

# Haloanisoles y barricas nuevas: puesta en evidencia del rol del moho

>>> La crianza del vino en barricas de roble reconquista su popularidad con el advenimiento de la enología moderna y la puesta en evidencia de su importancia en la expresividad de los más grandes vinos. Con una capacidad estándar de 225 L - potencialmente 300 botellas de 750 mL - todo incidente que afecte a la barrica puede volverse muy perjudicial para el productor. Es por esta razón que prevenir la presencia accidental de 2,4,6-TriCloroAnisol (TCA) en las barricas es, desde hace varios años, un desafío técnico y económico mayor para el rubro de la tonelería. <<<

Muy comprometido con este sector, el laboratorio LEC propone desde el 2012 un dispositivo de control de haloanisoles para barricas nuevas, basado en el principio de muestreo dinámico de Compuestos Orgánicos Volátiles (COV)<sup>1</sup>. En 2015 en Estados Unidos, un vino criado en una barrica francesa había presentado una concentración de 11 ng/L de TCA (2,4,6-tricloroanisol), mientras que ésta había sido reportada como negativa al salir de la producción. El vino contenía igualmente 82 ng/L de TCP (2,4,6-triclorofenol), precursor del TCA. Esta concentración tan inusual sugería una posible conversión natural del TCP en TCA, ya sea durante el proceso de vinificación, o bien durante el transporte en contenedores. Pruebas experimentales de fermentación maloláctica realizada en presencia de halofenoles no han sido capaces de confirmar su transformación en sus respectivos haloanisoles durante la fermentación. Se ha teorizado, entonces, la existencia de mohos propensos a desarrollarse en el interior de las barricas nuevas. Este fenómeno ha sido bien documentado en infraestructuras que contienen elementos de carpintería tratados con preparaciones a base de pentaclorofenol, que con el pasar del tiempo y bajo efecto del moho terminan contaminando la atmósfera con haloanisoles<sup>2, 3, 4, 5</sup>.



Luego de 12 horas de secado, 10 g de copos contaminados por este procedimiento fueron puestos en frascos de 100 mL según las 3 modalidades siguientes:

- N°1: Control negativo.
- N°2: Adición de 10 mL de agua ultra-pura para generar un medio propicio al desarrollo de microorganismos.
- N°3: Adición de 10 mL de agua ultra-pura y 100 mg de harina de trigo: este aditivo alimentario es utilizado en tonelería para producir una pasta impermeable que sirve para sellar los fondos.

Cada modalidad fue replicada tres veces. Los frascos fueron cerrados herméticamente y puestos en un recinto termo-regulado a 20 °C, siendo enseguida analizados con un sistema de termodesorción para la concentración y la inyección de COVs, un cromatógrafo de fase gaseosa equipado de una columna adaptada a su separación y un sistema de detección universal, el Detector de Ionización de Llama (FID) y un espectrómetro de masa (MS).

## Finalidad del estudio

Evaluar la capacidad de ciertos mohos comunes para transformar halofenoles en haloanisoles al interior de las barricas nuevas. Estas observaciones han motivado al laboratorio LEC a hacer evolucionar su sistema de control de barricas para detectar la presencia de estos compuestos en su conjunto.

## Primera fase de la experimentación

Una mezcla de 20 % de granulados de madera de roble no calentada y 80 % con calentamiento medio fue contaminada por maceración en una solución de etanol que contenía los principales halofenoles (TeCP, TCP, PCP, TBP).

La maceración duró 24 h en una solución que contenía 5 µg/L de cada compuesto en una proporción de 100 g de madera por litro de solución.

## Resultados de la primera fase

Luego de 3 semanas, la madera de las 3 réplicas de cada modalidad fue recolectada, secada durante una noche al aire libre y posteriormente analizada según un método interno acreditado por COFRAC. Los resultados obtenidos se encuentran sintetizados en la Tabla 1.

**Tabla 1.** Resultados de los análisis de maderas expresados en µg/kg. \*N.D.: No detectado, es decir inferior al límite de detección del método.

	Modalidad N°1			Modalidad N°2			Modalidad N°3		
	Réplica 1/3	Réplica 2/3	Réplica 3/3	Réplica 1/3	Réplica 2/3	Réplica 3/3	Réplica 1/3	Réplica 2/3	Réplica 3/3
TeCA	N.D*	N.D	N.D	0,8	0,9	0,6	2,2	1,7	2,2
TeCP	17,9	18,5	17,1	13,1	12,8	13,5	9,7	7,7	8,2
TCA	N.D	N.D	N.D	2,2	2,6	1,8	3,7	2,6	1,8
TCP	10,2	10,5	9,5	5,7	4,6	6,5	2,7	2,5	3,2
PCA	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	<0,3	<0,3
PCP	15,9	16,5	15,6	11,7	11,8	12,8	11,0	10,0	9,6
TBA	N.D	N.D	N.D	1,8	2,3	1,4	4,3	3,3	2,9
TBP	14,5	14,6	13,9	10,4	9,8	10,9	6,1	5,1	6,2

Se observa una disminución significativa de las concentraciones en halofenoles en las maderas humedecidas con relación al control negativo. Estas maderas presentan igualmente concentraciones sustanciales de haloanisoles. Estas observaciones son aún más exacerbadas en presencia de harina.

## Presencia de mohos comunes

La identificación de microorganismos presentes en las maderas humedecidas por un laboratorio experto permitió detectar la presencia de *Aspergillus flavus* y *Aspergillus oryzae*, mohos comunes muy conocidos en la industria agroalimentaria (Figura 2). Pareció pertinente verificar si este fenómeno podría haberse producido también en las barricas bajo condiciones de exportación.

## Segunda fase de la experimentación

Tres mini-barricas nuevas de 28 L fueron hidratadas según el protocolo siguiente: 200 mL de agua ultra-pura, dejándolas reposar durante 1 hora sobre cada fondo y 1 hora sobre cada cara lateral. Las barricas fueron enseguida escurridas durante una noche tapón abajo. Tres tratamientos fueron concebidos, con las siguientes características:

- N°1: Enjuague con agua ultra-pura, adición de 1 g de harina después del escurrido.
- N°2: Enjuague con agua, adición de halofenoles.
- N°3: Enjuague con agua, adición de halofenoles, adición de 1g de harina después del escurrido.

Las barricas fueron luego envueltas en filme y conservadas en posición de pie durante 4 semanas en un local temperado (10 a 15 °C, humedad del aire cercana al 40 %).

## Resultados de la segunda fase

Las primeras observaciones fueron las siguientes:

- El seguimiento continuo del interior de una de las barricas permitió determinar que la tasa de humedad del aire permaneció estable alrededor de 90 % (en el caso de un seguimiento de 6 meses en una barrica estándar de 225 L previamente enjuagada y escurrida, la tasa de humedad del aire interior nunca descendió por debajo de 80 %).
- Al cabo de 2 semanas, la presencia de haloanisoles fue observada en la atmósfera interior de las barricas 2 y 3.
- Luego de 4 semanas, colonias de moho eran perfectamente visibles al fondo de la barrica n°2 (Figura 1). Fue entonces necesario desarmar las barricas 2 y 3 para la observación y el análisis de la madera. En la barrica n°3 (Figura 2), los mohos colonizaron totalmente el fondo interior sobre el cual la harina había sido depositada.

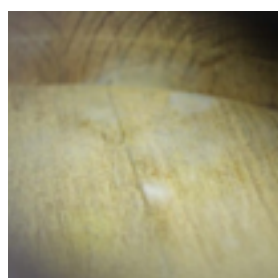


Figura 1. Colonias de moho al fondo de la barrica n°2.



Figura 2. Estado de los fondos de las barricas 2 y 3 luego de haber sido desarmadas.

Muestras de madera fueron tomadas sobre los fondos superiores e inferiores, al igual que la barriga, los resultados están sintetizados en la Tabla 2.

Tabla 2. Resultados de los análisis de la madera de las barricas expresados en µg/kg.

	BARRICA n°2 (+ HALOFENOLES)			BARRICA N°3 (+ HALOFENOLES & HARINA)		
	Fondo Sup.	Fondo Inf.	Barriga	Fondo Sup.	Fondo Inf.	Barriga
TeCA	<0,3	0,5	0,8	1,7	26,1	2,3
TeCP	2,5	9,7	5,1	2,7	12,9	1,7
TCA	<0,3	<0,3	0,5	0,0	6,6	1,0
TCP	0,8	2,2	2,0	0,9	3,1	0,5
PCA	N.D.	0,6	<0,3	0,3	N.D.	0,6
PCP	3,3	21,7	9,4	3,4	79,6	3,4
TBA	0,5	0,8	1,4	1,9	41,0	3,1
TBP	2,9	7,9	7,7	1,9	4,7	0,7

## Conclusiones

- La madera de roble húmeda constituye un sustrato potencial para los mohos comunes, teniendo como factor favorable la presencia de residuos de harina utilizada para sellar los fondos.
- La aptitud de estos microorganismos para convertir en unos cuantos días los precursores halofenoles en haloanisoles odorantes ha sido demostrada en este estudio.
- Es por lo tanto fuertemente recomendado asegurarse de la ausencia de estos precursores en las barricas, y muy particularmente en aquellas destinadas a la exportación. ■

Bertrand Léauté

Laboratoire Expertises et Conseils (LEC), 130 rue Jules Brisson, Cognac, France.

- 1 Lista de los haloanisoles/fenoles analizados de rutina: TCA (2,4,6-tricloroanisol), TCP (2,4,6-triclorofenol), TBA (2,4,6-tribromoanisol), TBP (2,4,6-tribromofenol), TeCA (2,3,4,6-tetracloroanisol), TeCP (2,3,4,6-tetraclorofenol), PCA (Pentacloroanisol), PCP (Pentaclorofenol).
- 2 McAllister, K.A., Lee, H. & Trevors, J.T. (1996). Microbial degradation of pentachlorophenol. *Biodegradation* <https://doi.org/10.1007/BF00056556>
- 3 Allard, A. S., Remberger, M., & Neilson, A. H. (1987). Bacterial O-methylation of halogen-substituted phenols. *Applied and environmental microbiology*, 53(4), 839–845.
- 4 Chatonnet, P., Fleury, A., and Boutou, S. (2010). Identification of a New Source of Contamination of *Quercus* sp. Oak Wood by 2,4,6-Trichloroanisole and Its Impact on the Contamination of Barrel-Aged Wines. *J. Agric. Food Chem.*, 58 (19), pp 10528–10538. <https://doi.org/10.1021/jf102571v>
- 5 McNally, K.J., and Harper, D.B. (1991). Methylation of phenol by chloromethane in the fungus *Phellinus pomaceus*. *Microbiology*. <https://doi.org/10.1099/00221287-137-5-1029>
- 6 Tindale, C. R., Whitfield, F. B., Levingston, S. D. and Nguyen, TH. (1989). Fungi isolated from packaging materials: Their role in the production of 2, 4, 6-trichloroanisole. *J. Sci. Food Agric.*, 49: 437-447. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2740490406>