

**QUANTIFICAÇÃO DOS CLOROANISÓIS POR MICRO
EXTRACÇÃO EM FASE SÓLIDA (SPME) E
CROMATOGRAFIA GASOSA (GC) COM DETECÇÃO
POR ESPECTROMETRIA DE MASSA (MS) EM
MACERADOS DE LOTES DE ROLHAS DE CORTIÇA
OU EM VINHO**

**DOSAGE DES CHLOROANISOLES PAR MICROEXTRACTION EN
PHASE SOLIDE (SPME) ET CHROMATOGRAPHIE GAZEUSE
(GC) AVEC DETECTION EN SPECTROMETRIE DE MASSE (MS)
DANS DES LIXIVIATS DE LOTS DE BOUCHONS DE LIÈGE OU
DANS UN VIN**

Jean-Michel Riboulet¹, Luiz A. R. Alves² e Nerea Urreizti³

¹ CEVAQOE, SARL - 12, rue Clément Ader - 31170 Tournefeuille - France
Tél. (33) 5 61 07 24 03 - Fax (33) 5 61 07 24 06 - E-mail: CEVAQOE-RIBOULET@wanadoo.fr

² Laboratório CEVAQOE, LDA. - Rua da Estação n° 13, 1° Esq. - 4535-284 Paços de Brandão
- Portugal - Tel. (351) 22 745 56 91 / 94 80 - Fax (351) 22 746 00 14 - E-mail: cevaqoe@iol.pt

³ CEVAQOE España, s.l. - Paseo de Sagastieder, 11 - 1° A - 20015 San Sebastián - España -
Tél. y Fax (34) 943 - 27 35 71 - E-mail: cevaqoe@euskalnet.net

(Manuscrito recebido em 23.10.02. Aceite para publicação em 20.12.02.)

RESUMO

Este estudo descreve um método de doseamento dos cloroanisóis extraídos das rolhas pelo vinho e é baseado na maceração de uma amostra do lote de rolhas a avaliar num vinho branco. Os cloroanisóis extraídos das rolhas pelo vinho de maceração são analisados pela técnica de SPME - GC/MS. Este método permite obter um limite de detecção de 0,2 ng.L⁻¹ para cada um dos cloroanisóis.

Palavras-chave: gosto a mofo; TCA (2,4,6-tricloroanisol); rolha; vinho; SPME - GC/MS.

Mots clefs: goût de moisi; TCA (2,4,6-trichloroanisole); bouchon; vin; SPME - GC/MS.

INTRODUÇÃO

A rolha de cortiça acompanha o vinho durante a sua evolução na garrafa e está ligada à conservação e protecção da sua qualidade. Somente a rolha de cortiça

permite a conservação e o desenvolvimento das qualidades aromáticas e organolépticas dos vinhos (Riboulet e Alegoet, 1986).

No entanto, os “gostos a rolha” ou “a mofo” num vinho estão a converter-se num dos principais “defeitos” encontrados nos vinhos. O consumidor mostra-se cada vez mais sensível e atento a esta questão.

Na maioria dos casos, os compostos responsáveis por estas alterações são moléculas da família dos cloroanisóis.

Os cloroanisóis são conhecidos desde à algum tempo por serem os responsáveis de intensos odores “a mofo” em vinhos, cortiça e em muitos outros produtos (água, café, chocolate, arroz,...). Existe uma grande variedade de derivados em função do lugar de inserção do cloro no anel benzénico. Entre os compostos identificáveis nos vinhos encontram-se o 2,4,6-TCA (2,4,6-tricloroanisol) e o 2,3,4,6-TeCA (2,3,4,6-tetracloroanisol), os quais estão associados na maioria dos casos à presença de odores e gostos a mofo. São estes dois compostos os que possuem o odor mais intenso e o nível de percepção mais baixo. O PCA (pentacloroanisol) tem um odor muito menos intenso que os restantes cloroanisóis (Comunicação pessoal, Riboulet, 1999; Comunicação Pessoal, Riboulet e Urreizti, 2000).

Os cloroanisóis provêm da metilação dos clorofenóis correspondentes. Estes foram muito utilizados durante anos como fungicidas no tratamento de madeira e como desfolhantes. O PCF (pentaclorofenol), fornecido sob a forma de sal, é um adjuvante na fabricação de papel e no tratamento de couros e telas. A reacção de metilação é levada a cabo bioquimicamente por um grande número de microorganismos e em particular por fungos.

Os cloroanisóis podem ter diversas origens, tais como a degradação de certas moléculas cloradas empregues como insecticidas ou podem ser directamente sintetizados a partir dos fenóis livres da água os quais reagem com o cloro utilizado nos tratamentos e/ou desinfecções das adegas.

Todas estas moléculas podem ser analisadas em vinhos, mas também em diferentes tipos de materiais susceptíveis de contaminar directa ou indirectamente o vinho (madeira, rolhas de cortiça, atmosfera, água, cartão, produtos enológicos,...). Estas análises são uma ajuda muito preciosa para colocar em evidência a existência de problemas e para determinar as suas causas.

Dependendo do tipo de policloroanisol detectado analiticamente, pode determinar-se a origem da contaminação. A presença de TCA tende a implicar a rolha de cortiça, enquanto que os TeCA e os PCA são indicadores de contaminações ambientais (Comunicação pessoal, Riboulet, 2000).

A análise dos cloroanisóis que a rolha de cortiça pode transmitir para o vinho constitui para os corticeiros uma ferramenta de controlo rápido e fiável das

rolhas de cortiça compradas ou de lotes de rolhas antes da sua expedição. De igual modo, e com o objectivo de prevenir o risco do “gosto a rolha”, para os produtores de vinho é também muito importante a análise das rolhas de cortiça antes do engarrafamento.

Este trabalho apresenta um método de quantificação dos cloroanisóis (TCA, TeCA e PCA) das rolhas de cortiça extraíveis pelo vinho e é baseado na maceração de uma amostra do lote de rolhas a avaliar num vinho e a sua análise por SPME – GC/MS (micro extracção em fase sólida com separação por cromatografia gasosa e detecção por espectrometria de massa).

A SPME foi introduzida como uma técnica moderna e alternativa para a preparação de amostras. Esta técnica elimina a utilização de solventes orgânicos, reduz o tempo de análise e permite a automatização da preparação das amostras. Além disso, pode acoplar-se com os diferentes tipos de equipamentos analíticos e aplica-se à extracção de uma vasta gama de moléculas, tais como pesticidas, aromas e produtos farmacêuticos, assim como à análise de alimentos, águas, atmosfera e matrizes sólidas (Pawliszyn, 1999; Doneche, 1993).

A detecção por espectrometria de massa é efectuada em modo MS/MS (espectrometria de massas em sequência) e consiste no armazenamento de um determinado ião produzido por impacto de electrões (EI) ou ionização química (CI), com libertação de todos os demais iões. O ião principal assim seleccionado colide com o gás hélio liberando os iões secundários, que por sua vez atingem o detector, gerando espectros. A espectrometria de massas em sequência apresenta diversas vantagens, nomeadamente uma maior selectividade, obtenção de limites de detecção mais baixos e espectros de melhor qualidade (Silverstein e Webster, 2000).

MATERIAIS E EQUIPAMENTOS

Materiais

- 1) Vinho de maceração – o vinho de maceração é um vinho branco comum, acondicionado em embalagem de tipo “Bag in Box”. Para controlar a ausência de cloroanisóis no vinho de maceração antes da sua utilização, analisa-se o vinho de todas as embalagens.
- 2) Etanol absoluto e cloreto de sódio, para análise – ACS – ISO.
- 3) Padrões de referência:
 - 3.1.) 2,4,6-tricloroanisol – d5, fornecido por Cambridge Isotope Laboratories.
 - 3.2.) 2,4,6-tricloroanisol, fornecido por Riedel-de Haën.
 - 3.3.) 2,3,4,6-tetracloroanisol, fornecido por ULTRA Scientific.

3.4.) pentacloroanisol, fornecido por SUPELCO.

4) Frascos de maceração – para realizar a maceração das rolhas de cortiça utilizam-se frascos de vidro com tampa em polipropileno. Estes materiais não fixam os cloroanisóis. Realizou-se um estudo sobre a eficácia da lavagem destes frascos, e verificou-se que estes estavam isentos de cloroanisóis após a lavagem.

5) Frascos de armazenamento de amostras – frascos de vidro descartáveis para evitar contaminações entre as diferentes amostras.

6) Vials – vials de 20 mL apropriados para o combiPAL munidos de cápsulas magnéticas de abertura larga. Com a finalidade de eliminar possíveis contaminações entre as amostras, estes frascos são também descartáveis.

Equipamentos

1) CombiPAL – o amostrador automático combiPAL está equipado com um módulo SPME que permite que a extracção e a introdução das amostras seja efectuada de maneira automática, contínua e reprodutível.

2) GC/MS – cromatógrafo em fase gasosa VARIAN modelo 3900 GC sobre o qual está montada uma coluna capilar de baixa polaridade equipado com detector de espectrometria de massa VARIAN, modelo Saturn 2100 T.

MODO OPERATÓRIO

Maceração das rolhas de cortiça

Hoje em dia, e no que respeita à maceração das rolhas de cortiça, não existe um método normalizado. O nosso método analisa os macerados obtidos a partir de rolhas de cortiça inteiras. Este princípio assemelha-se mais ao que pode ocorrer numa situação real, com uma rolha de cortiça numa garrafa de vinho. De um ponto de vista enológico, o que interessa é conhecer os componentes que migram da cortiça para o vinho, ou seja, os compostos extraíveis (Riboulet, 2001).

Recomenda-se que o número de rolhas postas a macerar seja de 10 ou 20 para um volume de 500 mL e 1000 mL respectivamente.

Deve levar-se em conta a representatividade das amostras das rolhas de cortiça que se analisam. O número de amostras e o tamanho de cada uma dependerá do número de rolhas que compõem o lote em questão e do risco que se está disposto a assumir na aceitação do lote, ou seja é função do plano de amostragem escolhido.

Para realizar a maceração, introduzem-se as rolhas de cortiça nos frascos de maceração previamente passados com o vinho de maceração, e seguidamente enche-se com o mesmo vinho (figura 1). O tempo de maceração foi optimizado sendo de 24 horas à temperatura ambiente.

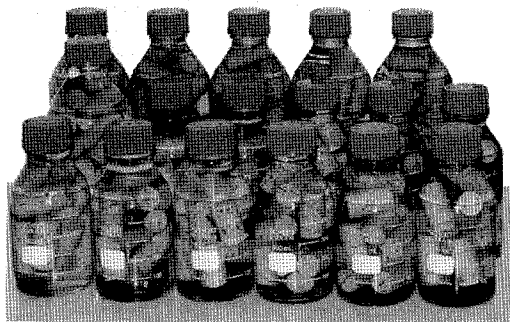


Fig. 1 – Maceração das rolhas de cortiça.
Maceration des bouchons de liège.

Após as 24 horas, homogeneiza-se o macerado e introduz-se nos frascos de armazenamento descartáveis.

Preparação da amostra a analisar

Após a maceração, introduz-se uma toma de ensaio de 15 mL para os vials de 20 mL apropriados para o combiPAL, nos quais se havia introduzido NaCl até saturação, com o objectivo de favorecer a extracção. Seguidamente junta-se a solução padrão de TCA-d5 e fecham-se os frascos com a cápsula magnética.

Uma vez preparada a amostra, esta é colocada no suporte de amostras do amostrador combiPAL, para seguidamente ser analisada (figura 2).

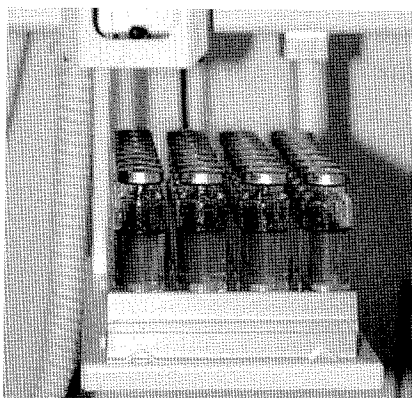


Fig. 2 – Suporte de amostras do amostrador automático.
Portoir du passeur automatique d'échantillons.

Extracção e injeção da amostra

A técnica de extracção e injeção utilizada é a SPME. Esta técnica analítica

é baseada na adsorção e na dessorção de moléculas sobre uma fibra específica (figura 3).

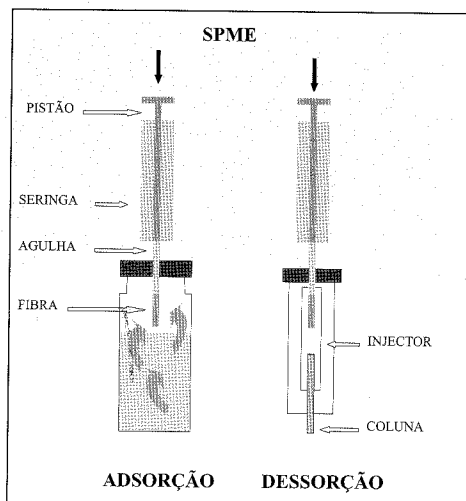


Fig. 3 – Técnica de extracção e de injeção por SPME.
Technique d'extraction et d'injection par SPME.

Com a SPME os cloroanísóis presentes no vinho de maceração fixam-se sobre um adsorvente específico – fibra de polidimetilsiloxano (PDMS). A adsorção é realizada a quente e sob agitação (figura 4). Estes compostos são termodesorbidos no injetor do cromatógrafo em fase gasosa (GC) para seguidamente serem identificados com exactidão e quantificados por espectrometria de massa (MS). O amostrador automático combiPAL está equipado com um módulo SPME que permite a extracção e a introdução das amostras no GC.

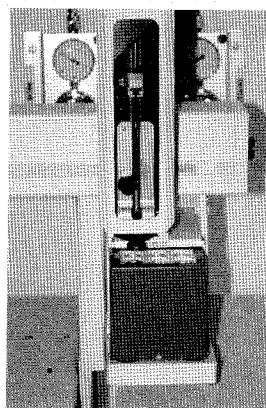


Fig. 4 – Técnica de extracção por SPME.
Technique d'extraction par SPME.

Separação e análise dos compostos injectados

A separação cromatográfica dos compostos é efectuada pela coluna capilar montada no GC. Na figura 5 mostra-se o cromatograma típico obtido para uma mistura de cloroanisóis.

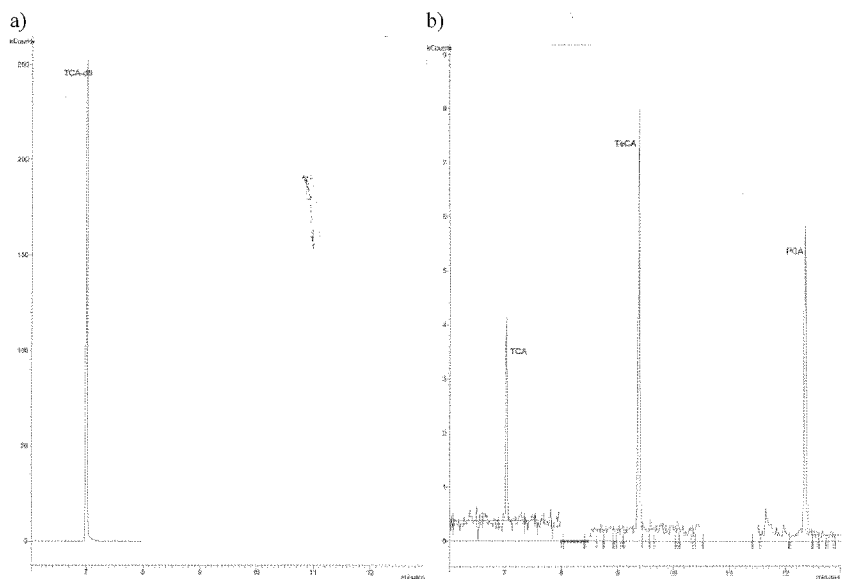


Fig. 5 – Cromatograma obtido na análise de cloroanisóis por SPME – GC/MS.

a) TCA-d5 b) TCA, TeCA e PCA

Chromatogramme obtenu pour l'analyse des chloroanisoles par SPME - GC/MS.

a) TCA-d5 b) TCA, TeCA e PCA

Os compostos eluídos são detectados pelo detector de espectrometria de massa VARIAN, funcionando em modo MS/MS e a quantificação é baseada na comparação com o padrão interno TCA-d5 e em relação a uma curva de calibração para cada composto.

Calibração

As soluções padrão para as curvas de calibração dos diferentes cloroanisóis são previamente preparadas na matriz desejada (vinho, ...). Para esta preparação utilizam-se soluções padrão de cloroanisóis de 1 µg.L⁻¹ e 10 µg.L⁻¹ preparadas em etanol absoluto. A calibração engloba uma gama de concentrações entre 0,5 ng.L⁻¹ e 50 ng.L⁻¹.

As curvas de calibração obtidas para os cloroanisóis são caracterizadas pelos seguintes parâmetros:

$$2,4,6\text{-TCA:} \quad y = 1,0251x \quad (r^2 = 0,99935).$$

$$2,3,4,6\text{-TeCA:} \quad y = 1,4001x \quad (r^2 = 0,99987).$$

$$\text{PCA:} \quad y = 1,3011x \quad (r^2 = 0,99981).$$

Controlo de qualidade

Sempre que se efectuarem análises sobre séries de amostras (independentemente do número de amostras), esta deve ser acompanhada de um controlo de qualidade (ensaio em branco e padrões de controlo).

Iniciar a sessão de trabalho com um padrão de controlo e acabar a mesma também com um padrão de controlo.

Durante a série de amostras deve ser introduzido um ensaio em branco para detectar possíveis contaminações.

As amostras para as quais um valor anormal é obtido farão objecto de uma nova análise para confirmação.

Condições operatórias

As condições operatórias deste método estão descritas no quadro I.

QUADRO I

Condições operatórias.
Conditions opératoires.

SPME	
fibra	polidimetilsiloxano (PDMS)
espessura do filme	100 µm
Adsorção	
agitação	500 rpm
temperatura de adsorção	40°C
tempo de adsorção	30 minutos
Dessorção	
temperatura de dessorção	260°C
tempo de dessorção	15 minutos
GC	
Injector (tipo 1177)	
temperatura	260 °C
Coluna capilar	
Coluna capilar de baixa polaridade	
Gás de arraste	
natureza	Hélio 6.0
caudal	1,0 mL.min ⁻¹
Temperatura do forno	
Programa de temperatura de 50 °C a 280 °C.	

Detector de espectrometria de massa

Com o objectivo de obtermos uma melhor sensibilidade, o espectrómetro de massa funciona em modo MS/MS. A quantificação por MS/MS é baseada na intensidade do pico do ião secundário após fragmentação do ião principal.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Análise completa e rápida

Obtemos de modo rápido, sem perda de sensibilidade e sem risco de contaminação, uma análise completa dos cloroanisóis. Optimizou-se o tempo global da quantificação dos cloroanisóis, em função dos parâmetros que podem ter uma influência sobre a qualidade das análises.

Controlaram-se de um modo particular parâmetros como a selecção da fibra, a qual se escolhe segundo a natureza dos compostos que se querem dosear e os tempos de extracção e de injeção, para que o ciclo de adsorção-dessorção se complete e não se contamine a análise seguinte.

Após a análise cromatográfica dos cloroanisóis, o programa de temperatura do GC elimina aqueles compostos susceptíveis de causar efeitos de memória (interferência dos compostos da análise precedente sobre a análise em curso).

O tempo de análise foi optimizado sem comprometer a qualidade dos resultados. Normalmente o material utilizado é de uso único. Nos casos em que não é possível o uso de material descartável, comprovou-se anteriormente que a limpeza descontaminou o material completamente.

Limites de detecção

Os limites de detecção foram calculados e têm o valor de $0,2 \text{ ng.L}^{-1}$, correspondentes a três vezes a concentração do ruído de fundo (Krull e Swartz, 1998).

Repetibilidade

Estudou-se a repetibilidade do método para uma concentração entre 5 e 6 ng.L^{-1} para cada um dos três compostos.

Os valores obtidos para o coeficiente de variação (CV) para cada um dos compostos vêm detalhados no quadro II.

Estudos em perspectiva

Embora este método esteja optimizado para as condições descritas acima, é aconselhável levar a cabo um estudo no sentido deste método poder ser empregue com maior abrangência.

Líquido de maceração

No que respeita à maceração das rolhas de cortiça, um estudo está a ser efectuado no sentido de verificar a eficácia da extracção quando esta é realizada com diferentes tipos de vinhos, nomeadamente o teor em álcool, bem como quando se utiliza como líquido de maceração uma solução alcoólica com diferentes teores em álcool.

QUADRO II

Estudo da repetibilidade da análise dos cloroanisóis por SPME.
Étude de la repetabilité de l'analyse des chloroanisoles par SPME.

Concentrações (ng.L ⁻¹)			
TCA	TeCA	PCA	
5,0	5,0	5,9	
5,0	4,6	5,4	
5,5	4,9	5,5	
5,5	4,9	6,0	
5,1	5,3	6,1	
5,1	4,8	5,8	
5,4	5,3	6,4	
4,9	4,9	5,8	
4,9	5,1	5,5	
5,3	4,9	5,9	
5,3	4,9	5,5	
Média:	5,18	4,96	5,80
Desvio padrão:	0,227	0,206	0,307
CV %:	4,4	4,2	5,3

Condições de maceração

As condições de maceração estão também a ser alvo de um estudo, nomeadamente a temperatura de maceração e efeito da agitação (ou mesmo ultra sons) sobre a eficácia da extracção.

Tempo antes de análise

Após preparação das amostras nos frascos de headspace, é também importante estudar a sua estabilidade em função do tempo decorrido antes de análise.

CONCLUSÕES

O método SPME – GC/MS é uma importante ferramenta analítica para a quantificação dos cloroanisóis eventualmente presentes nas rolhas de cortiça e susceptíveis de contaminar o vinho. Permite avaliar de maneira rápida e fiável se uma percentagem elevada de indivíduos de um lote de rolhas de cortiça podem apresentar um risco de produção de “gosto a mofo”.

O seu elevado grau de automatização reduz os custos das análises de tal modo que permite o controlo sistemático dos lotes de rolhas de cortiça.

Por outro lado, esta técnica pode ser complementado com testes sensoriais sobre macerados em água.

A única limitação do método é a representatividade das amostras quando se efectua a amostragem.

RÉSUMÉ

Dosage des chloroanisoles par microextraction en phase solide (SPME) et chromatographie gazeuse (GC) avec detection en spectrometrie de masse (MS) dans des lixiviats de lots de bouchons de liege ou dans un vin

Cette étude décrit une méthode de dosage des chloroanisoles extractibles des bouchons par le vin qui est basée sur une macération d'un échantillon du lot de bouchons à évaluer. Les chloroanisoles extraits des bouchons par le vin de macération sont analysés par la technique de SPME - GC/MS. Cette méthode permet d'obtenir des limites de détection de 0,2 ng.L⁻¹ pour chacun des chloroanisoles.

SUMMARY

Determination of chloroanisoles by solid phase microextraction (SPME) and gas chromatography (GC) with mass spectrometry detection (MS) in cork soaks or in wine

This paper describes a method for the quantification of releasable chloroanisoles from cork stoppers to wine. A sample of the corks to be tested is soaked in white wine. The chloroanisoles which have migrated from the stoppers to the wine are then analysed using the SPME - GC/MS technique. The proposed methodology allowed for a detection limit of 0,2 ng.L⁻¹ for each chloroanisole.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Doneche B., 1993. *Les acquisitions récentes en chromatographie du vin, applications à l'analyse sensorielle des vins*. 254 p. TEC DOC, Paris.
- Krull I., Swartz M., 1998. Determining Limits of Detection and Quantitation. *LCGC*.
- Pawliszyn J., 1999. *Applications of Solid Phase Microextraction*. 655 p. Royal Society of Chemistry, U.K..
- Riboulet J.M., Alegoet C., 1986. *Aspects Pratiques du Bouchage des Vins*. Collection Avenir Oenologie. Ed. Bourgonhe - Publications SARL. La Chapelle-de-Guinchay.
- Riboulet J.M., 1999. *El corcho supera el reto. Una tecnologia para el futuro*. I Jornada técnica sobre clorofenoles y cloroanisoles - Logroño.
- Riboulet J. M., 2001. L'analyse et la raison. *L'amateur de Bordeaux*, Hors-série, 39-41.
- Robert M. S., Francis X. W., 2000. *Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos*, 6ª Edição. 460 p. Livros Técnicos e Científicos Editora SA, Rio de Janeiro.
- Silverstein R.M., Webster F.X., 2000. *Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos*, 6ª Edição. 460 p. Livros Técnicos e Científicos Editora SA, Rio de Janeiro.