

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS  
CURSO DE GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

Thalita Isabel Assumpção

**AGENTES ANTIOXIDANTES NO MOSTO DA UVA NIÁGARA BRANCA:  
INFLUÊNCIA NO TEOR DE POLIFENÓIS E NA ATIVIDADE DA  
POLIFENOLOXIDASE**

Florianópolis

2019

Thalita Isabel Assumpção

**AGENTES ANTIOXIDANTES NO MOSTO DA UVA NIÁGARA BRANCA:  
INFLUÊNCIA NO TEOR DE POLIFENÓIS E NA ATIVIDADE DA  
POLIFENOLOXIDASE**

Trabalho Conclusão do Curso de Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito para a obtenção do Título de Bacharel em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Vivian Maria Burin

Florianópolis

2019

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Assumpção, Thalita Isabel  
AGENTES ANTIOXIDANTES NO MOSTO DA UVA NIÁGARA BRANCA:  
INFLUÊNCIA NO TEOR DE POLIFENÓIS E NA ATIVIDADE DA  
POLIFENOLOXIDASE / Thalita Isabel Assumpção ; orientador,  
Vivian Maria Burin, 2019.  
53 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) -  
Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências  
Agrárias, Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos,  
Florianópolis, 2019.

Inclui referências.

1. Ciência e Tecnologia de Alimentos. 2. Escurecimento.  
. 3. Vitis labrusca. 4. oxidação. I. Burin, Vivian Maria.  
II. Universidade Federal de Santa Catarina. Graduação em  
Ciência e Tecnologia de Alimentos. III. Título.

Thalita Isabel Assumpção

**AGENTES ANTIOXIDANTES NO MOSTO DA UVA NIÁGARA BRANCA:  
INFLUÊNCIA NO TEOR DE POLIFENÓIS E NA ATIVIDADE DA  
POLIFENOLOXIDASE**

Este Trabalho de Conclusão de Curso foi julgado adequado para obtenção do Título de “Bacharel em Ciência e Tecnologia de Alimentos” e aprovado em sua forma final.

Florianópolis, 18 de Novembro de 2019.

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Carmen Maria Olivera Muller  
Coordenadora do Curso

**Banca Examinadora:**

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Vívian Maria Burin  
Orientadora  
Universidade Federal de Santa Catarina

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Elane Schwinden Prudêncio  
Universidade Federal de Santa Catarina

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Isabela Maia Toaldo  
Universidade Federal de Santa Catarina

A minha mãe que sempre me deu asas para voar. Dedico!

## AGRADECIMENTOS

À Deus, pela preciosa dádiva do existir, por ser fiel e meu amigo, mesmo nos momentos onde eu não tinha fé.

A minha família, especialmente a minha mãe, que sempre acreditou no meu potencial, me estimulando, inspirando, ajudando e reconhecendo todos os meus esforços.

Ao meu amor William, pelo apoio em todas as decisões por mim tomadas, desde o primeiro momento da qual decidimos traçar um percurso juntos, por não me abandonar mesmo nos momentos em que fui tão ausente. Você faz parte da minha vida!

À minha orientadora, Prof<sup>a</sup>. Dra. Vívian Maria Burin, pela orientação, convívio e paciência. Por ser muito mais que minha orientadora, por ser uma inspiração em sua dedicação e determinação.

Aos colegas e também amigos do laboratório de Bioquímica de Alimentos, Jeferson, Trilicia, Luana, Mariana, Cássia, e em especial à Maiara pelos conhecimentos compartilhados, pelos papos na “*mesa da sabedoria*”, pelas tardes, cafés e risadas. E por toda a ajuda durante todo o período que permaneci no laboratório.

As minhas amigas e companheiras de curso: Andriele, Angela, Dinah, Fran, Indyanara, Mariana, Natália Moraes, Nathalia, por serem pessoas maravilhosas que terei a honra de levar para a vida. Por terem compartilhado trabalhos em grupos, semanas acadêmicas, pesquisas e também muitas experiências dessa aventura chamada Vida.

Aos professores e funcionários do departamento de Ciência e tecnologia de Alimentos, pela dedicação durante toda a graduação.

À Prefeitura Municipal de Garopaba pelo transporte universitário, ao longo desta jornada.

Aos membros da banca examinadora, pelas correções e valiosas contribuições para o aperfeiçoamento deste trabalho.

Muito Obrigada!

*“Tenha metas. Uma vida sem objetivos é uma existência triste, pois o homem é um ser, historicamente, movido a desafios.”*

*Renato Collyer*

## RESUMO

A principal forma de prevenir as reações de oxidação no mosto e no vinho branco é a adição de sulfito em diferentes etapas do processo de vinificação. No entanto, a utilização de altas concentrações deste composto apresenta relação direta com o surgimento de aromas desagradáveis nos vinhos, assim como pode acarretar em riscos à saúde. Diante disso, o objetivo deste trabalho foi avaliar a influência da adição de diferentes agentes antioxidantes no mosto da uva Niágara Branca quanto à inibição do escurecimento e da atividade da polifenoloxidase assim como o impacto na composição fenólica e atividade antioxidante. Para obter o mosto, a uva foi esmagada manualmente, em seguida o mosto foi centrifugado a 4.000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante, denominado extrato bruto, foi utilizado para as análises. Nesta etapa ocorreu a adição dos agentes antioxidantes: metabissulfito de potássio, ácido ascórbico e glutathione, de forma isolada e combinada e um mosto não foi adicionado de agente (mosto controle). Após a realização dos tratamentos, os mostos foram analisados quanto à atividade da polifenoloxidase, índice de escurecimento, polifenóis totais, orto-difenóis e atividade antioxidante. Para determinar a atividade da polifenoloxidase, primeiramente foram avaliados os fatores como temperatura e pH ideal da enzima no extrato bruto. A atividade ótima da enzima foi no pH de 6,5 e na temperatura de 25 °C. Os resultados demonstraram que todos os mostos adicionados dos agentes antioxidantes apresentaram efetivo controle da atividade da polifenoloxidase e índice de escurecimento enzimático. Dentre os agentes adicionados, pode-se destacar o mosto adicionado de 3 agentes combinados (metabissulfito de potássio, ácido ascórbico e glutathione) que apresentou forte redução da ação da atividade da polifenoloxidase e do índice de escurecimento do mosto. Também, esta mesma amostra apresentou o maior teor de polifenóis totais e capacidade antioxidante. A partir dos resultados obtidos pode-se observar que a redução da concentração do metabissulfito de potássio no mosto é possível quando este for associado com outros agentes antioxidantes, com efetivo efeito no controle das reações de oxidação enzimática.

**Palavras-chave:** Escurecimento. Oxidação. *Vitis labrusca*.



## ABSTRACT

The main way to prevent oxidation in must and white wine is the addition of sulfite at different stages of the winemaking process. However, the use of high concentrations of this compound is directly related to the emergence of unpleasant aromas in wines, as well as health risks. Therefore, the aim of this study was to evaluate the influence of the addition of different antioxidant agents in the Niagara grape must on the inhibition of browning and activity of polyphenol oxidase as well as the impact on phenolic composition and antioxidant activity. To obtain the must, the grape was crushed manually and then centrifuged at 4,000 rpm for 10 minutes. The supernatant, named crude extract, was used for the analyzes. At this stage, the antioxidant agents were added: potassium metabisulphite, ascorbic acid and glutathione, in isolation and in combination, and as a control was maintained the musts without addition of agent. After the treatments, the musts were analyzed for polyphenol oxidase activity, browning index, total polyphenols, ortho-diphenols and antioxidant activity. To determine the activity of polyphenol oxidase, firstly factors such as temperature and ideal pH of the enzyme in the crude extract were evaluated. The optimal activity of the enzyme was at pH 6.5 and at 25 °C. The results showed that all musts added from antioxidant agents showed effective control of polyphenol oxidase activity and enzymatic browning index. Among the added agents, it can highlight the added must of 3 combined agents (potassium metabisulphite, ascorbic acid and glutathione) that showed strong reduction of the action of the polyphenol oxidase activity and the browning index of the must. Also, this same sample had the highest total polyphenol content and antioxidant capacity. From results, it was observed that the reduction of the potassium metabisulphite concentration in the must is possible when it is associated with other antioxidant agents, with effective effect in the control of the enzymatic oxidation reactions.

**Keywords:** Browning. Oxidation. *Vitis labrusca*.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Cultivar Niágara Branca.....	17
Figura 2 – Estrutura química flavonoides.....	19
Figura 3 – Estruturas químicas dos principais flavanóis da uva e do vinho.....	20
Figura 4 – Estrutura química dos flavonóis encontrados em uvas .....	20
Figura 5 – Estrutura química dos ácidos hidroxicinâmicos.....	21
Figura 6 – Estrutura química dos ácidos hidroxibenzoicos .....	21
Figura 7 – Estrutura química do estilbeno.....	22
Figura 8 – Mecanismo de oxidação da polifenoloxidase .....	24
Figura 9 – Mecanismo de prevenção da atividade oxidante através do ácido ascórbico .....	28
Figura 10 – Reação da glutathione com compostos <i>orto</i> -quinona (o local da adição depende do tipo de composto fenólico envolvido) .....	29
Figura 11 – Influência do pH na atividade da polifenoloxidase em uva Niágara Branca .....	37
Figura 12 – Efeito da temperatura na atividade da polifenoloxidase em uva Niágara Branca.	37
Figura 13 – Porcentagem de inibição do índice de escurecimento e da atividade da PPO do mosto de uva Niágara Branca após adição de diferentes agentes antioxidantes e amostra controle.....	39
Figura 14 – Atividade antioxidante do mosto da uva Niágara Branca adicionado de diferentes agentes protetores de oxidação .....	43

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Composição físico-química da uva Niágara Branca.....	35
Tabela 2 – Valores da atividade da polifenoloxidase e índice de escurecimento do mosto de uva Niágara Branca adicionado dos diferentes agentes antioxidantes de forma isolada e combinada.....	38
Tabela 3 – Teor de <i>orto</i> -difenóis e polifenóis totais do mosto de uva Niágara Branca adicionado de diferentes agentes antioxidantes de forma isolada e combinada.....	41

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA – Atividade antioxidante  
ABTS – ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin) 6-ácido sulfônico  
ANOVA – Análise de Variância  
ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária  
ATT – Acidez total titulável  
DMACA – 4-dimetilaminocinamaldeído  
DPPH – 2,2-difenil-1-picrilhidrazil  
EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária  
EPAGRI - Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina  
EUA – Estados Unidos da América  
FRAP - ensaio antioxidante de determinação do poder de redução do íon ferro (do inglês: Ferric Reducing Antioxidant Power)  
GAE- Equivalente Ácido Gálico  
GRP – produto de reação da uva (do inglês: grape reaction product)  
GSH – glutathiona reduzida  
GSSG – glutathiona oxidada  
ha – hectares  
IE – Índice de escurecimento  
L - litro  
mg – miligrama  
mL- mililitro  
mm – milímetro  
nm – nanômetro  
OD – *orto*-difenóis  
OIV – Organização Internacional do Vinho  
ORAC - capacidade de absorção dos radicais oxigenados (do inglês: Oxygen Radical Absorbance Capacity)  
PPO - polifenoloxidase  
PT – polifenóis totais  
SO<sub>2</sub> – dióxido de enxofre  
SST – sólidos solúveis totais  
t- toneladas  
Trolox - Hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-ácido carboxílico  
U – atividade enzimática  
UV – Ultravioleta

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>14</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>16</b>
2.2	OBJETIVO GERAL.....	16
2.3	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	16
<b>3</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>17</b>
3.1	A UVA ‘NIÁGARA BRANCA’ .....	17
3.2	COMPOSTOS FENÓLICOS DA UVA .....	18
<b>3.2.1</b>	<b>Flavonoides</b> .....	<b>19</b>
<b>3.2.2</b>	<b>Ácidos fenólicos e estilbenos</b> .....	<b>20</b>
<b>3.2.3</b>	<b>Atividade antioxidante</b> .....	<b>22</b>
3.3	REAÇÕES DE OXIDAÇÃO EM UVA BRANCA .....	23
3.4	INIBIDORES DE ESCURECIMENTO ENZIMÁTICO .....	25
<b>3.4.1</b>	<b>Sulfitos</b> .....	<b>26</b>
<b>3.4.2</b>	<b>Ácido ascórbico</b> .....	<b>27</b>
<b>3.4.3</b>	<b>Glutathione</b> .....	<b>28</b>
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>31</b>
4.1	MATERIAL .....	31
<b>4.1.1</b>	<b>Reagentes</b> .....	<b>31</b>
<b>4.1.2</b>	<b>Amostras</b> .....	<b>31</b>
4.1.2.1	<i>Experimento</i> .....	31
4.2	MÉTODOS.....	32
<b>4.2.1</b>	<b>Análises físico-químicas</b> .....	<b>32</b>
<b>4.2.2</b>	<b>Análises espectrofotométricas</b> .....	<b>32</b>
4.2.2.1	<i>Otimização das condições de temperatura e pH para a atividade da polifenoloxidase da uva Niágara Branca</i> .....	32
4.2.2.2	<i>Atividade da Polifenoloxidase (PPO)</i> .....	32
4.2.2.3	<i>Índice de escurecimento</i> .....	33
4.2.2.4	<i>Determinação de orto-difenóis</i> .....	33
4.2.2.5	<i>Polifenóis totais</i> .....	33
4.2.2.6	<i>Atividade antioxidante</i> .....	34
<b>4.2.3</b>	<b>Análises estatísticas</b> .....	<b>34</b>
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>35</b>

5.1	ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS.....	35
5.2	ATIVIDADE DA POLIFENOLOXIDASE E ÍNDICE DE ESCURECIMENTO DOS MOSTOS .....	36
<b>5.2.1</b>	<b>Otimização das condições ótimas da enzima polifenoloxidase da uva Niágara Branca .....</b>	<b>36</b>
<b>5.2.2</b>	<b>Influência dos agentes antioxidantes na atividade enzimática e escurecimento.</b>	<b>38</b>
5.3	DETERMINAÇÃO DE <i>ORTO</i> -DIFENÓIS E POLIFENÓIS TOTAIS .....	41
5.4	ATIVIDADE ANTIOXIDANTE .....	43
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>45</b>
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>46</b>

## 1 INTRODUÇÃO

As uvas são consideradas uma das maiores fontes de compostos fenólicos e a presença destes compostos constitui importante parâmetro de qualidade em sucos e vinhos, uma vez que estão diretamente relacionados às características como cor, adstringência e amargor. Os compostos fenólicos, particularmente os *orto*-difenóis, são os principais componentes em uvas e vinhos relacionados com a oxidação que acarretam em alterações de coloração (SINGLETON *et al.*, 1985; CHEYNIER; SILVA, 1991; MATTIVI *et al.*, 2002; RIBÉREAU-GAYON *et al.*, 2006).

A reação de oxidação enzimática tem destaque principalmente nas uvas brancas, devido à ação da enzima polifenoloxidase que acarreta no escurecimento do mosto e afeta a qualidade sensorial do vinho assim como altera o tempo de prateleira, diminuindo o seu valor comercial. Além disto, as reações de oxidação também interferem na concentração dos compostos fenólicos, uma vez que são os principais substratos desta reação (CHEYNIER; SILVA, 1991; VAIMAKIS; ROUSSIS, 1996). Durante a prensagem da uva branca para obtenção do mosto e elaboração do vinho, a membrana que envolve a baga da uva é rompida e a enzima polifenoloxidase é liberada para o mosto. Na presença de oxigênio, a enzima catalisa a hidroxilação de monofenóis a *orto*-difenóis. Essa reação está relacionada, em parte, com a presença da função fenol e a mobilidade do átomo de hidrogênio na molécula dos polifenóis (OSZMIANSKI; CHEYNIER; MOUTOUNET, 1996; FLANZY, 2000; TOIT *et al.*, 2006)

O produto da oxidação depende, principalmente, do número de hidroxilas presentes no substrato. Quando a reação ocorre a partir de um monofenol, o radical semi-quinona gerado reage com um segundo radical para originar um produto de acoplamento, porém se a reação partir de um catecol (duas hidroxilas na posição *orto*) o radical semi-quinona perde um elétron e origina uma *orto*-quinona (CHEYNIER *et al.*, 1990; OSZMIANSKI; CHEYNIER; MOUTOUNET, 1996).

A principal forma de prevenir as reações de oxidação no mosto e nos vinhos brancos é a adição de sulfito em diferentes etapas do processo de vinificação (CLARK; PRENZLER; SCOLLARY, 2003). No entanto, para uvas brancas, a adição de sulfito inicia-se logo na etapa de desengace e prensagem do mosto a fim de interromper as reações oxidativas. Embora o sulfito seja um eficiente agente de proteção da oxidação de mostos e vinhos devido a ação de inativar a polifenoloxidase, a adição de elevadas concentrações deste composto no mosto pode retardar ou provocar paradas de fermentação, promover o surgimento de aromas

desagradáveis no vinho, e ainda oferecer riscos à saúde de consumidores que são sensíveis a este composto como as reações alérgicas (COSTANIGRO; APPLEBY; MENKE, 2014). Desta forma, pesquisadores vêm buscando alternativas tecnológicas de vinificação para minimizar a presença de sulfito nos vinhos, como por exemplo, a adição de glutathione, antioxidante naturalmente presente na uva e a adição de ácido ascórbico (SONNI *et al.*, 2011; WEBBER *et al.*, 2014; GIACOSA *et al.*, 2019).



## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo deste trabalho foi avaliar a influência da adição de diferentes agentes antioxidantes no mosto da uva Niágara Branca quanto à inibição do escurecimento e atividade da polifenoloxidase e o impacto na composição fenólica e atividade antioxidante da uva.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Otimizar as condições ideais de temperatura e pH para a atividade da polifenoloxidase da uva Niágara Branca;
- Avaliar a eficiência da ação de diferentes agentes antioxidantes como metabissulfito de potássio, ácido ascórbico e glutatona de forma isolada e combinada, em relação à inibição da atividade da enzima polifenoloxidase no mosto e índice de escurecimento;
- Determinar a concentração mínima efetiva de metabissulfito de potássio em combinação com ácido ascórbico e glutatona frente à inibição a oxidação enzimática do mosto;
- Avaliar a influência da adição dos diferentes agentes antioxidantes, de forma isolada ou combinada, na composição fenólica e atividade antioxidante do mosto.

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 A UVA ‘NIÁGARA BRANCA’

A uva ‘Niágara Branca’ (Figura 1) é o resultado do cruzamento das cultivares ‘Concord’ x ‘Cassady’, efetuadas por Hoag e Clark em 1868 em Nova York. Devido a sua origem, é considerada, por alguns autores como uma uva híbrida devido ao cruzamento de *Vitis labrusca* x *Vitis vinífera*, porém, geralmente é descrita na literatura como uma variedade *Vitis labrusca*. Esta cultivar foi introduzida no Brasil por Benedito Marengo no ano de 1894, mais precisamente, no Estado de São Paulo. Aproximadamente no ano de 1910 atingiu expressão nacional sendo reconhecida como uma variedade comercial e expandindo-se para outras regiões do país (EMBRAPA, 2019).

Figura 1 – Cultivar Niágara Branca.



Fonte: EMBRAPA (2019).

Atualmente a maior concentração de produção de uvas incluindo a 'Niágara Branca' ocorre nos estados do Rio Grande do Sul, Pernambuco, São Paulo e Santa Catarina. Em 2018 a área plantada em videiras no Brasil diminuiu 2,66% quando comparada ao ano anterior. O Estado do Rio Grande do Sul, que acumula 62,39% da área vitícola nacional, apresentou uma redução de 2,96% em sua área cultivada. Ainda assim, nesta região concentra-se a maior produção de uvas destinadas ao processamento para elaboração de vinhos e suco, sendo responsável por cerca de 90% da produção de vinhos e sucos de uva nacionais. O estado de Santa Catarina no ano de 2018 teve um aumento de 0,57% na sua área vitícola, quando comparada ao ano anterior (MELLO, 2019). De acordo com dados da Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina o Estado de Santa Catarina apresentou na

safra de 2017/2018 alta produtividade da uva Niágara Branca (acima de 20 t/ha) (EPAGRI, 2018).

Segundo Pommer (2003), entre as principais características da cultivar Niágara Branca estão à alta produtividade e a resistência a doenças. Os cachos possuem tamanho médio, cônicos e compactos, o peso médio é de 250 g. As bagas apresentam-se da cor Branca a verde, tamanho médio de 5,5 g, formato oval e com elevado teor de suco. O principal destino desta variedade é o consumo *in natura*, no entanto, suas características químicas e sensoriais são favoráveis para o processamento o que a tornou uma alternativa de matéria-prima para elaboração de sucos e vinhos, principalmente devido ao seu aroma e sabor, amplamente aceitos pelos consumidores (SILVA *et al.*, 2017).

### 3.2 COMPOSTOS FENÓLICOS DA UVA

Os compostos fenólicos, também denominados polifenóis, são constituintes fundamentais dos vegetais, presentes principalmente em frutas, tubérculos e raízes, onde sua natureza química apresenta-se diversificada. Na uva são classificados em flavonoides, ácidos fenólicos e estilbenos e estão presentes principalmente na casca e na semente, sendo que, sua quantidade e disposição podem variar dependendo de diversos fatores, como o período de maturação, condições climáticas, solo, variedade, estresse, entre outros (MATTIVI *et al.*, 2002; RIBÉREAU-GAYON *et al.*, 2006).

Do ponto de vista químico, os compostos fenólicos são caracterizados por apresentar um núcleo benzênico, agrupado a um ou vários grupos hidroxilas. Englobam desde moléculas simples até outras com alto grau de polimerização. Os inúmeros fatores que condicionam a síntese de compostos fenólicos, bem como as diferentes vias pelas quais a síntese pode acontecer, justificam a heterogeneidade química deste grupo (FLANZY, 2000; MORENO-ARRIBAS; POLO, 2009).

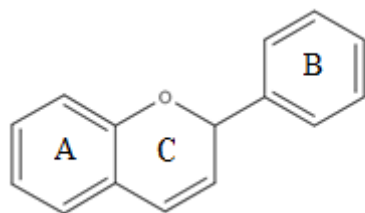
Segundo Ribéreau-Gayon (2006) a presença destes compostos na uva constitui um parâmetro fundamental de qualidade, uma vez que estão diretamente ligados a características como cor, adstringência e amargor dos produtos derivados da uva, como o vinho. De acordo com Soleas *et al.* (2002), além destes compostos serem fundamentais para a produção de vinhos e sucos, o interesse e estudo dos mesmos está cada vez maior, devido ao seu potencial benéfico para a saúde humana. Estudos realizados com compostos fenólicos e, especialmente com os flavonoides demonstram sua capacidade antioxidante, assim como seu efeito na

prevenção de diversas doenças como doenças cardiovasculares, cancerígena e neurológica (HARBORNE; WILLIAMS, 2000; SUH; KIM; SURH, 2018; HARBELOUI *et al.*, 2019).

### 3.2.1 Flavonoides

Os flavonoides pertencem a uma classe química que exibe uma estrutura básica de 15 átomos de carbono compreendendo dois anéis aromáticos (A e B) ligados através de uma cadeia de 3 carbonos ( $C_6-C_3-C_6$ ), que podem ou não ser parte de um terceiro anel (C) (Figura 2) (FLANZY, 2000; JACKSON, 2008; GARRIDO; BORGES, 2013). Variações na substituição do anel C resultam em importantes classes de flavonoides, como flavonóis, flavonas, flavanonas, flavanóis, isoflavonas e antocianinas. Substituições dos anéis A e B originam diferentes compostos dentro de cada classe de flavonoides (HOLLMAN; KATAN, 1999).

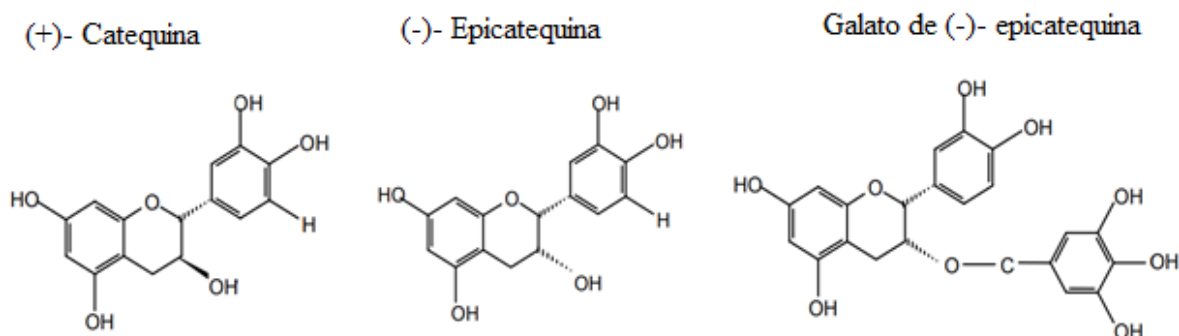
Figura 2 – Estrutura química dos flavonoides.



Fonte: Adaptado de Jackson (2008).

Os flavanóis são os compostos flavonoides mais abundantes em uvas e vinhos, são encontrados tanto na semente quanto na casca da uva, com maior concentração nas sementes (FLANZY, 2000). Os principais flavanóis presentes nas uvas e nos vinhos são a (+)-catequina e a (-)-epicatequina (Figura 3), que são epímeros no carbono 3 (GARRIDO; BORGES, 2013). Associam-se a estes compostos características de sabor e adstringência. Em vinhos brancos onde existe um limitado contato com as películas, as catequinas são os principais flavonoides. Estes compostos são os responsáveis pelo acastanhamento dos vinhos brancos e por conferir amargor (ZOECKLEIN *et al.*, 1995).

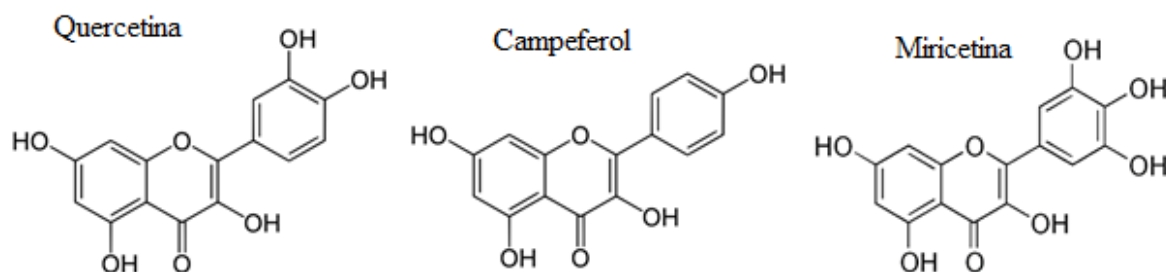
Figura 3 - Estruturas químicas dos principais flavanóis da uva e do vinho.



Fonte: Adaptado de Cabrita, Ricardo-Da-Silva e Laureano (2003).

Os flavonóis, outra classe de compostos flavonoides, são encontrados na forma de glicosídeos em plantas, nas uvas estão localizados na casca. Quercetina, miricetina e campeferol são os principais flavonóis encontrados em uvas (Figura 4) (FLANZY, 2000; WATERHOUSE, 2002). É a classe de flavonoides de menor concentração na uva, porém possui um papel importante na evolução da cor de vinhos tintos, agindo como co-pigmentos junto com as antocianinas (ALLEN, 1994).

Figura 4 – Estrutura química dos flavonóis encontrados em uvas.



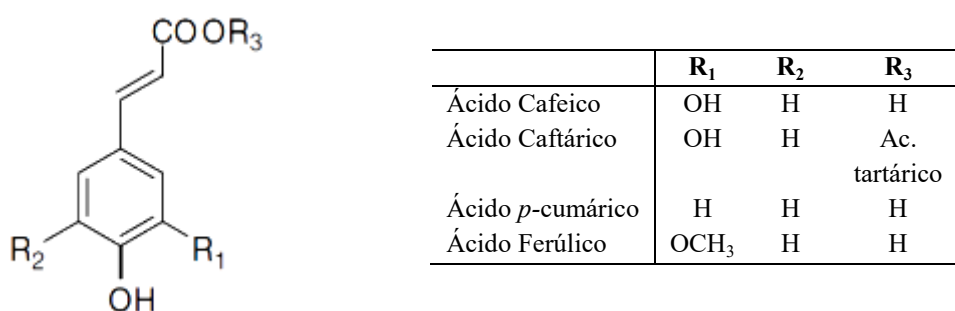
Fonte: Adaptado de Cabrita, Ricardo-Da-Silva e Laureano (2003).

### 3.2.2 Ácidos fenólicos e estilbenos

Os ácidos fenólicos (cinâmico e benzoico) e os estilbenos são encontrados nas uvas (precisamente na casca e polpa) e nos vinhos (JACKSON, 2008). Em vinhos brancos os ácidos hidroxibenzoicos e hidroxicinâmicos destacam-se, sendo os hidroxicinâmicos encontrados em maiores concentrações. São considerados incolores, no entanto, participam como substrato das reações de escurecimento dos mostos e vinhos. Não apresentam um sabor ou odor característico, porém são precursores de alguns compostos voláteis (RIBÉREAUGAYON *et al.*, 2006).

Os ácidos hidroxicinâmicos (Figura 5) e seus derivados estão presentes em maior concentração em mostos e vinhos brancos, esses compostos são os melhores substratos da enzima polifenoloxidase o que culmina nas reações de oxidação enzimática do mosto e consequente escurecimento. A maior parte desses compostos está presente nas uvas na forma de ésteres do ácido tartárico, sendo o éster do ácido cafeico (ácido caftárico) o hidroxicinamato mais abundante tanto no mosto como no vinho branco (QUIRÓS; LAGE-YUSTY; LÓPEZ-HERNÁNDEZ, 2009; MORENO-ARRIBAS; POLO, 2009).

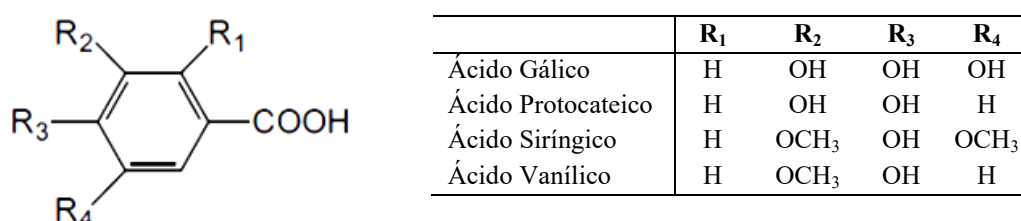
Figura 5 – Estrutura química dos ácidos hidroxicinâmicos.



Fonte: Adaptado de Garrido e Borges (2013).

Os ácidos hidroxibenzoicos (Figura 6) predominantes na uva e vinho são os ácidos gálico, *p*-hidroxibenzoico, vanílico, siríngico, protocateico e elágico. Dentre estes compostos, o ácido gálico é considerado o ácido hidroxibenzoico mais abundante em vinhos brancos, pode ser encontrado na forma livre nas uvas, e também pode ser liberado através da hidrólise das formas esterificadas com os flavanóis (MORENO-ARRIBAS; POLO, 2009; GARRIDO; BORGES, 2013).

Figura 6 - Estrutura química dos ácidos hidroxibenzoicos.

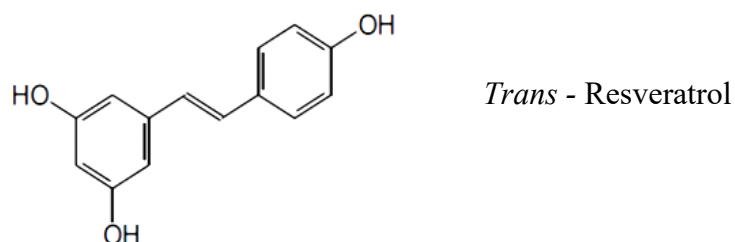


Fonte: Adaptado de Garrido e Borges (2013).

Os estilbenos são compostos fenólicos constituídos por dois anéis benzênicos ligados por uma cadeia etilênica. O composto mais estudado dessa classe é o *trans*-resveratrol (Figura

7) que é encontrado principalmente na casca da uva. Dessa forma os vinhos tintos, que têm maior contato com os sólidos da uva durante o processo de vinificação, possuem maior concentração desse composto quando comparado com os vinhos brancos (TRELA; WATERHOUSE, 1996; GARRIDO; BORGES, 2013).

Figura 7 – Estrutura química do estilbeno.



Fonte: Adaptado de Garrido e Borges (2013).

### 3.2.3 Atividade antioxidante

A atividade antioxidante é a capacidade de um composto em inibir ou retardar a degradação oxidativa e a peroxidação lipídica, e está relacionada principalmente com as propriedades redutoras e com a estrutura química. Estas características desempenham um papel importante na neutralização ou sequestro de radicais livres e quelação de metais de transição, tanto na etapa de iniciação como na propagação das reações oxidativas (ROGINSKY; LISSI, 2005).

Os compostos fenólicos são os principais antioxidantes naturais encontrados no reino vegetal. As uvas são consideradas uma das maiores fontes de compostos fenólicos quando comparadas a outras frutas e vegetais e vem sendo alvo de diversos estudos, assim como os seus produtos, sucos e vinhos (ABE *et al.*, 2007; MULERO *et al.*, 2015; JIMÉNEZ *et al.*, 2018). Pesquisas *in vivo* demonstraram que os polifenóis da uva e do vinho apresentam efeitos antioxidantes (BRAND-MILLER *et al.*, 2007; JARA-PALACIOS *et al.*, 2018; LINGUA *et al.*, 2019), assim como exercem forte influência na prevenção de diversas doenças como inibição da peroxidação do LDL, efeitos anti-inflamatórios, prevenção da aterosclerose e doenças cardiovasculares (FLANZY, 2000; CORDER *et al.*, 2001; CARLUCCIO *et al.*, 2003; JACKSON, 2008).

A determinação da atividade antioxidante dos alimentos, além de informar o seu potencial antioxidante antes de ser ingerido, é importante para avaliar sua proteção contra a oxidação e deterioração do próprio alimento, reações estas que podem levar à diminuição da

sua qualidade e do seu valor nutricional (LIMA, 2008). Os métodos mais utilizados para avaliar a capacidade antioxidante incluem a capacidade de absorvência do radical oxigênio (ORAC), poder de redução do ferro (método FRAP), inibição da peroxidação lipídica como TBARS (do inglês: *Thiobarbituric acid reactive substances*) e poder em sequestrar radicais livres utilizando os radicais DPPH e ABTS. Esses métodos diferem nos princípios dos testes e nas condições experimentais (LI *et al.*, 2009).

### 3.3 REAÇÕES DE OXIDAÇÃO EM UVA BRANCA

As uvas devem ser colhidas saudáveis e com maturidade enológica o mais uniforme possível, o qual é essencial para a obtenção de produtos de alta qualidade. Além disso, a temperatura ambiente no momento da colheita deve ser menor do que 20 °C, assim, em climas mais quentes a colheita deve ser realizada à noite ou nas primeiras horas da manhã (RIBÉREAU-GAYON *et al.*, 2006).

A cor é uma das importantes propriedades relacionadas ao apelo visual do mosto e vinhos. O escurecimento de mosto de uva branca pode ser proveniente tanto de reações enzimáticas como não enzimáticas o que afetam a qualidade dos produtos elaborados com uva, diminuindo assim o seu valor comercial (TOIT *et al.*, 2006).

Os compostos fenólicos, particularmente os *orto*-difenóis, são os principais componentes em vinhos brancos e são relacionados com o desenvolvimento das reações de oxidação, que podem acarretar em modificações de cor (escurecimento) e sabor (perda ou aumento da adstringência) dos vinhos. A oxidação dos compostos fenólicos pode ocorrer devido a reações químicas ou devido a reações de oxidação enzimática. De modo geral a oxidação enzimática, ocorre preferivelmente em mostos, visto que no vinho a atividade enzimática é inibida pelo etanol (CHEYNIER; SILVA, 1991; FLANZY, 2000).

A oxidação devido a reações químicas pode ocorrer através de diferentes mecanismos, sendo os compostos fenólicos substratos para todos eles. O primeiro mecanismo, catalisado por metais como ferro e cobre, envolve a oxidação dos compostos fenólicos à quinonas e conseqüente polimerização, aumentando a cor na região do amarelo pardo (ESSAFI; CHEYNIER; MOUTOUNET, 2003). O segundo mecanismo de escurecimento é particular para bebidas à base de uvas podendo ocorrer no mosto e no vinho, que consiste na oxidação do ácido tartárico à ácido glioxílico, o qual leva a condensação dos compostos fenólicos agindo como uma ponte entre as substâncias fenólicas. O terceiro mecanismo envolve a oxidação direta dos fenóis com o acetaldeído produzido pelas leveduras em bebidas

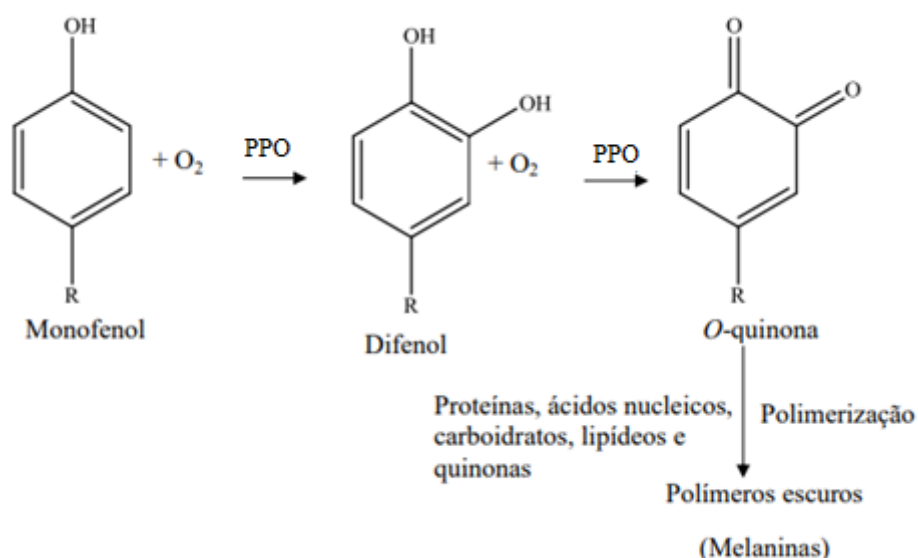


fermentadas (ESSAFI; CHEYNIER; MOUTOUNET, 2003; CLARK; PRENZLER; SCOLLARY, 2003).

A oxidação enzimática ocorre principalmente durante a etapa de prensagem da uva branca para obtenção do mosto, devido à ação de polifenoloxidasas (PPO) que também é conhecida por catecol-oxidase, tirosinase, fenolase e catecolase e faz parte de um grande grupo de enzimas conhecidas como oxidoredutases. Esta é principal enzima responsável pelo escurecimento enzimático e sua atividade varia conforme a espécie, o estágio de maturação e as condições de processo (MARTINEZ; WHITAKER, 1995; CLEMENTE, 1998; TOIT *et al.*, 2006). Dentre os fatores mais importantes que determinam a velocidade da reação de escurecimento enzimático, devido a ação da PPO, estão a concentração de PPO ativa e dos compostos fenólicos presentes no meio, o pH, a temperatura e a disponibilidade de oxigênio dos tecidos (MARTINEZ; WHITAKER, 1995).

A polifenoloxidase catalisa dois tipos de reações distintas, ambas envolvem o oxigênio molecular e podem catalisar a oxidação de monofenóis a *orto*-difenois e promover a oxidação de *orto*-difenois a *orto*-quinonas. As *orto*-quinonas formadas são instáveis e assim polimerizam-se rapidamente ou reagem com aminoácidos, peptídeos e proteínas, causando alterações estruturais e funcionais, diminuição do valor nutricional dos alimentos e origem de pigmentos escuros (melaninas) (Figura 8) (CHEYNIER; SILVA, 1991; MARTINEZ; WHITAKER, 1995).

Figura 8 - Mecanismo de oxidação da polifenoloxidase.



Fonte: Adaptado de Queiroz *et al.* (2008).

Reações de oxidações em produtos derivados da uva, como frutas frescas, sucos e vinhos são bem conhecidos e são um problema econômico para agricultores, comerciantes e consumidores, sendo alvo de diversos estudos (RAPEANU *et al.*, 2006; RIZZON; MENEGUZZO, 2007; WU, 2014; COMUZZO *et al.*, 2018). As técnicas pré-fermentativas são muito importantes para estabelecer a qualidade de um vinho, principalmente vinho branco, e devem ser cuidadosamente controladas, pois a extração de um excesso de polifenóis pode afetar a qualidade dos vinhos brancos (CHEYNIER; SILVA, 1991). Ferreira-Lima e colaboradores (2016) avaliaram o efeito da aplicação de diferentes condições de prensagem durante o processo de produção do vinho branco, e observaram que as condições de prensagem aplicadas para a obtenção do mosto influenciaram no perfil fenólico e atividade antioxidante dos vinhos.

### 3.4 INIBIDORES DE ESCURECIMENTO ENZIMÁTICO

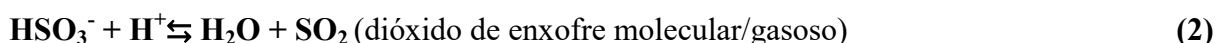
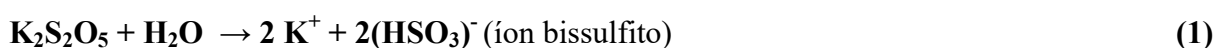
Diversos métodos têm sido aplicados para inibir o escurecimento enzimático, baseados na eliminação de um ou mais de seus componentes essenciais como o oxigênio, a enzima, o centro catalítico da PPO ou o substrato; na adição de um agente inibidor; bem como controlar as condições referentes ao armazenamento (LAURILA, KERVINEN e AHVENAINEN, 1998).

No processo de elaboração de vinhos brancos, a principal forma de prevenir o fenômeno de oxidação do mosto e vinho é a adição de dióxido de enxofre em diferentes etapas do processo de vinificação. No entanto, cabe ressaltar que embora o dióxido de enxofre seja um eficiente agente de proteção da oxidação, alguns consumidores são sensíveis ao consumo desta substância, e apresentam dentre outros sintomas reações alérgicas (CLARK; PRENZLER; SCOLLARY, 2003; SONNI *et al.*, 2011). Desta forma, nos últimos anos os vitivicultores sentiram a necessidade de buscar alternativas para reduzir a utilização de sulfito no vinho (WEBBER *et al.*, 2017; GIACOSA *et al.*, 2019). Embora a eliminação total do SO<sub>2</sub> não seja viável no processo tradicional de vinificação, evidências científicas e tecnológicas confirmam a possibilidade de reduzir significativamente seu uso nas etapas pré-fermentativas (WEBBER *et al.*, 2014). Sendo assim novas substâncias que possam ser utilizadas como antioxidantes são alvos de diversos estudos, como ácido ascórbico, glutathiona, taninos, entre outros (SONNI *et al.*, 2011; GIACOSA *et al.*, 2019).

### 3.4.1 Sulfitos

Sulfitos ou agentes sulfitantes são um dos mais antigos conservadores utilizados na indústria de alimentos, sendo utilizados na elaboração de vinhos desde o século XX. Esta classe compreende o dióxido de enxofre (SO<sub>2</sub>) e diversas formas de sais inorgânicos que liberam SO<sub>2</sub> no decorrer do processo (TAYLOR; HIGLEY; BUSH, 1986; GIACOSA *et al.*, 2019). Possuem diversas funções em alimentos e bebidas, sendo amplamente utilizados na indústria de vinhos devido a sua capacidade de eliminar bactérias e leveduras indesejáveis ao processo de fermentação. Além disso, possuem ação antioxidante que é parcialmente responsável pela inibição do escurecimento enzimático e não enzimático agindo competitivamente com o oxigênio, por ação direta sobre a polifenoloxidase ou por combinação irreversível com as *orto*-quinonas (TAYLOR; HIGLEY; BUSH, 1986; MACHADO; TOLEDO; VICENTE, 2006; GABRIELE *et al.*, 2018).

Diversos agentes sulfitantes são permitidos pela legislação brasileira para adição em vinhos, entre eles, dióxido de enxofre, metabissulfito de sódio e metabissulfito de potássio (ANVISA, 2016). Estes são considerados equivalentes após a incorporação aos alimentos uma vez que são convertidos às mesmas espécies iônicas ou não iônicas em um determinado pH, força iônica, concentração não-eletrolítica e temperatura (MACHADO; TOLEDO; VICENTE, 2006). As Equações (1, 2, 3) a seguir apresentam a dissociação do metabissulfito de potássio (K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub>) em meio aquoso.



O dióxido de enxofre e seus sais são classificados como aditivos alimentares e seu emprego possui um limite definido na legislação. Segundo a OIV (2019), o limite residual, de dióxido de enxofre e seus sais em vinhos variam conforme a classificação do mesmo. Nos vinhos tintos o limite residual é de 150 mg/L já em vinhos brancos e roses 200 mg/L. A legislação brasileira permite a adição de valor superior, determinando concentração máxima de 300 mg/L de SO<sub>2</sub> residual nos vinhos (ANVISA, 2016).

Apesar da eficácia e ampla utilização dos sulfitos na indústria de alimentos e bebidas, efeitos adversos à saúde vem sendo relatados desde a década de 1970. Vários riscos à saúde humana, incluindo dermatite, urticária, angioedema, diarreia, dor abdominal, bronco

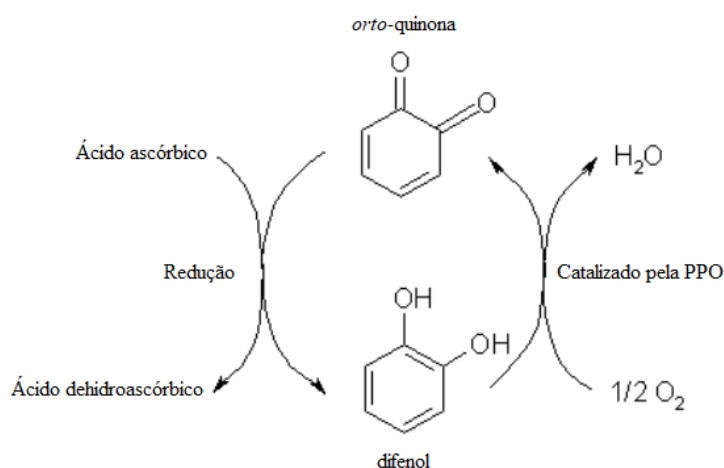
constrição e anafilaxia, têm sido associados ao consumo de SO<sub>2</sub> (TAYLOR; HIGLEY; BUSH, 1986; RAPOSO *et al.*, 2016). De acordo com Costanigro, Appleby e Menke (2014), os indivíduos sensíveis ao sulfito podem apresentar reações alérgicas graves, uma vez que os derivados do SO<sub>2</sub> podem causar a ativação de proto-oncogenes, a inativação de genes supressores de tumor e até mesmo desempenhar um papel no desenvolvimento de câncer de pulmão associado ao SO<sub>2</sub>.

Tendo em vista os efeitos adversos do dióxido de enxofre à saúde, Gabriele e colaboradores (2018) realizaram um estudo cujo objetivo foi avaliar o efeito da redução dos sulfitos na composição fitoquímica e atividade antioxidante do vinho tinto, em comparação a um vinho convencional adicionado de 150 mg/L de sulfito. Os autores observaram que os vinhos com baixo ou nenhum teor de sulfito apresentaram teor de compostos bioativos e atividades biológicas iguais ou similares aos vinhos convencionais. Resultados similares já haviam sido relatados por Garaguso e Nardini (2015).

### **3.4.2 Ácido ascórbico**

O ácido ascórbico, ou vitamina C, além de atribuir valor nutricional aos alimentos, também apresenta ação redutora. Juntamente com seus sais neutros compõe um dos principais grupos de antioxidantes empregados em produtos vegetais com o intuito de prevenir o escurecimento e outras reações oxidativas. Atua sequestrando o cobre, grupo prostético da PPO, e reduzindo quinonas a fenóis antes de formarem pigmentos escuros (SAPERS; MILLER, 1998). A redução das quinonas aos seus precursores fenólicos leva à oxidação irreversível do ácido ascórbico (que é preferencialmente oxidado em relação aos compostos fenólicos) e à formação de ácido dehidroascórbico sem atividade inibitória (Figura 9) (MARSHALL; KIM; WEI, 2000).

Figura 9 – Mecanismo de prevenção da atividade oxidante através do ácido ascórbico.



Fonte: Marshall, Kim e Wei (2000).

O ácido ascórbico ainda é pouco utilizado na elaboração de vinhos (SMRCKA; BARON, 2016), porém diferentes estudos confirmam a sua propriedade antioxidante quando adicionados no meio (BARRIL; CLARK; SCOLLARY, 2012; COMUZZO *et al.*, 2014; BARILL *et al.*, 2016). O seu sinergismo com o  $SO_2$  é mais eficaz do que quando utilizado de forma isolada, isso porque quando o ácido ascórbico é utilizado sozinho, tanto o peróxido de hidrogênio como os produtos da degradação do ácido dehidroascórbico podem levar a formação de pigmentos de degradação e assim alterar a coloração do vinho (CLARK; PRENZLER; SCOLLARY, 2003; SONNI *et al.*, 2011; SMRCKA; BARON, 2016).

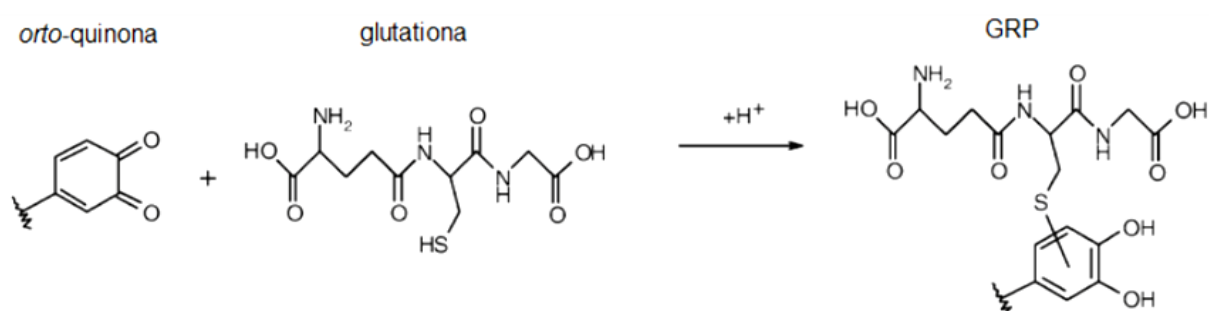
### 3.4.3 Glutathiona

A glutathiona (GSH) é um tripeptídeo de L-glutamato, L-cisteína e glicina. É sintetizada a partir de aminoácidos através da ação sequencial da  $\gamma$ -glutamilcisteína e da glutathiona sintetase (MEISTER, 1988). Sua forma monomérica é conhecida como glutathiona reduzida (GSH) e seu dímero, como glutathiona oxidada (GSSG), sendo que mais de 90% da glutathiona é encontrada na sua forma reduzida. A GSSG é formada em consequência da oxidação da GSH, mas pode ser reduzida novamente a GSH pela enzima glutathiona redutase (KRITZINGER; BAUER; TOIT, 2013). Presente em diversas frutas e alimentos possui propriedades benéficas como prevenção de formação de radicais livres, detoxificação de células e inibição do escurecimento enzimático e não enzimático (LAVIGNE; PONS; DUBOURDIEU, 2007).

A uva é a primeira fonte de glutathiona nos vinhos, sendo que sua concentração é dependente de diversos fatores como variedade, estágio de maturação, condições ambientais e práticas de cultivo (FRACASSETTI *et al.*, 2011). No mosto e na uva o teor de GSH é dependente de diversos fatores como exposição ao oxigênio, atividade da enzima tirosinase, maceração com a casca e a prensagem durante os processos pré-fermentativos. Pesquisas demonstram que os níveis de GSH no mosto e vinho variam de não detectáveis até 100 mg/L (CHEYNIER; SOUQUET; MOUTOUNET, 1989; PARK; BOULTON; NOBLE, 2000; TOIT *et al.*, 2006; FRACASSETTI *et al.*, 2011).

Em mostos e vinhos, o mecanismo de ação da GSH como antioxidante envolve a formação do “produto da reação da uva”, também denominado como *Grape Reaction Product* (GRP), que se refere ao produto que é resultante entre a glutathiona e as quinonas de certos fenóis presentes no mosto (Figura 10), como por exemplo, o ácido caftárico que é o principal substrato da reação (NIKOLANTONAKI; MAGIATIS; WATERHOUSE, 2014).

Figura 10 - Reação da glutathiona com compostos *orto*-quinona (o local da adição depende do tipo de composto fenólico envolvido).



Fonte: Sonni *et al.* (2011).

A formação do GRP, que é um composto incolor, evita a formação de compostos que contribuem para o escurecimento, pois o GRP não é substrato para a PPO, impedindo desta forma que a reação de escurecimento prossiga. Além de prevenir o escurecimento, a presença de GSH no mosto pode prevenir a perda de aromas varietais que são característicos de vinhos brancos (CHEYNIER; RIGAUD; MOUTOUNET, 1990; FLANZY, 2000; FRACASSETTI *et al.*, 2011).

A adição da glutathiona em vinhos vem sendo muito discutida por órgãos regulamentadores de diversos países, e estudos vem sendo realizados para esclarecer qual concentração deve ser adicionada e em quais etapas do processo de vinificação (FERREIRA-LIMA *et al.*, 2016; WEBBER *et al.*, 2017). Diferentes pesquisadores avaliaram o uso de

glutathione para a redução dos teores de  $\text{SO}_2$  no vinho devido à sua atividade antioxidante (SONNI *et al.*, 2011, NIKOLANTONAKI; MAGIATIS; WATERHOUSE, 2014; GIACOSA *et al.*, 2019). O estudo de Webber *et al.* (2014) relata que a adição de GSH evita a oxidação enzimática que ocorre no mosto e também a oxidação química que ocorre principalmente durante o armazenamento dos vinhos espumantes.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 MATERIAL

#### 4.1.1 Reagentes

Para realização das análises foram utilizados reagentes e padrões de grau analítico, todos os reagentes com grau de pureza maior que 95%.

#### 4.1.2 Amostras

As uvas da variedade Niágara Branca foram cedidas por uma vinícola do Estado de Santa Catarina, tiveram seus cachos selecionados de acordo com a homogeneidade de cor, tamanho das bagas e ausência de defeitos. Os cachos foram conduzidos ao laboratório de Bioquímica de Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC, identificados e congelados a -18°C até a realização das análises.

Para o preparo dos mostos foram utilizadas bagas de uva para obtenção de 50 mL de mosto. As bagas foram acondicionadas em embalagens plásticas para esmagamento manual. Após o esmagamento ocorreu a centrifugação do mosto a 4.000 rpm por 10 minutos. O precipitado foi descartado e o sobrenadante utilizado para a realização das análises. O preparo do mosto ocorreu somente no momento da adição dos agentes antioxidantes para posteriores análises.

##### 4.1.2.1 Experimento

Durante a obtenção do mosto foram realizados diferentes experimentos a fim de avaliar a proteção da oxidação do mosto: TC, sem adição de agente antioxidante; T1, 300mg/L de metabissulfito de potássio; T2, 150 mg/L de metabissulfito de potássio; T3, 150 mg/L de ácido ascórbico; T4, 150 mg/L de glutatona; T5, 150 mg/L de dióxido de enxofre + 150 mg/L de glutatona; T6, 150 mg/L de dióxido de enxofre + 150 mg/L de ácido ascórbico; T7, 150 mg/L de dióxido de enxofre + 150 mg/L de glutatona + 150 mg/L de ácido ascórbico. Cada experimento foi realizado em triplicata.



## 4.2 MÉTODOS

### 4.2.1 Análises físico-químicas

As análises físico-químicas foram determinadas de acordo com os métodos da Organização Internacional da Uva e do Vinho (OIV, 2019). Foram realizadas análises de pH (pH meter 220 MP – METTLER TOLEDO), sólidos solúveis totais (SST - °Brix) (refratômetro Quick – Brix<sup>TM</sup> 90 - METTLER TOLEDO) e acidez total titulável (ATT) (g de ácido tartárico/L de mosto). Todas as análises foram realizadas em triplicata.

### 4.2.2 Análises espectrofotométricas

As amostras foram analisadas em espectrofotômetro UV-VIS (Hitachi U 2010, CA, USA) quanto à atividade da polifenoloxidase, índice de escurecimento, *orto*-difenóis, teor de polifenóis totais e atividade antioxidante.

#### 4.2.2.1 Otimização das condições de temperatura e pH para a atividade da polifenoloxidase da uva *Niágara Branca*.

Para avaliar as condições ótimas da atividade da enzima polifenoloxidase foi utilizado o extrato bruto da uva *Niágara Branca* para determinar a melhor temperatura e pH. A análise da temperatura foi realizada utilizando três diferentes temperaturas:  $5 \pm 2$  °C;  $25 \pm 2$  °C;  $65 \pm 2$  °C. Já para determinar o melhor pH foram avaliados diferentes pH entre a faixa de pH 2,0 e 11,0 (totalizando 11 ensaios).

#### 4.2.2.2 Atividade da Polifenoloxidase (PPO)

A atividade da polifenoloxidase (PPO) no mosto das uvas foi determinada conforme descrito por Traverso-Rueda e Singleton (1973), com modificações seguindo as otimizações de pH e temperatura. As leituras foram realizadas a 420 nm. Uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como o aumento de 0,001 de absorbância por minuto por mL de amostra (U/mL). A atividade residual foi calculada e a atividade inibitória foi expressa como porcentagem de inibição conforme a Equação 4 (WU, 2014).

$$\text{\% Inibição} = ((A-B)/A)*100 \quad (4)$$

Onde, **A**= atividade de PPO do controle; **B** = atividade de PPO na presença do agente antioxidante.

#### 4.2.2.3 Índice de escurecimento

O índice de escurecimento (IE) foi determinado através de medidas diretas de absorbância das amostras de mosto da uva em 420 nm em cubeta (10 mm) utilizando um espectrofotômetro UV-VIS (Hitachi U 2010, CA, USA) (LERMA *et al.*, 2010). Os resultados foram expressos em % de Inibição do índice de escurecimento enzimático (Equação 5).

$$\text{\% Inibição} = ((A-B)/A)*100 \quad (5)$$

Onde, **A**= Absorbância a 420 nm do tratamento controle; **B** = Absorbância a 420 nm do mosto na presença do agente antioxidante.

#### 4.2.2.4 Determinação de orto-difenóis

A determinação dos *orto*-difenóis (OD) (reação de Arnow) foi realizada de acordo com Flanzly e Aubert (1969), utilizando o reativo de Arnow e formação de complexo do molibdênio, presente no reativo, com os compostos *orto*-, di- e tri-fenóis presentes no extrato. A leitura da absorbância foi realizada em 500 nm. O resultado obtido foi expresso em mg de catequina L<sup>-1</sup>.

#### 4.2.2.5 Polifenóis totais

A concentração de polifenóis totais (PT) foi determinada de acordo com o método colorimétrico de Folin-Ciocalteu, com leituras da absorbância em 760 nm. Para o cálculo de polifenóis totais foi utilizado uma curva padrão de ácido gálico e os resultados foram expressos em equivalente de ácido gálico (mg de GAE/ L) (SINGLETON; ROSSI, 1965).

#### 4.2.2.6 Atividade antioxidante

A atividade antioxidante *in vitro* (AA) foi determinada pelo do método ABTS (ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin) 6-ácido sulfônico) de acordo com Re *et al.* (1999). Esse método avalia o poder de sequestro de radicais livres através de reação com o radical ABTS•. Medidas de absorvância em 754 nm foram realizadas antes e após de 6 minutos de reação entre o radical e a amostra. Os resultados de atividade antioxidante foram expressos em equivalente ao Trolox (TEAC) (mM).

#### 4.2.3 Análise estatística

Os resultados foram submetidos a análise estatística pelo programa STATISTICA 8.0 (StatSoft Inc., Tulsa, EUA) e avaliados por meio de análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ). Todas as análises foram realizadas em triplicata e os resultados expressos como média  $\pm$  desvio padrão.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 5.1 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS DA UVA

Para a identificação do ponto ótimo de colheita da uva faz-se necessário o conhecimento acerca das alterações físico-químicas que ocorrem na baga e resultam no alcance de sua qualidade máxima (LIMA, 2010). Fatores genéticos, fisiológicos e ambientais são determinantes na composição das uvas e mostos e influenciam diretamente na qualidade final dos vinhos (RIBÉREAU-GAYON *et al.*, 2006). A Tabela 1 apresenta os resultados das análises físico-químicas das uvas Niágara Branca após a colheita.

Tabela 1 – Composição físico-química da uva Niágara Branca.

ANÁLISES	RESULTADOS
pH	3,23 ± 0,05
Sólidos solúveis totais (°Brix)	12,8 ± 0,06
Acidez titulável (g/L ácido tartárico)	9,28 ± 0,18

Resultados expressos em média ± desvio padrão.

Pode-se observar que os resultados de pH obtidos para as uvas Niágara Branca, foram similares aos encontrados por Burin *et al.* (2014) que avaliaram a mesma cultivar. Este resultado também é similar ao pH encontrado para as cultivares de uva Branca Riesling e Viognier com valores de 3,25 e 3,29, respectivamente (JIN *et al.*, 2017). O pH possui uma grande importância nas características físico-químicas, biológicas e sensoriais dos vinhos. No momento da colheita, o pH do mosto da uva deve estar na faixa de 3,1 a 3,6, para que o vinho atinja níveis satisfatórios em características como cor e sabor, uma vez que a velocidade de fermentação é reduzida em pH menor ou igual a 3,0 (AMERINE; OUGH, 1976; RIBÉREAU-GAYON *et al.*, 2006).

O teor de acidez total determinado na uva Niágara Branca está de acordo com o relatado em outros estudos com mostos de uvas Brancas (ANZANELLO; SOUZA; GONZATTO, 2008; JIN *et al.*, 2017). A acidez total de uvas e vinhos é formada pela soma dos ácidos orgânicos livres totais presentes no meio como os ácidos tartárico, málico, cítrico, láctico, succínico e acético. O ácido tartárico é um ácido específico da uva e a videira é uma das raras plantas que o sintetiza em quantidade elevada. Ao final da fase de crescimento vegetativo das uvas, as concentrações deste ácido podem chegar a 15 g/L de mosto

(FLANZY, 2000; RIBÉREAU-GAYON *et al.*, 2006). A acidez total de mostos é muito importante, pois influencia diretamente nas propriedades sensoriais (sabor, cor e aroma) e na estabilidade microbiológica e físico-química dos vinhos, especialmente em vinhos brancos (JACKSON, 2008).

Quanto ao teor de sólidos solúveis totais, que indica a concentração de açúcares no mosto, foi obtido um valor médio de 12,8 °Brix. Este método é aplicável somente aos mostos e aos sucos, pois quando se trata de vinhos o álcool interfere no índice de refração (RIZZON, 2010). O valor obtido neste estudo foi menor do que os encontrados em estudos realizados com a mesma variedade de uva por Anzanello, Souza e Gonzatto (2008) e Burin *et al.* (2014) (16,6 e 15,0, respectivamente). Diferenças observadas no teor de sólidos solúveis da uva podem estar relacionadas a fatores relacionados à safra, como clima, índice pluviométrico, horas de sol, entre outros (JACKSON, 2008).

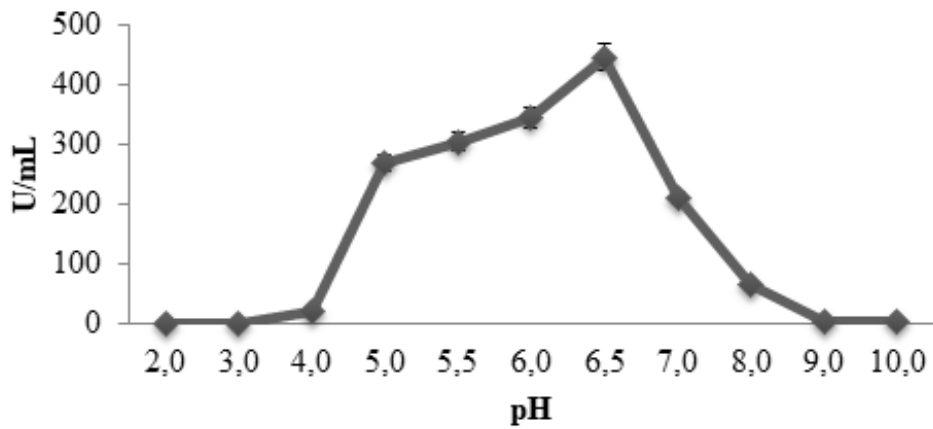
## 5.2 ATIVIDADE DA POLIFENOLOXIDASE E ÍNDICE DE ESCURECIMENTO DOS MOSTOS

### 5.2.1 Otimização das condições de atividade da enzima polifenoloxidase

A atividade enzimática é influenciada por diversos fatores, como a concentração do substrato, temperatura e pH (MARTINEZ; WHITAKER, 1995). Assim, neste estudo, foram realizados testes preliminares a fim de determinar a atividade da polifenoloxidase da uva Niágara Branca em função do pH e da temperatura.

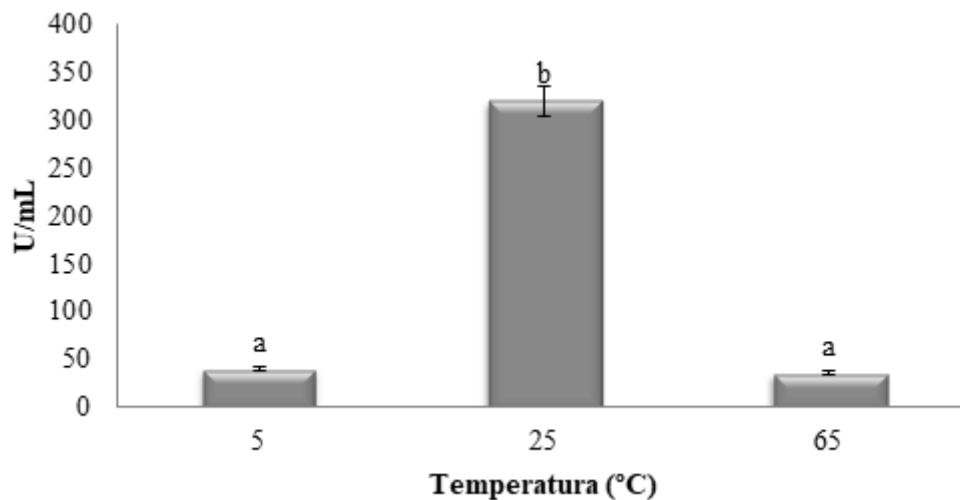
Cada reação enzimática é alcançada em um pH ótimo para a sua atividade máxima, geralmente, situado entre pH de 4,5 a 8,0 dependendo da matriz alimentícia (QUEIROZ *et al.*, 2008). Os resultados da determinação da influência do pH na atividade da polifenoloxidase em uva Niágara Branca estão demonstrados na Figura 11, e pode-se observar que o pH ótimo foi de 6,5 para a uva Niágara Branca. O resultado encontrado neste estudo está de acordo com outras pesquisas realizadas para avaliar o pH ótimo da atividade da PPO em diferentes cultivares, como por exemplo, em uvas Concord que os valores de pH foram em uma faixa de 5,9 a 6,3 (CASH *et al.*, 1976); pH 5,5 para as uvas Ravat 51 e Niágara, (WISSEMANN; LEE, 1981); pH 6,0 para uva Kosu (NAKAMURA *et al.*, 1983); pH 6,3 para uva Muscat Bailey (OKUDA *et al.*, 1999); pH 5,0 para uva Victoria (RAPEANU *et al.*, 2006) e pH 5,4 para uva Narince (ÜNAL; SENER, 2013).

Figura 11 – Influência do pH na atividade da polifenoloxidase em uva Niágara Branca.



Para avaliar a atividade da polifenoloxidase em função da temperatura foram realizados experimentos em três temperaturas distintas:  $5 \pm 2$  °C;  $25 \pm 2$  °C;  $65 \pm 2$  °C, utilizando o catecol como substrato. Foi possível observar que na temperatura de  $25 \pm 2$  °C a enzima polifenoloxidase apresentou a sua melhor atividade enzimática (Figura 12). O resultado deste estudo está de acordo com as temperaturas relatadas para as atividades da PPO nas uvas Concord (CASH *et al.*, 1976), Ravat 51 e Niágara (WISSEMANN; LEE, 1981) e Victoria (RAPEANU *et al.*, 2006), que também obtiveram a atividade máxima da PPO à 25 °C.

Figura 12 – Efeito da temperatura na atividade da polifenoloxidase em uva Niágara Branca.



### 5.2.2 Influência dos agentes antioxidantes na atividade enzimática e escurecimento

A Tabela 2 apresenta a atividade da polifenoloxidase (PPO) e o índice de escurecimento (IE) do mosto da uva Niágara Branca após adição dos agentes antioxidantes e amostra controle.

Tabela 2 – Valores da atividade da polifenoloxidase e índice de escurecimento do mosto de uva Niágara Branca adicionado dos diferentes agentes antioxidantes de forma isolada e combinada.

Tratamentos	PPO (U/mL)	IE (A420nm)
TC	480 <sup>a</sup> ± 20	0,817 <sup>a</sup> ± 0,018
T1	nd	0,342 <sup>de</sup> ± 0,013
T2	20 <sup>e</sup> ± 0	0,429 <sup>c</sup> ± 0,008
T3	225 <sup>b</sup> ± 25	0,553 <sup>b</sup> ± 0,005
T4	175 <sup>c</sup> ± 5	0,545 <sup>b</sup> ± 0,004
T5	65 <sup>d</sup> ± 5	0,369 <sup>d</sup> ± 0,010
T6	20 <sup>e</sup> ± 0	0,408 <sup>c</sup> ± 0,011
T7	nd	0,332 <sup>e</sup> ± 0,011

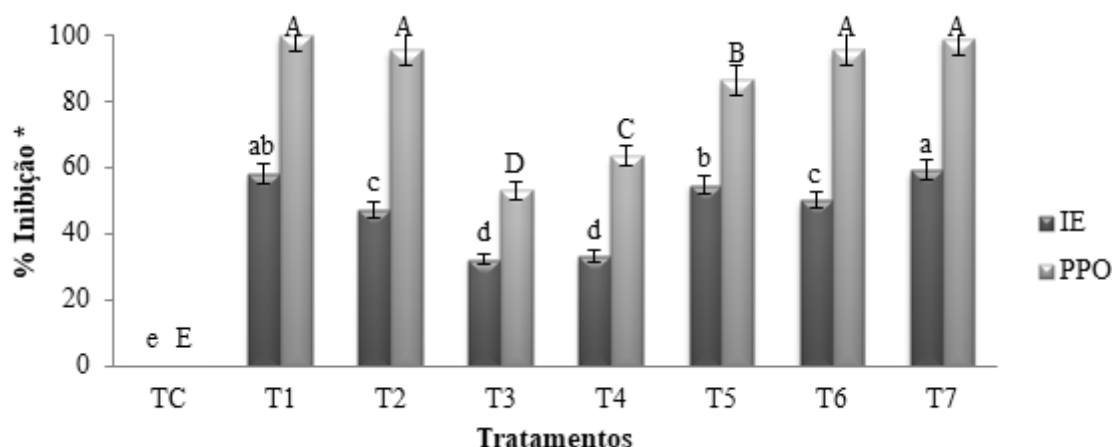
Resultados expressos em média ± desvio padrão. nd: não detectado. PPO: atividade enzimática da polifenoloxidase; IE: Índice de escurecimento. Letras diferentes na mesma coluna demonstram diferença significativa entre as amostras ( $p < 0,05$ ) conforme Teste de Tukey.

Conforme apresentado na Tabela 2, a adição de todos os agentes antioxidantes tanto na forma isolada ou combinada, tiveram um efeito significativo na redução da atividade da polifenoloxidase. Pode-se ressaltar que no mosto com maior concentração de metabissulfito de potássio (T1) não foi possível detectar a atividade enzimática da PPO, e o mesmo comportamento ocorreu na amostra em que houve uma combinação dos agentes antioxidantes utilizando a menor concentração de metabissulfito de potássio (T7).

A Figura 13 apresenta o índice de inibição da polifenoloxidase quando comparado ao tratamento controle. Todos os tratamentos apresentaram mais de 50% de redução da atividade da PPO, como também diferiram significativamente ( $p < 0,05$ ) do mosto controle. Os resultados também demonstraram que não houve diferença significativa na porcentagem de inibição da PPO quando utilizado somente o metabissulfito de potássio nas concentrações de 300 mg/L (T1) e 150 mg/L (T2), assim como nos tratamentos com a associação do

metabissulfito de potássio e ácido ascórbico (T6) e com o tratamento T7 no qual foi adicionado menor concentração de metabissulfito em associação com ácido ascórbico e glutatona.

Figura 13 – Porcentagem de inibição do índice de escurecimento e da atividade da polifenoloxidase do mosto de uva Niágara Branca após adição de diferentes agentes antioxidantes e amostra controle



PPO: atividade enzimática da polifenoloxidase; IE: Índice de escurecimento. Letras minúsculas diferentes demonstram diferença significativa no índice de escurecimento e letras maiúsculas demonstram diferença significativa na atividade da polifenoloxidase entre as amostras ( $p < 0,05$ ) conforme Teste de Tukey.

\*Os resultados foram determinados em relação aos resultados obtidos no tratamento controle TC (sem adição de agente antioxidante).

De acordo com a literatura, diferentes formas de inibição da PPO são conhecidas, como a utilização de agentes antioxidantes, quelantes e até adição de compostos que seriam substratos preferenciais da enzima em relação aos presentes no próprio alimento (MARSHALL; KIM; WEI, 2000). A busca pela redução ou inibição do processo de escurecimento enzimático são amplamente estudados em diversas frutas, hortaliças, sucos e vinhos, relacionando-se principalmente à ação da PPO nos compostos fenólicos que originam quinonas no meio, e consequente escurecimento do meio (QUEIROZ *et al.*, 2008). Estudo realizado por Rapeanu *et al.* (2006) com uvas Victoria avaliaram a atividade da PPO e o efeito inibitório da atividade enzimática com a adição de diferentes agentes enológicos como ácido ascórbico, ácido benzoico, L-cisteína, Glutaciona e metabissulfito de sódio. Os autores observaram que o ácido ascórbico, L-cisteína e o metabissulfito de sódio apresentaram maior eficiência quanto o grau de inibição da PPO. Unal e Senar (2013) realizaram um estudo da atividade da PPO com uvas da cultivar Narince e observaram que o escurecimento enzimático pode ser efetivamente controlado pelo uso de sulfito, ácido ascórbico e cisteína no mosto.



Estudo realizado com cultivares de uva Ravat 51 e Niágara demonstrou que a inativação da PPO ocorreu de forma positiva frente aos antioxidantes glutaciona, ácido ascórbico e metabissulfito de potássio quando utilizados de forma isolada (WISSEMANN; LEE, 1981).

Neste estudo, apesar da Glutaciona (T4) apresentar efeito inibitório da atividade da PPO acima de 60%, este valor foi inferior ao relatado por Wu (2014) que testou o efeito da GSH na inibição do escurecimento enzimático e não enzimático em sucos de uva e relatou que a glutaciona inibiu a atividade da PPO em 99,4%. No entanto, quando a glutaciona foi utilizada no mosto em combinação com o metabissulfito (T5), o efeito inibitório da PPO aumentou para 86,6% (Figura 13). Pesquisas avaliaram o impacto da adição de glutaciona combinada com metabissulfito na composição volátil dos vinhos e demonstraram que esta associação apresenta efeitos benéficos, uma vez que minimizou a perda de compostos aromáticos primários, provenientes da uva, como os mono-terpenos e aromas secundário, originados do processo de fermentação como os ésteres, assim como retardou as reações de escurecimento em vinhos brancos (ROUSSIS *et al.*, 2007; BOUZANQUET *et al.*, 2012).

A adição no mosto de ácido ascórbico de forma isolada (T3) foi o que apresentou menor eficácia quanto à inibição da atividade da PPO (53,1%), porém quando este mesmo agente é associado com o dióxido de enxofre (T6) a inibição aumentou para 95,8%. Estes resultados estão de acordo com a pesquisa realizada por Peng e colaboradores (1998) que avaliaram o efeito do ácido ascórbico em vinhos brancos, e indicaram que a combinação do metabissulfito com o ácido ascórbico é uma alternativa muito eficaz em proteger o vinho branco do escurecimento durante a conservação em garrafa, quando comparado com o uso do ácido ascórbico isolado.

O índice de escurecimento determinado pela absorbância a 420 nm é um parâmetro amplamente utilizado na enologia para avaliar as reações oxidativas que ocorrem em mostos e vinhos brancos (CILLIERS; SINGLETON, 1991; MAYÉN, 1997; BARÓN *et al.*, 2000). Neste estudo, conforme apresentado na Tabela 2, todas as amostras avaliadas apresentaram índice de escurecimento inferior quando comparadas com o mosto controle, diferindo significativamente ( $p < 0,05$ ). Ferreira *et al.* (1997) estabeleceram diferentes níveis para o escurecimento do vinho com base na absorbância em 420 nm: leve (absorbância menor que 0,2), moderado (entre 0,2 e 0,5) e intenso (maior que 0,5). Considerando essas mesmas categorias, os tratamentos T1, T2, T5, T6 e T7, apresentaram um escurecimento moderado, enquanto que os tratamentos T3, T4 e TC, apresentaram um escurecimento intenso.

É possível observar que nas amostras em que houve uma combinação entre os agentes antioxidantes o índice de inibição do escurecimento foi superior quando comparado

aos agentes utilizados de forma isolada, em que o tratamento T7, não diferiu significativamente do tratamento T1 em que foi utilizado o valor máximo de metabissulfito de potássio permitido pela legislação. Sonni *et al.* (2011) estudaram o efeito da combinação de ácido ascórbico e glutatona em vinhos modelos com a adição de metabissulfito de potássio, e verificaram que a combinação de ácido ascórbico e glutatona apresentou maior proteção contra a coloração oxidativa quando comparado ao uso de forma isolada. Pesquisadores avaliaram após 4 meses de envelhecimento em garrafa o efeito da adição de glutatona e a sua combinação com o ácido ascórbico, na cor dos vinhos Muscat Ottonel previamente tratados com dióxido de enxofre. Um efeito sinérgico positivo ocorreu na redução na intensidade da cor dos vinhos provenientes da adição dos agentes de forma combinada. Desta forma os autores sugerem que a combinação de ácido ascórbico e glutatona podem conferir melhor estabilidade da cor dos vinhos brancos durante o armazenamento (ANTOCE; BADEA; COJOCARU, 2016).

### 5.3 DETERMINAÇÃO DE *ORTO*-DIFENÓIS E POLIFENÓIS TOTAIS

Com a realização deste estudo pode-se observar que a adição de diferentes agentes antioxidantes acarretou alterações na concentração de polifenóis totais e *orto*-difenóis do mosto da uva Niágara Branca conforme demonstrado na Tabela 3.

Tabela 3 – Teor de *orto*-difenóis (OD) e polifenóis totais (PT) do mosto de uva Niágara Branca adicionado de diferentes agentes antioxidantes.

Tratamentos	OD (mg/L catequina)	PT (mg/L ácido gálico)
T <sub>C</sub>	155,16 <sup>d</sup> ± 4,90	428,0 <sup>g</sup> ± 1,36
T <sub>1</sub>	202,50 <sup>c</sup> ± 3,26	618,00 <sup>c</sup> ± 5,91
T <sub>2</sub>	224,13 <sup>b</sup> ± 1,22	640,27 <sup>b</sup> ± 4,55
T <sub>3</sub>	232,30 <sup>a</sup> ± 1,22	564,36 <sup>d</sup> ± 5,00
T <sub>4</sub>	200,87 <sup>c</sup> ± 6,53	538,91 <sup>f</sup> ± 4,09
T <sub>5</sub>	191,71 <sup>c</sup> ± 2,45	553,00 <sup>e</sup> ± 2,73
T <sub>6</sub>	217,20 <sup>b</sup> ± 0,82	568,91 <sup>d</sup> ± 1,36
T <sub>7</sub>	222,09 <sup>b</sup> ± 3,26	740,73 <sup>a</sup> ± 1,36

Resultados expressos em média ± desvio padrão. OD: *orto*-difenóis; PT: polifenóis totais. Letras diferentes na mesma coluna demonstram diferença significativa entre as amostras ( $p < 0,05$ ) conforme Teste de Tukey.

Os *orto*-difenóis são os compostos mais susceptíveis à oxidação em mostos e vinhos e responsáveis pelo escurecimento, principalmente para as uvas e vinhos brancos. Esses compostos são oxidados a *orto*-quinonas que podem polimerizar e condensar com outros compostos, incluindo compostos não fenólicos, e formar pigmentos escuros, que conferem a cor escura nos vinhos (LI; GUO; WANG, 2008). Uma característica comum de polifenóis, especialmente aqueles cujos grupos hidroxila localizam-se na posição *orto* ou *para*, é a facilidade de participar das reações de redução-oxidação. Por essa razão, compostos fenólicos com função *orto*- desempenham importante atividade no combate a radicais livres (SROKA; CISOWSKI, 2003).

Os resultados deste estudo demonstraram que o teor de *orto*-difenóis nos diferentes tratamentos variou de 191,71 à 232,30 mg /L de catequina (Tabela 3). Observou-se que todos os mostos adicionados de agente antioxidante diferiram significativamente ( $p < 0,05$ ) no teor de *orto*-difenóis quando comparados ao mosto controle o qual apresentou a menor concentração destes compostos. Em relação aos diferentes agentes utilizados pode-se observar que os tratamentos com ácido ascórbico (T3 e T6) apresentaram valores superiores quando comparados aos tratamentos adicionados de glutathione (T4 e T5). Este fato pode ser explicado pela atuação do agente antioxidante no mosto, uma vez que o ácido ascórbico pode reduzir as *orto*-quinonas, produzidas pela oxidação catalisada pela PPO, à *orto*-difenóis, retardando a formação dos pigmentos escuros (JANG; MOON, 2011), enquanto que a glutathione reage com as *orto*-quinonas já formadas originando um produto incolor denominado de GRP (*Grape Reaction Product*) (CHEYNIER *et al.*, 1990; CHEYNIER; RIGAUD; MOUTOUNET, 1990; FLANZY, 2000).

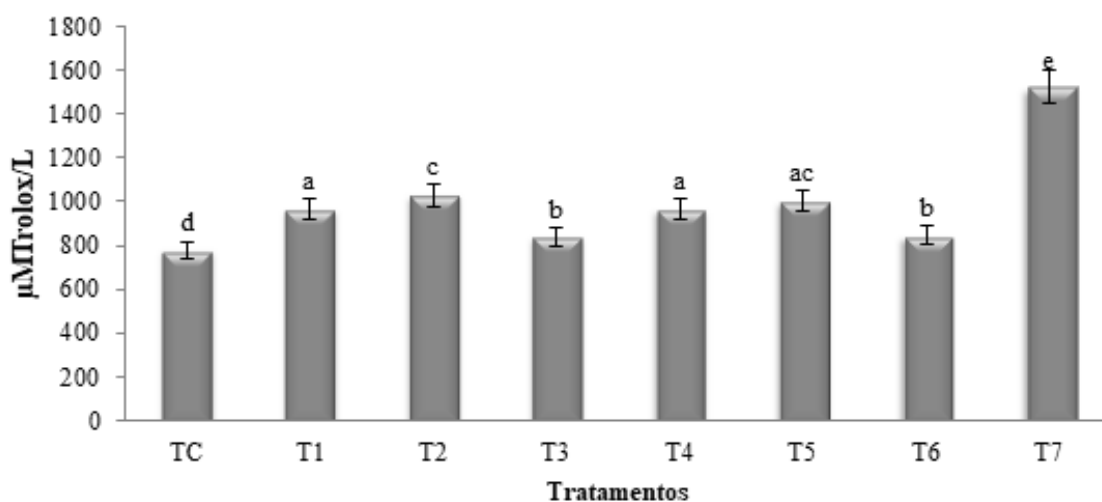
Com relação ao teor de PT, foi possível observar que a concentração variou entre 428 a 740,7 mg GAE /L nos diferentes tratamentos (Tabela 3). De forma geral, a concentração de PT dos mostos diferiu significativamente ( $p < 0,05$ ) de acordo com o agente antioxidante adicionado e com o tratamento controle. Pesquisadores afirmam que o teor de polifenóis do mosto de uva Branca está relacionado, entre outros fatores, com a ocorrência de reações de oxidação, uma vez que são os principais substratos desta reação enzimática (BONAGA, PALLOTTA, SYRGI, 1990; RIBÉREAU-GAYON *et al.*, 2006). Assim, pode-se observar que o mosto adicionado dos agentes antioxidantes combinados e com a menor concentração de sulfito como no tratamento T7 (metabissulfito de potássio + Glutathione + Ácido ascórbico) apresentou a maior concentração de PT, mesmo quando comparado a tratamento T1 que apresenta o maior teor de sulfito no meio. Altas concentrações de PT no mosto podem ser

benéficas uma vez que estes compostos desempenham um importante papel antioxidante (RUFINO *et al.*, 2010).

#### 5.4 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

A atividade antioxidante é a capacidade de um composto em inibir a degradação oxidativa e a peroxidação lipídica. Embora a atividade antioxidante dos fenólicos seja associada a diversos mecanismos, esses compostos são altamente reativos com radicais livres, sendo considerado seu principal mecanismo de ação (ROGINSKY; LISSI, 2005). Neste estudo, a avaliação da atividade antioxidante dos mostos foi realizada utilizando ensaio *in vitro* com base no poder de sequestro de radicais livres, método ABTS. Os resultados da capacidade antioxidante dos mostos adicionados dos diferentes agentes enológicos estão na Figura 14.

Figura 14 – Atividade antioxidante do mosto da uva Niágara Branca adicionado de diferentes agentes protetores de oxidação.



Resultados expressos como média  $\pm$  desvio padrão. Letras diferentes demonstram diferença significativa entre as amostras ( $p < 0,05$ ) conforme Teste de Tukey.

Pode-se observar que todos os tratamentos apresentaram diferença significativa ( $p < 0,05$ ) na capacidade antioxidante quando comparado ao tratamento controle. Com relação aos tratamentos cujos agentes foram adicionados de forma isolada (T1, T2, T3 e T4), a maior atividade antioxidante foi observada no tratamento T2, seguido dos tratamentos T1 e T4, que não diferiram significativamente, e o tratamento T3. Com relação aos mostos adicionados dos agentes de forma combinada, pode-se destacar o mosto adicionado de metabissulfito de

potássio + Glutathione + Ácido ascórbico (T7) que apresentou a maior atividade antioxidante (1523,2  $\mu$ MTrolox/L). Cabe destacar que esta mesma amostra também apresentou o maior teor de PT (Tabela 3).

## 6 CONCLUSÃO

Os resultados deste estudo demonstraram que todos os agentes antioxidantes de forma isolada ou combinada apresentaram efetivo controle da atividade da polifenoloxidase, assim como do escurecimento enzimático quando comparado ao mosto sem adição de antioxidantes. Dentre os tratamentos realizados, o mosto adicionado dos três agentes antioxidantes de forma combinada (metabissulfito de potássio + ácido ascórbico + glutathione) apresentou maior teor de polifenóis e capacidade antioxidante como também redução significativa da ação da atividade da polifenoloxidase e escurecimento enzimático. Cabe ressaltar que neste tratamento ocorreu uma redução de 75% na concentração do metabissulfito de potássio, com relação ao valor máximo permitido pela legislação.

Sugere-se para trabalhos futuros realizar a microvinificação dos mostos utilizando estes agentes antioxidantes de forma combinada, para avaliar o impacto e ação destes agentes na composição fenólica e volátil dos vinhos, e monitorar as alterações da composição durante o armazenamento em garrafa.

## REFERÊNCIAS

- ABE, L.T.; MOTA, R.V.; LAJOLO, F.M.; GENOVESE, M.I. Compostos fenólicos e capacidade antioxidante de cultivares de uvas *Vitis labrusca* L. e *Vitis vinifera* L. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, p. 394-400, 2007.
- ALLEN, M. **Advanced Oenology**. Charles Sturt University, 1994.
- AMERINE, M. A.; OUGH, C. S. **Análisis de vinos y mostos**. Zaragoza: Acribia, 1976.
- ANTOCE, A.O.; BADEA, G.A.; COJOCARU, G.A. Effects of Glutathione and Ascorbic Acid Addition on the CIELab Chromatic Characteristics of Muscat Ottonel Wines. **Agriculture and Agricultural Science Procedia**, v. 10, p. 206-214, 2016.
- ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada – RDC nº 123, de 04 de novembro de 2016. A Agência Nacional de Vigilância Sanitária dispõe sobre os aditivos alimentares e coadjuvantes de tecnologia autorizados para uso em vinhos. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil União**, v. 213, 2016
- ANZANELLO, R.; SOUZA, P.V.D.; GONZATTO, M.P. Produção de videiras ‘Niágara branca’ e ‘Concord’ submetidas a duas safras por ciclo vegetativo na depressão central do Rio Grande do Sul. **Scientia Agraria**, v. 9, n. 3, p. 311-316, 2008.
- BARÓN, R.; MAYÉN, M.; MÉRIDA, J.; MEDINA, M. Comparative study of browning and flavan-3-ols during the storage of white sherry wines treated with different fining agents. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 80, p. 226-230, 2000.
- BARRIL, C.; CLARK, A.C.; SCOLLARY, G.R. Chemistry of ascorbic acid and sulfur dioxide as an antioxidant system relevant to white wine. **Analytica Chimica Acta**, v. 732, p. 186-193, 2012.
- BARRIL, C.; RUTLEDGE, D.N.; SCOLLAR, G. R.; CLARK, A.C. Ascorbic acid and white wine production: a review of beneficial versus detrimental impacts. **Australian Journal of Grape and Wine Research**, v. 22, n. 2, p. 169-181, 2016.
- BONAGA, G; PALLOTTA, U.; SYRGHI, K. Influenza delle sostanze polifenoliche sulla qualità dei vini bianchi. **Vini d'Italia**, v. 32, n. 4, p. 13-30, 1990.
- BOUZANQUET, Q.; BARRIL, C.; CLARK, A. C.; DIAS, D. A.; SCOLLARY, G. R. A novel glutathione-hydroxycinnamic acid product generated in oxidative wine conditions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, n. 49, p. 12186–12195, 2012.
- BRAND-MILLER, J.C.; FATEMA, K.; MIDDLEMISS, C.; BARE, M.; LIU, V.; ATKINSON, F.; PETOCZ, P. Effect of alcoholic beverages on postprandial glycemia and insulinemia in lean, young, healthy adults. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 85, p. 1545-1551, 2007.
- BURIN, V.M.; FERREIRA-LIMA, N.E.; PANCERI, C.P.; BORDIGNON-LUIZ, M.T. Bioactive compounds and antioxidant activity of *Vitis vinifera* and *Vitis labrusca* grapes: Evaluation of different extraction methods. **Microchemical Journal**, v.114, p.155-163, 2014.

CABRITA, M. J.; RICARDO-DA-SILVA, J.; LAUREANO, O. Os compostos polifenólicos das uvas e dos vinhos. In: Seminário internacional de vitivinicultura. **Anais**, Enseada, México, 2003.

CARLUCCIO, M. A.; SICULELLA, L.; ANCORA, M.A.; MASSARO, M.; SCODITTI, E.; STORELLI, C.; VISIOLI, F.; DISTANTE, A.; DE-CATERINA, R. Olive oil and red wine antioxidant polyphenols inhibit endothelial activation: antiatherogenic properties of mediterranean diet phytochemicals. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 23, p. 622-629, 2003.

CASH, J. N.; SISTRUNK, W. A.; STUTTE, C. A. Characteristics of Concord grape polyphenoloxidase involved in juice color loss. **Journal of Food Science**, v. 41, p. 1398-1402, 1976.

CHEYNIER, V.; RIGAUD, J.; MOUTOUNET, M. Oxidation kinetics of trans-caffeoyltartrate and its glutathione derivatives in grape musts. **Phytochemistry**, v. 29, p. 1751-1753, 1990.

CHEYNIER, V.; RIGAUD, J.; SOUQUET, J. M.; DUPRAT, F.; MOUTOUNET, M. Must Browning in relation to the behavior of 122 phenolic compounds during oxidation. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 41, p. 346-349, 1990.

CHEYNIER, V.; SILVA, J. M. R. Oxidation of grape procyanidins in model solutions containing trans-caffeoyltartaric acid and polyphenol oxidase. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 39, p. 1047- 1049, 1991.

CHEYNIER, V.; SOUQUET, J.M.; MOUTOUNET, M. Glutathione content and glutathione to hydroxycinnamic acid ratio in *Vitis vinifera* and musts. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 40, p. 320- 324, 1989.

CILLIERS, J. J. L.; SINGLETON, V. L. Characterization of the products of nonenzymic autoxidative phenolic reactions in a caffeic acid model system. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 39, p. 1298-1303, 1991.

CLARK, A. C.; PRENZLER, P. D.; SCOLLARY, G. R. The role of copper (II) in the bridging reactions of (+)-catechin by glyoxylic acid in a model white wine. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 6204-6210, 2003.

CLEMENTE, E.; PASTORE, G.M. Peroxidase and polyphenol oxidase: the importance for food technology. **Boletim SBCTA**, v. 32, n. 2, p. 167-171, 1998.

COMUZZO, P.; MARCONI, M.; ZANELLA, G.M.; QUERZÈ, M. Pulsed electric field processing of white grapes (cv. Garganega): Effects on wine composition and volatile compounds. **Food Chemistry**, v. 264, p. 16-23, 2018.

COMUZZO, P.; BATTISTUTTA, F.; VENDRAME, M.; PÁEZ, M.S.; LUISI, G.; ZIRONI, R. Antioxidant properties of different products and additives in white wine. **Food Chemistry**, v. 168, p. 107-114.



- CORDER, R.; DOUTHWAITE, J.A.; LEES, D.M.; KHAN, N.Q.; SANTOS, A.C.V.; WOOD, E.G.; CARRIER, M.J. Health: Endothelin-1 synthesis reduced by red wine. **Nature**, v. 414, p. 863-864, 2001.
- COSTANIGRO, M.; APPLEBY, C.; MENKE, S.D. The wine headache: Consumer perceptions of sulfites and willingness to pay for non-sulfited wines. **Food Quality and Preference**, v. 31, p. 81-89, 2014.
- EMBRAPA. **Cultivares de uva e porta-enxertos de alta sanidade: Niágara branca**. Disponível em: [https://www.embrapa.br/uva-e-vinho/cultivares-e-porta-enxertos/cultivares-de-dominio-publico/-/asset\\_publisher/re0hjhq6j8j/content/cultivar-niagara-branca/1355300](https://www.embrapa.br/uva-e-vinho/cultivares-e-porta-enxertos/cultivares-de-dominio-publico/-/asset_publisher/re0hjhq6j8j/content/cultivar-niagara-branca/1355300). Acesso em: 30 set. 2019.
- EPAGRI. Avaliação de cultivares para o estado de Santa Catarina 2018- 2019. 2018, 78p.
- ES-SAFI, N. E.; CHEYNIER, V.; MOUTOUNET, M. Effect of copper on oxidation of (+)-catechin in a model solution system. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 38, p. 153-163, 2003.
- FERREIRA, V.; ESCUDERO, A.; FERNÁNDEZ, P.; CACHO, J.F. Changes in the profile of volatile compounds in wines stored under oxygen and their relationship with the browning process. **European Food Research and Technology**, v. 205, p. 392-396, 1997.
- FERREIRA-LIMA, N.E.; BURIN, V.M.; CALIARI, V.; BORDIGNON-LUIZ, M.T. Impact of Pressing Conditions on the Phenolic Composition, Radical Scavenging Activity and Glutathione Content of Brazilian *Vitis vinifera* White Wines and Evolution During Bottle Ageing. **Food and Bioprocess Technology**, v. 9, n.6, p. 944-957, 2016.
- FLANZY, C. **Enología: Fundamentos científicos y tecnológicos**. 1. ed. Madrid: Ediciones Mundi-Prensa, 2000, 797p.
- FLANZY, M.; AUBERT, S. Évaluation des Composés Phénoliques des Vins Blancs. **Annals Technologie Agricole**, v. 18, p. 27-44, 1969.
- FRACASSETTI, D.; LAWRENCE, N.; TREDoux, A. G. J.; TIRELLI, A.; NIEUWOUDT, H. H.; TOIT, W. J. Quantification of glutathione, catechin and caffeic acid in grape juice and wine by a novel ultraperformance liquid chromatography method. **Food Chemistry**, v. 128, p. 1136-1142, 2011.
- GABRIELE, M.; GERARDI, C.; LUCEJKO, J.J.; LONGO, V.; PUCCI, L.; DOMENICI, V. Effects of low sulfur dioxide concentrations on bioactive compounds and antioxidant properties of Aglianico red wine. **Food Chemistry**, v. 245, p. 1105-1112, 2018.
- GARAGUSO, I.; NARDINI, M. Polyphenols content, phenolics profile and antioxidant activity of organic red wines produced without sulfur dioxide/sulfites addition in comparison to conventional red wines. **Food Chemistry**, v. 179, p. 336-342, 2015.
- GARRIDO, J.; BORGES, F. Wine and grape polyphenols: A chemical perspective. **Food Research International**, v. 54, n. 2, p. 1844-1858, 2013.

- GIACOSA, S.; SEGADE, S.R.; CAGNASSO, E. CAUDANA, A.; ROLLE, L.; GERBI, V. SO<sub>2</sub> in Wines: Rational Use and Possible Alternatives. *In: MORATA, A. Red Wine Technology*. Academic Press, 2019, p. 309-321.
- HARBEOUI, H.; HICHAMI, A.; AIDIWANNES, W.; LEMPUT, J.; SAIDANITOUNSI, M.; KHAN, N.A. Anti-inflammatory effect of grape (*Vitis vinifera*L.) seed extract through the downregulation of NF- $\kappa$ B and MAPK pathways in LPS-induced RAW264.7 macrophages. **South African Journal of Botany**, v. 125, p. 1-8, 2019.
- HARBORNE, J.B.; WILLIAMS, C.A. Advances in flavonoid research since 1992. **Phytochemistry**. v. 52, p. 481-504, 2000.
- HOLLMAN, P.C.H.; KATAN, M.B. Dietary flavonoids:intake, health effects and bioavailability. **Food and Chemical Toxicology**, v. 37, n. 9, p. 937-942, 1999.
- JACKSON, R. S. **Wine science: Principles and applications**. 3rd. ed. London: Academic Press, 2008, 789p.
- JARA-PALACIOS, M.J.; GONÇALVES, S.; HERNANZ, D.; HEREDIA, F.J. ROMANO, A. Effects of in vitro gastrointestinal digestion on phenolic compounds and antioxidant activity of different white winemaking byproducts extracts. **Food Research International**, v. 109, p. 433-439, 2018.
- JANG, J. H.; MOON, K. D. Inhibition of polyphenol oxidase and peroxidase activities on fresh-cut apple by simultaneous treatment of ultrasound and ascorbic acid. **Food Chemistry**, v. 124, n. 2, p. 444–449, 2011.
- JIMÉNEZ, M., JUÁREZ, N., JIMÉNEZ-FERNÁNDEZ, V., MONRIBOT-VILLANUEVA, J.; GUERRERO-ANALCO, J. Phenolic compounds and antioxidant activity of wild grape (*Vitis tiliifolia*). **Italian Journal Of Food Science**, v. 30, n. 1, p. 128-143, 2018.
- JIN, X.; WU, X.; LIU, X., LIAO, M. Varietal heterogeneity of textural characteristics and their relationship with phenolic ripeness of wine grapes. **Scientia Horticulturae**, v. 216, p. 205-214, 2017.
- KRITZINGER, E.C.; BAUER, F.F.; DU TOIT, W.J. Role of glutathione in winemaking: A review. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, p. 269–277, 2013.
- LAURILA, E.; KERVINEN, R. Y.; AHVENAINER, R. The inhibition of enzymatic browning in minimally processed vegetables and fruits. **Postharvest News and Information**, v. 9, n. 4, p. 53-66, 1998.
- LAVIGNE, V.; PONS, A.; DUBOURDIEU, D. Assay of glutathione in must and wines using capillary electrophoresis and laser-induced fluorescence detection Changes in concentration in dry white wines during alcoholic fermentation and aging. **Journal of Chromatography** , v. 1139, p. 130-135, 2007.
- LERMA, N. L.; PEINADO, J.; MORENO, J.; PEINADO, R.A. Antioxidant activity, browning and volatile Maillard compounds in Pedro Ximénez sweet wines under accelerated oxidative aging. **LWT – Food Science and Technology**, v. 43, n.10, p. 1557-1563, 2010.

- LI, H.; GUO, A.; WANG, H. Mechanisms of oxidative browning of wine. **Food Chemistry**, v. 108, p. 1-13, 2008.
- LI, H.; WANG, X.; LI, Y.; LI, P.; WANG, H. Polyphenolic compounds and antioxidant properties of selected China wines. **Food Chemistry**, v. 112, p. 454-460, 2009.
- LIMA, A. **Caracterização química, avaliação da atividade antioxidante in vitro e in vivo, e identificação de compostos fenólicos presentes no Pequi (*Caryocar brasiliense*, Camb.)**. 2008. 219 f. Tese (Doutorado em Bromatologia) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.
- LIMA, M. A. C. **Cultivo da Videira: Colheita e pós-colheita**. Embrapa, 2010. Disponível em [http://www.cpatia.embrapa.br:8080/sistema\\_producao/spuva/colheita.html](http://www.cpatia.embrapa.br:8080/sistema_producao/spuva/colheita.html). Acesso em: 30 set. 2019.
- LINGUA, M.S.; THEUMER, M.G.; KRZYNSKI, P.; WUNDERLIN, D.A.; BARONI, M.V. Bioaccessibility of polyphenols and antioxidant properties of the white grape by simulated digestion and Caco-2 cell assays: Comparative study with its winemaking product. **Food Research International**, v. 122, p. 496-505, 2019.
- MACHADO, R.M.D.; TOLETO, M.C.F.; VICENTE, E. Sulfites em Alimentos. **Brazilian Journal Food Technology**, v. 9, p. 265-275, 2006.
- MARSHALL, M.R.; KIM, J.; WEI, C.I. Enzymatic browning in fruits, vegetables and seafoods. **Food and agricultural organization**, v. 41, p. 259-312, 2000.
- MARTINEZ, M.V.; WHITAKER, J.R., The biochemistry and control of enzymatic browning. **Trends in Food Science and Technology**, v.6, p.195- 200, 1995.
- MATTIVI, F.; ZULIAN, C.; NICOLINI, G.; VALENTI, L. Wine, biodiversity, technology, and antioxidants. **Annals of the New York Academy of Sciences**. New Yorque: 2002, v. 957, p. 37-56.
- MAYÉN, M.; BARÓN, R.; MÉRIDA, J.; MEDINA, M. Changes in phenolic compounds during accelerated browning in white wines from cv. Pedro Ximenez and cv. Baladí grapes. **Food Chemistry**, v. 58, p. 89-95, 1997
- MEISTER, A. Minireview: Glutathione metabolism and its selective modification. **Journal of Biological Chemistry**, v. 263, p. 17205–17208, 1988.
- MELLO, L. M. R. Uvas: desempenho do setor em 2018. Uberlândia: **Campo & Negócios**, p. 112-116, 2019.
- MORENO-ARRIBAS, M. V.; POLO, M. C. **Wine Chemistry and Biochemistry**. 1. Ed. Springer Science, New York, USA, 2009, 745p.
- MULERO, J.; MARTÍNEZ, G.; OLIVA, J.; CERMEÑO, S.; CAYUELA, J.M.; ZAFRILLA, P.; MARTÍNEZ-CACHÁ, A.; BARBA, A. Phenolic compounds and antioxidant activity of red wine made from grapes treated with different fungicides. **Food Chemistry**, v. 180, p. 25-31, 2015.

NAKAMURA, K.; AMANO, Y.; KAGAMI, M. Purification and some properties of a polyphenol oxidase from Koshu grapes. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 34, p. 122–127, 1983

NIKOLANTONAKI, M.; MAGIATIS, P.; WATERHOUSE, A.L. Measuring protection of aromatic wine thiols from oxidation by competitive reactions vs wine preservatives with ortho-quinones. **Food Chemistry**, v. 163, p. 61-67, 2014.

OIV. International organization of Vine and Wine. **International Code of enological Practices**, 2019.

OIV. International organization of Vine and Wine. **International Methods of Analysis of Wines and Musts**, 2019.

OKUDA, T.; PUE, A. G.; FUJIYAMA, K.; YOKOTSUKA, K. Purification and characterization of polyphenol oxidase from Muscat Bailey A grape juice. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 50, p. 137–143, 1999.

OSZMIANSKI, J.; CHEYNIER, V.; MOUTOUNET, M. Iron-catalyzed oxidation of (+)-catechin in model systems. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 44, p. 1712-1715, 1996.

PARK, S. K.; BOULTON, R.B.; NOBLE, A.C. Automated HPLC analysis of glutathione and thiol-containing compounds in grape juice and wine using pre-column derivatization with fluorescence detection. **Food Chemistry**, v. 68, p. 475-480, 2000.

PENG, Z.; DUNCAN, B.; POCOCK, K.F.; SEFTON, M.A. The effect of ascorbic acid on oxidative browning of white wines and model wines. **Australian Journal of Grape and Wine Research**, v. 4, p. 127-135, 1998

POMMER, C. V. **Uva: tecnologia de produção, pós-colheita, mercado**. Porto Alegre: Cinco Continentes, 2003, 777p.

QUEIROZ, C.; LOPES, M. L. M.; FIALHO, E.; VALENTE-MESQUITA, V. L. Polyphenol Oxidase: Characteristics and Mechanisms of Browning Control. **Food Reviews International**, v. 24, n. 4, p. 361-375, 2008.

QUIRÓS, A. R. B.; LAGE-YUSTY, M. A.; LÓPEZ-HERNÁNDEZ, J. HPLC-analysis of polyphenolic compounds in Spanish white wines and determination of their antioxidant activity by radical scavenging assay. **Food Research International**, v. 42, p. 1018-1022, 2009.

RAPEANU, G.; VAN LOEY, A.; SMOUT, C.; HENDRICKX, M. Biochemical characterization and process stability of polyphenoloxidase extracted from Victoria grape (*Vitis vinifera ssp. Sativa*). **Food Chemistry**, v. 94, p. 253-261, 2006

RAPOSO, R.,; RUIZ-MORENO, M. J.; GARDE-CERDÁN, T.; PUERTAS, B.; MORENO-ROJAS, J. M.; GONZALO DIAGO, A.; GUERRERO, R. F.; ORTIZ, V.; CANTOS-VILLAR, E. Effect of hydroxytyrosol on quality of sulfur dioxide-free red wine. **Food Chemistry**, v. 192, p. 25-33, 2016.

- RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICE-EVANS, C. Antioxidant activity applying na improved Abts radical. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 26, n.98, p. 1231-1237, 1999.
- RIBÉREAU-GAYON, P.; GLORIES, Y.; MAUJEAN, A.; DUBOURDIEU, D. **Handbook of Enology: The Chemistry of Wine Stabilization and Treatments**. Wiley & Sons, West Sussex, UK, v. 2, 2006. 451p.
- RIZZON, L. A. **Metodologia para análise de mosto e suco de uva**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica; Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2010. 82p.
- RIZZON, L. A.; MENEGUZZO, J. Suco de uva. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2007.
- ROGINSKY, V.; LISSI, E. A. Review of methods to determine chainbreaking antioxidant activity in food. **Food Chemistry**, v. 92, p. 235-254, 2005.
- ROUSSIS, I. G.; LAMBROPOULOS, I.; TZIMAS, P. Protection of volatiles in a wine with low sulfur dioxide by caffeic acid or glutathione. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 58, n. 2, p. 274–278, 2007.
- RUFINO, M. S. M.; ALVES, R. E.; DE BRITO, E. S.; PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURACALIXTO, F.; MANCINI-FILHO, J. Bioactive compounds and antioxidant capacities of 18 nontraditional tropical fruits from Brazil. **Food Chemistry**, v. 121, p. 996–1002, 2010.
- SAPERS, G. M.; MILLER, R. L. Browning inhibition in fresh-cut pears. **Journal Food Science**, v. 63, n. 2, p. 342-346, 1998.
- SILVA, T. K. R.; FARIA, C.M.D.R.; MAIA, A. J.; BOTELHO, R.V.; CALIXTO, R. Qualidade pós-colheita em uva ‘Niágara Branca’ submetida à aplicação de diferentes extratos vegetais. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, São Paulo, v. 19, n. 1, p. 1-7, 2017.
- SINGLETON, V. L.; SALGUES, M.; ZAYA, J.; TROUSDALE, E. Caftaric acid disappearance and conversion to products of enzymatic oxidation in grape must and wine. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 36, p. 50-56, 1985.
- SINGLETON, V.L.; ROSSI, J.A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 16, p. 144-158, 1965.
- SMRCKA, J.; BARON, M. The influence of ascorbic acid on sensory and analytical parameters of white wines. **Mendelnet**, v. 23, p. 657-662, 2016.
- SOLEAS, G.; GRASS, L.; JOSEPHY, P.D.; GOLDBERG, D.M.; DIAMANDIS, E.P. A comparison of the anticarcinogenic properties of four red wine polyphenols. **Clinical Biochemistry**, v. 35, p. 119-124, 2002.

SONNI, F.; CLARK, A.C.; PRENZLER, P.D.; RIPONI, C.; SCOLLARY, G.R. Antioxidant Action of Glutathione and the Ascorbic Acid/Glutathione Pair in a Model White Wine. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 8, p. 3940-3949, 2011.

SROKA, Z.; CISOWSKI, W. Hydrogen peroxide scavenging, antioxidant and antiradical activity of some phenolic acids. **Food and Chemical Toxicology**, v. 41, p. 753–758, 2003.

SUH, J.; KIM, H.; SURH, Y.J. Resveratrol suppresses migration, invasion and stemness of human breast cancer cells by interfering with tumor-stromal cross-talk. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 643, p.62–71, 2018.

TAYLOR, S.L.; HIGLEY, N.A.; BUSH, R.K. Sulphites in foods: uses, analytical methods, residues, fate, exposure assessment, metabolism, toxicity and hypersensitivity. **Advances in Food Research**, v. 30, p. 1-75, 1986.

TRELA, B. C.; WATERHOUSE, A. L. Resveratrol: isomeric molar absorptivities and stability. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 44, p. 1253-1257, 1996.

TOIT, W.J.; MARAIS, J.; PRETORIUS, I.S.; TOIT, M. Oxygen in must and wine: a review. **South African Journal of Enology and Viticulture**, v. 27, p. 76-94, 2006.

TRAVERSO-RUEDA, S.; SINGLETON, V. L. Catecholase activity in grape juice and its implications in winemaking. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 24, n. 3, 1973.

UNAL, M. U.; SENER, A. Effect of harvest year on biochemical properties of Narince grape (*Vitis vinifera* L. cv. Narince) polyphenol oxidase. **European Food Research and Technology**, v. 238, n. 4, p. 613–619, 2013.

VAIMAKIS, V.; ROUSSIS, I.G. Must oxygenation together with glutathione addition in the oxidation of white wine. **Food Chemistry**, v. 57, p. 419-422, 1996.

WATERHOUSE, A. L. Wine Phenolics. *In: Annals New York Academy of Sciences*. New York Academy of Sciences, New York, USA, 2002.

WEBBER, V.; DUTRA, S.V.; SPINELLI, A.R.M.; CARNIELI, G.J.; CARDOSO, A.; VANDERLINDE, R. Effect of glutathione during bottle storage of sparkling wine. **Food Chemistry**, v. 216, p. 254-259, 2017.

WEBBER, V.; DUTRA, S.V.; SPINELLI, A.R.M.; CARNIELI, G.J.; VANDERLINDE, R. Effect of glutathione addition in sparkling wine. **Food Chemistry**, v. 159, p.391–398, 2014.

WISSEMANN, K.W.; LEE, C.Y. Characterization of Polyphenoloxidase from Ravat 51 and Niagara Grapes. **Journal of Food Science**, v. 46, p. 506-508, 1981.

WU, S. Glutathione suppresses the enzymatic and non-enzymatic browning in grape juice. **Food Chemistry**, v. 160, p. 8-10, 2014.

ZOECKLEIN, B. W.; FUGELSANG, K.C., GUMP, B., NURY, F.S. **Wine analysis and production**. The Chapman e Hall Enology Library. International Thompson Publishing, 1995.