



MÉTODOS DE DETERMINACIÓN DE TCA (TRICLOROANISOLES)

TRABAJO FIN DE MÁSTER

Curso: 2022/2023

Alumna: MARÍA DE LA PAZ SÁNCHEZ APARICIO

Tutor: DANIEL SANCHO RINCÓN

Máster en Calidad, Desarrollo e Innovación de Alimentos

E.T.S. Ingenierías Agrarias, Campus de la Yutera (Palencia) Universidad de Valladolid

MÉTODOS DE DETERMINACIÓN DE TCA (TRICLOROANISOLES)

Master en Calidad, Desarrollo e Innovación de Alimentos

Resumen:

Uno de los principales defectos organolépticos más importantes en el vino, es el olor al corcho asociado principalmente a un aroma a moho que posee un umbral de detección extremadamente bajo. Este defecto es debido principalmente a la presencia de compuestos aromáticos que se encuentran en concentraciones del rango de ng/L. El compuesto principal asociado a este defecto es el 2,4,6-Tricloroanisol cuyo principal origen se haya en la O-metilación de triclorofenoles presentes en el corcho por parte de hongos filamentosos.

Para su determinación y cuantificación se han empleado diversos métodos analíticos, destacando principalmente la cromatografía de gases, ya que ha resultado muy eficaz en su determinación.

En este Trabajo de Fin de Máster se ha resumido los desarrollos analíticos más importantes en técnicas instrumentales de determinación del compuesto incluyendo técnicas de extracción tanto en matrices de vino como en matrices de corcho, constituyendo una de las etapas más importantes en el análisis de este compuesto.

Palabras clave: vino, métodos analíticos, 2,4,6- Tricloroanisol, corcho, TCA

Abstract:

One of the most important organoleptic defects in wine is the cork smell associated mainly with a musty aroma that has an extremely low detection threshold. This defect is mainly due to the presence of aromatic compounds that are found in concentrations in the ng/L range. The main compound associated with this defect is 2,4,6-Trichloroanisole, the main origin of which is the O-methylation of trichlorophenols present in cork by filamentous fungi.

For its determination and quantification, various analytical methods have been used, mainly gas chromatography, since it has been very effective in its determination.

This Master's Thesis has summarized the most important analytical developments in instrumental techniques for determining the compound, including extraction techniques in both wine matrices and cork matrices.

Keywords: wine, analytical methods, 2,4,6-trichloroanisole, cork, TCA

Indice

1.	Introducción	3
1.1.	Contexto y relevancia del estudio	3
1.1.1.	Corcho en la industria del vino.....	3
1.1.2.	Mal del corcho. Descripción de la problemática asociada a la presencia de 2,4,6-Tricloroanisol en vinos	4
1.2.	Descripción de 2,4,6-Tricloroanisol y fuentes de contaminación de 2,4,6-Tricloroanisol en la industria del vino	6
2.	Material y métodos	6
3.	Resultados y discusión	7
3.1.	Técnicas analíticas para la determinación de 2,4,6-TCA en vinos.....	8
3.1.1.	Cromatografía de gases.....	8
3.1.2.	Espectrometría de movilidad iónica.....	9
3.1.3.	Voltamperometría.....	10
3.1.4.	Narices electrónicas y Biosensores	10
3.1.5.	Detección sensorial	11
3.2.	Métodos oficiales de análisis de 2,4,6-Tricloroanisol	12
3.3.	Métodos de extracción en matriz de vino	14
3.4.	Metodos de análisis de 2,4,6-TCA en corchos. TCA liberable y TCA total.....	19
4.	Conclusiones.....	22
5.	Bibliografía	23

1. Introducción

1.1. Contexto y relevancia del estudio

La cultura del vino posee una gran importancia en la sociedad española actualmente. España posee el 15% de la superficie mundial de viñedos con más de un millón de explotaciones y 1,2 millones de hectáreas (Gómez-Limón Rodríguez, 2006).

Se define vino como un “alimento natural obtenido exclusivamente por fermentación alcohólica, total o parcial, de uva fresca, estrujada o no, o de mosto de uva” (BOE, 2003). El perfil del consumidor ha variado significativamente a lo largo de los años, ahora el consumidor valora más la calidad y desea conocer en profundidad la cultura que rodea al vino (Riera, 2014). El consumidor espera obtener un placer asociado a las diferentes sensaciones gustativas y olfativas producidas en su consumo de forma equilibrada y que no debe ser enturbiado por ninguna sensación desagradable (Ferreira González, 2007).

En base a lo anterior descrito en este Trabajo de Fin de Máster (TFM) se realizará una revisión bibliográfica de “Métodos de determinación de TCA (tricloroanisoles) en vinos”, el compuesto con mayor responsabilidad en el problema aromático asociado al corcho.

1.1.1. Corcho en la industria del vino

El tapón de corcho es sinónimo de buen vino y constituye la elección principal de más del 70% de productores de vinos en el mundo, con una producción anual de alrededor de 12 billones de botellas (Juanola et al., 2004).

Los tapones de corcho son un producto natural elaborado a partir de la cubierta suberosa (corteza) del alcornoque en particular de la especie *Quercus suber* L. cuyo componente principal es la suberina, un biopolímero aromático complejo estructuralmente relacionado con la lignina y muy resistente a la degradación (Álvarez-Rodríguez et al., 2002; Gil, 2009).

Los bosques de alcornocales, aparecen en el cuadrante suroccidental, en el levante y en el noroeste peninsular constituyendo en estas regiones una herramienta para el desarrollo socioeconómico de las zonas rurales y generador de bienes y servicios (CMAOT, 2017). Entre las características que distingue esta especie, el alcornoque posee la particularidad de regenerar de forma natural su corteza, el corcho, tras la saca o pela que se define como “la acción de separar el corcho del alcornoque en forma de tablas para su aprovechamiento” (Unión Europea, 2011). La saca se realiza en el periodo de junio a agosto siempre que las condiciones para ello sean óptimas. La

primera extracción se realiza a los 25-30 años de vida del alcornoque y el material obtenido se denomina barnizo, siendo este de baja calidad. El periodo entre saca y saca es de 9 años. En la segunda extracción el árbol tiene una vida de 30-40 años y se denomina corcho secundario. Y no es hasta la tercera extracción cuando se extrae corcho de calidad que es empleado para botellas de vino, denominándose amadia donde el alcornoque posee medio siglo de vida (Pires et al., 2007; Sánchez Sanz, 1982).

El embotellado aporta al vino un realce de aromas, sabores y materia colorante. Reduce la oxidación y favorece la maduración de los taninos. El tapón de corcho cumple los requisitos de capacidad de sellado, evitando que se produzcan fugas, la inercia hacia el contenido líquido en relación con sabor y durabilidad a lo largo del tiempo, así como cierta permeabilidad al aire que permite el intercambio de gases entre exterior e interior de la botella. Tratándose de este último, un aspecto altamente considerable en vinos de crianza que requieren dosis bajas pero constantes de oxígeno para un buen envejecimiento en botella (Mas et al., 2002; Pereira, 2007). Por ello, la botella se debe mantener de forma horizontal, lo que permite mantener el corcho húmedo e hinchado (Martínez Verdú, 2010). Además, se ha de destacar la combinación de ligereza, su elasticidad, alto poder calorífico, bajo contenido en agua, aislante térmico, reciclable y renovable, propiedades que hoy día le hace prácticamente irremplazables especialmente en vinos con larga crianza y alto valor añadido (Flor-Montalvo et al., 2021).

Sin embargo, a pesar de sus características, no se encuentra totalmente libre de problemas. El más importante asociado a ellos es un olor a Humedad conocido como olor a corcho que a menudo se atribuye a los compuestos químicos presentes en los tapones de corcho.

1.1.2. Mal del corcho. Descripción de la problemática asociada a la presencia de 2,4,6-Tricloroanisol en vinos

Los términos mal sabor y olor son términos similares relacionados con cualquier sabor que normalmente no se asocia con un alimento, y es frecuentemente causado por trazas de compuestos orgánicos volátiles (Prat et al., 2008; Ridgway et al., 2010). El aroma se encuentra entre los indicadores más importantes de las características sensoriales del vino (Liu et al., 2023).

El olor a corcho es uno de los principales defectos organolépticos del vino afectando a la calidad de los vinos, así como pérdidas económicas y de reputación en bodegas debido a la desconfianza del consumidor. La aparición del olor a corcho en vino embotellado es muy variable y según investigaciones ocasionalmente la proporción de

MÉTODOS DE DETERMINACIÓN DE TCA (TRICLOROANISOLES)

Master en Calidad, Desarrollo e Innovación de Alimentos

botellas afectadas es superior al 30% siendo entre el 0,5 y 2% de vinos embotellados afectados por este problema a nivel Europeo (Peña-Neira et al., 2000; Sefton & Simpson, 2005).

Esta problemática, se atribuye principalmente a los compuestos químicos presentes en tapones de corcho, sin embargo, también puede provenir de los barriles e incluso la propia atmósfera de la bodega (Juanola et al., 2004).

Se conoce que el principal compuesto asociado al olor a corcho en los vinos es el 2,4,6-Tricloroanisol (2,4,6-TCA), identificado por primera vez en 1982 (Buser et al., 1982). Esta molécula actuaría como elemento transmisor al vino desde el corcho (Cañas Guerrero et al., 2005). Además de 2,4,6-TCA existen varios compuestos relacionados con el defecto debido a que TCA es suficiente pero no necesario para generar olor a corcho en los vinos (Soleas et al., 2002), como son 2,4,6-tribromoanisol (2,4,6-TBA); 2,3,4,6-tetracloroanisol (2,3,4,6-TeCA) y pentacloroanisol, así como clorofenoles tal como son 2,4,6-triclorofenol (TCP), 2,3,4,6-tetraclorofenol (2,3,4,6-TCP) y pentaclorofenol (Peña-Neira et al., 2000).

2,4,6-TCA es una molécula de características organolépticas que pertenece a la familia de alteraciones mohosa-terrosa. Los descriptores que se emplean son: moho, hongo, humus, cartón mojado, bodega húmeda u olor a corcho rancio aportando un aroma y sabor desagradable (OIV, 2016).

No existen estudios toxicológicos que indiquen riesgo para los consumidores, sin embargo, estos analitos se caracterizan por poseer un umbral de percepción que se encuentra en el rango de 0,03-50 ng/L con umbrales de olfacción extremadamente bajos que depende del consumidor, tipo de vino, la ocasión y como es consumido, entre otros factores (Callejón et al., 2016; Cosme et al., 2021; Ferreira González, 2021).

Se produce rechazo por parte del consumidor con un vino que contenga 10 ng/L de TCA, mientras que los expertos, pueden detectar el efecto a partir de niveles de 5 ng/L e incluso en 2 ng/L cuando se compara con un vino de control no contaminado (Moreno-Arribas & Polo, 2009). El consumidor medio no suele atribuir la depreciación del producto al tapón de corcho y lo atribuye al vino (Cravero, 2020).

Se ha descubierto que 2,4,6-TCA no excita los receptores olfativos específicos para transducir malos olores en los cílios olfativos si no que suprime los canales activados por nucleótidos cíclicos en estas células sugiere una reducción de los olores endógenos, en lugar de una adición de olores exógenos (Takeuchi et al., 2013).

1.2. Descripción de 2,4,6-Tricloroanisol y fuentes de contaminación de 2,4,6-Tricloroanisol en la industria del vino

El 2,4,6-tricloroanisol (2,4,6-TCA) es un compuesto químico orgánico que pertenece a la familia de los anisoles clorados, se trata de un compuesto orgánico volátil (COV), derivados del anisol o metoxibenceno en cuya composición se sustituye 3 átomos de hidrógeno en posiciones 2,4 y 6 por átomos de cloro (Kumar et al., 2021).

Aunque el origen de la contaminación del vino por 2,4,6-TCA es diverso, frecuentemente se ha atribuido a los tapones de corcho su origen más probable (Pereira et al., 2000).

Los precursores del 2,4,6-Tricloroanisol, como son los halofenoles, pentaclorofenol o 2,4,6-Triclorofenol se han empleado durante años como componentes de biocidas a base de clorofenol que pueden propagarse y persistir durante décadas y acumularse en alcornos y suelo e incluso en la atmósfera de las bodegas (Tarasov et al., 2022).

Debido a que el corcho constituye un sustrato adecuado para microorganismo, los asociados principalmente a esta problemática son en su mayoría hongos filamentosos (Navascués, 2001). En esta línea, una de las vías de formación de cloroanisoles en este caso 2,4,6-TCA es la O-metilación de clorofenoles (2,4,6-TCP) por los microorganismos como parte de un proceso de desintoxicación (Álvarez-Rodríguez et al., 2002; Navascués, 2001).

Además, el corcho es un material con una estructura microporosa rica en lípidos que puede fijar fácilmente los contaminantes presentes en fase gaseosa en la atmósfera, por lo que tapones que podrían encontrarse sin contaminar pueden acabar contaminados si permanecen en lugares contaminados (Chatonnet et al., 1992)

Los clorofenoles son introducidos de forma directa e indirecta en bodegas a través de diferentes fuentes como son pallets de madera, cajas de cartón y materiales de embalaje que han sido previamente tratados con biocidas policlorofenólicos. En el tratamiento del corcho durante la producción de la corteza y su posterior elaboración de tapones donde se emplean compuestos clorofenólicos y en la limpieza de toneles de madera donde se emplea principalmente soluciones de hipoclorito (Martínez-Uruñuela, Rodríguez, et al., 2005).

2. Material y métodos

Se ha realizado una revisión bibliográfica en la que se han empleado las siguientes bases de datos documentales:

- Google académico (<https://scholar.google.es/>).

MÉTODOS DE DETERMINACIÓN DE TCA (TRICLOROANISOLES)

Master en Calidad, Desarrollo e Innovación de Alimentos

- Science Direct, de la editorial Elsevier (<https://www.sciencedirect.com>).
- Sistema de Información Científica Redalyc (<http://www.redalyc.org/home.oa>).

(Red de Revistas Científicas de América Latina y el Caribe, España y Portugal)

- Springer, de la editorial del mismo nombre (<https://www.springer.com/gp>).
- Pubchem

Como criterios de inclusión se han considerado:

1. Artículos publicados en los últimos 40 años.
2. Artículos que investiguen los diferentes métodos para la determinación de 2,4,6-Tricloroanisol.
3. Artículos redactados en inglés o español

Como criterio de búsqueda se han empleado las siguientes palabras claves:

- "2,4,6-tricloroanisol in wines" (2,4,6-tricloroanisol en vinos)
- "Cork taint in wines" (Defecto de corcho en vinos)
- "2,4,6-trichloroanisole analysis" (Análisis de 2,4,6-tricloroanisol)
- "Wine contamination by TCA" (Contaminación de vinos por TCA)

3. Resultados y discusión

La necesidad de obtener un producto de calidad ha impulsado que la industria alimentaria busque la forma de determinar sustancias tanto de forma cualitativa como cuantitativa. La presencia de 2,4,6-TCA en vinos es un parámetro de interés que afecta a las características sensoriales del producto por lo que ha llevado al desarrollo de diversas técnicas y enfoques analíticos (Callejón et al., 2016; Fontana, 2012; Tarasov et al., 2017).

A continuación se presenta las diferentes técnicas analíticas para la determinación de este compuesto que se ha identificado en las numerosas publicaciones científicas en las que se ha acotado la búsqueda. Seguido de ello, se entrará en profundidad a las diferentes técnicas de extracción del analito en diferentes matrices.

3.1. Técnicas analíticas para la determinación de 2,4,6-TCA en vinos

El nivel de concentración al que se realiza el análisis de compuestos aromáticos y el nivel de dificultad está relacionado con la polaridad y con la calidad de su espectro de masas. En este sentido el 2,4,6-TCA no es un análisis muy complicado puesto que se trata de una molécula no polar, fácilmente extraíble y volátil y además posee un espectro de masas con abundantes iones de alta masa (Moreno-Arribas & Carmen, 2009).

Sin embargo, las metodologías analíticas para la determinación de este compuesto requieren técnicas altamente selectivas, sensibles y sencillas para una identificación inequívoca y cuantificación a nivel de trazas (Callejón et al., 2016; Fontana, 2012; Tarasov et al., 2017).

Se han descrito varios métodos de determinación de 2,4,6-TCA en vinos, entre los que se encuentran la cromatografía de gases (CG), la espectrometría de movilidad iónica (IMS) o técnicas inmunoanalíticas como ensayos inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA).

Además, en términos de métodos cualitativos, la detección sensorial juega un papel fundamental. Se pueden emplear catadores entrenados para evaluar muestras de vino en busca de los olores y sabores característicos del TCA de forma rápida. Esta aproximación es subjetiva, pero sigue siendo esencial en la industria del vino para detectar y eliminar lotes contaminados que podrían afectar negativamente la reputación de la marca.

3.1.1. Cromatografía de gases

El análisis cromatográfico es un método que utiliza las pequeñas diferencias en la solubilidad, resolución, adsorción y desorción de cada componente de la muestra entre la fase estacionaria y la fase móvil para realizar la separación de cada componente y luego analizarlos uno por uno mediante el empleo de un detector (Wang et al., 2021).

En la cromatografía de gases, la muestra se volatiliza, se inyecta en la cabeza de una columna cromatográfica y los analitos se eluyen por el flujo de una fase móvil de a través de la columna (Yagües, 2008).

La cromatografía de gases (GC) es ampliamente empleada para determinar haloanisoles en vinos y tapones de corcho, en comparación con la cromatografía líquida, tiene mayor sensibilidad y poder de resolución (Hayasaka et al., 2005).

MÉTODOS DE DETERMINACIÓN DE TCA (TRICLOROANISOLES)

Master en Calidad, Desarrollo e Innovación de Alimentos

Teniendo en cuenta las propiedades fisicoquímicas de este compuesto semivolátil y la baja concentración a la que se suele encontrar, es necesario realizar un previo paso de derivatización de la muestra para mejorar la sensibilidad y reducir la cola de picos (Martínez-Uruñuela, Rodríguez, et al., 2005; Patil et al., 2011). Para ello, lo más empleado es la microextracción en fase sólida (SPME). El límite de detección (LOD) para este analito mediante estos métodos, normalmente se encuentra en el rango de 1 a 100 ng/L (Karpas et al., 2012).

También se consideran procesos como concentración de extractos y procedimiento de limpieza, este último no es obligatorio pero se recomienda para eliminar compuestos que pueden coeluir con haloanisoles y afectar su cuantificación (Hayasaka et al., 2005; Tarasov et al., 2017). A pesar de ser el método de referencia empleada, está muy lejos de las posibilidades económicas tanto de productores de corcho como de bodegas a la hora de poder realizar análisis rutinarios (Peres et al., 2013).

La CG con detector de captura de electrones (EDC) o espectrometría de masas (MS) son los métodos más usados. EDC se considera altamente selectivo para analitos con halógenos (Fontana, 2012; Tarasov et al., 2017). Sin embargo, la espectrometría de masas posee una mayor selectividad y sensibilidad consiguiendo límites de detección más bajos.

Para determinar estos compuestos, mediante cromatografía de gases, se han empleado diferentes columnas analíticas, normalmente se trata de columnas no polares. Sin embargo se ha empleado columnas polares para la detección de este analito en agua, obteniéndose una mejor separación (Chen et al., 2013).

La GC-MS, posee estrechos valores de tiempo de retención lo que puede llevar a una coelución de diferentes analitos. También se ha informado del empleo de GC-HRMS, con alta selectividad mostrando una sensibilidad similar a MS/MS, pero posee la desventaja de tener un precio superior.

3.1.2. Espectrometría de movilidad iónica

La espectrometría de movilidad iónica (IMS) es una técnica que caracteriza moléculas según su movilidad en fase gaseosa. Esta técnica ofrece sensibilidad, simplicidad instrumental, bajo costo y monitoreo en tiempo real. El proceso comienza vaporizando la muestra a analizar y luego ionizando el analito presente. Los iones generados se desplazan a través de un tubo mediante un gradiente de campo eléctrico, donde chocan con una corriente de gas inerte que fluye en dirección opuesta. Estas colisiones entre iones y moléculas gaseosas separan selectivamente los iones con tamaños y formas

similares, lo que hace que lleguen al extremo del tubo en diferentes momentos. La información temporal se utiliza para calcular la movilidad de los iones, una característica única de cada compuesto, lo que permite la identificación del analito (Ewing, 2006; Karpas, 2013). Esta técnica requiere un enriquecimiento y separación previa así como un dispositivo analítico que mida la señal, destacando la interferencia del etanol que se encuentra en vino (Karpas et al., 2012).

El uso de la movilidad iónica cuando se trabaja bajo el modo de ionización negativa confiere una selectividad adecuada con límites de detección de 0,2 ng/L y de cuantificación de 0,66 ng/L, además es destacable que la IMS es una técnica analítica económica, simple, portátil y que permite respuestas rápidas al obtener espectros en el rango de milisegundos (Márquez-Sillero, Aguilera-Herrador, et al., 2011).

3.1.3. Voltamperometría

Se ha referenciado también la aplicación de voltamperometría cíclica para la determinación de este compuesto en la cual se produce la reducción electroquímica mediante el empleo de un dispositivo potenciostato-galvanostato (Freitas et al., 2012; Peres et al., 2013). Se trata de un desarrollo simple, eficiente y menos costoso.

En una primera aproximación Freitas et al., (2012) obtuvieron límites de detección y cuantificación de 0,08 y 0,26 ppm respectivamente, sin embargo, establecieron que era una opción viable pero era necesario reducir esos límites, optimizar la composición de solvente, empleando acetonitrilo principalmente por la poca solubilidad del analito y posibilidad de modificar los electrodos empleados (Freitas et al., 2012). En un segundo estudio, Peres et al., (2013) emplearon electrodo de trabajo de plata, contraelectrodo de platino y un electrodo de referencia de doble unión Ag/AgCl y obtuvieron límites de detección de 0,31 ng/L y 0,95 ng/L. Sin embargo esta técnica no se aplicó directamente a muestras de vinos si no que se aplicó a muestras acuosas procedentes del tratamiento de planchas de corcho (Peres et al., 2013).

3.1.4. Narices electrónicas y Biosensores

Las técnicas de inmunoensayo pueden ofrecer un enfoque sencillo, práctico y rentable para detectar 2,4,6-TCA en etapas tempranas de su formación. Esto es aplicable tanto en la industria del vino como en otros alimentos (Moore et al., 2003).

Un biosensor es desechable, barato de producir y puede utilizarse como herramienta de detección. Estas son quizás las mayores ventajas del sensor en comparación con los métodos ya establecidos para la detección de TCA (Moore et al., 2003).

MÉTODOS DE DETERMINACIÓN DE TCA (TRICLOROANISOLES)

Master en Calidad, Desarrollo e Innovación de Alimentos

Moore et al., (2003) desarrollaron un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) para la detección de 2,4,6-TCA en muestras de corcho, el extracto de corcho se obtuvo mediante extracción con disolvente orgánico. El conjugado enzimático empleado fue de fosfatasa alcalina (A-AP) purificado con proteína G, se utilizaron electrodos serigrafiados de carbono obteniéndose un límite de detección de 29 ppt. Sin embargo, la matriz vino inhibe el análisis tanto para la parte ELISA como para el electroquímico, lo que implica la extracción de TCA del vino y cambiarlo a otra matriz (Moore et al., 2003).

Usando sensores de película delgada, se puede discriminar varios compuestos aromáticos incluso en presencia de una fuerte interferencia de etanol, siempre que los sensores operen en la región saturada de la curva de respuesta del etanol. Mediante redes neuronales de base radial, se logra una alta tasa de éxito en la clasificación de ácido acético, acetato de etilo, acetaldehído, 2,4,6-tricloroanisol y dióxido de azufre en etanol, así como en vino, alcanzando un 95% y 97% de éxito respectivamente (Santos et al., 2004). Los inmunosensores de desplazamiento electroquímico fueron propuestos por Duarte et al. (2008) para la detección de 2,4,6-TCA en muestras de tapón con límites de detección altos 200 µg/L (Duarte et al., 2009) y más recientemente, Varelas et al. (2011) propusieron un biosensor celular rápido (3-5 min) y de bajo costo para monitorear concentraciones bajas de 2,4,6-TCA (1-12 ng/L), que se probó para analizar preparaciones de 2,4,6-TCA en vino blanco y para 2,4,6-TCA extraído de remojos de corcho en vino blanco, obteniendo resultados satisfactorios (Varelas et al., 2011).

Estos métodos no dan valores precisos en un rango de concentraciones pero sí que pueden tratarse de una alternativa eficiente a los anteriores métodos propuestos para un monitoreo in situ o un cribado de muestras de corcho.

3.1.5. Detección sensorial

Los compuestos responsables del olor a humedad no son sólo los anisoles o fenoles halogenados, sino que se requieren métodos que permitan la determinación simultánea de un mayor número de estos compuestos con límites de cuantificación adecuados (Fontana, 2012). En la industria enológica se suele emplear panelistas capacitados para evaluar las características sensoriales y para evaluar los valores umbral de TCA, como se ha comentado anteriormente se puede esperar que los valores obtenidos utilizando dichos paneles representen umbrales mucho más bajos que el punto en el que la mayoría de los consumidores de vino detectarán el TCA (Prescott et al., 2005).

Macku et al., (2009) realizaron un estudio sensorial. Los corchos, previamente lavados con peróxido, fueron evaluados por panelistas expertos en 12 sesiones individuales

MÉTODOS DE DETERMINACIÓN DE TCA (TRICLOROANISOLES)

Master en Calidad, Desarrollo e Innovación de Alimentos

durante 2 meses junto a una solución estándar de 2,4,6-TCA. Las impresiones se recogieron *ad libitum*. Los catadores establecieron cuatro impresiones de cada corcho destacando que el olor típico a TCA fue el único que no se describe como efecto de una sustancia química y olor a humedad. Se destaca que el reconocimiento de TCA mejora cuando la concentración aumenta y se descubrió que el análisis sensorial mediante pruebas de remojo en seco era un método eficaz para identificar y segregar corchos de contaminados, tratándose de un método adecuado como protocolo de control de calidad ya que es una herramienta de cribado rápido y no destructiva en la que se puede determinar la incidencia preferiblemente por lotes (Macku et al., 2009).

Cravero et al., (2015) tras la selección de un panel con evaluadores que reconocían el olor a 2,4,6-TCA establecieron que los umbrales medios de identificación de este panel fueron 4,6 ng/L en agua, 6,7 ng/L en vino blanco seco y 7,1 ng/L en vino tinto seco y tras la capacitación por debajo de 3 ng/L el 50% de evaluadores lo reconocieron en identificación dúo-trío. A los panelistas les resultó más complicado detectarlo en vinos tintos envejecidos en madera (Cravero et al., 2015). En un estudio previo se estableció que la detección, era más complicada en vinos que en muestras de agua, lo que está relacionada con la complejidad de la matriz (Teixeira, 2006).

Por lo que se puede destacar que el análisis sensorial, puede ser un método rápido de cribado de muestras siempre que los catadores estén entrenados, partiendo de la base que en función de la matriz la percepción puede variar.

3.2. Métodos oficiales de análisis de 2,4,6-Tricloroanisol

En 1962 se publicaron por primera vez los métodos internacionales de análisis de vinos y mostos por parte de la OIV (Organización Internacional del Vino y la Viña). En 2008 obtuvieron el reconocimiento por parte de la Unión Europea al señalar en el reglamento (CE) nº 479/2008, que los métodos de análisis para establecer la composición de los productos cubiertos por dicho reglamento y las normas para verificar si dichos productos han sido sometidos a procesos que violan las prácticas enológicas autorizadas, son los recomendados y publicados por la OIV en su compendio (Consejo de la Unión Europea, 2008).

Las normas, incluyen toda la reglamentación de la OIV, consistente primordialmente en las resoluciones de la Organización, que son textos oficiales aprobados por consenso por la Asamblea General de los Estados miembros. Además, en esta sección se puede acceder a todas las publicaciones codificadas, que incluyen temas como etiquetado, definiciones, prácticas enológicas y métodos de análisis. Dentro de las normas, se

MÉTODOS DE DETERMINACIÓN DE TCA (TRICLOROANISOLES) Master en Calidad, Desarrollo e Innovación de Alimentos

encuentra que para la determinación de 2,4,6-Tricloroanisol se pueden diferenciar 2 métodos que se consideran factibles para su determinación, ambos métodos son tipo IV, es decir analíticos.

En primer lugar, se encuentra la **determinación del 2,4,6-tricloroanisol liberable en vino Tipo IV**. (OIV-MA-AS315-16, 2018)

Este método mide la cantidad de TCA liberada (TCA liberable) por una muestra de tapones de corcho, es decir, su matriz es el corcho y no el vino. Este corcho se macera en una solución hidroalcohólica hasta la obtención de un equilibrio a temperatura ambiente durante un día. Presenta como objetivo la evaluación del riesgo de liberación de este analito por un lote de corcho lo que implica que aplicando esta metodología proporciona un método para controlar la calidad de los tapones. Emplea la técnica de microextracción en fase sólida (SPME) para su posterior determinación mediante Cromatografía de gases con detección mediante espectrómetro de masas o captura de electrones. Tras la maceración, este método permite la adición de cloruro de sodio para aumentar la sensibilidad del método por un posible efecto matriz. Seguido de ello una agitación con calentamiento a 35°C para su extracción en el espacio de cabeza mediante SPME. La fibra de SPME se desorbe a 260°C en el inyector de la columna cromatográfica en modo splitness. La separación se lleva a cabo mediante una columna capilar con una fase estacionaria no polar.

Además, se encuentra regida la **determinación de la presencia y contenido de policlorofenoles y policloroanisoles en vinos, tapones de corcho, madera y bentonitas utilizadas como trampas atmosféricas** (OIV/OENO 374/2009) también de tipo IV (International Organisation of Vine and Wine, 2021).

Este método, además de su análisis en muestras de corcho, se aplica también a muestras de vino, propone la determinación de 2,4,6-tricloroanisol, 2,4,6-triclorofenol, 2,3,4,6- tetracloroanisol, 2,3,4,6-tetraclorofenol, pentacloroanisol y pentaclorofenol mediante cromatografía de gases, inyectando un extracto en hexano del vino y un extracto éter/hexano de las muestras sólidas a analizar y análisis interno.

Respecto a la determinación sensorial, se encuentra dentro de la sección de Documentos técnicos, este incluye los documentos de experiencia colectiva desarrollados por los grupos de expertos de la OIV, como también las ponencias de los Congresos Mundiales de la Viña y el Vino y otros documentos técnicos. Establece la selección y formación de un panel de cata para la evaluación de una característica visual, olfativa y/o alteración del sabor incluyéndose entre ellos el 2,4,6-TCA (OIV International, 2015)

3.3. Métodos de extracción en matriz de vino

La tendencia se dirige a la simplificación, miniaturización y automatización empleando además procedimientos libres de disolventes y respetuosos con el medio ambiente (Asensio-Ramos et al., 2011). Se destaca la importancia de realización de esfuerzos para obtener técnicas de extracción o preconcentración del analito debido a que 2,4,6-TCA posee una alta volatilidad y su baja concentración en diferentes matrices siendo este último por lo que es necesario contar con técnicas de preconcentración eficientes (Fontana, 2012).

Métodos clásicos como extracción Soxhlet, destilación, extracción con solventes, emplean solventes peligrosos, consumen mucho tiempo y son propensos a pérdidas de analitos (Vlachos et al., 2007). Por lo que en este apartado no se entrará a discutir estos métodos ya que están perdiendo el interés.

Existen varios criterios para evaluar la eficacia de las técnicas de extracción. Destaca, el factor de enriquecimiento debido a su papel en la determinación de la sensibilidad del análisis, recuperación de analitos de matrices complejas en este caso vino, procedimiento de limpieza, posibilidad de operar en modo headspace y que evite el contacto de la fase de extracción con matriz propuesta, volumen de muestra requerido, cantidad de solventes orgánicos, solidez de resultados, costo y tiempo, etc., (Karimpour Zahraei et al., 2021).

Se clasificarán las técnicas de extracción según el medio de extracción, en microextracción en fase sólida y microextracción en fase líquida.

La microextracción en fase sólida (SPME) el analito se extrae mediante partición entre fase orgánica en una fibra que se encuentra recubierta con sílice fundida y la muestra matriz. Esta técnica sin solventes requiere muestras pequeñas, reduciendo el tiempo y los costos asociados con la preparación y eliminación de solventes. SPME se integra con diversas técnicas analíticas como cromatografía de gases (GC), cromatografía de gases-espectrometría de masas (GC-MS) principalmente en el análisis de 2,4,6-TCA (Mottaleb et al., 2019).

Los principales parámetros que afectan el proceso SPME son tiempo de desorción, fuerza iónica, tipo de fibra, tiempo y temperatura de extracción, volumen de muestra y agitación (Martínez-Uruñuela et al., 2004).

MÉTODOS DE DETERMINACIÓN DE TCA (TRICLOROANISOLES)

Master en Calidad, Desarrollo e Innovación de Alimentos

Evans et al. (1997), desarrollaron y evaluaron un método rápido para la determinación de 2,4,6-TCA en muestras de vino mediante SPME y empleando un cromatógrafo de gases con columna capilar de sílice fundida con dimetilpolisiloxano (PDMS). Establecieron que debido a la volatilidad de 2,4,6-TCA es necesario un método de muestreo de espacio de cabeza a temperatura controlada reduce la posibilidad de contaminación por adsorción de componentes no volátiles de la matriz siendo la fibra de PDMS la que mejor resultados obtuvo (Evans et al., 1997). Método similar se aplicó para detectar en niveles a subumbral olfativo determinando que la adsorción en el espacio de cabeza da un rendimiento mayor que en el interior del vino debido a que adsorción de 2,4,6-TCA de un líquido sigue una cinética de primer orden, mientras que la adsorción desde el espacio de cabeza está regida por una cinética de segundo orden, donde la volatilización es el paso limitante de la velocidad (Fischer & Fischer, 1997).

Se validó el método por parte de Riu et al, (2002), mediante HS-SPME y CG-ECD probando varias fibras siendo las que mejor resultado obtuvieron PDMS y DVB-CAR-PDMS, este último presentó mayor sensibilidad que PDMS, pero la repetibilidad era mejor con la fase estacionaria de PDMS. Establecieron que la temperatura de extracción tenía un efecto negativo en el área del pico. También observaron la influencia de la temperatura en la extracción y la necesidad de calibración específica para diferentes tipos de vino. Obtuvieron un límite de detección de 1 ng/l tanto para vino blanco como para tinto y los límites de cuantificación son de 5 y 8 ng/l, respectivamente (Riu et al., 2002).

Martinez-Uruñuela et al., (2004) optimizaron la extracción directa de cloroansoles utilizando HS-SPME y presentaron un método basado en parámetros específicos. Además, introdujeron la técnica de microextracción múltiple en fase sólida (MHS-SPME) como alternativa para evitar el efecto matriz en el análisis de acetil-clorofenoles y cloroansoles en muestras de vino (Martínez-Uruñuela et al., 2004). MHS-SPME es una técnica basada en realizar varias extracciones consecutivas de un mismo vial hasta eliminar todos los analitos de la muestra. Permite la recuperación completa de los compuestos objetivos y, por tanto, el efecto matriz, que suele aparecer en los análisis basados en SPME. MHS-SPME es una modificación del HS-SPME habitual. El principio del procedimiento MHS-SPME se basa en una extracción gradual a intervalos de tiempo iguales. Si se lleva a cabo hasta una extracción exhaustiva, las distintas áreas de los picos de un determinado compuesto deben sumarse para lograr un área total que corresponda a la cantidad total de ese compuesto en el vial de muestra y que, por lo tanto, sea independiente de su distribución entre los tres. Según este estudio, la

MÉTODOS DE DETERMINACIÓN DE TCA (TRICLOROANISOLES)

Master en Calidad, Desarrollo e Innovación de Alimentos

influencia de la matriz de la muestra sobre el equilibrio de fases se elimina por completo (Martínez-Uruñuela, González-Sáiz, et al., 2005).

Jönsson et al., (2006) optimizó HS-SPME-CG-HRMS, empleando fibra PDMS durante 30 minutos de 3 ml de muestra saturada con cloruro de sodio y un tiempo de desorción de 5 minutos. Los límites de cuantificación tanto para TCA como para TBA se mejoraron a 30 pg/L y se consideró que SPME en combinación con GC-HRMS era confiable y rápido para la determinación de TCA y TBA en niveles extremadamente bajos en el vino (Jönsson et al., 2006).

Pizarro et al., (2007) optimizaron y validaron un HS-SPME combinado con un método de derivatización en fibra de PA para la determinación de haloanisoles y halofenoles en vino. Para este propósito, primero se extrajeron los analitos de la muestra usando una fibra SPME y luego los compuestos se derivatizaron exponiendo la fibra al espacio de cabeza del vial que contenía el reactivo de derivatización, N-metil-N-trimetilsililtrifluoroacetamida (Pizarro et al., 2007a). Este mismo autor desarrollo una microextracción en fase sólida con múltiples espacios de cabeza que permitía determinar de forma simultánea haloanisoles y halofenoles en vinos, para evitar la interferencia de la matriz procedente de muestras de vino. Dado que el método de adición estándar requiere mucho tiempo y se debe realizar una nueva regresión de calibración para cada muestra, lo que aumenta significativamente el esfuerzo experimental, MHS-SPME podría ser una alternativa al método de adición estándar para evitar el efecto matriz (Pizarro et al., 2007b).

Campillo et al, (2008) desarrolló un método de microextracción en fase sólida en espacio de cabeza (HS-SPME) para la determinación de 12 haloanisoles en muestras de vinos y bebidas espirituosas mediante cromatografía de gases con detección de emisiones atómicas (GC-AED) para ello emplearon una fibra de dinilbenceno/carboxeno/PDMS (Campillo et al., 2008).

Se desarrolló un método de determinación mediante el uso de HSSPME asistido por vacío (Vac-HSSPME) para acelerar la cinética de extracción mientras se toma el muestreo a temperatura ambiente. Vac-HSSPME durante 30 minutos a temperatura ambiente a 25 °C arrojó límites de detección más bajos (0,13 a 0,19 ng/L) que los obtenidos con muestreo HS-SPME y demostró ser un método rápido, sensible y a temperatura ambiente que podría usarse para la determinación de haloanisoles en muestras de vino. Se eliminó la necesidad de calentar la muestra a temperaturas elevadas como se ve en el procedimiento HS-SPME optimizado (Vakinti et al., 2019)

MÉTODOS DE DETERMINACIÓN DE TCA (TRICLOROANISOLES)

Master en Calidad, Desarrollo e Innovación de Alimentos

La extracción líquido-líquido (LLE) es el procedimiento más empleado en general en la industria alimentaria, se puede realizar en laboratorio general y con solventes económicos (Karimpour Zahraei et al., 2021). En el caso de la estimación 2,4,6-TCA fue empleada en la identificación de este compuesto y en diversos estudios posteriores (Buser et al., 1982; Chatonnet et al., 2004; Peña-Neira et al., 2000)

La microextracción en fase líquida (LPME) es una metodología desarrollada miniaturizando la extracción líquido-líquido reduciendo en gran medida el volumen de disolvente en unos pocos microlitros, su ventaja frente los procedimientos de extracción convencionales radica en simplicidad, eficacia, rapidez y bajo consumo de disolventes orgánicos (Asensio-Ramos et al., 2011). Para los compuestos que contaminan el corcho, hay algunas aplicaciones novedosas que exploran las ventajas de LPME:

La microextracción líquido-líquido dispersivo (DLLME), se propone como un procedimiento económico, simple y rápido basado en una mezcla de solventes (Rezaee et al., 2006). La elección del solvente de extracción es crucial, este debe mostrar baja solubilidad en agua, alta afinidad por analitos y buen comportamiento cromatográfico, mientras que la densidad debe ser mayor que la del agua (Campillo et al., 2010). La mezcla ternaria de un disolvente orgánico no polar e inmiscible en agua (disolvente de extracción) y un disolvente polar miscible en agua (disolvente de dispersión) se inyectan en una muestra acuosa. Debido a ello, se producen gotitas muy finas en la muestra acuosa y la extracción es casi instantánea. Después de un breve tiempo de contacto, la fase dispersa se separa por centrifugación y posteriormente se pueden determinar los analitos extraídos. Esta extracción proporciona altos factores de enriquecimiento en muy poco tiempo con poco consumo de solvente y también es compatible con las separaciones de GC (Collins et al., 2012; Fontana, 2012).

Pizarro et al, (2011) optimizaron un método de DLLME junto a cromatografía de gases-espectrometría de masas en tándem (GC-MS/MS) (Pizarro et al., 2011). Se evaluaron diferentes disolventes dispersores y disolventes de extracción, siendo la combinación de acetona-cloroformo aquella que presentó factores de enriquecimiento más altos y siendo la temperatura ambiente la temperatura de trabajo, previamente estudiaron la derivatización en matriz de vino empleando anhídrido acético como reactivo de derivatización (Pizarro et al., 2010). Ambos obtuvieron un LOD de 2,2 a 12 ng/L. Campillo et al. (2010) también propusieron una técnica similar con un límite de detección de 9- 9,5 ng/L (Campillo et al., 2010).

En los últimos años la microextracción de líquido iónico de gota simple (SDME) ha ganado ventaja en química analítica de alimentos debido a ventajas como simplicidad,

MÉTODOS DE DETERMINACIÓN DE TCA (TRICLOROANISOLES)

Master en Calidad, Desarrollo e Innovación de Alimentos

bajo coste, extracción rápida, volúmenes mínimos de disolvente y muestra, y facilidad de integración con técnicas analíticas como la espectroscopia, cromatografía y espectrometría de masas (Tang et al., 2018).

Los analitos se aíslan de la muestra mediante optimización de condiciones como temperatura, pH, disolvente, tiempo y velocidad de agitación (Kailasa et al., 2021). Esta técnica implica el aislamiento del analito de la solución de muestra a la fase de extracción, la transferencia de masa de analito a nivel de trazas va desde la fase acuosa a una sola gota de solvente orgánico hasta que se alcanza el equilibrio termodinámico de forma lenta por lo que una pequeña concentración del analito es extraído para el análisis. Se desarrolló el método analítico para la determinación de 2,4,6-TCA empleando como disolvente de extracción 1-octanol con un tiempo de extracción de 25 minutos y un límite de detección de 8,1 ng/L (Martendal et al., 2007). La microextracción de líquido iónico de gota única (SDME) fue reportado también por Márquez-Sillero et al., (2011), permite realizar el análisis de muestras sin ningún tratamiento adicional únicamente mediante la selectividad que aporta el líquido iónico extractante, 1-hexil-3-metilimidazolio bis(trifluorometilsulfonil)-imida acoplada con columna multicapilar (MCC) que evita la interferencia del etanol y espectrometría de movilidad iónica (IMS) obteniendo un límite de detección de 0,01 ng/L (Márquez-Sillero, Cárdenas, et al., 2011).

En el caso de DLLME a pesar de sus ventajas, el uso de disolventes dispersores puede disminuir el coeficiente de reparto de los analitos en el disolvente de extracción, por lo que se desarrolla la microextracción por emulsificación asistida por ultrasonidos (USAEME). Esta emplea un solvente no polar de alta densidad tratándose del solvente extractante que forma una emulsión de aceite en agua en una muestra asistida por ondas de ultrasonido, el ultrasonido facilita el fenómeno de emulsificación reduciendo el tamaño de gotas de la fase extractante, reduciendo el tamaño de gotas conduce a un aumento de la superficie de contacto entre ambos líquidos mejorando la transferencia de analito entre ambas fases (Luquedecastro & priegocapote, 2007; Regueiro et al., 2008).

Se demostró que la técnica podría aplicarse para la extracción y preconcentración de compuestos olorosos en aguas con un LOD de 0,2 ng/L (Fontana & Altamirano, 2010). Este mismo autor, propuso esta técnica en vinos previo a un análisis espectrométrico de masas combinada con cromatografía de gases (GC/MS/MS) con un LOD de 0,6-0,7 ng/L. La validación de la metodología se llevó a cabo mediante el método de adición estándar a dos concentraciones (10 y 50 ng/L) logrando recuperaciones por encima de 80% indicando robustez satisfactoria del método (Fontana et al., 2010).

Otra técnica es la extracción por sorción con barra de agitación (SBSE) es una técnica de extracción en fase sólida que utiliza una barra magnética revestida con un material sorbente para extraer compuestos volátiles y semivolátiles de muestras líquidas. La extracción por sorción con barra de agitación es beneficiosa porque permite la extracción eficiente de compuestos volátiles y semivolátiles con alta sensibilidad. Además, reduce la necesidad de grandes volúmenes de disolventes y minimiza la matriz de la muestra en el proceso de análisis. Sin embargo, la elección del material sorbente, las condiciones de agitación y desorción, y la preparación de la muestra son aspectos importantes a considerar para obtener resultados precisos y reproducibles.

SBSE mostró una mayor capacidad de concentración que ambas técnicas SPME, la extracción por absorción con barra agitadora, SBSE, acoplada a GC con modo de espectrometría de masas-trampa de iones en tándem para el análisis de halofenoles y haloanisoles mostró una mejor sensibilidad que la SPME (especialmente si se compara con el modo de espacio de cabeza. Los métodos SBSE e IS-SPME que describieron, permitió determinar dichos compuestos en matrices acuosas líquidas a niveles de ng/l (Maggi et al., 2008).

Zalacain et al., (2004) emplearon una barra agitadora magnética con un recubrimiento de PDMS, esta se desorbió en un sistema de desorción térmica acoplado a un cromatógrafo de gases. La barra agitadora requiere un menor tiempo de análisis y, lo que es más importante, la manipulación de la muestra se reduce considerablemente en comparación con otras técnicas extractivas. Obteniendo un límite de cuantificación de 1,08 pg/L. Entre todos los compuestos de la matriz del vino, se cree que parámetros como el etanol y los polifenoles pueden tener cierta influencia en los resultados de la cuantificación. Sin ser necesario un paso de preconcentración y con un tiempo de análisis muy reducido (Zalacain et al., 2004)

3.4. Métodos de análisis de 2,4,6-TCA en corchos. TCA liberable y TCA total

El sector del vino es uno de los más exigentes en materia de calidad. En bodega pueden utilizarse técnicas y criterios de detección como control de calidad. El vino no presenta un alto poder de extracción de haloanisoles mientras que el corcho adhiere estos compuestos con bastante fuerza (Capone et al., 1999).

El análisis de haloanisoles en material de corcho es un proceso más complicado que en el vino debido al efecto de matriz y a la necesidad añadida de aplicar técnica de preparación de muestras que generalmente requiere de un remojo del corcho, adición

MÉTODOS DE DETERMINACIÓN DE TCA (TRICLOROANISOLES)

Master en Calidad, Desarrollo e Innovación de Alimentos

de extractantes y concentración del extracto (Tarasov et al., 2017). En el caso del corcho se trata de una técnica destructiva.

El TCA liberable de un tapón de corcho se define como el valor de equilibrio de 2,4,6-TCA medido en el vino, tras la aplicación de la extracción líquido-sólido. Es función del contenido de 2,4,6-TCA en el tapón y de las características específicas del vino, de forma general se determina que el TCA liberable es constante para un tipo de corcho sin embargo, cuanto mayor sea el contenido en alcohol mayor cantidad de TCA se libera (Hervé et al., 2004). Según Macku et al., (2009) es preferible su determinación en planchas de corcho debido a que en la conservación de botellas de vino se altera la superficie del corcho (Macku et al., 2009). Lim et al., (2011) realizó el análisis de TCA tras el embotellado mediante una válvula de vacío y fibra de SPME en el cuello de la botella, para la determinación de la cantidad de TCA liberable, tratándose de un método cualitativo y no destructivo para identificar corchos contaminados (Lim et al., 2011).

El TCA total es el que se extrae de la matriz del corcho molido y tras el empleo de disolventes orgánicos (Hervé et al., 2004).

Se emplea técnicas clásicas como extracción Soxhlet siendo esta la más empleada. Que implica de molienda y extracción de analito cuya eficacia del poder de extracción, condiciones de extracción y superficie de contacto (Peña-Neira et al., 2000; Pollnitz et al., 1996; Tarasov et al., 2017). Juanola et al., (2002) evaluaron diferentes métodos de extracción como la extracción Soxhlet y la extracción por Ultrasonidos de 2,4,6-Tricloroanisol en corchos y su posterior determinación por CG-ECD. Concluyendo que peor efectividad presentaba, la de ultrasonidos (Juanola et al., 2002).

Se desarrolló un método de extracción con fluidos supercríticos (SFE) para 2,4,6-TCA en tapones de corcho con dióxido de carbono a alta presión. SFE es una técnica de separación y extracción que utiliza un fluido en su estado supercrítico como agente de extracción. Un fluido supercrítico se encuentra en un estado intermedio entre un líquido y un gas, exhibiendo propiedades únicas que lo hacen eficaz para la extracción de compuestos de muestras sólidas o líquidas. El método fue validado utilizando el isótopo estable $^2\text{H}_5$ -TCA como estándar interno. El procedimiento SFE ofrece un método rápido, cuantitativo, casi libre de disolventes y automatizado para la extracción de TCA a partir de corcho (Taylor et al., 2000).

SPME y SBSE son los más rápidos, fáciles de realizar y se realizan a temperatura ambiente. En su aplicación a corchos implica la maceración de corcho en solución hidroalcohólica de 300 ml durante 24h o vino blanco junto a un proceso de acetilación para convertir clorofenoles en compuestos más adecuados con n-hexano (Insa et al.,

MÉTODOS DE DETERMINACIÓN DE TCA (TRICLOROANISOLES)

Master en Calidad, Desarrollo e Innovación de Alimentos

2004). El empleo de HS-SPME tras la obtención de extractos proporciona un límite de cuantificación de entre 0,5 y 1 ng/L y límite de detección de 0,2 a 0,5 ng/L (Vlachos et al., 2007).

Otra técnica es la pervaporación (PV) que se trata de una técnica de separación y concentración de compuestos volátiles que se basa en la migración selectiva de los componentes a través de una membrana semipermeable bajo el efecto de una diferencia de presión parcial entre el lado de la muestra y el lado de destino. En el contexto del análisis del 2,4,6-Tricloroanisol (TCA), la pervaporación se ha utilizado para concentrar y aislar este compuesto de muestras de vinos o corchos. En un estudio combinaron la pervaporación con una unidad de desorción térmica y captura criogénica en fase sólida (PV-CT-TD). Los compuestos volátiles se analizaron empleando un cromatógrafo de gases con detector de espectrometría de masas con trampa de iones. El límite de cuantificación fue de 180,7 pg/L (Gómez-Ariza et al., 2004).

4. Conclusiones

Tras lo mencionado en este trabajo de Fin de Máster, podemos concluir que la determinación de 2,4,6-Tricloroanisol en vinos adquiere una gran importancia ya que constituye un grave problema que afecta a un gran porcentaje de bodegas a nivel mundial, ofreciendo pérdidas económicas y de reputación debido a que el consumidor no se encuentra familiarizado con esta problemática y atribuye de forma general el defecto al vino.

El principal desafío para su cuantificación es su determinación a niveles subumbrales olfativos por lo que se requiere de técnicas analíticas con alta sensibilidad y especificidad, sin olvidar que también existen otros compuestos asociados al olor del corcho que también deben ser cuantificados. La Cromatografía de Gases constituye una técnica muy eficaz para la determinación de este analito, que requiere un paso previo de extracción y concentración del analito, para evitar que se presenten interferencias en la medida. La técnica más ampliamente empleada para la extracción en la última década es la microextracción en fase sólida.

Las técnicas clásicas no ha sido evaluadas en este Trabajo debido a que cada vez se tiende más a una química verde en la que se prefiere el empleo de menos volumen de disolventes orgánicos.

Si bien se ha de destacar que para una determinación de forma rutinaria tanto en bodegas como para productores de corcho, económicamente no son las técnicas más adecuadas y que como se ha desarrollado en el presente trabajo, otras opciones viables son los detectores que pueden emplearse de forma rutinaria o la voltamperometría, la cual no se encuentra muy desarrollada para la determinación de este analito y que puede constituir un foco de estudio en los próximos años.

Finalmente, se ha de destacar la evaluación sensorial de este analito que debe de ser realizada mediante catadores entrenados y que puede constituir un método eficaz, rápido y no destructivo para el cribado principalmente de lotes de corcho que pueden contener este analito.

5. Bibliografía

- Álvarez-Rodríguez, M. L., López-Ocaña, L., López-Coronado, J. M., Rodríguez, E., Martínez, M. J., Larriba, G., & Coque, J.-J. R. (2002). Cork Taint of Wines: Role of the Filamentous Fungi Isolated from Cork in the Formation of 2,4,6-Trichloroanisole by O Methylation of 2,4,6-Trichlorophenol. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(12), 5860–5869. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.12.5860-5869.2002>
- Asensio-Ramos, M., Ravelo-Pérez, L. M., González-Curbelo, M. Á., & Hernández-Borges, J. (2011). Liquid phase microextraction applications in food analysis. *Journal of Chromatography A*, 1218(42), 7415–7437. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2011.05.096>
- BOE. (2003). *LEGISLACIÓN CONSOLIDADA Ley 24/2003, de 10 de julio, de la Viña y del Vino*. 1–20.
- Buser, H. R., Zanier, C., & Tanner, H. (1982). Identification of 2,4,6-trichloroanisole as a potent compound causing cork taint in wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 30(2), 359–362. <https://doi.org/10.1021/jf00110a037>
- Callejón, R. M., Ubeda, C., Ríos-Reina, R., Morales, M. L., & Troncoso, A. M. (2016). Recent developments in the analysis of musty odour compounds in water and wine: A review. *Journal of Chromatography A*, 1428, 72–85. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2015.09.008>
- Campillo, N., Peñalver, R., & Hernández-Córdoba, M. (2008). Solid-phase microextraction for the determination of haloanisoles in wines and other alcoholic beverages using gas chromatography and atomic emission detection. *Journal of Chromatography A*, 1210(2), 222–228. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2008.09.095>
- Campillo, N., Viñas, P., Cacho, J. I., Peñalver, R., & Hernández-Córdoba, M. (2010). Evaluation of dispersive liquid–liquid microextraction for the simultaneous determination of chlorophenols and haloanisoles in wines and cork stoppers using gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1217(47), 7323–7330. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2010.09.058>
- Cañas Guerrero, I., Fuentes Pardo, J. M., & Martín Ocaña, S. (2005). Bodegas Subterráneas Tradicionales En La Ribera Del Duero. *Ponencias Del V Curso De Verano Viticultura Y Enología En La C.O. Ribera Del Duero*, 1, 75–80.
- Capone, D. L., Skouroumounis, G. K., Baeker, D. A., McLeaN, H. J., Pollnitz, A. P., & Sefton, M. A. (1999). Absorption of chloroanisoles from wine by corks and by other materials. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 5(3), 91–98. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0238.1999.tb00292.x>
- Chatonnet, P., Bonnet, S., Boutou, S., & Labadie, M.-D. (2004). Identification and Responsibility of 2,4,6-Tribromoanisole in Musty, Corked Odors in Wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(5), 1255–1262. <https://doi.org/10.1021/jf030632f>
- Chatonnet, P., Dubourdieu, D., Boidron, J. ., & Pons, M. (1992). The origin of ethylphenols in wine. *Journal of Science Foodcience Food*, 60, 165–178.
- Chen, X., Luo, Q., Yuan, S., Wei, Z., Song, H., Wang, D., & Wang, Z. (2013). Simultaneous determination of ten taste and odor compounds in drinking water by

MÉTODOS DE DETERMINACIÓN DE TCA (TRICLOROANISOLES)

Master en Calidad, Desarrollo e Innovación de Alimentos

solid-phase microextraction combined with gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Environmental Sciences*, 25(11), 2313–2323. [https://doi.org/10.1016/S1001-0742\(12\)60290-3](https://doi.org/10.1016/S1001-0742(12)60290-3)

CMAOT. (2017). *Borrador del Plan Estratégico del Alcornocal y el Corcho en Andalucía*. 170.

Collins, T. S., Hjelmeland, A., & Ebeler, S. E. (2012). *Analysis of Haloanisoles in Corks and Wines* (pp. 109–127). <https://doi.org/10.1021/bk-2012-1098.ch008>

Consejo de la Unión Europea. (2008). Reglamento (CE) n o 479/2008 del Consejo, de 29 de abril de 2008 , por el que se establece la organización común del mercado vitivinícola, se modifican los Reglamentos (CE) n o 1493/1999, (CE) n o 1782/2003, (CE) n o 1290/2005 y (CE) n o 3/2008 y se deroga. *Diario Oficial de La Unión Europea*, L 148, 1–61.

Cosme, F., M. Nunes, F., & Filipe-Ribeiro, L. (Eds.). (2021). *Chemistry and Biochemistry of Winemaking, Wine Stabilization and Aging*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.87471>

Cravero, M. C. (2020). Musty and Moldy Taint in Wines: A Review. *Beverages*, 6(2), 41. <https://doi.org/10.3390/beverages6020041>

Cravero, M. C., Bonello, F., Pazo Alvarez, M. del C., Tsolakis, C., & Borsa, D. (2015). The sensory evaluation of 2,4,6-trichloroanisole in wines. *Journal of the Institute of Brewing*, 121(3), 411–417. <https://doi.org/10.1002/jib.230>

Duarte, M. V., Lozano-Sanchez, P., & Katakis, I. (2009). Copper UPD as non-specific adsorption barrier in electrochemical displacement immunosensors. *Biosensors and Bioelectronics*, 24(7), 2205–2210. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2008.11.032>

Evans, T. J., Butzke, C. E., & Ebeler, S. E. (1997). Analysis of 2,4,6-trichloroanisole in wines using solid-phase microextraction coupled to gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 786(2), 293–298. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(97\)00581-5](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(97)00581-5)

Ewing, R. G. (2006). *Ion Mobility Spectrometry*, 2nd Edition By Gary A. Eiceman (New Mexico State University, Las Cruces, NM) and Zeev Karpas (Nuclear Research Center, Beer-Sheva, Israel). CRC Press (an imprint of Taylor and Francis Group): Boca Raton, FL. 2005. xvi + 350 pp. *Journal of the American Chemical Society*, 128(16), 5585–5586. <https://doi.org/10.1021/ja0598560>

Ferreira González, V. (2007). La base química del aroma del vino: Un viaje analítico desde las moléculas hasta las sensaciones olfato-gustativas. *Revista de La Academia de Ciencias Exactas, Físicas, Químicas y Naturales de Zaragoza*, 62, 7–36. <http://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=2572189&info=resumen&idioma=SPA>

Ferreira González, V. (2021). Boletín boletín. *Boletín de La Sociedad de Química Analítica*, 75(2444–8818), 26.

Fischer, C., & Fischer, U. (1997). Analysis of Cork Taint in Wine and Cork Material at Olfactory Subthreshold Levels by Solid Phase Microextraction. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45(6), 1995–1997. <https://doi.org/10.1021/jf970121r>

Flor-Montalvo, F. J., Ledesma, A. S. T., Cámara, E. M., Jiménez-Macías, E., García-Alcaraz, J. L., & Blanco-Fernandez, J. (2021). 2-piece cork stoppers as alternative for valorization of thin cork planks: Analysis by lca methodology. *Foods*, 10(4).

MÉTODOS DE DETERMINACIÓN DE TCA (TRICLOROANISOLES)

Master en Calidad, Desarrollo e Innovación de Alimentos

<https://doi.org/10.3390/foods10040873>

- Fontana, A. R. (2012). Analytical methods for determination of cork-taint compounds in wine. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 37, 135–147. <https://doi.org/10.1016/J.TRAC.2012.03.012>
- Fontana, A. R., & Altamirano, J. C. (2010). Sensitive determination of 2,4,6-trichloroanisole in water samples by ultrasound assisted emulsification microextraction prior to gas chromatography–tandem mass spectrometry analysis. *Talanta*, 81(4–5), 1536–1541. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2010.02.065>
- Fontana, A. R., Patil, S. H., Banerjee, K., & Altamirano, J. C. (2010). Ultrasound-Assisted Emulsification Microextraction for Determination of 2,4,6-Trichloroanisole in Wine Samples by Gas Chromatography Tandem Mass Spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(8), 4576–4581. <https://doi.org/10.1021/jf904396g>
- Freitas, P., Dias, L. G., Peres, A. M., Castro, L. M., & Veloso, A. C. A. (2012). Determination of 2,4,6-Trichloroanisole by Cyclic Voltammetry. *Procedia Engineering*, 47, 1125–1128. <https://doi.org/10.1016/j.proeng.2012.09.349>
- Gil, L. (2009). Cork Composites: A Review. *Materials*, 2(3), 776–789. <https://doi.org/10.3390/ma2030776>
- Gómez-Ariza, J. ., García-Barrera, T., & Lorenzo, F. (2004). Simultaneous separation, clean-up and analysis of musty odorous compounds in wines by on-line coupling of a pervaporation unit to gas chromatography–tandem mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 516(1–2), 165–170. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2004.03.083>
- Gómez-Limón Rodríguez, J. A. (2006). El Sector Vitivinícola en Castilla y León. In M. Ibañez Rodríguez & T. Sánchez Nieto (Eds.), *El lenguaje de la vid y el vino y su traducción* (pp. 49–64). Universidad de Valladolid, Secretariado de Publicaciones e Intercambio Editorial.
- Hayasaka, Y., Baldock, G. A., & Pollnitz, A. P. (2005). Contributions of mass spectrometry in the Australian Wine Research Institute to advances in knowledge of grape and wine constituents. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 11(2), 188–204. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0238.2005.tb00287.x>
- Hervé, E., Price, S., Burns, G., & Weber, P. (2004). Chemical analysis of TCA as a quality control tool for natural corks. *ETS Laboratories*.
- Insa, S., Salvadó, V., & Anticó, E. (2004). Development of solid-phase extraction and solid-phase microextraction methods for the determination of chlorophenols in cork macerate and wine samples. *Journal of Chromatography A*, 1047(1), 15–20. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2004.06.104>
- International Organisation of Vine and Wine. (2021). *Compendium of International Methods of Wine and Must Analysis: Total Acidity, Type-I method*.
- Jönsson, S., Uusitalo, T., van Bavel, B., Gustafsson, I.-B., & Lindström, G. (2006). Determination of 2,4,6-trichloroanisole and 2,4,6-tribromoanisole on ngL⁻¹ to pgL⁻¹ levels in wine by solid-phase microextraction and gas chromatography-high-resolution mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1111(1), 71–75. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2006.01.096>
- Juanola, R., Guerrero, L., Subirà, D., Salvadó, V., Insa, S., Garcia Regueiro, J. A., & Anticó, E. (2004). Relationship between sensory and instrumental analysis of 2,4,6-trichloroanisole in wine and cork stoppers. *Analytica Chimica Acta*, 513(1), 291–297. <https://doi.org/10.1016/J.ACA.2003.12.021>

MÉTODOS DE DETERMINACIÓN DE TCA (TRICLOROANISOLES)

Master en Calidad, Desarrollo e Innovación de Alimentos

- Juanola, R., Subirà, D., Salvadó, V., Garcia Regueiro, J. ., & Anticó, E. (2002). Evaluation of an extraction method in the determination of the 2,4,6-trichloroanisole content of tainted cork. *Journal of Chromatography A*, 953(1–2), 207–214. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(02\)00155-3](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(02)00155-3)
- Kailasa, S. K., Koduru, J. R., Park, T. J., Singhal, R. K., & Wu, H.-F. (2021). Applications of single-drop microextraction in analytical chemistry: A review. *Trends in Environmental Analytical Chemistry*, 29, e00113. <https://doi.org/10.1016/j.teac.2020.e00113>
- Karimpour Zahraei, S., Salemi, A., & Schmidt, T. C. (2021). Sample preparation for determination of water taste and odor compounds: A review. *Trends in Environmental Analytical Chemistry*, 32, e00149. <https://doi.org/10.1016/j.teac.2021.e00149>
- Karpas, Z. (2013). Applications of ion mobility spectrometry (IMS) in the field of foodomics. *Food Research International*, 54(1), 1146–1151. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2012.11.029>
- Karpas, Z., Guamán, A. V., Calvo, D., Pardo, A., & Marco, S. (2012). The potential of ion mobility spectrometry (IMS) for detection of 2,4,6-trichloroanisole (2,4,6-TCA) in wine. *Talanta*, 93, 200–205. <https://doi.org/10.1016/J.TALANTA.2012.02.012>
- Kumar, S., Dufлот, D., Hoffmann, S. V., Jones, N. C., Bolognesi, P., Carlini, L., Richter, R., Avaldi, L., Brunger, M. J., & Limão-Vieira, P. (2021). A combined experimental and theoretical study of the lowest-lying valence, Rydberg and ionic electronic states of 2,4,6-trichloroanisole. *Journal of Quantitative Spectroscopy and Radiative Transfer*, 271, 107751. <https://doi.org/10.1016/j.jqsrt.2021.107751>
- Lim, V., Harley, S. J., & Augustine, M. P. (2011). Noninvasive Identification of Tainted Corks in Full Intact Wine Bottles: A Low-Pressure Room Temperature Study. *American Journal of Enology and Viticulture*, 62(3), 291–297. <https://doi.org/10.5344/ajev.2011.10106>
- Liu, S., Lou, Y., Li, Y., Zhao, Y., Laaksonen, O., Li, P., Zhang, J., Battino, M., Yang, B., & Gu, Q. (2023). Aroma characteristics of volatile compounds brought by variations in microbes in winemaking. *Food Chemistry*, 420, 136075. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2023.136075>
- Luquedecastro, M., & Priegocapote, F. (2007). Ultrasound-assisted preparation of liquid samples. *Talanta*, 72(2), 321–334. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2006.11.013>
- Macku, C., Gonzalez, L., Schleussner, C., Mesquita, A. C., Herwatt, J. W., Kirch, L. C., & Schwartz, R. J. (2009). Sensory Screening for Large-Format Natural Corks by “Dry Soak” Testing and Its Correlation to Headspace Solid-Phase Microextraction (SPME) Gas Chromatography/Mass Spectrometry (GC/MS) Releasable Trichloroanisole (TCA) Analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(17), 7962–7968. <https://doi.org/10.1021/jf901135p>
- Maggi, L., Zalacain, A., Mazzoleni, V., Alonso, G. L., & Salinas, M. R. (2008). Comparison of stir bar sorptive extraction and solid-phase microextraction to determine halophenols and haloanisoles by gas chromatography–ion trap tandem mass spectrometry. *Talanta*, 75(3), 753–759. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2007.12.013>
- Márquez-Sillero, I., Aguilera-Herrador, E., Cárdenas, S., & Valcárcel, M. (2011). Determination of 2,4,6-trichloroanisole in water and wine samples by ionic liquid-based single-drop microextraction and ion mobility spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 702(2), 199–204. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2011.06.046>

MÉTODOS DE DETERMINACIÓN DE TCA (TRICLOROANISOLES)

Master en Calidad, Desarrollo e Innovación de Alimentos

- Márquez-Sillero, I., Cárdenas, S., & Valcárcel, M. (2011). Direct determination of 2,4,6-trichloroanisole in wines by single-drop ionic liquid microextraction coupled with multicapillary column separation and ion mobility spectrometry detection. *Journal of Chromatography A*, 1218(42), 7574–7580. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2011.06.032>
- Martendal, E., Budziak, D., & Carasek, E. (2007). Application of fractional factorial experimental and Box-Behnken designs for optimization of single-drop microextraction of 2,4,6-trichloroanisole and 2,4,6-tribromoanisole from wine samples. *Journal of Chromatography A*, 1148(2), 131–136. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2007.02.079>
- Martínez-Uruñuela, A., González-Sáiz, J. M., & Pizarro, C. (2004). Optimisation of a headspace solid-phase microextraction method for the direct determination of chloroanisoles related to cork taint in red wine. *Journal of Chromatography A*, 1056(1–2), 49–56. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2004.06.136>
- Martínez-Uruñuela, A., González-Sáiz, J. M., & Pizarro, C. (2005). Multiple solid-phase microextraction in a non-equilibrium situation. *Journal of Chromatography A*, 1089(1–2), 31–38. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2005.06.063>
- Martínez-Uruñuela, A., Rodríguez, I., Cela, R., González-Sáiz, J. M., & Pizarro, C. (2005). Development of a solid-phase extraction method for the simultaneous determination of chloroanisoles and chlorophenols in red wine using gas chromatography–tandem mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 549(1–2), 117–123. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2005.06.016>
- Martínez Verdú, F. M. (2010). IX congreso nacional del color, IXCNC. *Optica Pura y Aplicada*, 43(4).
- Mas, A., Puig, J., Lladoa, N., & Zamora, F. (2002). Sealing and Storage Position Effects on Wine Evolution. *Journal of Food Science*, 67(4), 1374–1378. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2002.tb10292.x>
- Moore, E., Pravda, M., & Guilbault, G. G. (2003). Development of a biosensor for the quantitative detection of 2,4,6-trichloroanisole using screen printed electrodes. *Analytica Chimica Acta*, 484(1), 15–24. [https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(03\)00311-8](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(03)00311-8)
- Moreno-Arribas, M. V., & Carmen, P. (2009). Wine Chemistry and Biochemistry. In M. V. Moreno-Arribas & M. C. Polo (Eds.), *Wine Chemistr and Biochemistry* (Vol. 3, Issue 1). Springer New York. <https://doi.org/10.1007/978-0-387-74118-5>
- Mottaleb, M. A., Meziani, M. J., & Islam, M. R. (2019). Solid-Phase Microextraction and Its Application to Natural Products and Biological Samples. In *Encyclopedia of Analytical Chemistry* (pp. 1–28). Wiley. <https://doi.org/10.1002/9780470027318.a9905.pub2>
- Navascués, E. (2001). EL Metabolismo Microbiano En El Binomio Corcho-Vino. https://www.acenologia.com/ciencia54_1/
- OIV-MA-AS315-16. (2018). *Determination of releasable 2, 4, 6 trichloroanisole in wine by cork stoppers (Resolution OIV-OENO 623-2018)*. November, 2–7.
- OIV. (2016). Documento de revision del analisis sensorial del vino. *Revista de Analisis Sensorial*, 2, 36. <http://www.oiv.int/public/medias/4292/documento-de-revisi-n-del-lisis-sensorial-del-vino.pdf>
- OIV International. (2015). Review Document on Sensory Analysis of Wine. *Oiv.Int*, 27. <http://www.oiv.int/public/medias/3307/review-on-sensory-analysis-of-wine.pdf>

MÉTODOS DE DETERMINACIÓN DE TCA (TRICLOROANISOLES)

Master en Calidad, Desarrollo e Innovación de Alimentos

- Patil, S. H., Banerjee, K., Utture, S. C., Fontana, A. R., Altamirano, J. C., Oulkar, D. P., Wagh, S. S., Dasgupta, S., Patil, S. B., Jadhav, M. R., Ugare, B. R., Adsule, P. G., & Deshmukh, M. B. (2011). Development and validation of a simple analytical method for the determination of 2,4,6-trichloroanisole in wine by GC-MS. *Food Chemistry*, 124(4), 1734–1740. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.07.113>
- Peña-Neira, A., Fernández De Simón, B., García-Vallejo, M. C., Hernández, T., Cadahía, E., & Suarez, J. A. (2000). Presence of cork-taint responsible compounds in wines and their cork stoppers. *European Food Research and Technology*, 211(4), 257–261. <https://doi.org/10.1007/s002170000193>
- Pereira, C. S., Marques, J. J. F., & San Romão, M. V. (2000). Cork Taint in Wine: Scientific Knowledge and Public Perception — A Critical Review. *Critical Reviews in Microbiology*, 26(3), 147–162. <https://doi.org/10.1080/10408410008984174>
- Pereira, H. (2007). Wine and cork. *Cork*, 305–327. <https://doi.org/10.1016/B978-044452967-1/50016-9>
- Peres, A. M., Freitas, P., Dias, L. G., Sousa, M. E. B. C., Castro, L. M., & Veloso, A. C. A. (2013). Cyclic voltammetry: A tool to quantify 2,4,6-trichloroanisole in aqueous samples from cork planks boiling industrial process. *Talanta*, 117, 438–444. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2013.09.039>
- Pires, J., Pereira, H., & San Romao, M. (2007). Study of humidity and water activity of cork slabs during cork stopper manufacturing process-Preliminary results. *Study of Humidity and Water Activity of Cork Slabs during Cork Stopper Manufacturing Process: Preliminary Results*, 22(1), 15–20.
- Pizarro, C., Pérez-del-Notario, N., & González-Sáiz, J. M. (2007a). Optimisation of a headspace solid-phase microextraction with on-fiber derivatisation method for the direct determination of haloanisoles and halophenols in wine. *Journal of Chromatography A*, 1143(1–2), 26–35. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2007.01.023>
- Pizarro, C., Pérez-del-Notario, N., & González-Sáiz, J. M. (2007b). Multiple headspace solid-phase microextraction for eliminating matrix effect in the simultaneous determination of haloanisoles and volatile phenols in wines. *Journal of Chromatography A*, 1166(1–2), 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2007.08.031>
- Pizarro, C., Sáenz-González, C., Perez-del-Notario, N., & González-Sáiz, J. M. (2010). Optimisation of a dispersive liquid-liquid microextraction method for the simultaneous determination of halophenols and haloanisoles in wines. *Journal of Chromatography A*, 1217(49), 7630–7637. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2010.10.032>
- Pizarro, C., Sáenz-González, C., Pérez-del-Notario, N., & González-Sáiz, J. M. (2011). Development of a dispersive liquid-liquid microextraction method for the simultaneous determination of the main compounds causing cork taint and Brett character in wines using gas chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1218(12), 1576–1584. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2011.01.055>
- Pollnitz, A. P., Pardon, K. H., Liacopoulos, D., Skouroumounis, G. K., & Sefton, M. A. (1996). The analysis of 2,4,6-trichloroanisole and other chloroanisoles in tainted wines and corks. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 2(3), 184–190. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0238.1996.tb00107.x>
- Prat, C., Bañeras, L., & Anticó, E. (2008). Screening of musty-earthy compounds from tainted cork using water-based soaks followed by headspace solid-phase

MÉTODOS DE DETERMINACIÓN DE TCA (TRICLOROANISOLES)

Master en Calidad, Desarrollo e Innovación de Alimentos

- microextraction and gas chromatography-mass spectrometry. *European Food Research and Technology*, 227(4), 1085–1090. <https://doi.org/10.1007/s00217-008-0823-0>
- Prescott, J., Norris, L., Kunst, M., & Kim, S. (2005). Estimating a “consumer rejection threshold” for cork taint in white wine. *Food Quality and Preference*, 16(4), 345–349. <https://doi.org/10.1016/j.foodqual.2004.05.010>
- Regueiro, J., Llompart, M., Garcia-Jares, C., Garcia-Monteagudo, J. C., & Cela, R. (2008). Ultrasound-assisted emulsification–microextraction of emergent contaminants and pesticides in environmental waters. *Journal of Chromatography A*, 1190(1–2), 27–38. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2008.02.091>
- Rezaee, M., Assadi, Y., Milani Hosseini, M.-R., Aghaee, E., Ahmadi, F., & Berijani, S. (2006). Determination of organic compounds in water using dispersive liquid–liquid microextraction. *Journal of Chromatography A*, 1116(1–2), 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2006.03.007>
- Ridgway, K., Lalljie, S. P. D., & Smith, R. M. (2010). Analysis of food taints and off-flavours: a review. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 27(2), 146–168. <https://doi.org/10.1080/19440040903296840>
- Riera, J. (2014). El Vino y la Cultura. *Anales de La Real Academia de Medicina y Cirugía de Valladolid*, 51, 201–240. <http://p88-10.210.221.5.acceso.bibliotecaceu.es/accedix0/sitios/control/0incrustat.php?aplicacion=10013>
- Riu, M., Mestres, M., Busto, O., & Guasch, J. (2002). Determination of 2,4,6-trichloroanisole in wines by headspace solid-phase microextraction and gas chromatography–electron-capture detection. *Journal of Chromatography A*, 977(1), 1–8. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(02\)01276-1](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(02)01276-1)
- Sánchez Sanz, E. (1982). El corcho: su extracción y su aprovechamiento. *Narria. Estudios de Artes y Costumbres Populares*, 10–15.
- Santos, J. P., Lozano, J., Aleixandre, M., Sayago, I., Fernández, M. J., Arés, L., Gutiérrez, J., & Horrillo, M. C. (2004). Discrimination of different aromatic compounds in water, ethanol and wine with a thin film sensor array. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 103(1–2), 98–103. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2004.04.042>
- Sefton, M. A., & Simpson, R. F. (2005). Compounds causing cork taint and the factors affecting their transfer from natural cork closures to wine – a review. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 11(2), 226–240. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0238.2005.tb00290.x>
- Soleas, G. J., Yan, J., Seaver, T., & Goldberg, D. M. (2002). Method for the Gas Chromatographic Assay with Mass Selective Detection of Trichloro Compounds in Corks and Wines Applied To Elucidate the Potential Cause of Cork Taint. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(5), 1032–1039. <https://doi.org/10.1021/jf011149c>
- Takeuchi, H., Kato, H., & Kurahashi, T. (2013). 2,4,6-Trichloroanisole is a potent suppressor of olfactory signal transduction. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(40), 16235–16240. <https://doi.org/10.1073/pnas.1300764110>
- Tang, S., Qi, T., Ansah, P. D., Nalouzebi Fouemina, J. C., Shen, W., Basheer, C., & Lee, H. K. (2018). Single-drop microextraction. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*,

108, 306–313. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2018.09.016>

- Tarasov, A., Cabral, M., Loisel, C., Lopes, P., Schuessler, C., & Jung, R. (2022). State-of-the-Art Knowledge about 2,4,6-Trichloroanisole (TCA) and Strategies to Avoid Cork Taint in Wine. In *Grapes and Wine*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.103709>
- Tarasov, A., Rauhut, D., & Jung, R. (2017). “Cork taint” responsible compounds. Determination of haloanisoles and halophenols in cork matrix: A review. *Talanta*, 175, 82–92. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2017.07.029>
- Taylor, M. K., Young, T. M., Butzke, C. E., & Ebeler, S. E. (2000). Supercritical Fluid Extraction of 2,4,6-Trichloroanisole from Cork Stoppers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(6), 2208–2211. <https://doi.org/10.1021/jf991045q>
- Teixeira, M. (2006). 2, 4, 6-Trichloroanisole: a consumer panel evaluation. *Ciência e Técnica* ..., 21(2), 53–65. <http://www.scielo.oces.mctes.pt/pdf/ctv/v21n2/v21n2a01.pdf>
- Unión Europea. (2011). Reglamento (UE) N° 1129/2011 de la Comisión de 11 de noviembre de 2011 por el que se modifica el anexo II del Reglamento (CE) N° 1333/2008 del Parlamento Europeo y del Consejo para establecer una lista de aditivos alimentarios de la Unión. *Diario Oficial de La Unión Europea*, 6, 177. <https://www.boe.es/doue/2011/295/L00001-00177.pdf>
- Vakinti, M., Mela, S.-M., Fernández, E., & Psillakis, E. (2019). Room temperature and sensitive determination of haloanisoles in wine using vacuum-assisted headspace solid-phase microextraction. *Journal of Chromatography A*, 1602, 142–149. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2019.03.047>
- Varelas, V., Sanvicens, N., M-Pilar-Marco, & Kintzios, S. (2011). Development of a cellular biosensor for the detection of 2,4,6-trichloroanisole (TCA). *Talanta*, 84(3), 936–940. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2011.02.029>
- Vlachos, P., Kampioti, A., Kornaros, M., & Lyberatos, G. (2007). Matrix effect during the application of a rapid method using HS-SPME followed by GC-ECD for the analysis of 2,4,6-TCA in wine and cork soaks. *Food Chemistry*, 105(2), 681–690. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.12.056>
- Wang, Q., Jing, J.-Y., & Cheng, Z. (2021). Long-range surface plasmon resonance and its biological sensing applications (pp. 277–338). <https://doi.org/10.1016/bs.coac.2021.08.002>
- Yagües, G. V. (2008). Cromatografía de gases. *Cromatografía*, 1–19.
- Zalacain, A., Alonso, G. L., Lorenzo, C., Iñiguez, M., & Salinas, M. R. (2004). Stir bar sorptive extraction for the analysis of wine cork taint. *Journal of Chromatography A*, 1033(1), 173–178. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2003.12.059>