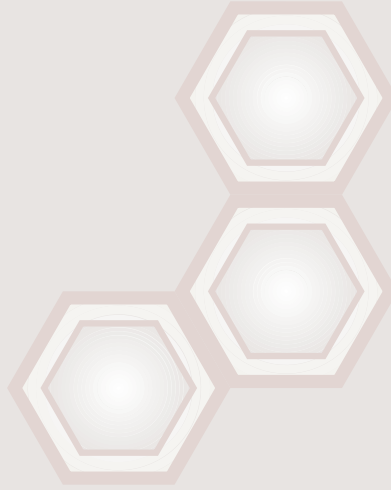
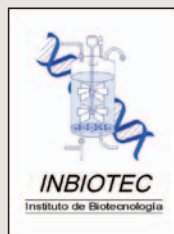


CAUSAS y orígenes de la **contaminación** del **vino** por HALOANISOLES

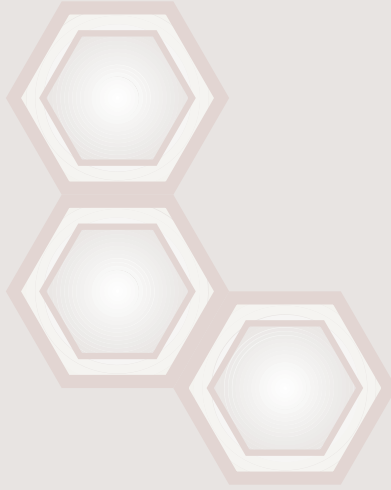
Juan José Rubio Coque
M^a Luisa Álvarez Rodríguez
Raúl Feltrer Martínez



CAUSAS
y orígenes de la
contaminación
del **vino** por
HALOANISOLE



Juan José Rubio Coque
M^a Luisa Álvarez Rodríguez
Raúl Feltre Martínez



EDITA



AGRUPACIÓN SANVICENTEÑA EMPRESARIOS DEL CORCHO

DISEÑOGRÁFICO
PABLOHUESO A.C.S.L

IMPRIME
INFOPRINT S.L.

ESPAÑA
FEBRERO 2005

ÍNDICE

I	INTRODUCCIÓN 7 .
A	LOS <i>HALOANISOLE</i> S	
	COMO CONTAMINANTES DEL VINO:	
	ORIGEN, MICROORGANISMOS	
	PRODUCTORES	
	Y FUENTES DE CONTAMINACIÓN 11 .
B	DIMENSIONANDO EL PROBLEMA DEL TCA 27 .
C	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES 37 .
	BIBLIOGRAFÍA 43 .

INTRODUCCIÓN

La contaminación del vino con **aromas y/o sabores que podríamos denominar fúngicos o a moho** es uno de los problemas más importantes que afectan a las bodegas de todo el mundo.

Tradicionalmente, de forma errónea, este fenómeno se ha asociado en exclusiva al corcho, que supuestamente actuaría como transmisor al vino de los denominados científicamente **cloroanisoles** (sobre todo *2,4,6-tricloroanisol*, conocido comúnmente por sus siglas: *TCA*); este compuesto es capaz de conferir al vino un desagradable y penetrante aroma fúngico a concentraciones muy bajas (del orden de 2-4 ng/l).

En consecuencia **el fenómeno se ha venido denominando “cork taint” o contaminación del corcho**, cuando, para ser rigurosos, habría que hablar de **contaminación por cloroanisoles**. El empleo masivo e indiscriminado de este termino ha contribuido a difundir la idea entre el personal técnico de bodegas, e incluso entre el público en general, de que la contaminación del vino por cloroanisoles es atribuible siempre y exclusivamente al tapón de corcho, algo falso según las últimas investigaciones llevadas a cabo.

Sin embargo, dicha contaminación puede aparecer **en otros alimentos o, incluso, en el agua de consumo público**. Se trata de un hecho bien documentado y más extendido de lo que podría pensarse, que no afecta exclusivamente al sector vitivinícola.

Además, los estudios realizados por diferentes grupos de investigación indican que **el fenómeno de la contaminación del vino por anisoles es más complejo de lo que se suponía**. A este problema contribuyen varios compuestos químicos y factores, que en ningún caso permiten atribuir la culpabilidad del problema exclusivamente al tapón de corcho.

De esta manera, **cada vez es más evidente que un porcentaje elevado de los vinos contaminados se debe a procesos de contaminación producidos en la propia bodega**.

En este informe repasaremos de la manera más exhaustiva posible el estado actual del tema, revisando los últimos estudios realizados y las perspectivas futuras en relación con este problema.

El sabor a moho, indicador de una contaminación agroalimentaria

El sabor y/o aroma a moho o a humedad del vino es consecuencia de la presencia en el ambiente (ya sea el aire, agua, madera, etc.) de microorganismos (especialmente hongos filamentosos), los cuales al entrar en contacto con una serie de pesticidas de alta toxicidad utilizados industrialmente (*halofenoles*), desarrollan una reacción de defensa que les lleva a producir *haloanisoles*. Estos pesticidas son los *clorofenoles*, *fluorofenoles*, *yodofenoles* y *bromofenoles* (ver figura 1).

Los *haloanisoles* son contaminantes muy importantes capaces de arruinar las propiedades organolépticas naturales de cualquier vino. Sus características más importantes son:

- A** En primer lugar producen desagradables olores denominados como **fúngicos** o a moho (olores mohosos) o como olores y aromas propios de **humedad**. Cuando la concentración de *2,4,6-TBA* es particularmente elevada se pueden percibir además aromas yodados o fenólicos.
- B** En segundo lugar tienen un **umbral de percepción olfativa muy bajo**, del orden de ng/l (1 ng o nanogramo corresponde a 10^{-9} gramos). Este hecho es muy significativo ya que **una cantidad muy pequeña de ciertos *haloanisoles* se percibe con claridad a través de gusto y olfato**. Los umbrales de percepción de los principales *haloanisoles* identificados como contaminantes de vino en solución acuosa y/o alcohólica se recogen en la **tabla 1**.
- C** Generalmente son **muy volátiles**, capaces de transmitirse a través del aire y con una gran facilidad para adherirse y contaminar la madera, el corcho y también otros materiales (**polímeros plásticos, siliconas, cartón y papel, gomas, resinas, etc.**).

Estas características determinan que al aparecer como contaminantes en alimentos, incluso a niveles muy bajos, produzcan desagradables sensaciones (olores y sabores) a moho que hacen desaconsejable su consumo.

Una contaminación que puede afectar a cualquier producto alimentario

Los primeros datos de contaminación de vinos por *cloroanisoles* y más concretamente por *TCA*, datan de la década de los años 80 del pasado siglo (Tanner *et al.*, 1981; Buser *et al.*, 1982). En un trabajo posterior (Amón *et al.*, 1989) se identificaron varios compuestos químicos diferentes responsables de la contaminación en vinos, señalándose al *2,4,6-TCA* como el agente contaminantes más importante.

Sin embargo, la detección de cloroanisoles (especialmente *2,4,6-TCA* y *2,3,4,6-tetracloroanisol* o *2,3,4,6-TeCA*) como contaminante de otros alimentos fue previa a su detección en vino:

- Así en **1966** Engel y colaboradores detectaron un **lote de pollos y huevos contaminados** con *2,3,4,6-TeCA*.
- Unos años más tarde se demostró que el ***2,3,4,6-TeCA* era el agente responsable del mal olor de un lote de pollos** (Curtis *et al.*, 1972 y 1974).
- También se ha demostrado la implicación del *2,4,6-TCA* y el *2,3,4,6-TeCA* como los compuestos responsables del desagradable olor y sabor de un **lote de frutas secas** (Whitfield *et al.*, 1985; Tindale *et al.*, 1989) y de una **partida brasileña de café contaminada** con un desagradable olor fúngico (Spadone *et al.*, 1990).
- Estos compuestos también han sido señalados como productores de olores y sabores desagradables **en agua para el consumo humano** (Nystrom *et al.*, 1992).

A

LOS HALOANISOLES COMO CONTAMINANTES DEL VINO: ORIGEN, MICROORGANISMOS PRODUCTORES Y FUENTES DE CONTAMINACIÓN

Halofenoles y haloanisoles: composición química y estructura

Los *haloanisoles* (*cloroanisoles* y *bromoanisoles*) reconocidos como los enemigos declarados del vino más importantes son el *2,4,6-tricloroanisol* (*2,4,6-TCA*), el *2,3,4,6-tetracloroanisol* (*2,3,4,6-TeCA*), el *pentacloroanisol* (*PCA*) y el *2,4,6-tribromoanisol* (*2,4,6-TBA*) cuya estructura podemos apreciar en la **figura 1**.

Estructuralmente son compuestos derivados del *anisol* o *metoxibenceno*, e incluyen en su composición uno o más átomos de un *halógeno*. El *anisol* es un compuesto presente en una gran número de sustancias volátiles que suelen ser muy olorosas, mientras que los *halógenos* son cuatro: *flúor* (F), *cloro* (Cl), *bromo* (Br) y *yodo* (I). Por eso los anisoles que resultan de su interacción son llamados *fluoroanisoles*, *cloroanisoles*, *bromoanisoles* y *yodoanisoles*. La estructura química de los principales *haloanisoles* (y los *halofenoles* de los que proceden) implicados en la contaminación del vino se recoge en la **figura 1**.

Desde un punto de vista biológico los *haloanisoles* se originan por una reacción bioquímica de defensa conocida como *biometilación* que tiene lugar en determinados microorganismos (fundamentalmente *hongos filamentosos*). Ante una agresión externa de los *halofenoles* (pesticidas muy tóxicos), el hongo es capaz de transformarlos en *haloanisoles* no tóxicos (**ver figura 4**).

La formación de *haloanisoles* es, por tanto, un mecanismo de supervivencia para muchos microorganismos (hongos y bacterias) cuando entran en contacto con *halofenoles* tóxicos.

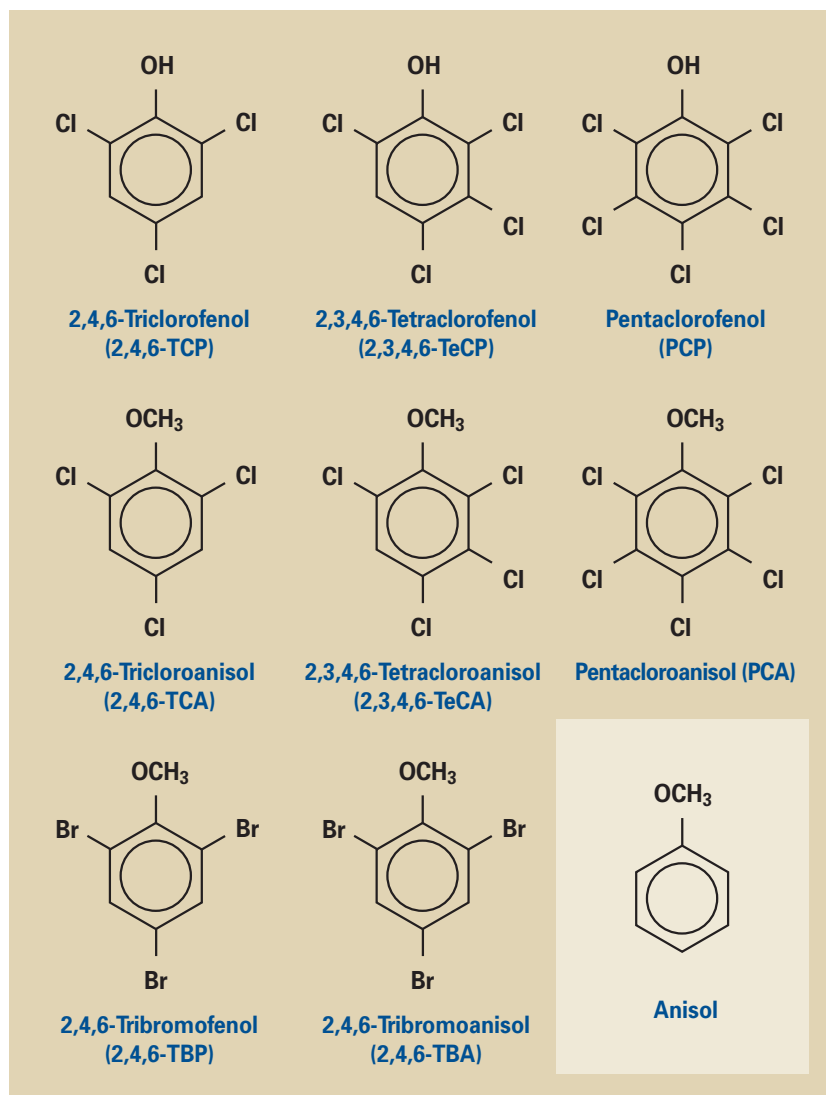


Figura 1. Estructura química del *anisol* y los principales fenoles halogenados y *haloanisoles* implicados en la contaminación del vino.

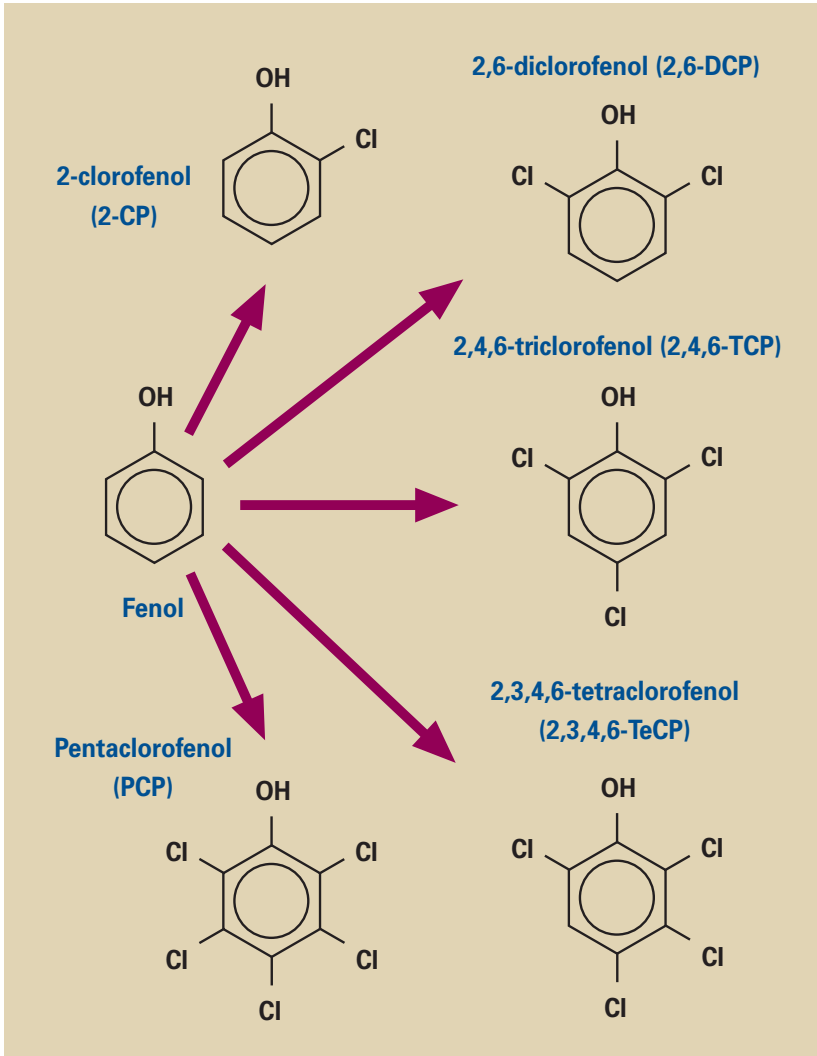
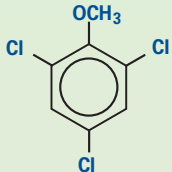
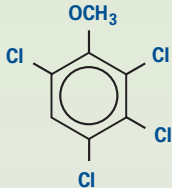
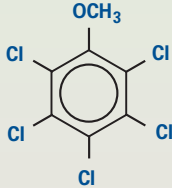
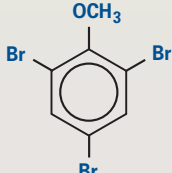


Figura 2. Estructura del *fenol* y de varios *clorofenoles* derivados portadores de uno a cinco átomos de cloro.

De manera análoga los *bromofenoles*, *fluorofenoles* y *yodofenoles* serían estructuralmente idénticos excepto por el halógeno que llevan en su estructura (*bromo*, *fluor* y *yodo* respectivamente).

Tabla 1. Umbrales de percepción de los principales *haloanisoles* implicados en la contaminación del vino según diversos autores.

COMPUESTO	UMBRAL DE PERCEPCIÓN	ESTRUCTURA
2,4,6-TCA	En solución acuosa: 30 – 300 pg/l* (a, b) En solución alcohólica (vino): 1.5 – 3 ng/l* (c)	
2,3,4,6-TeCA	En solución acuosa: 4 ng/l (a) En solución alcohólica (vino): - 10 – 15 ng/l en vinos tranquilos (d) - 5 ng/l en vinos espumosos (d)	
PCA	Compuesto poco oloroso Umbral de percepción > 50 µg/l* (d)	
2,4,6-TBA	En solución acuosa: 8 - 30 pg/l (e, f, g, i) En solución alcohólica (vino): 3.4 ng/l (d)	

* µg o microgramo (equivale a 10^{-6} gramos); ng o nanogramo (equivale a 10^{-9} gramos); pg o picogramo (equivale a 10^{-12} gramos)

(a): Curtis et al., 1972; (b): Griffiths, 1974; (c): Duerr, 1985

(d): Chatonnet, P., 2004

(e): Saxby et al., 1982; (f): Whitfield et al., 1997; (g): Malleret y Bruchet, 2002

Origen ambiental de los *clorofenoles* y *cloroanisoles* que contaminan corcho, madera y otros materiales



Cuadro 2. ¿Por qué existe la contaminación en corcho y/o bodegas?

Los *halofenoles* más ampliamente utilizados por el hombre son los *clorofenoles* y los *bromofenoles*. Estos compuestos se transforman en *anisoles* por la acción biológica de determinados microorganismos, fundamentalmente hongos filamentosos (como una cepa de *Trichoderma longibrachiatum* aislada a partir de corcho en nuestro laboratorio) capaces de llevar a cabo la reacción química que se indica en la **figura 4** (Coque *et al.*, 2003).

Los *clorofenoles* no son sustancias creadas por la naturaleza, sino que han sido producidos artificialmente por el hombre. Por eso, apenas existen microorganismos capaces de degradarlos por lo que son compuestos muy recalcitrantes: **persisten de forma tenaz en la naturaleza durante periodos de tiempo considerables** (hasta decenios).

Algunos autores apuntan a que los *clorofenoles* podrían formarse además durante el proceso de cloración del agua mediante reacción del *hipoclorito sódico* con *fenoles* disueltos en ella (Nystrom *et al.*, 1992), mientras que también se ha sugerido que en el corcho podría formarse durante el blanqueo de los tapones con lejía (práctica hoy ya en desuso).

Los *clorofenoles*, especialmente el *pentaclorofenol (PCP)* y el *2,4,6-triclorofenol (2,4,6-TCP)* son dos de los pesticidas más ampliamente utilizados. Además las preparaciones de *PCP* suelen estar contaminadas con un 2-8% de *2,3,4,6-tetraclorofenol (2,3,4,6-TeCP)*.

Su amplio uso se debe a:

- son **muy fáciles de sintetizar** para las industrias químicas
- son **muy baratos**
- son liposolubles (**solubles en grasas**) por lo que atraviesan las membranas de los seres vivos
- son **muy tóxicos**. La toxicidad se debe a su capacidad para reaccionar y destruir las proteínas y el material genético o ADN de los seres vivos.

Los *clorofenoles* han sido **ampliamente utilizados durante décadas como pesticidas (antifúngicos) y preservantes de la madera**, tanto en agricultura como en la industria, **para evitar el crecimiento de hongos sobre madera**, embalajes (cartón) y pieles, y en menor medida en **granos (cereales) y cultivos**. Como consecuencia han llegado a ser uno de los grupos más importantes de contaminantes que pueden ser hallados en prácticamente cualquier ecosistema (Chaudhry y Chapalamadugu, 1991). Algunos estudios han demostrado que el *2,4,6-TCP* y el *2,4,6-TCA* son **contaminantes normales de los ecosistemas acuáticos de agua dulce en Suecia** (Nystrom *et al.*, 1992). Este hecho se agrava por su resistencia a la degradación, lo que les hace persistir en los ecosistemas naturales durante muy largos periodos de tiempo.

El empleo de *clorofenoles* está actualmente prohibido en Europa ya que se sospecha que son cancerígenos. Sin embargo, continúan siendo ampliamente utilizados en países en desarrollo (Asia y África principalmente).

A la vista de estos datos podemos afirmar que las posibles contaminaciones que afectan al sector del vino se pueden producir a dos niveles:

- Contaminaciones del corcho producidas directamente en el bosque de alcornoques por exposición a *clorofenoles*, o contaminación del corcho durante el proceso de manufactura del tapón en la industria corchera.
- Contaminación del vino, o del tapón, durante su almacenaje en la propia bodega generalmente por contaminación de la madera de estructuras (techos y paredes), toneles y barricas o estantes donde reposan las botellas.

Los *bromofenoles* son, tras los *clorofenoles*, los compuestos más ampliamente utilizados, especialmente el *2,4,6-tribromofenol (2,4,6-TBP)*. Este compuesto se puede encontrar de manera natural en ambientes marinos ya que es sintetizado por algunas algas pardas como una manera de eliminar un exceso de bromo (Flodin y Whitfield, 1999).

Sin embargo, los *bromofenoles* son producidos en grandes cantidades por las industrias químicas. Su empleo fundamental es como retardantes de llama en pinturas, barnices y elementos plásticos, aunque debido a la prohibición del empleo de *clorofenoles* como fungicidas en Europa se emplean cada vez más con este fin, ya que su uso no está restringido.

La aparición de *bromofenoles* y *bromoanisoles* en el vino está en relación directa con su presencia en bodegas (Chatonnet, 2004) a donde podrían llegar a través de pinturas, barnices y maderas tratadas.

La contaminación del vino

Los estudios realizados por nuestro grupo de investigación al respecto nos han permitido obtener varias conclusiones importantes (referencias Álvarez-Rodríguez *et al.*, 2002a y 2004 y Coque *et al.*, 2003).

a) el único mecanismo efectivo para explicar la formación de *cloroanisoles* a niveles apreciables, tanto en bodega como en corcho, es la transformación del pesticida *2,4,6-TCP* por biometilación en *2,4,6-TCA* (ver reacción química en figura 4).

b) Este pesticida puede contaminar tanto las planchas de corcho en las fábricas, como los palés y estanterías de madera en las bodegas, y es transformado a *2,4,6-TCA* por una amplia variedad de microorganismos, principalmente hongos filamentosos.

c) Esta transformación es llevada a cabo por aquellos microorganismos que poseen una proteína (enzima) llamada *clorofenol O-metiltransferasa* (CPOMT) que puede metilar una amplia variedad de *clorofenoles* para sintetizar los correspondientes *cloroanisoles*.

d) Una única enzima, la CPOMT, es responsable de la síntesis de todos los *anisoles* que afectan al vino: *2,4,6-TCA*, *2,3,4,6-TeCA*, *PCA* y *2,4,6-TBA*.

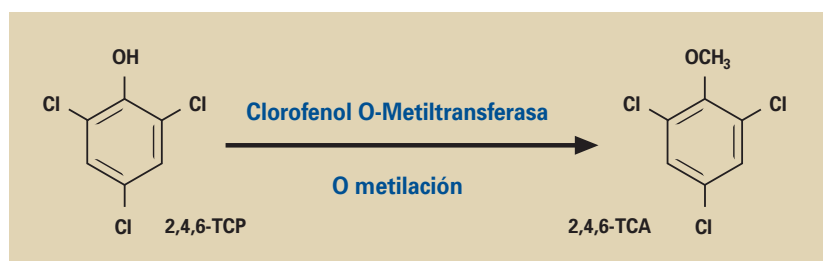


Figura 4. Mecanismo de formación por el hongo *Trichoderma longibrachiatum* de *2,4,6-TCA* por O metilación de *2,4,6-TCP* en una reacción catalizada por el enzima *Clorofenol O-metiltransferasa* (CPOMT).

¿Por qué los hongos filamentosos producen *cloroanisoles*?

Hoy está totalmente demostrado que los hongos filamentosos naturales sólo sintetizan *cloroanisoles* cuando entran en contacto con *clorofenoles*.

Los *clorofenoles* se encuentran actualmente como contaminantes de aguas, suelos, material vegetal (como hojarasca de bosques) e incluso la atmósfera. La razón de ello es su uso y producción indiscriminada durante los últimos decenios a razón de varios millones de toneladas anuales. Esto, unido a su elevada resistencia a su biodegradación ambiental, ha producido su acumulación en todos los ecosistemas que se analizan.

Debido a su elevada toxicidad, precisamente por eso se usan como fungicidas y pesticidas, cuando un hongo filamentoso entra en contacto con los *clorofenoles* intenta por todos los medios su inactivación (destoxificación o eliminación de su toxicidad) ya que en caso contrario podría morir o sufrir daños importantes que afecten a su fisiología.

Para ello los hongos han desarrollado dos estrategias diferentes que podemos apreciar en la **figura 5**:

I) Cuando un hongo filamentoso entra en contacto con el *2,4,6-TCP* como mecanismo de defensa produce enzimas tipo *lacasas* que son secretadas al exterior de la célula para degradar allí los *clorofenoles*, evitando que entren en la célula donde pueden dañar al hongo filamentoso.

II) Sin embargo, los *clorofenoles* son compuestos liposolubles que pueden llegar a atravesar la pared y la membrana celular del hongo para alcanzar su interior (citoplasma y núcleo) donde pueden dañar irreversiblemente proteínas importantes, o incluso su material genético (ADN). Ante esta amenaza el hongo se defiende produciendo inmediatamente la enzima *CPOMT* (*Clorofenol O-metiltransferasa*), descubierta en nuestro laboratorio, y que es la responsable de transformar el *2,4,6-TCP* tóxico, en un compuesto inofensivo, el *2,4,6-TCA*. Éste es expulsado de la célula y así el *2,4,6-TCA* pasa directamente y se adhiere al corcho, la madera o cualquier otro material sobre el que el hongo está creciendo, puesto que el mecanismo es el mismo en todos los casos.

Esta estrategia de defensa es muy común entre los hongos filamentosos, de manera que la mayor parte de los hongos, presentes tanto en corcho como en bodegas, pueden sintetizar *anisoles*. Además en nuestro laboratorio hemos demostrado que esta enzima puede actuar sobre distintos *clorofenoles* y *bromofenoles*. Por tanto, la enzima CPOMT es la responsable de la formación de todos los *anisoles* (*cloroanisoles* y *bromoanisoles*) que contaminan el vino.

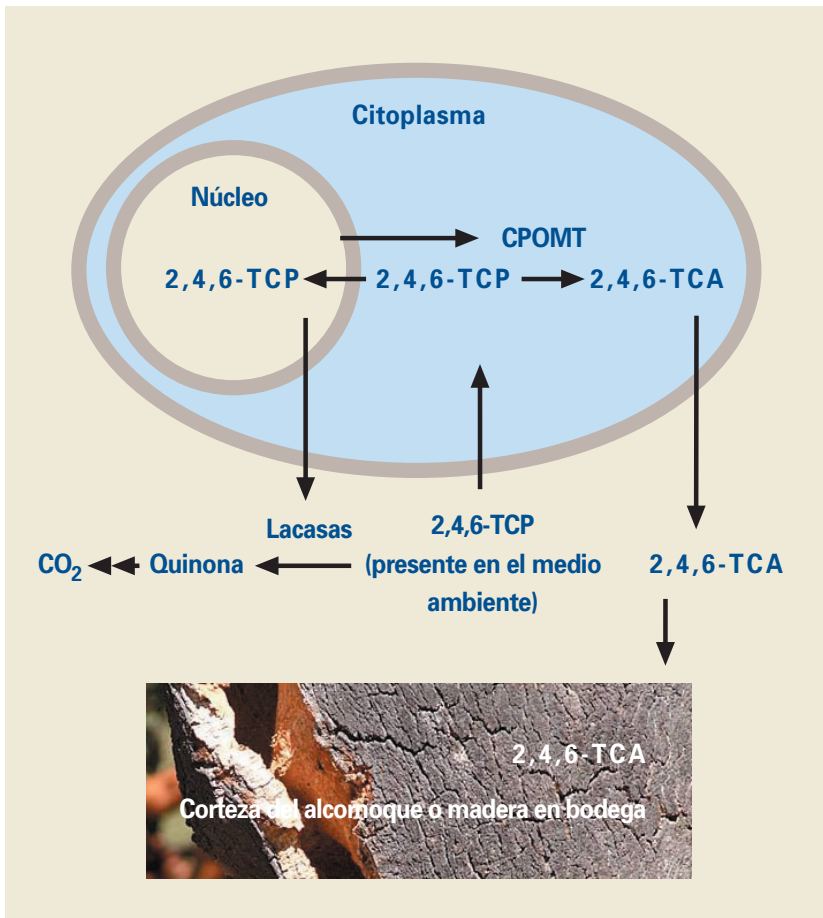


Figura 5. Mecanismos de biotransformación del 2,4,6-TCP por hongos filamentosos y origen del 2,4,6-TCA (y otros *anisoles*) en corcho y madera.

Descubriendo el verdadero origen de la contaminación

Los datos científicos expuestos demuestran que el **verdadero origen de la contaminación del vino por *cloroanisoles*** es un **problema de contaminación ambiental y no del empleo de tapones de corcho defectuosos**.

Sin embargo, partiendo del hecho de que un número limitado de casos puede deberse al empleo de tapones defectuosos, no podemos dejar de afirmar que el enfoque, hasta ahora clásico, de culpar casi exclusivamente al tapón de corcho es demasiado simplista y requiere un análisis más riguroso, puesto que **existen diferentes fuentes de contaminación**. De hecho, **es posible detectar en bodegas vinos contaminados que nunca han estado en contacto con corcho** (Chatonnet *et al.*, 2004).

Contaminaciones atribuibles al corcho

Varios estudios realizados indican que los tapones de corcho serían los responsables de un número significativo de casos de contaminación, aunque no existen estudios rigurosos que confirmen con veracidad el porcentaje de casos que realmente serían achacables al tapón.

Así, existe **cierta confusión cuando se habla de contaminaciones atribuibles al corcho**, pudiendo considerar dos situaciones claramente diferentes:

I) El tapón de corcho como elemento contaminante. En este caso el tapón cuando llega a la bodega posee unos niveles de *haloanisoles* inaceptables. El **origen** de contaminación puede ser básicamente doble.

- En ocasiones la contaminación se produciría en el **propio alcornoque**, cuando su corteza absorbe *halofenoles* que son **transportados por la atmósfera o por el agua de lluvia**, o bien que alcanzan de manera accidental el alcornoque. Los *halofenoles* son compuestos muy tóxicos para los seres vivos (por eso se usan como pesticidas) y los hongos filamentosos que crecen en la superficie del alcornoque los destoxifican transformándolos en *haloanisoles* que quedan adheridos al corcho. Esta contaminación se puede arrastrar a lo largo de todo el proceso productivo, contaminando finalmente el tapón.
- En otros **casos las planchas de corcho llegan limpias de *haloanisoles* a las fábricas corcheras**. Sin embargo, el tapón producido está contaminado.

- En este caso podemos afirmar de manera concluyente que **en la fabrica existen uno o más puntos que producen la contaminación del corcho**, emitiendo *halofenoles* y/o *haloanisoles* que son absorbidos por el corcho a lo largo del proceso productivo contaminando finalmente el tapón.

II) El tapón de corcho como elemento transmisor de una contaminación existente en bodega. Ocasionalmente el tapón puede llegar limpio a la bodega donde se contaminaría debido a la existencia de materiales contaminados con *halofenoles* y/o *haloanisoles* en la misma.

En este caso el tapón puede absorber estos compuestos para a continuación transferirlos al vino. **El tapón de corcho actúa como vehículo transmisor de la contaminación, pero el origen de la misma se encuentra en la bodega.**

Es posible que un porcentaje elevado de contaminaciones atribuidas al corcho pertenezcan a esta categoría, siendo la bodega la principal responsable de la contaminación. Por otro lado, **el análisis que podemos hacer es diferente en función del tipo de tapón:**

- **Tapón compuesto o aglomerado.** El análisis de diferentes muestras de granulado de corcho a partir del que se fabrican los tapones de corcho compuestos (o tapones aglomerados) indica que **este material tiene unos niveles basales, aunque muy bajos, de contaminación** (Álvarez-Rodríguez *et al.*, 2002a) que puede transmitir al vino.
- **Tapón natural.** En el caso de tapones naturales se ha estimado que el nivel medio de contaminación es del 5.6% (Soleas *et al.*, 2002). Sin embargo, el problema que plantean las partidas de tapón natural es que tapones de un mismo lote, e incluso de un mismo árbol, pueden presentar niveles de contaminación diferentes dependiendo fundamentalmente de:
 - Que el árbol del cual proceden estuviese o no contaminado.
 - De su procedencia dentro de un mismo árbol. Con frecuencia las planchas de corcho exhiben un gradiente de contaminación por *cloroanisoles* que disminuye desde el pie de la planta hacia las ramas.
 - De problemas puntuales de contaminación en la fábrica de tapones.

Comportamiento del tapón de corcho frente a los cloroanisoles

El comportamiento del corcho frente al *TCA* se rige por unos principios fundamentales:

- El tapón de corcho, como la madera en general y el plástico, tiene una alta capacidad para absorber *cloroanisoles* transmitidos por vía aérea sin que medie contacto directo con la fuente primaria de contaminación. Esta absorción es muy rápida y puede tener lugar en periodos muy cortos de tiempo (24 horas) (Barker *et al.*, 2001). Esto quiere decir que en caso de existir una contaminación en la bodega el corcho podría absorber los *cloroanisoles* para luego cedérselos al vino, no siendo el problema primario en este caso el tapón de corcho.
- El tapón de corcho sólo es capaz de ceder al vino el *2,4,6-TCA* presente en aquellas superficies que entran en contacto con el vino (Pollnitz *et al.*, 1996; Capone *et al.*, 1999 y 2002). Si la contaminación se localiza en la parte interna o central del corcho ésta no va a pasar al vino. Algunos estudios indican que el porcentaje medio de *2,4,6-TCA* que un tapón de corcho cede al vino tras un periodo de 12 meses en botella no supera el 12%.
- El tapón de corcho puede absorber de manera muy rápida la mayor parte de los cloroanisoles presentes en un vino que esté contaminado previamente al embotellado. El 80% del *TCA* se absorbe durante las primeras 24 horas y el nivel de absorción aumenta hasta el 90% a las 48 horas de contacto (Capone *et al.*, 1999) quedando el vino prácticamente libre de *cloroanisoles*.
- Este estudio es muy importante porque sugiere que cuando se detecta un tapón de corcho contaminado que ha estado en contacto con un vino pudiera ocurrir que la contaminación primaria fuese del vino y no del corcho. La única manera de saber si la contaminación proviene del vino o del tapón es realizar un extenso análisis de vinos y tapones contaminados. Si no existe una relación directa entre las cantidades de *2,4,6-TCA* detectadas en el tapón y el vino, la contaminación sería atribuible al corcho. Si por el

contrario, los tapones y el vino están contaminados de manera uniforme la fuente primaria de contaminación sería el vino.

- Esta absorción se produce sólo en los 2 mm externos del tapón de corcho, no penetrando el *2,4,6-TCA* hacia el interior del tapón (Barker *et al.*, 2001).
- El contenido de *2,4,6-TCA* de un tapón puede ser uniforme y entonces la contaminación habría sucedido a lo largo de un periodo de tiempo muy largo en el árbol, o por el contrario puede concentrarse en la parte más externa del tapón (Howland *et al.*, 1997). En este caso la contaminación habría ocurrido en algún momento posterior a la extracción del tapón de la plancha de corcho, bien sea en la fábrica de tapones o en la bodega (presumiblemente durante su almacenamiento).
- La adición de *2,4,6-TCA* en la parte externa de un tapón de corcho utilizado como cierre de una botella de vino no produjo la contaminación del vino después de 3 años, lo cual sugiere que el tapón de corcho no permite el paso de *2,4,6-TCA* al interior de la botella y por tanto representa una barrera efectiva para la contaminación de vino por un *TCA* exógeno (Capone *et al.*, 2002).

Conjuntamente todos estos datos indican que cuando se detecta un vino cerrado con tapón de corcho y contaminado con *haloanisoles* no podemos afirmar, sin ninguna duda, que la fuente primaria de contaminación sea el corcho. Para hacerlo, serían necesarios análisis adicionales para descartar que el problema de contaminación se debiera al vino.

Contaminaciones de vinos no atribuibles al corcho: contaminaciones previas al embotellado

Como hemos indicado en el apartado anterior, cada vez son más las evidencias que sugieren que un porcentaje muy importante del total de contaminaciones de vino por *haloanisoles*, en las que la culpa se ha hecho recaer sobre el corcho, son atribuibles a otros elementos.

De hecho existen varios ejemplos de vinos contaminados que no han entrado en contacto con el corcho, por lo que se trata de casos donde la contaminación tiene lugar en las bodegas. Entre ellos podemos citar:

- Se han detectado vinos que contenían **2,4,6-TCA, PCA y 2,3,4,6-TeCA** donde la contaminación provenía de la **presencia en la bodega de madera portadora de estas sustancias**: estructura de madera de techos o incluso barricas (Chatonnet *et al.*, 1994). El análisis de estas maderas indicó que contenían cantidades elevadas de varios *clorofenoles*. **Se supone que dicha madera debió ser tratada con PCP y/o 2,4,6-TCP como fungicidas, compuestos que en el ambiente húmedo de la bodega habrían sido convertidos a *cloroanisoles* por hongos filamentosos.** Estos compuestos son muy volátiles por lo que pueden ser transmitidos a través del aire para contaminar el vino y otros lugares y elementos de la bodega.

- En el caso de la **contaminación por 2,4,6-TBA** se han descrito **tres situaciones** diferentes (Chatonnet *et al.*, 2004):
 - **Bodega A.** La contaminación se detectó en vinos **almacenados tanto en barricas de roble (12 ng/l) como en cubas de acero inoxidable (2 ng/l)** y también en la **atmósfera de la bodega (46-162 ng/g adsorbente)** y en las **barricas de roble donde maduraba el vino (143-224 ng/g madera)**. Los niveles detectados del precursor **2,4,6-TBP** fueron incluso mayores, detectándose la mayor contaminación en barricas de roble de 24 meses de antigüedad, dato que sugiere que se trata de la fuente primaria de contaminación. Este compuesto se transformaría parcialmente en **2,4,6-TBA** por hongos filamentosos. Una vez formado, se transmitió a diferentes lugares de la bodega por vía aérea.

 - **Bodega B.** En este caso la **fente primaria de contaminación fueron barricas de roble eliminadas varios años antes**. Sin embargo, cantidades residuales de **2,4,6-TBP y 2,4,6-TBA (15-122 ng/g adsorbente)** fueron detectadas en la **atmósfera de la bodega**, desde donde **estos compuestos contaminaron las nuevas barricas adquiridas y el vino en ellas envejecido (13-78 ng/l)**.

 - **Bodega C.** En el caso de esta bodega los **vinos envejecidos en barricas de roble estaban fuertemente contaminados con 2,4,6-TBP y 2,4,6-TBA (13-108 ng/l)**. Los niveles más elevados de **2,4,6-TBP (82363 ng/g)** se encontraron en el **recubrimiento de madera de la bodega y en la pintura blanca que recubría parte de las paredes (4933 ng/g)**.

Se supone que la vía de entrada de este compuesto en la bodega habría sido la pintura o la madera empleada en su construcción; desde estas estructuras y por vía aérea el *2,4,6-TBP* y el *2,4,6-TBA* acabaron contaminando el resto de elementos de la bodega, especialmente las barricas de roble y los tapones de silicona utilizados para sellar las barricas. Estos elementos en contacto directo con el vino serían los que acabaron provocando su contaminación.

EN RESUMEN

La aparición de sabor u olor a “moho” en el vino no es solo atribuible al corcho

- EITCA , causante del olor a moho que aparece en el vino, puede estar en el aire y el agua de las bodegas, de donde pasa a madera, corcho, parafinas o plásticos.
- El tapón de corcho es sometido durante su fabricación a numerosos controles para evitar la contaminación con *halonisoles*. (Ver www.celiege.com)
- El corcho sólo puede contaminar al vino cuando los halonisoles se localizan en la superficie que va a estar en contacto con éste. La contaminación presente en la parte central o interna del tapón no se transmite al vino.
- El vino que se ha contaminado por TCA puede transmitir al tapón su contaminación. De hecho, el corcho es capaz de absorber gran parte de los halonisoles presentes en un vino, disminuyendo su nivel de contaminación.
- Un tapón de corcho libre de TCA proporciona una garantía absoluta para conservar a salvo un vino embotellado y almacenado en una bodega contaminada.

B

DIMENSIONANDO EL PROBLEMA DEL TCA

Contaminación de vinos por *cloroanisoles*: situación actual del problema

A pesar de ser uno de los grandes problemas del sector vitivinícola existen grandes discrepancias sobre la incidencia real y la cuantificación de las pérdidas económicas que produce la contaminación por *TCA*, debido sobre todo a la falta de transparencia con la que las bodegas y las empresas que manufacturan corcho afrontan la situación.

Pérdidas económicas de las bodegas por *cloroanisoles*

La cuantificación objetiva de las pérdidas económicas que sufren las bodegas de todo el mundo por la contaminación con *cloroanisoles* es casi imposible de realizar. Algunos datos publicados al respecto que se deben tomar con total cautela son los siguientes:

- Según Butzke y colaboradores (1999) este fenómeno supone a las bodegas de todo el mundo unas pérdidas anuales de 10.000 millones de dólares, incluyendo las debidas a fugas y oxidaciones causadas por defectos físicos del corcho (Butzke *et al.*, 1999). A todas luces este dato es totalmente erróneo y supervalorado.
- Otros expertos del sector, como Pascal Chatonnet, opinan que las **pérdidas acumuladas históricamente por las bodegas** desde que se empezó a conocer este problema ascenderían a unos 1.000 millones de dólares (declaraciones realizadas por el Dr. Chatonnet a El Mundo Vino y recogidas el 19/01/2004 en <http://elmundovino.elmundo.es>).

Frecuencia de contaminación del vino por *haloanisoles*

Los datos numéricos sobre la incidencia real de la contaminación del vino por *cloroanisoles* son muy discrepantes dependiendo de que el estudio proceda de un sector afín al corcho, al mundo de las bodegas o del sector de los tapones sintéticos. **Ciñéndonos a estudios científicos podemos aportar los siguientes datos:**

- Lee y Simpson en 1993 detectaron que el nivel de contaminación de los vinos se situaría entre el 0.5-6% (Lee y Simpson, 1993).

Posteriormente se ha sugerido una incidencia del problema que oscilaría entre el 2-7% del total de botellas (Butzke *et al.*, 1999).

- Uno de los estudios más completos ha sido realizado recientemente por **Soleas y colaboradores (2002)** llegando a analizar un total de **2400 vinos diferentes**. El estudio consistió en una cata realizada por reconocidos expertos capaces de detectar organolépticamente *2,4,6-TCA* a concentración igual o superior a 2 ng/l. Las conclusiones que se pueden extraer de este estudio son las siguientes:

I).- El nivel general de contaminación para todos los vinos analizados fue del 6.1%.

II).- El posterior análisis por cromatografía de gases-masas de 145 vinos contaminados detectados por este estudio confirmó que 74 (51%) poseían niveles de *2,4,6-TCA* superiores a 2 ng/l (umbral de percepción). **Estos datos sugieren que en el 49% de los vinos restantes la contaminación podría deberse a otros compuestos no analizados.**

NUEVAS AMENAZAS PARA LOS VINOS: LA CONTAMINACIÓN POR *2,4,6-TRIBROMOANISOL (2,4,6-TBA)* Y *PIRAZINAS*

Aunque tradicionalmente se ha venido culpando a los *cloroanisoles* como los principales agentes responsables de la contaminación del vino con desagradables aromas y sabores fúngicos, cada vez **existen más evidencias que indican que existen otros compuestos responsables de este problema.**

Las dos más destacables son:

- El estudio realizado por **Soleas y colaboradores** en 2002 indica que de los 145 vinos contaminados sólo el 51 % (74) poseían niveles de *2,4,6-TCA* superiores a 2 ng/l (umbral de percepción). **Este resultado claramente indica que en el caso de los 71 vinos contaminados restantes la contaminación no es atribuible a *2,4,6-TCA* sino a otros compuestos.**
- Desafortunadamente en este trabajo no se ensayaron niveles en vino de otros *cloroanisoles* (*2,3,4,6-TeCA* y *PCA*) ni de *2,4,6-tribromoanisol* (*2,4,6-TBA*), por lo que la causa última de la contaminación de estos vinos permanece por determinar.
- Más recientemente **Chatonnet y colaboradores** (2004) han realizado un análisis sobre un total de **30 vinos tintos contaminados con aromas y sabores fúngicos que no habían estado en contacto con corcho**. Sorprendentemente sólo **dos vinos (6.7%) mostraron valores de *2,4,6-TCA* superiores al umbral de percepción**. Sin embargo, 26 de estos vinos (86.7%) mostraron contaminación por *2,4,6-TBA* en unos niveles superiores a los 2 ng/l, siendo éste identificado como el principal agente responsable de su desagradable aroma y sabor.

Este estudio es muy importante por tres razones:

- I) Es el primer análisis que demuestra que un vino puede deber su **desagradable aroma y sabor fúngico no a *cloroanisoles*, sino a otros compuestos químicos muy parecidos como son los *bromoanisoles***. De hecho, el aroma fúngico de cada vino estaba en relación directa con su contenido de *TBA*.
- II) Se demuestra en este estudio que **en muchos casos la contaminación no es atribuible al corcho sino que se ha producido en la propia bodega**.
- III) Por último, indica que **todos los estudios realizados hasta ahora han sido incompletos puesto que en su análisis no se incluía la detección de este compuesto y que cualquier estudio anterior a esta fecha debería ser considerado con toda cautela**.

- Otra posibilidad es que la contaminación con aromas fúngicos pueda deberse a la presencia de otros compuestos no analizados. Como dato indiquemos que recientemente investigadores del *Australian Wine Research Institute* (Simpson *et al.*, 2004) que el compuesto *2-metoxi-3,5-dimetilpirazina* es un potente contaminante para los vinos, siendo su umbral de percepción muy similar al del *2,4,6-TCA* (unos 2.1 ng/l).

El corcho no tiene olor, por lo tanto, lo correcto es referirse a “olor o sabor a moho o a humedad” para expresar la contaminación del vino.

El olor a humedad o a moho puede deberse a muchas causas. Según los estudios realizados, cerca de la mitad de las contaminaciones atribuidas al TCA tienen otros orígenes distintos.

Investigaciones independientes han demostrado que existe contaminación en vinos que no han entrado nunca en contacto con el corcho

¿CÓMO SOLUCIONAR LA CONTAMINACIÓN DE VINOS POR HALOANISOLES?

Actualmente no existe ningún tratamiento totalmente efectivo para eliminar una contaminación por *haloanisoles* en los materiales de taponado o en bodega, aunque la industria del corcho está haciendo grandes esfuerzos de investigación para tratar de conseguirlo en sus productos.

En el caso de contaminación en bodegas la labor debe ser fundamentalmente **preventiva**. Se recomienda un **análisis de las diferentes dependencias** (sobre todo de aquellas donde exista madera) y control atmosférico para asegurarnos que los niveles de estos contaminantes no son peligrosos. En caso de detectarse contaminación se recomienda, si es posible, **la eliminación y sustitución del elemento contaminado** (barricas, suelos de madera, etc.)

En el caso de los **tapones de corcho** se han desarrollado diferentes estrategias, cuyos inventores afirman que contribuyen a eliminar parcial o totalmente el problema.

Podemos citar como más representativas las siguientes:

- La corchera Amorim está actualmente desarrollando el método ROSA basado en una destilación al vapor controlada, mediante la cual el vapor y el agua a presión expulsan los compuestos presentes en cantidades infinitesimales en las celdillas del corcho. Según la empresa los niveles de contaminantes se reducen en un 80%.
- El Grupo OENEO ha desarrollado un método de superextracción a base de CO₂ licuado que según estudios independientes ha dado muy buen resultado.
- La multinacional holandesa NovoNordisk desarrolló en el año 1999 (Patentes WO 01/10614 A1 y WO 99/58309) un preparado comercial llamado SUBERASE que consistía en una solución alcohólica de *lacasas* que servía para lavar externamente los tapones y que aparentemente eliminaba *clorofenoles* y *cloroanisoles*. Tras un tiempo en el mercado el producto ha sido retirado debido a su insatisfactorio funcionamiento.

- En el año 2001 se ha presentado una patente (WO 01/41989 A2) basada en el empleo de suspensiones de carbón activo obtenidas a partir de corteza de cocotero. Esta suspensión se utilizaría para lavar los tapones de corcho.
- El proyecto DOLFIN financiado por la Unión Europea ha desarrollado un sistema que permitiría la eliminación de *cloroanisoles* del tapón en base a una compleja tecnología de radiación microondas. Sin embargo, en un estudio realizado en el *Australian Wine Technical Institute* no se ha encontrado una reducción significativa en el contenido de *TCA* en los corchos tratados por este método.
- La empresa IONMED ha desarrollado un acelerador de electrones que permite mediante emisiones β la esterilización total del tapón de corcho, eliminando los microorganismos que podrían producir el *TCA*. El inconveniente de este sistema es que no elimina los *cloroanisoles* ya presentes en el corcho antes del tratamiento.
- En el Instituto de Biotecnología de León (INBIOTEC) actualmente se están desarrollando cepas de hongos con capacidad para degradar *clorofenoles* y *cloroanisoles* e incapaces de sintetizar estos compuestos. Estos hongos y sus enzimas podrían en un futuro ser usados para tratar las planchas de corcho o los tapones.

LA CONTAMINACIÓN DEL VINO: ¿ELECCIÓN DE UN PRODUCTO NATURAL O UN PRODUCTO SINTÉTICO PARA EL TAPONADO DE LAS BOTELLAS?

En los últimos tiempos y debido al problema de la contaminación del vino por *cloroanisoles*, del que se ha venido sistemáticamente culpando de manera injusta y exclusiva al tapón de corcho, la proliferación de tapones sintéticos es cada vez mayor.

Los tapones sintéticos pueden ser de materiales diversos: metálicos, de polietileno (expandido o extruído) o incluso de vidrio.

Supuestamente la principal ventaja de estos tapones es la ausencia total de contaminación por *cloroanisoles*. Sin embargo, en la creciente controversia tapón de corcho – tapón sintético podemos plantear una serie de cuestiones a fin de arrojar luz sobre este tema:

a).- ¿Son los tapones sintéticos un cierre eficaz que evite la transferencia de haloanisoles para prevenir la contaminación del vino?

Sabemos que el corcho no permite la entrada de *2,4,6-TCA* en la botella (Capone *et al.*, 2002), sin embargo no existen estudios al respecto para los cierres sintéticos. Es importante aclarar este punto porque si existe una contaminación puntual o temporal de *haloanisoles* en la bodega debemos estar seguros que estos compuestos no van a atravesar el cierre para contaminar el vino.

b).- ¿Pueden los tapones sintéticos absorber cloroanisoles?

Esta cuestión es importante porque si absorben *cloro y/o bromoanisoles* podrían transmitirlos al vino. Actualmente sabemos que **varios materiales como parafina, madera, plásticos derivados del polipropileno, siliconas, tapones metálicos forrados con un componente plástico, papel de aluminio e incluso papel plástico parafilm de polietileno pueden absorber parcialmente los *cloroanisoles* presentes en vinos contaminados (Capone *et al.*, 1999).** Recordemos que varios de los tapones sintéticos disponibles en el mercado están precisamente fabricados en este material.

De hecho existen estudios que indican que el polietileno puede ser un compuesto efectivo en la eliminación de *cloroanisoles* del vino. Sin embargo, en estudios realizados con vino Riesling embotellado en presencia de una lámina de este compuesto se ha detectado una cierta pérdida del carácter frutal.

A la vista de estos estudios podría ser interesante comprobar si un vino tinto de crianza o reserva embotellado en presencia de polietileno experimenta alguna modificación organoléptica significativa.

c).- ¿Permiten los tapones sintéticos un envejecimiento en botella similar al del tapón de corcho?

En la actualidad con los datos disponibles no se puede afirmar con rotundidad que los tapones sintéticos permitan un correcto envejecimiento del vino en botella.

Existen varios estudios al respecto encargados por algunas de las marcas que manufacturan tapón sintético que por supuesto ensalzan las cualidades del tapón ensayado.

El único informe independiente digno de consideración es el estudio publicado en 2001 por el *Australian Wine Research Institute* (AWRI). Este estudio (Godden et al., 2001; Francis et al., 2003) ha consistido en embotellar un vino blanco (Semillon) con 14 tipos de tapones diferentes (un tapón a rosca o Rote; dos tapones de corcho natural de 38 y 44 mm de longitud; dos tapones técnicos de corcho: tapón sintético *Altec* de OENEO y el tapón *Twintop* de Amorim que es un tapón aglomerado que lleva en sus dos extremos dos discos de corcho natural; tres tapones de polímero plástico extruído (Nukork, Nomacorc y Ecorc) y seis tapones de polímero plástico inyectado en molde (Aegis, Auscork, *Betacorque*, Integra, Supremecorc y Tage).

Tras 20 y 36 meses de embotellado se analizaron diferentes parámetros y las principales conclusiones del estudio fueron:

● **Evaluación de propiedades físicas del tapón**

- **Fuerza de extracción requerida.** Se incrementa para todos los tapones a lo largo de los 12 primeros meses de embotellado. Además esta fuerza tiende a aumentar a medida que disminuye la temperatura. Fue similar para todos los tapones ensayados
- **Facilidad de reinsertión en la botella.** Los tapones de corcho natural y el tapón técnico *Twintop* fueron los más fáciles de reinsertar, mientras que los sintéticos *Ecorc* y *Tage* fueron muy difíciles de reinsertar. Además este estudio indicó que los tapones sintéticos son más difíciles de retirar del sacacorchos que los tapones de corcho.

- Pérdidas. Únicamente los tapones sintéticos *Betacorque* y *Normacorc* mostraron signos de un cierre imperfecto con pérdidas.
- **Retención de sulfuroso (SO₂) y oscurecimiento del vino.** El tapón que permite una mayor retención de sulfuroso fue el tapón de rosca *Rote*. A continuación los tapones de corcho mostraron una mayor capacidad de retención que los tapones sintéticos. Niveles alarmantemente bajos de sulfuroso se obtuvieron con los tapones sintéticos *Tage*, *Ecorc* y *Betacorc*. Respecto del oscurecimiento de los vinos los resultados fueron similares.
- **Análisis sensorial.**
 - Contaminación por *cloroanisoles*. Únicamente los vinos embotellados con tapones de corcho mostraron contaminación por *cloroanisoles*.
 - Ninguno de los tapones de polímeros sintéticos confirió al vino aromas plásticos.
 - Oxidación de aromas. Los mayores problemas de oxidación se dieron para uno de los tipos de corcho natural y el sintético *Betacorque*. La mayor parte de los tapones sintéticos mostraron un grado de oxidación intermedio y los menores niveles de oxidación se obtuvieron para el resto de tapones de corcho (técnicos o naturales) y el tapón *Rote*. Claramente los valores de oxidación obtenidos tienen que ver con los niveles de sulfuroso libre. Aquellos vinos que mostraron mayores niveles de sulfuroso exhibieron también un menor nivel de oxidación.
 - Es importante destacar que aunque el tapón a rosca *Rote* se comportó bastante bien en todas las pruebas un indeseado aroma a goma fue detectado en todos los vinos, posiblemente debido a la formación de altos niveles de compuestos de azufre en una atmósfera muy carente de oxígeno y por lo tanto fuertemente reductora.

Por lo tanto, y a la vista de estos resultados parciales, que no olvidemos se han realizado en un vino blanco Semillon podemos concluir **que los tapones sintéticos tienen actualmente varias desventajas respecto de los tapones de corcho:**

- Mecánicamente son más imperfectos.
- La pérdida de sulfuroso libre es más rápida, lo que acorta la vida del vino en botella y permite el desarrollo de aromas oxidados.

d).- ¿Qué opinan los consumidores de que vinos de gama media-alta puedan taponarse con cierres sintéticos?

Por último otro aspecto de interés a la hora de considerar la sustitución de un tapón de corcho natural por un tapón sintético es la opinión del consumidor.

A tal efecto se han realizado hasta el momento varias encuestas entre los consumidores:

- La revista *Wine Spectator* (<http://www.winespectator.com>) realizó en marzo de 2001 en USA una encuesta entre consumidores que en un 55% preferían sus vinos con tapones naturales, en oposición a un 38% que preferían los tapones sintéticos. Pero cuando se les preguntó si se sentirían molestos si el alcornoque natural fuera protegido aunque el corcho no se pudiera utilizar en el embotellado de vino, el 34% afirmó que no estarían para nada molestos mientras que un 31% dijo que sí.
- La consultora *Wine Intelligence* (<http://www.wineintelligence.com>) ha publicado en el año 2003 un estudio realizado entre consumidores británicos del que podemos destacar:
 - Un 99% de los entrevistados afirmó que el tradicional sonido “pop” que se produce al abrir una botella taponada con corcho es un ritual muy importante para los bebedores de vino.
 - Cerca del 60% de los consumidores son contrarios a adquirir vinos con tapón de rosca.
 - La mayor parte de los entrevistados son neutrales respecto a los tapones sintéticos a base de polímeros: la mayor parte no los rechazan pero tampoco les gustan.
 - Las generaciones jóvenes (por debajo de los 45 años) son las que muestran una mayor predisposición al tapón de corcho.
- Por último, es importante mencionar que algunas organizaciones ecologistas de gran peso, como WWF/Adena llevan años realizando una amplia campaña publicitaria a fin de concienciar al consumidor para que exija vinos taponados con tapón de corcho como medida para favorecer la supervivencia de los alcornoques y de un gran número de especies animales en peligro de extinción en este tipo de bosque mediterráneo.

C

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

CONCLUSIONES

A modo de resumen y en base a los estudios realizados en los últimos años, podemos extraer una serie de conclusiones bien documentadas y que es importante tener en cuenta cuando nos enfrentamos ante una situación concreta de contaminación de vinos por *anisoles*:

I

El problema de la contaminación del vino por *anisoles* es complejo y se debe a múltiples factores, ya que pueden intervenir una o varias sustancias con capacidad para producir aromas fúngicos o mohosos a los vinos. Entre estas sustancias podemos mencionar el *2,4,6-TCA*; *2,3,4,6-TeCA*; *PCA*; *2,4,6-TBA* y *2-metoxi-3,5-dimetilpirazina*.

II

Los últimos datos apuntan a que sólo un 50% de los casos en los que aparecen aromas mohosos en los vinos puede ser achacado a una contaminación por *cloroanisoles*, mientras que el resto es debidos a contaminación por *2,4,6-TBA* y *2-metoxi-3,5-dimetilpirazina* o por mezclas de todos estos compuestos y otros actualmente desconocidos.

III

Los *anisoles* son producidos por varios microorganismos, sobre todo hongos filamentosos, los cuales poseen una proteína (enzima) llamada "*clorofenol-O-metiltransferasa*" que es capaz de transformar un pesticida (*clorofenol* o *bromofenol*) en el *anisol* correspondiente.

IV

Este mecanismo molecular descubierto en el hongo *Trichoderma longibrachiatum* es universal y permite explicar la formación y contaminación de *anisoles* sobre cualquier material: corcho, aguas, madera en bodegas, etc.

V

Un porcentaje muy alto de todos los hongos analizados (cercano al 80%) pueden sintetizar *anisoles* y pueden ser aislados rutinariamente tanto de corcho como de bodegas.

VI

Podemos afirmar que el verdadero origen del problema no es la presencia de hongos creciendo sobre corcho o madera, sino la elevada contaminación ambiental de *clorofenoles* y *bromofenoles* que son transformados por estos microorganismos en los correspondientes *anisoles*. De hecho los hongos filamentosos nunca sintetizan por si mismos *2,4,6-TCA* a no ser que entren en contacto con su precursor, el pesticida *2,4,6-TCP*. Por ello es muy importante realizar labores preventivas para evitar la contaminación por estos pesticidas.

VII

La presencia de *anisoles* en un vino no es siempre indicativa de una contaminación del corcho ya que en muchas ocasiones un corcho que llega a la bodega perfectamente limpio puede absorber *clorofenoles*, *cloroanisoles*, *bromofenoles* o *bromoanisoles* presentes como contaminantes en las instalaciones de la bodega.

VIII

Cuando realizamos un análisis cromatográfico de un vino contaminado y su correspondiente tapón y observamos niveles mayores de *anisoles* en el tapón que en el vino no podemos automáticamente culpar al tapón de corcho, ya que está comprobado que un tapón puede absorber la mayor parte del *2,4,6-TCA* presente en un vino contaminado en un periodo de tiempo muy corto.

IX

La única manera de conocer si la fuente primaria de contaminación es el tapón de corcho o por el contrario es el vino es realizar una batería de análisis cromatográficos que nos determinen los niveles de contaminación en tapones y vino y el patrón de contaminación: si es homogéneo (todas las botellas contaminadas) y detectamos cantidades elevadas de *clorofenoles* como *2,4,6-TCP* y *PCP* con una probabilidad muy alta la contaminación proviene del vino. Si por el contrario el nivel de contaminación es aleatorio (unas botellas contaminadas y otras no) y no se detectan niveles altos de *clorofenoles*, con una probabilidad muy alta la fuente primaria de contaminación sería el tapón de corcho.

X

Un tapón de corcho contaminado con *cloroanisoles* sólo contaminará el vino si estos compuestos están localizados en la zona de contacto corcho-vino, ya que está comprobado que el *2,4,6-TCA* no puede atravesar el tapón de corcho. Por tanto, **el tapón de corcho puede llegar incluso a proteger un vino en el caso de bodegas contaminadas.**

XI

El empleo de tapones sintéticos de polietileno (PET) no es garantía de vinos libres de *cloroanisoles* en el caso de bodegas contaminadas, ya que está comprobado que el PET absorbe los *cloroanisoles* en grandes cantidades y podría posteriormente cedérselos al vino.

XII

Un estudio comparativo de diversos tipos de cierres realizado por el *Australian Wine Research Institute* indica que **los tapones de corcho son mecánicamente más perfectos que los tapones sintéticos** ensayados; además **retienen una mayor cantidad de sulfuroso** durante periodos prolongados evitando los fenómenos oxidativos, hecho que **alarga la vida del vino en la botella.**

XIII

Por todo lo expuesto podemos afirmar que hoy en día **el tapón de corcho sigue siendo la mejor opción para cerrar botellas de cualquier tipo de vino.**

RECOMENDACIONES

Para acabar con este problema se requiere una acción conjunta tanto de las empresas fabricantes de tapones como de las bodegas. En este sentido se pueden hacer una serie de recomendaciones tendentes a minimizar la incidencia de este problema.

Recomendaciones para las bodegas

Sería recomendable que las bodegas realizaran también una **labor preventiva tendente a minimizar la contaminación de sus instalaciones** por estos compuestos:

A

Las bodegas deberían **realizar análisis periódicos** (semestrales o como mínimo anuales) para determinar que sus instalaciones están libres de clorofenoles, cloroanisoles, *2,4,6-TBP* y *2,4,6-TBA*.

B

Los análisis deberían consistir en **trampas atmosféricas y análisis de materiales susceptibles de estar contaminados** como madera de instalaciones (techos, suelos, paredes) y barricas fundamentalmente.

C

Los análisis deberían detectar la presencia de los siguientes compuestos: *2,4,6-TCP*; *2,4,6-TCA*; *2,3,4,6-TeCP*; *2,3,4,6-TeCA*; *PCP*; *PCA*, *2,4,6-TBP* y *2,4,6-TBA*.

D

Se debería exigir a los fabricantes de barricas, y otros elementos que entran en contacto con el vino, como los tapones de silicona utilizados para su cierre, un certificado de que están libres de estos compuestos. Esto es importante porque se conocen casos de bodegas donde estos tapones y las barricas presentaban altos niveles de contaminación.

E

Cada vez que se planea la introducción de **nuevos materiales** (incluyendo barnices y pinturas) en bodega deberá realizarse una **analítica o exigir certificación de que los materiales empleados son limpios**.

F

Se debería exigir a los proveedores de las cajas de cartón y las cajas de madera utilizadas en el embalaje de vinos una certificación de que sus productos están libre de *clorofenoles*, *cloroanisoles*, *bromofenoles* y *bromoanisoles*. Una posible contaminación de estos elementos no puede afectar al vino, ya que el tapón y la cápsula evitan su entrada en botella, pero daría mala imagen al consumidor que los embalajes tuviesen el típico aroma fúngico de estos compuestos, además de contribuir a la contaminación de las instalaciones de bodega.

Recomendaciones para las empresas que manufacturan tapón de corcho

Entre ellas podemos citar:

A

Atenerse a las recomendaciones que establece el Sistema SYSTECODE. Se trata del primer sistema de acreditación para empresas del corcho desarrollado por la Confederación Europea del Corcho (CELIÈGE) y que tiene como objeto que estas empresas alcancen unos estándares de calidad elevados que minimicen al máximo las posibilidades de contaminación por cloroanisoles.

B

Evitar la introducción en las instalaciones industriales de materiales contaminados, fundamentalmente madera tratada con *PCP*, o pinturas y barnices que contienen *2,4,6-TBP*, exigiendo de los proveedores que los productos adquiridos estén libres de estos contaminantes.

C

Conservar una muestra pequeña, pero suficientemente representativa (al menos 20 unidades), de cada lote de tapones suministrado, para en el caso de una posterior reclamación por contaminación poder realizar una analítica que confirme o desmienta la posible culpabilidad del corcho.

D

Realizar periódicamente (cada 6 meses o 1 año) un análisis atmosférico de las instalaciones que permita conocer la posible existencia de una fuente de contaminación por los mismos compuestos ya indicados para las bodegas.

BIBLIOGRAFÍA

Álvarez-Rodríguez, ML.; (2003). "Análisis de la producción de 2,4,6-tricloroanisol por hongos filamentosos aislados de corcho". Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias. Universidad de Extremadura.

Álvarez-Rodríguez, ML.; López-Ocaña, L; López-Coronado, JM; Rodríguez, E; Martínez, MJ; Larriba, G y Coque, JJR. (2002a). "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". *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 5860-5869.

Álvarez-Rodríguez, ML.; Larriba, G y Coque, JJR. (2002b). "Microbiology of cork: isolation of microorganisms producing 2,4,6-trichloroanisole and suberolytic microorganisms". En: "*Proceedings of the I World Cork Congress on Cork and Cork Oak*". Pag. 831-837. Ed. APCOR. Santa Mª de Lamas, Portugal.

Álvarez-Rodríguez, ML y Coque, JJR. (2004). "Origen y biosíntesis de TCA en el corcho. Mecanismos moleculares en el hongo *Trichoderma longibrachiatum*". En: "Informe técnico: *anisoles* y *Brettanomyces*. Causas, efectos y mecanismos de control". Pag. 33-79. Fundación para la Cultura del Vino (ed.). Madrid.

Amon, JM; Vandeepeer, JM y Simpson, RF. (1989). "Compounds responsible for cork taint". *Aust. Ans New Zeal. Wine. Ind. J.* 4: 62-69.

Barker, DA; Capone, DL; Pollnitz, AP; McLean, HJ; Francis, IL; Oakey, H y Sefton, MA. (2001). "Absorption of 2,4,6-trichloroanisole by wine corks via the vapour phase in an enclosed environment". *Aust. J. Grape Wine Res.* 7: 40-46.

Buser, H-R; Zanier, C y Tanner, H. (1982). "Identification of 2,4,6-trichloroanisole as a potent compound causing cork taint in wine". *J. Agr. Food. Chem.* 30: 359-363.

Butzke, CE; Evans, TJ y Ebeler, SE. (1999). "Detection of cork taint in wine using automated solid-phase microextraction in combination with GC/MS-SIM". *Chemistry of wine flavor*. Waterhouse, AL and Ebeler, SE. Editores. ACS Symposium Series. American Chemical Society. Washington D.C.

Capone, DL; Skouroumounis, GK; Barker, DA, McLean, HJ; Pollnitz, AP y Sefton, MA. (1999). "Absorption of chloroanisoles from wine by corks and by other materials". *Aust. J. Grape Wine Res.* 5: 91-98.

Capone, DL; Skouroumounis, GK y Sefton, MA. (2002). "Permeation of 2,4,6-trichloroanisole through cork closures in wine bottles". *Aust. J. Grape Wine Res.* 8: 196-199.

Chatonnet, P. (2004). "Índole, origen y consecuencia de la presencia de *anisoles* en el mundo vinícola". En: "Informe técnico: *anisoles* y *Brettanomyces*. Causas, efectos y mecanismos de control". Pag.9-19. Fundación para la Cultura del Vino (ed.). Madrid.

Chatonnet, P; Guimberteau, G; Dubourdieu, D y Boidron, JN. (1994). "Nature et origen des odeurs de moisi dans les caves. Incidence sur la contamination des vins". *J. Int. Sci. Vigne et du Vin.* 28: 131-151.

Chaudhry, GO y Chapalamadugu, S. (1991). "Biodegradation of halogenated organic compounds". *Microbiol. Rev.* 55: 59-79.

Coque, JJR, Álvarez-Rodríguez, ML y Larriba, G. (2003). "Characterization of an inducible chlorophenol *O*-methyltransferase from *Trichoderma longibrachiatum* involved in the formation of *chloroanisoles* and determination of its role in cork taint of wines". *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 5089-5095.

Curtis, RF; Land, DG; Griffiths, MN; Gee, MG; Robinson, D; Peel, JL; Dennis, C y Gee, JM. (1972). "2,3,4,6-tetrachloroanisole: association with musty taint in chickens and microbiological formation". *Nature.* 235: 223-224.

Curtis, RF; Dennis, C; Gee, JM; Gee, MG; Griffiths, MN; Land, DG; Peel, JL y Robinson, D. (1974). "*Chloroanisoles* as a cause of musty taint in chickens and their microbiological formation from chlorophenols in broiler house liter". *J. Sci. Food. Agr.* 25: 811-828.

Duerr, P. (1985). "Wine quality evaluation". En "Proceedings of the International Symposium on cool climate viticulture and enology". Pag. 257-266. Heatherbell, A., Lombard, PD., Bodyfelt, FW. And Price, SF (editors). Carvallis, Oregon State University. USA.

Evans, TJ; Butzke, CE y Ebeler, SE. (1997). "Analysis of 2,4,6-trichloroanisole in wines using solid-phase microextraction coupled to gas chromatography-mass spectrometry". *J. Chromat.* **786**: 293-298.

Flodin, S y Whitfield, KJ. (1999). "Biosynthesis of bromophenols in marine algae". *Water Sci. Technol.* **40**: 53-58.

Francis, L; Field, J.; Gishen, M; Valente, P; Lattey, K; Hoj, P; Robinson, E y Godden, P. (2003). "The AWRI closure trial: sensory evaluation data 36 months after bottling". *Aust. and NZ Grapegrower Winemaker.* **475**: 59-64.

Godden, P; Francis, L; Field, J., Gishen, M; Coulter, A; Valente, P; Hoj, P y Robinson, E. (2001). "Wine bottle closures: physical characteristics and effect on composition and sensory properties of a Semillon wine. 1. Performance up to 20 months post-bottling". *Aust. J. Grape Wine Res.* **7**: 64-105.

Griffiths, NM. (1974). "Sensory properties of chloroanisoles". *Chem. Sens. Flavor.* **1**: 187-195.

Howland, PR; Pollnitz, AP; Liacopoulos, D; McLean, HJ y Sefton, MA. (1997). "The location of 2,4,6-trichloroanisole in a batch of contaminated wine corks". *Aust. J. Grape Wine Res.* **3**: 141-145.

Lee, TH y Simpson, RF. (1993). "Microbiology and chemistry of cork taints in wine". *Wine Microbiology and Biotechnology.* Ed. GH Fleet (Harwood Academic Publishers: Chur. Switzerland) : 353-372.

Maarse, H; Nijssen LM y Angelinas S. (1989). "Halogenated phenols and chloroanisoles: occurrence, formation and prevention". *Actas del 2nd Wartburg Aroma Symposium.*

Maujean, A; Millery, P y Lemaesquier, H. (1985). "Explications biochimiques et metaboliques de la confusion entre gout de bouchon et gout de moisi". *Rev. Franc. Oenol.* **24**: 55-62.

Neidlemann, SL y Geigert, J. (1986). "Biohalogenation: principles, basic roles and applications". Ellis Harwood, Chichester chapters.

Nystrom, A; Grimvall, A; Krantzrulcker, C; Savenhed, R y Akerstrand, K. (1992). "Drinking-water off-flavor caused by 2,4,6-trichloroanisole". *Water Sci. Technol.* **25**: 241-249.

Pollnitz, AP; Pardon, KH; Liacopoulos, D; Skouroumounis, GK y Sefton, MA. (1996). "The analysis of 2,4,6-trichloroanisole and other chloroanisoles in tainted wines and corks". *Aust. J. Grape Wine Res.* **2**: 184-190.

Saxby, MJ; Reid, WJ; and Wragg, Gs. (1982). "Index of chemical taints". Leatherhead Food, RA. Leatherhead.

Silva Pereira, C; Pires, A; Valle, MJ; Vilas Boas, L; Figueiredo Marques, JJ y San Romao, MV. (2000). "Role of *Chrysonilia sitophila* in the quality of cork stoppers for sealing wine bottles". *J. Ind. Microbiol. Biotech.* **24**: 256-261.

Soleas, GJ; Yan, J; Seaver, T y Goldberg, DM. (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". *J. Agric. Food Chem.* **50**: 1032-1039.

Spadone, J-C; Takeoka, G y Liadron, R. (1990). "Analytical investigation of Rio off-flavor in green coffee". *J. Agr. Food. Chem.* **38**: 226-232.

Tanner, H; Zanier, C y Würdig. (1981). "Zur analytischen differenzierung von muffon und korkgeschmack in wein". *Schweiz. Z. Obst. u. Weinbau.* **117**: 752-757.

Tindale, CR; Whitfield, FB; Levingston, SD y Nguyen, THL. (1989). Fungi isolated from packaging materials: their role in the production of 2,4,6-trichloroanisole". *J. Sci. Food Agr.* **49**: 437-447.

Whitfield, F; Nguyen, L; Shaw, KJ; Last, JH; Tindale, CR y Stanley, G. (1985). "Contamination of dried fruits by 2,4,6-trichloroanisole and 2,3,4,6-tetrachloroanisole absorbed from packaging materials". En: *Chem. Ind.* (London); pag. 661-666.

Whitfield, F; Hill, JL; and Shaw, KJ. (1997). "2,4,6-Tribromoanisole: a potential cause of mustiness in package food". *J. Agric. Food. Chem.* **45**: 889-893.



Fondo Europeo de
Desarrollo Regional
Iniciativa Comunitaria Interreg III

Portugal-Espanha
Cooperação Transfronteiriça
INTERREG III A
Espana-Portugal
Cooperación Transfronteriza
INTERREG III A



AGRUPACIÓN SANVICENTEÑA EMPRESARIOS DEL CORCHO

