

**UNIVERSIDADE DE CAXIAS DO SUL**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE**  
**INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**  
**NÍVEL: DOUTORADO**

**EFEITO DA ADIÇÃO DE GLUTATIONA EM VINHOS**  
**ESPUMANTES**

**Vanessa Webber**

Caxias do Sul, 2016.

**Vanessa Webber**

**EFEITO DA ADIÇÃO DE GLUTATIONA EM VINHOS  
ESPUMANTES**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em  
Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul,  
visando à obtenção de grau de Doutora em  
Biotecnologia.

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dra. Regina Vanderlinde

Coorientadoras: Dra. Sandra Valduga Dutra

Prof<sup>ª</sup>. Dra. Valéria Weiss Angeli

**Caxias do Sul, 2016.**

W371e Webber, Vanessa

Efeito da adição de glutatona em vinhos espumantes / Vanessa Webber. – 2016.

114 f.: il.

Tese (Doutorado) - Universidade de Caxias do Sul, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, 2016.

Orientação: Regina Vanderlinde.

Coorientação: Valéria Weiss Angeli, Sandra Valduga Dutra.

1. vinho espumante. 2. glutatona. 3. antioxidante. 4. microencapsulação. I. Vanderlinde, Regina, orient. II. Angeli, Valéria Weiss, coorient. III. Dutra, Sandra Valduga, coorient. IV. Título.

VANESSA WEBBER

# EFEITO DA ADIÇÃO DE GLUTATIONA EM VINHOS ESPUMANTES

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em  
Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul, visando  
à obtenção do título de Doutor em Biotecnologia.

Orientadora: Profa. Dra. Regina Vanderlinde

Co-orientadoras: Profa. Dra. Valéria Weiss Angeli

Dra. Sandra Valduga Dutra

TESE APROVADA EM 02 DE SETEMBRO DE 2016

---

Orientadora: Profa. Dra. Regina Vanderlinde

---

Co-orientadora: Profa. Dra. Valéria Weiss Angeli

---

Co-orientadora: Dra. Sandra Valduga Dutra

---

Profa. Dra. Neidi Garcia Penna

---

Profa. Dra. Cláudia Alberici Stefenon

---

Prof. Dr. Sérgio Echeverrigaray Laguna



*Dedico esta tese aos meus primeiros mentores,  
meu pai Valter e minha mãe Ivete,  
que nunca mediram esforços para me ajudar  
e sempre incentivaram meu aprendizado.  
Ao meu marido, Maurício e minha filha Julia,  
pela paciência e companheirismo.*

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus pela proteção e por me dar força, serenidade e equilíbrio para realização desta tese.

Ao meu marido Maurício e minha filha Julia pelo amor e carinho que me dão força e fazem meus dias mais felizes.

A minha família, especialmente minha mãe, Ivete, meu pai, Valter e meus irmãos Aline e Vinícius pelo apoio. A minha avó Jurema pelas orações.

À Profa. Dra. Regina Vanderlinde pela orientação, pelos ensinamentos, pela confiança depositada e pelas oportunidades de aprendizado desde a iniciação na pesquisa, como bolsista de iniciação científica.

À Profa. Dra. Valéria Weiss Angeli pela co-orientação, pela exigência, pelo bom exemplo, pela colaboração em relação aos trabalhos relacionados às micro e nanopartículas e, por dedicar até mesmo seu tempo de licença para minha orientação.

Ao enólogo Alejandro Cardozo da vinícola Piagentini Ltda., por auxiliar na idealização do projeto e deste trabalho, na obtenção do mosto e na elaboração dos espumantes.

Aos professores e funcionários do curso de Pós-Graduação em Biotecnologia em especial aos professores Dr. Sergio Echeverrigaray e Dra. Mirian Salvador e Dr. Aldo J. P. Dillon pelo acompanhamento e sugestões que deixaram este trabalho melhor e a secretária Lucimara Serafini Rech pelo apoio constante.

Aos meus colegas e amigos Ângela Rossi Marcon, Carlos Roani, Fernanda Spinelli, Gilberto João Carnieli, Júlio Meneguzzo, Plínio Manosso, Susiane Leonardelli, Sandra Valduga Dutra, pelo auxílio, incentivo e amizade, que foram essenciais para a realização deste trabalho.

Às bolsistas de iniciação científica Letícia Pederiva, Cristiane Leonardelli, Pâmela Neto, Giovana Modelski e Bruna Lizot Trentin; e aos colegas de pós-graduação Daniel de Siqueira Ferreira e Cátia Branco pela ajuda prática na realização dos experimentos e análises dos espumantes deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Pedro Luiz Manique Barreto, meus sinceros agradecimentos por estar sempre pronto a me ajudar, deixar sempre seu laboratório de portas abertas para me receber e para realizar meus experimentos.

Aos colegas da UFSC, Sabrina Matos de Carvalho, Cleonice da Rosa e Matheus Maciel por me receberem e me auxiliarem na utilização dos equipamentos com sua experiência e com seus conhecimentos.

À Universidade de Caxias do Sul (UCS), ao Instituto Brasileiro do Vinho (IBRAVIN) e ao Laboratório de Referência Enológica (LAREN) pela oportunidade da realização desta pesquisa.

Ao CNPq, à Fapergs e a Capes, pelo apoio financeiro necessário para realização do trabalho.

Agradeço a todas aquelas pessoas que de forma direta ou indireta contribuíram para realização deste trabalho.

## ÍNDICE

<b>LISTA DE TABELAS.....</b>	<b>I</b>
<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>II</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS.....</b>	<b>III</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>IV</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>V</b>
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>6</b>
<b>2. OBJETIVO .....</b>	<b>9</b>
3.1. OBJETIVO GERAL.....	9
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	9
<b>3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA GERAL.....</b>	<b>11</b>
3.1. VINHO ESPUMANTE.....	11
3.1.1. <i>Etapas na elaboração de vinhos espumantes através do método tradicional....</i>	<i>13</i>
3.1.2. <i>Envelhecimento dos vinhos espumantes e a autólise das leveduras .....</i>	<i>14</i>
3.2. OXIDAÇÃO DOS VINHOS .....	17
3.2.1. <i>Alteração oxidativa do perfil aromático .....</i>	<i>17</i>
3.2.2. <i>Alteração oxidativa dos compostos fenólicos.....</i>	<i>19</i>
3.2.3. <i>Escurecimento .....</i>	<i>20</i>
3.3. GLUTATIONA .....	22
3.3.1. <i>Glutaciona como antioxidante em mostos e vinhos: inibição do escurecimento e impacto nos compostos aromáticos.....</i>	<i>26</i>
3.4. ENCAPSULAÇÃO DA GLUTATIONA .....	33
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>38</b>
4.1. CAPÍTULO 1 – EFEITO DA GLUTATIONA NA PREVENÇÃO DA OXIDAÇÃO DE VINHOS BRANCOS.....	39
4.2. CAPÍTULO 2 - EFEITO DA ADIÇÃO DE GLUTATIONA EM VINHOS ESPUMANTES .....	49
4.3. CAPÍTULO 3 – EFEITO DA GLUTATIONA DURANTE O ARMAZENAMENTO DE VINHOS ESPUMANTES.....	58
4.4. CAPÍTULO 4 – PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE MICROPARTÍCULAS DE B-CICLODEXTRINA/GLUTATIONA E QUITOSANA/GLUTATIONA OBTIDAS POR SPRAY-DRYER .....	65
<b>5. DICUSSÃO GERAL .....</b>	<b>89</b>
<b>6. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS .....</b>	<b>92</b>
<b>7. BIBLIOGRAFIA COMPLEMENTAR .....</b>	<b>94</b>
<b>8. ANEXOS .....</b>	<b>105</b>
8.2. ANEXO I - DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	105

## LISTA DE TABELAS

### Lista de Tabelas do Capítulo 2

TABLE 1 – EXPERIMENTAL DESIGN 3 <sup>2</sup> .....	52
TABLE 2 – VOLATILE COMPOSITION OF SPARKLING WINE – EXPERIMENTS 1-9 .....	53
TABLE 3 – PHENOLIC COMPOUNDS, COLOR INDEX, FREE SO <sub>2</sub> AND GSH CONTENT OF SPARKLING WINE – EXPERIMENTS 1-9 .....	54

### Lista de Tabelas do Capítulo 3

TABELA 1 – SO <sub>2</sub> LIVRE, ACETALDEÍDO, ÍNDICE DE COR, CONCENTRAÇÃO DE CATEQUINA, EPICATEQUINA, ÁCIDO CAFEICO, ÁCIDO CUMARICO E COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS DOS ESPUMANTES COM 1, 6, 12 E 18 MESES DE ARMAZENAMENTO .....	63
---	----

### Lista de Tabelas do Capítulo 4

TABELA 1. RENDIMENTO, PERCENTUAL DE RECUPERAÇÃO E EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO DAS FORMULAÇÕES DE MICROPARTÍCULAS DE QUITOSANA/GSH E DE B-CD/GSH.....	81
TABELA 2. PARÂMETROS OBTIDOS PARA A EQUAÇÃO $M_T/M_\infty = Kt^N$ PARA A FORMULAÇÃO DE MICROPARTÍCULA DE B-CD E PARA A DE QUITOSANA, AMBAS CONTENDO GSH.....	85

## LISTA DE FIGURAS

<b>FIGURA 1</b> – ESTRUTURA QUÍMICA DAS MOLÉCULAS DE GLUTATIONA REDUZIDA (A) COM A PRESENÇA DO GRUPO SULFÍDRICO E GLUTATIONA OXIDADA (B) COM A PRESENÇA DA PONTE DISSULFETO .....	22
<b>FIGURA 2</b> – REAÇÃO DA GLUTATIONA COM COMPOSTOS DE ORTO-QUINONA (O LOCAL DA ADIÇÃO DEPENDE DO TIPO DE COMPOSTO FENÓLICO ENVOLVIDO) (SONNI <i>ET AL.</i> , 2011).....	27

### Lista de Figuras do Capítulo 3

<b>FIGURA 1</b> – CONCENTRAÇÃO DE GSH NOS VINHOS ESPUMANTES DURANTE O TEMPO DE 1, 6 E 12 MESES DE ARMAZENAMENTO. ....	<b>ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.1</b>
<b>FIGURA 2</b> – CONCENTRAÇÃO DE GLUTATIONA TOTAL NOS VINHOS ESPUMANTES DURANTE O TEMPO DE 1, 6 E 12 MESES DE ARMAZENAMENTO. ....	<b>ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.1</b>

### Lista de Figuras do Capítulo 4

<b>FIGURA 1.</b> MICROGRAFIAS OBTIDAS POR MEV DAS MICROPARTÍCULAS DE (A) QUITOSANA/GSH, (B) QUITOSANA, (C) B-CD/GSH, (D) B-CD, (E) GSH.....	74
<b>FIGURA 2.</b> ESPECTROS NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO PARA (A) GSH, (B) QUITOSANA, (C) MICROPARTÍCULAS QUITOSANA/GSH, (D) MISTURA FÍSICA QUITOSANA E GSH .....	75
<b>FIGURA 3.</b> ESPECTROS NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO PARA (A) GSH, (B) B-CD, (C) MICROPARTÍCULAS B-CD/GSH, (D) MISTURA FÍSICA B-CD E GSH .....	76
<b>FIGURA 4.</b> TERMOGRAMAS DE DSC: (A) GSH, (B) QUITOSANA, (C) B-CD, (D) B-CD/GSH, (E) QUITOSANA/GSH, (F) MISTURA FÍSICA QUITOSANA E GSH, (G) MISTURA FÍSICA B-CD E GSH..	77
<b>FIGURA 5.</b> TERMOGRAMAS DAS AMOSTRAS DE (A) QUITOSANA, (B) GSH, (C) MICROPARTÍCULAS DE QUITOSANA/GSH, (D) MICROPARTÍCULAS DE B-CD/GSH, (E) B-CD .....	78
<b>FIGURA 6.</b> DIFRATOGRAMAS DAS MICROPARTÍCULAS DE QUITOSANA (A), DAS MICROPARTÍCULAS DE B-CD (B), DA B-CD (C), DA QUITOSANA (D) E DA GSH (E).....	80
<b>FIGURA 7.</b> PERFIL DE LIBERAÇÃO DA GSH EM VINHO MODELO (SOLUÇÃO HIDROALCOÓLICA 12 %, PH 3,5) À 25 °C (N=3) .....	83
<b>FIGURA 8.</b> LIBERAÇÃO DA GSH PELA RAZÃO $M_T/M_\infty$ EM FUNÇÃO DO TEMPO PARA AS MICROPARTÍCULAS B-CD/GSH E QUITOSANA/GSH .....	84

**LISTA DE ABREVIATURAS**

GSH – glutationa

GSSG – glutationa oxidada ou glutationa dissulfeto

CD – ciclodextrina

PPO – polifenoloxidase

POD – peroxidase

ROS – espécies reativas de oxigênio

GRP – *Grape Reaction Product* ou 2-(S)-glutathionilcaftárico

GEC – *Glutathione Equivalent Capacity*

DTT – ditioneitol

NDA – naftaleno-2,3-dicarboxaldeído

UV – ultravioleta

MEV ou SEM – microscopia eletrônica de varredura

TGA – análise termogravimétrica

DSC – calorimetria exploratória diferencial

FT-IR – espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier

DRX ou XRD – difratometria de raios X

EE – eficiência de encapsulação

DNTB – sulfidril 5,5-ditio-bis(ácido 2-nitrobenzóico)

## RESUMO

Vinhos espumantes, assim como os vinhos brancos, são muito susceptíveis a oxidação nas etapas de elaboração e durante o armazenamento e envelhecimento. A glutatona (GSH), antioxidante naturalmente presente nas uvas e derivados, contribui positivamente na preservação de aromas, prevenção do escurecimento e outros defeitos decorrentes do armazenamento prolongado em vinhos brancos. A molécula de GSH é muito reativa, devido a seu grupo sulfidril. Neste sentido, uma alternativa para preservá-la e manter suas propriedades antioxidantes por um maior período durante o armazenamento dos espumantes seria a microencapsulação em um sistema polimérico. A microencapsulação também poderia evitar um aspecto negativo da utilização de GSH em vinhos, que é indução da formação de H<sub>2</sub>S (*off-flavour*), visto que, se a GSH for liberada lentamente poderia evitar o efeito redutor de oxigênio no vinho. Neste contexto, este trabalho teve como objetivo avaliar o efeito da adição de GSH livre em espumantes e preparar microcápsulas contendo glutatona para adição em vinhos e/ou espumantes. A GSH livre (10, 20 e 30 mg L<sup>-1</sup>) foi adicionada em diferentes etapas da elaboração (mosto, vinho base e espumante) de espumantes pelo método tradicional. Foram avaliados os efeitos da adição de GSH sobre compostos aromáticos, os compostos fenólicos relacionados ao escurecimento de vinhos brancos e as concentrações de SO<sub>2</sub> livre. As análises dos compostos fenólicos e da glutatona total e reduzida foram realizadas por cromatografia líquida de alta eficiência e espectrofotometria UV e, as análises dos compostos aromáticos foram realizadas por cromatografia gasosa. As micropartículas contendo GSH como composto ativo foram preparadas por spray-dryer com quitosana ou β-ciclodextrina (β-CD), como polímeros e sua caracterização foi realizada por microscopia eletrônica de varredura (MEV), análise termogravimétrica (TGA), calorimetria exploratória diferencial (DSC), espectroscopia na região do infravermelho com transformada de *Fourier* (FT-IR), difratometria de raios-X (DRX). Além disso, foram realizados testes para verificar a recuperação da GSH, a eficiência de encapsulação e a cinética de liberação da GSH em vinho modelo. A adição de GSH ao mosto influenciou mais na composição do espumante do que a adição ao vinho base. Entretanto, a adição de GSH ao vinho base manteve níveis elevados de SO<sub>2</sub> na forma livre. A adição de 10 mg L<sup>-1</sup> de GSH no mosto é suficiente para assegurar menores concentrações de ácidos cafeico, cumárico e ferrúlico nos espumantes. A adição de 20 mg L<sup>-1</sup> de GSH no espumante junto com o liquor de expedição resultou em menor índice de cor, maiores quantidades de SO<sub>2</sub> na forma livre, menores concentrações de acetaldeído e mesma quantidade de compostos fenólicos até 12 meses de armazenamento em garrafas. A quantidade de GSH adicionada no espumante pronto decaiu em um mês de armazenamento e estabilizou nos primeiros seis meses, porém a quantidade de glutatona total permaneceu maior no espumante com adição de 30 mg L<sup>-1</sup>, até 12 meses de armazenamento. Apesar de somente a GSH ter propriedade antioxidante, a quantidade de glutatona total teve maior correlação com os resultados obtidos e, por isso, o nível de glutatona total pode ser um melhor indicador da condição antioxidante do vinho. Foi possível encapsular glutatona tanto utilizando β-CD, quanto utilizando quitosana. A caracterização das microcápsulas comprovaram um microrrevestimento do composto ativo e uma interação entre a GSH e os polímeros utilizados. A β-CD foi mais eficiente para encapsular a GSH, permitindo a liberação gradativa da molécula em solução de vinho modelo e maior proteção da molécula, conferindo melhor estabilidade térmica para GSH.

Palavras-chave: glutatona, vinhos espumantes, microencapsulação, antioxidante.



## ABSTRACT

Sparkling wine, white wines as well, are very susceptible to oxidation in the processing stages and during storage and aging. Glutathione (GSH), present naturally in grapes and derivatives, is an antioxidant which positively contributes to the preservation of aromas, prevention of browning and other defects resulting from prolonged storage of white wines. The GSH molecule is very reactive due to its sulfhydryl group. In this sense, an alternative to preserve it and maintain its antioxidant properties for a longer period during the storage of sparkling wine would be the microencapsulation of GSH into a polymeric system. Microencapsulation of GSH could also prevent a negative aspect of the use of GSH in wine, which is inducing the formation of H<sub>2</sub>S (off-flavor), once the GSH is released slowly avoid oxygen reduced conditions in wine. In this context, this study aimed to evaluate the effect of adding free GSH in sparkling wine and prepare microcapsules containing glutathione to addition to the wine and/or sparkling wine. The free GSH (10, 20 and 30 mg L<sup>-1</sup>) was added at different stages (must, base wine and sparkling wine) of sparkling wine elaboration by the traditional method. The effects of the addition of GSH on aromatics compounds, phenolic compounds related to browning of white wines and on the free SO<sub>2</sub> concentrations were evaluated. The analysis of phenolic compounds and the total and reduced glutathione were performed by high-performance liquid chromatography and UV spectrophotometry and; the analyzes of the aromatic compounds were made by gas chromatography. The microparticles containing GSH as active compound were prepared by spray-dryer with chitosan or β-cyclodextrin as polymers and their characterization was performed by scanning electron microscopy (SEM), thermal gravimetric analysis (TGA), differential scanning calorimetry (DSC), spectroscopy in the infrared with Fourier transform (FT-IR), X-ray diffraction (XRD). Furthermore, tests were performed to verify the recovery of GSH, the encapsulation efficiency and release kinetics of GSH in a model wine. The addition of GSH to the must influenced more in the sparkling wine composition than the addition to the base wine. However, the addition of GSH to the base wine appears to maintain higher levels of SO<sub>2</sub> in its free form. The addition of 10 mg L<sup>-1</sup> of GSH in the mus is sufficient for lower concentrations of caffeic acid, coumaric acid and ferulic in sparkling wine. The addition of 20 mg L<sup>-1</sup> of GSH in the sparkling wine together with the expedition liquor resulted in lower color index, larger amounts of SO<sub>2</sub> in free form, lower acetaldehyde concentration and same amount of phenolic compounds up to 12 months storage in bottle. The amount of GSH added to the ready sparkling wine declined in one month storage and stabilized within the first six months, but the amount of total glutathione remained higher in sparkling wine with addition of 30 mg L<sup>-1</sup> until 12 months of storage. Although only GSH have antioxidant property, the total amount of glutathione had a higher correlation with the results obtained and therefore, the overall glutathione levels are a better indicator of wine antioxidant condition than GSH itself. It was possible to encapsulate glutathione using both, β-CD or chitosan. The characterization of microcapsules proved the micro surfacing of the active compound and an interaction between GSH and the polymers as well as improvement of the thermal stability of the molecule. The β-CD was more efficient for encapsulating GSH, allowing a gradual release of the molecule into model wine solution and added protection of the molecule, giving improved thermal stability for GSH.

Keywords: glutathione, sparkling wines, microencapsulation, antioxidant.

## 1. INTRODUÇÃO

A vitivinicultura brasileira está concentrada principalmente no estado do Rio Grande do Sul, particularmente na Serra Gaúcha, região que se destaca pela produção – aproximadamente 95% do espumante brasileiro – e qualidade dos seus espumantes. A Serra Gaúcha apresenta diversos fatores naturais que propiciam a elaboração de um vinho base com aromas primários finos e delicados, boa acidez e baixo teor alcoólico, resultando em espumantes de alta qualidade, sendo comparados aos melhores do mundo.

O vinho espumante pode ser elaborado através do método tradicional (*Champenoise*) ou método *Charmat*. O vinho espumante elaborado através do método tradicional é o produto final que após duas fermentações permanece por um período amadurecendo com as leveduras dentro da garrafa. Este método resulta em espumantes com aroma complexo caracterizado por notas de levedura e tostado, de qualidade diferenciada. Os vinhos espumantes brasileiros são elaborados predominantemente com as uvas Chardonnay e Pinot Noir, embora a uva Riesling Itália também seja utilizada em alguns cortes.

Durante a elaboração e armazenamento dos vinhos espumantes podem ocorrer reações de oxidação, o que leva a perda dos aromas característicos do vinho, formação de aromas atípicos e escurecimento. A adição de antioxidantes é uma das alternativas para evitar o processo oxidativo e manter a qualidade dos vinhos. O dióxido de enxofre ( $\text{SO}_2$ ) é o antioxidante tradicionalmente utilizado, também por sua ação antimicrobiana. Os sulfitos ainda são considerados as ferramentas mais eficazes para controlar reações de oxidação em vinhos, entretanto são tóxicos e alergênicos. Atualmente, a indústria vinícola busca alternativas para reduzir o uso de  $\text{SO}_2$ , visto que a busca de uma alimentação saudável através do consumo de produtos naturais é uma tendência mundial. Embora a eliminação total do  $\text{SO}_2$  ainda não seja viável, evidências científicas e tecnológicas confirmam a possibilidade de reduzir significativamente seu uso nas etapas iniciais de vinificação. Entretanto, é mais difícil

encontrar substitutos adequados para o SO<sub>2</sub> nos vinhos finais engarrafados.

A glutatona é um antioxidante que está naturalmente presente em uvas. Ela pode estar na forma reduzida (GSH) ou na forma oxidada (GSSG) dependendo do meio, sendo que sua molécula é muito reativa. Apenas na forma reduzida ela apresenta propriedades antioxidantes, que podem inibir reações de oxidação, prevenir o escurecimento e a formação de compostos aromáticos atípicos e decorrentes da oxidação no vinho, além de preservar os aromas varietais. A glutatona reduzida (GSH) pode sofrer reações de adição com compostos fenólicos oxidados (o-quinonas), converter eles de volta a sua forma reduzida e menos reativa, além disso, a GSH pode ligar compostos aldeídos relevantes para vinho, assim como o SO<sub>2</sub>, evitando a oxidação do vinho.

Os níveis de GSH naturalmente encontrados nos vinhos podem variar conforme a cultivar, o local de cultivo (solo, clima, altitude) e conforme as práticas enológicas utilizadas. Durante a fermentação, a concentração de GSH é variável e o metabolismo da levedura é influenciado pelo conteúdo de GSH extracelular. A adição de GSH vem sendo muito discutida atualmente pelos órgãos regulamentadores de diversos países, por isso, estudos sobre a adição de GSH em vinhos espumantes são necessários para elucidar qual a concentração de GSH deveria ser adicionada e em que etapa da elaboração, para possibilitar a avaliação da sua contribuição para qualidade dos vinhos espumantes.

A GSH é uma molécula muito reativa e logo que adicionada ao vinho se combina com outros compostos ou se oxida, conforme as condições do meio. Para proteger a molécula de GSH contra agentes químicos e/ou degradação enzimática e, para evitar que ela se esgote na forma livre, combinando com outros compostos rapidamente, uma alternativa interessante para a adição de GSH em vinhos seria a sua proteção em micro ou nanocápsulas. Dessa maneira, a GSH seria liberada de forma controlada, reagindo continuamente com os compostos do vinho por um maior tempo durante seu armazenamento em garrafas. A micro

ou nanoencapsulação de GSH também poderia evitar a indução da formação de H<sub>2</sub>S (*off-flavour*), evitando condições de oxigênio baixo disponível.

Neste contexto, este trabalho tem como objetivo avaliar o efeito da adição de diferentes concentrações de GSH em diferentes etapas da elaboração de vinhos espumantes na sua composição volátil e fenólica durante o tempo de amadurecimento em contato com as borras e durante o tempo de armazenamento. Além disso, este trabalho tem também como objetivo preparar e caracterizar microcápsulas contendo glutatona visando sua adição em vinhos.

## 2. OBJETIVO

### 3.1. Objetivo Geral

Avaliar o efeito da adição de diferentes concentrações de GSH durante o processo de elaboração de vinhos espumantes, pelo método tradicional, sobre a manutenção dos compostos aromáticos e fenólicos, e também sobre o escurecimento durante o amadurecimento e armazenamento, bem como encapsular GSH e estudar sua liberação em vinho modelo.

### 3.2. Objetivos específicos

- Estudar o efeito da adição de GSH em vinhos espumantes em concentrações de 10, 20 e 30 mg L<sup>-1</sup>, em três etapas da elaboração pelo método tradicional (antes da primeira fermentação, antes da segunda fermentação e após o degórgement);
- Avaliar a concentração de GSH e de glutatona total nos vinhos espumantes com adição de GSH durante o armazenamento;
- Estudar o efeito da adição de GSH sobre a concentração de ésteres e álcoois superiores nos vinhos espumantes durante o armazenamento;
- Estudar o efeito da adição de GSH sobre concentração dos ácidos cafeico, cumárico e ferrúlico, catequina e epicatequina nos vinhos espumantes durante o armazenamento;
- Avaliar o efeito da adição de GSH sobre o índice de cor e o SO<sub>2</sub> livre nos vinhos espumantes durante o armazenamento;
- Elaborar micropartículas de quitosana e de β-ciclodextrina contendo GSH pelo método de secagem por spray dryer;

- Caracterizar as micropartículas contendo GSH e avaliar a liberação de GSH em vinho modelo.

### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA GERAL

#### 3.1. Vinho espumante

O vinho espumante requer métodos de elaboração diferenciados, tem alto valor agregado e sua principal característica é o perlage. As propriedades sensoriais peculiares dos espumantes, como a efervescência, dependem da segunda fermentação de um vinho base, e do processo de autólise, que ocorre durante o processo de envelhecimento em garrafas na presença de cepas de leveduras (Martínez-Rodríguez & Pueyo, 2009).

Dependendo do processo de elaboração, os vinhos espumantes podem ser classificados em vinhos espumantes fermentados na garrafa e vinhos espumantes fermentados em grandes tanques herméticos. Para os vinhos espumantes fermentados em grandes recipientes, a fermentação é realizada nos tanques hermeticamente fechados, o vinho permanece um mínimo de 20 dias na presença de leveduras e, após, o vinho espumante é transferido para a garrafa. Para os vinhos espumantes fermentados em garrafas, a segunda fermentação e o processo de amadurecimento são realizados na garrafa que será comercializado. Esta técnica de elaboração é chamada método clássico ou tradicional (Martínez-Rodríguez & Pueyo, 2009).

Entre os vinhos espumantes elaborados pelo método tradicional incluem-se o “Talento” italiano, o “Cava” elaborado na Espanha e o “Champagne” na França. As principais diferenças entre estes tipos de vinhos são as variedades de uvas utilizadas na preparação do vinho base, a zona de produção (área geográfica) e o tempo em contato com as leveduras, cada um regulado por legislação própria de cada país (Ough, 1992; Hidalgo, 2003).

Os espumantes brasileiros são elaborados principalmente na região sul,

especificamente na Serra Gaúcha. Nesta região as condições climáticas e geográficas são favoráveis para a produção de uvas para elaboração de espumantes, pois durante os meses de dezembro, janeiro e fevereiro, que são determinantes do ciclo vegetativo das videiras visando a elaboração de espumantes, o número de dias de chuvas bastante elevado reduz a insolação, enquanto as noites são frescas com temperaturas noturnas menores que de 20°C (Mével, 2006). Estes dois fatores fazem que as uvas não madurem completamente, o que lhes confere elevado teor de acidez e teores moderados de açúcar, um perfil perfeito para uvas destinadas à produção de espumantes. Aliado a isto, a lenta maturação favorece a formação de aromas muito finos e delicados, fator também essencial para a qualidade do espumante (Azevedo & Velloso, 2006). Estes fatores climáticos da região resultam em uvas com baixo potencial alcoólico (9,5 a 10,5% v/v), acidez titulável relativamente elevada (75 a 85 meq/L) e pH baixo (3,10 a 3,25), condições necessárias para garantir o frescor, fator importante para a qualidade dos vinhos espumantes (Rizzon *et al.*, 2000).

As uvas Chardonnay, entre as brancas, e Pinot Noir, entre as tintas, são as mais utilizadas para elaboração de vinhos espumantes. Além dessas, são utilizadas também as variedades brancas Riesling Itálico, Sémillon e Trebbiano, e em casos mais específicos, a Cabernet Franc, vinificada em branco (Rizzon *et al.*, 2000). As variedades Chardonnay e a Pinot Noir são originárias da França. A primeira origina um vinho equilibrado e aporta aromas de maçã verde, abacaxi e cítricos maduros, reforçando a complexidade aromática e a acidez, além de preencher o meio de boca, aumentando a persistência final. A segunda é uma cultivar de película tinta vinificada em branco para elaboração de vinho espumante que apresenta excelente acidez e sutil aromas de frutas vermelhas, com toques de especiarias, além de conferir mais corpo e estrutura ao espumante (Rizzon *et al.*, 2000; Azevedo & Velloso, 2006).



### 3.1.1. Etapas na elaboração de vinhos espumantes através do método tradicional

Para elaboração dos vinhos espumantes, o vinho base derivado da primeira fermentação, produzido através das técnicas usuais utilizadas na obtenção de vinhos brancos, é transvasado para garrafas e adicionado do liquor de *tirage*. O vinho base pode ser monovarietal ou uma mistura de vinhos de diferentes variedades, e deve apresentar certas características sensoriais (cor pálida e aroma frutado) e analíticas (concentração suficiente de oxigênio para que as leveduras se multipliquem, conteúdo de álcool moderado e baixa acidez volátil). Não deve conter leveduras residuais, ou bactérias, e usualmente é submetido à estabilização tartárica. Depois de introduzido na garrafa, ela é fechada com uma tampa temporária (Martínez-Rodríguez & Pueyo, 2009).

O liquor de *tirage* é uma solução formada por leveduras responsáveis pela segunda fermentação, sacarose e mosto de uva, nas proporções corretas para produzir uma pressão desejável de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>). As leveduras utilizadas na segunda fermentação devem também apresentar características como atividade fermentativa a baixas temperaturas, resistência ao etanol e a pressão do dióxido de carbono, potencial de decantação, etc. (Saracco & Gozzelino, 1995; Martínez-Rodríguez *et al.*, 2001).

As garrafas são mantidas em ambientes escuros com temperatura e umidade controlada especialmente para o processo de amadurecimento. Neste estágio ocorre a segunda fermentação, o CO<sub>2</sub> é formado e estabilizado e, posteriormente, ocorre o amadurecimento em contato com as leveduras. Durante este amadurecimento ocorre a autólise de leveduras, causando a liberação de muitos compostos importantes para a qualidade dos espumantes e que proporcionam características únicas a cada garrafa (Martínez-Rodríguez & Pueyo, 2009; Torresi *et al.*, 2011). As garrafas são então submetidas a um processo de movimentação para o que o sedimento se desloque para o gargalo da garrafa. Este processo foi originalmente realizado com as garrafas inclinadas em pupitres de madeira, girando-as manualmente 1/8 de

volta por dia durante aproximadamente quinze ou mais dias, dependendo do tipo de vinho, de sua estrutura coloidal, do tipo de levedura e da capacidade desta formar grumos (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2003; Torresi *et al.*, 2011). Hoje, este sistema vem sendo substituído por sistemas automatizados que podem mover todas as garrafas simultaneamente (Torresi *et al.*, 2011). Após, este depósito de leveduras no gargalo das garrafas é congelado através da imersão em um banho criogênico. A tampa é removida e a pressão interna ocasiona a expulsão do depósito congelado (Martínez-Rodríguez & Pueyo, 2009).

No processo de expulsão do depósito de leveduras, em francês denominado *degorgement*, uma quantidade de vinho pode ser perdida, a qual pode ser compensada na adição do licor de expedição. Este licor deve ser composto do próprio vinho espumante ou por sacarose, mosto de uva, mosto parcialmente fermentado, ou mosto corrigido ou não, o vinho base, ou uma mistura desses produtos, com adição, quando relevante, de vinhos destilados. Dessa maneira, pode ser dado ao vinho espumante o grau de doçura desejável. Finalmente, a garrafa é fechada com a rolha final (Martínez-Rodríguez & Pueyo, 2009).

### **3.1.2. Amadurecimento dos vinhos espumantes e a autólise das leveduras**

O processo de amadurecimento do vinho espumante é associado com a qualidade sensorial do vinho final. É durante este processo que ocorre a autólise das leveduras, através da qual são liberados compostos intracelulares para o vinho que podem alterar significativamente sua composição final (Torresi *et al.*, 2011). A autólise das leveduras poderia ser definida como a hidrólise dos biopolímeros sob a ação de enzimas hidrolíticas que liberam compostos do citoplasma (peptídeos, aminoácidos, ácidos graxos e nucleotídeos) e da parede celular (glucanos e manoproteínas) para o vinho (Alexandre & Guilloux-Benatier, 2006). Geralmente, a autólise inicia no final da fase de crescimento estacionário e está associado à morte celular. Quando os açúcares e outros nutrientes são consumidos, as células

de levedura utilizam suas reservas de energia interna, compostas de glicogênio e outros elementos. Uma vez que estas reservas se tornam insuficientes para a demanda de energia da célula, inicia sua autofagia e subsequentemente autólise (Alexandre & Guilloux-Benatier, 2006; Martínez-Rodríguez & Pueyo, 2009).

As características gerais do mecanismo de autólise propostas são as seguintes: enzimas hidrolíticas são liberadas no espaço intracelular devido à degradação das endoestruturas das células. Inicialmente estas enzimas são inibidas por inibidores citoplasmáticos específicos, que após são degradados provocando a ativação proteolítica dessas enzimas. Quando o espaço intracelular é insuficiente devido à acumulação dos produtos da hidrólise formados pela degradação enzimática de macromoléculas intracelulares, os produtos autolíticos são liberados ao meio extracelular. Por fim, uma maior degradação de compostos mais polimerizados em compostos de baixo peso molecular ocorre no ambiente extracelular (Martínez-Rodríguez & Pueyo, 2009).

As pesquisas realizadas sobre autólise em enologia são realizadas com dois enfoques: um sobre a quebra da parede celular através da análise das mudanças nos seus componentes durante a hidrólise, realizando estudos estruturais e ultraestruturais das células de leveduras e, outro, analisando os diferentes produtos liberados no meio durante a autólise, seguindo as mudanças nos compostos nitrogenados, polissacarídeos, glicoproteínas, ácidos nucleicos, lipídios e outras macromoléculas. As condições de autólise durante o envelhecimento dos vinhos espumantes elaborados pelo método tradicional não são ótimas e por isso pode levar meses ou anos até que termine (Martínez-Rodríguez & Pueyo, 2009).

Durante o amadurecimento dos vinhos espumantes, as leveduras podem liberar aminoácidos para o meio extracelular antes que a autólise inicie. Esta liberação ocorre como uma resposta celular a ausência de nutrientes do vinho. Durante o processo de autólise, a concentração de aminoácidos aumenta apenas alguns miligramas por litro. Duas possíveis

explicações são sugeridas para esta observação: primeiro, a protease A é uma endoprotease que produz peptídeos ao invés de aminoácidos, e, segundo, que os aminoácidos liberados são transformados através de reações de descarboxilação e desaminação, que causariam a redução na concentração final dos aminoácidos. A concentração de peptídeos no vinho aumenta antes que a concentração de aminoácidos livres, demonstrando que primeiro são liberados peptídeos e posteriormente, estes são hidrolisados em aminoácidos (Moreno-Arribas *et al.*, 1996). A concentração final de peptídeos presentes nos vinhos espumantes pode ser influenciada por diferentes variáveis, tais como a temperatura, tempo de amadurecimento, cepa de levedura utilizada na segunda fermentação, entre outros (Martínez-Rodríguez *et al.*, 2002).

Ainda durante a autólise das leveduras no processo de elaboração de vinhos espumantes, a atividade enzimática (proteases e glucanases) causa a quebra dos glucanos e a liberação das manoproteínas da parede celular (Alexandre & Guilloux-Benatier, 2006). Outros compostos, liberados durante a autólise, estão presentes em quantidades menores, tais como lipídios e ácidos nucleicos, podem ter um papel importante nas características sensoriais do vinho final (Pueyo *et al.*, 2000; Martínez-Rodríguez & Pueyo, 2009). Lipídios podem afetar as características organolépticas do vinho, pois os ácidos graxos liberados podem aumentar os componentes voláteis com baixo limiar de percepção, tanto diretamente como através de derivados tais como ésteres, cetonas e aldeídos (Charpeniter & Feuillat, 1993). Além disso, vários compostos voláteis são formados ou liberados durante a autólise (Hidalgo *et al.*, 2004), alguns com baixos níveis de percepção. Os ésteres são a maior família de compostos voláteis liberados durante a autólise (Alexandre & Guilloux-Benatier, 2006; Martínez-Rodríguez & Pueyo, 2009). Diferentes autores relacionam a qualidade dos vinhos espumantes à concentração de ésteres, como caproato de isoamila, acetato de octila, acetato de feniletila, caproato de feniletila, linoleato de etila, e succinato de dietila (Pozo-Bayón *et al.*, 2003; Pueyo *et al.*, 1995). Embora seja aceito que a segunda fermentação e o amadurecimento

em contato com as leveduras alteram o perfil aromático dos vinhos espumantes (Francioli *et al.*, 2003; Riu-Aumatell *et al.*, 2006), o impacto destes compostos nas propriedades sensoriais dos vinhos espumantes é pouco entendida (Martínez-Rodríguez & Pueyo, 2009).

Apesar dos baixos níveis de oxigênio disponíveis no meio devido à presença de CO<sub>2</sub>, durante o amadurecimento e armazenamento dos vinhos espumantes em garrafas, podem ocorrer reações de oxidação envolvendo compostos fenólicos e aromáticos, assim como ocorre nos vinhos brancos tranquilos.

### **3.2. Oxidação dos vinhos**

O processo oxidativo dos vinhos inclui alterações como a perda de aromas frutados e florais, o desenvolvimento de aromas desagradáveis e o escurecimento precoce. A susceptibilidade de um vinho a estas alterações está relacionada principalmente a três fatores: (1) potencial redox do vinho; (2) concentração e tipo de antioxidantes – intrínsecos ou adicionados –; (3) compostos fenólicos presentes; e, concentração de oxigênio dissolvido (Silva Ferreira *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2008; Hosry *et al.*, 2009; Comuzzo & Zironi, 2013).

#### **3.2.1. Alteração oxidativa do perfil aromático**

O aroma dos vinhos constitui uma das mais importantes características organolépticas da sua qualidade e tipicidade. Nos vinhos jovens, o aroma é essencialmente determinado pelos constituintes voláteis provenientes das uvas e da vinificação. Entretanto, durante o amadurecimento e o armazenamento, vários compostos voláteis do vinho são transformados. Como exemplo, os ésteres de ácidos graxos formados na fermentação alcoólica que constituem elementos importantes do aroma dos vinhos brancos e desaparecem durante a conservação, devido à hidrólise destes ésteres (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2003). Neste sentido,

vários compostos fermentativos (ésteres etílicos de ácidos graxos, acetatos, ácidos graxos e terpenos) diminuem com o envelhecimento oxidativo, enquanto outros, como sotolon e derivados de furfural, aumentam (Lavigne *et al.*, 2008; Papadopoulou & Roussis, 2008; Roussis & Sergianitis, 2008).

A degradação oxidativa do aroma do vinho é dependente de vários fatores, incluindo a concentração de oxigênio dissolvido, pH, temperatura de armazenamento, concentração e tipo de compostos fenólicos presentes, assim como a presença de antioxidantes exógenos, tais como SO<sub>2</sub> e ácido ascórbico (Silva Ferreira *et al.*, 2002). Ela é caracterizada pela perda de aromas característicos e formação de aromas atípicos (*off flavour*) associados a deterioração do vinho, como naftalina, amadeirado, feno, ração, querosene (Vaimakis & Roussis, 1996; Escudero *et al.*, 2002; Silva Ferreira *et al.*, 2002; Papadopoulou & Roussis, 2008; Roussis & Sergianitis, 2008). A presença destes aromas atípicos têm sido atribuída a compostos como 3-(metiltio)propionaldeído (metional), 4-propenil-2-metoxifenol (eugenol), 3-hidroxi-4,5-dimetil-2(5H)-furanona (sotolon), 2,4,5-trimetil-1,3-dioxolano, fenilacetaldeído e 1,1,6-trimetil-1,2-dihidronaftaleno (TDN) (Escudero *et al.*, 2000; Silva Ferreira *et al.*, 2003; Lavigne *et al.*, 2008). Além destes, a aminoacetofenona, um composto derivado do ácido indolacético, também é associado a aromas característicos do envelhecimento atípico, como de amaciante de roupa, verniz ou naftalina (Hoenicke *et al.*, 2002; Shneider, 2007). O seu limiar de percepção sensorial situa-se entre 0,7 e 1,0 µg.L<sup>-1</sup>. Os vinhos de uvas *Vitis vinifera* contêm teores entre 0,02 e 0,3 µg.L<sup>-1</sup>, porém em vinhos alterados, esse teor pode chegar até 10 µg.L<sup>-1</sup>. Já nos vinhos de uvas da espécie *Vitis labrusca*, a aminoacetofenona participa do seu aroma característico, não sendo considerado um aroma atípico ou defeito aromático (Dubourdieu & Lavigne-Cruege, 2004; Shneider, 2007).

Além dos compostos aromáticos citados, o acetaldeído, quando presente em concentrações elevadas, também pode ser considerado característico de vinhos oxidados. Este

aldeído pode estar presente no vinho depois da fermentação primária como um resíduo do metabolismo primário da levedura, ou pode ser formado se o vinho se encontra em condições de oxidação. Neste último caso, acetaldeído é formado através da oxidação microbiana do etanol em condições aeróbias. Depois de formado, este composto pode combinar-se com os compostos fenólicos flavanóides, incluindo taninos e antocianinas, originando pigmentos escuros (Sonni *et al.*, 2011b; Comuzzo & Zironi, 2013). Em baixas concentrações, o acetaldeído dá um aroma frutado agradável ao vinho; mas em concentrações elevadas, se transforma em um aroma vegetal irritante lembrando grama verde ou maçã (Liu & Pilone, 2000).

### **3.2.2. Alteração oxidativa dos compostos fenólicos**

No vinho, os polifenóis e especialmente os flavonoides, como os flavan-3-ols e os produtos da sua condensação, as procianidinas, representam uma classe de compostos prontamente oxidáveis envolvendo o escurecimento e a instabilidade de importantes componentes aromáticos varietais durante o envelhecimento (Fernandez-Zurbano *et al.*, 1995; Li *et al.*, 2008; Nikolantonaki *et al.*, 2014). Os compostos fenólicos presentes em maior quantidade nos mostos e vinhos brancos são os ácidos benzóicos e cinâmicos, catequinas, procianidinas e flavonóis. Entre os ácidos cinâmicos presentes nos vinhos brancos estão o ácido p-cumárico e o ácido cafeico, e, em menor quantidade o ácido ferrúlico. Estes ácidos cinâmicos existem em estado livre e na forma combinada com o ácido tartárico (ácidos cutárico e caftárico) (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2003) e são os primeiros substratos a serem oxidados no mosto (Comuzzo & Zironi, 2013). A hidroxilação dos monofenóis resulta na formação de *orto*-difenóis que são os compostos mais susceptíveis a oxidação, os quais, quando oxidados formam as *orto*-quinonas (du Toit *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2008; Sonni *et al.*, 2011). As quinonas podem polimerizar e condensar com muitos outros compostos (incluindo

espécies fenólicas e não-fenólicas), formando pigmentos escuros, sendo essas reações aceleradas em pH alto (Rigaud *et al.*, 1991; Fernández-Zurbano *et al.*, 1995; Li *et al.*, 2008).

### 3.2.3. Escurecimento oxidativo em vinhos brancos

O escurecimento é um processo oxidativo envolvendo açúcares, lipídios, aminoácidos, ou fenóis em alimentos (Li *et al.*, 2008). É um dos principais problemas encontrados durante a vinificação, principalmente em vinhos brancos, pois resulta em efeitos negativos nas propriedades sensoriais (perda de cor, aroma e aumento da adstringência) (Escudero *et al.*, 2002; Silva Ferreira, *et al.*, 2002) e perda do valor nutricional do vinho (Sioumis *et al.*, 2006). Portanto, manter a qualidade do vinho branco através de todas as fases da vinificação, envelhecimento em barris ou garrafas e armazenamento em prateleiras continua sendo um grande desafio (Nikolantonaki *et al.*, 2014).

O escurecimento do vinho pode ser classificado em enzimático e não-enzimático em função do mecanismo inicial de oxidação. O enzimático ocorre na maioria das vezes em mostos, podendo ser controlado, e o não-enzimático prevalece no vinho fermentado, principalmente na presença de ferro e cobre (Li *et al.*, 2008).

No escurecimento enzimático, as principais enzimas oxidoredutases responsáveis pelo mecanismo de escurecimento são as polifenoloxidasas (PPO) e as peroxidases (POD). O escurecimento enzimático em mostos é correlacionado com o conteúdo de ácidos hidroxicinâmicos, incluindo os ácidos caftárico, cutárico e feftárico, sendo suas conformações naturais *trans*, ainda que as conformações *cis* estejam presentes em pequenas quantidades. Os substratos preferidos das PPO, entre os compostos fenólicos do mosto, são o ácido caftárico e, em menor intensidade, seu homólogo monohidroxilado, o ácido cutárico (Singleton *et al.*, 1985; Li *et al.*, 2008). A oxidação enzimática do ácido caftárico e do cutárico conduz ao ácido caftárico-*o*-quinona, que participa da degradação oxidativa dos mostos devido sua alta



concentração e reatividade (Rigaud *et al.*, 1991; Fernández-Zurbano *et al.*, 1995; Li *et al.*, 2008).

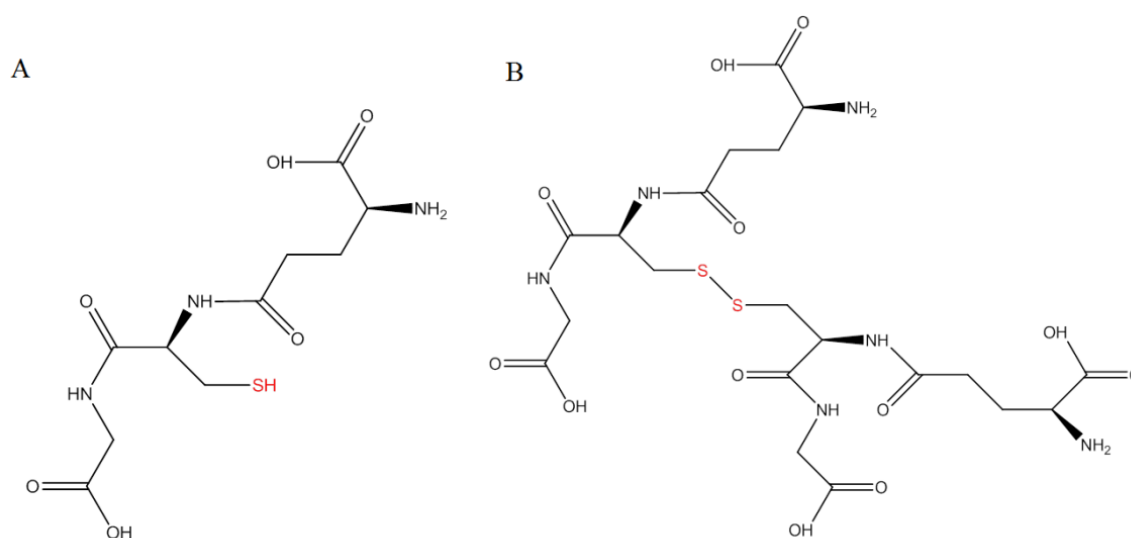
A oxidação não-enzimática é decorrente da oxidação dos compostos fenólicos e subsequente polimerização dos produtos oxidados. As reações de polimerização entre fenóis e outros constituintes do vinho, incluindo acetaldeído e ácido glioxílico também podem originar pigmentos escuros. Os compostos mais susceptíveis são o ácido cafeico e seus ésteres, catequina, epicatequina, antocianinas e seus derivados, e ácido gálico (Li *et al.*, 2008). Os níveis de flavan-3-ols são significativamente correlacionados com o grau de escurecimento da maioria dos vinhos brancos (Fernández-Zurbano *et al.*, 1995)

Durante o envelhecimento o mecanismo de oxidação ocorre devido às espécies reativas de oxigênio (ROS), tais como o radical superóxido e sua forma protonada, o radical hidroperóxil. Os grupos funcionais catecol podem reagir com esses radicais, formando semiquinonas, quinonas e peróxido de hidrogênio; este último pode formar radicais hidroxil através da reação de Fenton. Esses radicais hidroxil são muito reativos e instáveis; eles reagem imediatamente, principalmente com os compostos mais representativos no vinho, como etanol (oxidado à acetaldeído) (Comuzzo & Zironi, 2013).

Diferentes vinhos possuem capacidade oxidativa diversa, dependendo do potencial redox do vinho, que é dependente do seu *status* antioxidante. Esse *status* está diretamente relacionado aos níveis de antioxidantes tais como fenólicos, GSH, ácido ascórbico e SO<sub>2</sub>. A relação entre estes componentes pode retardar a oxidação do vinho (Sioumis *et al.*, 2006; Hosry *et al.*, 2009).

### 3.3. Glutathiona

A glutathiona é um tripeptídeo de ácido glutâmico, cisteína e glicina. É sintetizada a partir de aminoácidos, através da ação sequencial da  $\gamma$ -glutamilcisteína e da glutathiona sintetase (Noctor & Foyer, 1998). Sua forma monomérica é conhecida como glutathiona reduzida (GSH) e seu dímero, como glutathiona oxidada (GSSG) (Figura 1). A GSSG é formada em consequência da oxidação da GSH, mas pode ser reduzida novamente a GSH através da enzima glutathiona redutase e concomitante oxidação de NADPH (Kritzinger *et al.*, 2013).



**Figura 1** – Estrutura química das moléculas de glutathiona reduzida (A) com a presença do grupo sulfídrico e glutathiona oxidada (B) com a presença da ponte dissulfeto

A GSH desempenha vários papéis fisiológicos e bioquímicos em plantas, os mais importantes são o controle redox e no metabolismo do enxofre (Noctor & Foyer, 1998). A importância biológica da GSH está relacionada a seu grupo sulfidril livre (SH) do resíduo de cisteína, que confere a propriedade redox e nucleofílica. Assim, a GSH pode reduzir radicais

livres devido à sua capacidade de transferir um átomo de hidrogênio do seu grupo sulfidríla e manter em forma reduzida muitas outras moléculas na matriz do mosto/vinho (Friedman, 1994; Noctor & Foyer, 1998; du Toit *et al.*, 2007).

A glutationa é um componente natural de muitas frutas capaz de inibir a oxidação enzimática e não-enzimática em sucos de frutas, vinhos e outros alimentos (Friedman, 1994; Roussis *et al.*, 2007). A GSH foi quantificada primeiramente em uvas em 1989, por Cheynier *et al.* (1989). Neste estudo, o conteúdo de GSH em uvas de 28 variedades *Vitis vinifera* e seus respectivos mostos variou entre 56 e 372  $\mu\text{mol kg}^{-1}$  (17-114  $\text{mg kg}^{-1}$ ). Essa grande variação foi atribuída não somente a variedade, mas também a safra, localização, condições e zonas de cultivo e práticas enológicas (Cheynier *et al.*, 1989). Neste sentido, diversos fatores estão relacionados com o conteúdo de GSH nas uvas, por exemplo, o *status* de nitrogênio da videira – estimado como conteúdo de nitrogênio assimilável pela levedura do mosto (Kritzinger *et al.*, 2013).

No início do amadurecimento da uva a quantidade de GSH aumenta nas bagas. Além disso, foi observada uma forte correlação entre os níveis de GSH e de sólidos solúveis nas bagas até 16° Brix, após, a GSH se manteve estável (Adams & Liyanage, 1993; Okuda & Yokotsuka, 1999). Okuda e Yokotsuka (1999) estabeleceram que a glutationa presente nas bagas durante a maturação está, em sua maioria (>90%), na forma reduzida. Segundo os autores, o aumento nos níveis de GSH em bagas no início do amadurecimento pode ser atribuído a uma maior contribuição dos componentes do floema de fontes como folhas maduras para a baga. Entretanto, ainda é incerto se a GSH pode ser sintetizada na própria baga ou qual seria o local exato de síntese (Kritzinger *et al.*, 2013).

Em mostos, o conteúdo de GSH é muito variável. Níveis que variam de não detectáveis até 100  $\text{mg L}^{-1}$  foram relatados (Cheynier *et al.*, 1989; Park *et al.*, 2000). Muitos fatores podem influenciar a concentração de GSH no mosto, por exemplo, exposição ao

oxigênio, atividade da tirosinase, maceração com a casca durante o período pré-fermentativo e pressão aplicada na sua extração (du Toit *et al.*, 2007; Maggu *et al.*, 2007; Comuzzo & Zironi, 2013). Segundo du Toit *et al.* (2007) que estudaram o efeito dos tratamentos oxidativos e redutivos na elaboração de vinhos sobre a concentração de GSH em sucos de uvas brancas e seus vinhos resultantes, o tratamento redutivo ( $<0,3 \text{ mg L}^{-1}$  de  $\text{O}_2$  dissolvido, obtido durante a prensagem) resulta em níveis maiores de GSH quando comparado ao experimento controle ( $1 - 1,5 \text{ mg L}^{-1}$  de  $\text{O}_2$  dissolvido adicionado) e ao tratamento oxidativo ( $3,5 - 4 \text{ mg L}^{-1}$  de oxigênio dissolvido adicionado). Estes resultados estão de acordo com outro estudo realizado por Maggu *et al.* (2007), no qual a utilização de pressões maiores na etapa de extração e um maior tempo de maceração com as cascas (maior contato com oxigênio) levou a redução na quantidade de GSH, além de elevar níveis de compostos fenólicos oxidáveis em relação ao controle (Maggu *et al.*, 2007). A utilização de práticas enológicas oxidativas, além de reduzir a quantidade de GSH, resulta em níveis de GSSG elevados (Kritzinger *et al.*, 2013).

Os resultados relativos à evolução da concentração de GSH durante fermentação alcoólica são contraditórios (Kritzinger *et al.*, 2013) e os níveis de GSSG, em geral, permanecem baixos ( $< 2 \text{ mg L}^{-1}$ ) (Kritzinger, 2012). A GSH está envolvida em muitos mecanismos de resposta ao estresse de *Saccharomyces cerevisiae*, como a falta de enxofre e de nitrogênio, o estresse oxidativo e a remoção de metais pesados e alguns compostos químicos (Penninckx, 2002). Durante a fermentação alcoólica, a GSH pode ser absorvida ou liberada pela levedura através de transportadores. Além disso, o metabolismo da levedura provavelmente é influenciado pelo conteúdo de GSH extracelular (Kritzinger *et al.*, 2013). Lavigne *et al.* (2007) propuseram que a quantidade de GSH presente após a fermentação alcoólica é dependente da cepa de levedura. No entanto, em estudo realizado por Fracassetti *et al.* (2010), a influência da cepa de levedura foi considerada insignificante. Algumas leveduras comerciais enriquecidas com glutatona foram desenvolvidas e prometem benefícios, como

exercer efeito complementar de proteção contra oxidação e favorecer a formação de tióis voláteis estáveis (Lallemand, 2011).

As razões das variações de concentração de GSH durante a fermentação continuam inexplicadas. Entretanto, sabe-se que muitas uvas e metabólitos de levedura são tanto assimilados como liberados pela levedura durante a fermentação dependendo das interações não lineares entre a composição inicial do mosto, a base genética da cepa de levedura e os muitos parâmetros ambientais que afetam o crescimento das leveduras, tais como, temperatura, pH e a pressão osmótica (Kritzinger *et al.*, 2013).

Os níveis de GSH em vinhos brancos varia de não detectáveis até 30 mg L<sup>-1</sup> (Marchand & de Revel, 2010; Janes *et al.*, 2010; Fracassetti *et al.*, 2011; Roland & Schneider, 2015); em vinhos tintos, até aproximadamente 2 mg L<sup>-1</sup> (Marchand & de Revel, 2010; Roland & Schneider, 2015); e em sucos de uva até 40 mg L<sup>-1</sup> (du Toit *et al.*, 2007; Fracassetti *et al.*, 2011). Foram observados níveis tanto maiores quanto menores de GSH nos vinhos em comparação aos seus mostos (Park *et al.*, 2000; du Toit *et al.*, 2007; Kritzinger, 2012; Lavigne *et al.*, 2007; Andújar-Ortiz *et al.*, 2012) e, níveis maiores de GSH foram observados em vinhos jovens, ainda em tanques, antes do engarrafamento (Fracassetti *et al.*, 2011). Janes *et al.* (2010) reportaram que a média dos níveis de GSH em 28 vinhos jovens Sauvignon Blanc foi de 12,5 mg L<sup>-1</sup>. Em outro estudo realizado por Fracassetti *et al.* (2015) foi observado que as maiores concentrações de GSH (12,4 ± 1,4 mg L<sup>-1</sup>) foram detectadas ao final da fermentação alcoólica. Esta concentração reduziu após a trasfega e continuou reduzindo durante o envelhecimento sob as borras. A concentração de GSH geralmente decai durante o envelhecimento e armazenamento do vinho (Ugliano *et al.*, 2011; Kritzinger, 2012; Lavigne *et al.*, 2007; Andújar-Ortiz *et al.*, 2012; Fracassetti & Tirelli, 2015).

Durante o envelhecimento em garrafa, a exposição ao oxigênio também pode influenciar a concentração de GSH em vinho. Vinhos Sauvignon Blanc expostos a níveis mais

baixos de oxigênio durante envelhecimento em garrafa apresentaram maiores concentrações de GSH em comparação àqueles expostos a níveis mais altos de oxigênio, o que foi atribuído ao grau de oxidação inferior em vinhos com níveis mais baixos de oxigênio (Ugliano *et al.*, 2011).

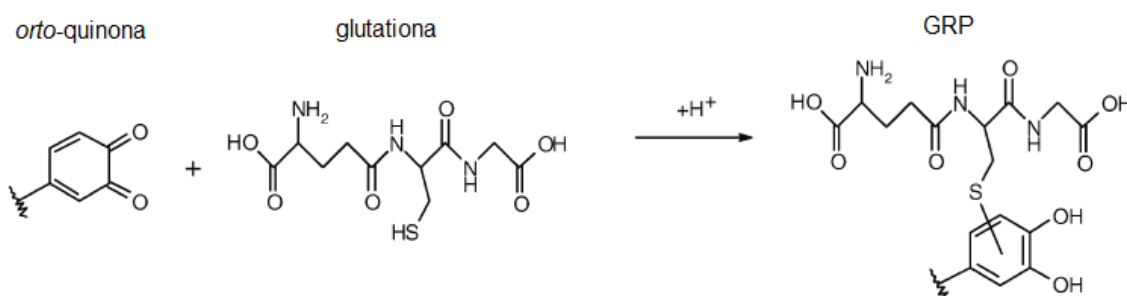
Os resultados sobre o efeito de borras de leveduras nos níveis de GSH no vinho são contraditórios (Kritzinger *et al.*, 2013). Segundo Lavigne *et al.* (2007), as propriedades redutoras das borras de levedura impediram a oxidação de GSH durante o envelhecimento em barril de vinhos Sauvignon Blanc. Além disso, o esgotamento da GSH foi mais rápido em vinhos que foram envelhecidos em barricas novas como resultado do maior efeito de oxidação de madeira nova. Por outro lado, Kritzinger (2012) mostrou claramente uma significativa redução no teor de GSH durante o envelhecimento, ainda que em condições redutoras, que fariam limitar a oxidação de GSH. Segundo Dubourdieu & Lavigne-Cruège (2004), a GSH não é liberada a partir das células de levedura autolisadas. Fracassetti & Tirelli (2015) não observaram liberação de GSH pelas borras de leveduras. A perda da GSH observada durante o envelhecimento sob as borras pode estar relacionada com a capacidade das borras ligarem-se aos tióis, responsáveis pelos defeitos organolépticos (reduzido) (Fracassetti & Tirelli, 2015).

Devido à complexidade e variabilidade do seu comportamento, a evolução da GSH durante vinificação pode alterar drasticamente e a concentração pode ser manipulada pelo enólogo, limitando a oxidação ao longo do processo de vinificação e envelhecimento (Kritzinger *et al.*, 2013).

### **3.3.1. Glutathione como antioxidante em mostos e vinhos: inibição do escurecimento e impacto nos compostos aromáticos**

O mecanismo de ação da GSH como antioxidante em mostos e vinhos envolve a formação do chamado *Grape Reaction Product* (GRP), ou produto da reação da uva, que se

refere ao produto resultante da reação entre a glutatona e as quinonas de certos fenóis do mosto (Figura 2), como *o*-difenóis, especialmente o ácido caftárico. A oxidação do ácido caftárico por ação da enzima PPO forma a *orto*-quinona do ácido que, em um meio que contenha glutatona, reage espontaneamente com esta para formar o composto ácido 2-(S)-glutationilcaftárico (GRP). As *orto*-quinonas são compostos que possuem propriedades eletrofílicas e, por isso, ligam-se facilmente com moléculas nucleofílicas, como a GSH (Nikolantonaki *et al.*, 2014). A formação do GRP, que é incolor, praticamente inerte e não é substrato da PPO, supõe um processo de paralisação das reações de oxidação, o que evita a formação de polímeros escuros e previne o escurecimento até certo ponto (Singleton *et al.*, 1985). Além disso, enquanto um mol de um fenol simples pode consumir 3,4 átomos de oxigênio, o mesmo fenol combinado com a glutatona, sob a forma de GRP, pode consumir até 8,5 moles de oxigênio (Cilliers & Singleton, 1990).



**Figura 2** – Reação da glutatona com compostos de *orto*-quinona (o local da adição depende do tipo de composto fenólico envolvido) (Sonni *et al.*, 2011)

Entretanto, o GRP pode ser oxidado pela lacase ou pelas quinonas do ácido caftárico em excesso após a glutatona se esgotar, resultando um escurecimento intenso. A adição de ácido caftárico a soluções de PPO-GRP induz a degradação completa do GRP, devido a um fenômeno de co-oxidação, implicando na oxidação enzimática do ácido caftárico a correspondente *o*-quinona, seguida da oxidação do GRP por esta mesma quinona. A interação

entre PPO e SO<sub>2</sub> pode prevenir a produção de GRP o que manterá muito mais ácidos caftáricos e *p*-cutáricos livres com alto potencial e escurecimento (Rigaud *et al.*, 1991; Li *et al.*, 2008). Portanto, a razão entre ácidos hidroxicinâmicos e GSH de um mosto deve apresentar uma boa indicação da sua susceptibilidade à oxidação, sendo que razões maiores levam a obtenção de mostos mais escuros. Uma proporção de 0,9-2,2 caracteriza um mosto levemente escuro e, mostos de cor média ou muito escuro são caracterizados por razões de 1,1-3,6 e 3,8-5,9, respectivamente (du Toit *et al.*, 2006).

Wu (2014) testou o efeito da GSH na inibição do escurecimento enzimático e não-enzimático em sucos de uva. Foi avaliada a ação de GSH em diferentes concentrações (de 100 a 600 mg L<sup>-1</sup>) na inibição da atividade enzimática de PPOs extraídas de sucos de uva. A partir da concentração de 400 mg L<sup>-1</sup>, a GSH inibiu 99,4% da atividade das PPOs, por isso esta concentração foi utilizada para ser adicionada em sucos de uva logo após sua obtenção e em sucos enlatados, posteriormente esterilizados e armazenados à 80°C. Os ensaios foram avaliados quanto ao escurecimento em diferentes tempos e comparados a ensaios controle, obtidos da mesma forma, porém sem adição de GSH. O escurecimento observado nos sucos com adição de GSH foi significativamente menor que observados nos ensaios controle até o período analisado (6h para o suco recém-obtido e 36h esterilizado).

Hosry *et al.* (2009) avaliaram a susceptibilidade ao escurecimento e o grau de oxidação de vinhos brancos mantidos sob condições de oxidação, nos quais foi adicionada GSH em diferentes concentrações. Concluíram que a estabilidade destes vinhos pode ser realçada pela adição de GSH e sugerem a sua adição no momento do engarrafamento a fim de prevenir o envelhecimento atípico do vinho. Segundo Dubourdieu & Lavigne-Cruege (2004), uma concentração de 10 mg L<sup>-1</sup> de GSH adicionada no engarrafamento de vinhos Sauvignon Blanc reduziu significativamente a tonalidade amarela do vinho durante um período de três anos de envelhecimento, em comparação ao vinho controle.



O estudo realizado por Sonni *et al.* (2011a), em um vinho branco modelo, relaciona o efeito antioxidante da glutatona e do ácido ascórbico evidenciado através da prevenção ao escurecimento e da estabilidade de compostos fenólicos como (+)-catequina, ácido caféico e outros compostos envolvidos na reação de escurecimento oxidativo. Entretanto, este estudo mostra que, em altas concentrações de glutatona ( $860 \text{ mg L}^{-1}$ ), a prevenção do escurecimento ocorre inicialmente e, eventualmente, após, pode levar a formação de pigmentos escuros. Isto porque, no período inicial, durante o qual a glutatona ofereceu um efeito protetor, a produção dos precursores do pigmento xantilium e de *orto*-quinona derivada de compostos fenólicos foi limitada. Após, quando a glutatona induziu a coloração, pigmentos poliméricos diferentes daqueles encontrados no vinho modelo sem adição de glutatona foram formados. Na presença de ácido ascórbico, altas concentrações de glutatona foram capazes de retardar a redução do ácido ascórbico e inibir a reação dos produtos da degradação do ácido ascórbico com o flavanol do vinho, (+)-catequina. Entretanto, com o esgotamento da glutatona, novamente ocorre um aumento da produção de uma grande variedade de pigmentos poliméricos diferentes.

Sonni *et al.* (2011b) mostraram que a inibição inicial que ocorreu no estudo citado anteriormente foi devido à capacidade de GSH para formar produtos de adição com compostos de carbonila, tais como o ácido glioxílico. Além disso, estes autores provaram que o efeito inibidor da GSH sobre a formação de dímeros derivados de ácido glioxílico foi independente de temperatura (20 vs 45°C) ou a presença de cobre e ferro. Os autores relataram também a formação de outro produto no qual GSH reage com um composto intermediário para a produção de dímeros, interrompendo as reações de polimerização. Esta inibição das reações de polimerização de carbonil-derivados impede a formação de pigmentos indesejados, tais como o amarelo cátion xantílio, o qual pode induzir mudanças de cores que são negativamente relacionados à qualidade do vinho.

Para entender melhor as reações que a glutatona e outros conservantes do vinho participam e quais produtos podem ser resultantes destas reações, Nikolantonaki *et al.*, (2014) investigaram o poder nucleofílico relativo dos principais conservantes (dióxido de enxofre, ácido ascórbico e glutatona), como também de um conservante natural (floroglucinol) em relação ao composto tiol varietal (3-sulfanilhexanol) em uma quinona modelo (4-metil-1,2-benzoquinona). Os três conservantes reagiram rapidamente com a quinona modelo, entretanto, comparando os rendimentos dos produtos de reação, o ácido ascórbico foi o que reagiu mais rápido, seguido pelo dióxido de enxofre e pela glutatona, nesta ordem. O local do ataque nucleofílico na *orto*-quinona modelo ocorreu nas três posições possíveis para os três antioxidantes nucleofílicos estudados. Assim, as três posições possíveis têm eletrofilicidade semelhantes e a reatividade em cada posição é afetada pelo caráter nucleofílico. Ainda neste estudo, foi avaliada a existência de interações sinérgicas entre estes conservantes. A análise quantitativa dos produtos da reação mostrou que o dióxido de enxofre teve uma reatividade similar sozinho ou em misturas com ácido ascórbico e/ou glutatona. Este resultado demonstrou a falta de efeito sinérgico entre estes três conservantes em condições ácidas como a do vinho. As reações foram conduzidas em concentrações equimolares, mas no vinho as proporções dos compostos variam. Porém, as taxas rápidas de reação dos conservantes do vinho com as quinonas sugerem que essas substâncias poderiam proteger o vinho mesmo quando presentes em concentrações muito baixas.

Panero *et al.* (2015) estudaram o efeito da adição de glutatona e elagitanninos em relação à oxidação de vinhos brancos engarrafados com duas concentrações de  $\text{SO}_2$  ( $20 \text{ mg L}^{-1}$  e  $60 \text{ mg L}^{-1}$ ), durante 6 meses de armazenamento. A adição de GSH, assim como observado por, Nikolantonaki *et al.* (2014), não proporcionou nenhum efeito em relação ao  $\text{SO}_2$ . Entretanto, contrariando outros estudos (Hosry *et al.*, 2009; Dubourdieu & Lavigne-Cruege, 2004, Sonni *et al.*, 2011a) nenhum efeito protetor contra o escurecimento foi observado.

Panero *et al.* (2015) também estudaram o efeito da adição GSH em níveis mais elevados de SO<sub>2</sub> e em dois níveis de oxigênio dissolvido. A adição de GSH provocou um aumento significativo na taxa de oxigênio consumida durante o primeiro mês de envelhecimento em garrafa, o que está de acordo com os resultados obtidos por Ugliano *et al.* (2011), no qual vinhos Sauvignon Blanc expostos a níveis mais baixos de oxigênio durante envelhecimento em garrafa apresentaram maiores concentrações de GSH em comparação àqueles expostos a níveis mais altos de oxigênio. Entretanto, no estudo realizado por Panero *et al.* (2015), após um ano, não foram observados efeitos sobre o processo de oxidação. Segundo Panero *et al.* (2015), a GSH, ao contrário de outros aditivos antioxidantes, não aumentou a combinação do SO<sub>2</sub>, porém a perda rápida e quase completa de GSH foi observada durante os primeiros meses de envelhecimento em garrafa.

Quanto a ação da GSH na preservação dos compostos aromáticos, estima-se que concentrações entre 10 e 20 mg L<sup>-1</sup> de GSH adicionadas no momento do engarrafamento são ótimas para controlar a degradação oxidativa de certos aromas voláteis (Roussis *et al.*, 2007). No caso das variedades aromáticas, a glutatona parece limitar a redução de ésteres voláteis (acetato de isoamila, hexanoato de etila) e terpenos (linalol) durante o armazenamento (Roussis *et al.*, 2007; Papadopoulou & Roussis, 2008) e no caso específico de vinhos Sauvignon Blanc no armazenamento em garrafa, proteger os tióis voláteis, 4-metil-4-mercaptopentanona e 3-mercaptohexanol (Dubourdieu & Lavigne-Cruege, 2004). A GSH pode levar a redução das associações *orto*-quinonas e outros tióis, pois compete pelas o-quinonas, dessa forma leva a um aumento de aromas relacionados aos compostos tióis e seus derivados no vinho (Fracassetti *et al.*, 2011). Alguns metabólitos derivados diretamente da glutatona poderiam estar envolvidos na revelação de aromas de mercaptanos, como mercaptohexanol e mercaptopentanona, em vinhos Sauvignon Blanc (Roland *et al.*, 2011).

Ugliano *et al.* (2011) demonstraram que os vinhos com adição de GSH (20 mg L<sup>-1</sup>)

antes do engarrafamento acumularam níveis mais elevados de H<sub>2</sub>S durante o envelhecimento em garrafas de vinho Sauvignon Blanc comparados com os vinhos em que não foi adicionado GSH. Esse efeito foi ampliado em condições de baixo oxigênio e em elevadas concentrações de cobre (II). Os autores atribuíram o acúmulo de H<sub>2</sub>S a capacidade antioxidante da GSH, que causa condição redutora no vinho que promove a produção de H<sub>2</sub>S, mas afirmam ser preciso realizar mais estudos para elucidar o papel da GSH na produção de H<sub>2</sub>S.

Sabendo que a GSH é um composto interessante para evitar os efeitos do envelhecimento atípico, Sarakbi & Kauffmann (2014) estabeleceram um critério para caracterização de vinhos brancos e o chamaram de capacidade equivalente da glutathione (GEC, *glutathione equivalent capacity*). A GEC é um critério quantitativo que pode ser utilizado, juntamente com outros critérios, para avaliar a estabilidade do vinho branco, especialmente em relação ao aroma do vinho. É calculada através da soma das áreas dos picos dos aminotióis em relação à área do pico de uma solução padrão de glutathione (1 μM) obtidos através de cromatografia líquida com detecção amperométrica em um eletrodo de prata. A GEC foi inversamente relacionada ao escurecimento dos vinhos brancos da variedade Riesling e, além disso, foi observada uma redução gradual de 55% da GEC durante um período de 29 dias de envelhecimento. A GEC foi cerca de cinco vezes maior nos mostos do que nos vinhos, entretanto observou-se uma perda de 66% da GEC em 30 min de exposição ao ar em temperatura ambiente.

A GSH pode exercer um efeito protetor sobre a cor nas diversas etapas da elaboração dos vinhos e sobre os aromas do vinho durante o envelhecimento. No entanto, a maior parte dos estudos foram realizados em meios sintéticos e/ou sob condições extremas de oxidação, portanto, outros estudos nas condições reais do vinho são necessários para obtermos resultados conclusivos. A instabilidade da glutathione, tanto em contato com oxigênio como com compostos fenólicos oxidados, explica porque poucos estudos são realizados para

analisar glutatona em mostos e vinhos (Dubourdieu & Lavigne-Cruege, 2004).

### **3.4. Encapsulação da glutatona**

Com os avanços da engenharia de materiais e da nanotecnologia, o estudo sobre encapsulação de substâncias ativas em micro/nanopartículas poliméricas tem despertado grande interesse científico e tecnológico, devido sua propriedade de transporte e liberação dessas substâncias com aplicações eficazes nos campos da medicina e farmácia (Huertas *et al.*, 2010; Rao *et al.*, 2011). Encapsulação é um processo de empacotamento de materiais sólidos, líquidos ou gasosos em cápsulas, as quais podem liberar o conteúdo de forma controlada e sob condições específicas. A utilização do processo de encapsulação tem solucionado limitações no emprego de ingredientes alimentícios, visto que pode suprimir ou atenuar características organolépticas indesejáveis, reduzir a volatilidade e a reatividade, e aumentar a estabilidade destes em condições ambientais adversas (Favaro-Trindade *et al.*, 2008).

A GSH livre presente no vinho pode sofrer hidrólise tanto química como enzimática ou ainda, o grupo tiol da GSH pode ser oxidado a GSSG, assim as propriedades antioxidantes da GSH seriam perdidas. A encapsulação de GSH em um sistema polimérico parece ser uma alternativa promissora para proteger a molécula de GSH contra agentes químicos e/ou enzimáticos (Lopedota *et al.*, 2009; Trapani *et al.*, 2010; Kafedjiiski *et al.*, 2005) durante o envelhecimento ou armazenamento de vinhos e espumantes. Além disso, a GSH encapsulada poderia evitar a formação do H<sub>2</sub>S, que, segundo Ugliano *et al.* (2011) é formado com a presença de GSH, provavelmente, devido a condição redutora que a GSH livre ocasiona no meio.

Micro e nanopartículas são definidas como partículas sólidas que formam um sistema

de transporte e liberação controlada de substâncias ativas, incluindo micro/ nanoesferas e micro/nanocápsulas, as quais diferem entre si por suas composições e suas organizações estruturais (Schaffazick *et al.*, 2003; Huertas *et al.*, 2010). Nas micro/nanocápsulas a substância ativa pode estar presente no núcleo ou adsorvida na superfície da cápsula, enquanto que as micro/nanoesferas possuem uma estrutura do tipo matriz onde a substância ativa pode ser adsorvida na superfície da esfera ou retida na matriz polimérica (Huertas *et al.*, 2010; Rao *et al.*, 2011). No caso das micro/nanocápsulas a cavidade pode conter a substância ativa sob a forma líquida ou sólida como uma dispersão/emulsão molecular. Esta cavidade serve como reservatório e tem caráter lipofílico ou hidrofílico, de acordo com o caráter de solubilidade da substância ativa e com o método de preparação (Huertas *et al.*, 2010). As nanopartículas poliméricas são sistemas carreadores de substâncias ativas que apresentam diâmetro inferior a 1000 nm (1  $\mu\text{m}$ ), enquanto as micropartículas apresentam diâmetro de 1 a 1000  $\mu\text{m}$  (Kreuter, 1996; Schaffazick *et al.*, 2003).

Os mecanismos de liberação dos materiais ativos microencapsulados variam de acordo com a natureza do agente encapsulante, sendo que normalmente ocorrem devido a mecanismos como: variação de temperatura e de pH, solubilidade do meio, biodegradação, difusão, ruptura mecânica, permeabilidade seletiva e gradiente de concentração existente em relação ao meio de liberação. A difusão do agente ativo na matriz polimérica é definida como um processo de transferência de massa de moléculas individuais de uma substância por intermédio de um movimento molecular aleatório e associado a um gradiente de concentração (Favaro-Trindade *et al.*, 2008).

A escolha do método de encapsulação depende das características da substância ativa, do material encapsulante, do mecanismo de liberação e do tamanho das estruturas que se deseja obter (Bansode *et al.*, 2010). Em termos gerais, os métodos de encapsulação são divididos em três tipos: químicos (ex: polimerização interfacial e *in situ*), físico-químicos (ex:

coacervação e separação de fases, expansão de fluidos supercríticos) e físico-mecânicos (ex: secagem ou congelamento por pulverização, tecnologia de leito fluidizado, evaporação do solvente). A microencapsulação pelo método de secagem por pulverização (spray drying) é um processo comercial de baixo custo que é principalmente utilizado para a encapsulação de perfumes, óleos e sabores. Neste método as partículas do material ativo são dispersas numa solução de polímero e pulverizadas dentro de uma câmara quente. O material de parede solidifica sobre as partículas do material ativo enquanto o solvente evapora de tal forma que as microcápsulas são obtidas em forma polinuclear ou de matriz (Jyothi *et al.*, 2010).

Diferentes tipos de materiais podem ser encapsulados, como: proteínas, peptídeos, óleos voláteis, ingredientes alimentícios, pigmentos, corantes, catalisadores, pesticidas, entres outros (Jyothi *et al.*, 2010). Diferentes tipos de revestimentos ou materiais de parede podem ser utilizados, entretanto, para uso em alimentos estes materiais devem ser cuidadosamente escolhidos para evitar riscos à saúde dos consumidores. O material de parede adequado para aplicação na indústria vinícola deve ter pré-requisitos adicionais, tais como, grau de pureza alimentício, ter baixo custo e ser abundante.

A quitosana é um polímero amplamente utilizado para liberação oral de muitas proteínas e fármacos, pois não é tóxica, é biodegradável, biocompatível e tem boas propriedades mecânicas (Koo *et al.*, 2011). A quitosana é obtida pela reação de desacetilação da quitina em meio alcalino. A quitina é um polímero natural, extraído de exoesqueleto de crustáceos e insetos, composto pelas unidades monoméricas de  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)-2-amino-2-desoxi-D-glicose e  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)-2-acetamida-2-desoxi-D-glicose. Este polímero natural possui uma estrutura cristalina altamente organizada, tem baixa reatividade química e é insolúvel em meio aquoso e na maioria dos solventes orgânicos, porém pode se dissolver facilmente em soluções de ácidos fracos diluídos, como o ácido acético (Laranjeira & Fávare, 2009). Micropartículas de quitosana podem ser facilmente obtidas por gelificação iônica entre grupos catiônicos da

quitosana e ânions multivalentes (Koo *et al.*, 2011). Kafedjiiski *et al.* (2005) sintetizaram e caracterizaram o conjugado quitosana-glutationa e concluíram que ele pode ser capaz de carregar macromoléculas hidrofílicas, além de melhorar as propriedades mucoadesivas e a permeabilidade de substâncias ativas *in vitro*.

Estudos anteriores reportaram a inclusão de ciclodextrinas (CDs) em sistemas de nanopartículas de quitosana (Trapani *et al.*, 2010; Jingou *et al.*, 2011). A inclusão de CDs em estruturas de micro ou nano partículas foi realizada visando melhorar a capacidade dessas partículas de carrear compostos hidrofóbicos (Del Valle, 2004), no entanto, os estudos mostraram que micropartículas de CD podem também carrear moléculas hidrofílicas com alta eficiência (Lopedota *et al.*, 2009; Jingou *et al.*, 2011). As CDs são obtidas a partir do amido, e são adequadas para microencapsulação por inclusão molecular. São formadas por um número variável de glucose unidas entre si por ligações  $\alpha$ -1,4. As mais comuns são  $\alpha$ -CD,  $\beta$ -CD e  $\gamma$ -CD, com 6, 7 e 8 unidades de glucose, respectivamente. Têm a forma de um cone truncado, com uma cavidade hidrofóbica no centro e uma camada externa hidrofílica, portanto, solúveis em água (Del Valle, 2004). As CDs são capazes de interagir com a parte hidrofóbica das cadeias laterais de compostos peptídeos ou proteínas e assim, impedir em certa medida sua degradação (Irie & Uekama, 1999). Lopedota *et al.* (2009) sugerem uma fraca interação entre GSH e CDs, sendo que a espinha dorsal do peptídeo pode ser parcialmente incluída na cavidade da CD, enquanto grupos de ácido carboxílico e amina polares e o grupo tiol permanecem fora da cavidade. Essa interação, mesmo sendo fraca, é capaz de evitar a degradação da GSH por endopeptidases (Garcia-Fuentes *et al.*, 2006).

As técnicas de encapsulação utilizadas na elaboração de vinhos e espumantes são aplicadas principalmente como método para imobilização de células de levedura (Silva *et al.*, 2002; Martynenko & Gracheva, 2003; Servetas *et al.*, 2013), de bactérias ácido-láticas (Kosseva *et al.*, 1998; Maicas, 2001; Kosseva & Kennedy, 2004) e de enzimas (Spagna *et al.*,



2002). Entre as técnicas de imobilização celular disponíveis, a oclusão em géis de polissacarídeos, tais como ágar-ágar, alginato, quitosana e carragenana, é a mais importante e amplamente utilizada (Kourkoutas *et al.*, 2004; Torresi *et al.*, 2011). No entanto, a utilização de alginatos e de hidrogéis de polissacarídeos, em geral, não é uma boa escolha industrial por causa do alto custo e baixa estabilidade química e mecânica. Apenas a aplicação de géis de alginato na fermentação secundária na garrafa de espumantes elaborados pelo método tradicional tem sido comercialmente utilizada em processos de vinificações, com a finalidade de facilitar e tornar mais rápido o processo de *remuage* e facilitar a remoção das células no *degorgement* (Kourkoutas *et al.*, 2004).

## **4. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Os resultados serão apresentados em forma de capítulos.

### **CAPÍTULO 1**

#### **Efeito da glutathione na prevenção da oxidação de vinhos brancos**

Artigo publicado na Revista Brasileira de Viticultura e Enologia

### **CAPÍTULO 2**

#### **Efeito da adição de glutathione em vinhos espumantes**

Artigo publicado na revista Food Chemistry

### **CAPÍTULO 3**

#### **Efeito da glutathione durante o armazenamento de vinhos espumantes**

Artigo aprovado na revista Food Chemistry

### **CAPÍTULO 4**

#### **Preparação e caracterização de micropartículas de $\beta$ -ciclodextrina/glutathione e quitosana/glutathione obtidas por spray-dryer**

Artigo será submetido para Química Nova

**4.1.      CAPÍTULO 1 – Efeito da glutathione na prevenção da oxidação de vinhos  
brancos**



Shutterstock.com

## Efeito da glutatona na prevenção da oxidação de vinhos brancos

Vanessa Webber<sup>1</sup>  
 Suslane Leonardelli<sup>2</sup>  
 Laurien Adami<sup>2</sup>  
 Gilberto João Carnieli<sup>2</sup>  
 Regina Vanderlinde<sup>1,2</sup>

### Resumo

**V**inhos brancos são muito susceptíveis à oxidação em diversas etapas de elaboração e durante o armazenamento e envelhecimento. Para evitar os efeitos depreciativos da oxidação são utilizados antioxidantes. A glutatona, antioxidante naturalmente presente nas uvas e seus derivados, contribui positivamente para a preservação de aromas varietais, prevenção do escurecimento e outros defeitos decorrentes do armazenamento prolongado em vinhos brancos. Existem alguns produtos enológicos no mercado contendo glutatona e a sua adição em vinhos vem sendo discutida por diversos pesquisadores. Portanto, esta revisão tem como objetivo elucidar o mecanismo de ação da glutatona em vinhos e seus efeitos na inibição do processo oxidativo.

**Palavras-chave:** antioxidantes, vinhos, oxidação.

<sup>1</sup>UCS,  
 95070-560 Caxias do Sul, RS.  
<sup>2</sup>Laren e Ibravin,  
 95084-470 Caxias do Sul, RS.  
 Autor correspondente:  
 vwebber@ucs.br

## Abstract

### The effect of glutathione to prevent the oxidation of white wines

White wines are very susceptible to oxidation in various stages of production and also during the storage and aging period. Antioxidants are used to prevent the negative effects of oxidation. Glutathione, a natural antioxidant found in grapes and their derivatives, contributes positively to the preservation of varietal aromas, preventing browning and other problems resulting from the prolonged storage of white wines. There are some wine products on the market containing glutathione and its use in wines has been discussed by many researchers. Therefore, this review aims to elucidate the mechanism of action of glutathione in wines and its effects on the inhibition of the oxidative process.

**Key words:** antioxidants, wines, oxidation.

## Introdução

A deterioração oxidativa, principalmente nos vinhos brancos e espumantes, é um problema conhecido em enologia. A primeira etapa da oxidação é caracterizada pela transformação dos compostos aromáticos. Isto leva à perda dos aromas característicos e, posteriormente, à formação de aromas atípicos associados à deterioração. O escurecimento oxidativo é uma etapa posterior (FERREIRA et al., 2002; PAPADOPOULOU; ROUSSIS, 2008; ROUSSIS; SERGIANITIS, 2008; HOSRY et al., 2009; SONNI et al., 2011). Um dos principais responsáveis pelo escurecimento oxidativo são os fenóis, que sofrem oxidação não enzimática na presença de oxigênio, resultando polifenóis polimerizados que precipitam na forma de pigmentos escuros (FERNÁNDEZ-ZURBANO et al., 1995; LI et al., 2008). Neste contexto, como uma alternativa para evitar o processo oxidativo, é proposta a adição de antioxidantes e, dentre estes, a glutatona.

A glutatona é um tripeptídeo, constituído por ácido glutâmico, cisteína e glicina, e está naturalmente presente em pequenas quantidades nas uvas e vinhos e tem propriedades antioxidantes (LAVIGNE et al., 2007). Ela atua como inibidora das mudanças prejudiciais à qualidade dos vinhos brancos provocadas durante o armazenamento em garrafas (ROUSSIS; SERGIANITIS, 2008; SONNI et al., 2011). O termo glutatona é utilizado indistintamente para designar tanto sua forma reduzida como sua forma dimérica, ambas presentes no mosto e no vinho (CASASSA, 2009). Os estudos

relacionados à glutatona em vinhos e mostos comprovam que o nível de glutatona reduzida (GSH) é importante para a prevenção da formação de compostos aromáticos indesejáveis e da oxidação de compostos fenólicos no vinho (PAPADOPOULOU; ROUSSIS, 2008; ROUSSIS; SERGIANITIS, 2008; HOSRY et al., 2009; SONNI et al., 2011). Tendo em vista o interesse geral de reduzir os níveis de  $SO_2$  na indústria de alimentos, a adição de GSH e a redução das doses de  $SO_2$  têm sido sugeridas, sendo que a GSH apresentou maior proteção em relação a importantes compostos aromáticos, comparada ao  $SO_2$  (ROUSSIS; SERGIANITIS, 2008). Além disso, um dossiê toxicológico que discute a segurança de sua adição em mostos e vinhos foi apresentado e está sendo avaliado pela Organização Internacional da Uva e do Vinho (OIV, 2010). Portanto, a utilização de glutatona na produção de vinhos brancos pode ser uma alternativa interessante para o setor vinícola.

Alguns fornecedores de produtos enológicos já vendem misturas de nutrientes para leveduras contendo glutatona com a promessa de preservar e melhorar os aromas produzidos no processo de elaboração (BOWER et al., 2010; LALLEMAND, 2011). Porém, o assunto ainda é pouco difundido no setor vinícola. Portanto, neste trabalho estão apresentados e discutidos estudos sobre a glutatona, seus efeitos na prevenção da oxidação do vinho e suas possíveis aplicações na indústria vinícola.

### Processo oxidativo do vinho branco

O processo oxidativo inclui alterações, tais como: rápida perda de aromas frutados e florais, desenvolvimento de aromas desagradáveis e escurecimento precoce. A susceptibilidade de um vinho a estas alterações está relacionada principalmente a três fatores: (I) potencial redox do vinho, (II) concentração e tipo de antioxidantes e compostos fenólicos presentes, (III) concentração de oxigênio dissolvido (FERREIRA et al., 2003).

### Alteração oxidativa do perfil aromático

O aroma dos vinhos constitui uma das mais importantes características organolépticas da sua qualidade e tipicidade. Nos vinhos jovens, o aroma é essencialmente determinado pelos constituintes voláteis provenientes das uvas e da vinificação. Vários compostos voláteis do vinho são transformados durante o armazenamento podendo ocorrer perda do aroma. Durante o processo de maturação dos vinhos, os ésteres de ácidos graxos formados na fermentação alcoólica constituem elementos importantes do aroma dos vinhos brancos, desaparecendo durante a conservação, devido à hidrólise destes ésteres (RIBÉREAU-GAYON et al., 2003).

A deterioração oxidativa em vinhos brancos é caracterizada pela perda de aromas característicos e formação de aromas atípicos (*off flavour*) associados à deterioração do vinho, como naftalina, amadeirado, feno, ração, querosene (VAIMAKIS; ROUSSIS, 1996; ESCUDERO et al., 2002; FERREIRA et al., 2002; PAPADOPOULOU; ROUSSIS, 2008; ROUSSIS; SERGIANITIS, 2008). A presença destes aromas atípicos tem sido atribuída a compostos como 3-(metiltio)propionaldeído (metional), 4-propenil-2-metoxifenol (eugenol), 3-hidroxi-4,5-dimetil-2(5H)-furanona (sotolon), 2,4,5-trimetil-1,3-dioxolano, fenilacetaldeído e 1,1,6-trimetil-1,2-dihidronaftaleno (TDN) (ESCUDERO et al., 2000; FERREIRA et al., 2003; LAVIGNE et al., 2008).

Aromas provenientes do envelhecimento atípico, como de amaciante de roupa, verniz ou naftalina são atribuídos à aminoacetofenona, um composto derivado do ácido indolacético, naturalmente presente nas uvas (HOENICKE et al., 2002; SHNEIDER, 2007; CASASSA, 2009). O seu limiar de percepção sensorial situa-se entre 0,7 e 1,0  $\mu\text{g L}^{-1}$ . Os vinhos *Vitis vinifera*, inclusive tintos, contêm teores entre 0,02 e 0,3  $\mu\text{g L}^{-1}$ , porém em vinhos alterados, esse teor pode chegar até 10  $\mu\text{g L}^{-1}$ . A aminoacetofenona participa do aroma característico da espécie *Vitis labrusca* (DUBOURDIEU; LAVIGNE-CRUEGE, 2004; SHNEIDER, 2007).

A degradação oxidativa está associada com pH baixo, temperaturas elevadas de armazenamento e alto teor de oxigênio (FERREIRA et al., 2002). Vários compostos fermentativos (ésteres etílicos de ácidos graxos, acetatos, ácidos graxos e terpenos) diminuem com o envelhecimento oxidativo, enquanto outros, como sotolon e derivados de furfural, aumentam (LAVIGNE et al., 2008; PAPADOPOULOU; ROUSSIS, 2008; ROUSSIS; SERGIANITIS, 2008).

### Alteração oxidativa dos compostos fenólicos e escurecimento

Muitos constituintes do vinho, incluindo compostos fenólicos, certos metais, tirosina e aldeídos são susceptíveis à oxidação durante o processo de elaboração e armazenamento do vinho, induzindo ao escurecimento (FERNÁNDEZ-ZURBANO et al., 1995; LI et al., 2008). O escurecimento é um processo oxidativo envolvendo açúcares, lípidios, aminoácidos ou fenóis em alimentos (LI et al., 2008). Este processo oxidativo é um dos principais problemas encontrados durante a vinificação, principalmente em vinhos brancos, pois resulta em efeitos negativos nas propriedades sensoriais (perda de cor, sabor e aroma e aumento da adstringência) (ESCUDERO et al., 2002; FERREIRA et al., 2002) e perda do valor nutricional do vinho (SIOUMIS et al., 2006). Os compostos fenólicos são as principais substâncias envolvidas nas reações de escurecimento (DU TOIT et al., 2006; LI et al., 2008). Dentre os compostos fenólicos, os orto-difenóis, resultantes da hidroxilação de monofenóis, são os compostos mais susceptíveis à oxidação (DU TOIT et al., 2006; LI et al., 2008; SONNI et al., 2011).

O conteúdo fenólico dos vinhos brancos secos representa cerca de 50 a 250  $\text{mg L}^{-1}$ , ou seja, menos de 10% comparado aos vinhos tintos. Os compostos fenólicos presentes em maior quantidade nos mostos e vinhos brancos são os ácidos benzóicos e cinâmicos, catequinas, procianidinas e flavonóis. Entre os ácidos cinâmicos presentes nos vinhos brancos estão o ácido p-cumárico e o ácido cafeico, e, em menor quantidade, o ácido ferrúlico. Estes ácidos cinâmicos existem em estado livre e na forma combinada com o ácido tartárico (ácidos cutárico e caftárico) (RIBÉREAU-GAYON et al., 2003). Estes ácidos estão diretamente envolvidos no escurecimento de mostos e vinhos brancos (SINGLETON et al., 1985).

Diferentes vinhos possuem capacidade oxidativa diversa, devido a seu potencial redox, que é dependente do status antioxidante do vinho. Esse status está diretamente relacionado aos níveis de antioxidantes tais como



fenólicos, GSH, ácido ascórbico e  $SO_2$ . A relação entre estes componentes pode retardar a oxidação do vinho (SIOUMIS et al., 2006; HOSRY et al., 2009).

O escurecimento do vinho pode ser classificado em enzimático e não enzimático em função do mecanismo inicial de oxidação. O enzimático ocorre na maioria das vezes em mostos, podendo ser controlado, e o não enzimático prevalece no vinho fermentado, principalmente na presença de ferro e cobre (LI et al., 2008).

### Escurecimento enzimático

As principais enzimas oxidoreduzases responsáveis pelo mecanismo de escurecimento são as polifenoloxidasas (PPO) e as peroxidases (POD). O escurecimento enzimático em mostos é correlacionado com o conteúdo de ácidos hidroxicinâmicos, incluindo os ácidos caftárico, cutárico e feftárico, sendo suas conformações naturais *trans*, ainda que as *cis* estejam presentes em pequenas quantidades. Os substratos preferidos das PPOs, entre os compostos fenólicos do mosto, são o ácido caftárico e, em menor intensidade, seu homólogo monoidroxilado, o ácido cutárico (SINGLETON et al., 1985; LI et al., 2008).

A oxidação enzimática do ácido caftárico e do cutárico conduz ao ácido caftárico- $\alpha$ -quinona, que participa da degradação oxidativa dos mostos devido a sua alta concentração e reatividade. As  $\alpha$ -quinonas produzidas na oxidação enzimática reagem de acordo com sua propriedade redox e afinidades eletrônicas. As quinonas produzidas podem polimerizar e condensar com muitos outros compostos (incluindo espécies fenólicas e não fenólicas), formando pigmentos escuros, sendo essas reações aceleradas em pH alto (RIGAUD et al., 1991; FERNÁNDEZ-ZURBANO et al., 1995; LI et al., 2008).

### Escurecimento não enzimático

A oxidação não enzimática, também chamada oxidação química, prevalece no vinho com características de regeneração e autocatálise, e também pode ocorrer através da reação com a luz (LI et al., 2008). Os *o*-difenois, principalmente o ácido cafeico e seus ésteres, catequina, epicatequina, antocianinas e seus derivados e ácido gálico, são considerados os mais susceptíveis à oxidação no processo de escurecimento não enzimático, e os níveis de flavan-3-ols são significativamente correlacionados com o grau de escurecimento da maioria dos vinhos brancos (FERNÁNDEZ-ZURBANO et al., 1995).

O escurecimento não enzimático em vinhos pode surgir através de várias vias relacionadas aos fenóis, e uma delas é a oxidação dos fenóis e subsequente polimerização dos produtos oxidados. O primeiro processo é catalisado pelo cobre e pelo ferro. Outras rotas envolvem reações de polimerização entre fenóis e outros compostos presentes em vinhos, incluindo condensação com acetaldeído ou ácido glicoxílico (derivado da oxidação do ácido tartárico) (LI et al., 2008).

### Glutathiona

A glutathiona é um tripeptídeo linear sintetizado a partir de aminoácidos, através da ação sequencial da  $\gamma$ -glutamilcisteína e da glutathiona sintetase. O par *redox* da glutathiona desempenha um importante papel na proteção de muitos tipos de células contra os danos oxidativos (NOCTOR; FOYER, 1998).

A glutathiona é um componente natural de muitas frutas, definida como inibidora da oxidação enzimática e não enzimática de sucos de frutas, vinhos e outros alimentos (FRIEDMAN, 1994; ROUSSIS et al., 2007; CASASSA, 2009). A glutathiona monomérica é conhecida como glutathiona reduzida (GSH) e seu dímero como glutathiona oxidada (GSSG) (Figura 1).

A glutathiona reduzida (GSH) possui propriedade de sequestrar radicais livres devido a sua capacidade de transferir um átomo de hidrogênio do seu grupo sulfidril (SH) e tem a capacidade de manter em forma reduzida muitas outras moléculas na matriz do mosto/vinho (FRIEDMAN, 1994; NOCTOR; FOYER, 1998; DU TOIT et al., 2007). Enquanto oxidantes favorecem a formação de GSSG (glutathiona oxidada), a manutenção dos níveis de GSH ocorre devido à redução da GSSG por NADPH, uma reação catalisada pela glutathiona redutase (GR) (NOCTOR; FOYER, 1998).

O conteúdo de glutathiona naturalmente presente nas bagas pode variar dependendo da variedade, condições e zonas de cultivo (CHEYNIER et al., 1989), e das práticas enológicas utilizadas (LAVIGNE et al., 2007). O teor de glutathiona é praticamente constante durante a maturação da baga (ADAMS; LIYANAGE, 1993) e é maior em vinhos jovens ainda em tanques antes do engarrafamento (FRACASSETTI et al., 2011). Além disso, a quantidade de glutathiona parece estar diretamente relacionada aos níveis de nitrogênio potencialmente assimiláveis e com os níveis de radiação ultravioleta (CASASSA, 2009). Isto talvez possa explicar os maiores teores de glutathiona em vinhos da África do Sul (FRACASSETTI et al., 2011), quando comparados a vinhos

de Bordeaux, na França (MARCHAND; REVEL, 2010), visto que a África do Sul provavelmente sofra maior incidência de raios ultravioleta por situar-se mais próxima da Linha do Equador.

A quantidade de glutatona em vinhos brancos varia de poucos miligramas até 30 mg L<sup>-1</sup> (MARCHAND; REVEL, 2010; JANES et al., 2010; FRACASSETTI et al., 2011), até aproximadamente 2 mg L<sup>-1</sup> em vinhos tintos (corte de Cabernet Sauvignon e Merlot) (MARCHAND; REVEL, 2010), e 40 mg L<sup>-1</sup> em sucos de uva (DU TOIT et al., 2007; FRACASSETTI et al., 2011). Estudos mostram que, durante o envelhecimento e o armazenamento, o conteúdo de GSH diminui (LAVIGNE et al., 2007; FRACASSETTI et al., 2011). Além disso, a glutatona é facilmente degradada em mostos sob níveis muito baixos de oxigênio, ainda que em presença de doses de SO<sub>2</sub> de 60 mg L<sup>-1</sup> (DU TOIT et al., 2007).

Altos níveis de glutatona são desejáveis, principalmente nas uvas brancas, devido a sua ação antioxidante. Seu mecanismo de ação envolve a formação do chamado *Grape Reaction Product* (GRP), ou produto da reação da uva, que se refere ao produto resultante da reação entre a glutatona e as quinonas de certos fenóis do mosto (Figura 2), especialmente o ácido caftárico. O GRP é o produto final desta cadeia de oxidação e, portanto, limita o progresso da mesma, já que não pode ser subsequentemente oxidado (SINGLETON et al., 1985; RIGAUD et al., 1991). Além disso, o GRP é um poderoso antioxidante (DU TOIT et al., 2007), pois enquanto um mol de um fenol simples pode consumir 3,4 átomos de oxigênio, o mesmo fenol combinado com a glutatona, sob a forma de GRP, pode consumir até 8,5 moles de oxigênio (CILLIERS; SINGLETON, 1990).

Portanto, a formação do GRP, que é incolor e não é substrato da PPO, supõe um processo de paralisação da quinona frente às reações de oxidação anteriormente mencionadas. Portanto a GSH no mosto pode interceptar a produção de quinonas durante a oxidação enzimática e diminuir a quantidade de pigmentos escuros. O ácido caftárico preso como GRP é inerte, ou quase, para suprir a oxidação pelas PPO, e a reação chega ao seu fim com o desaparecimento do ácido caftárico (SINGLETON et al., 1985).

Entretanto, o GRP pode ser oxidado pela lacase ou pelas quinonas do ácido caftárico em excesso, após a glutatona se esgotar, resultando um escurecimento intenso. A adição de ácido caftárico a soluções de PPO-GRP induz a degradação completa do derivado glutatiónil, devido a um fenômeno de cooxidação, ocasionando a oxidação enzimática do ácido caftárico a correspondente  $\alpha$ -quinona, seguida da oxidação

do GRP por esta mesma quinona. A interação entre PPO e SO<sub>2</sub> pode prevenir a produção de GRP o que manterá muito mais ácidos caftáricos e *p*-cutáricos livres com alto potencial e escurecimento (RIGAUD et al., 1991; LI et al., 2008).

O cobre, em qualquer de seus estados, diminui a concentração de glutatona disponível e aumenta o escurecimento do mosto (RIGAUD et al., 1991). Um grande problema associado com as pulverizações à base de cobre antes da colheita é que o cobre no mosto, além de precipitar moléculas tioladas como a glutatona (CASASSA, 2009), é também um poderoso catalisador da oxidação (Figura 3).

A presença de glutatona em uvas tem sido relatada desde os anos 80 (CHEYNIER et al., 1989), porém, pouco tem sido descrito sobre a análise deste composto em vinhos e mostos, e sobre sua ação na conservação da qualidade dos vinhos submetidos ao armazenamento. A forte reatividade da glutatona, tanto com oxigênio e como com compostos fenólicos oxidados, explica porque poucos estudos são realizados para analisar glutatona em mostos e vinhos (DUBOURDIEU; LAVIGNE-CRUEGE, 2004).

Nos vinhos brancos, GSH previne o escurecimento da cor, a dissipação do aroma varietal e a tendência do desenvolvimento de defeitos devido ao envelhecimento do vinho (Dubourdieu; Lavigne-Cruege, 2004; HOSRY et al., 2009). Além disso, a glutatona também pode atuar como ativador da fermentação alcoólica, pois tem ação detoxificante em relação à levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Algumas leveduras comerciais enriquecidas com glutatona foram desenvolvidas e prometem benefícios, como exercer efeito complementar de proteção contra oxidação e favorecer a formação de tióis voláteis estáveis (LALLEMAND, 2011). Neste caso, a ação da glutatona ocorre após a autólise das leveduras, quando a glutatona é liberada, com a condição que os níveis iniciais de nitrogênio prontamente assimiláveis sejam adequados (CASASSA, 2009).

As borras e certos suplementos comerciais fermentativos também podem fornecer glutatona solúvel ao mosto/vinho. O manejo da glutatona durante a vinificação pode ter muita influência sobre a longevidade dos vinhos brancos durante a etapa de armazenamento e/ou envelhecimento em garrafa, já que foi encontrada uma relação direta entre os teores iniciais destes compostos em mostos e os teores presentes nos vinhos correspondentes depois de um mês do final da fermentação alcoólica (DUBOURDIEU; LAVIGNE-CRUEGE, 2004).



### Conservação dos compostos aromáticos

As propriedades benéficas da GSH atuantes na prevenção dos efeitos negativos provocados pelo envelhecimento e para a qualidade sensorial de vinhos brancos são comprovadas (FRIEDMAN, 1994; LAVIGNE et al., 2007; HOSRY et al., 2009; SONNI et al., 2011). Estima-se que concentrações entre 10 e 20 mg L<sup>-1</sup> de glutatona no momento do engarrafamento são ótimas para controlar a degradação oxidativa de certos aromas voláteis (ROUSSIS et al., 2007). Por outro lado, alguns metabólitos derivados diretamente da glutatona poderiam estar envolvidos na revelação de aromas de mercaptanos, como mercaptohexanol e mercaptopentanona, em vinhos Sauvignon Blanc (ROLAND et al., 2011), ou seja, a glutatona pode ser um precursor de alguns aromas varietais. A GSH pode levar à redução das associações  $\alpha$ -quinonas e outros tióis, pois compete pelas  $\alpha$ -quinonas, dessa forma leva a um aumento de aromas relacionados aos compostos tióis e seus derivados no vinho (FRACASSETTI et al., 2011).

No caso das variedades aromáticas, a glutatona parece limitar a redução de ésteres voláteis (acetato de isoamila, hexanoato de etila) e terpenos (linalol) durante o armazenamento (ROUSSIS et al., 2007; PAPADOUPOULOU; ROUSSIS, 2008) e no caso específico de vinhos Sauvignon Blanc no armazenamento em garrafa, exercer proteção sobre os tióis voláteis, 4-metil-4-mercaptopentanona e 3-mercaptohexanol (DUBOURDIEU; LAVIGNE-CRUEGE, 2004).

### Prevenção do escurecimento oxidativo

Vários estudos comprovam a ação da glutatona na prevenção da oxidação (VAIMAKIS; ROUSSIS, 1996; MAGGU et al., 2007; HOSRY et al., 2009; SONNI et al., 2011). Hosry et al. (2009) avaliaram a susceptibilidade ao escurecimento e o grau de oxidação de vinhos brancos adicionados de diferentes teores de glutatona e mantidos sob oxidação acelerada (8 dias a 55°C). Concluíram que a estabilidade destes vinhos pode ser realçada pela adição de glutatona e sugerem a sua adição no momento do engarrafamento a fim de prevenir o envelhecimento atípico do vinho.

Vaimakis e Roussis (1996) estudaram a oxigenação do mosto e a adição de glutatona a fim de avaliar as mudanças na composição fenólica, na coloração e nos aromas típicos. Concluíram que a oxigenação do mosto fornece vinhos brancos de baixo conteúdo fenólico, cor agradável e

baixa capacidade de escurecimento, porém com poucas características aromáticas e frutadas. Quando a oxigenação do mosto foi maior, a magnitude dos efeitos acima descritos também aumentou. Segundo este estudo, a adição de glutatona juntamente com a oxigenação do mosto resulta em vinhos brancos de cor estável e típica da variedade da uva utilizada. Entretanto a correta dose de oxigenação e a quantidade de glutatona não foram determinadas.

A extração, tanto de aromas varietais, de polifenóis como de glutatona, varia dependendo dos processos anteriores à fabricação do vinho, tais como: o tempo de contato com a casca e a quantidade de pressão aplicada durante a prensagem da uva. Um estudo realizado por Maggu et al. (2007) avaliou esses fatores nos níveis de glutatona, aromas varietais e compostos fenólicos de suco da uva de Sauvignon Blanc. Foi concluído que, quando as uvas são prensadas sob pressões mais elevadas e quando o suco é submetido a maior tempo de contato com as cascas, as quantidades de compostos do aroma varietal são maiores, porém a quantidade de glutatona é menor e a de compostos fenólicos oxidáveis, maior. Sendo assim, nessas condições, foi observado um aumento claro no potencial oxidativo do suco, o que pode modificar a coloração do mosto ou do vinho e levar a uma perda de aromas varietais.

O estudo realizado por Sonni et al. (2011), em um vinho branco modelo, confirma esses resultados e relaciona o efeito antioxidante da glutatona e do ácido ascórbico evidenciado através da prevenção ao escurecimento com a estabilidade de compostos fenólicos como (+)-catequina, ácido cafeico e outros compostos envolvidos na reação de escurecimento oxidativo. Entretanto, este estudo demonstra que em altas concentrações de glutatona (860 mg L<sup>-1</sup>), esta proteção pode ocorrer apenas inicialmente, mas eventualmente pode induzir a formação de pigmentos escuros. No período durante o qual a glutatona ofereceu um efeito protetor, a produção dos precursores do pigmento xantiliun e de  $\alpha$ -quinona derivada de compostos fenólicos foi limitada. Quando a glutatona induziu a coloração, pigmentos poliméricos foram formados, mas estes foram diferentes daqueles encontrados no vinho modelo sem adição de glutatona. Na presença de ácido ascórbico, altas concentrações de glutatona foram capazes de retardar a redução do ácido ascórbico e inibir a reação dos produtos da degradação do ácido ascórbico com o flavanol do vinho (+)-catequina. Entretanto, ao se esgotar, a glutatona novamente induz a produção de uma grande variedade de pigmentos poliméricos diferentes.

## Conclusão

Diversos estudos demonstram que a presença da glutatona em mostos e vinhos resulta em benefícios na preservação aromática e cor de vinhos brancos em diversos estudos. Sua ação antioxidante bloqueia o processo oxidativo e por isso contribui para manutenção da qualidade dos vinhos envelhecidos ou armazenados por longos períodos. Portanto, a adição de glutatona aos vinhos parece ser uma alternativa promissora. Atualmente, a glutatona é vendida comercialmente em misturas de produtos enológicos para serem adicionadas, antes ou durante a fermentação alcoólica. Porém, a maioria dos estudos que tratam sobre seu efeito na preservação aromática sugere sua adição no engarrafamento. Neste sentido, estudos complementares estão sendo realizados a fim de elucidar a melhor quantidade de glutatona a ser adicionada e o melhor momento para sua adição, tanto do ponto de vista qualitativo como econômico.

## Agradecimentos

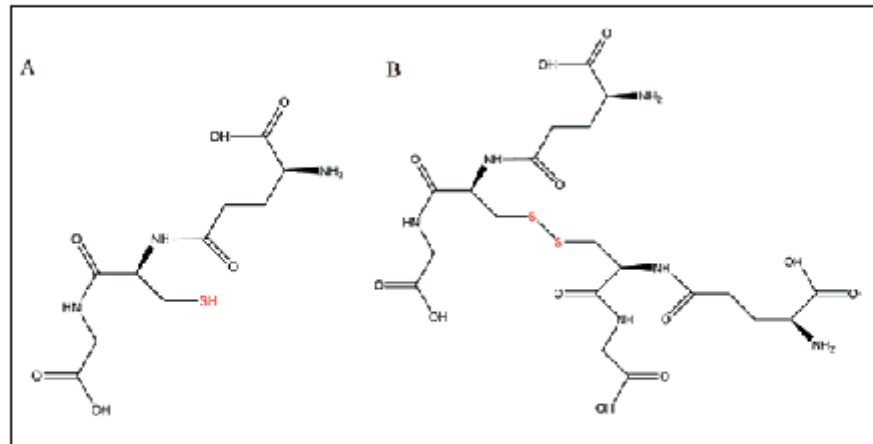
Ao CNPq, à Fapergs e à Vinícola Piagentini Ltda. pelo suporte financeiro nas pesquisas.

## Referências

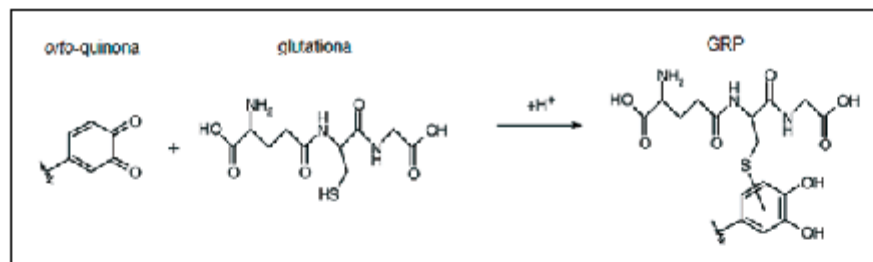
- ADAMS, D. O.; LIYANAGE, C. Glutathione increases in grape berries at the onset of ripening. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 44, p. 333-338, 1993.
- BOWYER, P. K.; MURAT, M-L.; MOINE-LEDOUX, V. **Maximizing aroma preservation in white and rosé wines**, 2010. Disponível em: [http://www.vinestovintages.ca/LaffortHelpfulHints/Maximising%20Aroma%20Preservation%20\(white%20&%20rose\).pdf](http://www.vinestovintages.ca/LaffortHelpfulHints/Maximising%20Aroma%20Preservation%20(white%20&%20rose).pdf). Acesso em: 07 abr. 2012.
- CASASSA, F. Glutathión, ácido ascórbico y SO<sub>2</sub>: viejos conocidos, nuevos conceptos. **Wine Making Update – Revista Enología**, p. 1-6, 2009. Disponível em: [http://www.revistaenologia.com/include/leer\\_pdf.php?id=360](http://www.revistaenologia.com/include/leer_pdf.php?id=360). Acesso em: 09 abr. 2012.
- CHEYNIER, V.; SOUQUET, J. M.; MOUTOUNET, M. Glutathione content and glutathione to hydroxycinnamic acid ratio in *Vitis vinifera* grapes and musts. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 40, p. 320-324, 1989.
- CILLIERS, J. J. L.; SINGLETON, V. L. Caffeic acid autoxidation and the effects of thiols. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 38, p. 1789-1796, 1990.
- DANILEWICZ, J. C.; SECCOMBE, J. T.; WHELAN, J. Mechanism of interaction of polyphenols, oxygen, and sulfur dioxide in model wine and wine. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 59, p. 128-135, 2008.
- DU TOIT, W. J.; LISJAK, K.; STANDER, M.; PREVOO, D. Using LC-MSMS to assess glutathione levels in South African white grape juices and wines made with different levels of oxygen. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, p. 2765-2769, 2007.
- DU TOIT, W. J.; MARAIS, J.; PRETORIUS, I. S.; DU TOIT, M. Oxygen in must and wine – A review. **South African Journal of Enology and Viticulture**, v. 27, p. 76-94, 2006.
- DUBOURDIEU, D.; LAVIGNE-CRUEGE, V. The role of glutathione on the aromatic evolution of dry white wine. **Wine Internet Technical Journal**, v. 2, p.1-9, 2004. Disponível em: <http://www.infowine.com/default.asp?scheda=1148>. Acesso em: 22 mar. 2012.
- ESCUADERO, A.; ASENSIO, E.; CACHO, J.; FERREIRA, V. Sensory and chemical changes of young wines stored under oxygen. An assessment of the role played by aldehydes and some other important odorants. **Food Chemistry**, v. 77, p. 325-331, 2002.
- ESCUADERO, A.; HERNÁNDEZ-ORTE, P.; CACHO, J.; FERREIRA, V. Clues about the role of methional as character impact odorant of some oxidized wines. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, p. 4268-4272, 2000.
- FERNÁNDEZ-ZURBANO, P.; FERREIRA, V.; PEÑA, C.; ESCUDERO, A.; SERRANO, F.; CACHO, J. Prediction of oxidative browning in white wines as a function of their chemical composition. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 43, p. 2813-2817, 1995.
- FERREIRA, A. C. S.; OLIVEIRA, C.; HOGG, T.; PINHO, P. G. de. Relationship between potentiometric measurements, sensorial analysis, and some substances responsible for aroma degradation of white wines. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 4668-4672, 2003.
- FERREIRA, A. C. S.; PINHO, P. G. de; RODRIGUES, P.; HOGG, T. Kinetics of oxidative degradation of white wines and how they are affected by selected technological parameters. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 5919-5924, 2002.
- FRACASSETTI, D.; LAWRENCE, N.; TREDoux, A. G. J.; TIRELLI, A.; HIEUWOUTD, H. H.; DU TOIT, W. J. Quantification of glutathione, catechin and caffeic acid in grape juice and wine by a novel ultra-performance liquid chromatography method. **Food Chemistry**, v. 128, p. 1136-1142, 2011.

- FRIEDMAN, M. Improvement in the safety of foods by SH-containing amino acids and peptides. A Review. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 42, p. 3-20, 1994.
- HOENICKE, K.; SIMAT, T. J.; STEINHART, H.; CHRISTOPH, N.; GEBNER, M.; KÖHLER, H.-J. Untypical aging off-flavor' in wine: formation of 2-aminoacetophenone and evaluation of its influencing factors. **Analytica Chimica Acta**, v. 458, p. 29-37, 2002.
- HOSRY, L.; AUEZOVA, L.; SAKR, A.; HAJJ-MOUSSA, E. Browning susceptibility of white wine and antioxidant effect of glutathione. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 44, p. 2459-2463, 2009.
- JANES, L.; LISJAK, K.; VANZO, A. Determination of glutathione content in grape juice and wine by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. **Analytica Chimica Acta**, v. 674, p. 239-242, 2010.
- LALLEMAND. Levadura inactiva específica enriquecida en glutatión. **Lallemand winemaking update**. n. 2, 2011, 2 p. Disponível em: <http://www.proenol.com/files/editorials/WUP%202%20-%202011%20-%20OMW%20-%20SP.pdf?u=>. Acesso em: 22 mar. 2012.
- LAVIGNE, V.; PONS, A.; DARRIET, P.; DUBOURDIEU, D. Changes in the sotolon content of dry white wines during barrel and bottle aging. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, p. 2688-2693, 2008.
- LAVIGNE, V.; PONS, A.; DUBOURDIEU, D. Assay of glutathione in must and wines using a capillary electrophoresis and laser-induced fluorescence detection: changes in concentration in dry white wines during alcoholic fermentation and aging. **Journal of Chromatography A**, v. 1139, p. 130-135, 2007.
- LI, H.; GUO, A.; WANG, H. Mechanisms of oxidative browning of wine. **Food Chemistry**, v. 108, p. 1-13, 2008.
- MAGGU, M.; WINZ, R.; KILMARTIN, P.; TROUGHT, M. C. T.; NICOLAU, L. Effect of skin contact and pressure on the composition of Sauvignon Blanc must. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, p. 10281-10288, 2007.
- MARCHAND, S.; REVEL, G. A HPLC fluorescence-based method for glutathione derivatives quantification in must and wine. **Analytica Chimica Acta**, v. 660, p. 158-163, 2010.
- NOCTOR, G.; FOYER, C. H. Simultaneous measurement of foliar glutathione,  $\gamma$ -glutamylcysteine, and amino acids by high-performance liquid chromatography: comparison with two other assay methods for glutathione. **Analytical Biochemistry**, v. 264, p. 98-110, 1998.
- ORGANIZATION International de la Vigne et du Vin. CIV SECUAL 2010. **Utilisation du glutathion en œnologie (Dossier toxicologique et éléments de sécurité alimentaire)**, 2010, 17 p.
- PAPADOPOULOU, D.; ROUSSIS, I. G. Inhibition of the decrease of volatile esters and terpenes during storage of a white wine and a model wine medium by glutathione and N-acetylcysteine. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 43, p. 1053-1057, 2008.
- RIBÉREAU-GAYON, P.; GLORIES, Y.; MAUJEAN, A.; DUBOURDIEU, D. **Tratado de enología: química del vino: estabilización y tratamientos**, 1ª Ed. – Buenos Aires: Hemisferio Sur, v. 2, 2003. 537 p.
- RIGAUD, J.; CHEYNIER, V.; SOUQUET, I. M.; MOUTOUNET, M. Influence of must composition on phenolic oxidation kinetics. **Journal of Science of Food and Agriculture**, v. 57, p. 55-63, 1991.
- ROLAND, A.; SHNEIDER, R.; RAZUNGLES, A.; CAVELIER, F. Varietal thiols in wine: discovery, analysis and applications. **Chemical Review**, n. 111, p. 7355-7376, 2011.
- 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.
- ROUSSIS, I. G.; SERGIANITIS, S. Protection of some aroma volatiles in a model wine medium by sulphur dioxide and mixtures of glutathione with caffeic acid or gallic acid. **Flavor and Fragrance Journal**, v. 23, p. 35-39, 2008.
- SHNEIDER, V. O envelhecimento atípico dos vinhos brancos. **Revista Internet de Viticultura e Enologia**, p.1-8, 2007. Disponível em: [www.infowine.com](http://www.infowine.com). Acesso 15 fev. 2012.
- SINGLETON, V. L.; SALGUES, M.; ZAYA, J.; TROUSDALE, E. Catearic acid disappearance and conversion to products of enzymic oxidation in grape must and wine. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 36, p. 50-56, 1985.
- SIOUMIS, N.; KALLITHRAKA, S.; MAKRIS, D. P.; KEFALAS, P. Kinetics of browning onset in white wines: influence of principal redox-active polyphenols and impact on the reducing capacity. **Food Chemistry**, v. 94, p. 98-104, 2006.
- 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. 59, p. 3940-3949, 2011.
- 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.

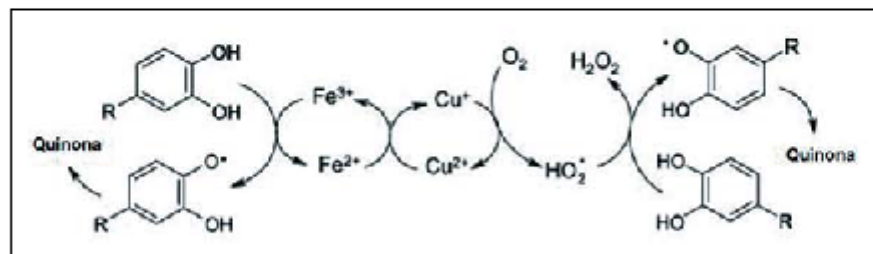




**Figura 1.** Estrutura química das moléculas de glutatona reduzida (A) com a presença do grupo sulfídrico e glutatona oxidada (B) com a presença da ponte dissulfeto.



**Figura 2.** Reação da glutatona com compostos de *orto*-quinona (o local da adição depende do tipo de composto fenólico envolvido) (SONNI et al., 2011).



**Figura 3.** Ação catalítica de ferro e cobre na oxidação de fenóis para produzir quinonas e peróxido de hidrogênio (DANILEWICZ et al., 2008).

## **4.2. CAPÍTULO 2 - Efeito da adição de glutathione em vinhos espumantes**

Artigo publicado na *Food Chemistry*



## Effect of glutathione addition in sparkling wine



Vanessa Webber<sup>a,\*</sup>, Sandra Valduga Dutra<sup>b</sup>, Fernanda Rodrigues Spinelli<sup>b</sup>, Ângela Rossi Marcon<sup>a</sup>, Gilberto João Carnieli<sup>b</sup>, Regina Vanderlinde<sup>a,b</sup>

<sup>a</sup>University of Caxias do Sul, Francisco Getúlio Vargas, 1130, 95070-560 Caxias do Sul, RS, Brazil

<sup>b</sup>Reference Laboratory of Enology, Brazilian Wine Institute – IBRAVIN, Avenida da Vindima, 1855, Exposição, 95054-470 Caxias do Sul, Brazil

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 2 January 2014

Received in revised form 3 March 2014

Accepted 8 March 2014

Available online 17 March 2014

#### Keywords:

Glutathione

Sparkling wine

Aroma compounds

Phenolic compounds

Antioxidant

Browning

### ABSTRACT

This study aims to evaluate the effect of the addition of glutathione (GSH) on secondary aromas and on the phenolic compounds of sparkling wine elaborated by traditional method. It was added 10 and 20 mg L<sup>-1</sup> of GSH to must and to base wine. The determination of aroma compounds was performed by gas chromatography. Phenolic compounds and glutathione content were analyzed by high performance liquid chromatography. Sparkling wines with addition of GSH to must showed lower levels of total phenolic compounds and hydroxycinnamic acids. Furthermore, the sparkling wine with addition of GSH to must showed higher levels of 2-phenylethanol, 3-methyl-1-butanol and diethyl succinate, and lower concentrations of ethyl decanoate, octanoic and decanoic acids. The GSH addition to the must show a greater influence on sparkling wine than to base wine, however GSH addition to base wine seems retain higher SO<sub>2</sub> free levels. The concentration of GSH added showed no significant difference.

© 2014 Elsevier Ltd. All rights reserved.

### 1. Introduction

Glutathione (GSH) is a tripeptide composed by glutamic acid, cysteine and glycine, and it's naturally present in many plants and food (Meister, 1988). The thiol group of the cysteine is the site active responsible for its biochemical properties to prevent the oxidation of wine (Lavigne, Pons, & Dubourdieu, 2007; Meister, 1988). GSH in must and wine exerts a protective effect on many desirable wine aromas, limits the formation of off-flavours (Kritzinger, 2012; Lavigne et al., 2007; Roussis & Sergianitis, 2008) and the formation of browning pigments to a certain extent (Hosry, Auezova, Sakr, & Hajj-Moussa, 2009; Kritzinger, 2012; Sonni, Clark, Prenzler, Riponi, & Scollary, 2011a; Vaimakis & Roussis, 1996).

The glutathione may be present in wine in the reduced form (GSH) or dimeric/disulfide form (GSSG). The pH of the wine promotes that the glutathione remains in its reduced form, the presence of GSSG wine must be considered and studied. According to Marchand and de Revel (2010), total glutathione of wine is a better indicator of its antioxidant potential than just reduced glutathione.

The GSH is an important metabolite for the yeast multiplication during fermentation and it is a potential source of nitrogen and

sulfur. It is involved in many mechanisms of stress response of *Saccharomyces cerevisiae* and it may also play a role in the maintenance of basic cell functions such as cell structural integrity (Penninckx, 2002). The final concentration of GSH in wine may be influenced by the metabolism of the yeast *S. cerevisiae* during alcoholic fermentation. It is suggested that GSH, being an intracellular compound, is released upon yeast autolysis and can be taken up from the extracellular environment to the cell (Kritzinger, 2012).

Many aroma compounds found in wine do not come from the grapes, but they are formed during the alcoholic fermentation due to the primary (essential) or secondary yeast metabolism (Styger, Prior, & Bauer, 2011). Beyond the ethanol, glycerol, diols and higher alcohols numerous other compounds are formed through yeast metabolism, especially acids, esters, aldehydes, ketones, and sulfur compounds (Rapp & Versini, 1995). The role of GSH in the formation of higher alcohols, acids, esters and acetates was not studied in sparkling wine.

The GSH is known to prevent the browning of white wine (Hosry et al., 2009; Sonni et al., 2011a; Vaimakis & Roussis, 1996). In the enzymatic browning, the main substrates for oxidases enzymes are the ones derived from hydroxycinnamic acids, such as caffeic acid and coumaric acid (Singleton, Salgues, Zaya, & Trousdale, 1985). The *o*-diphenols, mainly caffeic acid and its esters, catechin, epicatechin, anthocyanins and their derivatives, and gallic acid, are considered the most susceptible to oxidation in the process of non-enzymatic browning of most white wine (Fernández-Zurbano et al., 1995).

\* Corresponding author. Address: University of Caxias do Sul (UCS), Institute of Biotechnology, Secretaria de Pós-graduação em Biotecnologia, Francisco Getúlio Vargas, 1130, Caxias do Sul, RS, Brazil. Tel.: +55 54 99511005; fax: +55 54 32098064.

E-mail address: [vwebber@ucs.br](mailto:vwebber@ucs.br) (V. Webber).



The addition of GSH could permit the use of lower doses of sulfur dioxide (SO<sub>2</sub>) in wine, and provide greater protection against important aroma compounds compared to SO<sub>2</sub> (Roussis & Sergianitis, 2008). Despite SO<sub>2</sub> is very effective in protecting wine from oxidation and from antimicrobial spoilage, there is a growing trend that its use in wine is reduced, because its allergenic properties and health implications (Fracassetti, Coetzee, Vanzo, Ballabio, & du Toit, 2013). As the SO<sub>2</sub>, GSH can also bind to aldehyde compounds (Sonni et al., 2011b). Moreover, GSH can undergo addition reactions with *o*-quinone compound from the oxidation of the tartaric acid esters of hydroxycinnamic acids, converting it back to its reduced form or forming less reactive phenolic compounds, as the glutathionyl-caftaric acid (Cheynier, Souquet, & Moutounet, 1989). GSH and SO<sub>2</sub> could present a synergistic effect in increasing the oxygen consumption rate (Fracassetti et al., 2013).

Some suppliers of enological products (Laffort – www.laffort.com and Lallemend – www.lallemendwine.com) offer mixtures of nutrients for yeast containing GSH in order to preserve and enhance the aroma formed. However, the GSH addition to the must or wine is currently being discussed. Nowadays, studies about the effects of the addition of GSH are mainly related to oxidation protection of still wine, but little attention has been paid to the effect of the presence of GSH during alcoholic fermentation. Therefore, the aim of this study was to evaluate the effect of adding different concentrations of GSH before each fermentation of sparkling wine elaborated by traditional method.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Must

The sparkling wine was elaborated by the traditional method with cv Chardonnay (60%) and Pinot Noir (40%) grapes from South of Brazil, Rio Grande do Sul State, vintage 2011. It was added to the must 50 mg L<sup>-1</sup> metabisulfite, 100 mg L<sup>-1</sup> of gallic tannins, 30 mg L<sup>-1</sup> pectinolytic enzyme and L-glutathione reduced (GSH, Sigma–Aldrich) at variables concentrations according to the experimental design, item 2.4. For must clarification it was used 300 mg L<sup>-1</sup> of activated charcoal, 100 mg L<sup>-1</sup> of gelatin and 30 mg L<sup>-1</sup> of silica.

### 2.2. Base wine elaboration

For the base wine it was used 300 mg L<sup>-1</sup> of *S. cerevisiae* var. *bayanus* yeast strain (Spark, Laffort). It was added to the base wine 400 mg L<sup>-1</sup> of nutrient (composed of yeasts cell walls, cellulose support and yeasts inert), 300 mg L<sup>-1</sup> of ammonium phosphate containing nutrient and thiamine, 300 mg L<sup>-1</sup> of ammonium phosphate and L-glutathione reduced at variables concentrations according to the experimental design, item 2.4. The fermentation temperature was 13–15 °C. The wine base was clarified with bentonite addition. After the first fermentation the wine base was kept into closed tanks of 50 liters full, at 0 °C until bottling.

### 2.3. Sparkling wine elaboration

To the base wine it was added 26 g L<sup>-1</sup> of sugar and the same nutrients added to the must in the first fermentation. The wine base was bottled and it was added 300 mg L<sup>-1</sup> of yeast, which was the same as in the first fermentation. The bottles were closed with plastic lid (bidule) and overcap metal. Sparkling wine was kept for nine months in contact with the lees at temperature of approximately 18 °C in the dark. Soon after the *degorgement*, analyzes of aroma compounds, phenolic compounds, glutathione residual, free SO<sub>2</sub>, color index and sensory analysis were performed.

### 2.4. Experimental design

It was added 10 and 20 mg L<sup>-1</sup> of GSH (L-glutathione reduced, purity ≥98.0%, from Sigma–Aldrich) to the must before the first fermentation and to the base wine before the second fermentation. The experiment was conducted as factorial design 3<sup>2</sup>, resulting in nine experimental sparkling wine, as shown in the Table 1.

Each experiment was performed in 3 bottles and the analysis were performed in triplicate for each bottle. The results were analyzed using analysis of variance (ANOVA) and mean test of Turkey at a confidence level of 95%.

The results of the analysis of GSH (reduced and total) and the results of volatile and phenolic compounds were evaluated for degree of correlation by Pearson's correlation coefficient. The Pearson's correlation coefficient can vary between -1 and 1, values between 0 and 1 show a positive correlation and values between 0 and -1 show a negative correlation. Values above 0.7 (positive or negative) features a strong correlation, values between 0.3 and 0.7 features a moderate correlation and values below 0.3 features a weak correlation.

### 2.5. Volatile compounds

The analysis of volatile compounds such as esters and higher alcohols was performed on a gas chromatograph HP 6890 Agilent Technologies, with flame ionization detector. The compounds were identified from comparison to authentic standards from Sigma–Aldrich.

#### 2.5.1. Determination of higher alcohols, acetaldehyde, ethyl acetate, and methanol

It was added 70 µL of 4-methyl-2-pentanol solution (5 g L<sup>-1</sup>, internal standard) into 5 mL of a distilled sample. The injection (1.0 µL) was performed in split mode to 60 mL min<sup>-1</sup> at 220 °C. It was used a capillary column CPWax 57CB (60 m, 250 µm and 0.25 µm). The carrier gas was the hydrogen 5.0 at 2.0 mL min<sup>-1</sup> and the nitrogen as auxiliary gas at 37 mL min<sup>-1</sup>. The oven temperature was 40 °C for 5 min, 40–90 °C at 3 °C min<sup>-1</sup>, 90–200 °C at 10 °C min<sup>-1</sup>, 200 °C for 5 min. The combustion was maintained with synthetic air at 350 mL min<sup>-1</sup> and hydrogen at 35 mL min<sup>-1</sup>. The detector temperature was 230 °C.

#### 2.5.2. Determination of esters, acetates, alcohols, and volatile acids

It was added 2 mL of 3-octanol (40 mg L<sup>-1</sup>) and 2 mL of heptanoic acid (50 mg L<sup>-1</sup>), as internal standards, and 0.3 mL of phosphoric acid (1:3) to 50 mL of sparkling wine degassed in ultrasound. The sample was subjected to three liquid/liquid row extractions (4:2:2) with a mixture of diethyl ether/n-hexane (1:1). The injection (2.0 µL) was performed in splitless mode at 60 mL min<sup>-1</sup> at 240 °C. It was used a capillary column CP Inowax (30 m, 250 µm e 0.25 µm). The carrier gas was the hydrogen 5.0 at 2.0 mL min<sup>-1</sup> and the nitrogen as auxiliary gas at 37 mL min<sup>-1</sup>. The oven temperature was 40 °C for 5 min; 40–230 °C at 3 °C min<sup>-1</sup>; 230 °C for 20 min. The combustion was maintained with synthetic air flow at 350 mL min<sup>-1</sup>, and hydrogen at 35 mL min<sup>-1</sup>. The detector temperature was 230 °C.

### 2.6. Analysis of phenolic compounds

The determination of caffeic, ferulic, *p*-coumaric acids, catechin and epicatechin was performed by High Performance Liquid Chromatography according to the methodology of Gómez-Alonso, García-Romero, and Hermosín-Gutiérrez (2007). It was used an Agilent Technologies chromatograph equipped with spectrophotometric diode array detector and Zorbax® SB-C-18 (250 mm × 4.6 mm, 5 µm). The chromatograms were obtained at 320 nm for the



**Table 1**  
Experimental design 3<sup>2</sup>.

Experiment	Coded variables		Real variables	
	X1	X2	GSH must (mg L <sup>-1</sup> )	GSH wine base (mg L <sup>-1</sup> )
1 (control)	-1	-1	0	0
2	-1	0	0	10
3	-1	1	0	20
4	0	-1	10	0
5	0	0	10	10
6	0	1	10	20
7	1	-1	20	0
8	1	0	20	10
9	1	1	20	20

phenolic acids and 280 nm for the catechin and epicatechin. These phenolic compounds were identified from comparison to authentic standards from Sigma–Aldrich.

All samples were filtered with membrane of ester mixture 0.45 µm, and 10 µL was injected to the chromatograph. The mobile phase was composed by the following solvents: Solvent A, 50 mM NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH adjusted to 2.6; solvent B 20% solvent A and 80% acetonitrile; and solvent C, 200 mM H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, pH 1.5. The mobile phase was vacuum filtered with membrane 0.45 µm. The flow rate was constant at 1 mL min<sup>-1</sup> and the gradient of the solvents used for separation is described by Gómez-Alonso et al. (2007).

### 2.7. Determination of total phenolic compounds and color index

The phenolic compounds were determined by the measurement of UV absorption at a wavelength of 280 nm after the dilution of the samples in distilled water, and the color index at the absorbance of 420 nm (Ribéreau-Gayon, Dubourdieu, Donèche, & Louvain, 2003).

### 2.8. Determination of glutathione

The determination of glutathione was performed using the adapted methodology from Andujar-Ortiz, Pozo-Bayón, Moreno-Arribas, Martín-Álvarez, and Rodríguez Bencomo (2012). For sample derivatization it was used two solutions of dithiothreitol (DTT, Sigma–Aldrich) dissolved in borate buffer solution and naphthalene-2,3-dicarboxaldehyde (NDA, Sigma–Aldrich) solution dissolved in ethanol (stored at -18 °C). NDA was dissolved in absolute ethanol to a final concentration of 5 mg mL<sup>-1</sup>. DTT solutions were prepared at concentrations of 5 mM and 0.5 mM in borate buffer to determine the level of total glutathione or reduced glutathione, respectively. The borate buffer was prepared with H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> (0.2 M), adjusting the pH to 9.2 with NaOH solution (1N). The two solutions were filtered, stored in 1 ml vials and kept frozen at -20 °C.

The derivatization was made using an autosampler as the following: 20 µL of sample was placed in a 1 ml vial, to this it was added 70 µL of DTT solution and 10 µL of NDA solution. After that, 100 µL of the mixture was injected into the chromatograph.

The determination of GSH was performed on a liquid chromatograph HP 1100 from Agilent Technologies. We used a Zorbax<sup>®</sup> SB-C-18 (250 mm × 4.6 mm, 5 µm) and a guard column Zorbax<sup>®</sup> ODS 4-pack (12.5 mm × 4.6 mm, 5 µm). The mobile phase was a solution of methanol and phosphate buffer 15:85 (v:v). The phosphate buffer was composed of Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O (10 mM) in ultrapure water, pH adjusted to 7.5 using orthophosphoric acid solution. The mobile phase was vacuum filtered with membrane 0.45 µm. The wavelengths used for excitation and emission were 467 and

525 nm, respectively. The glutathione were identified from comparison to authentic standard from Sigma–Aldrich.

## 3. Results and discussion

### 3.1. Influence of GSH addition on volatile composition

The volatile compounds of the sparkling wines are shown in the Table 2. The sparkling wine with addition of GSH to the must showed lower concentrations of acetaldehyde. The acetaldehyde is formed during the fermentation as a residual product from the primary metabolism of yeast, or is formed by microbial oxidation of ethanol under aerobic conditions (Sonni et al., 2011b). The GSH present in the must may have facilitated its reduction to ethanol, because GSH may have favored a more reducing environment. The concentration of acetaldehyde can also be affected by the metabolism of lactic acid bacteria, because some species, especially *Oenococcus oeni*, can catabolize this compound resulting in the formation of ethanol and ethyl acetate. At low concentration, acetaldehyde gives pleasant fruity aroma to wine, but at high concentration, the aroma became an unpleasant vegetative one reminding green grass or apple (Liu & Piloni, 2000).

Acetaldehyde is extremely reactive and readily binds to proteins or amino acids to generate a range of compounds that interfere in wine flavor and aroma (Styger et al., 2011). GSH added to the must may have prevented ethanol oxidation or it may have reacted with acetaldehyde during alcoholic fermentation, forming an addition product, retarding the formation of tannins and consequently the formation of dark yellow pigments (Sonni et al., 2011b). However, there was no difference in the amount of catechins and epicatechins in the sparkling wine in this study (Table 3).

The addition of GSH did not interfere in the sparkling wine's methanol concentrations, because the methanol comes from the hydrolysis of grape pectins during fermentation and their level depends on the maceration with the grape's solid parts, and on the contact time of these pectins with the enzymes polymethyl esterases (Ribéreau-Gayon et al., 2003).

The addition of GSH did not influence in the concentrations of the hexanol, cis-3-hexen-1-ol and trans-3-hexen-1-ol and hexyl acetate, because they are derived from de grape and they are precursors of the hexyl acetate which also showed no variation. However, the concentration of 2-phenylethanol increased when GSH was added to the must, regardless the GSH concentration. The GSH addition to the base wine did not alter the levels of this compound. The 2-phenylethanol smells like roses and its threshold perception is 14 mg L<sup>-1</sup> (Santos et al., 2004). The sparkling wine without GSH addition to the must, the concentration of 2-phenylethanol was less than 14 mg L<sup>-1</sup>. The GSH addition to the must provided a reduced environment; therefore greater amount of phenylacetaldehyde may have been reduced to phenylethanol by the action of alcohol dehydrogenase enzyme (Etschmann, Bluemke, Sell, & Schrader, 2002).

In general, the level of higher alcohols (1-propanol, 2-methyl-1-propanol, 2-methyl-1-butanol and 3-methyl-1-butanol) was lower in the sparkling wine without addition of GSH to the must. The addition of GSH to the base wine showed no significant difference. The concentration of higher alcohols in the wine can be determined by amino acids composition, which represent a major source of must assimilable nitrogen (Rapp & Versini, 1995). Although GSH is a tripeptide composed of three amino acids and it has nitrogen in its composition, the concentration of GSH added to the must and/or to the base wine should not have affected the amount of available nitrogen in the must, because the studies about must supplementation use much larger amounts of nitrogen, ranging around 350–480 mg L<sup>-1</sup> (Torrea et al., 2011; Vilanova,



**Table 2**  
Volatiles composition of sparkling wine – experiments 1–9.

Compound (mg.L <sup>-1</sup> )	Experiment								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Acetaldehyde	70.54 a ± 1.26	71.48 a ± 1.00	72.19 a ± 2.81	55.25 c ± 0.89	55.70 c ± 1.84	60.93 b ± 2.09	58.62 bc ± 2.43	57.52 bc ± 0.33	59.22 bc ± 1.14
Alcohols									
Methanol	27.37 a ± 3.78	31.46 a ± 4.29	26.03 a ± 2.47	29.72 a ± 3.44	30.86 a ± 5.02	30.33 a ± 2.11	26.69 a ± 1.68	31.15 a ± 2.05	30.24 a ± 3.50
Hexanol	1.188 a ± 0.16	1.173 a ± 0.13	1.247 a ± 0.09	1.247 a ± 0.16	1.236 a ± 0.14	1.322 a ± 0.20	1.158 a ± 0.18	1.201 a ± 0.13	1.225 a ± 0.20
Cis-3-hexen-1-ol	0.023 a ± 0.01	0.024 a ± 0.01	0.025 a ± 0.01	0.034 a ± 0.01	0.030 a ± 0.01	0.344 a ± 0.01	0.025 a ± 0.01	0.030 a ± 0.01	0.031 a ± 0.01
Trans-3-hexen-1-ol	0.087 a ± 0.01	0.086 a ± 0.01	0.091 a ± 0.01	0.104 a ± 0.01	0.105 a ± 0.01	0.113 a ± 0.02	0.096 a ± 0.01	0.100 a ± 0.01	0.106 a ± 0.02
2-phenylethanol	12.49 bc ± 1.30	12.56 bc ± 1.67	12.29 c ± 1.11	19.79 a ± 1.75	20.70 a ± 2.42	19.00 a ± 3.28	17.12 ab ± 2.28	17.76 a ± 2.24	17.46 a ± 2.98
1-propanol	64.35 b ± 2.85	68.50 ab ± 1.08	64.61 b ± 3.34	68.89 ab ± 1.90	73.82 a ± 2.09	69.12 ab ± 0.58	68.62 ab ± 8.82	69.03 ab ± 1.37	69.87 ab ± 1.05
2-methyl-1-propanol	12.55 b ± 1.94	14.79 ab ± 0.50	14.12 ab ± 1.64	14.34 ab ± 1.78	16.42 a ± 1.99	15.33 ab ± 0.51	16.03 a ± 0.74	15.19 ab ± 1.56	15.92 ab ± 1.17
2-methyl-1-butanol	12.52 ab ± 2.54	11.36 b ± 0.90	12.02 ab ± 1.53	13.36 ab ± 0.72	15.19 ab ± 2.02	14.08 ab ± 1.32	14.55 ab ± 2.43	14.55 ab ± 1.61	16.01 a ± 1.01
3-methyl-1-butanol	148.13 b ± 1.98	148.86 b ± 0.72	146.86 b ± 2.15	157.21 a ± 2.36	156.64 a ± 4.38	156.82 a ± 1.19	155.57 a ± 2.36	157.64 a ± 1.46	156.04 a ± 1.94
Sum higher alcohols <sup>a</sup>	237.55 c ± 3.75	243.51 bc ± 0.81	237.61 c ± 6.61	253.80 ab ± 3.88	262.06 a ± 8.32	255.35 ab ± 1.37	254.79 ab ± 13.29	256.41 ab ± 2.20	257.84 ab ± 4.23
Esters									
Diethyl succinate	2.477 b ± 0.24	2.644 b ± 0.41	2.443 b ± 0.32	4.197 a ± 0.28	4.013 a ± 0.36	4.375 a ± 0.70	4.351 a ± 0.55	4.414 a ± 0.38	3.806 a ± 0.65
Isoamyl acetate	0.891 a ± 0.02	0.824 a ± 0.11	0.905 a ± 0.04	0.491 b ± 0.02	0.504 b ± 0.02	0.795 a ± 0.04	0.576 b ± 0.03	0.599 b ± 0.15	0.815 a ± 0.05
Hexyl acetate	0.101 a ± 0.001	0.097 a ± 0.010	0.101 a ± 0.003	0.073 a ± 0.002	0.076 a ± 0.001	0.086 a ± 0.003	0.081 a ± 0.003	0.080 a ± 0.010	0.089 a ± 0.011
Ethyl acetate	47.65 abc ± 4.11	49.71 a ± 4.89	45.15 abc ± 3.85	33.25 d ± 8.23	38.95 bcd ± 0.90	48.36 ab ± 3.00	37.510c ± 4.75	39.33 abcd ± 2.54	47.67 abc ± 4.52
Phenylethyl acetate	0.056 a ± 0.003	0.052 a ± 0.009	0.059 a ± 0.005	0.049 a ± 0.005	0.050 a ± 0.002	0.053 a ± 0.001	0.044 a ± 0.008	0.044 a ± 0.008	0.058 a ± 0.004
Ethyl butyrate	0.382 ab ± 0.03	0.386 ab ± 0.01	0.384 ab ± 0.02	0.341 b ± 0.01	0.342 a ± 0.02	0.400 a ± 0.04	0.374 ab ± 0.03	0.386 ab ± 0.01	0.392 a ± 0.02
Ethyl hexanoate	1.309 a ± 0.05	1.310 a ± 0.15	1.300 a ± 0.08	0.897 c ± 0.14	1.023 bc ± 0.07	1.160 ab ± 0.13	1.234 ab ± 0.14	1.148 ab ± 0.10	1.164 ab ± 0.17
Ethyl octanoate	2.069 a ± 0.01	1.907 ab ± 0.42	2.065 a ± 0.16	0.949 d ± 0.27	1.250 cd ± 0.18	1.550 bc ± 0.19	1.676 abc ± 0.23	1.485 bc ± 0.17	1.456 bcd ± 0.34
Ethyl decanoate	0.544 a ± 0.03	0.434 ab ± 0.12	0.484 a ± 0.08	0.161 d ± 0.05	0.200 cd ± 0.05	0.288 cd ± 0.05	0.306 bc ± 0.06	0.248 cd ± 0.06	0.246 cd ± 0.07
Ethyl dodecanoate	0.087 a ± 0.003	0.081 a ± 0.007	0.081 a ± 0.005	0.073 a ± 0.001	0.083 a ± 0.020	0.074 a ± 0.001	0.074 a ± 0.002	0.074 a ± 0.002	0.073 a ± 0.001
Sum esters C4-C12 <sup>b</sup>	4.390 a ± 0.17	4.118 abc ± 0.67	4.314 ab ± 0.26	2.422 c ± 0.44	2.898 de ± 0.27	3.472 bcd ± 0.36	3.664 abcd ± 0.38	3.341 cd ± 0.31	3.332 cd ± 0.57
Acids									
Butyric acid	1.016 a ± 0.14	1.079 a ± 0.13	1.019 a ± 0.14	1.154 a ± 0.18	1.247 a ± 0.22	1.344 a ± 0.29	1.075 a ± 0.21	1.145 a ± 0.21	1.149 a ± 0.19
Isobutyric acid	2.052 a ± 0.22	2.155 a ± 0.28	2.074 a ± 0.17	2.155 a ± 0.21	2.247 a ± 0.30	2.670 a ± 0.55	2.165 a ± 0.35	2.313 a ± 0.39	2.263 a ± 0.34
Isovaleric acid	0.970 a ± 0.17	0.982 a ± 0.13	0.966 a ± 0.13	1.148 a ± 0.21	1.189 a ± 0.21	1.243 a ± 0.23	1.033 a ± 0.21	1.077 a ± 0.21	1.076 a ± 0.20
Sum acids C4-C5 <sup>c</sup>	4.038 a ± 0.50	4.215 a ± 0.46	4.060 a ± 0.38	4.456 a ± 0.60	4.683 a ± 0.71	5.256 a ± 1.04	4.273 a ± 0.75	4.535 a ± 0.76	4.488 a ± 0.70
Hexanoic acid	6.818 a ± 0.66	6.682 a ± 0.41	6.794 a ± 0.41	6.574 a ± 0.60	6.339 a ± 0.39	7.372 a ± 0.74	6.382 a ± 0.81	6.636 a ± 0.65	6.836 a ± 0.82
Octanoic acid	10.12 a ± 0.49	10.00 a ± 1.28	10.50 a ± 0.86	6.43 cd ± 0.50	6.08 d ± 0.68	8.14 b ± 0.83	7.74 bc ± 0.49	7.50 bcd ± 0.36	7.62 bcd ± 0.88
Decanoic acid	2.47 a ± 0.12	2.26 a ± 0.45	2.30 a ± 0.44	1.20 b ± 0.09	1.14 b ± 0.06	1.46 b ± 0.20	1.42 b ± 0.23	1.33 b ± 0.06	1.36 b ± 0.30
Dodecanoic acid	0.405 a ± 0.16	0.340 a ± 0.06	0.301 a ± 0.04	0.281 a ± 0.06	0.360 a ± 0.18	0.288 a ± 0.06	0.273 a ± 0.07	0.278 a ± 0.06	0.277 a ± 0.06
Sum acids C6-C12 <sup>d</sup>	19.81 a ± 0.72	19.28 a ± 1.49	19.90 a ± 1.18	14.48 cd ± 0.48	13.78 d ± 0.53	17.26 bc ± 0.76	15.76 bc ± 0.55	15.75 bc ± 0.62	16.09 bc ± 0.35

Means followed by different letters within the same line are significantly different by Tukey's test ( $p \leq 0.05$ ). (a) Sum of higher alcohols = (sum of 1-propanol, 2-methyl-1-propanol, 2-methyl-1-butanol, and 3-methyl-1-butanol); (b) sum of esters C4-C12 = (sum of ethyl butyrate, ethyl hexanoate, ethyl octanoate, ethyl decanoate and ethyl dodecanoate); (c) sum of acids C4-C5 = (sum of isobutyric acid, butyric acid, and isovaleric acid); (d) sum acids C4-C5 (butyric acid, isobutyric acid and isovaleric acid); and sum of acids C6-C12 = (sum of hexanoic acid, octanoic acid, and decanoic acid).

**Table 3**  
Phenolic content, color index, free SO<sub>2</sub> and GSH content of sparkling wine – experiments 1–9.

Compound	Experiment								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Caffeic acid (mg L <sup>-1</sup> )	0.718 a ± 0.40	0.660 a ± 0.36	0.620 a ± 0.01	0.387 b ± 0.05	0.429 b ± 0.07	0.467 b ± 0.03	0.461 b ± 0.04	0.433 b ± 0.09	0.415 b ± 0.04
Coumaric acid (mg L <sup>-1</sup> )	0.298 b ± 0.02	0.359 a ± 0.02	0.357 a ± 0.03	0.200 c ± 0.01	0.198 c ± 0.02	0.217 c ± 0.03	0.169 c ± 0.04	0.191 c ± 0.02	0.182 c ± 0.02
Ferulic acid (mg L <sup>-1</sup> )	0.151 a ± 0.03	0.122 abc ± 0.01	0.138 ab ± 0.03	0.088 bc ± 0.001	0.096 abc ± 0.03	0.079 c ± 0.01	0.078 c ± 0.01	0.082 bc ± 0.002	n.d. <sup>b</sup>
Sum HA (mg L <sup>-1</sup> ) <sup>a</sup>	1.166 a ± 0.02	1.141 a ± 0.04	1.113 a ± 0.06	0.630 b ± 0.08	0.722 b ± 0.09	0.724 b ± 0.05	0.708 b ± 0.07	0.706 b ± 0.09	0.623 b ± 0.06
Catechin (mg L <sup>-1</sup> )	4.030 b ± 0.12	4.377 ab ± 0.77	5.063 a ± 0.10	3.843 b ± 0.06	3.713 b ± 0.07	3.567 b ± 0.11	3.800 b ± 0.11	4.260 ab ± 0.36	4.300 ab ± 0.15
Epicatechin (mg L <sup>-1</sup> )	0.720 bc ± 0.02	1.203 a ± 0.33	0.873 abc ± 0.01	0.743 bc ± 0.05	0.680 c ± 0.05	1.067 ab ± 0.10	0.603 c ± 0.18	0.723 bc ± 0.02	0.963 abc ± 0.07
TFC <sup>c,d</sup>	7.427 a ± 0.06	7.528 a ± 0.18	7.367 a ± 0.04	6.847 b ± 0.32	6.441 c ± 0.14	6.453 c ± 0.21	6.469 c ± 0.13	6.664 bc ± 0.04	6.713 bc ± 0.07
Color Index <sup>d</sup>	0.012 a ± 0.003	0.012 a ± 0.003	0.010 a ± 0.001	0.010 a ± 0.003	0.010 d ± 0.003	0.011 a ± 0.002	0.008 a ± 0.002	0.013 a ± 0.004	0.014 a ± 0.04
Free SO <sub>2</sub> (meq L <sup>-1</sup> )	8.925 d ± 0.30	11.400 b ± 0.57	13.225 a ± 0.56	9.825 cd ± 0.63	8.850 d ± 0.79	10.800 bc ± 0.82	9.175 d ± 0.62	8.775 d ± 0.46	11.350 b ± 0.27
GSH (mg L <sup>-1</sup> )	0.754 a ± 0.13	0.812 a ± 0.13	0.884 a ± 0.13	0.820 a ± 0.17	0.888 a ± 0.20	0.958 a ± 0.14	0.926 a ± 0.18	0.930 a ± 0.16	1.004 a ± 0.13
Total Glutathione (mg L <sup>-1</sup> )	2.600 c ± 0.24	3.098 c ± 0.77	3.552 c ± 0.62	7.150 b ± 0.97	8.772 ab ± 1.09	8.502 ab ± 0.74	8.794 ab ± 1.39	9.390 a ± 1.20	8.362 ab ± 0.97
HA/GSH	1.543 a ± 0.31	1.409 a ± 0.28	1.258 ab ± 0.19	0.778 bc ± 0.25	0.822 bc ± 0.21	0.754 bc ± 0.16	0.760 bc ± 0.18	0.762 bc ± 0.21	0.617 c ± 0.08

Means followed by different letters within the same line are significantly different by ANOVA test complemented by Tukey's test, the significance level of 5%. (a) HA = Hydroxycinnamic acid; (b) n.d. = not detectable; (c) TFC = Total phenolic Compounds; (d) Results in absorbance.

Siebert, Varela, Pretorius, & Henschke, 2012). However the GSH available in the must may have favored the permanence of nitrogen in its free form.

The concentration of 1-propanol was higher in the sparkling wine of the experiment 5 which differed from the experiment 1 (without GSH addition or control) and of the experiment 3. The sparkling wine of the experiment 5 as well as the sparkling wine of the experiment 7 showed higher concentrations of 2-methyl-1-propanol as compared to the sparkling wine of the control experiment.

The concentration of 3-methyl-1-butanol was higher in the sparkling wine which was added GSH to the must, regardless on the concentration of 10 or of 20 mg L<sup>-1</sup> and regardless on the GSH addition to the base wine. The formation of higher alcohols, such as 3-methyl-1-butanol, seems to depend on the redox status of the yeast cell because according to this status the aldehyde can be reduced by NADH-dependent to its corresponding alcohol, as it can be oxidized by NAD<sup>+</sup>-dependent to volatile carboxylic acid (Styger et al., 2011). GSH favors the reduced state of the yeast (Kritzinger, 2012).

The sum of higher alcohols (1-propanol, 2-methyl-1-propanol, 2-methyl-1-butanol and 3-methyl-1-butanol) ranged from 237 to 261 mg L<sup>-1</sup>. According to Rapp and Versini (1995) concentrations less than 300 mg L<sup>-1</sup> contribute to the wine aroma complexity desired, however when its concentration exceeds 400 mg L<sup>-1</sup> it shows a negative factor to the quality.

The concentration of diethyl succinate increased with the addition of GSH to the must and this increase did not depend on GSH concentration. The GSH addition to the base wine did not influence the concentration of diethyl succinate in the sparkling wine.

The diethyl succinate has a fruity aroma, like a melon one (Peinado, Moreno, Bueno, Moreno, & Mauricio, 2004). Its concentration is associated with the malolactic fermentation (Knoll et al., 2012; Styger et al., 2011), which may have occurred spontaneously in the sparkling wine of this study. According to Knoll et al. (2012) diethyl succinate concentration increases during the malolactic fermentation and varies with the bacteria strain. Cysteine and GSH, stimulate the proliferation of lactic acid bacteria as *Oenococcus oeni*, (Pophaly, Singh, Pophaly, Kaushik, & Tomar, 2012) facilitating the malolactic fermentation, this explain higher concentrations of diethyl succinate in the sparkling wines with GSH addition to the must.

The wine esters are sourced primarily from chemical reactions between acids and alcohols derived from microbial metabolism and from the action of yeasts during alcoholic fermentation. Higher alcohols acetic esters are characterized by presenting pleasant, intense and characteristic aromas. The level of isoamyl acetate was higher in the sparkling wine without the addition of GSH to the must. However, the addition of 20 mg L<sup>-1</sup> of GSH to the base wine seemed to increase the concentration of this compound in the sparkling wine. The isoamyl acetate has a characteristic aroma of banana and its perception threshold is around 0.03–0.16 mg L<sup>-1</sup> (Peinado et al., 2004; Santos et al., 2004). The concentrations of hexyl acetate and phenylethyl acetate did not vary with the addition of GSH. If we consider the hypothesis that GSH helps to maintain the availability of free nitrogen, these results may be related to those obtained by Vilanova et al. (2012) where the levels of esters of acetates did not change with the supplementation of nitrogen to the must.

The average concentration of ethyl acetate in the experiment 4 of the sparkling wine was lower compared to the sparkling wine of the control experiment. The ethyl acetate is the most important ester and it is an indicator of lactic and acetic bacteria action. When it is present in high concentrations (above 180 mg L<sup>-1</sup>) it provides acetic taste which is harmful to the wine quality (Ribéreau-Gayon et al., 2003). Evidences indicate that the ethyl esters such as ethyl



acetate, ethyl hexanoate and ethyl octanoate can also be formed during the malolactic fermentation (Styger et al., 2011).

The variations in the concentrations of esters (C4–C12) during the vinification suggest that the esterases are involved in the synthesis as in the hydrolysis of esters. The reduction occurred in these compounds may impair the quality of sparkling, as the ethyl esters of fatty acids are characterized by presenting pleasant aromas (floral, fruity, honey) (Ribèreau-Gayon et al., 2003). The descriptors of aroma ethyl hexanoate include green apple, strawberry, brandy, banana and its perception threshold is  $0.014 \text{ mg L}^{-1}$ . The ethyl octanoate has floral and fruity aroma, reminiscent of pear and banana, (Peinado et al., 2004) and its perception threshold is  $0.01 \text{ mg L}^{-1}$  (Santos et al., 2004). The ethyl decanoate has a fruity aroma, referring to grape (Peinado et al., 2004), and its perception threshold is  $0.2 \text{ mg L}^{-1}$  (Santos et al., 2004).

The concentration of hexanoic acid and dodecanoic acids did not change with addition of GSH. The concentrations of octanoic and decanoic acids decreased with the addition of GSH to the must, regardless of GSH concentration. The addition of GSH to the base wine did not influence on the amount of decanoic acid, but there was an increase in the concentration of octanoic acid. The fatty acids are formed during the beginning of alcoholic fermentation and in higher concentrations than the corresponding ethyl esters (Rapp & Versini, 1995). The concentrations of octanoic and decanoic acids, known by the flavors of fat, rancidity and soap, and the thresholds of perception of  $0.5\text{--}1.0 \text{ mg L}^{-1}$ , respectively (Peinado et al., 2004; Santos et al., 2004), decreased with the addition of GSH to the must, regardless of GSH concentration.

Many factors may change the "bouquet" of wine, such as yeast, must treatment and fermentation conditions. The GSH concentration influenced on the volatile composition of wine, preserving the reductor status of the environment and causing variations in the relative activity of the biosynthetic pathways and in the catabolic reactions of amino acids responsible for the  $\alpha$ -ketoacids formation (Torrea et al., 2011). Furthermore, GSH may have favored the occurrence of spontaneous malolactic fermentation, which modifies the volatile composition.

### 3.2. Influence of GSH addition on phenolic compounds

The influence of GSH addition on phenolic compounds is shown in the Table 3. The amount of phenolic compounds was lower in the sparkling wine with the addition of GSH to the must. The amounts of caffeic acid decreased with the GSH addition to the must regardless of the amount added, 10 or  $20 \text{ mg L}^{-1}$ . The GSH addition to the base wine did not influence on the concentration of caffeic acid. The amount of coumaric acid also reduced with the GSH addition to the must. The sparkling wine in which was added GSH only to the base wine (experiments 2 and 3) had greater concentration of the coumaric acid compared to the control sparkling wine. However, the GSH addition to the base wine in the sparkling wine with GSH in the must, did not influence on the coumaric acid concentration. The sparkling wines with smaller concentrations of ferulic acid compared to those of the control were the experiments 4, 6, 7 and 8.

The addition of GSH did not preserve the wine content of phenolic compounds in general, as previously suggested by Vaimakis and Roussis (1996) and Fragasso et al. (2010). The reduction of the content of hydroxycinnamic acids probably occurred because the tripeptide does not react directly with oxygen and protects the compounds usually already oxidised. The mechanism of GSH action in preventing browning mainly involved their reactivity with o-quinones, which are the products of the oxidation of phenolic compounds. The GSH reacts spontaneously with these o-quinones to form the compound 2-S-glutathionylcaftaric acid (Grape Reaction Product – GRP) or other less reactive, inhibiting the

formation of brown polymers to a certain extent (Cheynier et al., 1989; Singleton et al., 1985; Sonni et al., 2011a, 2011b). The oxidation reactions occur primarily during grapes crushing, where the phenolic compounds are enzymatically oxidized by polyphenol oxidases of the grape, but they may also occur in the wine during the chemistry oxidation (Cheynier et al., 1989; Sonni et al., 2011a). The reduction of phenolic compounds in white wine reduces the capacity of wine react with  $\text{O}_2$  and prevents the occurrence of oxidation (du Toit, Marais, Pretorius, & du Toit, 2006; Fernández-Zurbano et al., 1995; Singleton et al., 1985). The lowest levels of total phenolic observed may be related to the results obtained for the hydroxycinnamic acids. Furthermore, once GRP is formed from GSH and the o-quinone of the hydroxycinnamic acid, the GRP was measure as total phenolic.

The color index did not vary with GSH addition, as well the levels of catechin and epicatechin. However, as the wine elaborated with GSH addition exhibited lower amount of hydroxycinnamic acids and tannins stability, it is expected to occur less browning during storage time in the sparkling wine with addition of GSH, because the wine stability could be enhanced by adding GSH (Hosry et al., 2009).

### 3.3. GSH in wine

The GSH addition, especially to the base wine, may have helped the  $\text{SO}_2$  in its antioxidant role, keeping more  $\text{SO}_2$  in the free form as well as in studies by Roussis and Sergianitis (2008). This could indicate that GSH in the base wine is the preferred substrate for chemical oxidation compared to  $\text{SO}_2$ . These results demonstrate the synergistic effect between GSH and  $\text{SO}_2$  according studies by Fracassetti et al. (2013).

$\text{SO}_2$  is used in wine to limit the harmful impact of oxygen. Its main function is to eliminate the hydrogen peroxide and o-quinone compounds, and also to form adducts with carbonyl compounds, for example with acetaldehyde (Sonni et al., 2011b). Therefore, the more  $\text{SO}_2$  free in the environment, less the amount of hydrogen peroxide, o-quinones and carbonyl compounds, and thus the quality of wine is preserved.

The GSH levels found in the sparkling wines of this study are similar to those found for still white wines by Marchand and de Revel (2010), Janes, Lisjak, and Vanzo (2010) and Fracassetti et al. (2011). The GSH content in the sparkling wine was lower than the amount of GSH added to the must and/or base wine. The GSH may have been lost by the reaction with o-quinones to form the GRP or by its incorporation to this product, or even by the interaction of GSH with the yeast (du Toit, Lisjak, Stander, & Prevo, 2007; Kritzinger, 2012).

The GSH may still have been degraded by vacuolar membrane – by the enzyme  $\gamma$ -glutamyltranspeptidase ( $\gamma$ -GT) and L-cysteinyglycine dipeptidase, since it can be transported into the yeast cell vacuole (Jaspers, Gigot, & Penninckx, 1985). According to Kumar, Sharma, and Bachhawat (2003), there is also the possibility of an alternative pathway of GSH degradation in *S. cerevisiae* regardless of the enzyme  $\gamma$ -GT. This pathway is mediated by a novel protein complex involving three new genes which have been characterized in *S. cerevisiae* (Ganguli, Kumar, & Bachhawat, 2007).

The fermentation by *S. cerevisiae* may have an impact on the final GSH concentration of wine due to the metabolism of the yeast (Kritzinger, 2012). *S. cerevisiae* can either absorb GSH from the environment as can secrete it, which may result in fluctuating concentrations of GSH in the wine during fermentation (Miyake et al., 1998). It is also suggested that GSH, being an intracellular compound, is released in yeast autolysis at the end of fermentation (Kritzinger, 2012).

The GSH concentration in must ranges from undetectable to more than  $100 \text{ mg L}^{-1}$  and is influenced by several factors,



including exposure to oxygen (du Toit et al., 2007), maceration with grape skins during pre-fermentation and pressing conditions (Maggu, Winz, Kilmartin, Trought, & Nicolau, 2007). The content of GSH in the sparkling wine reduced during fermentation, as in some previous studies (du Toit et al., 2007; Kritzinger, 2012). However, the GSH concentrations in sparkling wine were not influenced by the amount of GSH added to the must or to the base wine.

Theoretically, the reduction conditions can hold larger amount of GSH in its reduced form and these conditions are reached more quickly by fermentation. However, this was not observed in this study, since the addition of GSH in the wine base, which is a more reduced environment than the must, did not result in an increase of GSH concentration in the sparkling wine. The highest concentration of total glutathione was found in sparkling wine in which GSH was added to the must. The content of total glutathione in sparkling wine showed strong correlations with many compounds analyzed and it did not occur in relation to the reduced glutathione. Therefore, the total glutathione was an indicator of glutathione content in wine better than GSH, as it was suggested in a study of Marchand and de Revel (2010).

The content of total glutathione in sparkling wine showed a strong negative correlation with the caffeic acid ( $r = -0.84$ ), the coumaric acid ( $r = -0.84$ ), the ferulic acid ( $r = -0.69$ ), the total phenolic ( $r = -0.88$ ), with the ethyl decanoate ( $r = -0.78$ ) and the octanoic ( $r = -0.76$ ) and decanoic acids ( $r = -0.81$ ). Moreover, a moderate negative correlation with the levels of free  $\text{SO}_2$  ( $r = -0.47$ ). On the other hand, it showed a strong positive correlation with 2-phenylethanol ( $r = 0.73$ ), 3-methyl-1-butanol ( $r = 0.87$ ) and diethyl succinate ( $r = 0.80$ ).

#### 4. Conclusions

The GSH addition to the must interferes more in the formation of aroma and phenolic compounds of the sparkling wine than the GSH addition to the base wine. However, the GSH addition to the base wine seems to maintain higher levels of  $\text{SO}_2$  in the free form. The concentration of GSH added ( $10$  or  $20 \text{ mg L}^{-1}$ ) have no significant influence on the composition of the sparkling wine. The addition of  $10 \text{ mg L}^{-1}$  of GSH to the must is sufficient to ensure lower concentration of caffeic acid, coumaric and ferulic in sparkling wine. So, the addition of  $10 \text{ mg L}^{-1}$  of GSH to the must and  $10 \text{ mg L}^{-1}$  of GSH to the base wine seems to be a good option for the elaboration of sparkling wine with better quality of aroma and lower phenolic compounds content.

Finally, the amount of total glutathione is more related to perceived changes in the sparkling wine than the GSH. Further studies should be conducted to assess the influence of the GSH in the malolactic fermentation, and to elucidate the role of GSH on the levels of free  $\text{SO}_2$  and their synergistic effect, maybe using higher concentrations of GSH.

#### Acknowledgments

This study was supported by National Counsel of Technological and Scientific Development (CNPq) (Project 480846/2011-1), FAPERGS and Piagentino Ltda. Winery. Special acknowledgment to winemaker Alejandro Cardoso for their collaboration.

#### References

- Andujar-Ortiz, I., Pozo-Bayón, M. A., Moreno-Arribas, M. V., Martín-Álvarez, P. J., & Rodríguez Bencomo, J. J. (2012). Reversed-phase high-performance liquid chromatography–fluorescence detection for the analysis of glutathione and its precursor  $\gamma$ -glutamyl cysteine in wine and model wine supplemented with oenological inactive dry yeast preparations. *Food Analytical Methods*, 5, 154–161.
- Cheyrier, V., Souquet, J. M., & Moutouret, M. (1989). Glutathione content and glutathione to hydroxycinnamic acid ratio in *Vitis vinifera* grapes and must. *American Journal of Enology and Viticulture*, 40, 320–324.
- du Toit, W. J., Marais, J., Pretorius, I. S., & du Toit, M. (2006). Oxygen in wine: A review. *South African Journal of Enology and Viticulture*, 27, 76–94.
- du Toit, W. J., Lisjak, K., Stander, M., & Preevo, D. (2007). Using LC–MS/MS to assess glutathione levels in South African white grape juices and wine made with different levels of oxygen. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 2765–2769.
- Etschmann, M. M. W., Bluemel, W., Sell, D., & Schrader, J. (2002). Biotechnological production of 2-phenylethanol. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 59, 1–8.
- Fernández-Zurbano, P., Ferreira, V., Peña, C., Escudero, A., Serrano, F., & Cacho, J. (1995). Prediction of oxidative browning in white wine as a function of their chemical composition. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43, 2813–2817.
- Fracassetti, D., Lawrence, N., Tredoux, A. G. T., Tirelli, A., Nicuwoodt, H. H., & du Toit, W. J. (2011). Quantification of glutathione, catechin and caffeic acid in grape juice and wine by a novel ultra-performance liquid chromatography method. *Food Chemistry*, 28, 1136–1142.
- Fracassetti, D., Coetzee, C., Vanzo, A., Ballabio, D., & du Toit, W. J. (2013). Oxygen consumption in South African Sauvignon Blanc wines: Role of glutathione, sulphur dioxide and certain phenolics. *South African Journal of Enology and Viticulture*, 34, 156–169.
- Fragasso, M., Antonacci, D., Pati, S., Lamacchia, F., Baiano, A., Coletta, A., et al. (2010). Influence of glutathione addition on volatile profile of Trebbiano and Bombino Bianco wine. *Proceedings XXXIII World Congress of Vine and Wine* (pp. 20–25). Georgia, Tbilisi: OIV.
- Ganguli, D., Kumar, C., & Bachhawat, A. K. (2007). The alternative pathway of glutathione degradation is mediated by a novel protein complex involving three new genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 175, 1137–1151.
- Gómez-Alonso, S., García-Romero, E., & Hermosin-Gutiérrez, I. (2007). HPLC analysis of diverse grape and wine phenolics using direct injection and multidetection by DAD and fluorescence. *Journal of Food Composition and Analysis*, 20, 618–626.
- Hosry, L., Auezova, L., Sakr, A., & Hajj-Moussa, E. (2009). Browning susceptibility of white wine and antioxidant effect of glutathione. *International Journal of Food Science and Technology*, 44, 2459–2463.
- Janes, L., Lisjak, K., & Vanzo, A. (2010). Determination of glutathione content in grape juice and wine by high performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Analytica Chimica Acta*, 674, 239–242.
- Jaspers, C. J., Gigot, D., & Penninckx, M. J. (1985). Pathways of glutathione degradation in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Phytochemistry*, 24, 703–707.
- Knoll, C., Fritsch, S., Schnell, S., Grossmann, M., Krieger-Weber, S., du Toit, M., et al. (2012). Impact of different malolactic fermentation inoculation scenarios on Riesling wine aroma. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28, 1143–1153.
- Kritzinger, E. C. (2012). Winemaking practices affecting glutathione concentrations in white wine (Thesis). Stellenbosch, South Africa: Stellenbosch University.
- Kumar, C., Sharma, R., & Bachhawat, A. K. (2003). Utilization of glutathione as an exogenous sulfur source is independent of  $\gamma$ -glutamyl transpeptidase in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: Evidence for an alternative glutathione degradation pathway. *FEMS Microbiology Letters*, 219, 187–194.
- Lavigne, V., Pons, A., & Dubourdieu, D. (2007). Assay of glutathione in must and wine using a capillary electrophoresis and laser-induced fluorescence detection: Changes in concentration in dry white wine during alcoholic fermentation and aging. *Journal of Chromatography A*, 1139, 130–135.
- Liu, S.-Q., & Pilone, G. (2000). An overview of formation and roles of acetaldehyde in winemaking with emphasis on microbiological implications. *International Journal of Food Science and Technology*, 35, 49–61.
- Maggu, M., Winz, R., Kilmartin, P. A., Trought, M. C. T., & Nicolau, L. (2007). Effect of skin contact and pressure on the composition of Sauvignon Blanc must. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 10281–10288.
- Marchand, S., & de Revel, G. (2010). A HPLC fluorescence-based method for glutathione derivatives quantification in must and wine. *Analytica Chimica Acta*, 660, 158–1630.
- Meister, A. (1988). Minireview: Glutathione metabolism and its selective modification. *Journal of Biological Chemistry*, 263, 17205–17208.
- Miyake, T., Hazu, T., Yoshida, S., Kanayama, M., Tomochika, K., Shimada, S., et al. (1998). Glutathione transport systems of the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 62, 1858–1864.
- Peinado, R. A., Moreno, J., Bueno, J. E., Moreno, J. A., & Mauricio, J. C. (2004). Comparative study of aromatic compounds in two young white wine subjected to pre-fermentative cryomaceration. *Food Chemistry*, 84, 585–590.
- Penninckx, M. J. (2002). An overview on glutathione in *Saccharomyces* versus non-conventional yeasts. *FEMS Yeast Research*, 2, 295–305.
- Pophaly, S. D., Singh, R., Pophaly, S. D., Kaushik, J. K., & Tomar, S. K. (2012). Current status and emerging role of glutathione in food grade lactic acid bacteria. *Microbial Cell Factories*, 11, 1–14.
- Rapp, A., & Versini, G. (1995). Influence of nitrogen compounds in grapes on aroma compounds of wine. In G. Charalambous (Ed.), *Food flavors: Generation, analysis and process influence* (pp. 1659–1694). Amsterdam: Elsevier Science.
- Ribéreau-Gayon, P., Dubourdieu, D., Donèche, B., & Louvand, A. (2003). *Tratado de Enología. I. Microbiología del vino – Saponificaciones. 2. Química del vino – Estabilización y tratamientos*. Buenos Aires: Hemisferio Sur.

- Roussis, I. G., & Sergianitis, S. (2008). Protection of some aroma volatiles in a model wine medium by sulphur dioxide and mixtures of glutathione with caffeic acid or gallic acid. *Flavour and Fragrance Journal*, 23, 35–39.
- Santos, J. P., Arroyo, T., Alexandre, M., Lozano, J., Sayago, I., García, M., et al. (2004). A comparative study of sensor array and GC-MS: Application to Madrid wine characterization. *Sensors and Actuators B*, 102, 299–307.
- Singleton, V. L., Salgues, M., Zaya, J., & Trousdale, E. (1985). Catearic acid disappearance and conversion to products of enzymic oxidation in grape must and wine. *American Journal of Enology and Viticulture*, 36, 50–56.
- Sonni, F., Clark, A. C., Prenzler, P. D., Riponi, C., & Scollary, G. R. (2011a). Antioxidant action of glutathione and the ascorbic acid/glutathione pair in a model white wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59, 3940–3949.
- Sonni, F., Moore, E. G., Clark, A. C., Chinnici, F., Riponi, C., & Scollary, G. R. (2011b). Impact of glutathione on the formation of methylnethine- and carboxymethine-bridged (+)-catechin dimers in a model wine system. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59, 7410–7418.
- Styger, G., Prior, B., & Bauer, F. F. (2011). Wine flavor and aroma. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 38, 1145–1159.
- Torrea, D., Varela, C., Ugliano, M., Ancin-Azpilicueta, C., Francis, L., & Henschke, P. A. (2011). Comparison of inorganic and organic nitrogen supplementation of grape juice – Effect on volatile composition and aroma profile of a Chardonnay wine fermented with *Saccharomyces cerevisiae* yeast. *Food Chemistry*, 127, 1072–1083.
- Vaimakis, V., & Roussis, I. G. (1996). Must oxygenation together with glutathione addition in the oxidation of white wine. *Food Chemistry*, 57, 419–422.
- Vilanova, M., Siebert, T. E., Varela, C., Pretorius, I. S., & Henschke, P. A. (2012). Effect of ammonium nitrogen supplementation of grape juice on wine volatiles and non-volatiles composition of the aromatic grape variety Albariño. *Food Chemistry*, 133, 124–131.

**4.3. CAPÍTULO 3 – Efeito da glutathione durante o armazenamento de vinhos  
espumantes**

Artigo publicado na revista Food Chemistry





## Effect of glutathione during bottle storage of sparkling wine



Vanessa Webber<sup>a,\*</sup>, Sandra Valduga Dutra<sup>b</sup>, Fernanda Rodrigues Spinelli<sup>a,b</sup>, Gilberto João Carnieli<sup>b</sup>, Alejandro Cardozo<sup>c</sup>, Regina Vanderlinde<sup>a,b</sup>

<sup>a</sup> University of Caxias do Sul, Rua Francisco Getúlio Vargas, 1130, CEP 95070-560 Caxias do Sul, RS, Brazil

<sup>b</sup> Reference Laboratory of Enology, Brazilian Wine Institute – IBRAVIN, Avenida da Vindima, 1855, Exposição, CEP 95054-470 Caxias do Sul, Brazil

<sup>c</sup> Cia Piagentini de Bebidas e Alimentos Ltda., Rua Visconde de Pelotas, 2188, Pio X, CEP 95020-500 Caxias do Sul, Brazil

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 21 June 2016

Received in revised form 15 August 2016

Accepted 16 August 2016

Available online 17 August 2016

#### Keywords:

Glutathione

Sparkling wine

Antioxidant

Browning

### ABSTRACT

Reduced glutathione (GSH) is an efficient antioxidant on limiting browning, losing varietal aromas and off-flavor formation. Therefore, this study aims to evaluate the effect of GSH addition (10, 20 and 30 mg L<sup>-1</sup>) after the disgorging of the sparkling wine during storage. The sparkling wines were analyzed at 1, 6, 12 and 18 months of storage according to the color index, concentration of the free SO<sub>2</sub>, phenolic compounds, catechin, epicatechin, caffeic acid, coumaric acid, acetaldehyde, total and reduced glutathione. The results show that GSH concentration decreased to the level of the control sparkling wine during the first 6 months, and the total glutathione gradually declined up to 12 months. The GSH reduces browning and acetaldehyde formation for up to 12 months. However, the presence of glutathione had low or no influence on the concentration of free SO<sub>2</sub>, total phenolics, catechin, epicatechin, caffeic and coumaric acids.

© 2016 Elsevier Ltd. All rights reserved.

### 1. Introduction

The sparkling wine made by the traditional method is the result of the second fermentation of the base wine in bottles, followed by aging in contact with lees. During this aging the yeast autolysis occurs, which causes the release of many important compounds for sparkling wine quality which provide unique characteristics to each bottle. After aging, the lees are eliminated by the disgorging and the sparkling wine is stored until its commercialization (Torres, Frangipane, & Anelli, 2011).

During storage of sparkling wines without yeast lees, oxidation reactions involving phenols and aromatic compounds can occur, as it happens in white wines. In order to prevent the oxidation, sulfur dioxide (SO<sub>2</sub>) is traditionally used, not only for its antioxidant property, but also for its antimicrobial action (Comuzzo & Zironi, 2013; Danilewicz, Seccombe, & Whelan, 2008).

The main role of SO<sub>2</sub> as an antioxidant is cleaving the hydrogen peroxide and o-quinone compounds efficiently (Danilewicz et al., 2008). The SO<sub>2</sub> can also form adducts with carbonyl compounds, particularly acetaldehyde (Sonni, Moore et al., 2011). Sulfites are still considered the most effective tools to control oxidation reactions in wine, but they are toxic and allergenic. Currently, wine with a low amount of sulfites is better accepted by the most

conscious consumers who seek a healthy diet, therefore some wine producers seek to reduce the use of SO<sub>2</sub> in winemaking. Although the complete elimination of SO<sub>2</sub> is not viable, scientific and technological evidence confirm the possibility to significantly reduce its use in the early stages of winemaking. However, it is more difficult to find suitable replacements for SO<sub>2</sub> in bottled wine (Comuzzo & Zironi, 2013).

Technological alternatives to SO<sub>2</sub> in bottled wine are necessary. Among the alternatives which have been studied there is the addition of reduced glutathione (GSH), although it is still in experimental levels (Hosry, Auezova, Sakr, & Hajj-Moussa, 2009; Roussis & Sergianitis, 2008; Sonni, Clark, Prenzler, Riponi, & Scollary, 2011; Webber et al., 2014). GSH is a tripeptide with antioxidant properties which is naturally present in wines in low concentrations (Kritzinger, Bauer, & du Toit, 2013). The GSH concentration in wine may be influenced by several aspects; from the variety, the *terroir* and the harvest (Cheynier, Souquet, & Moutounet, 1989); to the use of different yeast strains and the winemaking technology (Kritzinger, Standerb, & du Toit, 2013).

The differentiation between GSH and total glutathione is important because only in the reduced form is that glutathione acts as an antioxidant in wine. The concentration of total glutathione is the amount of GSH and dimeric glutathione, also called disulfide or oxidized (GSSG). The GSSG is formed by oxidation of GSH and it can be reduced back to GSH by glutathione reductase enzyme, with the concomitant oxidation of NADPH (Kritzinger, Bauer et al.,

\* Corresponding author.

E-mail address: [vaniwe@hotmail.com](mailto:vaniwe@hotmail.com) (V. Webber).



2013). The analysis of total glutathione concentration seems to be a good indicator of GSH present (Marchand & de Revel, 2010), considering that there is great variation in the levels of GSH during winemaking and wine aging.

GSH plays an important role in protecting against browning and loss of flavor which occur due to oxidation in white wines (Coetzee & du Toit, 2012; Kritzinger, Bauer et al., 2013; Rodríguez-Bencomo et al., 2014; Roussis, Lambropoulos, & Tzimas, 2007). GSH inhibits formation of dark polymers by avoiding polymerization which occurs from the quinone compounds present in the wine due to the oxidation of phenolic compounds. With its thiol group serving as a nucleophilic center, rich in electrons, GSH replaces the electrophilic ring of the quinone of caffeic acid. This substitution regenerates the hydroquinone form of the moiety corresponding to the caffeic acid. The product formed is the *Grape Reaction Product* (GRP, e.g. S-2-glutathionylcaffeic acid), which is not dark and not easily oxidized (Li, Guo, & Wang, 2008; Singleton, Salgues, Zaya, & Trousdale, 1985; Comuzzo & Zironi, 2013). However, the laccase, present in grapes affected by Botrytis, can oxidize the GRP with the subsequent formation of dark polymers (Comuzzo & Zironi, 2013).

The quinones formed by the oxidative process during storage and/or aging of the wine react with GSH, when it is present (Comuzzo & Zironi, 2013). In the absence of sufficient amounts of GSH, the quinones react with other phenolic compounds and this reaction can lead to formation of new polymers and tannins of larger structures, with consequent changes in the wine sensory characteristics (Waterhouse & Laurie, 2006).

The addition of GSH in must and wine up to a maximum of 20 mg L<sup>-1</sup> was recently included among the oenological practices recommended by the *Organization Internationale de la Vigne et du Vin* – OIV (OIV – Code International des Pratiques Œnologiques, 2016). Therefore, to our knowledge, there are few studies testing the addition of GSH in non-model wine and during a medium or long storage time. Nevertheless, some of the most recent observations should be confirmed and various aspects should be investigated before using GSH on a larger scale in wine, in particular, further studies are needed in bottled wines during storage and in sparkling wine. Therefore, this study aims to evaluate the effect of adding different concentrations of GSH in sparkling wine after the disgorging during storage time.

## 2. Material and methods

### 2.1. Sparkling wine elaboration

Sparkling wines were produced by the traditional method with Chardonnay (60%) and Pinot Noir (40%) grapes of the 2011 harvest. It was added to the must: 50 mg L<sup>-1</sup> of metabisulphite, 100 mg L<sup>-1</sup> of gallic tannins, 30 mg L<sup>-1</sup> of pectinolytic enzyme. For the must clarification it was used 300 mg L<sup>-1</sup> of activated carbon, 100 mg L<sup>-1</sup> of gelatin and 30 mg L<sup>-1</sup> of silica.

The base wine was elaborated with 300 mg L<sup>-1</sup> yeast strain *Saccharomyces cerevisiae* var. *bayanus* (Spark, Laffort). It was added to the must 400 mg L<sup>-1</sup> of nutrient (composed of yeasts cell walls, cellulose support and yeasts inert), 300 mg L<sup>-1</sup> of ammonium phosphate containing nutrient and thiamine, 300 mg L<sup>-1</sup> of ammonium phosphate. The fermentation temperature was 13–15 °C. The base wine was clarified with bentonite addition. After the first fermentation the base wine was kept into full closed tanks of 50 L, at 0 °C until bottling.

To the base wine it was added 26 g L<sup>-1</sup> of sugar and the same nutrients added to the must in the first fermentation. The base wine was bottled and it was added 300 mg L<sup>-1</sup> of yeast, which was the same as used in the first fermentation. The bottles were closed with plastic lid (bidule) and metal overcap. Sparkling wine

was kept nine months in contact with lees at a temperature of approximately 18 °C in the dark.

### 2.2. Experimental design

After the disgorging, it was added L-glutathione reduced from Sigma-Aldrich (G4251, ≥98.0%) at variables concentrations of 10, 20 e 30 mg L<sup>-1</sup> to sparkling wines. The analysis of aromatic compounds, phenolic compounds, residual glutathione, free SO<sub>2</sub>, and color index were performed in the storage time at 1, 6, 12 and 18 months.

### 2.3. Determination of acetaldehyde

The acetaldehyde analysis was performed on a gas chromatograph HP 6890 of the Agilent Technologies, with flame ionization detector. The compound was identified by comparing it to authentic standard of the Sigma-Aldrich. In order to analyze acetaldehyde, it was added 70 µL of 4-metil-2-pentanol solution (5 g L<sup>-1</sup>, internal standard) in 5 mL of the distilled sample. The injection (1.0 µL) was performed in the split mode at 60 mL min<sup>-1</sup> at 220 °C. A capillary column CPWax 57CB (60 m, 250 µm and 0.25 µm) was used. The carrier gas was hydrogen 5.0 at 2.0 mL min<sup>-1</sup> and nitrogen as auxiliary gas at 37 mL min<sup>-1</sup>. The oven temperature was 40 °C for 5 min, 40 at 90 °C to 3 °C min<sup>-1</sup>, 90–200 °C at 10 °C min<sup>-1</sup>, 200 °C for 5 min. The combustion was maintained with synthetic air at 350 mL min<sup>-1</sup> and hydrogen at 35 mL min<sup>-1</sup>. The detector temperature was 230 °C.

### 2.4. Analysis of phenolic compounds

The determination of coumaric and caffeic acid, catechin and epicatechin were performed by high-performance liquid chromatography according to the methodology of Gómez-Alonso, García-Romero, and Hermosín-Gutiérrez (2007). It was used an Agilent Technologies chromatograph equipped with spectrophotometric diode array detector and Zorbax® SB-C-18 (250 mm × 4.6 mm, 5 µm). The chromatograms were obtained at 320 nm for the phenolic acids and 280 nm for the catechin and epicatechin. These phenolic compounds were identified by comparing it to the authentic standards from Sigma-Aldrich.

All samples were filtered with a 0.45 µm membrane ester mixture, and 10 µL were injected into the chromatograph. The mobile phase was composed of the following solvents: solvent A, 50 mM NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH adjusted to 2.6; solvent B, 20% solvent A and 80% acetonitrile; and solvent C, 200 mM H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, pH 1.5. The mobile phase was vacuum filtered with membrane of 0.45 µm. A constant flow rate was 1 mL min<sup>-1</sup> and the gradient of the solvents which were used for separation was described by Gómez-Alonso, García-Romero, and Hermosín-Gutiérrez (2007).

### 2.5. Determination of total phenolic compounds and color index

Total phenolics were determined by the measurement of UV absorption at a wavelength of 280 nm after dilution of samples in distilled water, and the color index at the absorbance of 420 nm (Ribéreau-Gayon, Dubourdieu, Donèche, & Louvain, 2003).

### 2.6. Determination of glutathione

The determination of glutathione was performed by using the methodology described by Webber et al. (2014). For sample derivatization it was used two different solutions of dithiothreitol (DTT, Sigma-Aldrich) dissolved in borate buffer solution and naphthalene-2,3-dicarboxaldehyde (NDA, Sigma-Aldrich) solution dissolved in absolute ethanol (stored at -18 °C). NDA was



dissolved in absolute ethanol to a final concentration of 5 mg mL<sup>-1</sup>. DTT solutions were prepared at concentrations of 5 mM e 0.5 mM in borate buffer to determine the level of total glutathione or reduced glutathione, respectively. Borate buffer was prepared with H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> (0.2 M), adjusting the pH to 9.2 with NaOH solution (1 N). The two solutions were filtered, stored in 1 mL vials and kept frozen at -20 °C.

The derivatization was made using an auto sampler as the following: 20 µL of sample was placed in a 1 mL vial, to this was added 70 µL of DTT solution and 10 µL of NDA solution. After that, 100 µL of the mixture was injected into the chromatograph.

The determination of glutathione was performed on a liquid chromatograph HP 1100 of the Agilent Technologies. It was used Zorbax<sup>®</sup> SB-C-18 column (250 mm × 4.6 mm, 5 µm) and a guard column Zorbax<sup>®</sup> ODS 4-pack (12.5 mm × 4.6 mm, 5 µm). The mobile phase was a solution of methanol and phosphate buffer 15:85 (v:v). The phosphate buffer was composed of Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O (10 mM) in ultrapure water, pH adjusted to 7.5 using orthophosphoric acid solution. The mobile phase was vacuum filtered with membrane 0.45 µm. The wavelengths used for excitation and emission were 467 and 525 nm, respectively. The glutathione was identified by comparing it to Sigma-Aldrich authentic standard.

### 2.7. Statistical analysis

Each experiment was conducted in three bottles and the analyses were performed in triplicate for each bottle. The results were presented as means ± standard deviation (SD). The normality test of Kolmogorov-Smirnov was applied and the data were performed using one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's test at  $p > 0.05$ . To verify the existence of correlation between the results of the analyses of acetaldehyde, catechin, and color index (browning), the data were evaluated according to Pearson's correlation (Granato, Calado, & Jarvis, 2014). All analyses were conducted using the statistical software SPSS 21.0 for Windows.

## 3. Results and discussion

The GSH concentration measure was lower than the added concentration (Fig. 1), including the first analysis time, 1 month after the addition. Along the storage time, the GSH concentration dropped to undetectable levels within 18 months of storage. The high reactivity of GSH with oxygen and oxidized phenolic compounds can explain this rapid reduction in its concentration.

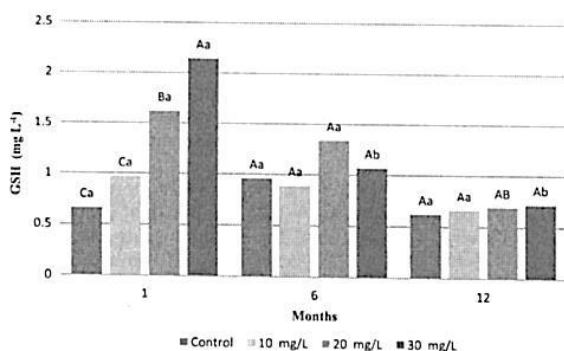


Fig. 1. GSH concentration of the sparkling wines during 1, 6 and 12 months of storage time. Different lowercase letters mean significant differences between months of storage and different capital letters mean significant differences between GSH concentrations by ANOVA complemented by Tukey Multiple Comparison Test ( $p \leq 0.05$ ).

Moreover, as part glutathione of the glutathionyl-caftaric acid undergoes gradual hydrolysis during wine aging (Cejudo-Bastante, Perez Coello, & Hermosin-Gutierrez, 2010), it can be assumed that hydrolysis may also have occurred with the free form of GSH in a similar manner during storage of sparkling wine (Sonni, Moore et al., 2011). From 6 months the GSH concentrations showed no significant difference between the experiments, all comparable with the control sparkling wine. A similar result was found by Panero, Motta, Petrozziello, Guaita, and Bosso (2015) which added 20 mg L<sup>-1</sup> of GSH in white wines in the bottling and observed that GSH was quickly consumed, and that consumption was faster in trials with a greater level of dissolved oxygen.

The concentration of total glutathione decreased after its addition in the sparkling wine (Fig. 2). After one month of storage, the amount of total glutathione in the sparkling wine which had an addition of 10 mg L<sup>-1</sup> of GSH was similar to the amount obtained in the control sparkling wine, while the sparkling wine which had an addition of 20 and 30 mg L<sup>-1</sup> had higher total glutathione concentrations compared to the control sparkling wine. In periods of 6 and 12 months of storage only sparkling wine which had an addition of 30 mg L<sup>-1</sup> of GSH showed higher total glutathione concentrations than the control. With 18 months of storage, it was not possible to detect the total glutathione concentration, being below the quantitation limit of the method (0.61 mg L<sup>-1</sup>).

These results are according to the studies by Lavigne, Pons, and Dubourdieu (2007), who also observed the reduction of glutathione during aging, but in still wines. Andujar-Ortiz, Pozo-Bayón, Moreno-Arribas, Martín-Álvarez, and Rodríguez Bencomo (2012) showed similar results, in which the amount of GSH and total glutathione progressively reduced during the shelf life of wine bottles for up to 9 months, the first in greater proportion to the second one.

Several antioxidants help SO<sub>2</sub> to protect white wines from the effects of the oxygen (Clark et al., 2010; Roussis et al., 2007; Sonni, Clark et al., 2011; Barril, Clark, & Scollarya, 2012; Fracassetti, Coetzee, Vanzo, Ballabio, & du Toit, 2013; Grant-Preece, Fang, Schmidtke, & Clark, 2013). Previous studies suggest that there is a synergistic relationship between glutathione and SO<sub>2</sub> (Roussis & Sergianitis, 2008; Fracassetti et al., 2013; Panero et al., 2015; Webber et al., 2014). However, the addition of GSH in the sparkling wine generally did not alter the concentration of free SO<sub>2</sub> in the present study, with the exception of sparkling wines which were added 20 mg L<sup>-1</sup> of GSH, which for the storage time of 12 months had higher concentration of free SO<sub>2</sub> compared to the control sparkling wine. Nikolantonaki, Magiatis, and Waterhouse

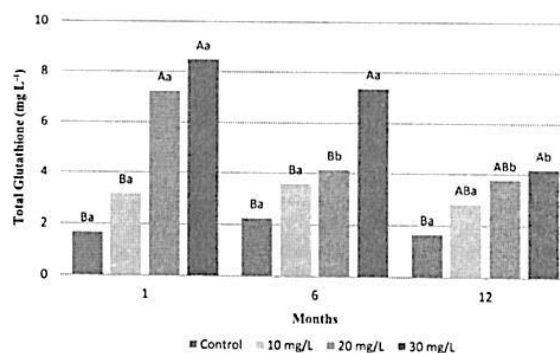


Fig. 2. Total glutathione concentration of the sparkling wines during 1, 6 and 12 months of storage time. Different lowercase letters mean significant differences between months of storage and different capital letters mean significant differences between GSH concentrations by ANOVA complemented by Tukey Multiple Comparison Test ( $p \leq 0.05$ ).



(2014) did not find synergistic effect between  $\text{SO}_2$  and GSH reactions with a model quinone (4-methyl-1,2-benzoquinone). On the other hand, Fracassetti et al. (2013) and Panero et al. (2015) observed that in the presence of oxygen, GSH and  $\text{SO}_2$  showed a synergistic effect on the acceleration of oxygen consumption in white wines. Moreover, according to Panero et al. (2015), the GSH did not increase the consumption of  $\text{SO}_2$ , unlike other additives antioxidants such as ascorbic acid and oenological tannins. The GSH, as well as  $\text{SO}_2$ , reacts with o-quinone, but, most likely, does not react with the hydroperoxyl radical to form hydrogen peroxide, which would lead to an increase in the consumption of  $\text{SO}_2$ .

In our previous study, the free  $\text{SO}_2$  levels remained stable after the addition of GSH in the must and/or base wine (Webber et al., 2014), which did not occur in this study. This shows that the step in which GSH is added may have an influence, since in this study GSH was added in ready sparkling wine, and in our previous study, the GSH was added in the must and in the base wine. Another influencing factor is the environment stability, which is related to the dissolved oxygen level that influences the synergistic effect of GSH and  $\text{SO}_2$ , as observed by Panero et al. (2015).

During storage, the oxidation occurs due to reactive oxygen species (ROS) such as superoxide radical and its protonated form, the hydroperoxyl radical. The catechol functional groups may react with these radicals, forming semiquinone, quinone and hydrogen peroxide; the latter can form hydroxyl radicals through Fenton reaction. These hydroxyl radicals are very reactive and unstable and they react immediately, especially with the most representative compounds in wine, such as ethanol (oxidized to acetaldehyde) (Comuzzo & Zironi, 2013).

The acetaldehyde concentrations in the sparkling wine showed no changes in the first 6 months of storage when compared to the control sparkling wine. With 12 months of storage, the sparkling wines supplemented with 20 and 30  $\text{mg L}^{-1}$  of GSH showed lower amounts of acetaldehyde than the control. Probably, there was an addition reaction between GSH and acetaldehyde, although this is primarily bound by  $\text{SO}_2$  (Sonni, Moore et al., 2011). Acetaldehyde may be present in the wine after the primary fermentation as a residue of yeast metabolism, or it may be formed if the wine is in oxidation conditions. In the latter case, acetaldehyde is formed by the oxidation of ethanol and, once formed, it can be combined with phenolics flavonoids including anthocyanins and tannins, forming dark pigments (Sonni, Moore et al., 2011; Comuzzo & Zironi, 2013).

According to Sonni, Moore et al. (2011), the carbonyl compounds, such as acetaldehyde, are characterized by the reactivity with flavonoid compounds, such as catechin, due to the nucleophilic nature of flavonols and the electrophilic character of the aldehyde group, especially in acid pH, such as wine. The dimer formed between catechin and acetaldehyde can participate in other reactions to form higher polymers, which can form colloids and precipitate, resulting in wine browning (Saucier, Bourgeois, Vitry, Roux, & Glories, 1997). This may have been one of the causes of the sparkling wines browning, but not the main one, once the linear correlation between acetaldehyde and catechin was practically null ( $r = -0.04$ ), and the linear correlation between these two compounds and the color index results were weak ( $r = -0.1$  for catechin and  $r = 0.2$  for acetaldehyde). Thus, the addition of GSH may have prevented that acetaldehyde formed polymer compounds, once the correlation between GSH and acetaldehyde was moderately positive ( $r = 0.4$ ) up to 12 months of storage. In addition, with 18 months of storage, the sparkling wines supplemented with GSH showed no significant difference from the control sparkling wine for the concentration of acetaldehyde, probably due to the lack of GSH in the environment.

The color index increased up to 6 months in the control sparkling wine when compared to sparkling wine supplemented with

GSH. These results are according to previous studies which suggest that GSH can prevent browning of white wines to a certain extent, avoiding the sequence of chemical and enzymatic browning reactions eliminating the o-quinones and inhibiting subsequent polymerization reactions (Cheynier et al., 1989; Hosry et al., 2009; Singleton et al., 1985; Sonni, Clark et al., 2011; Sonni, Moore et al., 2011; Webber et al., 2014). The linear correlations observed between GSH and the color index and between the total glutathione and the color index up to 12 months of storage were negative and moderate ( $r = -0.5$  and  $-0.4$ , respectively), which proves the moderate effect of GSH addition in inhibiting the browning of sparkling wine. In 18 months of storage, it was observed a small reduction in the color index, due to a reduction in GSH levels in the medium.

The white wine browning during aging can also be related to the presence of flavonol phenolic compounds from grape skins and seeds, such as catechins and epicatechins (Oliveira, Silva Ferreira, De Freitas, & Silva, 2011; Clark et al., 2010). However, no significant differences were observed ( $p > 0.05$ ) between the control and sparkling wine supplemented with GSH in relation to the concentration of catechin. These results are consistent with the studies by Sonni, Moore et al. (2011) and Panero et al. (2015), and they may be a consequence of the relative small amount of catechin consumed throughout the experiment and/or of the presence of competing reactions involving catechin. However, the presence of GSH may have prevented the formation of polymers which were formed in the presence of catechin (dimers of catechins) and GSH may also be reacted with o-quinone catechins, that is, the product of the catechin oxidation to form the glutathionil-catechin compound; or GSH can be reacted with the reaction product of acetaldehyde and catechin, once GSH is unable to prevent the initial reaction between these two compounds (Sonni, Moore et al., 2011). GSH supplemented probably acted only in the subsequent oxidation and polymerization processes. A similar conclusion is obtained by observing the behavior of phenolic acids. The catechin concentrations decreased with the storage time, because the shortage of GSH, dimers of catechin could be formed (Sonni, Moore et al., 2011). This is evidenced by the moderate positive correlation between catechin and GSH; and between catechin and the total glutathione ( $r = 0.4$ ), that is, the lower the concentration of total glutathione GSH, the lower the concentration of catechin is.

In general, epicatechin concentrations did not change with the addition of GSH. Although previous studies in model wines have shown that the epicatechin concentrations decreased more rapidly than catechin concentrations under oxidizing conditions (Clark et al., 2010; Labrouche, Clark, Prenzler, & Scollary, 2005). This behavior was not observed in sparkling wine, regardless of the levels of supplementation with GSH.

The concentrations of the phenolic compounds are shown in Table 1. In general, GSH addition in the sparkling wine did not affect the concentration of phenolic compounds related to wine aging, such as coumaric and caffeic acid (di Lecce, Boselli, D'Ignazi, & Frega, 2013), once no sample supplemented with GSH differed from the control sample. The thiol group of GSH can react with the quinone of the phenolic acids and form the GRP (Singleton et al., 1985), which has an o-dihydroxyphenol structure, therefore the amount of total phenolic compounds in general increased with the storage time, regardless of GSH addition. However, there was no reduction in the concentration of free phenolic compounds analyzed in this study. Coumaric and caffeic acids present in wine are involved in the formation of dark different compounds, oxidation/condensation products, especially in the presence of GSH (Bouzanquet, Barril, Clark, Dias, & Scollary, 2012; Sonni, Clark et al., 2011). However, caffeic and coumaric acids can also react with reactive oxygen species, forming



**Table 1**  
Concentration of free SO<sub>2</sub>, acetaldehyde, color index, concentration of catechin, epicatechin, caffeic acid, coumaric acid and total phenolic compounds in sparkling wines with 1, 6, 12 and 18 months of storage.

GSH (mg L <sup>-1</sup> )	1 month	6 months	12 months	18 months
<b>FREE SO<sub>2</sub> (mg L<sup>-1</sup>)</b>				
0 (control)	9.98 ± 1.13 Aa	11.02 ± 1.62 Aa	10.25 ± 1.39 Ba	7.33 ± 0.59 Aa
10	14.25 ± 1.18 Aa	9.78 ± 2.32 Aab	12.85 ± 2.51 ABa	7.88 ± 0.22 Ab
20	14.43 ± 0.50 Aa	12.33 ± 5.36 Aab	15.82 ± 0.56 Aa	8.40 ± 0.42 Ab
30	15.03 ± 0.73 Aa	9.80 ± 0.24 Ab	13.75 ± 2.12 ABab	10.83 ± 2.67 Aab
<b>ACETALDEHYDE (mg L<sup>-1</sup>)</b>				
0 (control)	71.09 ± 1.43 Aa	67.21 ± 2.44 Aa	69.00 ± 4.05Aa	66.44 ± 2.03 ABa
10	64.07 ± 2.22 Aa	66.43 ± 2.70 Aa	65.23 ± 3.19ABa	70.29 ± 4.43 Aa
20	70.46 ± 2.54 Aa	68.83 ± 1.80 Aa	62.12 ± 2.02 Bb	61.53 ± 4.09 Bb
30	71.35 ± 1.08 Aa	63.20 ± 3.22 Ab	61.92 ± 4.04 Bb	63.16 ± 4.08 Bb
<b>COLOR INDEX*</b>				
0 (control)	0.015 ± 0.004 Ac	0.025 ± 0.006 Aab	0.029 ± 0.001 Aa	0.021 ± 0.001 Ab
10	0.016 ± 0.002 Ab	0.019 ± 0.002 Bb	0.029 ± 0.003 ABa	0.019 ± 0.001 Ab
20	0.015 ± 0.002 Ab	0.019 ± 0.001 Bab	0.024 ± 0.001 Ba	0.019 ± 0.001 Aab
30	0.015 ± 0.002 Ab	0.017 ± 0.002 Bb	0.027 ± 0.002 ABa	0.019 ± 0.001 Ab
<b>CATECHIN (mg L<sup>-1</sup>)</b>				
0 (control)	3.54 ± 0.60 Aa	3.81 ± 0.24 Aa	3.30 ± 0.21 Ab	2.14 ± 0.50 Ab
10	3.99 ± 0.61 Aa	3.52 ± 0.43 Aa	3.64 ± 0.48 Aa	1.58 ± 0.16 Ab
20	4.21 ± 0.31 Aa	3.74 ± 0.41 Aa	3.97 ± 0.65 Aa	1.91 ± 0.08 Ab
30	4.35 ± 0.60 Aa	3.81 ± 0.16 Aa	3.74 ± 0.24 Aab	2.50 ± 0.22 Ab
<b>EPICATECHIN (mg L<sup>-1</sup>)</b>				
0 (control)	0.72 ± 0.02 Aa	0.76 ± 0.05 Aa	0.75 ± 0.06 Aa	0.84 ± 0.29 Aa
10	0.74 ± 0.07 Aa	0.64 ± 0.10 Aa	0.76 ± 0.06 Aa	0.46 ± 0.03 Ba
20	0.84 ± 0.15 Aab	0.72 ± 0.12 Aab	0.88 ± 0.26 Aa	0.48 ± 0.03 ABb
30	0.89 ± 0.07 Aa	0.68 ± 0.08 Aab	1.00 ± 0.04 Aa	0.48 ± 0.04 ABb
<b>CAFFEIC ACID (mg L<sup>-1</sup>)</b>				
0 (control)	0.79 ± 0.06 Acb	0.63 ± 0.01 Ac	0.91 ± 0.01 Ab	1.29 ± 0.10 ABa
10	0.66 ± 0.03 Ab	0.68 ± 0.07 Ab	1.04 ± 0.07 Aa	1.22 ± 0.09 Ba
20	0.68 ± 0.04 Ac	0.70 ± 0.08 Ac	0.98 ± 0.03 Ab	1.19 ± 0.04 Ba
30	0.66 ± 0.03 Ac	0.73 ± 0.08 Ac	1.08 ± 0.13 Ab	1.42 ± 0.02 Aa
<b>COUMARIC ACID (mg L<sup>-1</sup>)</b>				
0 (control)	0.34 ± 0.02 Aab	0.24 ± 0.04 Ab	0.36 ± 0.05 Aa	0.31 ± 0.03 Aab
10	0.30 ± 0.02 Aa	0.29 ± 0.04 Aa	0.39 ± 0.02 Aa	0.33 ± 0.07 Aa
20	0.33 ± 0.02 Aa	0.30 ± 0.04 Aa	0.40 ± 0.03 Aa	0.34 ± 0.03 Aa
30	0.30 ± 0.03 Aab	0.27 ± 0.07 Ab	0.37 ± 0.02 Aab	0.39 ± 0.04 Aa
<b>TOTAL PHENOLIC COMPOUNDS*</b>				
0 (control)	7.13 ± 0.11 Ac	7.37 ± 0.12 Ab	7.69 ± 0.02 Aa	7.63 ± 0.01 Aa
10	7.25 ± 0.23 Ab	7.54 ± 0.19 Aa	7.61 ± 0.09 Aa	7.65 ± 0.02 Aa
20	7.30 ± 0.20 Ab	7.44 ± 0.08 Aab	7.61 ± 0.04 Aa	7.57 ± 0.07 Aa
30	7.22 ± 0.12 Ab	7.41 ± 0.15 Aab	7.56 ± 0.05 Aa	7.56 ± 0.06 Aa

Means and standard deviations followed by different lowercase letters in the same line and capital letters in the same column are significantly different by ANOVA complemented by Tukey Multiple Comparison Test ( $p \leq 0.05$ ).

\* Absorbance results.

compounds o-quinone of the phenolic acid correspondent, before GSH could react directly with the phenolic acids or with the reactive oxygen species (du Toit, Lisjak, Stander, & Prevoo, 2007). The results showed that the latter case must have occurred, because the amount of caffeic and coumaric acids in sparkling wine did not reduce with GSH addition in the same proportion to the GSH concentration reduced, which leads us to believe that regardless of GSH addition, the phenolic compounds were first oxidized to o-quinone, which following reacted with GSH forming GRP, preventing extent the formation of dark polymers to a certain, and it resulted in sparkling wine browning. This hypothesis can be supported by du Toit et al. (2007), in which the musts and wines that have been protected from oxygen and, therefore, with limited quinone compounds formation, they presented the highest levels of GSH.

According to the color index analysis (Table 1), up to 6 months of storage in bottle, the addition of GSH helped to prevent oxidative browning in sparkling wine, regardless of GSH concentration added. After 12 months of storage, it was observed that the addition of 20 mg L<sup>-1</sup> of GSH prevented browning. The addition of 10 mg L<sup>-1</sup> of GSH seems to be insufficient to maintain the sparkling wine color; and adding 30 mg L<sup>-1</sup> might have been excessive,

therefore, GSH parts may have formed adducts with carbonyl compounds (Sonni, Moore et al., 2011), which may have reacted to form dark polymers. Probably the excess of GSH did not react with the free caffeic acid as suggested in a previous study (Bouzanquet et al., 2012), because the caffeic acid concentration increased with storage time.

These results are in agreement with the study by Sonni, Clark et al. (2011) conducted in model wines in which the presence of high concentrations of GSH initially showed a protective effect against oxidative coloring, but eventually induces the formation of color under conditions conducive to oxidation. Furthermore, Sonni, Clark, et al. (2011) demonstrated that when GSH induced browning, the formed polymeric pigments were different from those found in the model wine without GSH.

A significant difference in caffeic acid content of sparkling wine in storage time was probably due to hydrolysis of the ester bond of the caftaric acid during aging when it was released free caffeic acid (di Lecce, Boselli, D'ignazi, & Frega, 2013). The coumaric acid concentrations did not vary with the addition of GSH nor increased with storage time, showing a different behavior compared to caffeic acid, particularly in storage time. This shows the influence of structural variations between caffeic acid and coumaric in



reactions involving these phenolic acids and GSH previously reported by Bouzanquet et al. (2012).

Despite the promising results presented in previous studies in model wine with addition of GSH, its addition in the sparkling wine, in general, showed little influence on the concentration of the analyzed compounds. This is because, in most cases, studies in model wine usually do not have the wine complex composition and, due to this complexity, GSH can react with the various components or with the resulting products of the various reactions which can occur between these components, as discussed above. Furthermore, the model wines used in some studies are made with higher concentrations of the components studied than those that actually contain the wines and they are usually subjected to extreme oxidizing conditions.

#### 4. Conclusion

The addition of 20 mg L<sup>-1</sup> of GSH after disgorging results in a lower color index, smaller amounts of acetaldehyde and the same quantity of phenolic compounds in stored bottles for 12 months. The amount of GSH stabilized within the first six months of bottling, but the total amount of glutathione remained higher in sparkling wine with the addition of 30 mg L<sup>-1</sup> of GSH in up to 12 months of storage.

#### Acknowledgements

To the Foundation for Research of Rio Grande do Sul State – Brazil (FAPERGS), the National Counsel of Technological and Scientific Development – Brazil (CNPq) and Piagentini Winery – Brazil for financial support.

#### References

- Andujar-Ortiz, I., Pozo-Bayón, M. A., Moreno-Arribas, M. V., Martín-Álvarez, P. J., & Rodríguez Bencomo, J. J. (2012). Reversed-phase high-performance liquid chromatography–fluorescence detection for the analysis of glutathione and its precursor  $\gamma$ -glutamyl cysteine in wine and model wine supplemented with oenological inactive dry yeast preparations. *Food Analytical Methods*, 5, 154–161.
- Barril, C., Clark, A. C., & Scollary, G. R. (2012). Chemistry of ascorbic acid and sulfur dioxide as an antioxidant system relevant to white wine. *Analytica Chimica Acta*, 722, 186–193.
- Bouzanquet, Q., Barril, C., Clark, A. C., Dias, D. A., & Scollary, G. R. (2012). A novel glutathione-hydroxycinnamic acid product generated in oxidative wine conditions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60, 12186–12195.
- Cejudo-Bastante, M. J., Perez Coello, M. S., & Hermosin-Gutiérrez, I. (2010). Identification of new derivatives of 2-S-glutathionylcaltaric acid in aged white wines by HPLC–DAD–ESI–MS. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 58, 11483–11492.
- Cheyrier, V., Souquet, J. M., & Moutouner, M. (1989). Glutathione content and glutathione to hydroxycinnamic acid ratio in *Vitis vinifera* grapes and must. *American Journal of Enology and Viticulture*, 40, 320–324.
- Clark, A. C., Vestner, J., Barril, C., Maury, C., Prenzler, P. D., & Scollary, G. R. (2010). The influence of stereochemistry of antioxidants and flavanols on oxidation processes in a model wine system: Ascorbic acid, erythorbic acid, (+)-catechin and (–)-epicatechin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 1004–1011.
- Coetzee, C., & du Toit, W. J. (2012). A comprehensive review on Sauvignon blanc aroma with a focus on certain positive volatile thiols. *Food Research International*, 45, 287–298.
- Comuzzo, P., & Zironi, R. (2013). Biotechnological strategies for controlling wine oxidation. *Food Engineering Reviews*, 5, 217–229.
- Danilewicz, J. C., Seccombe, J. T., & Whelan, J. (2008). Mechanism of interaction of polyphenols, oxygen and sulfur dioxide in model wine and wine. *American Journal of Enology and Viticulture*, 59, 128–136.
- di Lecce, G., Boselli, E., D'Ignazi, G., & Frega, N. G. (2013). Evolution of phenolics and glutathione in Verdicchio wine obtained with maceration under reductive conditions. *LWT – Food Science and Technology*, 53, 54–60.
- du Toit, W. J., Lisjak, K., Stander, M., & Prevoo, D. (2007). Using LC-MSMS to assess glutathione levels in South African white grape juices and wines made with different levels of oxygen. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 2765–2769.
- Fracassetti, D., Coetzee, C., Vanzo, A., Ballabio, D., & du Toit, W. J. (2013). Oxygen consumption in South African Sauvignon Blanc wines: Role of glutathione, sulphur dioxide and certain phenolics. *South African Journal of Enology and Viticulture*, 34, 156–169.
- Gómez-Alonso, S., García-Romero, E., & Hermosin-Gutiérrez, I. (2007). HPLC analysis of diverse grape and wine phenolics using direct injection and multidetection by DAD and fluorescence. *Journal of Food Composition and Analysis*, 20, 618–626.
- Granato, D., Calado, V. M. A., & Jarvis, B. (2014). Observations on the use of statistical methods in Food Science and Technology. *Food Research International*, 55, 137–149.
- Grant-Preece, P., Fang, H., Schmidtke, L. M., & Clark, A. C. (2013). Sensorially important aldehyde production from amino acids in model wine systems: Impact of ascorbic acid, erythorbic acid, glutathione and sulphur dioxide. *Food Chemistry*, 141, 304–312.
- Hosry, L., Auezova, L., Sakr, A., & Hajj-Moussa, E. (2009). Browning susceptibility of white wine and antioxidant effect of glutathione. *International Journal of Food Science and Technology*, 44, 2459–2463.
- Kritzinger, E. C., Bauer, F. F., & du Toit, W. J. (2013). Role of glutathione in winemaking: A review. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 61, 269–277.
- Kritzinger, E. C., Stander, M. A., & du Toit, W. J. (2013). Assessment of glutathione levels in model solution and grape ferments supplemented with glutathione-enriched inactive dry yeast preparations using a novel UPLC-MS/MS method. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 30, 80–92.
- Labrousse, F., Clark, A. C., Prenzler, P. D., & Scollary, G. R. (2005). Isomeric influence on the oxidative coloration of phenolic compounds in a model white wine: Comparison of (+)-catechin and (–)-epicatechin. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 53, 9993–9999.
- Lavigne, V., Pons, A., & Dubourdieu, D. (2007). 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 A*, 1139, 130–135.
- Li, H., Guo, A., & Wang, H. (2008). Mechanisms of oxidative browning of wine. *Food Chemistry*, 108, 1–13.
- Marchand, S., & de Revel, G. (2010). A HPLC fluorescence-based method for glutathione derivatives quantification in must and wine. *Analytica Chimica Acta*, 660, 158–163.
- Nikolantonaki, M., Magiatis, P., & Waterhouse, A. L. (2014). Measuring protection of aromatic wine thiols from oxidation by competitive reactions vs wine preservatives with ortho-quinones. *Food Chemistry*, 163, 61–67.
- OIV (Organisation internationale de la vigne et du vin) (2016). *Code International des Pratiques Oenologiques – resolutions OIV-OENO 445 and 446-2015*, Paris. URL: <http://www.oiv.int/public/medias/2695/code-2016-fr.pdf> Accessed 12.06.16.
- Oliveira, C. M., Silva Ferreira, A. C., De Freitas, V., & Silva, A. M. S. (2011). Oxidation mechanisms occurring in wines. *Food Research International*, 44, 1115–1126.
- Panero, L., Motta, S., Petrozziello, M., Guaita, M., & Bosso, A. (2015). Effect of SO<sub>2</sub> reduced glutathione and ellagitannins on the shelf life of bottled white wines. *European Food Research Technology*, 240, 345–356.
- Ribèreau-Gayon, P., Dubourdieu, D., Donèche, B., Louvand, A. (2003). *Tratado de Enología. 1. Microbiología del vino – Vinificaciones. 2. Química del vino – Estabilización y tratamientos (1ª edición)*, Hemisferio Sur, Buenos Aires, Argentina.
- Rodríguez-Bencomo, J. J., Andujar-Ortiz, I., Moreno-Arribas, V., Simó, C., González, J., Chana, A., Dávalos, J., & Pozo-Bayón, A. (2014). Impact of glutathione-enriched inactive dry yeast preparations on the stability of terpenes during model wine aging. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 62, 1373–1383.
- Roussis, I. G., Lambropoulos, I., & Tzimas, P. (2007). Protection of volatiles in a wine with low sulfur dioxide by caffeic acid or glutathione. *American Journal of Enology and Viticulture*, 58, 274–278.
- Roussis, I. G., & Sergianitis, S. (2008). Protection of some aroma volatiles in a model wine medium by sulphur dioxide and mixtures of glutathione with caffeic acid or gallic acid. *Flavour and Fragrance Journal*, 23, 35–39.
- Saucier, C., Bourgeois, G., Vitry, C., Roux, D., & Glories, Y. (1997). Characterization of (p)-catechin-acetaldehyde polymers: A model for colloidal state of wine polyphenols. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 45, 1045–1049.
- Singleton, V. L., Salgues, M., Zaya, J., & Trousdale, E. (1985). Caltaric acid disappearance and conversion to products of enzymic oxidation in grape must and wine. *American Journal of Enology and Viticulture*, 36, 50–56.
- Sonni, F., Clark, A. C., Prenzler, P. D., Riponi, C., & Scollary, G. R. (2011). Antioxidant action of glutathione and the ascorbic acid/glutathione pair in a model white wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59, 3940–3949.
- Sonni, F., Moore, E. G., Clark, A. C., Chinnici, F., Riponi, C., & Scollary, G. R. (2011). Impact of glutathione on the formation of methylmethine- and carboxymethine-bridged (+)-catechin dimers in a model wine system. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59, 7410–7418.
- Torresi, S., Frangipane, M. T., & Anelli, G. (2011). Biotechnologies in sparkling wine production. Interesting approaches for quality improvement: A review. *Food Chemistry*, 129, 1232–1241.
- Waterhouse, A. L., & Laurie, V. F. (2006). Oxidation of wine phenolics: A critical evaluation and hypotheses. *American Journal of Enology and Viticulture*, 57, 306–313.
- Webber, V., Dutra, S. V., Spinelli, F. R., Marcon, A. R., Carnieli, G. J., & Vanderlinde, R. (2014). Effect of glutathione addition in sparkling wine. *Food Chemistry*, 159, 391–398.

**4.4. CAPÍTULO 4 – Preparação e caracterização de micropartículas de  $\beta$ -ciclodextrina/glutationa e quitosana/glutationa obtidas por spray-dryer**

Artigo será submetido para Química Nova

**PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE MICROPARTÍCULAS DE  $\beta$ -  
CICLODEXTRINA/GLUTATIONA E QUITOSANA/GLUTATIONA OBTIDAS POR  
SPRAY-DRYING**

**Vanessa Webber<sup>a,\*</sup>, Daniel de Siqueira Ferreira<sup>a</sup>, Pedro Luis Manique Barreto<sup>b</sup>, Sabrina  
Matos de Carvalho<sup>b</sup>, Valéria Weiss Angeli<sup>a</sup>, Regina Vanderlinde<sup>a,c</sup>**

<sup>a</sup> Instituto de Biotecnologia, Universidade de Caxias do Sul, 95070-560 Caxias do Sul – RS, Brasil

<sup>b</sup> Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, 88034-001 Florianópolis – SC, Brasil

<sup>c</sup> Laboratório de Referência Enológica, Instituto Brasileiro do Vinho, 95084-470 Caxias do Sul – RS, Brasil

\* e-mail: [vwebber@ucs.br](mailto:vwebber@ucs.br)

**PREPARATION AND CHARACTERIZATION OF MICROPARTICLES OF  $\beta$ -  
CYCLODEXTRIN/GLUTATHIONE AND CHITOSAN/GLUTATHIONE OBTAINED BY  
SPRAY-DRYING**

The aim of this work was to prepare and characterize spray-dried microparticles using  $\beta$ -cyclodextrin ( $\beta$ -CD) or chitosan as polymers for encapsulation of glutathione (GSH) for its addition to wine to prevent oxidation. SEM showed spherical microparticles, with wrinkled surfaces for  $\beta$ -CD/GSH and smooth surfaces for chitosan/GSH microparticles. A wide distribution of particle size was observed and,  $\beta$ -CD/GSH showed an average diameter smaller than the chitosan/GSH microparticles. FT-IR showed a possible interaction between GSH and both polymers. DSC and DRX showed that encapsulation process produced a marked decrease in GSH crystallinity. The encapsulation efficiency was 25.0 % for chitosan/GSH and 62.4 % for  $\beta$ -CD/GSH microparticles. The GSH release profiles from microparticles showed that  $\beta$ -CD can control the release behaviors of GSH better than chitosan in a model wine. Cumulative release data were fitted to an empirical equation to compute diffusional exponent ( $n$ ), which indicated the non-Fickian trend for GSH release.

Keywords: microparticles, chitosan, cyclodextrin, glutathione.

## INTRODUÇÃO

A glutathione ( $\gamma$ -glutamyl-cysteinyl-glycine; GSH) é o tiol de baixo peso molecular mais abundante nas células animais. É um tripeptídeo linear sintetizado a partir de aminoácidos, através da ação sequencial da  $\gamma$ -glutamylcisteína e da glutathione sintetase.<sup>1</sup> O par redox GSH/glutathione dissulfeto (GSSG) é o principal determinante da capacidade antioxidante das células.<sup>2</sup> A GSH é capaz de reagir com um radical livre para formar a glutathione dissulfeto (GSSG ou glutathione oxidada), que é desprovida de atividade antioxidante, mas que pode ser reduzida pela glutathione redutase que utiliza NADPH como substrato, regenerando a GSH.<sup>1,3</sup> Porém, a GSH pode ser perdida de modo irreversível em meios muito susceptíveis à oxidação e, na falta da enzima e/ou substrato, a GSH permanece na forma oxidada, não sendo novamente reduzida.<sup>4</sup>

A glutathione é um componente natural de muitas frutas que tem o papel importante de inibir a oxidação de sucos de frutas, vinhos e outros alimentos.<sup>5</sup> No vinho branco, a GSH desempenha um papel importante na proteção contra o escurecimento e contra a perda de aromas devido ao processo oxidativo.<sup>6-8</sup> A GSH inibe formação de polímeros escuros, pois evita a polimerização que ocorre a partir dos compostos o-quinonas presentes nos vinhos devido à oxidação dos compostos fenólicos. A GSH com o seu grupo tiol servindo como um centro nucleofílico rico em elétrons substitui o anel eletrofílico da quinona do ácido cafeico. Essa substituição regenera a forma hidroquinona da metade do ácido cafeico. O produto formado *Grape Reaction Product* (GRP, ex: ácido 2-S-glutathionilcafeico), que não é escuro e não é facilmente oxidável.<sup>9-11</sup> Devido à sua propriedade antioxidante, a adição de glutathione como um ingrediente funcional em alimentos é sugerida.<sup>2</sup> Entretanto, a aplicação de GSH em alimentos é limitada por apresentar baixa biodisponibilidade devido à pouca absorção celular<sup>12</sup> e à sua instabilidade<sup>13</sup>. Quando adicionada em vinhos a GSH livre se perde rapidamente.<sup>14,15</sup> Em vista disso, a encapsulação de GSH em um sistema polimérico capaz de proteger o peptídeo contra oxidação química e/ou enzimática parece ser uma alternativa promissora.<sup>16-18</sup>

Sistemas de encapsulação vêm sendo utilizados para proteger ingredientes sensíveis contra as condições ambientais (como luz, oxigênio, água e temperatura) que o alimento é submetido durante seu processamento e seu armazenamento.<sup>19</sup> Estes sistemas permitem que uma barreira polimérica proteja a substância bioativa contra condições de oxidação, agindo como um mecanismo de liberação controlada, resultando em uma melhor estabilidade da substância.<sup>13,19</sup>



Além disso, a encapsulação tem sido aplicada para melhorar a funcionalidade e a biodisponibilidade de substâncias bioativas.<sup>20-22</sup>

A quitosana é um polímero amplamente utilizado para liberação oral de muitas proteínas e fármacos, pois não é tóxica, é biodegradável, biocompatível e tem boas propriedades mecânicas.<sup>13</sup> A quitosana é obtida pela reação de desacetilação da quitina em meio alcalino. A quitina é um polímero natural, extraído de exoesqueleto de crustáceos e insetos, composto pelas unidades monoméricas de  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)-2-amino-2-desoxi-D-glicose e  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)-2-acetamida-2-desoxi-D-glicose. Este polímero natural possui uma estrutura cristalina altamente organizada, tem baixa reatividade química e é insolúvel em meio aquoso e na maioria dos solventes orgânicos, porém pode se dissolver facilmente em soluções de ácidos fracos diluídos, como o ácido acético.<sup>23</sup> Micropartículas de quitosana podem ser facilmente obtidas por gelificação iônica entre grupos catiônicos da quitosana e ânions multivalentes.<sup>13</sup> Kafedjiiski et al.<sup>18</sup> sintetizaram e caracterizaram o conjugado quitosana-glutationa e concluíram que ele pode ser capaz de carregar macromoléculas hidrofílicas, além de melhorar as propriedades mucoadesivas e a permeabilidade de fármacos *in vitro*.

Estudos anteriores reportaram a inclusão de ciclodextrinas (CDs) em sistemas de nanopartículas de quitosana.<sup>17, 24</sup> A inclusão de CDs em estruturas de micro ou nanopartículas foi realizada visando melhorar a capacidade dessas partículas de carregarem compostos pouco solúveis,<sup>25</sup> no entanto, os estudos mostraram que micropartículas de CD podem também carrear moléculas hidrofílicas com alta eficiência.<sup>16, 24</sup> As CDs são obtidas a partir do amido, e são adequadas para microencapsulação por inclusão molecular. São formadas por um número variável de glucose unidas entre si por ligações  $\alpha$ -1,4. As mais comuns são  $\alpha$ -CD,  $\beta$ -CD e  $\gamma$ -CD, com 6, 7 e 8 unidades de glucose, respectivamente. Têm a forma de um cone truncado, com uma cavidade hidrofóbica no centro e uma camada externa hidrofílica, portanto, solúveis em água.<sup>25</sup> As CDs são capazes de interagir com a parte hidrofóbica das cadeias laterais de compostos peptídeos ou proteínas e assim, impedir em certa medida sua degradação.<sup>18</sup> Lopodota et al.<sup>16</sup> sugerem uma fraca interação entre GSH e CDs, sendo que a espinha dorsal do peptídeo pode ser parcialmente incluída na cavidade da CD, enquanto grupos de ácido carboxílico e amina polares e o grupo tiol permanecem fora da cavidade. Essa interação, mesmo sendo fraca, é capaz de evitar a degradação da GSH por endopeptidases.<sup>27</sup>

Portanto, este trabalho tem como objetivo preparar e caracterizar micropartículas de quitosana e de  $\beta$ -CD contendo GSH através do método de aspersão por spray dryer.



## PARTE EXPERIMENTAL

### Materiais

Os componentes das micropartículas como: glutathiona reduzida ( $\geq 98.0\%$ , G4251), quitosana (baixo peso molecular, 448869) e  $\beta$ -ciclodextrina ( $\geq 97.0\%$ , C4767) foram comprados da Sigma-Aldrich do Brasil. O ácido 5,5-ditiobis(2-nitrobenzóico) utilizado na quantificação da GSH também foi obtido da Sigma-Aldrich ( $\geq 98\%$ , BioReagent, adequado para determinação de grupos sulfífril, D8130). Os demais reagentes utilizados foram adquiridos da Merck Brasil.

### Preparação das micropartículas de $\beta$ -ciclodextrina

Foram adicionados 13,02 mM de GSH (4 g) e de  $\beta$ -ciclodextrina (14,78 g) em 500 mL de água destilada. Após a completa dissolução dos componentes sob agitação, a mistura foi seca em spray dryer (Büchi) em temperatura de entrada de 200 °C (controlada), temperatura de saída de 72 °C, aspiração de 100 % ( $35\text{ m}^3\text{ h}^{-1}$  de volume de fluxo) e fluxo da bomba de 20 % (fluxo de alimentação de  $10\text{ mL min}^{-1}$ ). O rendimento em micropartículas resultantes do processo de secagem foi calculado através da seguinte equação: rendimento = [(peso das micropartículas secas)/ (peso total de sólidos na solução antes da secagem)] \* 100.

### Preparação das micropartículas de quitosana

As micropartículas de quitosana foram preparadas conforme metodologia de Koo et al.<sup>13</sup> com algumas modificações. Foram adicionados 5 gramas de quitosana em 250 mL de solução de ácido acético 2 % (pH= 4,5) e a solução foi mantida sob agitação por 12 h até a completa dissolução da quitosana. Esta solução foi diluída com adição de 250 mL de água destilada. Em 250 mL desta solução contendo 2,5 g de quitosana foram adicionados 200 mL de solução aquosa contendo 12,5 g de GSH. A mistura final obtida foi seca em spray dryer (Büchi) em temperatura de entrada de 130 °C (controlada), temperatura de saída de 47 °C, aspiração de 100 % ( $35\text{ m}^3\text{ h}^{-1}$  de volume de fluxo) e fluxo da bomba de 20 % (fluxo de alimentação de  $10\text{ mL min}^{-1}$ ). O rendimento em micropartículas resultantes do processo de secagem foi calculado através da seguinte equação: rendimento = [(peso das micropartículas secas)/ (peso total de sólidos na solução antes da secagem)] \* 100.

## **Caracterização físico-química das micropartículas**

### *Análise morfológica*

A avaliação morfológica das micropartículas foi realizada através de microscopia eletrônica de varredura. As micropartículas foram anexadas em uma fita adesiva de carbono condutiva para microscopia sobre um porta-amostras. Após, foi realizada uma deposição de ouro à plasma em atmosfera de argônio por cerca de 2 minutos. A morfologia da superfície das partículas foi avaliada em um microscópio eletrônico de varredura modelo SSX-550 Shimadzu operando em alto vácuo. Todas as micrografias foram obtidas nos aumentos em ampliação original de 1000 e 3000 vezes.

### *Espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier - FTIR*

Os espectros na região do infravermelho foram obtidos em um espectrômetro modelo Nicolet IS 10 da Thermo Scientific. Esta análise foi realizada para as amostras de GSH,  $\beta$ -CD, quitosana micropartículas de  $\beta$ -CD/GSH e quitosana/GSH, e da mistura dos componentes das micropartículas nas mesmas proporções utilizadas nas suas preparações. Para esta análise as amostras foram preparadas em forma de pastilhas contendo KBr (grau espectroscópico IR). As amostras foram analisadas de 450 a 4000  $\text{cm}^{-1}$  com resolução de 1  $\text{cm}^{-1}$ .

### *Calorimetria exploratória diferencial – DSC*

As curvas de DSC foram obtidas com um DSC-60 – modelo DAC-60 da Shimadzu. Aliquotas de 5 mg de cada amostra foram colocadas em placas de alumínio. As medidas por DSC foram realizadas por aquecimento das amostras até 250 °C a uma taxa de 5 °C  $\text{min}^{-1}$ . Esta análise foi realizada para as amostras de GSH,  $\beta$ -CD, quitosana, micropartículas de  $\beta$ -CD/GSH e quitosana/GSH, e da mistura dos componentes das micropartículas nas mesmas proporções utilizadas nas suas preparações.

### *Análise Termogravimétrica – TGA*

As curvas termogravimétricas das amostras dos padrões GSH,  $\beta$ -CD, quitosana, destes mesmos padrões dissolvidos e submetidos a secagem por spray dryer, e micropartículas de  $\beta$ -

CD/GSH e quitosana/GSH foram obtidas utilizando um equipamento Shimadzu TGA-50, na faixa de temperatura de 23 °C a 800 °C, com uma taxa de aquecimento de 10 °C min<sup>-1</sup> em atmosfera de N<sub>2</sub> com fluxo de 50 mL min<sup>-1</sup>. A massa utilizada foi de aproximadamente 10 mg de amostra em pó.

#### *Difratometria de Raios X – DRX*

As análises por difratometria de raios-X foram realizadas utilizando um Difratorômetro de Raios-X (Shimadzu, XRD6000X). As amostras foram escaneadas de 5° a 40°.

#### **Recuperação da GSH microencapsulada**

Uma concentração teórica de 50 mg L<sup>-1</sup> de GSH em forma de micropartículas de β-CD/GSH e de quitosana/GSH foi dissolvida em vinho modelo. Para preparação do vinho modelo, 5g L<sup>-1</sup> de ácido tartárico foram adicionados em solução hidroalcoólica 12 %. O pH foi ajustado a 3,5 com NaOH 1N. A concentração de ácido tartárico foi escolhida para que simulasse a ação de todos os ácidos do vinho e produzisse uma acidez titulável final ~ 4 g L<sup>-1</sup>.<sup>28,29</sup> Para garantir a total dissolução do polímero e do fármaco, as soluções de micropartículas a 50 mg L<sup>-1</sup> de GSH permaneceram no ultrassom por 15 min à temperatura ambiente. Após foi medida a concentração de GSH em espectrofotômetro, conforme metodologia descrita abaixo. A porcentagem de GSH recuperada das micropartículas foi calculada através da seguinte equação:

$$\text{Recuperação de GSH \%} = [(\text{GSH Medida}) / (\text{GSH Total Teórica})] * 100$$

A GSH total teórica é a quantidade de GSH na microcápsula supondo que toda a GSH adicionada no seu preparo esteja presente na alíquota de micropartícula utilizada e a GSH medida é a quantidade de GSH recuperada lida em espectrofotômetro, após a diluição total do polímero e do fármaco.

#### **Eficiência de Encapsulação**

A eficiência de encapsulação (EE%) será obtida através da relação entre a concentração de GSH na superfície das micropartículas e o conteúdo total de GSH nas partículas após a

secagem em spray dryer, dividida pela GSH total teórico (GSH adicionada na preparação das micropartículas) e é expressa em porcentagem de GSH encapsulada, calculada utilizando a Equação 1 exposta a seguir.<sup>13,30</sup>

$$EE = \frac{GSH\ total - GSH\ superficial}{GSH\ total\ teórico} \times 100 \quad (\text{Equação 1})$$

A concentração de GSH na superfície das micropartículas foi realizada conforme metodologia adaptada de Quispe-Condori, Saldaña e Temelli<sup>30</sup>, considerando que a solubilidade da GSH em água é alta e muito maior que a dos polímeros. Foi pesada 4,662 mg de micropartículas de  $\beta$ -CD/GSH e 1,204 mg das micropartículas quitosana/GSH, para resultar em uma concentração teórica total de 100 mg L<sup>-1</sup> de GSH quando dissolvidas em 10 mL. As micropartículas foram acondicionadas em um filtro de papel e percoladas com 2 mL de água destilada até o total escoamento desta para um béquer. O procedimento de percolação foi realizado cinco vezes. A quantificação da GSH superficial foi realizada através da quantificação de GSH contida na água destilada que percolou o filtro contida no béquer (n=3).

### **Cinética de Liberação da GSH**

Foi pesada 46,62 mg de micropartículas de B-CD/GSH e 12,04 mg das micropartículas quitosana/GSH, para resultar em uma concentração teórica total de 100 mg L<sup>-1</sup> de GSH quando dissolvidas em 100 mL. As micropartículas foram dispersas em 100 mL de vinho modelo e a concentração de GSH liberada foi analisada por espectrofotometria em 0,17; 0,50; 0,83; 1,00; 1,17; 2,83; 3,50; 4,00; 5,33; 6,00; 25,00 e 48,00 horas (n=3).

### **Quantificação de GSH**

A quantificação da GSH foi realizada por espectrofotometria, segundo metodologia adaptada de Rahman et al.<sup>31</sup> Este método envolve oxidação de GSH através do reagente sulfidril 5,5-diotio-bis(ácido 2-nitrobenzóico) (DNTB) para formar o derivado amarelo ácido 5-tio-2-nitrobenzóico (TNB), medido a absorvância de 412 nm. Para esta análise, em cubetas de quartzo de 10 mm de caminho ótico, foram pipetados 0,4 mL da amostra, 1,6 mL de solução tampão fosfato (pH 7,5) e 2,0 mL de solução de DNTB. Após 1 min da reação, a amostra foi analisada à 412 nm em espectrofotômetro PerkinElmer, modelo Lambda 40. A solução

tampão fosfato foi preparada com  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  (10 mM) em água ultrapura; com pH ajustado a 7,5 usando solução de ácido ortofosfórico. A solução de DNTB é composta de 2 mg de DNTB em 3 mL de tampão fosfato. As concentrações de GSH presente nas amostras foram calculadas através de curva analítica em solução hidroalcoólica com pH 3,8 feita no mesmo dia em que as amostras foram analisadas e nas seguintes concentrações de GSH 10, 20, 30, 40, 50, 75, 100  $\text{mg L}^{-1}$ .

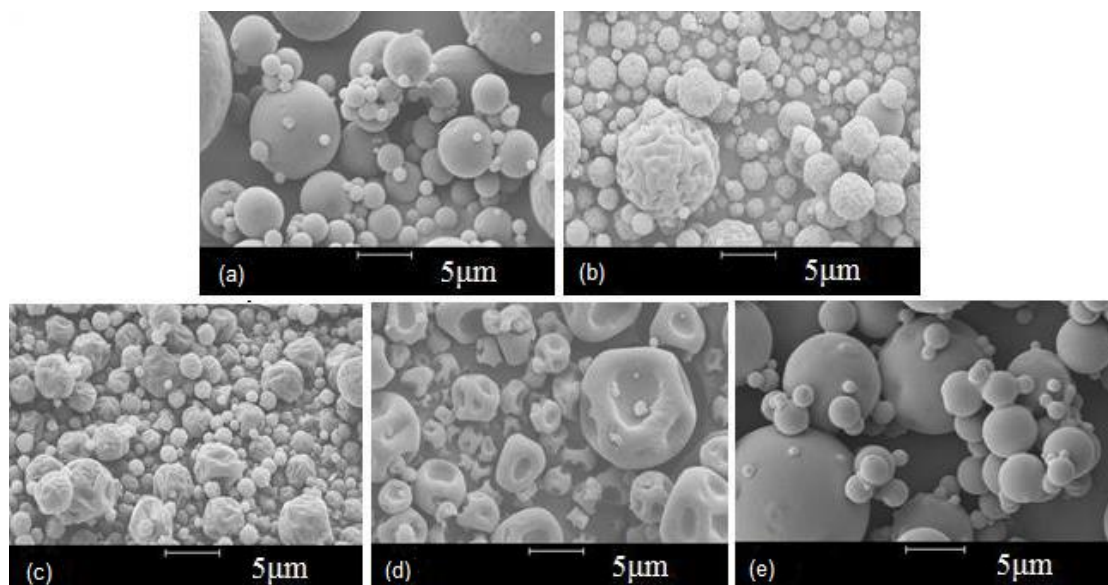
## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Caracterização físico-química das micropartículas

#### *Análise morfológica*

A análise morfológica das micropartículas quitosana/GSH e  $\beta$ -CD/GSH mostrou a presença de partículas esféricas e com ampla distribuição de tamanho para ambas as formulações (Figura 1). Comparando as Figuras 1a e 1c foi possível observar que, em média, as micropartículas de  $\beta$ -CD apresentaram diâmetros menores do que as de quitosana. As micropartículas de  $\beta$ -CD apresentaram-se como uma esfera com depressões superficiais aparentes enquanto as micropartículas de quitosana mostraram superfícies lisas e sem depressões. As micropartículas  $\beta$ -CD/GSH apresentaram uma superfície externa arredondada, sem trincas aparentes ou porosidade (Figura 1c), aspectos indicativos de boa proteção do material do núcleo. Essa morfologia também foi observada em micropartículas obtidas com goma arábica, secas por pulverização.<sup>32</sup>

As depressões superficiais das micropartículas de  $\beta$ -CD e as rugosidades observadas nas micropartículas de quitosana são características do processo rápido de secagem por pulverização em spray dryer. Estes resultados estão de acordo com as morfologias apresentadas por Oliveira et al.<sup>33</sup> de microesferas de quitosana e por Zhang et al.<sup>34</sup> e de Oliveira et al.<sup>35</sup> em micropartículas de quitosana e  $\beta$ -CD, ambos utilizando secagem por spray-drying.



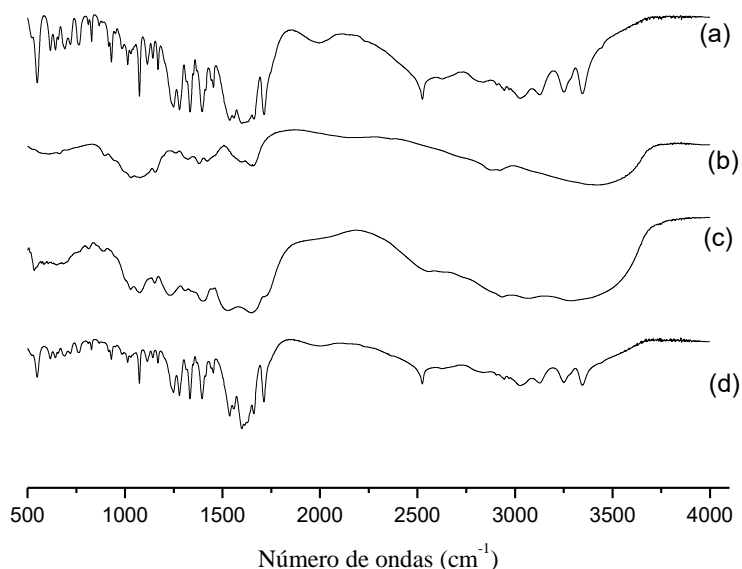
**Figura 1.** Micrografias obtidas por MEV das micropartículas de (a) quitosana/GSH, (b) quitosana, (c)  $\beta$ -CD/GSH, (d)  $\beta$ -CD, (e) GSH

A Figura 1 (1b e 1d) mostra as micrografias dos materiais de parede (quitosana e  $\beta$ -CD, respectivamente) secos em spray dryer sem adição do composto ativo. Comparando as morfologias das micropartículas com as dos polímeros sem adição do composto ativo podemos observar algumas diferenças. A micrografia da micropartícula de quitosana/GSH apresentou morfologia diferente da morfologia do polímero de quitosana, que apresentou depressões superficiais contínuas. Porém a morfologia da micropartícula de quitosana/GSH foi similar a morfologia da GSH pura submetida diluição em água e posterior secagem em spray dryer (Figura 1e), o que pode ser indicativo de uma baixa interação entre a quitosana e a GSH. Por outro lado, a morfologia da micropartícula de  $\beta$ -CD/GSH mostrou diferenças tanto em relação a morfologia da  $\beta$ -CD quanto a da GSH que foram submetidas ao mesmo processo de secagem das micropartículas. A micrografia de  $\beta$ -CD mostrou grandes cavidades e uma forma não esférica e a da GSH mostrou-se esférica e lisa, enquanto as micropartículas mostraram forma esférica não regular com algumas depressões superficiais. Estes resultados demonstram uma possível interação entre o polímero,  $\beta$ -CD, e o composto ativo, GSH.

#### *Espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier - FTIR*

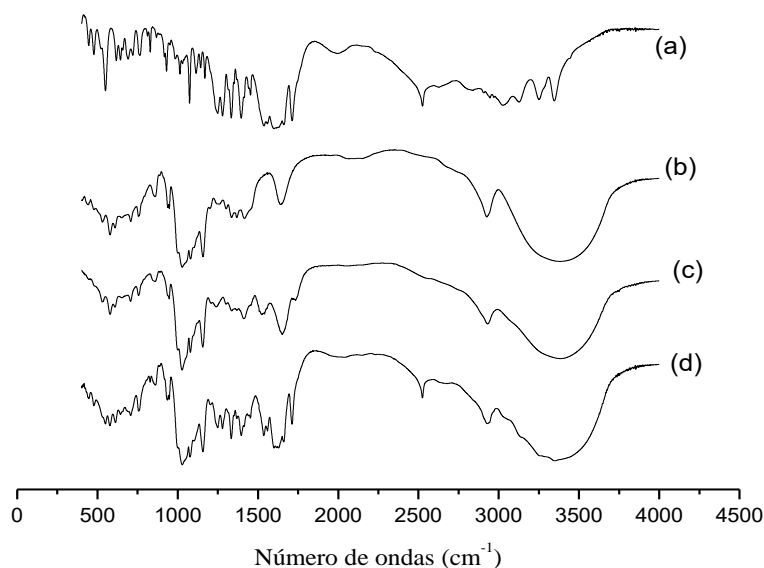
Os espectros de FTIR da GSH, da quitosana e da  $\beta$ -CD puras, assim como das micropartículas e da mistura física dos componentes das micropartículas foram registrados (Figura 2 e 3, respectivamente). Os espectros obtidos para a quitosana, para a  $\beta$ -CD e para a glutathione

separadamente são similares aos obtidos em estudos anteriores.<sup>16,24,34,36</sup> O espectro de GSH pura (Figura 2a e 3a) mostrou bandas de absorção fortes atribuídas a estiramentos carbonil e amida ( $1713\text{ cm}^{-1}$  e  $1600\text{ cm}^{-1}$ , respectivamente), bem como a banda referente ao grupo -SH em  $2525\text{ cm}^{-1}$ .



**Figura 2.** Espectros na região do infravermelho para (a) GSH, (b) quitosana, (c) micropartículas quitosana/GSH, (d) mistura física quitosana e GSH

As bandas características da quitosana são a  $3426\text{ cm}^{-1}$  (estiramentos -OH e -NH<sub>2</sub>),  $2922\text{ cm}^{-1}$  e  $2872\text{ cm}^{-1}$  (estiramento -CH),  $1601\text{ cm}^{-1}$  (estiramento -NH<sub>2</sub>),  $1078\text{ cm}^{-1}$  (estiramento C-O-C) e  $601\text{ cm}^{-1}$  (vibração do estiramento do anel piranosídico) (Figura 2b).<sup>24</sup> A estrutura química da quitosana apresenta dois grupamentos polares capazes de formar ligações de hidrogênio, o grupo hidroxila e o grupo amino. No espectro da micropartícula quitosana/GSH (Figura 2c) a banda na região do estiramento OH e NH desloca-se para valores menores ( $3300\text{ cm}^{-1}$ ), sugerindo interações via ligações de hidrogênio entre os componentes na micropartícula. O espectro das micropartículas quitosana/GSH mostra uma banda sobreposta em  $2525\text{ cm}^{-1}$  referente ao grupo -SH da GSH. O espectro obtido da mistura física de quitosana e GSH (Figura 2d) foi similar ao espectro da GSH pura e diferente do espectro da micropartícula quitosana/GSH, sugerindo uma possível interação entre o polímero e a GSH.



**Figura 3.** Espectros na região do infravermelho para (a) GSH, (b)  $\beta$ -CD, (c) micropartículas  $\beta$ -CD/GSH, (d) mistura física  $\beta$ -CD e GSH

Os espectros na região do infravermelho da micropartícula de  $\beta$ -CD foram muito semelhantes aos do polímero puro. Os picos característicos de  $\beta$ -CD incluem  $3400\text{ cm}^{-1}$  (estiramento -OH),  $2927\text{ cm}^{-1}$  (estiramento -CH),  $1640\text{ cm}^{-1}$  (flexão H-O-H),  $1400\text{ cm}^{-1}$  (flexão -OH),  $1156\text{ cm}^{-1}$  (estiramento -CO),  $1028\text{ cm}^{-1}$  (estiramento C-O-C) e  $950\text{ cm}^{-1}$  (vibração do esqueleto envolvendo a ligação  $\alpha$ -1,4).<sup>24,36</sup> O espectro da micropartícula de  $\beta$ -CD mostra uma banda forte em  $1646\text{ cm}^{-1}$  atribuída à flexão H-O-H do polímero, uma banda fraca em  $1713\text{ cm}^{-1}$  dos estiramentos carbonil da GSH e uma banda fraca sobreposta em  $2525\text{ cm}^{-1}$  referente ao grupo -SH da GSH (Figura 3c), sugerindo uma possível interação entre o polímero e a GSH.<sup>16</sup>

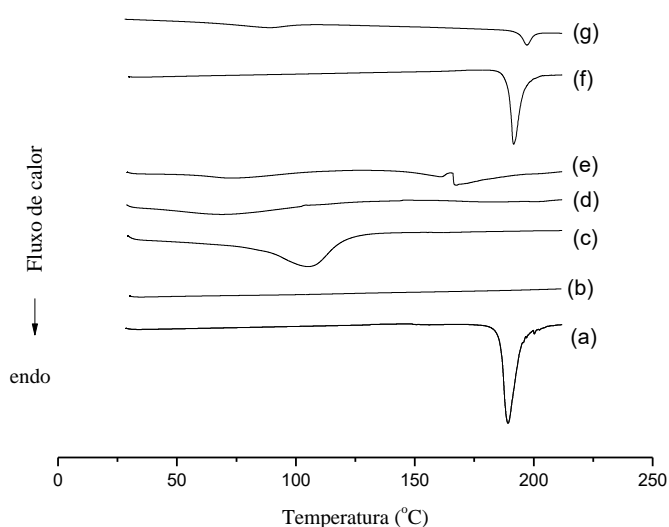
O espectro obtido da mistura física de quitosana e GSH (Figura 3d) mostra picos característicos dos dois componentes, diferentemente do espectro das microcápsula  $\beta$ -CD/GSH o qual foi mais similar ao espectro da  $\beta$ -CD pura, o que indica a possibilidade de interação entre a  $\beta$ -CD e a GSH.

#### *Calorimetria Exploratória Diferencial – DSC*

Os perfis de DSC da quitosana, da  $\beta$ -CD, da GSH e das duas formulações das micropartículas são mostrados na Figura 4. O perfil da GSH pura exibiu um único pico endotérmico a  $196\text{ }^{\circ}\text{C}$ , correspondente à fusão da GSH. Nos perfis de DSC das micropartículas contendo GSH o pico



em 196 °C não esteve presente e os termogramas são semelhantes aos dos polímeros, principalmente com relação às micropartículas de quitosana. Estes resultados, tomados em conjunto, estão de acordo com os resultados obtidos por Lopedota et al.<sup>16</sup> no qual o processo de encapsulação também produziu uma diminuição acentuada na cristalinidade de GSH e conferiu a ela um estado quase amorfo. Provavelmente causado pela intercalação das cadeias de GSH e as cadeias poliméricas. No caso do sistema  $\beta$ -CD/GSH, outra causa provável é a pequena concentração de GSH na formulação da micropartícula, quando comparada a concentração do polímero.



**Figura 4.** Termogramas de DSC: (a) GSH, (b) quitosana, (c)  $\beta$ -CD, (d)  $\beta$ -CD/GSH, (e) quitosana/GSH, (f) mistura física quitosana e GSH, (g) mistura física  $\beta$ -CD e GSH

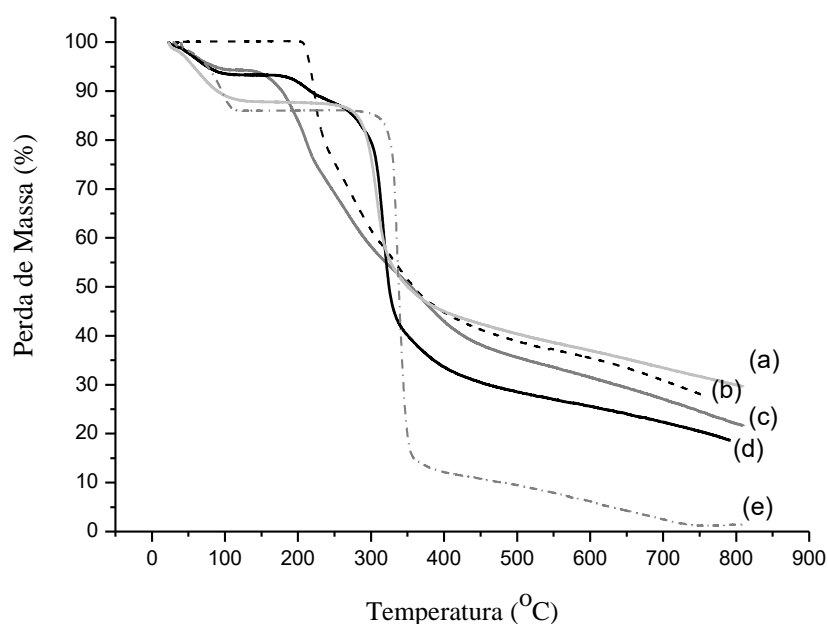
#### *Análise Termogravimétrica – TGA*

As análises termogravimétricas foram realizadas para avaliar a estabilidade térmica das micropartículas e também dos seus componentes individualmente, como mostra a Figuras 5.

A curva termogravimétrica da GSH padrão não houve perda de massa até 205 °C. Acima de 205 °C foi observada perda de massa de 55 % entre 200 °C e 400 °C e, após 400 °C uma perda de massa menos acentuada com patamar final indefinido, conforme observado por Baek, Choy e Choi.<sup>37</sup>

A quitosana na primeira etapa de decomposição apresentou uma perda de água inicial de 10 % até 100 °C. Entre 100 e 280 °C a curva termogravimétrica da quitosana apresentou perda de massa de 5 % e entre 280 e 380 °C uma perda de 35 %, correspondente a desacetilação e

despolimerização do composto. Entre 380-700 °C apresentou uma perda de 20 % e, acima de 700 °C, a perda continua com patamar indefinido. Estes resultados são similares aos obtidos em estudos anteriores.<sup>38-41</sup>



**Figura 5.** Termogramas das amostras de (a) quitosana, (b) GSH, (c) micropartículas de quitosana/GSH, (d) micropartículas de  $\beta$ -CD/GSH, (e)  $\beta$ -CD

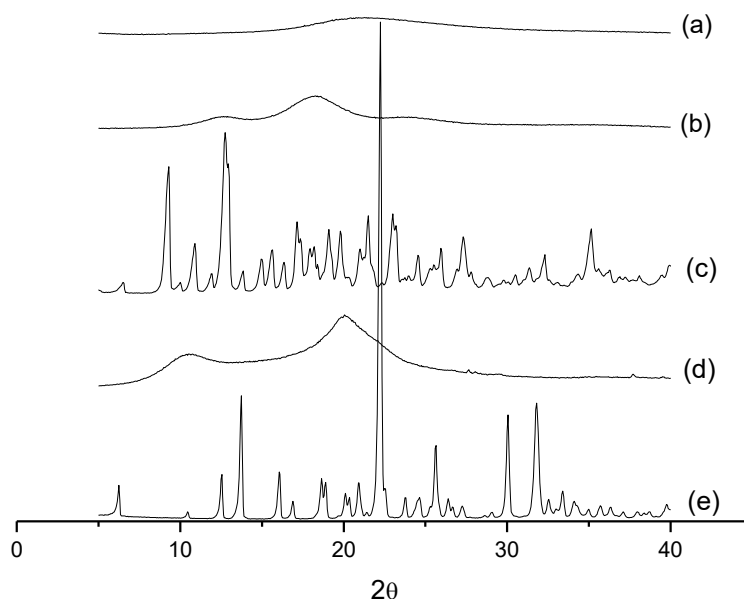
O termograma da  $\beta$ -CD apresentou três etapas de decomposição. A primeira etapa de 15 % de perda de massa até 120 °C é referente à evaporação de água, que pode ser observada também no termograma de DSC como o pico endotérmico nesta faixa de temperatura (Figura 4 c). O segundo evento térmico de decomposição (70 %) iniciou em 290 °C. Este evento foi reportado anteriormente por outros autores nesta mesma faixa de temperatura.<sup>42</sup> O mecanismo envolvido nesta fase de transição não está claro ainda, mas parece estar associado à hidratação do cristal que ocorre com a síntese de  $\beta$ -CD, que pode estar presente em formas cristalinas diferentes com uma possível transição entre elas.<sup>43</sup> As formas pseudomórficas prevalentes para os cristais de  $\beta$ -CD são as formas decahidratado ou dodecahidratado. As diferenças estruturais destes hidratos dependem da quantidade de moléculas de água e de como elas são dispostas no interior da ciclodextrina. Isto explica a fusão e a decomposição da  $\beta$ -CD em temperaturas acima de 300 °C, e está principalmente relacionado à ausência de um pico de fusão claro, antes da decomposição,<sup>42</sup> como pode ser observado na curva de DSC (Figura 5 c).

Comparando as curvas termogravimétricas dos componentes das micropartículas de forma isolada com as das micropartículas contendo GSH, podemos observar que a curva termogravimétrica da micropartícula de quitosana/GSH inicialmente é similar a da quitosana pura, apresentando uma perda de água até a temperatura de 100 °C. A partir desta temperatura a curva termogravimétrica da micropartícula de quitosana/GSH apresenta uma perda de massa com perfil similar ao da GSH pura seca em *spray dryer*. Estes resultados sugerem que não houve proteção da GSH contra a degradação. Entretanto, um comportamento diferente pôde ser observado para a amostra  $\beta$ -CD/GSH. A curva termogravimétrica das micropartículas  $\beta$ -CD/GSH mostra que há uma perda de água até 100 °C e que, até 290 °C não há perda de massa, como ocorreu para a amostra de  $\beta$ -CD. Portanto, provavelmente houve uma proteção da molécula de GSH, evitando sua degradação a partir dos 150 °C até 290 °C. Até a temperatura de 320 °C a degradação das micropartículas  $\beta$ -CD/GSH foi similar ao perfil da  $\beta$ -CD pura. À 320 °C uma perda de massa de 42 % ocorreu na micropartícula e posteriormente a perda de massa continua menos acentuada. O termograma das micropartículas  $\beta$ -CD/GSH foi, portanto diferente da GSH pura e da  $\beta$ -CD pura, sugerindo que ocorreu uma interação entres os compostos, conferindo maior estabilidade térmica à GSH.

Comparando as curvas termogravimétricas das duas micropartículas (Figura 5c e 5d) podemos observar que a micropartícula  $\beta$ -CD/GSH conferiu maior estabilidade em relação ao aumento de temperatura quando comparada a micropartícula quitosana/GSH.

#### *Difratometria de Raios X – DRX*

Os difratogramas de quitosana,  $\beta$ -CD, GSH e das micropartículas de quitosana e  $\beta$ -CD carregadas com GSH são mostrados na Figura 6. Assim como nos estudos anteriores, a quitosana mostrou um estado amorfo para parcialmente cristalino,<sup>44</sup> apresentando dois picos característicos em  $2\theta$  de 11°, que corresponde a cristais hidratados e em 20° que corresponde a cristais anidros (Figura 5 c).<sup>24,44</sup> Por outro lado, os padrões de  $\beta$ -CD e de GSH apresentaram fortes características cristalinas, com vários picos fortes nos difratogramas. O espectro de difração de raios-X da GSH cristalina foi caracterizado por um pico intenso em  $2\theta$  de 22,3° e dois picos de baixa intensidade a  $2\theta$  de 9-11°.<sup>16</sup> Nos espectros de raios-X das micropartículas esses picos estão ausentes, ou fortemente reduzidos, o que indica que a GSH pode existir como dispersão molecular nas micropartículas poliméricas.<sup>45</sup>



**Figura 6.** Difratomogramas das micropartículas de quitosana (a), das micropartículas de  $\beta$ -CD (b), da  $\beta$ -CD (c), da quitosana (d) e da GSH (e)

No espectro de difração das micropartículas de quitosana o pico em  $2\theta$  de  $20^\circ$  da quitosana torna-se ainda mais amplo. É conhecido que a largura do raio-X do pico de difração está relacionado com o tamanho de cristalito, o pico alargado geralmente resulta de um cristal imperfeito. Assim, o pico largo das micropartículas podem ser resultado da reação de reticulação entre o polímero e a GSH, o que pode destruir a estrutura cristalina dos compostos.<sup>46</sup>

Estes resultados estão de acordo com resultados anteriores obtidos com a análise dos compostos estudados<sup>16,24,44,47</sup> e sugerem que o processo de microencapsulação ocasiona uma redução na cristalinidade da GSH e/ou confere a ela um estado quase amorfo.

### **Rendimento, Recuperação e Eficiência de Encapsulação**

O rendimento do processo de preparação em micropartículas (Tabela 1) foi maior para a formulação das micropartículas de  $\beta$ -CD/GSH quando comparado ao rendimento em micropartículas da formulação de quitosana/GSH. Estes resultados estão de acordo com os rendimentos obtidos em outros estudos sobre a obtenção de micropartículas por spray

dryer,<sup>32,34,48</sup>, sendo previamente esperada uma perda significativa dos componentes que ficam retidos no equipamento devido ao processo de secagem. O rendimento do processo de secagem depende muito da configuração do equipamento, por isso estes dados não são relatados na maioria dos estudos<sup>32</sup> e também por isso são de difícil comparação com os demais estudos.

**Tabela 1.** Rendimento, percentual de recuperação e eficiência de encapsulação das formulações de micropartículas de quitosana/GSH e de  $\beta$ -CD/GSH

Formulação	Rendimento %	Recuperação % (n=3)	EE% (n=3)
quitosana/GSH	49,2	100,5 $\pm$ 9,5	25,0 $\pm$ 14,4
$\beta$ -CD/GSH	61,7	109,7 $\pm$ 1,0	62,4 $\pm$ 12,2

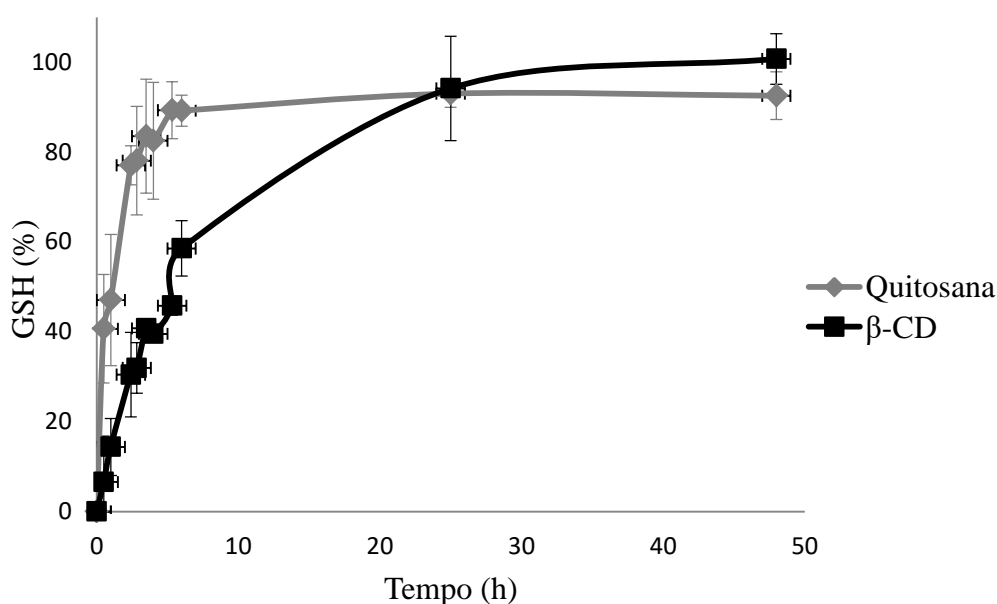
Através do doseamento da GSH após a dissolução das micropartículas (Tabela 1) foi possível recuperar totalmente a GSH adicionada a ambas formulações,  $\beta$ -CD/GSH e quitosana/GSH. Os resultados sugerem que o processo de preparação não ocasionou perda e/ou degradação do composto ativo, considerando que as variações que ocorreram para mais ou para menos de 100% podem ser explicadas devido a heterogeneidade das alíquotas retiradas do pó de micropartículas, tendo em vista que as eficiências de encapsulação foram menores que 100%. A capacidade da quitosana e da  $\beta$ -CD reter a GSH foi determinada através da eficiência de encapsulação (Tabela 1). Podemos observar que a GSH apresentou menor afinidade com a quitosana do que com a  $\beta$ -CD, provavelmente devido a baixa massa molar do peptídeo e a presença de somente um grupo de carga negativa na sua estrutura.<sup>17</sup> Ikeda et al.<sup>49</sup> utilizaram a  $\beta$ -CD para formar complexos de inclusão com captopril, e os resultados mostraram a inclusão total da molécula na cavidade da  $\beta$ -CD com o ácido carboxílico localizado dentro da cavidade e a parte terminal tiol para fora da cavidade. Com a GSH, provavelmente a parte interna da cavidade de  $\beta$ -CD se liga a uma porção do L-glutamato da cadeia lateral da GSH assim como ocorreu com a GSH e a  $\alpha$ -CD em estudo anterior.<sup>27</sup> Dados obtidos por RMN mostram que a associação entre GSH e  $\alpha$ -CD ocorre na ordem de 55-70 M<sup>-1</sup> a 25 °C e,<sup>27</sup> apesar de alguns sinais sobrepostos impedirem uma medida precisa das constantes de complexação entre GSH e uma ciclodextrina quimicamente modificada (sulphobutyl ether- $\beta$ -cyclodextrin), Trapani et al.<sup>17</sup> sugerem uma afinidade semelhante. Em estudo recente realizado por Cutrignelli et al.,<sup>50</sup> a eficiência de encapsulação da GSH em lipossomas contendo GSH ou complexos de inclusão contendo GSH/ciclodextrinas ( $\beta$  e quimicamente modificadas) foi entre 13,6 e 23,7 %.

Em relação a conjugação entre quitosana e GSH, uma das formas possíveis seria pelo método de polimerização de radicais, através da formação da ligação amida entre os grupos carboxílicos da glicina da GSH e os grupos amina da quitosana.<sup>13,18</sup> Provavelmente, a eficiência de encapsulação da micropartícula de quitosana/GSH não foi maior porque não foram adicionados catalisadores para reação e, o tempo de reação foi curto quando comparado a outros estudos.<sup>13,18</sup> Além disso, o pH da solução não foi ajustado para valores próximos a neutralidade; o que pode ter dificultado a conjugação através da polimerização de radicais. Em pH 7 o resíduo de glicina de GSH é particularmente móvel, enquanto a parte glutamina da GSH é a mais rígida.<sup>51</sup> Portanto, em pH de 4,5, resultante da mistura da solução de quitosana com a solução de GSH no preparo das micropartículas, a mobilidade da glicina deve ter sido um pouco reduzida, dificultando ligação entre os dois compostos. Koo et al.<sup>13</sup> encontraram eficiências de encapsulação entre 20 e 65 % na obtenção de nanopartículas de quitosana/GSH preparadas através do método de gelificação iônica com tripolifosfato de sódio, com ajuste de pH à 6 e diversas proporções variáveis de GSH e tripolifosfato de sódio. A baixa eficiência de encapsulação da micropartícula quitosana/GSH também pode-se dever ao fato de que a quitosana utilizada neste estudo possui baixo peso molecular e, por isso, as moléculas de GSH são imobilizadas em posições mais próximas e, portanto a GSH pode se auto-oxidar através da formação de ligações dissulfeto intramoleculares, apresentando menos grupos tiois livres,<sup>52</sup> tendo em vista que não foram adicionados agentes redutores durante o preparo das micropartículas.

### **Cinética de liberação da GSH em vinho modelo**

Geralmente o processo de liberação do composto ativo ocorre pelo intumescimento da rede polimérica, que ocorre quando o meio aquoso penetra na rede levando a mesma a uma expansão. Essa rede polimérica torna-se cada vez mais ampla permitindo a liberação do ativo para a fase externa até o equilíbrio termodinâmico. Neste sentido, a cinética de liberação da GSH dependerá dos seguintes fenômenos: difusão do polímero em meio aquoso, cinética de relaxamento da macromolécula, difusão do composto ativo através da rede polimérica intumescida.<sup>53,54</sup> A liberação da GSH foi testada para as amostras: quitosana/GSH e  $\beta$ -CD/GSH. A Figura 7 apresenta a liberação da GSH em intervalos entre 0,16 a 48 horas. Nota-se na Figura 7 que a liberação da GSH contida na micropartícula de quitosana/GSH é maior do que na micropartícula de  $\beta$ -CD/GSH. Nos primeiros minutos para a micropartícula de quitosana/GSH ocorre uma fase inicial de liberação rápida seguida de uma fase mais lenta

até o equilíbrio. Essa fase inicial de liberação mais rápida pode ser atribuída à GSH presente na superfície da micropartícula. Esse efeito pode ser denominado efeito *burst*. Nesse caso a liberação de cerca de 90% da GSH presente na amostra quitosana/GSH para o meio aconteceu no primeiro dia, seguido de um pequeno aumento nessa porcentagem no segundo dia. Para as micropartículas de  $\beta$ -CD/GSH essa liberação ocorreu mais lentamente e até uma hora, a concentração de GSH liberada ao meio foi menor do que  $10 \text{ mg L}^{-1}$  (limite de quantificação do método). Sendo a liberação inicial menos acentuada e o efeito *burst* menor para as micropartículas de  $\beta$ -CD/GSH do que para as micropartículas de quitosana/GSH, indicando baixo índice de GSH superficial na amostra, ou seja, a liberação se dá pela difusão da GSH do interior da matriz de  $\beta$ -CD através do intumescimento da rede polimérica.



**Figura 7.** Perfil de liberação da GSH em vinho modelo (solução hidroalcoólica 12 %, pH 3,5) à 25 °C ( $n=3$ )

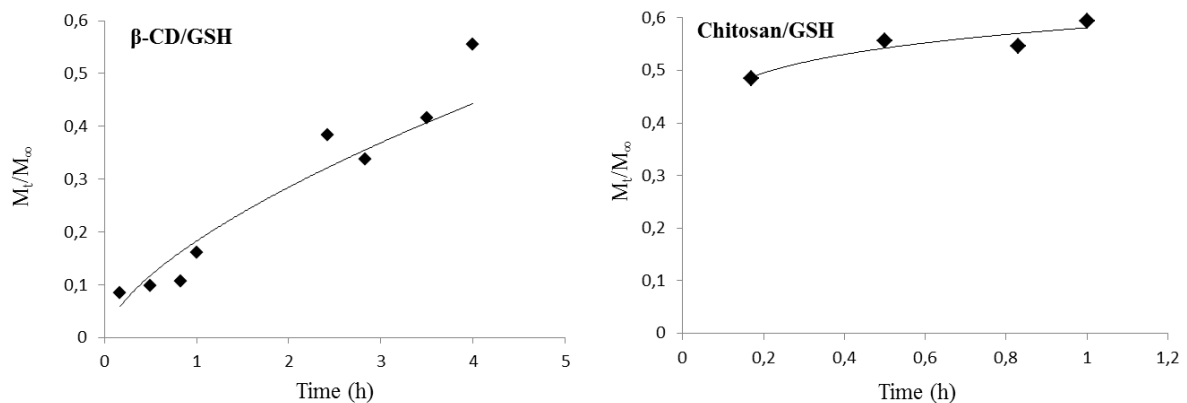
Os estudos anteriores que tratam da encapsulação da GSH em sistemas poliméricos de quitosana,  $\beta$ -CD ou quitosana/ $\beta$ -CD tratam da aplicação farmacêutica de GSH e, por isso, avaliam sua liberação em meios sintéticos diversos, por exemplo, simulando meios gástricos e intestinais,<sup>16,17,24,55</sup> o que torna difícil uma comparação. Além do mais se considerarmos os diferentes métodos de encapsulação e as diferentes formulações encontradas nos estudos anteriores. O perfil de liberação rápida é típico observado para micropartículas de quitosana e são atribuídos a um mecanismo combinado da complexação equilibrada entre quitosana e o composto ativo e da difusão do composto ativo através da camada fina da quitosana.<sup>17</sup>



Os dados de liberação *in vitro* de GSH em vinho modelo das micropartículas  $\beta$ -CD/GSH e quitosana/GSH foram fundamentados apropriadamente no modelo de Korsmeyer–Peppas, que é utilizado para determinar o mecanismo de liberação da porção inicial do composto ativo ( $M_t/M_\infty \leq 60\%$ ) através da Equação 2:

$$\frac{M_t}{M_\infty} = K t^n \quad (\text{Equação 2})$$

Na equação acima,  $M_t/M_\infty$  é a fração de GSH liberada a um tempo  $t$ ,  $K$  é a taxa constante de liberação e  $n$  é o expoente de liberação, indicativo do mecanismo de liberação da composto ativo. O valor de  $n$  é usado para caracterizar o mecanismo de liberação da GSH. Os valores de  $n$ ,  $K$  e do coeficiente de determinação ( $R^2$ ) foram obtidos através dos gráficos mostrados na Figura 8 e são mostrados na Tabela 2.



**Figura 8.** Liberação da GSH pela razão  $M_t/M_\infty$  em função do tempo para as micropartículas  $\beta$ -CD/GSH e quitosana/GSH

Para partículas esféricas,  $n=0,43$  corresponde a um mecanismo de liberação Fickniano, indicando que o composto ativo é liberado por difusão e,  $n=0,85$  corresponde ao transporte Caso II (relaxação), indicando a liberação por inchaço ou entumescimento. Valores de  $n$  entre 0,43 e 0,85 correspondem a um transporte não Fickiano ou anômalo, indicando uma superposição dos dois fatores, difusão e intumescimento.<sup>56,57</sup> O comportamento Fickiano foi observado para a partícula quitosana/GSH, o que está de acordo com os resultados de eficiência de encapsulação (Tabela 1). Além disso, os valores de  $K$  sugerem que a taxa de liberação de GSH foi superior nas micropartículas quitosana/GSH. O valor de  $n$  para as micropartículas  $\beta$ -CD/GSH foi maior do que 0,45 e menor que 0,85, o que indica que, para

esta formulação, a liberação da GSH seguiu uma liberação não-Fickiana. Portanto, no caso da micropartícula  $\beta$ -CD/GH, além da liberação da GSH por difusão, ocorreu a expansão da cadeia do polímero ocasionando penetração de fluido para dentro da matriz.<sup>24</sup> Contudo, as micropartículas  $\beta$ -CD/GH apresentaram uma liberação da GSH mais lenta quando comparadas as micropartículas quitosana/GSH.

**Tabela 2.** Parâmetros obtidos para a equação  $M_t/M_\infty = Kt^n$  para a formulação de micropartícula de  $\beta$ -CD e para a de quitosana, ambas contendo GSH

Amostra	<i>K</i>	<i>n</i>	<i>R</i> <sup>2</sup>
$\beta$ -CD/GSH	0,1826	0,64	0,89
Quitosana/GSH	0,5810	0,10	0,85

## CONCLUSÃO

Foi possível encapsular glutatona tanto utilizando  $\beta$ -CD quanto utilizando quitosana. Os métodos utilizados neste estudo são de fácil preparação, não envolvem a presença de tensoativos e, no caso das micropartículas de  $\beta$ -CD/GSH, nem solventes orgânicos. A caracterização das microcápsulas comprovaram um microrrevestimento do composto ativo e uma interação entre a GSH e os polímeros utilizados, além de melhorar a estabilidade térmica da molécula. A  $\beta$ -CD foi mais eficiente para encapsular a GSH, permitindo a liberação lenta da molécula em solução de vinho modelo e maior proteção da molécula, conferindo melhor estabilidade térmica para GSH. Outros estudos devem ser realizados a fim de melhorar a estabilidade da GSH e liberando-a mais lentamente em meios hidroalcoólicos com pHs baixos, como vinhos e espumantes, além de avaliar a viabilidade de utilização de GSH encapsulada nestes produtos.

## AGRADECIMENTOS

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS), ao Conselho Nacional para o Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro.

## REFERÊNCIAS

1. Li, Y.; *Antioxidants in biology and medicine: essentials, advances, and clinical applications*, Nova Science Publishers: New York, 2011.
2. Wu, G.; Fang, Y-Z.; Yang, S.; Lupton, J. R.; Turner, N. D.; *The Journal of Nutrition* **2003**, 489.
3. Kretzschmar, M.; *Exp. Toxicol. Pathol.* **1996**, 48, 439.
4. Jordão Jr, A. A.; Chiarello, P. G.; Bernardes, M. S. M.; Vannucchi, H.; *Medicina, Ribeirão Preto* **1998**, 31, 434.
5. Friedman, M.; *J. Agric. Food Chem.* **1994**, 42, 3.
6. Kritzinger, E. C.; Bauer, F. F.; du Toit, W. J.; *J. Agric. Food Chem.* **2013**, 61, 269.
7. Roussis, I. G.; Lambropoulos, I.; Tzimas, P.; **2007**, 58, 274.
8. Rodríguez-Bencomo, J. J.; Andújar-Ortiz, I.; Moreno-Arribas, V.; Simó, C.; Gonzáles, J.; Chana, A.; Dávalos, J.; Pozo-Bayón, A.; *J. Agric. Food Chem.* **2014**, 62, 1373.
9. Singleton, V. L.; Salgues, M.; Zaya, J.; Trousdale, E.; *Am. J. Enol. Vitic.* **1985**, 36, 50.
10. Li, H.; Guo, A.; Wang, H.; *Food Chem.* **2008**, 108, 1.
11. Comuzzo, P.; Zironi, R.; *Food Eng. Rev.* **2013**, 5, 217.
12. Allen, J.; Bradley, R. D.; *The Journal of Alternative and Complementary Medicine* **2011**, 17, 827, doi:10.1089/acm.2010.0716.
13. Koo, S. H.; Lee, J-S.; Kim, G-H.; Lee, H. G.; *J. Agric. Food Chem.* **2011**, 59, 11264.
14. Lavigne, V.; Pons, A.; Dubourdieu, D.; *J. Chromatogr. A* **2007**, 1139, 130.
15. Kritzinger, E. C.; Tese de doutorado, Universidade de Stellenbosch, África do Sul, 2012.
16. Lopedota, A.; Trapani, A.; Cutrignelli, A.; Chiarantini, L.; Pantucci, E.; Curci, R.; Manuali, E.; Trapani, G.; *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2009**, 72, 509.
17. Trapani, A.; Lopedota, A.; Franco, M.; Cioffi, N.; Ieva, E.; Garcia-Fuentes, M.; Alonso, M. J.; *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2010**, 75, 26.
18. Kafedjiiski, K.; Föger, F.; Werle, M.; Bernkop-Schnürch, A.; *Pharm. Res.* **2005**, 22, 1480.
19. Dziezak, J. D.; *Food Technol.* **1998**, 42, 136.
20. Parada, J.; Aguilera, J. M.; *J. Food Sci.* **2007**, 72, 2, R21.
21. Rasheed, A.; Kumar, A.; Sravanthi V.; *Sci. Pharm.* **2008**, 76, 567.
22. Huang, Q.; Yu, H.; Ru, Q.; *J. Food Sci.* **2010**, 75, 1, R50.
23. Laranjeira, M. C. M.; Fávare, V. T.; *Quím. Nova* **2009**, 32, 672.
24. Jingou, J.; Shilei, H.; Weiqi, L.; Danjun, W.; Tengfei, W.; Yi, X.; *Colloids Surf., B* **2011**, 83, 103.

25. Del Valle, E. M. M.; *Process Biochem.* **2004**, 39, 1033.
26. Irie, T.; Uekama, K.; Cyclodextrins in peptide and protein delivery. *Adv. Drug Delivery Rev.* **1999**, 36, 101.
27. Garcia-Fuentes, M.; Trapani, A.; Alonso, M.J.; *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2006**, 64, 146.
28. Danilewicz, J. C.; Seccombe, J. T.; Whelan, J.; *Am. J. Enol. Vitic.* **2008**, 59, 128.
29. Papadopoulou, D.; Roussis, I.G.; *Int. J. Food Sci. Technol.* **2008**, 43, 1053.
30. Quispe-Condori, S.; Saldaña, M. D. A.; Temelli, A.; *LWT – Food Scienc. Technol.* **2011**, 44, 1880.
31. Rahman, I.; Kode, A.; Biswas, S.K.; *Nat. Protoc.* **2006**, 1, 3159.
32. Nunes, I. L.; Mercadante, A. Z.; *Braz. Arch. Biol. Technol.* **2007**, 50, 893.
33. Oliveira, B. F.; Santana, M. H. A.; Ré, M. I.; *Braz. J. Chem. Eng.* **2005**, 22, 353.
34. Zhang, W.; Chen, X.; Li, P.; He, Q.; Zhou, H.; Cha, D.; *Journal of Wuhan University of Technology-Mater* **2008**, 23, 541.
35. de Oliveira, I. R. W. Z.; Fatibello-Filho, O.; Fernandes, S. C.; Vieira, I. C.; *Quim. Nova* **2009**, 32, 1195.
36. Hu, X.; Wei, B.; Li, H.; Wu, C.; Bai, Y.; Xu, X.; Jin, Z.; Tian, Y.; *Carbohydr. Polym.* **2012**, 90, 1193.
37. Baek, M.; Choy, J-H.; Choi, S-J.; *Int. J. Pharm.* **2012**, 425, 29.
38. Nieto, J. M.; Peniche-Covas, C.; Padrón, G.; *Thermochim. Acta* **1991**, 176, 63.
39. Tirkistani, F. A. A.; *Polym. Degrad. Stab.* **1998**, 61, 161.
40. Neto, C. G. T.; Giacometti, J. A.; Job, A. E.; Ferreira, F. C.; Fonseca, J. L. C.; Pereira, M. R.; *Carbohydr. Polym.* **2005**, 62, 97.
41. Chaves, J. A. P.; Bezerra, C. W. B.; Silva, H. A. S.; Santana, A. A.; *Cadernos de Pesquisa* 2009, 16, 36.  
[http://www.pppg.ufma.br/cadernosdepesquisa/uploads/files/rev2009\\_2\\_05\\_36-43.pdf](http://www.pppg.ufma.br/cadernosdepesquisa/uploads/files/rev2009_2_05_36-43.pdf),  
acessada em setembro de 2015.
42. Barbosa, J. A. A.; Zoppi, A.; Quevedo, M. A.; Melo, P. N.; Medeiros, A. S. A.; Streck, L.; de Oliveira, A. R.; Fernandes-Pedrosa, M. F.; Longhi, M. R.; da Silva-Júnior, A. A. *Int. J. Mol. Sci.* **2014**, 15, 17077.
43. Giordano, F.; Novak, C.; Moyano, J.R.; *Thermochim. Acta* **2001**, 380, 123.
44. Papadimitriou, S. A.; Achilias, D. S.; Bikiaris, D. N.; *Int. J. Pharm.* **2012**, 430, 318.
45. Zhang, Y.; Zhuo R. X.; *Biomaterials* **2005**, 26, 2089.
46. Rokhade, A. P.; Agnihotri, S. A.; Patil, S. A.; Mallikarjuna, N. N.; Kulkarni, P. V.; Aminabhavi, T. M.; *Carbohydr. Polym.* **2006**, 65, 243.

47. Trapani, A.; Laquintana, V.; Denora, N.; Lopodota, A.; Cutrignelli, A.; Franco, M.; Trapani, G.; Liso, G.; *Eur. J. Pharm. Sci.* **2007**, 30, 64.
48. Pereira, M. R.; Cruz, L.; Ré, M. I.; Guterres, S. S.; *Acta Farm. Bonaerense* **2006**, 25, 198.
49. Ikeda, Y.; Motoune, S.; Matsuoka, T.; Arima, H.; Hirayama, F.; Uekama, K.; *J. Pharm. Sci.* **2002**, 91, 2390.
50. Cutrignelli, A.; Lopodota, A.; Denora, N.; Laquintana, V.; Tongiani, S.; Franco, M. *J. Pharm. Sci.* **2014**, 1031, 1246.
51. Krezel, A.; Bal, W.; *Org. Biomol. Chem.* **2003**, 1, 3885.
52. Atyabi, F.; Moghaddam, F. A.; Dinarvand, R.; Zohuriaan-Mehr, M. Z.; Ponchel, G.; *Carbohydr. Polym.* **2008**, 74, 59.
53. Del Nobile, M. A.; Conte, A.; Incoronato, A. L.; Panza, O.; *J. Food Eng.* **2008**, 89, 57.
54. Mastromatteo, M.; Barbuzzi, G.; Conte, A.; Del Nobile, M. A.; *Innovative Food Sci. Emerging Technol.* **2009**, 10, 222.
55. Jin, X.; Xu, Y.; Shen, J.; Ping, Q.; Su, Z.; You, W.; *Carbohydr. Polym.* **2011**, 86, 51.
56. Zuleger, S.; Lippold, B. C.; *Int. J. Pharm.* **2001**, 217, 139.
57. Siepmann, J.; Peppas, N. A.; *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2001**, 48, 139.



## 5. DICUSSÃO GERAL

Com os resultados desta tese podemos observar que a adição de GSH evita tanto a oxidação enzimática, que ocorre principalmente no mosto, quanto à oxidação química, que ocorre principalmente durante o armazenamento dos vinhos espumantes. Os efeitos da adição de GSH foram maiores no mosto que no vinho base, uma vez que o mosto se encontra em condições mais vulneráveis à oxidação. Porém, a adição de GSH no vinho base influenciou na manutenção dos níveis de SO<sub>2</sub> livre e dessa forma a GSH pode ser uma alternativa promissora para prolongar o efeito antioxidante e conservante no vinho espumante.

A adição de GSH nas diferentes etapas de elaboração do vinho espumante apresentou maior influência nos resultados do que as diversas concentrações (10, 20 ou 30 mg L<sup>-1</sup>) de GSH adicionadas. O efeito da adição de GSH sobre compostos aromáticos e fenólicos foi maior quando a GSH foi adicionada no mosto. Já no vinho base, a adição de GSH mostrou maior influência na preservação dos níveis de SO<sub>2</sub> livre, dos ésteres etílicos e acetato de isoamila. E finalmente, a adição após o degorgement não apresentou influência sobre a manutenção dos níveis de SO<sub>2</sub> livre, dos compostos fenólicos ou aromáticos, porém, teve influência na manutenção da qualidade dos vinhos espumantes, pois permitiu evitar a oxidação durante o armazenamento desses vinhos em garrafas, evitando o escurecimento e a formação de acetaldeído.

Provavelmente, quando a GSH é adicionada ao mosto a GSH reage com compostos o-quinona evitando que a cadeia de reações de oxidação que levam à formação de compostos poliméricos prossiga, proporcionando um meio de fermentação em condições reduzidas. Isto evitou a oxidação do etanol e do 2-feniletanol em acetaldeído e fenilacetaldeído, respectivamente. Possibilitando maiores quantidades de 2-feniletanol (aroma de rosas) no vinho espumante. Apesar da adição de GSH no mosto ter proporcionado condições reduzidas

ao vinho, provavelmente não evitou a oxidação dos compostos fenólicos à o-quinonas. Quando a GSH é adicionada ao vinho base ela evita que o  $\text{SO}_2$  combine com outros compostos do vinho, mantendo-o na forma livre, o que permite que o mesmo atue como conservante e antioxidante por um tempo maior e, por consequência, ajuda a prevenir a perda de compostos aromáticos, como ésteres etílicos e acetato de isoamila. Quando a GSH foi adicionada após o degorgement, evitou a formação de acetaldeído ou ainda, possibilitou uma reação de adição entre a GSH e o acetaldeído, embora este seja principalmente ligado ao  $\text{SO}_2$ . Portanto, a GSH evitou que o acetaldeído combinasse com outros compostos como a catequina, para formar polímeros maiores, os quais podem causar o escurecimento do vinho. Devido a isso, e ao fato de a GSH reagir com compostos o-quinona, sua adição após o degorgement evitou o escurecimento dos vinhos espumantes por até 12 meses de armazenamento em garrafas.

Os níveis de glutathiona total nos vinhos espumantes foram maiores quando a GSH foi adicionada no mosto, e apresentaram uma relação inversa com o escurecimento do vinho espumante durante o armazenamento. Por isso, a concentração de glutathiona total parece ser um bom indicador do potencial antioxidante do vinho.

Os níveis de GSH esgotaram rapidamente nos vinhos espumantes após a adição da mesma, independente da concentração adicionada. Os níveis de glutathiona total também reduziram rapidamente, mas de forma gradual conforme a concentração adicionada. Para evitar que a GSH esgote rapidamente do meio, combinando com outros compostos presentes no vinho, a mesma foi encapsulada em um sistema polimérico para ser liberada gradualmente, evitando assim, a formação de  $\text{H}_2\text{S}$  que ocorre em condições fortemente reduzidas, ou seja, com baixo nível de oxigênio disponível.

A encapsulação de GSH foi realizada pelo método de secagem por pulverização em spray-dryer com a utilização de quitosana ou beta-ciclodextrina. As micropartículas de  $\beta$ -

ciclodextrina contendo GSH apresentaram maior eficiência de encapsulação, protegeram melhor a molécula da GSH contra o aumento da temperatura e, liberaram a GSH de forma mais lenta em vinho modelo por dissolução do polímero. Após 48 horas toda a GSH encapsulada foi liberada ao vinho modelo. A adição da micropartícula contendo GSH antes da fermentação pode ser uma alternativa promissora para obtermos maior quantidade de GSH após a fermentação alcoólica, evitando que a mesma seja absorvida ou consumida pelas leveduras. Porém, outros agentes encapsulantes devem ser testados para obtermos uma liberação mais lenta da GSH no vinho, a fim de preservá-lo contra a oxidação durante o armazenamento.

## 6. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

A adição de GSH ao mosto influenciou mais na composição do espumante do que a adição ao vinho base. Entretanto, a adição de GSH ao vinho base pareceu manter níveis mais elevados de  $\text{SO}_2$  na forma livre.

A concentração de GSH adicionada ao mosto e/ou ao vinho base não influenciou significativamente nos resultados. A adição de  $10 \text{ mg L}^{-1}$  de GSH no mosto é suficiente para assegurar menores concentrações de ácidos cafeico, cumárico e ferrúlico nos espumantes.

A adição de  $20 \text{ mg L}^{-1}$  de GSH no espumante junto com o licor de expedição resultou em menor índice de cor, maiores quantidades de  $\text{SO}_2$  na forma livre, menores concentrações de acetaldeído e mesma quantidade de compostos fenólicos até 12 meses de armazenamento em garrafas.

A quantidade de GSH adicionada no espumante pronto decaiu em um mês de armazenamento e estabilizou nos primeiros seis meses, porém a quantidade de glutathiona total permaneceu maior no espumante com adição de  $30 \text{ mg L}^{-1}$ , até 12 meses de armazenamento.

Apesar de somente a GSH ter propriedade antioxidante, a quantidade de glutathiona total teve maior correlação com os resultados obtidos e, por isso, os níveis de glutathiona total seja um melhor indicador da condição antioxidante do vinho do que propriamente a GSH.

Foi possível encapsular glutathiona tanto utilizando  $\beta$ -CD, quanto utilizando quitosana. A caracterização das microcápsulas comprovaram um microrrevestimento do composto ativo e uma interação entre e a GSH os polímeros utilizados, além de melhorar a estabilidade térmica da molécula. A  $\beta$ -CD foi mais eficiente para encapsular a GSH, permitindo a liberação gradativa da molécula em solução de vinho modelo e maior proteção da molécula, conferindo melhor estabilidade térmica para GSH.

Com os resultados e conclusões obtidos, estabelecemos as seguintes perspectivas para continuação do trabalho:

1. Estudar a utilização de doses de GSH  $> 30 \text{ mg L}^{-1}$ , combinando técnicas enológicas destinadas a controlar as causas múltiplas de oxidação do vinho.
2. Elucidar o papel da GSH nos níveis de  $\text{SO}_2$  livre e se uso de GSH como antioxidante em vinhos poderia reduzir o uso de  $\text{SO}_2$ , utilizando níveis maiores de GSH.
3. Estudar a influência da adição de GSH nos espumantes na autólise das leveduras.
4. Estudar a influência da adição da GSH na fermentação maloláctica.
5. Estudar a influência da adição da GSH na espuma dos vinhos espumantes.
6. Encapsular a moléculas de GSH utilizando outras técnicas de obtenção de nano e/ou micropartículas e outros agentes encapsulantes a fim de melhorar a estabilidade da GSH, liberando-a mais lentamente em meios hidroalcoólicos com pHs baixos, como vinhos e espumantes, reagindo continuamente com os compostos do vinho por um maior tempo durante seu armazenamento em garrafas.
7. Avaliar a viabilidade de utilização de GSH encapsulada em vinhos e espumantes.
8. Estudar se a GSH liberada lentamente favorece que o vinho permaneça em condições reduzidas de oxigênio e evite a formação de  $\text{H}_2\text{S}$ .

## 7. BIBLIOGRAFIA COMPLEMENTAR

- Adams, D.O.; Liyanage, C. (1993). Glutathione increases in grape berries at the onset of ripening. **Am. J. Enol. Viticult.** 44: 333-338.
- Alexandre, H.; Guilloux-Benatier, M. (2006). Yeast autolysis in sparkling wine – a review. **Aust. J. Grape Wine Research** 12: 119-127.
- Andujar-Ortiz, I.; Pozo-Bayón, M.A.; Moreno-Arribas, M.V.; Martín-Álvarez, P.J.; Rodríguez Bencomo, J.J. (2012). Reversed-phase high-performance liquid chromatography–fluorescence detection for the analysis of glutathione and its precursor  $\gamma$ -glutamyl cysteine in wine and model wine supplemented with oenological inactive dry yeast preparations. **Food Anal. Method.** 5: 154-161.
- Azevedo, A.; Velloso, G. (2006). Chandon: a crença no espumante brasileiro de qualidade. **Wine Style** 6: 7-11.
- Bansode, S.S.; Banarjee, S.K.; Gaikwad, D.D.; Jadhav, S.L.; Thorat, R.M. (2010). Microencapsulation: a review. **Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res.** 1: 38-43.
- Charpeniter, C.; Feuillat, M. (1993). **Yeast autolysis**. In: G.H. Fleet (Ed.) **Wine Microbiology and Biotechnology**. Chur, Switzerland: Harwood Academic Publishers. pp. 225-242.
- Cheynier, V.; Souquet, J.M.; Moutounet, M. (1989). Glutathione content and glutathione to hydroxycinnamic acid ratio in *Vitis vinifera* grapes and must. **Am. J. Enol. Viticult.** 40(4): 320-324.
- Cilliers, J.J.L.; Singleton, V.L. (1990). Caffeic acid autoxidation and the effects of thiols. **J. Agric. Food Chem.** 38: 1789-1796.
- Comuzzo, P., & Zironi, R. (2013). Biotechnological strategies for controlling wine oxidation. **Food Engineering Reviews**, 5, 217–229.



- Del Valle, E.M.M. (2004). Cyclodextrins and their uses: A review. **Process Biochem.** 39: 1033 – 1046.
- Dubourdieu, D.; Lavigne-Cruege, V. (2004). The role of glutathione on the aromatic evolution of dry white wine. **Wine Internet Technical Journal** 2: 1-9. Disponível em: <http://www.infowine.com/default.asp?scheda=1148>. Acesso em: 22 mar. 2012.
- du Toit, W.J. ; Marais, J.; Pretorius, I.S.; du Toit, M. (2006). Oxygen in wine: A review. **S. Afr. J. Enol. Viticult.** 27: 76-94.
- du Toit, W.J.; Lisjak, K.; Stander, M.; Prevoo, D. (2007). Using LC-MSMS to assess glutathione levels in South African white grape juices and wine made with different levels of oxygen. **J. Agric. Food Chem.** 55(8): 2765-2769.
- Escudero, A.; Hernandez-Orte, P.; Cacho, J.; Ferreira, V. (2000). Clues about the role of methional as character impact odorant of some oxidized wines. **J. Agric. Food Chem.** 48: 4268–4272.
- Escudero, A.; Asensio, E.; Cacho, J.; Ferreira, V. (2002). Sensory and chemical changes of Young wines stored under oxygen. An assessment of the role played by aldehydes and some other important odorants. **Food Chem.** 77: 325-331.
- Favaro-Trindade, C.S.; Pinho, S.C.; Rocha, G.A. (2008). Revisão: Microencapsulação de ingredientes alimentícios. **Braz. J. Food Technol.** 11: 103-112.
- Fernández-Zurbano, P.; Ferreira, V.; Pefia, C.; Escudero, A.; Serrano, F.; Cacho, J. (1995) Prediction of oxidative browning in white wine as a function of their chemical composition. **J. Agric. Food Chem.** 43(11): 2813-2817.
- Fracassetti, D. (2010). Investigation on cysteinyl thiol compounds from yeast affecting wine properties. **Tese de doutorado.** Technology and Biotechnology, University of Milan, Italy.

- Fracassetti, D.; Lawrence, N.; Tredoux, A.G.T.; Tirelli, A.; Nieuwoudt, H.H.; du Toit, W.J. (2011). Quantification of glutathione, catechin and caffeic acid in grape juice and wine by a novel ultra-performance liquid chromatography method. **Food Chem.** 128(4): 1136-1142.
- Fracassetti, D.; Tirelli, A. (2015). Monitoring of glutathione concentration during winemaking by a reliable high-performance liquid chromatography analytical method. **Aust. J. Grape Wine Res.** 1-7. DOI: 10.1111/ajgw.12139 P 1-7.
- Francioli, S.; Torrens, J.; Riu-Aumatell, M.; López-Tamames, E.; Buxaderas, S. (2003). Volatile compounds by SPME-GC as age markers of sparkling wines. **Am. J. Enol. Vitic.** 54: 158-162.
- Friedman, M. (1994) Improvement in the Safety of Foods by SH-Containing Amino Acids and Peptides. A Review. **J. Agric. Food Chem.** 42(1): 3-20.
- Garcia-Fuentes, M.; Trapani, A.; Alonso, M.J. (2006). Protection of the peptide glutathione by complex formation with  $\alpha$ -cyclodextrin: NMR spectroscopic analysis and stability study **Eur. J. Pharm. Biopharm.** 64: 146 – 153.
- Hidalgo, J. (2003). **Tratado de enología**. Madrid: Mundi prensa.
- Hidalgo, P.; Pueyo, E.; Pozo-Bayón, M.A.; Martínez-Rodríguez, A.J.; Martínez-Álvarez, P.; Polo, M.C. (2004). Sensory and analytical study of rose sparkling wines manufactured by second fermentation in the bottle. **J. Agric. Food Chem.**, 52: 6640-6645.
- Hoenicke, K.; Simat, T.J.; Steinhart, H.; Christoph, N.; Gebner, M.; Köhler, H-J. (2002). Untypical aging off-flavor in wine: formation of 2-aminoacetophenone and evaluation of its influencing factors. **Anal. Chim. Acta** 458: 29–37.
- Hosry, L.; Auezova, L.; Sakr, A.; Hajj-Moussa, E. (2009). Browning susceptibility of white wine and antioxidant effect of glutathione. **Int. J. Food Sci. Technol.** 44: 2459-2463.

- Huertas, C.E. M.; Fessi, H.; Elaissari, A. (2010). Polymer-based nanocapsules for drug delivery. **Int. J. Pharm.** 385: 113–142.
- Irie, T.; Uekama, K. (1999). Cyclodextrins in peptide and protein delivery. **Adv. Drug Deliv. Rev.** 36: 101 – 123.
- Janes, L.; Lisjak, K.; Vanzo, A. (2010). Determination of glutathione content in grape juice and wine by highperformance liquid chromatography with fluorescence detection. **Anal. Chim. Acta** 674(2): 239-242.
- Jingou, J.; Shilei, H.; Weiqi, L.; Danjun, W.; Tengfei, W.; Yi, X. (2011). Preparation, characterization of hydrophilic and hydrophobic drug in combine loaded chitosan/cyclodextrin nanoparticles and in vitro release study. **Colloids Surf., B** 83: 103-107.
- Jyothi, N.V.N.; Prasanna, P.M.; Sakarkar, S.N.; Prabha, K.S.; Ramaiah, P.S.; Srawan, G.Y. (2010). Microencapsulation techniques, factors influencing encapsulation efficiency. **J. Microencapsul.** 27: 187–197.
- Kafedjiiski, K.; Föger, F.; Werle, M.; Bernkop-Schnürch, A. (2005). Synthesis and in vitro evaluation of a novel chitosan–glutathione conjugate. **Pharm. Res.** 22: 1480-1488.
- Koo, S.H.; Lee, J-S.; Kim, G-H.; Lee, H.G. (2011). Preparation, characteristics, and stability of glutathione-loaded nanoparticles. **J. Agric. Food Chem.** 59: 11264-11269.
- Kosseva, M.; Beschkov, V.; Kennedy, J.F.; Lloyd, L.L. (1998). Malolactic fermentation in chardonnay wine by immobilized *Lactobacillus casei* cells. **Process Biochem.** 33: 793–797.
- Kosseva, M.; Kennedy, J.F. (2004). Encapsulated lactic acid bacteria for control of malolactic fermentation in wine. **Artificial Cells, Blood Substitutes, and Biotechnology** 32: 55–65.

- Kourkoutasa, Y.; Bekatoroua, A.; Banatb, I.M.; Marchantb, R.; Koutinasa, A.A. (2004). Immobilization technologies and support materials suitable in alcohol beverages production: a review. **Food Microbiol.** 21: 377–397.
- Kreuter J. (1996). Nanoparticles and microparticles for drug and vaccine delivery. **J. Anat.** 189: 503–505.
- Kritzinger, E.C. (2012). Winemaking practices affecting glutathione concentrations in white wine. Master Thesis in Agricultural Sciences. Department of Viticultura and Oenology, Faculty of AgriSciences, Stellenbosch University, Stellenbosch, South Africa.
- Kritzinger, E.C.; Bauer, F.F.; du Toit, W.J. (2013). Role of glutathione in winemaking: A review. **J. Agric. Food Chem.** 61: 269–277.
- Lallemand Inc. (2011). **Levadura inactiva específica enriquecida en glutati3n. Lallemand Winemaking Update.** n.2, 2p. Dispon3vel em: <http://www.proenol.com/files/editorials/WUP%202%20-%202011%20-%20OMW%20-%20SP.pdf?u=>. Acesso em: 22 mar. 2012.
- Laranjeira, M.C.M.; F3vare, V.T. (2009). Quitosana: biopol3mero funcional com potencial industrial biom3dico. **Qu3m. Nova** 32: 672-678.
- Lavigne, V.; Pons, A.; Dubourdieu, D. (2007). Assay of glutathione in must and wine using a capillary electrophoresis and laser-induced fluorescence detection: Changes in concentration in dry white wine during alcoholic fermentation and aging. **J. Chromatogr. A** 1139(1): 130-135
- Lavigne, V.; Pons, A.; Darriet, P.; Dubourdieu, D. (2008). Changes in the sotolon content of dry white wines during barrel and bottle aging. **J. Agric. Food Chem.** 56: 2688–2693.
- Li, H.; Guo, A.; Wang, H. (2008). Mechanisms of oxidative browning of wine. **Food Chem.** 108: 1-13.

- Lopedota, A.; Trapani, A.; Cutrignelli, A.; Chiarantini, L.; Pantucci, E.; Curci, R.; Manuali, E.; Trapani, G. (2009). The use of Eudragit<sup>®</sup> RS 100/cyclodextrin nanoparticles for the transmucosal administration of glutathione. **Eur. J. Pharm. Biopharm.** 72: 509-520.
- Maicas, S. (2001). The use of alternative technologies to develop malolactic fermentation in wine. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 56: 35–39.
- Maggu, M.; Winz, R.; Kilmartin, P.A.; Trought, M.C.T.; Nicolau, L. (2007). Effect of skin contact and pressure on the composition of Sauvignon Blanc must. **J. Agric. Food Chem.** 55(25): 10281-10288.
- Marchand, S.; de Revel, G. (2010). A HPLC fluorescence-based method for glutathione derivatives quantification in must and wine. **Anal. Chim. Acta** 660(1-2): 158-1630.
- Martínez-Rodríguez, A.J.; Carrascosa, A.V.; Barcenilla, J.M.; Pozo-Bayon, M. A.; Polo, M.C. (2001). Autolytic capacity and foam analysis as additional criteria for the selection of yeast strains for sparkling wine production. **Food Microbiol.** 18: 183-191.
- Martínez-Rodríguez, A.J.; Carrascosa, A.V.; Martín-Álvarez, P.J.; Moreno-Arribas, V.; Polo, M.C. (2002). Influence of the yeast strain on the changes of amino acids, peptides and proteins during sparkling wine production by tradicional method. **J. Ind. Microbiol. Biot.** 29: 314-322.
- Martínez-Rodríguez, A.; Pueyo, E. (2009). **Sparkling Wines and Yeast Autolysis**. In: V. Moreno-Arribas, V.; Polo, M.C. (Eds.), **Wine Chemistry and Biochemistry**. New York, USA: Springer Life Sciences Science Business Media Eds., LLC. pp 61-80.
- Martynenko, N.N.; Gracheva, I.M. (2003). Physiological and biochemical characteristics of immobilized Champagne yeasts and their participation in Champagnizing processes: A Review. **Appl. Biochem. Microbiol.** 39: 439–445.
- Mével, P. (2006). A vocação da Serra Gaúcha está no espumante. Informativo ABE n° 51, Bento Gonçalves, 6 p.



- Moreno-Arribas, V.; Pueyo, E.; Polo, M.C. (1996). Peptides in musts and wines. Changes during the manufacture of cava (Sparkling wines). **J. Agric. Food Chem.** 44: 3783-3788.
- Nikolantonaki, M.; Magiatis, P.; Waterhouse, A.L. (2014). Measuring protection of aromatic wine thiols from oxidation by competitive reactions vs wine preservatives with ortho-quinones. **Food Chem.** 163: 61–67.
- Noctor, G.; Foyer, C.H. (1998). Simultaneous measurement of foliar glutathione,  $\gamma$ -glutamylcysteine, and amino acids by high-performance liquid chromatography: Comparison with two other assay methods for glutathione. **Anal. Biochem.** 264: 98-110.
- OIV. CIV SECUAL 2010-03 11. (2010). **Utilisation du Glutathion en Oenologie (Dossier toxicologique et éléments de Sécurité alimentaire)**, 17 p.
- Okuda, T.; Yokotsuka, K. (1999). Levels of glutathione and activities of related enzymes during ripening of Koshu and Cabernet Sauvignon grapes and during winemaking. **Am. J. Enol. Vitic.** 50: 264–270.
- Ough, C. S. (1992). **Winemaking basics**. New York: Food Product Press.
- Panero, L.; Motta, S.; Petrozziello, M.; Guaita, M.; Bosso, A. (2015). Effect of SO<sub>2</sub>, reduced glutathione and ellagitannins on the shelf life of bottled white wines. **Eur. Food Res. Technol.** 240: 345–356.
- Papadopoulou, D.; Roussis, I. G. (2008). Inhibition of the decrease of volatile esters and terpenes during storage of a white wine and a model wine medium by glutathione and N-acetylcysteine. **Int. J. Food Sci. Technol.** 43(6): 1053-1057.
- Park, S.K., Boulton, R.B.; Noble, A.C. (2000). Automated HPLC analysis of glutathione and thiol-containing compounds in grape juice and wine using pre-column derivatization with fluorescence detection. **Food Chem.** 68: 475-480.

- Penninckx, M. J. (2002). An overview on glutathione in *Saccharomyces* versus non-conventional yeasts. **FEMS Yeast Res.** 295–305.
- Pueyo, E.; Martín-Álvarez, P.J.; Polo, M.C. (1995). Relationship between foam characteristics and chemical composition in wines and cava (sparkling wines). **Am. J. Enol. Vitic.** 46: 518-524.
- Pueyo, E.; Martínez-Rodríguez, A.; Polo, M.C.; Santa-Maria, G.; Bartolomé, B. (2000) Release of Lipids during Yeast Autolysis in a Model Wine System. **J. Agric. Food Chem.** 48: 116–122.
- Pozo-Bayón, M.A.; Pueyo, E.; Martín-Álvarez, P.J.; Martínez-Rodríguez, A.J.; Polo, M.C. (2003). Influence of the yeast strain, bentonite addition, and aging time on volatile compounds of sparkling wines. **Am. J. Enol. Vitic.** 54: 273-278.
- Ribéreau-Gayon, P.; Dubourdieu, D.; Donèche, B.; Louvand, A. (2003). **Tratado de Enología. 1. Microbiología del vino - Vinificaciones. 2. Química del vino – Estabilización y tratamientos** (1ª edition), Hemisferio Sur, Buenos Aires, Argentina.
- Rigaud, J.; Cheynier, V.; Souquet, I.M.; Moutounet, M. (1991). Influence of must composition on phenolic oxidation kinetics. **J. Sci. Food Agric.** 57: 55-63.
- Riu-Aumatell, M.; Bosch-Fusté, J.; López-Tamames, E.; Buxaderas, S. (2006). Development of volatile compounds of cava (Spanish sparkling wine) during long ageing time in contact with lees. **Food Chem.** 95: 237–242
- Rizzon, L.; Meneguzzo, J.; Abarzua, C.E. (2000). **Elaboração de vinho espumante na propriedade vitícola.** Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, Documentos 29, 24 p.
- Rao, J.P.; Geckeler, K.E. (2011). Polymer nanoparticles: Preparation techniques and sizecontrol parameters. **Prog. Polym. Sci.** 36: 887–913.
- Roland, A.; Shneider, R.; Razungles, A.; Cavelier, F. (2011). Varietal thiols in wine: discovery, analysis and applications. **Chem. Rev.** 7355–7376.

- Roland, A.; Schneider, R. (2015). Development and validation of a high-throughput analysis of glutathione in grapes, musts and wines by Stable Isotope Dilution Assay and LC–MS/MS. **Food Chem.** 177: 152–157.
- Roussis, I.G.; Lambropoulos, I.; Tzimas, P. (2007). Protection of volatiles in a wine with low sulfur dioxide by caffeic acid or glutathione. **Am. J. Enol. Viticult.** 58: 274 -278.
- Roussis, I.G.; Sergianitis, S. (2008). Protection of some aroma volatiles in a model wine medium by sulphur dioxide and mixtures of glutathione with caffeic acid or gallic acid. **Flavour Frag. J.** 23: 35-39.
- Saracco, C.; Gozzelino, A. (1995). **Produzione dei vini espumanti e frizzanti**. Bologna: Edagricole – Edizioni Agricole della Calderini, 110 p.
- Sarakbi, A.; Kauffmann, J-M. (2014). A new chemical criteria for white wine: The glutathione equivalent capacity. **Food Chem.**153: 321–326.
- Schaffazick. R.; Guterres, S. S.; Freitas, L. L.; Pohlmann, A. R. (2003). Caracterização e Estabilidade Físico-Química de Sistemas Poliméricos Nanoparticulados para Administração de Fármacos. **Quím. Nova** 26: 726-737.
- Servetas, I.; Berbegal, C.; Camacho, N.; Bekatorou, A.; Ferrer, S.; Niga, P.; Drouza, C.; Koutinas, A.A. (2013). *Saccharomyces cerevisiae* and *Oenococcus oeni* immobilized in different layers of a cellulose/starch gel composite for simultaneous alcoholic and malolactic wine fermentations. **Process Biochem.** 48: 1279–1284.
- Shneider, V. (2007). O envelhecimento atípico dos vinhos brancos. **Revista Internet de Viticultura e Enologia**,1-8. Disponível em: [www.infowine.com](http://www.infowine.com). Acesso 15 fev. 2012
- Silva, S.; Ramon-Portugal, F.; Silva, P.; Texeira, M.F.; Strehaiano, P. (2002). Use of encapsulated yeast for the treatment of stuck and sluggish fermentations. **J. Int. Sci. Vigne Vin** 36 : 161–168.
- Silva Ferreira, A.C.; Oliveira, C.; Hogg, T.; Guedes de Pinho, P. (2003). Relationship

- between potentiometric measurements, sensorial analysis, and some substances responsible for aroma degradation of white wines. **J. Agric. Food Chem.** 51: 4668-4672.
- Silva Ferreira, A.C.; Pinho, P.G.; Rodrigues, P.; Hogg, T. (2002). Kinetics and oxidative degradation of white wines and how they are affected by selected technological parameters. **J. Agric. Food Chem.** 50: 5919-5924.
- Singleton, V.L.; Salgues, M.; Zaya, J.; Trousdale, E. (1985). Caftaric acid disappearance and conversion to products of enzymic oxidation in grape must and wine. **Am. J. Enol. Viticult.** 36: 50-56.
- Sioumis, N.; Kallithraka, S.; Makris, D.P.; Kefalas, P. (2006). Kinetics of browning onset in white wines: influence of principal redox-active polyphenols and impact on the reducing capacity. **Food Chem.** 94: 98-104.
- Sonni, F.; Clark, A.C.; Prenzler, P.D.; Riponi, C.; Scollary, G.R. (2011a). Antioxidant action of glutathione and the ascorbic acid/glutathione pair in a model white wine. **J. Agric. Food Chem.** 59: 3940–3949.
- Sonni, F.; Moore, E.G.; Clark, A.C.; Chinnici, F.; Riponi, C.; Scollary, G. R. (2011b). Impact of glutathione on the formation of methylnmethine- and carboxymethine-bridged (+)-catechin dimers in a model wine system. **J. Agric. Food Chem.** 59: 7410-7418.
- Spagna, G.; Barbagallo, R.N.; Greco, E.; Manenti, I.; Pifferi, P.G. (2002). A mixture of purified glycosidases from *Aspergillus niger* for oenological application immobilized by inclusion in chitosan gels. **Enzyme Microb. Tech.** 30: 80–9.
- Torresi, S.; Frangipane, M.T.; Anelli, G. (2011). Biotechnologies in sparkling wine production. Interesting approaches for quality improvement: A review. **Food Chem.** 129: 1232–1241.
- Trapani, A.; Lopodota, A.; Franco, M.; Cioffi, N.; Ieva, E.; Garcia-Fuentes, M.; Alonso, M. J. (2010). A comparative study of chitosan and chitosan/cyclodextrin nanoparticles as

potential carriers for the oral delivery of small peptides. **Eur. J. Pharm. Biopharm.** 75: 26-32.

Ugliano, M.; Kwiatkowski, M.; Vidal, S.; Capone, D.; Siebert, T.; Dieval, J-B.; Aagaard, O.; Waters, E.J. (2011). Evolution of 3-mercaptohexanol, hydrogen sulfide, and methyl mercaptan during bottle storage of Sauvignon blanc wines. Effect of glutathione, copper, oxygen exposure, and closure-derived oxygen. **J. Agric. Food Chem.** 59: 2564-2572.

Wu, G.; Fang, Y-Z.; Yang, S. ; Lupton, J.R.; Turner, N.D. (2004). Glutathione metabolism and its implications for health. **J. Nutr.** 134: 489 – 492.

## 8. ANEXOS

### 8.2. ANEXO I - Delineamento experimental

Foram realizados dois experimentos. No primeiro experimento foram adicionados 10 e 20 mg L<sup>-1</sup> de GSH no mosto e no vinho base, conforme planejamento experimental fatorial 3<sup>2</sup> (Tabela 1).

Tabela 1 – Delineamento experimental 1: Experimento fatorial 3<sup>2</sup>.

Experimento	Variáveis Codificadas		Variáveis Reais	
	X1	X2	GSH no mosto (mg L <sup>-1</sup> )	GSH no vinho base (mg L <sup>-1</sup> )
1	-1	-1	0	0
2	-1	0	0	10
3	-1	1	0	20
4	0	-1	10	0
5	0	0	10	10
6	0	1	10	20
7	1	-1	20	0
8	1	0	20	10
9	1	1	20	20

No segundo experimento foram adicionados 10, 20 e 30 mg.L<sup>-1</sup> de GSH após o *degorgement* (Tabela 2). Neste experimento foi avaliada a oxidação e a preservação dos compostos aromáticos durante o armazenamento do espumante pronto para o consumo.

Tabela 2 – Delineamento experimental 2: adição de GSH no momento do engarrafamento.

Experimento	Variáveis Reais	
	GSH no vinho base (mg.L <sup>-1</sup> )	GSH no espumante (mg.L <sup>-1</sup> )
1	0	0
2	0	10
3	0	20
4	0	30



As amostras foram analisadas após o engarrafamento nos períodos de 1, 6, 12, 18 meses. Foram realizadas análises de compostos aromáticos, compostos fenólicos e sensoriais. Cada tratamento foi realizado em 3 garrafas, as análises foram realizadas em triplicata para cada garrafa.