran desavantatge d'aquest detector és l'elevat cost de manteniment. Addicionalment, cal esmentar que l'acoblament de diferents sistemes de detecció representa un avenç en l'obtenció de metodologies més sensibles i selectives. Concretament, s'ha descrit un procediment de HS-SPME per a la determinació d'anisoles en vi que combina la detecció per captura d'electrons amb l'espectrometria de masses amb ionització mitjançant plasma induït per alta freqüència (ICP-MS) sense incrementar el temps d'anàlisi [136].

De la mateixa manera que les tècniques de preparació de mostra, la cromatografia de gasos ha experimentat un gran desenvolupament en els darrers anys. Concretament, l'innovador concepte de la cromatografia de gasos multidimensional (MDGC) ha revolucionat el camp de les tècniques de separació. La MDGC sorgeix com a conseqüència de les deficiències resolutives dels mètodes estàndards a l'hora d'analitzar mostres molt complexes. A grans trets aquest sistema es basa en la distribució de les substàncies entre dues columnes independents. Un cop els anàlits han recorregut la primera columna es focalitzen en diverses fraccions estretes a intervals de temps curts i regulars cap a la segona que es caracteritza per ésser de menor longitud per facilitar la ràpida separació. En general, la primera columna és apolar i la separació és produïda per diferència de volatilitat mentre que en la segona dimensió, constituïda normalment per una columna polar, la separació és ràpida i isotèrmica a la temperatura d'elució de la primera dimensió i és produïda com a resultat de les diferents interaccions entre els compostos i la fase estacionària. Com que cada banda s'elueix de la primera dimensió en diverses fraccions, la separació de cada una d'elles s'ha d'acomplir al cap de pocs segons abans que la següent fracció es re-injecti a la segona columna. Aquests requeriments s'aconsegueixen utilitzant sistemes de modulació adequats. Donat que els components de la primera columna es transfereixen per pulsos cap a la segona, les dades de temps-resposta es poden transformar en una matriu la qual es representa en un espai de dues dimensions proporcionant una superfície de contorn per a cada pic. Els detectors han de permetre donar una resposta en un temps mínim. Actualment els detectors d'ionització de flama (FID) moderns compleixen aquest requisit. No obstant, dels espectròmetres de masses disponibles, només el “*time-of-flight*” (TOF) és adient per aquest sistema. El cromatograma resultant presenta dos eixos de temps (retenció de cada una de les columnes) i la intensitat de senyal corresponent a l'alçada de pic. Els anàlits que pertanyen a la mateixa família química es preveu que presentin

aproximadament les mateixes interaccions amb la fase estacionària i per tant han de mostrar temps de retenció similars en la segona dimensió. Això es tradueix en una ordenació característica en bandes en el cromatograma, de manera que es poden “identificar” els diferents compostos. La principal aplicació d’aquesta aproximació inclou la separació de mescles que contenen gran nombre de components els quals mitjançant la cromatografia de gasos tradicional donen lloc a pics sobreposats. El seu aparent potencial ha estat explotat en camps ben diversos com l’anàlisi de plaguicides, petrolis, aromes, entre d’altres. Fins i tot, cal mencionar que el seu acoblament amb la SPME ha permès la determinació de la composició volàtil del vi [137].

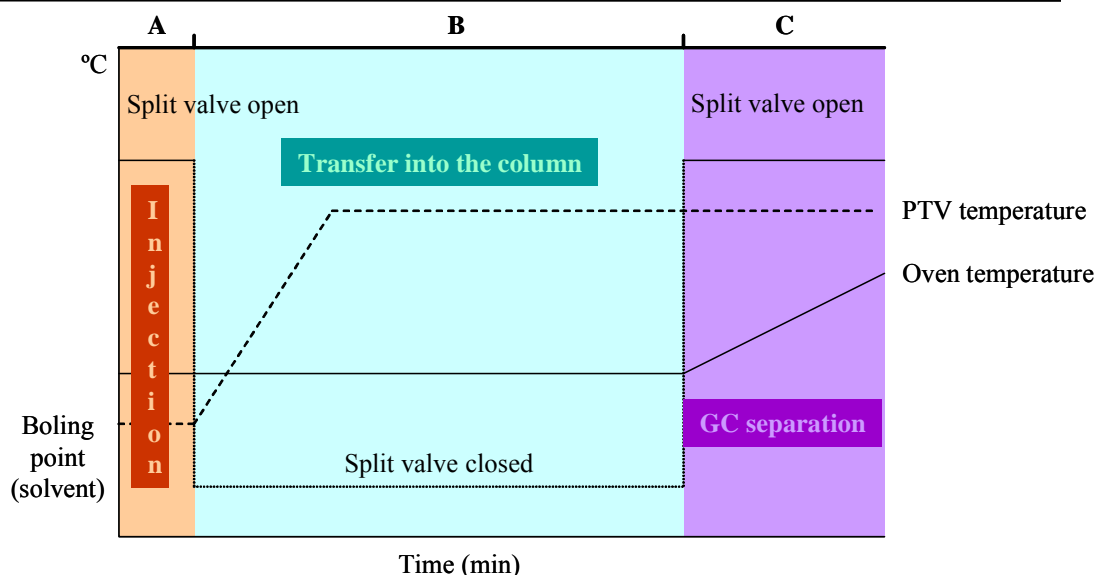
El futur desenvolupament de la cromatografia de gasos es dirigeix a reduir costos i millorar l’exactitud, precisió i temps. En qualsevol laboratori analític l’estalvi del temps necessari per realitzar una anàlisi de rutina és primordial. En moltes ocasions els mètodes basats en la cromatografia de gasos són massa lents ja que són directament dependents de la resolució. Per augmentar la velocitat de les separacions cromatogràfiques es poden considerar les següents opcions: utilitzar columnes més curtes i selectives, de diàmetre intern més reduït i que continguin menys fase estacionària, incrementar la temperatura de programació, augmentar el flux del gas portador, etc. Com a resultat d’aquestes modificacions neix la cromatografia de gasos d’alta velocitat. El gran avantatge d’aquesta tècnica és la rapidesa amb la qual es realitzen les anàlisis (fins i tot en pocs segons) i optimitzant els diferents paràmetres implicats es poden obtenir cromatogrames de mostres complexes amb una extraordinària resolució. L’eficiència d’aquesta tècnica ha estat posada de manifest en disciplines ben diverses i en concret també ha estat aplicada a la determinació de TCA en suro [138].

Les innovacions en el sistema d’introducció de mostra han significat l’ampliació de les possibilitats de la cromatografia de gasos. Un apartat especial s’ha de dedicar a la injecció de grans volums (LVI), que a diferència de la cromatografia convencional la qual es fonamenta en la introducció de 1 a 2  $\mu\text{L}$ , permet injectar volums superiors, fins i tot, de centenars de  $\mu\text{L}$ . Existeixen diferents estratègies per dur a terme la LVI, però en totes elles s’obtenen una sèrie d’avantatges:

- l’increment del volum de mostra injectat (fins a 100  $\mu\text{L}$  o més) implica que els límits de detecció del mètode analític es redueixin, augmentant-ne així la sensibilitat,

- es simplifica notablement la preparació de mostra per a l'anàlisi d'anàlits a nivell traça i s'evita així molts dels errors que porta associats. Per exemple, una pràctica habitual per enriquir els extractes derivats de la SPE és l'evaporació del dissolvent que, a part de ser una tasca laboriosa i que implica un augment del temps d'anàlisi, pot estar subjecta a la pèrdua dels compostos d'estudi,
- resulta fàcil l'acoblament d'aquesta tècnica al sistema cromatogràfic.

La LVI es pot dur a terme usant diferents tipus d'injectors però el vaporitzador de temperatura programada (PTV) operant en el mode de divisió (“*split*”) del solvent, representa una elecció molt apropiada per suprimir els possibles efectes matriu i en general, per la seva estabilitat enfront la resposta de l'anàlit [139]. Es tracta d'un tipus d'injector similar al “*split/splitless*” però està equipat amb un dispositiu d'escalfament i refredament. Normalment es col·loca en el “*liner*” una porció de llana de vidre o un altre tipus de material inert per tal d'acomodar la mostra líquida. S'ha d'evitar que existeixin fortes interaccions entre els anàlits i aquest material, ja que podrien derivar en pèrdues per adsorció o degradació tèrmica [140]. Com a norma general, la mostra s'injecta a velocitat constant i a una temperatura inferior al punt d'ebullició del dissolvent. Atès que la vàlvula de “*split*” es manté oberta durant la injecció i circula un elevat flux de gas portador, es facilita l'eliminació del solvent de forma controlada i es produeix la concentració i retenció dels compostos en el material d'empaquetament del “*liner*”. Posteriorment, quan aproximadament el 95% del dissolvent s'ha evaporat, es tanca la vàlvula i s'escalfa l'injector, ràpidament a una velocitat definida, fins a la temperatura necessària per a completar la vaporització dels anàlits i transferir-los dins de la columna cromatogràfica. Els components de la mostra amb diferents volatilitats s'evaporen successivament i per tant se separen durant la injecció. Tan bon punt es completa la transferència, la vàlvula de “*split*” s'obre i es manté el PTV a alta temperatura fins al final del programa del forn per prevenir la possible acumulació d'interferències en el sí de l'injector. Aquest procés d'injecció s'il·lustra a la **Figura 2.9**.



**Figura 2.9.** Esquema del procediment d'injecció mitjançant un injector PTV operant en el mode de "split" del dissolvent. (A) Introducció de la mostra, (B) Transferència dels analítics, (C) Separació cromatogràfica.

El desenvolupament d'una adequada introducció de mostra requereix l'optimització de diferents paràmetres, com per exemple, la duració de l'etapa d'eliminació del solvent i de la transferència dins la columna, el tipus i quantitat de material inert, el diàmetre del "liner", el volum de mostra, el tipus de dissolvent, la velocitat d'injecció i la rampa d'escalfament del PTV, la temperatura d'injecció, etc. [141]. Considerant els avantatges de la LVI, sobretot en termes de sensibilitat, s'ha potenciat la seva utilització per a l'anàlisi d'una gran varietat de compostos que es troben en diferents matrius a concentracions molt baixes [142]. Per a l'anàlisi de tricloroanisoles, TBA, 2-metilisoborneol, geosmina i pirazines en aigües, Malleret et al. van desenvolupar un mètode basat en l'acoblament del "closed-loop stripping analysis (CLSA)" amb la injecció de grans volums, obtenint uns límits de detecció de l'ordre dels pg/L per tots els analítics considerats [143]. La versatilitat de la LVI ha facilitat el seu acoblament amb diverses tècniques de preconcentració, especialment l'extracció en fase sòlida. En determinades ocasions les metodologies basades en la SPE no permeten assolir els límits de detecció per a una determinada aplicació i això obliga a la utilització de majors volums de mostra. Aquest fet es tradueix en una complicació en la realització de la tècnica juntament amb una major inversió de temps de preparació, afectant negativament sobretot als anàlisis de rutina. Tots aquests entrebancs es poden vèncer emprant la LVI. Hi ha pocs articles que mostrin l'eficiència d'aquestes dues tècniques

per a la determinació de cloroanisoles i clorofenols en mostres de vi [44]. El treball de recerca que es presenta demostra, amb les publicacions que s'adjunten, que l'extracció en fase sòlida i també el seu acoblament amb la injecció de grans volums representa una clara alternativa als mètodes existents per a l'anàlisi d'aquests compostos.

## 2.4. REFERÈNCIES

---

- [1] P. Chatonnet, S. Bonnet, S. Boutou, M.-D. Labadie, *J. Agric. Food Chem.* 52 (2004) 1255.
- [2] J.M. Amon, J.M. Vandeppeer, R.F. Simpson, *Aust. N. Z. Wine Ind. J.* 4 (1989) 62.
- [3] H.-R. Buser, C. Zanier, H. Tanner, *J. Agric. Food Chem.* 30 (1982) 359.
- [4] C. Bayonove, F. Leroy, *Simposio Internazionale "Il sughero in Enologia"*. Pavia (Itàlia), 1993.
- [5] A. Peña-Neira, B. Fernández de Simón, M.C. García-Vallejo, T. Hernández, E. Cadahía, J.A. Suarez, *Eur. Food Res. Technol.* 211 (2000) 257.
- [6] P. Chatonnet, D. Labadie, S. Boutou, *J. Int. Sci. Vigne Vin.* 37 (3) (2003) 181.
- [7] A.P. Pollnitz, K.H. Pardon, D. Liacopoulos, G.K. Skouroumounis, M.A. Sefton, *Aust. J. Grape Wine Res.* 2 (1996) 184.
- [8] D.L. Capone, G.K. Skouroumounis, D.A. Barker, H.J. McLean, A.P. Pollnitz, M.A. Sefton, *Aust. J. Grape Wine Res.* 5 (1999) 91.
- [9] R. Carabias-Martínez, E. Rodríguez-Gonzalo, P. Revilla-Ruiz, J. Hernández-Méndez, *J. Chromatogr. A* 1089 (2005) 1.
- [10] P.R. Howland, A.P. Pollnitz, D. Liacopoulos, H.J. McLean, M.A. Sefton, *Aust. J. Grape Wine Res.* 3 (3) (1997) 141.
- [11] D.A. Barker, D.L. Capone, A.P. Pollnitz, H.J. McLean, I.L. Francis, H. Oakey, M.A. Sefton, *Aust. J. Grape Wine Res.* 7 (2001) 40.
- [12] R. Juanola, D. Subirà, V. Salvadó, J.A. Garcia Regueiro, E. Anticó, *J. Chromatogr. A* 953 (2002) 207.
- [13] R. Juanola, L. Guerrero, D. Subirà, V. Salvadó, S. Insa, J.A. Garcia Regueiro, E. Anticó, *Anal. Chim. Acta* 513 (2004) 291.
- [14] R. Juanola, D. Subirà, V. Salvadó, J.A. Garcia Regueiro, E. Anticó, *Eur. Food Res. Technol.* 220 (2005) 347.
- [15] G.J. Soleas, J. Yan, T. Seaver, D. M. Goldberg, *J. Agric. Food Chem.* 50 (2002) 1032.
- [16] O. Ezquerro, A. Garrido-López, M.T. Tena, *J. Chromatogr. A* 1068 (2005) 201.
- [17] W.R. Sponholz, H. Muno, *Ind. Bevande XXIII* (1994) 133.
- [18] J.L. Gómez-Ariza, T. García-Barrera, F. Lorenzo, A. Gustavo González, *Anal. Chim. Acta* 540 (2005) 17.

- 
- [19] S. Mitra, *Sample preparation techniques in analytical chemistry*, John Wiley & Sons, Hoboken, New Jersey (Estats Units) (2003), ISBN 0-471-32845-6.
- [20] D.T. Rossi, N. Zhang, *J. Chromatogr. A* 885 (2000) 97.
- [21] E.M. Thurman, M.S. Mills, *Solid-phase extraction. Principles and practise*, John Wiley & Sons, Nova York (Estats Units) (1998), ISBN 0-471-61422-X.
- [22] J.S. Fritz, *Analytical solid-phase extraction*, John Wiley & Sons, Nova York (USA) (1999), ISBN 0-471-24667-0.
- [23] N. Masqué, R.M. Marcé, F. Borrull, *Trends Anal. Chem.* 17 (6) (1998) 384.
- [24] C.F. Poole, *Trends Anal. Chem.* 22 (6) (2003) 362.
- [25] M.T. Galceran, O. Jáuregui, *Anal. Chim. Acta* 304 (1995) 75.
- [26] R. Schilling, P.J. Clarkson, M. Cooke, *Fresenius J. Anal. Chem.* 360 (1998) 90.
- [27] L.E. Sojo, J. Djauhari, *J. Chromatogr. A* 840 (1999) 21.
- [28] I. Rodríguez, M.P. Llompart, *J. Chromatogr. A* 885 (2000) 291.
- [29] H. Escalona, L. Birkmyre, J.R. Piggott, A. Paterson, *Anal. Chim. Acta* 458 (2002) 45.
- [30] D. Matějček, B. Klejdus, O. Mikeš, O. Štěrbová, V. Kubáň, *Anal. Bioanal. Chem.* 377 (2003) 340.
- [31] R.J. Robbins, S.R. Bean, *J. Chromatogr. A* 1038 (2004) 97.
- [32] C. Cámara, P. Fernández, A. Martín-Esteban, C. Pérez-Conde, M. Vidal, *Toma y tratamiento de muestras*, Editorial Síntesis, S.A., Madrid (Spain) (2004), ISBN 84-7738-962-4.
- [33] M.-C. Hennion, *J. Chromatogr. A* 885 (2000) 73.
- [34] U. Führer, A. Deißler, K. Ballschmiter, *Fresenius J. Anal. Chem.* 354 (1996) 333.
- [35] M.E. León-González, L.V. Pérez-Arribas, *J. Chromatogr. A* 902 (2000) 3.
- [36] R. Cela, R.A. Lorenzo, M.C. Casais, *Técnicas de separació analítica*, Editorial Síntesis, S.A., Madrid (Espanya) (2004), ISBN 84-9756-028-0.
- [37] M. Castillo, D. Puig, D. Barceló, *J. Chromatogr. A* 778 (1997) 301.
- [38] R. López, M. Aznar, J. Cacho, V. Ferreira, *J. Chromatogr. A* 966 (2002) 167.
- [39] C.W. Huck, G.K. Bonn, *J. Chromatogr. A* 885 (2000) 51.
- [40] S. Lacorte, D. Fraise, D. Barceló, *J. Chromatogr. A* 857 (1999) 97.
- [41] D. de Almeida Azevedo, S. Lacorte, T. Vinhas, P. Viana, D. Barceló, *J. Chromatogr. A* 879 (2000) 13.



- [42] R. Wissiack, E. Rosenberg, *J. Chromatogr. A* 963 (2002) 149.
- [43] M. del Álamo, L. Casado, V. Hernández, J.J. Jiménez, *J. Chromatogr. A* 1049 (2004) 97.
- [44] A. Martínez-Uruñela, I. Rodríguez, R. Cela, J.M. González-Sáiz, C. Pizarro, *Anal. Chim. Acta* 549 (2005) 117.
- [45] N. Fontanals, R.M. Marcé, F. Borrull, *Trends Anal. Chem.* 24 (5) (2005) 394.
- [46] J. Haginaka, *Trends Anal. Chem.* 24 (5) (2005) 407.
- [47] N. Sanvicens, F. Sánchez-Baeza, M.P. Marco, *J. Agric. Food Chem.* 51 (2003) 3924.
- [48] Z. Zhang, M.J. Yang, J. Pawliszyn, *Anal. Chem.* 66 (17) (1994) 844 A.
- [49] H. Lord, J. Pawliszyn, *J. Chromatogr. A* 885 (2000) 153.
- [50] H. Prosen, L. Zupančič-Kralj, *Trends Anal. Chem.* 18 (4) (1999) 272.
- [51] J. Pawliszyn, *Solid phase microextraction. Theory and practice*, Wiley-VCH, Nova York (Estats Units) (1997), ISBN 0-471-19034-9.
- [52] S. Ulrich, *J. Chromatogr. A* 902 (2000) 167.
- [53] M.F. Alpendurada, *J. Chromatogr. A* 889 (2000) 3.
- [54] A. Peñalver, E. Pocurull, F. Borrull, R.M. Marcé, *Trends Anal. Chem.* 18 (8) (1999) 557.
- [55] X. Li, Z. Zeng, J. Zhou, *Anal. Chim. Acta* 509 (2004) 27.
- [56] M. Liu, Z. Zeng, Y. Tian, *Anal. Chim. Acta* 540 (2005) 341.
- [57] T. Górecki, X. Yu, J. Pawliszyn, *Analyst* 124 (1999) 643.
- [58] L. Urruty, M. Montury, *J. Agric. Food Chem.* 44 (1996) 3871.
- [59] E.E. Stashenko, J.R. Martínez, *Trends Anal. Chem.* 23 (8) (2004) 553.
- [60] M.-R. Lee, Y.-C. Yeh, W.-S. Hsiang, B.-H. Hwang, *J. Chromatogr. A* 806 (1998) 317.
- [61] A. Ribeiro, M.H. Neves, M.F. Almeida, A. Alves, L. Santos, *J. Chromatogr. A* 975 (2002) 267.
- [62] H. van Doorn, C.B. Grabanski, D.J. Miller, S.B. Hawthorne, *J. Chromatogr. A* 829 (1998) 223.
- [63] J.P.G. Wilkins, C.P. Yorke, M.R. Tinkler, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 11 (1997) 206.
- [64] Y. Hanada, I. Imaizumi, K. Kido, T. Tanizaki, M. Koga, H. Shiraishi, M. Soma, *Anal. Sci.* 18 (2002) 655.

- 
- [65] D. Li, J. Park, J.-R. Oh, *Anal. Chem.* 73 (2001) 3089.
- [66] J.M. Halket, V.G. Zaikin, *Eur. J. Mass Spectrom.* 9 (2003) 1.
- [67] A. Zafra, M. del Olmo, B. Suárez, E. Hontoria, A. Navalón, J.L. Vilchez, *Water Res.* 37 (2003) 735.
- [68] A. Besner, P. Tétreault, L. Lépine, J.-F Archambault, *Anal. Chem.* 67 (1995) 442.
- [69] J.M. Rosenfeld, *J. Chromatogr. A* 843 (1999) 19.
- [70] K.D. Buchholz, J. Pawliszyn, *Anal. Chem.* 66 (1994) 160.
- [71] M. Llompart, M. Lourido, P. Landín, C. García-Jares, R. Cela, *J. Chromatogr. A* 963 (2002) 137.
- [72] M. Llompart, B. Blanco, R. Cela, *J. Microcol. Sep.* 12 (1) (2000) 25.
- [73] A. Martínez-Uruñela, J.M. González-Sáiz, C. Pizarro, *J. Chromatogr. A* 1048 (2004) 141.
- [74] A. Martínez-Uruñela, J.M. González-Sáiz, C. Pizarro, *J. Chromatogr. A* 1089 (2005) 31.
- [75] D.C. Montgomery, *Diseño y análisis de experimentos*, Limusa Wiley, México D.C. (México) (2004), ISBN 968-18-6156-6.
- [76] G.E.P. Box, W.G. Hunter, J.S. Hunter, *Estadística para investigadores. Introducción al diseño de experimentos, análisis de datos y construcción de modelos*, Editorial Reverté, Barcelona (España) (1989), ISBN 84-291-5041-2.
- [77] T. Lundstedt, E. Seifert, L. Abramo, B. Thelin, A. Nyström, J. Pettersen, R. Bergman, *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 42 (1998) 3.
- [78] R. Castro Mejías, R. Natera Marín, M.V. García Moreno, C. García Barroso, *J. Chromatogr. A* 995 (2003) 11.
- [79] R. Castro Mejías, R. Natera Marín, M.V. García Moreno, C. García Barroso, *J. Chromatogr. A* 953 (2002) 7.
- [80] G. Vas, K. Vékey, *J. Mass Spectrom.* 39 (2004) 233.
- [81] M. Mestres, C. Sala, M.P. Martí, O. Busto, J. Guasch, *J. Chromatogr. A* 835 (1999) 137.
- [82] R. Castro, R. Natera, P. Benítez, C. G. Barroso, *Anal. Chim. Acta* 513 (2004) 141.
- [83] L. Tat, P. Comuzzo, I. Stolfo, F. Battistutta, *Food Chem.* 93 (2005) 361.

- [84] M.P. Martí, M. Mestres, C. Sala, O. Busto, J. Guasch, J. Agric. Food Chem. 51 (2003) 7861.
- [85] M. Bonino, R. Schellino, C. Rizzi, R. Aigotti, C. Delfini, C. Baiocchi, Food Chem. 80 (2003) 125.
- [86] C. Sala, M. Mestres, M.P. Martí, O. Busto, J. Guasch, J. Chromatogr. A 880 (2000) 93.
- [87] C. Prouteau, R. Schneider, Y. Lucchese, F. Nepveu, R. Renard, C. Vaca-Garcia, Anal. Chim. Acta 513 (2004) 223.
- [88] M. Correia, C. Delerue-Matos, A. Alves, Fresenius J. Anal. Chem. 369 (2001) 647.
- [89] S. Millán, M.C. Sampedro, N. Unceta, M.A. Goicolea, E. Rodríguez, R.J. Barrio, J. Chromatogr. A 995 (2003) 135.
- [90] C.G. Zambonin, M. Quinto, N. De Vieto, F. Palmisano, Food Chem. 86 (2004) 269.
- [91] C. Fischer, U. Fischer, J. Agric. Food Chem. 45 (1997) 1995.
- [92] T.J. Evans, C.E. Butzke, S.E. Ebeler, J. Chromatogr. A 786 (1997) 293.
- [93] R. Alzaga, L. Ortiz, F. Sánchez-Baeza, M.-P. Marco, J.M. Bayona, J. Agric. Food Chem. 51 (2003) 3509.
- [94] M. Riu, M. Mestres, O. Busto, J. Guash, J. Chromatogr. A 977 (2002) 1.
- [95] E. Lizarraga, A. Irigoyen, V. Belsue, E. González-Peñas, J. Chromatogr. A 1052 (2004) 145.
- [96] A. Martínez-Uruñela, J.M. González-Sáiz, C. Pizarro, J. Chromatogr. A 1056 (2004) 49.
- [97] P.B.M. Pinheiro, J.C.G. Esteves da Silva, Anal. Bioanal. Chem. 382 (2005) 341.
- [98] L. Malleret, J. Dugay, A. Bruchet, M.-C. Hennion, J. Chromatogr. A 999 (2003) 135.
- [99] Y.-H. Sung, T.-Y. Li, S.-D. Huang, Talanta 65 (2005) 518.
- [100] L. Zhang, R. Hu, Z. Yang, J. Chromatogr. A 1098 (2005) 7.
- [101] A. Díaz, F. Ventura, M.T. Galceran, J. Chromatogr. A 1064 (2005) 97.
- [102] S. López-Vidal, L. Arce, Chromatographia 62 (9/10) (2005) 527.
- [103] F. Bianchi, M. Careri, A. Mangia, M. Musci, J. Sep. Sci. 26 (2003) 369.
- [104] M. Riu, M. Mestres, O. Busto, J. Guasch, Anal. Chim. Acta *en premsa*.
- [105] O. Ezquerro, M.T. Tena, J. Chromatogr. A 1068 (2005) 201.

- 
- [106] P. Chatonnet, D. Labadie, S. Boutou, J. Int. Sci. Vigne Vin. 39 (3) (2005) 137.
- [107] S. Rocha, V. Ramalheira, A. Barros, I. Delgadillo, M.A. Coimbra, J. Agric. Food Chem. 49 (2001) 5142.
- [108] C. Dufour, C.L. Bayonove, J. Agric. Food Chem. 47 (1999) 678.
- [109] O. Ezquerro, B. Pons, M.T. Tena, J. Chromatogr. A 999 (2003) 155.
- [110] J. Díez, C. Domínguez, D.A. Guillén, R. Veas, C.G. Barroso, J. Chromatogr. A 1025 (2004) 263.
- [111] R.F. Alves, A.M.D. Nascimento, J.M.F. Nogueira, Anal. Chim. Acta 546 (2005) 11.
- [112] J. Marín, A. Zalacain, C. De Miguel, G.L. Alonso, M.R. Salinas, J. Chromatogr. A 1098 (2005) 1.
- [113] Y. Hayasaka, K. MacNamara, G.A. Baldock, R.L. Taylor, A.P. Pollnitz, Anal. Bioanal. Chem. 375 (2003) 948.
- [114] S. Vidal, *Analysis of wine polychloroanisoles by Stir Bar Sorptive Extraction coupled with Gas Chromatography/Mass Spectrometry: validation of a fast and reliable method*. Off-flavours in wine and other beverages: origin, detection & control, Tarragona (Espanya) 23-25 November, 2005.
- [115] A. Zalacain, G.L. Alonso, C. Lorenzo, M. Iñiguez, M.R. Salinas, J. Chromatogr. A 1033 (2004) 173.
- [116] L. Montero, S. Conradi, H. Weiss, P. Popp, J. Chromatogr. A 1071 (2005) 163.
- [117] A. Miki, A. Isogai, H. Utsunomiya, H. Iwata, J. Biosci. Bioeng. 100 (2) (2005) 178.
- [118] N. Ochiai, K. Sasamoto, M. Takino, S. Yamashita, S. Daishima, A. Heiden, A. Hoffman, The Analyst 126 (2001) 1652.
- [119] D. Benanou, F. Acobas, M.R. de Roubin, F. David, P. Sandra, Anal. Bioanal. Chem. 376 (2003) 69.
- [120] D. Benanou, F. Acobas, M.R. de Roubin, Wat. Sci. Tech. 40 (6) (2004) 161.
- [121] R.M. Callejón, A.M. Troncoso, M.L. Morales, *Analysis of chloroanisoles and chlorophenols in cork by stir bar sortive extraction*. In *Vino Analytica Scientia*, Montpellier (França) 7-9 July, 2005.
- [122] N. Campillo, N. Aguinaga, P. Viñas, I. López-García, M. Hernández-Córdoba, J. Chromatogr. A 1061 (2004) 85.
- [123] J. Lozano, J.P. Santos, M.C. Horrillo, Talanta 67 (2005) 610.

- [124] R.C. McKellar, H.P. Vasantha Rupasinghe, X. Lu, K.P. Knight, *J. Sci. Food Agric.* 85 (2005) 2391.
- [125] J.A. Ragazzo-Sanchez, P. Chalier, C. Ghommidh, *Sens. Actuators B* 106 (2005) 253.
- [126] A. Legin, A. Rudnitskaya, L. Lvova, Y. Vlasov, C. Di Natale, A. D'Amico, *Anal. Chim. Acta* 484 (2003) 33.
- [127] M.P. Martí, R. Boqué, M. Riu, O. Busto, J. Guasch, *Anal. Bioanal. Chem.* 376 (2003) 497.
- [128] J.L. Gómez-Ariza, T. García-Barrera, F. Lorenzo, *J. Chromatogr. A* 1049 (2004) 147.
- [129] J.L. Gómez-Ariza, T. García-Barrera, F. Lorenzo, *Anal. Chim. Acta* 516 (2004) 165.
- [130] J.L. Gómez-Ariza, T. García-Barrera, F. Lorenzo, *J. Chromatogr. A* 1056 (2004) 243.
- [131] W.R. Sponholz, M.K. Grossmann, H. Muno, A. Hoffmann, *Ind. Bevande* 37.
- [132] M.K. Taylor, T.M. Young, C.E. Butzke, S. Ebeler, *J. Agric. Food Chem.* 48 (2000) 2208.
- [133] M. Massanell, J.M. Montornes, I. Katakis, *The use of Suboptimum Haptens as a strategy to develop a highly-sensitive enzyme-linked immunosorbent assay for 2,4,6-trichloroanisole detection*. Off-flavours in wine and other beverages: origin, detection & control. Tarragona (Espanya) 23-25 November, 2005.
- [134] E. Moore, M. Pravda, G.G. Guilbault, *Anal. Chim. Acta* 484 (2003) 15.
- [135] A.J. Handley, E. R. Adlard, *Gas chromatographic techniques and applications*, Sheffield Academic Press, Sheffield (Regne Unit) (2001), ISBN 0-8493-0514-4.
- [136] J.L. Gomez-Ariza, T. Garcia-Barrera, F. Lorenzo, *J. Anal. At. Spectrom.* 20 (9) (2005) 883.
- [137] M. Arlorio, G. Piana, J.D. Coïsson, F. Travaglia, A. Martelli, *SPME-2D GC coupled techniques applied on wines authentication*. In *Vino Analytica Scientia*, Montpellier (França) 7-9 July, 2005.
- [138] I Seminario de Cromatografia de Alta Velocidad "Fast GC/GCMS", Barcelona (Espanya) June 2004.
- [139] J. Zrostlíková, J. Hajšlová, M. Godula, K. Maštovská, *J. Chromatogr. A* 937 (2001) 73.

- [140] J. Teske, W. Engewald, Trends Anal. Chem. 21 (9+10) (2002) 584.
- [141] W. Engewald, J. Teske, J. Efer, J. Chromatogr. A 856 (1999) 259.
- [142] H.G.J. Mol, H.-G.M. Janssen, C.A. Cramers, J.J. Vreus, U.A.Th. Brinkman, Trends Anal. Chem. 15 (1996) 206.
- [143] L. Malleret, A. Bruchet, M-C. Hennion, Anal. Chem. 73 (2001) 1485.



### ***3. Objectius***

---





Tal com s'ha especificat en la introducció precedent, la determinació de cloroanisoles en mostres de vi i suro ha generat una extensa bibliografia adreçada a oferir metodologies simples, ràpides i extremadament sensibles. Malgrat el progressiu interès pels compostos clorofenòlics en els darrers anys, per la seva implicació en el “gust de suro”, aquests sovint han estat relegats a un segon terme com ho demostra la poca disponibilitat de protocols d'anàlisi fidedignes en les dues matrius citades. La preocupació no només per la possible presència de TCA sinó també per l'origen de la contaminació ha donat lloc a l'avaluació de nous mètodes que permetin una acurada quantificació tant dels cloroanisoles com dels clorofenols.

La memòria que aquí es presenta respon a un objectiu principal que és:

**Contribuir al coneixement pel que fa a metodologies analítiques per a la determinació de clorofenols, cloroanisoles i 2,4,6-tribromoanisol en vi i suro a través de l'anàlisi mitjançant cromatografia de gasos.**

És precisament el sector surer, amb la freqüent demanda de les corresponents analítiques d'aquestes substàncies, qui ha estimulat aquesta recerca per tal de garantir la qualitat del producte final. Així doncs, partint d'aquesta línia bàsica d'investigació s'han plantejat altres objectius més concrets que a continuació es detallen:

- 1.- Desenvolupament de mètodes basats en l'extracció en fase sòlida (SPE) i la microextracció en fase sòlida (SPME) per a la determinació de clorofenols en el control de qualitat del suro. Avaluació de la capacitat d'extracció de les mescles etanol/aigua a l'hora d'establir el contingut total de clorofenols en taps de suro.
- 2.- Avaluació d'una metodologia per a la determinació simultània de cloroanisoles i clorofenols en matrius de suro basada en l'extracció sòlid-líquid emprant *n*-pentà com a dissolvent. Assaigs previs per examinar el percentatge d'eliminació de cloroanisoles i els seus precursors fenòlics en mostres de suro aplicant diferents tractaments de rentat que fàcilment poden incorporar-se en el procés de manufactura dels taps de suro.

### *3. Objectius*

---

**3.-** Desenvolupament de metodologies per a l'anàlisi de clorofenols, TCA i TBA en mostres de vi. Estudi dels possibles efectes matriu en la quantificació dels compostos clorofenòlics.

#### ***4. Publicacions***

---



---

---

**4.1 Development of solid-phase extraction and solid-phase microextraction methods for the determination of chlorophenols in cork macerate and wine samples**

S. Insa, V. Salvadó, E. Anticó

J. Chromatogr. A 1047 (2004) 15-20

---

---



---

---

**4.2 Ethanol/water extraction combined with solid-phase extraction and solid-phase microextraction for the determination of chlorophenols in cork stoppers**

Sara Insa, Emili Besalú, Cristina Iglesias, Victòria Salvadó, Enriqueta Anticó

J. Agric. Food Chem. **2006**, 54, 627-632

---

---





---

---

**4.3 Assays on the simultaneous determination and elimination of chloroanisoles and chlorophenols from contaminated cork samples**

Sara Insa, Victòria Salvadó, Enriqueta Anticó

J. Chromatogr. A, en revisió

---

---



**Assays on the simultaneous determination and elimination of  
chloroanisoles and chlorophenols from contaminated cork  
samples<sup>#</sup>**

Sara Insa, Victòria Salvadó, Enriqueta Anticó\*.

Department of Chemistry. University of Girona, Campus Montilivi. 17071  
Girona, Spain.

---

<sup>#</sup> Presented at the 11th Meeting on Instrumental Analysis, Barcelona, 15-17 November 2005.

\* Corresponding author.

Tel.: +34-972418276;

Fax: +34-972418150

E-mail address: [enriqueta.antic@udg.es](mailto:enriqueta.antic@udg.es)

---

---

**4.4 Assessment of the matrix effect on the headspace solid-phase microextraction (HS-SPME) analysis of chlorophenols in wines**

Sara Insa, Emili Besalú, Victòria Salvadó, Enriqueta Anticó

J. Sep. Sci., en viat

---

---



**ASSESSMENT OF THE MATRIX EFFECT ON THE HEADSPACE SOLID-  
PHASE MICROEXTRACTION (HS-SPME) ANALYSIS OF  
CHLOROPHENOLS IN WINES**

Sara Insa, Emili Besalú<sup>1</sup>, Victòria Salvadó, Enriqueta Anticó\*

Department of Chemistry. University of Girona, Campus Montilivi. 17071 Girona,  
Spain.

<sup>1</sup>Institute of Computational Chemistry. University of Girona. Campus Montilivi. 17071  
Girona, Spain.

\* Corresponding author:

**Dra. Enriqueta Anticó**

Department of Chemistry, University of Girona

Campus Montilivi s/n

17071 Girona (Spain)

Tel.: 34-972418276

FAX: 34-972418150

*E-mail address:* [enriqueta.antic@udg.es](mailto:enriqueta.antic@udg.es)

---

---

**4.5 Highly selective solid-phase extraction and large volume injection for the robust gas chromatography-mass spectrometric analysis of TCA and TBA in wines**

S. Insa, E. Anticó, V. Ferreira

J. Chromatogr. A 1089 (2005) 235-242

---

---





## ***5. Discussió dels resultats***

---



En aquest capítol es proporcionarà una visió detallada dels resultats recollits en els articles anteriorment adjuntats. Dites publicacions mantenen entre elles un fil conductor comú que es fonamenta en el desenvolupament de mètodes per l'anàlisi de determinades substàncies relacionades amb el defecte de "gust de suro". Així doncs, considerant els objectius proposats en aquesta tesi doctoral, es poden establir tres apartats on s'engloben els diferents resultats obtinguts.

**Desenvolupament de mètodes basats en l'extracció en fase sòlida (SPE) i la microextracció en fase sòlida (SPME) per a la determinació de clorofenols en el control de qualitat del suro. Avaluació de la capacitat d'extracció de les mescles etanol/aigua a l'hora d'establir el contingut total de clorofenols en taps de suro**

Els resultats als quals fa referència aquest primer objectiu estan recollits a les publicacions 4.1 i 4.2.

La necessitat de disposar de metodologies per a la determinació dels compostos clorofenòlics en suro i en vi a baixes concentracions ha donat peu a la utilització tècniques de pretractament de mostra que garanteixin l'obtenció de la sensibilitat requerida. En aquest sentit s'ha optat per l'aplicació de l'extracció en fase sòlida (SPE) i la microextracció en fase sòlida (SPME) a l'hora de preconcentrar els anàlits abans de la seva anàlisi per cromatografia de gasos i detecció de captura d'electrons. Els estudis presentats en aquest apartat s'han orientat principalment a desenvolupar una metodologia analítica per ser aplicada a la indústria surera; per això s'han utilitzat solucions hidroalcohòliques com a medi extractant. És a dir, s'ha avaluat el seu ús per quantificar els clorofenols en mostres taps de suro que es preparen per realitzar-ne els testos de control (vegeu apartat 1.3.5). Cal destacar també que, tant en aquest estudi com en tots els que en aquesta memòria es presenten on els compostos d'interès són els clorofenols, s'ha incorporat, prèviament a l'anàlisi cromatogràfica, una etapa de derivatització (acetilació) per evitar els posteriors problemes d'adsorció i millorar la resolució dels pics.

L'avaluació de l'eficàcia de la SPE com a tècnica d'extracció i preconcentració de clorofenols comença amb la selecció del sorbent més adient. En els darrers anys, tal i

com s'ha ressenyat en la secció dedicada a metodologies, han aparegut un gran nombre d'adsorbents que actuen mitjançant el mecanisme de fase reversa i que han millorat substancialment la realització i la selectivitat de procés de SPE. En el cas que ens ocupa, nombrosos estudis dirigits a l'anàlisi de compostos fenòlics en aigües han assenyalat l'eficiència del C<sub>18</sub> i l'Oasis HLB davant altres tipus de sorbents. Per tal de contrastar aquesta informació es va considerar convenient comparar-ne el seu comportament emprant mostres fortificades d'aigua i dissolucions hidroalcohòliques amb un percentatge d'etanol del 12% (v/v) similars als macerats de taps de suro i el vi. Cal assegurar que el fet que la solució contingui una certa quantitat de dissolvent orgànic no afecti negativament l'extracció ja sigui obstaculitzant la interacció dels grups funcionals de l'adsorbent amb els anàlits com fent que es doni la seva elució simultàniament a l'etapa de càrrega. Ambdós sorbents van proporcionar recuperacions similars en les dues matrius esmentades, per tant es pot concloure que un contingut d'etanol del 12% no afecta negativament el procediment d'extracció. L'anàlisi de la variància demostra que no existeixen diferències significatives entre les dades obtingudes pels dos adsorbents emprats quan les mostres contenen un 0% i un 12% (v/v) d'alcohol. No obstant, l'aplicació del mètode de SPE a macerats reals fortificats amb clorofenols mostra diferències entre l'Oasis HLB i el C<sub>18</sub>. Mentre el primer proporciona recuperacions quantitatives pels tres anàlits, el sorbent de C<sub>18</sub> resulta en una menor eficiència d'extracció en gairebé tots els casos. Aquest fenomen es podria explicar per la poca capacitat de retenció de compostos fenòlics més polars (vegeu Taula 2 de la publicació 4.1, on el TCP presenta la recuperació més baixa) i la manca de selectivitat d'aquest tipus d'adsorbent que afavoreix que gran nombre d'interferències s'extreguin juntament amb els anàlits, disminuint-ne així la seva retenció. A més a més el C<sub>18</sub> és poc estable a pH àcids (recordeu que prèviament al procés de SPE el medi s'ajusta a pH=2 per assegurar la forma protonada dels fenols) i en la seva estructura poden existir grups silanol lliures que fan possible la formació d'enllaços per pont d'hidrogen amb els compostos, donant lloc a retencions irreversibles i dificultats addicionals en l'etapa d'elució del cartutx. A partir d'aquestes dades, l'estudi es va continuar amb la fase sòlida Oasis HLB.

La metodologia d'extracció en fase sòlida amb l'adsorbent Oasis HLB va ser avaluada en termes de volum de mostra que es pot aplicar sense que es produeixin pèrdues dels anàlits. Es va comprovar que, excepte pel TCP, és possible aplicar volums de macerats

de taps de suro fins a 250 mL mantenint recuperacions quantitatives. Finalment, es va examinar la recuperació del mètode fortificant les mostres a diferents nivells de concentració dels clorofenols. Gairebé en tots els casos s'obtenen resultats satisfactoris, demostrant així l'efectivitat del procediment a l'hora de quantificar els clorofenols "alliberables" quan es troben a concentracions de l'ordre dels pocs ng/L en els corresponents macerats de suro.

Per al desenvolupament del procediment de SPME dels clorofenols un cop acetilats *in situ* es va escollir una fibra de polidimetilsiloxà (PDMS) atenent a les característiques apolars dels compostos derivatitzats i a la bibliografia existent. Com a mode d'operació es va considerar adient emprar l'extracció a l'espai en cap (HS-SPME) ja que així s'evita el deteriorament de la fibra a causa de la presència de gran nombre d'interferents en el sí de la matriu.

D'entre els paràmetres que afecten la SPME dels anàlits continguts en una solució hidroalcohòlica (etanol/aigua 12% (v/v)) es van seleccionar el temps i la temperatura d'extracció i la quantitat de sal addicionada com a factors a estudiar. Després de l'optimització mitjançant l'estratègia clàssica, és a dir, variant un factor cada vegada mantenint fixes els altres, es van obtenir els resultats següents:

- 1) A mesura que s'augmenta el temps d'extracció, la resposta és major. No obstant, per tal de no perllongar excessivament l'anàlisi es va fixar el temps a 30 minuts, ja que sota aquestes condicions la quantitat de cada compost extreta era suficientment gran com per ser detectada.
- 2) Tal com s'ha comentat en l'apartat 2.2.3, en general, l'augment de la temperatura de mostreig produeix un efecte positiu en la recuperació dels anàlits. A més, quan es treballa en la configuració de "headspace", el fet d'aplicar temperatura a la mostra facilita la transferència de les substàncies a l'espai en cap i posteriorment a la fibra. Malgrat tot, a temperatures extremes es pot donar el mecanisme invers i per tant és possible la reducció de l'eficiència de la SPME ja que el valor de la constant de distribució disminueix. Aquest fenomen és el que s'ha observat en el cas del TCP i TeCP quan l'extracció es realitza a 65°C. Per aquest motiu es va triar com a temperatura òptima 55°C perquè en aquest punt s'obtenien majors extraccions per a tots els compostos d'estudi.

3) Habitualment, el fet d'afegir una sal soluble a una dissolució n'incrementa la força iònica afavorint la SPME dels compostos menys solubles. Contràriament a aquesta norma general, es va comprovar que l'addició de NaCl no comportava un augment en la resposta d'extracció, per la qual cosa es va establir el valor de sal afegida en 0.8 g. Per interpretar aquest resultat s'ha de tenir en compte la composició de la matriu, és a dir, el contingut d'etanol de la mostra, el qual necessàriament ha d'influenciar els paràmetres que governen el procés. Altrament, la presència d'alcohol indueix a variacions en els coeficients de distribució dels anàlits entre la solució aquosa i la fibra. De fet en aquest estudi es va verificar que majors continguts d'etanol es traduïen en menors recuperacions dels clorofenols, però malgrat aquesta reducció en l'extracció quan el percentatge és d'un 12%, el mètode resultant és prou sensible per determinar els compostos en els macerats de suro i les mostres de vi.

Un cop optimitzats els factors que determinen l'eficiència de la SPME, es va validar el mètode. Els paràmetres de qualitat estudiats van ser la linealitat, la repetitivitat i el límit de detecció. Es va observar una tendència lineal per a tots els anàlits en un interval de concentracions comprès entre 1 i 40 ng/L amb uns coeficients de correlació ( $r^2$ ) superiors a 0.993. Freqüentment s'assenyala que la SPME és un procés poc repetitiu però en aquest cas es van obtenir desviacions estàndard relatives inferiors al 5.3%. El càlcul dels límits de detecció basat en una relació senyal/soroll de 3 a 1 va confirmar que la metodologia desenvolupada es caracteritza per la seva elevada sensibilitat, permetent la detecció dels clorofenols a nivells de concentració al voltant de 1 ng/L.

En darrer terme es va assajar l'eficàcia del mètode de HS-SPME aplicant-lo a mostres reals fortificades amb 10 ng/L de cada clorofenol. Si bé tant pels macerats de taps de suro com pel vi es van obtenir resultats de recuperació favorables en gairebé tots els anàlits, cal esmentar que fou impossible la detecció de PCP en vi. Probablement les condicions dràstiques de temperatura (55°C) afavoreixen que les substàncies volàtils del vi passin a l'espai en cap i, conseqüentment, siguin extretes per la fibra de PDMS juntament amb els clorofenols. Precisament en el cromatograma corresponent es pot apreciar com en la zona on apareix el PCP es localitzen gran nombre de pics que podrien correspondre a les interferències abans esmentades.

En determinades ocasions no interessa quantificar la fracció de compostos “alliberables” en els macerats de suro sinó que es pretén establir el contingut total d’anàlit a la mostra. En aquest sentit es proposa estudiar la capacitat de les mescles etanòliques amb un percentatge d’alcohol superior al 12% (v/v) per extreure els clorofenols de mostres de suro. Per aquesta raó, d’una banda es tritura el tap per tal que no només la seva part superficial estigui en contacte amb la solució extractant com succeeix en l’anàlisi dels compostos “alliberables”, sinó la seva totalitat, i d’altra banda s’incrementa el percentatge d’etanol de la mescla d’extracció per afavorir-ne el procés. Així doncs, es realitza una anàlisi en unes condicions més dràstiques que permetrien garantir un control més rigorós del taps de suro.

El procediment emprat consisteix en l’extracció dels compostos clorofenòlics seguit d’una preconcentració i purificació a través de la SPE o la SPME (igual que en el treball anterior) i finalment l’anàlisi mitjançant cromatografia de gasos amb detecció de captura d’electrons.

Considerant els resultats satisfactoris obtinguts prèviament amb el sorbent Oasis HLB a l’hora de preconcentrar macerats de suro, es va creure convenient la seva utilització per realitzar els experiments que s’inclouen en aquest treball. En primer lloc es va assajar quin era el contingut màxim d’etanol que admetia l’adsorbent sense que es produïssin pèrdues dels compostos. Segons les dades que es mostren a la Figura 1 de l’article 4.2, es pot concloure que un percentatge d’alcohol del 40% ofereix recuperacions quantitatives per el TeCP i el PCP mentre que percentatges superiors provoquen importants reduccions en l’extracció de tots tres anàlits. Així doncs, es va prendre un contingut màxim d’etanol del 30%.

Per afavorir el mecanisme d’extracció dels clorofenols del suro fortificat es va augmentar el percentatge d’etanol de la mescla hidroalcohòlica fins a un 40% i 60%. Així, abans d’aplicar el procés de SPE de l’extracte resultant va ser necessària la seva dilució a la meitat per obtenir uns percentatges del 20% i el 30% respectivament i assegurar que no es produís la pèrdua dels compostos durant l’etapa de preconcentració. Emprant la dissolució amb un contingut més elevat d’etanol (60%) es produeix la saturació del sorbent a causa del gran nombre de partícules que s’extreuen conjuntament amb els anàlits. Les recuperacions obtingudes a partir d’un suro fortificat a 20 ng/g i



extret amb una dissolució hidroalcohòlica del 40% van ser del 78.6% pel TCP, 59.2% pel TeCP i 33.6% pel PCP. Es comprova que a mesura que disminueix el nombre d'àtoms de clor de la molècula el procés d'extracció resulta més favorable ja que, al cap i a la fi, l'agent extractant presenta major afinitat per les substàncies polars i d'altra banda, el PCP és retingut majoritàriament pel suro. Per tant, el mètode proposat permet la determinació quantitativa del TCP mentre que l'anàlisi dels altres compostos esdevé més crítica.

Generalment, la SPME ofereix major preconcentració que la SPE, per aquest motiu es va examinar si el mateix procediment resultava més efectiu aplicant aquesta tècnica. No obstant, tenint en compte que l'extracte de suro conté un 40% d'etanol cal realitzar-ne una dilució per evitar la pèrdua de sensibilitat provocada per la presència de dissolvent orgànic. Com ja s'ha puntualitzat en l'apartat anterior, un contingut del 12% d'alcohol, tot i afectar el procés de SPME, no comporta una excessiva reducció de la resposta. A més, no interessa efectuar una major dilució de l'extracte per disminuir el percentatge d'etanol ja que aquesta operació porta associada la dilució dels propis anàlits, fet que pot ser més perjudicial que el benefici en el valor dels coeficients de partició.

Per a la consecució del procediment de HS-SPME es va escollir una fibra de Polidimetilsiloxà/divinilbenzè (PDMS/DVB) atenent als excel·lents resultats citats en la bibliografia per a l'extracció de clorofenols i perquè la incorporació del DVB aporta una interacció extra amb els compostos clorofenòlics a causa de les interaccions  $\pi$ - $\pi$  dels anells aromàtics i a més facilita que els temps necessari per assolir l'equilibri es redueixi. L'estudi dels paràmetres que afecten l'extracció es va centrar en la influència del temps, la temperatura i la quantitat de sal addicionada. En aquest sentit, es va optar per aplicar un disseny factorial complet  $2^3$  per avaluar l'efecte dels diferents factors individuals i les seves interaccions en el mecanisme d'adsorció. Examinant les dades que s'indiquen a la Taula 2 de l'article 4.2 es poden formular les següents conclusions:

- 1) Segons els valors de significància (valor p) obtinguts en l'anàlisi de la variància, les interaccions dobles entre els factors no determinen la resposta pel que fa l'extracció, és a dir, els factors actuen de forma independent.
- 2) D'entre les variables individuals cal mencionar que el temps és significant per als tres anàlits d'interès i té un efecte positiu al nivell superior. La temperatura millora significativament la sensibilitat del mètode només pel TCP quan es treballa al nivell

baix. I pel que fa al contingut de NaCl no s'observa cap efecte en l'eficiència de l'extracció.

3) L'anàlisi de la variància també revela que existeix evidència de curvatura en el cas del TCP i el TeCP. Aquest fet obliga a una inspecció més acurada en la regió intermitja del domini estudiat mitjançant els experiments realitzats en el punt central (50 min, 60°C, 1 g de NaCl) per verificar si la curvatura és còncaua o convexa. Les gràfiques de contorn de la temperatura envers el temps d'extracció (vegeu Figura 3 de la publicació 4.2) mostren que, en ambdues situacions, prop del punt central es troba un mínim i per tant la resposta s'incrementa en els extrems de la representació.

A partir d'aquests resultats es poden establir les condicions experimentals més adients per portar a terme la HS-SPME: 60 min, 50°C i 0.8 g de contingut de sal. Cal mencionar que s'han analitzat les dades en global no per cada anàlit per separat. En aquest sentit no existeix cap dubte en fixar el temps a 60 min ja que en tots els casos la resposta és major quan es perllonga l'extracció. S'ha pres la temperatura de 50°C perquè el TCP mostra una major extracció en el nivell baix d'aquesta variable mentre que pels altres compostos no és significativa. Considerant la manca d'influència de la quantitat de NaCl addicionada es treballa en el nivell més baix del domini experimental. Les gràfiques de contorn permeten preveure que les condicions òptimes es trobarien a temps d'extracció superiors als 60 min, però temps tan llargs són poc pràctics a nivell de laboratori. Així doncs, amb les valors seleccionats per als paràmetres considerats s'obté una metodologia prou sensible com per detectar els clorofenols a nivells traça.

Pel que fa als paràmetres de qualitat, és primordial avaluar la linealitat del mètode desenvolupat sobretot perquè el fenomen d'adsorció es fonamenta en un mecanisme de competència pels llocs actius de la superfície del sorbent. És a dir, quan aquestes posicions són ocupades s'impossibilita la retenció de més molècules de compost. Això significa que la linealitat es limita a intervals petits de concentració. Addicionalment, pot tenir lloc el desplaçament de l'anàlit si en la matriu existeixen altres substàncies amb més afinitat pel recobriment de PDMS/DVB. Per tant la presència de compostos interferents pot afectar l'extracció de l'anàlit i la linealitat del mètode. Les corbes de calibratge construïdes en un interval comprès entre 1 i 50 ng/L demostren una dependència lineal entre la quantitat de clorofenol extreta per la fibra i la seva concentració en la mostra (vegeu Taula 3 de la publicació 4.2). La precisió (%RSD  $\leq$

11.4%), la sensibilitat i els límits de detecció  $\leq 2.5$  ng/L del procediment descrit també resulten acceptables.

L'aplicació de la metodologia requereix ésser avaluada en dues etapes. En primer lloc, és necessari comprovar que l'extracció mitjançant la HS-SPME d'extractes hidroalcohòlics reals fortificats amb els clorofenols és efectiva. En tots els casos s'obtenen recuperacions superiors al 80%. En segon lloc, cal examinar el procediment íntegre, és a dir, l'extracció del suro fortificat a 13.5 ng/g amb una mescla etanol/aigua al 40% (v/v), la seva dilució fins aconseguir un 12% de contingut d'etanol i el posterior procés de HS-SPME. Les recuperacions han estat del 78.5%, 51.9% i 19.6% pel TCP, TeCP i PCP, respectivament. Aquestes dades són similars a les obtingudes aplicant la SPE com a tècnica d'extracció i preconcentració.

Així es pot concloure que ambdós mètodes ofereixen resultats satisfactoris en la determinació de TCP, però no és així pels fenols més clorats. S'ha d'atribuir la manca de resultats quantitius, especialment pel PCP, a la insuficient capacitat extractiva de les solucions hidroalcohòliques.

**Avaluació d'una metodologia per a la determinació simultània de cloroanisoles i clorofenols en matrius de suro basada en l'extracció sòlid-líquid emprant *n*-pentà com a dissolvent. Assaigs previs per examinar el percentatge d'eliminació de cloroanisoles i els seus precursors fenòlics en mostres de suro aplicant diferents tractaments de rentat que fàcilment poden incorporar-se en el procés de manufactura dels taps de suro**

L'article on es tracta aquest objectiu es troba en l'apartat 4.3.

Al llarg d'aquesta tesi doctoral en repetides ocasions s'ha reiterat la dificultat que comporta l'anàlisi conjunta dels cloroanisoles i els seus precursors fenòlics com a conseqüència del diferent comportament químic d'ambdues famílies de compostos. Aquest fet queda perfectament reflectit en la literatura consultada, on escasses publicacions ofereixen metodologies capaces d'acomplir aquest propòsit i els mètodes existents no han estat caracteritzats amb prou profunditat. Sota aquestes directrius, s'ha avaluat un procediment analític per a la determinació simultània de cloroanisoles i clorofenols en matrius de suro mitjançant cromatografia de gasos amb detecció per espectrometria de masses. El fet de disposar d'un mètode robust no només representa una eina indispensable per a tasques de control del producte sinó que també és el punt de partida per a la consecució de noves investigacions, com per exemple l'avaluació de diferents sistemes de rentat. Precisament, el sector surer es caracteritza per la seva iniciativa innovadora que ha fomentat el plantejament de nous reptes enfocats a obtenir un tap de suro de més qualitat. D'entre les diferents línies d'investigació, s'ha dedicat un especial interès a l'examinació dels diferents sistemes de rentat que es duen a terme durant el procés de manufactura del tap. Per proporcionar un coneixement més ampli sobre aquests tractaments aplicats, en aquest treball s'han proposat un seguit de reactius de rentat dels quals se n'ha estudiat l'eficàcia per a l'eliminació tant de cloroanisoles com clorofenols en mostres de suro.

Tenint en compte d'una banda les limitacions abans esmentades de les dissolucions hidroalcohòliques com a medi d'extracció i de l'altra l'eficàcia del *n*-pentà com a solvent en l'anàlisi de TCA en mostres de suro (mètode desenvolupat pel nostre grup de recerca) es va considerar adient adaptar-ne les condicions experimentals per poder efectuar la determinació de cloroanisoles juntament amb els seus precursors. Aquest procediment es basa en l'extracció dels compostos emprant *n*-pentà com a dissolvent.

L'extracte resultant, un cop preconcentrat, es divideix en dues fraccions addicionant  $K_2CO_3$  al 5%. D'aquesta manera els cloroanisoles romanen en la fase orgànica mentre que els clorofenols desprotonats a causa del medi bàsic es transfereixen a la fase aquosa on posteriorment es realitza la seva derivatització. Òbviament un punt crític del procediment és la separació dels anàlits mitjançant l'extracció líquid-líquid ja que interessa que no es produeixin pèrdues i es recuperin quantitativament els compostos en les dues fraccions. L'estudi d'aquesta etapa emprant dissolucions de patrons i aplicant les condicions descrites en la secció experimental mostra que els resultats són satisfactoris en tots els casos. L'avaluació del mètode global es realitza fortificant suro triturat, del qual s'ha comprovat l'absència de cloroanisoles i clorofenols. Les recuperacions són acceptables per a tots els nivells de concentració considerats. Existeixen moltes discrepàncies envers les tècniques de fortificació de mostres sòlides, però la manca de materials de referència certificats obliguen a la seva utilització quan es vol validar un mètode. Per assegurar la veracitat de tots els resultats es va comprovar que el procediment de fortificació emprat és vàlid. Després d'addicionar sobre el suro una solució de concentració perfectament coneguda dels anàlits, es van assajar diferents temps de contacte abans de realitzar l'extracció per tal de simular les interaccions que es produeixen en una mostra real. Fins i tot al cap de 48 hores les recuperacions obtingudes són favorables. Finalment, en una matriu tan complexa com el suro resulta essencial avaluar-ne la precisió. Els diferents experiments han mostrat que el procediment és repetitiu i reproduïble, amb uns valors de desviació estàndard relativa inferiors al 10% en gairebé tots els compostos.

L'estudi del mètode d'anàlisi es completa amb la seva aplicació a mostres reals. Per aquest propòsit es van seleccionar dos tipus de planxes de suro, les quals havien estat rebutjades per a la fabricació de taps de suro a causa de l'elevat risc de presentar substàncies contaminants, com els cloroanisoles i clorofenols. D'una banda es van analitzar mostres que procedien de la part inferior de l'alzina surera. Aquest material es troba en contacte directe amb el sòl i és on habitualment s'apliquen els plaguicides, els quals poden contenir compostos clorofenòlics en la seva composició. D'altra banda, es van escollir diferents planxes de suro que clarament manifestaven el defecte de la "taca groga" i que sovint es relaciona amb la presència de cloroanisoles. De fet, l'anàlisi sensorial d'aquestes mostres ja va revelar l'existència d'un intens aroma de florit/humitat. En ambdues classes de planxes es va detectar i quantificar TCA i TCP.

Es varen assajar sistemes de rentat simples i econòmics que fàcilment podrien ser incorporats en el procés de manufactura de taps de suro. Si bé, en els darrers anys els grans productors de suro han desenvolupat potents mètodes d'eliminació sobretot de TCA (vegeu apartat 1.3.4), la petita i mitjana empresa no disposa de suficients mitjans per implantar aquestes innovacions i ha optat per millorar, dintre les seves possibilitats, les diferents etapes de producció com el bullit de les planxes i el rentat dels taps acabats. Sigui quin sigui el mètode de rentat aplicat, és essencial determinar-ne la capacitat d'eliminació de TCA i en aquest sentit s'emmarquen els experiments que a continuació s'exposen.

Les mostres de suro escollides per avaluar l'eficàcia de diversos tractaments de rentats van ser les que mostraven el defecte de "taca groga" on s'hi havia detectat una major quantitat de TCA i TCP (vegeu Taula 6 de la publicació 4.3). Aquest valor es va prendre com a referència del contingut inicial per poder estimar el percentatge d'eliminació de cada un dels rentats. Per aquest motiu periòdicament es va anar comprovant que aquest valor romanía constant al llarg de la realització dels diferents tests. A més, una de les etapes del procés implica l'assecat del suro un cop efectuat el rentat per tal de posteriorment realitzar l'extracció. A causa de la volatilitat del TCA, aquesta operació pot comportar pèrdues de l'anàlit que podrien emmascarar els resultats finals. L'examinació d'aquesta etapa va mostrar que el 51% del TCA i el 9% del TCP es perdien per evaporació. Aquestes dades doncs es van tenir en compte en el càlcul de l'eficàcia dels rentats.

Els reactius assajats en aquest estudi han estat aigua Milli-Q, hidròxid de sodi i dos productes comercials (producte 1: àcid peracètic i producte 2: àcid sulfàmic) que s'usen com a desinfectants de taps de suro. Dels resultats obtinguts (vegeu Figura 2 de la publicació 4.3) en destaca que la simple aplicació d'un rentat amb aigua permet reduir en aproximadament un 50% la quantitat de TCA i TCP. Addicionalment es va comprovar si era possible assolir un major rendiment d'eliminació utilitzant un bany d'ultrasons per millorar el contacte del material de suro amb l'aigua. En aquest cas però no s'aconsegueix augmentar el percentatge d'extracció dels anàlits. Pel que fa als rentats amb NaOH, en primer lloc es va estudiar una concentració de 0.1M. L'elecció d'aquest reactiu és fruit de les seves excel·lents característiques com a agent extractant de compostos fenòlics de matrius sòlides, especialment sòls. Sota aquestes condicions,

s'aconsegueix eliminar completament el TCP i a la vegada es redueix el contingut de TCA en aproximadament un 70%. L'èxit d'aquest tractament concretament en el cas del TCP es justifica per la desprotonació del grup hidroxil present en la molècula, fet que facilita la seva extracció. Com que aquest rentat és força agressiu i pot afectar a les propietats físiques del suro es va examinar si era possible obtenir resultats similars utilitzant una solució de NaOH menys concentrada (0.01M). No obstant, en aquesta ocasió s'observa una eliminació menys eficient per ambdós anàlits. Finalment, en relació als productes comercials utilitzats es demostra el seu baix poder d'extracció tant pel TCA com pel TCP. La composició química d'aquests dos reactius es basa en solucions àcides i per tant ja es preveia, pel que fa al TCP, que s'obtidrien baixos rendiments atès que no es donaria la reacció de desprotonació. No obstant, com que a aquests productes se'ls reconeix una funció com a desinfectants i esterilitzants en la indústria surera es volia verificar si també comportaven algun benefici en termes d'eliminació. El baix percentatge d'eliminació del TCA, inferior a l'aigua, es podria atribuir a l'elevada viscositat dels dos reactius estudiats que impedeix una correcta solubilització del compost.

A grans trets es pot concloure que l'aplicació de dissolucions alcalines de NaOH 0.1M representa la millor proposta per tal d'eliminar TCA i TCP de matrius de suro. Davant d'aquests resultats, però, caldria examinar les modificacions que pot provocar el NaOH sobre l'estructura del suro i, en conseqüència, si les seves propietats per al tapament d'ampolles de vi es veuen afectades. Val a dir que, a més, existeix una estricta normativa que regula l'ús de reactius aplicats a productes que han d'estar en contacte amb aliments, i per tant, s'hauria d'assegurar que aquest tractament no deriva en efectes nocius per a la salut.

### **Desenvolupament de metodologies per a l'anàlisi de clorofenols, TCA i TBA en mostres de vi. Estudi dels possibles efectes matriu en la quantificació dels compostos clorofenòlics**

Els resultats corresponents a aquest objectiu es presenten als articles 4.4 i 4.5.

Un cop avaluats els mètodes per a l'anàlisi de clorofenols i cloroansoles en mostres de suro es va creure convenient seguir el mateix plantejament per tal de poder disposar de procediments que garanteixin la correcta quantificació d'aquestes substàncies en l'altre matriu d'interès: el vi. En primer lloc es discuteixen els resultats referents als experiments realitzats per a la determinació dels compostos clorofenòlics mitjançant l'aplicació de la SPME com a etapa de concentració i l'avaluació de la influència dels efectes matriu en funció del tipus de vi utilitzat. Posteriorment s'examina l'estudi en el qual s'aplica la SPE i la injecció de grans volums per a l'anàlisi de TCA i TBA en mostres de vi.

Tot i el gran avenç que ha suposat la introducció de SPME en la determinació de substàncies a nivells traça, sovint aquesta tècnica presenta certes limitacions, sobretot quan s'analitzen mostres complexes. Aquest és el cas del vi on coexisteixen compostos de famílies químiques ben diverses a concentracions que difereixen diferents ordres de magnitud. Aquest fet obliga a dur a terme un estricte control dels paràmetres que afecten la SPME per tal d'assegurar d'establir el contingut dels anàlits d'interès en la mostra a la vegada que es minimitza l'extracció d'interferències. Tal com es reflecteix en l'article 4.1, el mètode d'anàlisi de clorofenols mitjançant HS-SPME i cromatografia de gasos amb detecció de captura d'electrons no oferia bons resultats quan s'aplicava a mostres de vi. Malgrat la reconeguda selectivitat del detector, en moltes ocasions els pics dels compostos apareixen superposats amb els d'impureses procedents de la matriu que impossibiliten l'anàlisi quantitativa. Per solucionar aquesta manca de resolució es va optar per incorporar dues modificacions en la metodologia analítica desenvolupada. D'una banda, es van avaluar de nou els factors que influeixen el procés d'extracció però aquesta vegada aplicant un disseny factorial complet i, de l'altra, es va proposar la detecció per espectrometria de masses operant en el mode MS/MS per obtenir major selectivitat. Els resultats d'aquestes modificacions juntament amb l'estudi de l'efecte matriu es comenten breument a continuació.



Aquest treball es pot considerar com una continuació de l'estudi recollit en l'article 4.1, i per tant es prenen com a punt de partida les condicions d'extracció de la fibra de PDMS. És a dir, es defineix un nou domini experimental per cada un dels paràmetres estudiats (temps, temperatura i contingut de sal) centrat en les condicions que s'havien trobat quan es varia un factor cada vegada (40 min, 50°C i 0.8 g de NaCl). Un cop descrit el domini de treball (vegeu Taula 1 de la publicació 4.4) es realitza el disseny experimental complet que contempla dos nivells per a cada factor. D'aquesta manera es durà a terme un estudi més exhaustiu de l'efecte en la resposta de cada paràmetre i a la vegada es podrà comprovar si existeix interacció entre variables, una informació que el mètode clàssic d'optimització no proporciona. Després de realitzar aleatòriament els 8 experiments per triplicat es poden enunciar les següents conclusions (els resultats es sintetitzen a la Taula 3 de l'article 4.4):

- 1) Per a tots els clorofenols la variable temps té un efecte rellevant i incrementa la resposta quan aquesta es fixa al nivell alt.
- 2) La temperatura només és significativa en el cas del TeCP i el PCP i la quantitat d'anàlit extreta s'incrementa a temperatures elevades.
- 3) L'addició de sal no condueix a una major extracció en cap dels compostos estudiats.
- 4) Existeixen interaccions dobles entre la temperatura i el contingut de sal afegit en el cas del TCP i TeCP i entre la temperatura i el temps pel PCP.
- 5) L'evidència de curvatura es fa patent en el TCP i TeCP. No obstant, un estudi més acurat considerant els experiments efectuats en el punt mig de l'interval de treball mostra que aquesta curvatura és poc accentuada sense màxims ni mínims. Així doncs, es pot establir que els punts experimentals òptims es situen als extrems de la superfície explorada.

Tenint en compte la informació extreta del disseny factorial es pot concloure que les condicions d'extracció més adients són: 60 min, 70°C i 0.4 g de contingut de sal. La major resposta s'obté a temps elevats per a tots els anàlits. Probablement allargant el mostreig per sobre dels 60 min l'extracció sigui més eficient però per verificar aquesta asseveració s'haurien d'aplicar tècniques d'optimització. D'altra banda, l'augment en la resposta a majors temps d'extracció va en detriment de la rapidesa de l'anàlisi i per això no s'ha considerat. En conjunt el nivell alt de la temperatura produeix un efecte favorable en el procés de HS-SPME i per aquesta raó es fixa a 70°C. Concretament la interacció doble amb signe positiu entre la temperatura i el temps pel PCP corroboren

aquests resultats. En cap anàlit s'ha constatat la influència de la quantitat de NaCl afegida. A més el signe negatiu de la seva interacció amb la temperatura en el TCP i TeCP refermen la hipòtesi de treballar a continguts baixos de sal.

En un primer estadi es van establir els paràmetres de qualitat del mètode de HS-SPME amb detecció de captura d'electrons utilitzant mescles etanol/aigua 12% (v/v), obtenint-se valors satisfactoris tant pel que fa a la repetitivitat com la linealitat en l'interval de concentracions considerat. No obstant, l'aplicació del procediment a mostres de vi blanc fortificades amb els tres clorofenols va posar de manifest problemes de superposició dels pics dels anàlits amb pics d'interferents que havien estat extrets conjuntament com ja s'havia vist en el treball 4.1. Aquesta manca de resolució dels pics cromatogràfics va portar a utilitzar un sistema de detecció més selectiu.

Mantenint els paràmetres de la HS-SPME que condueixen a una màxima extracció dels clorofenols, es va estudiar la resposta cromatogràfica utilitzant una trampa d'ions com a analitzador treballant en el mode MS/MS. El procés implica l'aïllament de l'ió precursor corresponent a cada molècula que en aquest cas són aquells amb uns valors de  $m/z$  de 196, 230 i 264 pel TCP, TeCP i PCP, respectivament. Posteriorment, s'aplica el voltatge òptim per produir la seva fragmentació i es recullen els ions fills que són els que s'utilitzen amb finalitats quantitatives (132 i 160 pel TCP, 194 i 166 pel TeCP i 165 i 200 pel PCP). Es tracta d'una tècnica que a part de millorar substancialment la selectivitat també comporta un benefici en la sensibilitat ja que s'elimina el soroll de fons. Emprant aquest mode d'operació s'obtenen pics totalment gaussians per tots els clorofenols, els quals s'identifiquen inequívocament a partir del patró de fragmentació característic de l'ió precursor.

En darrer terme es va comprovar si existeixen diferències entre la matriu sintètica (dissolució hidroalcohòlica) i les reals (vi blanc i negre), i per aquest motiu es van comparar els pendents de les rectes de regressió corresponents. Un cop verificada l'absència de diferències entre les desviacions estàndard es va realitzar un test  $t$  per a un nivell de significància del 5%. Els pendents del vi sintètic i vi blanc són estadísticament comparables per a tots els anàlits, en canvi s'observen diferències quan es compara la mescla etanol/aigua amb el vi negre exceptuant el cas del TCP. Així doncs, és possible emprar solucions hidroalcohòliques per determinar els clorofenols en vi blanc mentre

que en mostres de vi negre és necessari usar patrons de calibració preparats amb la matriu. Aquest diferent comportament del vi negre es pot atribuir a la seva complexa composició. Possiblement la interacció dels clorofenols amb altres substàncies presents produeixen canvis en els valors de les constants de distribució i en general la resposta d'extracció és menor. D'entre els paràmetres de qualitat estudiats, a banda de la linealitat, precisió i recuperació del mètode (vegeu Taula 5 i 6 de la publicació 4.4), cal destacar-ne els baixos límits de detecció dels compostos en les tres matrius, en tots els casos inferiors a 1 ng/L, fet que posa de manifest la gran sensibilitat del procediment desenvolupat.

Finalment, només resta exposar els resultats derivats del desenvolupament d'una metodologia per a la determinació de TCA i TBA en mostres de vi blanc. Tal i com es desprèn de l'apartat 2 d'aquesta memòria i el gran nombre de publicacions existents ho corroboren, la necessitat de disposar de tècniques de preconcentració que permetin equiparar la sensibilitat dels mètodes instrumentals amb els llindars de percepció d'aquests compostos ha provocat que la SPME esdevingui l'opció més utilitzada a l'hora de desenvolupar mètodes d'anàlisi d'aquestes substàncies. Aquesta tendència sovint ha emmascarat el potencial d'altres tècniques d'extracció com per exemple la SPE. Si bé és cert que amb la majoria de metodologies basades en la SPE no es poden assolir els estrictes requeriments pel que fa a límit de detecció, no se'n pot descartar el seu ús quan s'acobla amb altres sistemes de preconcentració. Aquest ha estat el principal repte plantejat del present treball. Tant el TCA com el TBA es caracteritzen per posseir uns llindars de percepció extremadament baixos en vi i per tant exigeixen procediments d'anàlisi molt sensibles. Amb aquest propòsit s'ha optimitzat un mètode basat en l'extracció dels compostos de mostres de vi mitjançant la SPE i la introducció de grans volums en el sistema cromatogràfic. A més cal remarcar que s'han emprat cartutxos de SPE empaquetats amb poca quantitat de fase sòlida (50 mg), fet que es tradueix en un augment de la competitivitat del procés en termes d'estalvi de temps, sorbent, reactius i mostra.

D'entre els paràmetres a examinar, s'ha posat especial atenció en l'etapa de rentat. El sorbent utilitzat (LiChrolut EN) es caracteritza per la seva elevada àrea superficial específica i, per tant, elevada capacitat de retenció. Això afavoreix que gran quantitat de substàncies quedin retingudes durant el procés d'extracció del vi. Sobretot en aquest

tipus de mostres tan complexes, on interessa determinar compostos que es troben a baixes concentracions, es fa palès la necessitat d'aplicar rentats el màxim de selectius. Per aquesta raó s'han assajat mescles aquoses amb diferents percentatges de metanol i un contingut de NaHCO<sub>3</sub> del 1% que permet eliminar els àcids grassos. A mesura que s'incrementa el volum de metanol de la solució de rentat s'observa en el cromatograma corresponent una important reducció del nombre de compostos majoritaris presents en el vi. Aquesta millora no només és primordial a l'hora de quantificar els anàlits sinó que també evita el deteriorament dels components del cromatògraf, especialment si tenim en compte que s'injectaran grans volums de mostra. La composició òptima de la dissolució de rentat és la que conté un 70% de metanol ja que a partir d'aquest punt s'observa una disminució en la recuperació tant del TCA com del TBA.

La correcta elecció del dissolvent d'elució esdevé essencial per assegurar la completa recuperació dels anàlits un cop retinguts en el cartutx. Els millors resultats per l'aplicació que s'està considerant són els que presenta el diclorometà. L'estudi exhaustiu del volum del solvent d'elució ha revelat que només 0.6 mL són suficients per recuperar quantitativament els anàlits, evidenciant així l'estalvi de reactius utilitzats. En moltes aplicacions és freqüent incorporar en el procediment la posterior evaporació del dissolvent per preconcentrar l'extracte abans de la seva injecció en el cromatògraf de gasos. Es tracta d'una etapa addicional i tediosa, no sempre exempta de pèrdues d'anàlit. És en aquest punt on la introducció de grans volums juga un paper decisiu.

L'adaptació de les condicions per a la injecció de grans volums (LVI) implica una optimització minuciosa de diversos paràmetres. La introducció de mostra mitjançant l'injector emprat, que opera de forma similar al de vaporització de temperatura programada (PTV), es duu a terme a una temperatura per sota del punt d'ebullició del dissolvent. Tenint en compte que el solvent d'elució és diclorometà, una temperatura inicial de 40°C representa un compromís idoni. Altres factors com són el volum (40 µL) i la velocitat d'injecció (5 µL/min) i el flux de "split" (100 mL/min) venen determinats per la configuració de l'injector que s'ha emprat en aquest estudi. Per realitzar l'examinació de les diferents variables que afecten la introducció de la mostra s'utilitzen extractes reals fortificats amb TCA i TBA obtinguts després del procés de SPE. El conjunt d'assaigs efectuats han revelat les següents conclusions:

1) L'estudi del temps de transferència dels compostos a la columna ens indica que calen uns 4 minuts per completar el procés. Aquest temps, comparat amb altres mètodes descrits, semblaria força llarg. Aquest factor està limitat pel comportament de l'anàlit menys volàtil i per les restriccions instrumentals que només permeten escalfar l'injector a una velocitat de 200°C/min.

2) Quan es tria el mode d'operació de vaporització del solvent ("*solvent-split injection*") és imprescindible fixar el temps en el qual es manté la vàlvula de "*split*" oberta per tal que el dissolvent s'elimini i els anàlits romanguin en el material inert del "*liner*" (llana de vidre). S'ha comprovat que en incrementar el temps es produeix principalment la pèrdua del TCA ja que en ésser una substància més volàtil presenta més tendència per ser arrossegada pel flux d'heli que circula dins de l'injector, mentre que el TBA és retingut en la llana de vidre durant l'evaporació del solvent. Encara que a un temps de 0.5 min s'observa una major recuperació d'ambdós compostos, el temps de "*split*" s'estableix a 0.7 min perquè en aquestes condicions els resultats són acceptables i el perfil cromatogràfic obtingut és més nítid, i a la vegada s'afavoreix la conservació dels components de l'instrument.

3) Una de les possibilitats que ofereix aquest mode d'injecció de mostra és l'eliminació d'impureses volàtils. Un cop introduïda la mostra en estat líquid i, mantenint la vàlvula oberta, s'augmenta lleugerament la temperatura perquè dites substàncies s'expulsin cap a l'exterior juntament amb el dissolvent. Quan aquesta estratègia s'assaja utilitzant patrons s'observa que és possible escalfar l'injector fins a 100°C abans d'efectuar la transferència del TCA i TBA dins la columna sense que això impliqui una reducció de la recuperació dels anàlits. No obstant, quan es repeteix l'experiment amb extractes de vi fortificats s'observa un clar efecte matriu. En qualsevol de les temperatures intermitges té lloc la pèrdua dels compostos, especialment del TCA. L'explicació més coherent per aquest fenomen és la diferent interacció amb el suport inert del "*liner*". És a dir, una mostra real conté gran nombre d'interferències que competeixen amb els compostos d'interès pel punts actius de la llana de vidre, fins al punt de desplaçar-los. Donat que el dissolvent s'elimina no només pel flux d'heli sinó també per efecte de la temperatura, es produeix un volum de gas que causa la discriminació entre el TCA i el TBA. Aquest fet obliga a desestimar l'aplicació d'una temperatura intermitja prèvia a la transferència dels compostos dins el sistema cromatogràfic.

El conjunt de paràmetres estudiats en la injecció de grans volums d'extractes de vi que contenen TCA i TBA s'esquematitzen en la Figura 1 de la publicació 4.5.

Un fet diferencial de la metodologia desenvolupada és la seva robustesa. Les dades de repetitivitat ( $RSD < 6\%$ ) i la reproductibilitat ( $RSD < 9\%$ ) evidencien la qualitat dels resultats. Tant la linealitat del sistema cromatogràfic (avaluada fortificant extractes) com del mètode global (examinada fortificant mostres de vi) indiquen una dependència lineal entre la resposta i la concentració d'anàlit en l'interval habitual en el qual s'analitzen. També s'ha estudiat la recuperació del procediment trobant-se resultats superiors al 80% independentment de la composició del vi i el nivell de concentració. Finalment, s'han determinat els límits de detecció del mètode, que són de 0.2 ng/L pel TCA i 0.4 ng/L pel TBA. Aquests valors són substancialment inferiors al seu llindar de percepció i del mateix ordre que els que s'obtenen mitjançant procediments basats en la SPME. Per tant els avantatges que es deriven d'aquest treball en termes de precisió, sensibilitat i rapidesa confirmen aquesta proposta com una excel·lent alternativa per a la determinació de TCA i TBA en mostres de vi.



## ***6. Conclusions***

---





Del conjunt de resultats recollits en aquesta memòria es poden enumerar les següents conclusions:

▪ S'han desenvolupat mètodes de determinació de clorofenols "alliberables" (TCP, TeCP i PCP) en macerats de suro basats en l'extracció en fase sòlida (SPE) o la microextracció en fase sòlida (SPME) i cromatografia de gasos amb detecció de captura d'electrons.

\* La comparació entre els sorbents d'extracció en fase sòlida C<sub>18</sub> i Oasis HLB ha demostrat que ambdós cartutxos proporcionen resultats similars pel que fa a la recuperació dels compostos d'interès en mostres d'aigua i dissolucions hidroalcohòliques amb un percentatge d'etanol del 12 % (v/v). Quan s'avaluen macerats de suro reals fortificats a 200 ng/L amb els clorofenols considerats, el sorbent Oasis HLB resulta més efectiu en gairebé tots els casos a l'hora d'extreure i preconcentrar els anàlits.

\* En les condicions experimentals establertes per l'etapa d'extracció en fase sòlida mitjançant els cartutxos Oasis HLB s'han analitzat diferents volums de macerats de suro fortificats a 10 ng de cada clorofenol. S'ha comprovat que una càrrega de fins i tot 250 mL permet obtenir recuperacions quantitatives per tots els compostos. Igualment s'ha aplicat el mètode per l'extracció de mostres que contenen diferents nivells de concentració (150, 50 i 20 ng/L). En la majoria dels casos s'han trobat valors de recuperacions acceptables.

\* L'estudi de diferents paràmetres que afecten la microextracció en fase sòlida dels clorofenols en solucions hidroalcohòliques mitjançant una fibra de Pòlidimetilsiloxà (PDMS) i mode d'espai en cap ha permès establir que les condicions experimentals que proporcionen una major resposta són: 60 min, 55°C i un contingut de NaCl de 0.8 g.

\* El mètode de SPME presenta una resposta lineal en l'interval estudiat, una elevada repetitivitat amb valors de %RSD inferiors al 5.3% i uns límits de detecció pròxims a 1 ng/L. La seva aplicació a mostres reals fortificades a 10 ng/L ha confirmat la seva utilitat per a la quantificació de clorofenols presents en macerats; no obstant, en el cas del vi, apareixen dificultats a l'hora de determinar

els compostos, especialment el PCP, com a resultat del gran nombre d'interferències que s'extreuen conjuntament amb els anàlits.

▪ S'ha avaluat la capacitat de mesclades etanol/aigua per a l'extracció de clorofenols de taps de suro, les quals posteriorment han estat preconcentrades aplicant les tècniques de SPE i SPME i analitzades utilitzant la cromatografia de gasos amb detecció de captura d'electrons.

\* S'ha assajat el contingut màxim d'etanol que admeten els cartutxos Oasis HLB sense que es produeixin pèrdues d'anàlit durant el procés de càrrega de la mostra. Emprant un percentatge d'etanol del 40% s'ha obtingut una recuperació del 45% pel TCP mentre que pels altres clorofenols s'han aconseguit dades quantitatives. Aquests resultats ens indiquen que el percentatge d'alcohol màxim per aquesta aplicació és del 30%.

\* Les extraccions del suro triturat fortificat a 20 ng/g s'han dut a terme utilitzant solucions hidroalcohòliques del 40% i el 60%, les quals han estat diluïdes a la meitat abans del procés de SPE, per obtenir un percentatge d'etanol del 20% i 30%, respectivament. Quan es carrega l'extracte que conté major proporció d'etanol (30%) es produeix la saturació del cartutx a conseqüència de l'elevat nombre d'interferents procedents del suro. En el cas de l'extracte amb un 20% d'etanol s'han obtingut recuperacions del 78.6% pel TCP, 59.2% pel TeCP i 33.6% pel PCP.

\* En el desenvolupament del mètode de HS-SPME s'ha emprat una fibra de Polidimetilsiloxà/divinilbenzè (PDMS/DVB) per a l'extracció de clorofenols de solucions etanol/aigua del 12% (v/v). L'estudi del temps, temperatura i contingut de sal s'ha realitzat aplicant un disseny factorial complet a dos nivells. Segons els resultats obtinguts es pot afirmar que només les variables individuals controlen la resposta i, d'entre aquestes, el temps és significatiu pels tres anàlits mentre que la temperatura només afecta l'extracció del TCP i el contingut de NaCl no influeix en el procés en cap cas. Mitjançant els gràfics de contorn s'ha verificat que la curvatura detectada pel TCP i el TeCP correspon a un mínim en la regió intermitja. Amb aquestes dades es pot concloure que les condicions d'extracció més adients són: 60 min, 50°C i 0.8 g de contingut de NaCl.

\* Els valors de precisió ( $\%RSD \leq 11.4\%$ ) i límit de detecció ( $\leq 2.5$  ng/L) corroboren la robustesa i sensibilitat de la metodologia proposada. L'aplicació de la HS-SPME sobre extractes de suro fortificats ha mostrat recuperacions superiors al 80%. Quan s'avalua tot el procés en global, és a dir, incloent l'etapa d'extracció amb una mescla hidroalcohòlica al 40% (v/v) d'etanol del suro fortificat a 13.5 ng/g i la seva posterior dilució fins aconseguir un percentatge d'alcohol del 12% per posteriorment dur a terme la HS-SPME, s'obtenen recuperacions del 78.5%, 51.9% i 19.6% pel TCP, TeCP i PCP, respectivament, valors similars a les que s'han descrit pel procediment basat en la SPE.

\* Tant el mètode basat en la SPE com en la HS-SPME ofereixen resultats satisfactoris per a la quantificació de TCP en mostres de suro, en canvi pels altres compostos esdevé més crític, fet que es pot atribuir a la baixa eficiència extractiva de les mescles etanol/aigua.

- S'ha avaluat un mètode fonamentat en l'extracció sòlid-líquid per a la determinació simultània de cloroanisoles i clorofenols en suro que posteriorment ha estat aplicada per examinar l'eficiència de diferents tractaments destinats a l'eliminació d'aquests compostos.

\* Després de comprovar diferents etapes que constitueixen el procediment, aquest s'ha assajat globalment fortificant suro triturat. Tant els resultats de recuperació a diferents nivells com els de precisió són satisfactoris en tots els casos. Addicionalment, s'ha verificat que el procés de fortificació emprat constitueix una opció adequada quan es vol obtenir suro contaminat amb finalitats de validació.

\* El mètode ha estat aplicat a diferent tipus de mostres de suro que acostumen a ser rebutjades per a la fabricació de taps i on s'hi ha detectat la presència de TCA i TCP.

\* Utilitzant aquestes mostres reals s'ha comprovat l'eficàcia de diferents rentats per a l'eliminació dels compostos relacionats amb el "gust de suro". El rentat amb aigua permet reduir el contingut de TCA i TCP en gairebé un 50%. En relació a l'ús de dissolucions alcalines de NaOH 0.1M es comprova que s'aconsegueix eliminar completament el compost fenòlic i aproximadament el 70% de TCA. Concentracions més diluïdes de NaOH no donen lloc a resultats tan favorables. Dos productes comercials basats en solucions àcides de peracètic i sulfàmic han

representat la pitjor alternativa ja que per ambdós compostos s'han obtingut baixos percentatges d'eliminació.

- S'ha fet un estudi de l'efecte matriu en la determinació de clorofenols en matrius de vi mitjançant la cromatografia de gasos acoblada a l'espectrometria de masses operant en el mode MS/MS.

\* Tenint en compte els resultats obtinguts per la fibra de PDMS, s'ha definit un nou domini experimental per tal d'avaluar la influència dels diferents paràmetres que afecten el procés de HS-SPME emprant un disseny factorial complet a dos nivells. Si bé el temps afecta l'extracció de tots els clorofenols, la temperatura només és significant pel TCP i TeCP. La quantitat de sal afegida no presenta efecte en la resposta dels anàlits. En conjunt es pot establir que les condicions d'extracció que provoquen un augment en la resposta són les que s'especifiquen: 60 min, 70°C i 0.4 g de contingut de sal.

\* L'anàlisi de mostres reals fortificades amb els respectius clorofenols utilitzant el mètode de HS-SPME desenvolupat i l'espectròmetre de masses treballant en el mode MS/MS com a sistema de detecció ha permès la correcta quantificació i identificació dels anàlits.

\* S'han estudiat en detall els possibles efectes matriu de les solucions etanol/aigua al 12% (v/v), vi blanc i vi negre. A partir de la comparació dels pendents de les rectes de regressió construïdes en els medis esmentats es pot concloure que no existeixen diferències significatives entre les solucions hidroalcohòliques i el vi blanc però sí que s'observen entre les primeres i el vi negre exceptuant el cas del TCP.

- S'ha desenvolupat una metodologia basada en la cromatografia de gasos i l'espectrometria de masses per a la determinació de TCA i TBA en mostres de vi acoblant la SPE i la injecció de grans volums (LVI).

\* Per aquest estudi s'han emprat cartutxos amb molt poca quantitat del sorbent LiChrolut EN (50mg) i se n'han assajat algunes de les etapes que governen el procés de SPE. La mescla hidrometanòlica al 70% (v/v) amb un 1% de NaHCO<sub>3</sub> ha representat la composició òptima per una eficient eliminació de les interferències adsorbides durant la càrrega de la mostra de vi. D'entre els diferents

dissolvents assajats com a eluents, el diclorometà permet recuperar quantitativament el TCA i TBA en un volum mínim de 0.6 mL.

\* La introducció de 40 µL d'extracte de vi dins el cromatògraf de gasos s'ha efectuat sota les següents condicions: 5 µL/min de velocitat d'injecció, 100 mL/min de flux de "split", 200°C/min de velocitat d'esclafament de l'injector, 4 min de transferència dels compostos a la columna cromatogràfica, 0.7 min d'eliminació del dissolvent a través de la vàlvula de "split". Tot i que en determinades ocasions és possible aplicar una temperatura intermitja durant l'eliminació del dissolvent per afavorir que les interferències més volàtils s'evaporin i siguin expulsades a través de la vàlvula, les característiques dels anàlits, sobretot el TCA, fan desestimar aquesta possibilitat.

\* Els valors de repetitivitat (%RSD < 6%) i la reproductibilitat (%RSD < 9%) posen de manifest la robustesa del mètode desenvolupat. Juntament amb l'òptima linealitat observada, cal mencionar les excel·lents recuperacions dels dos compostos a diferents nivells de concentració (5, 15, 30, 100 ng/L), les quals en cap cas són inferiors al 80%. En darrer lloc és essencial assenyalar els baixos límits de detecció aconseguits (0.2 ng/L pel TCA i 0.4 ng/L pel TBA), que fan que una metodologia per a la determinació d'aquests anàlits basada en la SPE es pugui equiparar, en termes de sensibilitat, a l'habitual SPME.



## ***7. Agraïments***

---





En multitud d'ocasions he imaginat com seria el moment de redactar els agraïments, però ara, davant la infinitat d'aquesta pàgina en blanc, sento un cúmul de sentiments difícils d'expressar tan sols amb simples paraules. D'una banda, m'envaeix una sensació d'alleujament al mirar enrere i comprovar que al final l'esforç dedicat ha valgut la pena. D'altra banda, m'entristeix el fet de tancar una etapa de la meua vida, de la qual especialment en valoro les persones que m'han acompanyat al llarg del complex camí de la recerca.

Sovint ens regim per protocols i, pel que fa als agraïments d'una tesi, el protocol estableix que el nom del director ha d'aparèixer en primer lloc. En el meu cas, però, donar-te les gràcies Enriqueta abans que a ningú més no representa un requeriment purament formal. Sense els teus consells i constant dedicació aquesta tesi no hauria esdevingut una realitat. Treballar amb tu ha estat a la vegada tan enriquidor com gratificant, però el que realment m'enorgulleix no és haver compartit el teu potencial científic sinó haver descobert la gran persona que ets.

Dels anys que he format part de la Facultat de Ciències sempre en guardaré un afecte especial i això és degut als companys i companyes de l'àrea de Química Analítica. Sembla contradictori però a vegades preferiria no endur-me un record tan positiu de vosaltres perquè així ara no us trobaria tant a faltar. Permeteu-me fer un esment especial a l'Eva, la Sònia, la Gemma i la Marta, amb les quals he compartit quelcom més que rialles i confidències. A tu Roser t'agraeixo sincerament l'haver-me proporcionat les bases per poder iniciar la meua recerca i m'alegro que el món del suro hagi fet que haguem reprès el contacte. És precisament la indústria del suro qui ha confiat amb la meua experiència i per aquest motiu voldria expressar per escrit el meu agraïment a l'empresa J. Vigas S.A.

Quisiera agradecer a los doctores Juan Cacho y Vicente Ferreira la oportunidad de repetir estancia en la Universidad de Zaragoza y así haber podido trabajar en el reconocido grupo que lideran. Des del primer momento todos los compañeros me arroparon tanto dentro del laboratorio como fuera de él, de tal forma que nunca olvidaré la generosidad desinteresada que todos me brindaron. Me siento muy afortunada de haberos conocido y sobre todo quisiera subrayar mi amistad con Eva; te deseo mucha

suerte con tu tesis y recuerda que la puertas de mi casa siempre (en especial en verano) estarán abiertas para ti.

A banda de les persones relacionades directament amb la feina, voldria agrair el suport de la família i els amics més pròxims. Sóc conscient que els mals moments no els he viscut sola sinó que tots vosaltres m'heu fet costat quan més ho he necessitat. En concret, Maria Rosa m'has demostrat que la teva amistat incondicional és un dels valors que més aprecio en la vida.

No voldria concloure aquesta tesi doctoral sense abans mencionar-te a tu, Joan. Durant aquests anys, junts hem compartit experiències inoblidables i experiències per oblidar; però amb tot m'he adonat que t'estimo i desitjo que aquest sentiment sigui el fonament del nostre projecte en comú.

De tot cor, gràcies a tothom.

*Sara*



