

Os haloanisóis e as barricas novas: destaque para o papel desempenhado pelos bolores

>>> O estágio do vinho em barricas de carvalho tem desfrutado de um renovado interesse, com o advento da enologia moderna e a demonstração da sua importância para conferir expressão aos melhores vinhos. Com uma capacidade padrão de 225 L, o que representa, potencialmente, 300 garrafas de 75 cL, qualquer acidente adverso que envolva uma barrica pode ser altamente prejudicial para o produtor. Por este motivo, a prevenção da presença accidental de 2,4,6-tricloroanisol (TCA) em barricas tem sido um problema técnico e económico da maior relevância para o setor da tanoaria há vários anos. <<<

O laboratório LEC tem acompanhado de perto este setor e, desde 2012, oferece um sistema de controlo de haloanisóis para barricas novas, baseado no princípio da amostragem dinâmica de compostos orgânicos voláteis (COV)¹. Em 2015, nos Estados Unidos, descobriu-se que um vinho que estagiara numa barrica de carvalho francês possuía uma concentração de 11 ng/L de TCA (2,4,6-tricloroanisol), apesar de ter obtido um resultado negativo nos testes efetuados no final da produção. O vinho continha, igualmente, 82 ng/L de TCF (2,4,6-triclorofenol), um precursor do TCA. Esta concentração altamente invulgar sugeria uma possível conversão natural do TCF em TCA, quer durante a vinificação quer durante o transporte em recipientes. Os ensaios de fermentação malolática na presença de haloanisóis não confirmaram a sua transformação nos correspondentes haloanisóis durante a FML. A existência de bolores com probabilidade de desenvolvimento no interior de barricas novas foi tida em conta. Este fenómeno foi bem documentado em instalações que contêm elementos estruturais de madeira tratados com preparados de pentaclorofenol que, ao longo do tempo e devido à ação do bolor, acabam por contaminar a atmosfera com haloanisóis^{2, 3, 4, 5}.



Após uma secagem de 12 horas, foram colocados 10 g de aparas contaminadas em frascos de 100 mL e tratados de acordo com 3 procedimentos distintos:

- N.º1: Controlo.
- N.º2: Adição de 10 mL de água ultrapura, para manter um ambiente propício ao crescimento microbial.
- N.º3: Adição de 10 mL de água ultrapura e 100 mg de farinha de trigo: método utilizado em tanoaria para produzir uma pasta destinada a selar as tampas da barrica.

Cada procedimento foi efetuado em três réplicas. Os frascos foram hermeticamente selados, colocados numa câmara de temperatura controlada, a 20 °C, e, de seguida, analisados, com recurso a um sistema de dessorção térmica para a concentração e injeção de COV, a um cromatógrafo de fase gasosa, equipado com uma coluna apropriada, para a respetiva separação e a um sistema de deteção universal, com um Detetor de Ionização de Chama (DIC) e um Espectrómetro de Massa (EM).

■ Resultados da primeira fase

Após 3 semanas, o carvalho das 3 réplicas de cada procedimento foi recuperado, secado ao ar livre durante a noite e, posteriormente, analisado segundo um método interno acreditado pelo COFRAC. Os resultados obtidos encontram-se resumidos na Tabela 1.

Tabela 1. Resultados das análises do carvalho, expressos em µg/kg. *N.D. = Não detetado, i.e., abaixo do limiar de deteção do método utilizado.

	Procedimento N.º 1			Procedimento N.º 2			Procedimento N.º 3		
	Ensaio 1/3	Ensaio 2/3	Ensaio 3/3	Ensaio 1/3	Ensaio 2/3	Ensaio 3/3	Ensaio 1/3	Ensaio 2/3	Ensaio 3/3
TeCA	N.D.*	N.D.	N.D.	0,8	0,9	0,6	2,2	1,7	2,2
TeCF	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
TCF	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
PCF	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
TBF	14,5	14,6	13,9	10,4	9,8	10,9	6,1	5,1	6,2

Objeto do presente estudo

Avaliar a capacidade dos bolores comuns de transformarem haloanisóis em haloanisóis no interior de barricas novas. As observações efetuadas levaram o laboratório LEC a desenvolver o seu sistema de controlo de barricas, de modo a analisar a presença de todos estes compostos.

■ Primeira fase da experiência

Uma combinação de 20 % de aparas de carvalho não tostado e 80 % de tostadura média foi contaminada por maceração numa solução etanólica que continha os principais haloanisóis (TeCF, TCF, PCF, TBF). A maceração teve lugar durante 24 horas, numa solução que continha 5 µg/L de cada composto, com um rácio de 100 g de carvalho por litro de solução.

Observou-se uma diminuição significativa das concentrações de halofenóis no carvalho húmido, em comparação com o controlo, apesar das concentrações substanciais de haloanisóis. Estas observações foram ainda mais pronunciadas na presença de farinha.

Presença de bolores comuns

A identificação, por um especialista laboratorial, dos micro-organismos presentes no carvalho húmido tornou possível a deteção da presença do *Aspergillus flavus* e do *Aspergillus oryzae*, bolores comuns frequentemente encontrados na indústria agroalimentar⁶ (Figura 2). Pareceu relevante verificar se este fenómeno era igualmente passível de ocorrência em barricas para exportação.

Segunda fase da experiência

Hidrataram-se três barricas novas de pequena dimensão, com uma capacidade de 28 L, de acordo com o seguinte procedimento: adição de 200 mL de água ultrapura, repouso de 1 hora em cada tampa e 1 hora em cada lado. As barricas foram escorridas durante a noite, em posição invertida, através do orifício do batoque. De seguida, foram submetidas a três procedimentos distintos, com as seguintes características:

- N.º1: Água de lavagem ultrapura, com adição de 1 g de farinha após o escorrimto.
- N.º2: Água de lavagem, com adição de halofenóis.
- N.º3: Água de lavagem, com adição de halofenóis e de 1 g de farinha após o escorrimto.

As barricas foram, seguidamente, envoltas em película retrátil e armazenadas em posição vertical durante 4 semanas, em condições temperadas (10 a 15 °C, humidade relativa de aproximadamente 40 %).

Resultados da segunda fase

As primeiras observações foram as seguintes:

- A monitorização contínua do interior de uma das barricas tornou possível determinar que a humidade permaneceu estável, em cerca de 90 % (no caso da monitorização, ao longo de seis meses, de uma barrica padrão de 225 L previamente lavada e escorrida, a humidade interna nunca atingiu um nível inferior a 80 %).
- Após duas semanas, observou-se a presença de haloanisóis na atmosfera interna das barricas 2 e 3.
- Após 4 semanas, eram claramente visíveis manchas de bolor na tampa da barrica 2 (Figura 1). Foi, portanto, necessário desmontar as barricas 2 e 3 para observação e análise do carvalho.

Na barrica 3 (Figura 2), os bolores colonizaram por completo a tampa inferior, na qual fora colocada a farinha.



Figura 1. Manchas de bolor na tampa da barrica 2.



Figura 2. Estado das tampas das barricas 2 e 3 após a desmontagem.

Recolheram-se amostras de carvalho das tampas superiores e inferiores e das aduelas, cujos resultados se resumem na Tabela 2.

Tabela 2. Resultados das análises do carvalho das barricas, expressos em µg/kg.

	BARRICA 2 (+ HALOFENÓIS)			BARRICA 3 (+ HALOFENÓIS E FARINHA)		
	Tampa superior	Tampa inferior	Aduelas	Tampa superior	Tampa inferior	Aduelas
TeCA	< 0,3	0,5	0,8	1,7	26,1	2,3
TeCF	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
TCF	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
PCF	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
TBF	2,9	7,9	7,7	1,9	4,7	0,7

Conclusões

→ O carvalho húmido é um potencial substrato para bolores comuns, cujo surgimento é favorecido pela presença de resíduos da farinha utilizada para selar as tampas.

→ O presente estudo demonstrou a capacidade destes micro-organismos de converter precursores de halofenóis em haloanisóis fétidos numa questão de dias.

→ Deste modo, recomenda-se enfaticamente que se assegure a ausência destes precursores nas barricas, sobretudo as destinadas a exportação. ■

Bertrand Léauté

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

1 Liste von Haloanisolen/Phenolen, die Gegenstand von Routineanalysen sind: TCA (2,4,6-Trichloroanisol), TCP (2,4,6-Trichlorophenol), TBA (2,4,6-Tribromoanisol), TBP (2,4,6-Tribromophenol), TeCA (2,3,4,6-Tetrachloroanisol), TeCP (2,3,4,6-Tetrachlorophenol), PCA (Pentachloroanisol), PCP (Pentachlorophenol).

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>