

UNIVERSIDADE DE CAXIAS DO SUL
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E BIOLÓGICAS
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

ATIVIDADE ANTIOXIDANTE, ANTIGENOTÓXICA E
ANTIMUTAGÊNICA DE EXTRATOS DE FOLHAS DE *VITIS*
***LABRUSCA* (VARIEDADE ISABEL) ORGÂNICA E CONVENCIONAL**
EM CÉLULAS DE MAMÍFERO V79

GIOVANA VERA BORTOLINI

Caxias do Sul

2012

Giovana Vera Bortolini

**ATIVIDADE ANTIOXIDANTE, ANTIGENOTÓXICA E
ANTIMUTAGÊNICA DE EXTRATOS DE FOLHAS DE *VITIS*
LABRUSCA (VARIEDADE ISABEL) ORGÂNICA E CONVENCIONAL
EM CÉLULAS DE MAMÍFERO V79**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul, visando à
obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia.

Orientadores: Prof. Dr. João A. P. Henriques

Prof^a. Dr^a. Mirian Salvador

Caxias do Sul

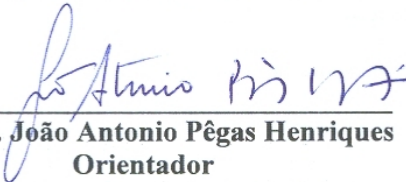
2012

GIOVANA VERA BORTOLINI

**ATIVIDADE ANTIOXIDANTE, ANTIGENOTÓXICA E ANTIMUTAGÊNICA DE
EXTRATO DE FOLHAS DE *VITIS LABRUSCA*, VARIEDADE ISABEL, ORGÂNICA
E CONVENCIONAL EM CÉLULAS DE MAMÍFERO V79**

**Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul, visando à
obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia.**

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 3 DE SETEMBRO DE 2012.



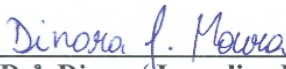
Prof. Dr. João Antonio Pêgas Henriques
Orientador



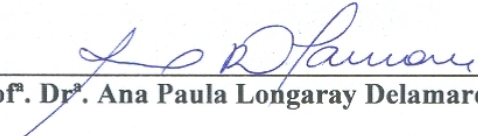
Profª. Drª. Mirian Salvador
Orientadora



Prof. Dr. Daniel Prá



Profª. Drª. Dinara Jaqueline Moura



Profª. Drª. Ana Paula Longaray Delamare

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Universidade de Caxias do Sul
UCS - BICE - Processamento Técnico

B739a Bortolini, Giovana Vera, 1985-

Atividade antioxidante, antigenotóxica e antimutagênica de extratos de folhas de *vitis labusca* (variedade Isabel) orgânica e convencional em células de mamífero v79 / Giovana Vera Bortolini. - 2012.

82 f. ; 30 cm

Apresenta bibliografia.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de Caxias do Sul, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, 2012.

“Orientação: Prof. Dr. João A. P. Henriques, Co-orientação: Profª. Drª. Mirian Salvador.”

1. Videira – Biotecnologia. 2. Células – Biotecnologia. I. Título.

CDU 2.ed.: 634.842.1:57.08

Índice para o catálogo sistemático:

- | | |
|----------------------------|-----------------|
| 1. Videira – Biotecnologia | 634.842.1:57.08 |
| 2. Células – Biotecnologia | 57.086.8 |

Catalogação na fonte elaborada pelo bibliotecário
Marcelo Votto Teixeira – CRB 10/1974

“Escolhe um trabalho de que gostes, e não terás que trabalhar nem um dia na tua vida”.

(Confúcio)

AGRADECIMENTOS

Ao final desse trabalho, gostaria de agradecer:

Aos meus orientadores, Prof. Dr. João Antonio Pêgas Henriques e Prof^a Dr^a Mirian Salvador pela confiança depositada na execução deste projeto/dissertação pela disponibilidade, auxílio, ajuda em todos os momentos e pela honra de ser orientada por duas pessoas, verdadeiramente possuidoras do conhecimento.

Ao colega e amigo Cristiano Trindade do Instituto de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul pela intensa ajuda na realização de testes e na redação do artigo e também por me acalmar nos momentos de pânico.

Ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da UCS, nas pessoas dos coordenadores Prof. Dr. Aldo Dillon e a querida secretária Lucimara Serafini além de professores e colegiado.

A Capes, CNPq e FAPERGS pelo suporte financeiro e concessão de bolsas para a realização deste trabalho.

A todos os colegas do Laboratório de Estresse Oxidativo e Antioxidantes pela companhia, auxílio e amizade. Especialmente aos colegas que estiveram ligados mais diretamente a esse trabalho: Bárbara Segalotto Costa e Joanna Carra Anghinoni (minhas queridas bolsistas).

Aos grandes amigos e “mestres na minha vida” Gustavo Scola e Patrícia Spada.

Às queridas amiga Adriana Dallpicoli Rodrigues, Márcia Souza, Fabiane Michelin, pelos cafés, pelas conversas pelas opiniões e pela troca de experiências.

À minha grande família que sempre deu suporte, acreditou, vibrou e chorou pelas conquistas e dificuldades. Obrigada do fundo do meu coração pai, mãe e Gi. Espero estar

retribuindo à altura todo amor que recebo de vocês.

Ao meu amor, Guilherme que aguentou firme aos quase três anos me levando para o laboratório praticamente de madrugada, pela choradeira quando parecia que nada dava certo. Obrigada pelo incentivo e por estar sempre ao meu lado.

À Força Sublime, seja Deus, seja Luz, seja o que for, por me dar a força que precisei para superar todas as dificuldades e percalços, sem esmorecer.

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS	5
LISTA DE ABREVIATURAS	6
RESUMO	7
ABSTRACT	8
1. INTRODUÇÃO	9
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	11
2.1 Radicais livres e antioxidantes	11
2.2 Antigenotoxicidade e antimutagenicidade.....	17
2.3 Aspectos fitoquímicos e farmacológicos das folhas de videiras.....	20
2.4 Metodologias para a avaliação da atividade antigenotóxica, antimutagênica e antioxidante.	23
3. OBJETIVOS.....	30
3.1 Objetivo geral	30
3.2 Objetivos específicos.....	30
4. RESULTADOS.....	31
Capítulo I:	32
Antioxidant, antigenotoxic and antimutagenic activities of the aqueous extracts of organic and conventional grapevine <i>Vitis labrusca</i> cv. Isabella leaves in V79 cells.....	32
5. DISCUSSÃO GERAL.....	63
6. CONCLUSÕES.....	71
7. PERSPECTIVAS.....	72
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	73

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Produção do radical hidroxila pelas reações de Fenton e Haber-Weiss.....	12
Figura 2. Núcleo fundamental e diferentes classes de flavonoides.....	14
Figura 3. Principais ácidos fenólicos não flavonoides.....	15
Figura 4. Ação simplificada da enzima superóxido dismutase.....	15
Figura 5. Ação da enzima catalase.....	16
Figura 6. Diferentes tipos de danos ao DNA e mecanismos de reparo.....	18
Figura 7: Imagem de uma Videira.....	21
Figura 8. Classes de danos ao DNA observdas pelo ensaio cometa.....	26
Figura 9. Diagrama ilustrando a origem do micronúcleo.....	28

LISTA DE ABREVIATURAS

CAT	Enzima catalase
MMS	Metil metano sulfonado
HepG2	Linhagem celular de carcionoma humano de fígado
A549	Linhagem epitelial humana de adenocarcionoma de pulmão
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNPH	Dinitrofenilhidrazina
DTNB	5,5'-dinitrobenzoico
HO [·]	Radical hidroxila
MDA	Malondialdeído
NO [·]	Óxido nítrico
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
O ₂ ^{·-}	Ânion radical superóxido
ONOO [·]	Peroxinitrito
RL	Radicais livres
ER	Espécies reativas
RO [·]	Radical alcóxil
ROO [·]	Radical peróxil
ONOO ⁻	Peroxinitrito
NO [·]	Oxido Nítrico
NO ^{·-}	Ânion nitrosônio
NO ⁺	Cátion nitrosônio
GPx	Glutationa peroxidase
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrogênio
BER	Reparação por excisão de bases
NER	Reparação por excisão de nucleotídeos
V79	Linhagem de fibroblasto de pulmão de hamster chinês
N ₂ O	Óxido Nitroso
SOD	Enzima superóxido dismutase
TBARS	Ácido tiobarbitúrico

RESUMO

A produção de uva possui um papel importante na história e na economia mundial. Atualmente os vinhedos podem ser encontrados em dois sistemas distintos de cultivos, o orgânico, onde utilização de pesticidas, fertilizantes e recursos de engenharia genética são proibidos, e o convencional que podem receber tratamento com diferentes produtos químicos. A cada safra de uva é produzida uma grande quantidade de folhas de videira, as quais são principalmente descartadas no meio ambiente ou em alguns países utilizadas na preparação de bebidas, alimentos e na medicina popular. Assim sendo, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a atividade antioxidante, antigenotóxica e antimutagênica de extratos aquosos de folhas de *Vitis labrusca* variedade Isabel. Os polifenóis, o conteúdo de ácido ascórbico e os compostos majoritários foram determinados. Nos ensaios com linhagem celular, as células V79 foram tratadas durante 3 horas com os extratos das folhas e, em seguida, expostos durante uma hora com o agente oxidante peróxido de hidrogênio ou o agente mutagênio Metil metano sulfonado (MMS). Após, a viabilidade celular foi determinada pelo ensaio de redução MTT e sobrevivência clonogênica. O nível de peroxidação lipídica e presença de grupos carbonil das proteínas foram também verificados. O efeito antigenotóxico dos extratos foi analisado pelo ensaio cometa alcalino e com a utilização das enzimas endonuclease III (ENDO III) e fosfatidil-pirimidina de DNA glicosilase (FPG), enzimas que reconhecem os danos oxidativos à purinas e pirimidinas. A atividade antimutagênica dos extratos foi avaliada pelo ensaio de micronúcleos, através de MMS, um composto reconhecidamente mutagênico. Para a determinação da atividade antioxidante *in vitro*, a capacidade de varredura do radical livre DPPH• e a capacidade dos extractos para mimetizar a atividade das enzimas Superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT) foram avaliados. O extrato orgânico apresentou quantidade superior de polifenóis, ácido ascórbico e também de quercetina-3-glucósido e rutina que o extrato convencional. No entanto, nos ensaios de viabilidade celular, ambos os extratos, orgânico convencional e preveniram a morte celular de maneira semelhante. Em se tratando de atividade antigenotóxica e antimutagênica e atividade antioxidante *in vitro*, o extrato orgânico apresentou efeitos mais pronunciados. É possível que os polifenóis e também o ácido ascórbico presente nos extratos sejam responsáveis pelos resultados encontrados nesse trabalho. Embora outros estudos sejam necessários, os dados obtidos nesse trabalho mostram que os extratos aquosos de videiras da variedade Isabel, orgânico e convencional, tem importante atividade antigenotóxica antimutagênica e antioxidante e podem estar relacionados com a diminuição na incidência de diferentes patologias.

Palavras-chave: *Vitis labrusca*, Isabel, antioxidante, antigenotóxica, antimutagênica.

ABSTRACT

The grape production plays an important role in world's economy and history. Currently, vineyards can be found in organic management, which use of pesticides, fertilizers and genetic engineering resources are prohibited, and conventional vineyards, which can be treated with different chemicals. On each harvest is produced a large amount of vine leaves, which are mainly disposed in the environment or in some countries, used in folk medicine and as food and beverage. Therefore, the objective of this study was to evaluate the antioxidant antigenotoxic and antimutagenic activities of aqueous extracts of *Vitis labrusca* leaves cv. *Isabella* variety. The polyphenols and ascorbic acid content and the major compounds were determined. The cell line V79 was treated for 3 hours with the leaves extracts and then exposed for one hour to the oxidative agent hydrogen peroxide or MMS mutagen. After that, the cell viability was analysed by MTT reduction and clonogenic survival assays, the lipid peroxidation level and protein carbonyl formation were also observed. The antigenotoxic effect of the extracts was analyzed by the alkaline comet assay and using enzyme endonuclease III (ENDO III) and phosphatidyl pyrimidine DNA glycosylase (FPG), enzymes that recognize damage to purines and pyrimidines. The antimutagenic activity of the extracts was evaluated by micronucleus assay, using MMS, a known mutagenic compound. For the determination of *in vitro* antioxidant activity the scavenging activity of the DPPH[•] was verified, and the ability of extracts to mimic the enzymes SOD and CAT. The organic extract present highest polyphenol, ascorbic acid content and also quercetin-3-glucoside and rutin. However, treatment with organic and conventional extract prevented cell death, lipid peroxidation and protein carbonyl the same manner. Moreover, the organic extract showed a better antimutagenic and antigenotoxic activity than conventional extract. Although it was observed that both extracts have *in vitro* antioxidant activity, and the organic extract showed better ability to scavenging DPPH[•], and greater SOD and CAT-like activity than the conventional. It is possible that the polyphenols and ascorbic acid present in extracts are responsible for the results found in this work. Although other studies are necessary, the data obtained in this work shows that the aqueous extracts of grapevines leaves, cv. *Isabella*, both organic and conventional management, have important antigenotoxic, antimutagenic and antioxidant activity and can minimize the damage associated with different pathologies.

Key-words: *Vitis labrusca*, *Isabella*, antioxidant, antigenotoxic, antimutagenic.

1. INTRODUÇÃO

O cultivo de videiras no Rio Grande do Sul assume grande importância na economia local e do País. A produção de uvas no Brasil, em 2011, foi da ordem de 1,4 milhões de toneladas, sendo que dessas, 829,58 mil toneladas foram produzidos no Estado do Rio Grande do Sul. Dos 81.915 mil hectares plantados no Brasil, a maior região vitícola do país é a Serra Gaúcha, que possui em torno de 50 mil hectares cultivados (Brasil, 2012).

As videiras cultivadas no mundo são do gênero *Vitis*, das espécies *V. labrusca* e *V. vinifera*, cujos frutos são utilizados para a elaboração de sucos e vinhos. A *V. labrusca* é a espécie americana há mais tempo conhecida, as videiras são mais rústicas e mais produtivas e, portanto, com custo de produção inferior ao da *V. vinifera*. No Brasil, vem sendo utilizada na produção de sucos e vinhos comuns. Entre os principais cultivares americanos está a *V. labrusca* variedade Isabel, com uma produção de cerca de 198 milhões de quilogramas no Rio Grande do Sul (Brasil, 2011).

O plantio de uvas apresenta dois tipos distintos de vinhedos, o convencional e o orgânico. No convencional, as videiras podem receber tratamento com fertilizantes sintéticos solúveis e agrotóxicos. No manejo orgânico, as videiras são cultivadas com o emprego de insumos naturais, mas sem a utilização de agrotóxicos, adubos químicos e/ou outras substâncias tóxicas e sintéticas (IFOAM, 2005). Nesse contexto, observa-se uma associação entre o conteúdo de polifenóis e a presença/ausência de pesticidas. Em alguns cultivares (uvas, amoras, pêssegos, peras e tomates) a prática orgânica possibilitou um aumento no conteúdo de compostos fenólicos (Carbonaro *et al.*, 2002; Asami *et al.*, 2003, Dani *et al.*, 2007, Hallmann, 2012), no entanto, em ameixas esse conteúdo foi superior no cultivo convencional (Lombardi-Boccia *et al.*, 2004).

Diversos estudos já relacionaram o conteúdo de polifenóis e vitaminas presentes em

frutas e vegetais com a diminuição na incidência de doenças relacionadas ao estresse oxidativo tais como Alzheimer, Parkinson, aterosclerose, câncer, entre outras (para revisão ver Valko *et al.*, 2007; Scheffrin, 2010, Firuzi *et al.*, 2011; Hu, 2011). No entanto, das folhas de videiras que apresentam polifenóis na sua composição e que têm sido tradicionalmente utilizadas como alimento e para a preparação de bebidas, ainda se tem poucos estudos.

Na medicina tradicional, os extratos de folhas de *V. vinifera* têm sido utilizados como anticoagulantes (Bombardelli & Morazzoni, 1995; Baytop, 1999), antihipertensivo (Basoglu *et al.*, 1996, 2004) e para o tratamento de distúrbios gastrointestinais (Kosar *et al.*, 2007). Alguns estudos científicos têm mostrado a capacidade de extratos de folhas de *V. vinifera* em diminuir os níveis glicêmicos, além de hepatoprotetor, analgésico, antiinflamatório e antioxidante (Orhan *et al.*, 2006, 2007; Kosar *et al.*, 2007).

Existem apenas três estudos avaliando os efeitos biológicos dos extratos das folhas de *V. labrusca*. Dois desses estudos foram realizados pelo nosso grupo, onde se observou que extratos hidroalcoólicos preparados com as folhas da variedade bordô apresentam propriedades neuroprotetoras (Dani *et al.*, 2009), hepaprotetoras, cardioprotetoras e nefroprotetoras (Oliboni *et al.*, 2011), ambos os estudos utilizando como modelo de estudo, tecido de ratos Wistar. Extratos metanólicos de folhas da variedade Isabel mostram atividade antioxidante *in vitro* e antiproliferativa em células tumorais HepG2 (carcinoma de fígado) e A549 (adenocarcinoma de pulmão) (Pacífico *et al.*, 2011).

Em face ao exposto, procurou-se nesse trabalho verificar os efeitos antioxidante antigenotóxico e antimutagênico de extratos aquosos de folhas de *V. labrusca* (variedade Isabel), orgânica e convencional, em cultura de fibroblastos de pulmão de hamster chinês (células V79) expostas ao H₂O₂ ou MMS.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Radicais livres e antioxidantes

Os radicais livres são átomos ou moléculas que possuem um ou mais elétrons desemparelhados no seu orbital de valência. Isso os torna altamente reativos, e ao tentar adquirir o segundo elétron para se estabilizar são capazes de reagir com diversas biomoléculas como proteínas, lipídios e o ácido desoxirribonucleico (DNA). Dentre os principais radicais livres destaca-se o radical ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$), radical hidroxil ($HO^{\bullet}$), radical alcóxil ($RO^{\bullet}$), radical peróxil ($ROO^{\bullet}$), radical peroxinitrito ($ONOO^{\bullet}$) e óxido nítrico ($NO^{\bullet}$) (Halliwell & Gutteridge, 2007).

Para os radicais livres e para os compostos não radicalares, como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) que são capazes de gerar radicais livres, pode-se utilizar o termo espécies reativas (ER) (Halliwell & Gutteridge, 2007).

Dentre as ER, $O_2^{\bullet-}$ é o mais comum e abundante na célula, pode reagir com centros ferro-enxofre das enzimas, danificando-as e diminuindo sua função. Pode ser formado no organismo principalmente, através da cadeia de transporte de elétrons, assim como pela ação de células fagocitárias como os neutrófilos, monócitos e macrófagos durante a fagocitose, devido à ativação da enzima NADPH oxidase presente na membrana dessas células (Babior, 2000). Esse radical pode ser gerado também por reações de autooxidação (hemoglobina, mioglobina e catecolaminas) e reações enzimáticas em diversas organelas celulares. Essas autooxidações são, geralmente, reações em cadeia nas quais o $O_2^{\bullet-}$ pode atuar como iniciador e propagador das cadeias radicalares (Oga, 2003). Ainda, o $O_2^{\bullet-}$ é capaz de reagir com outras moléculas e gerar espécies reativas secundárias como na reação com o ácido nítrico, gerando principalmente o ânion peroxinitrito que, apesar de sua meia-vida curta, pode atravessar membranas e reagir com biomoléculas, danificando-as (Denicola & Radi, 2005).

O peróxido de hidrogênio (H₂O₂) é formado principalmente na matriz mitocondrial durante o processo de redução do oxigênio, ou pela dismutação do O₂^{•-} pela enzima superóxido dismutase (Sod) (Fridovich, 1998). O H₂O₂ tem tempo de meia vida longo e pode atravessar facilmente a membrana plasmática reagindo com proteínas ligadas ao ferro. Se não for decomposto, o H₂O₂ poderá produzir HO[•], que é muito reativo. Embora o HO[•] possua meia vida curta é muito tóxico às proteínas, aos lipídios e ao DNA (Halliwell & Gutteridge, 2007). O radical HO[•] é formado a partir do H₂O₂ através das reações de Fenton e Haber-Weiss que requerem ferro ou cobre (Figura 1).

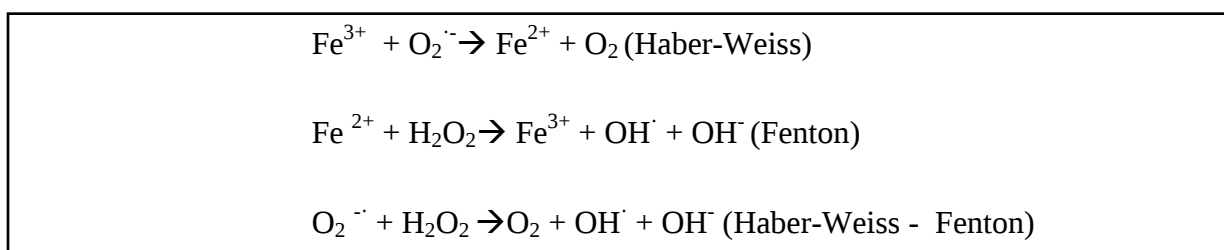


Figura 1: Produção do radical hidroxila pelas reações de Fenton e Haber-Weiss.

(Adaptado de Valko *et al.*, 2005)

Uma vez que o organismo humano não possui um sistema de defesa enzimático contra o radical HO[•], a capacidade desse radical em lesar as células é superior às demais espécies reativas (Halliwell & Gutteridge, 2007). Por isso, a melhor defesa que a célula possui contra esse radical é preventiva, ou seja, evitar que o radical seja gerado.

O NO[•] é um radical livre que reage rapidamente com outras espécies radicalares levando à geração de mais espécies reativas. A redução do óxido nítrico forma o ânion nitroxila (NO⁻) e a oxidação desse gera o cátion nitrosônio (NO⁺), o qual é muito reativo e pode gerar o óxido nitroso (N₂O) e, possivelmente, o HO[•] (Davis *et al.*, 2001).

Além disso, outras ER, como o radical peroxil (ROO[•]), podem ser formadas, principalmente pela reação de ER com lipídios (Singh *et al.*, 2008). Ainda, as espécies reativas podem ser geradas por fontes exógenas, a partir do metabolismo de xenobióticos e na exposição a radiações ionizantes (raios x e γ) e não ionizantes (raios ultravioleta) (Gutteridge & Halliwell, 2010).

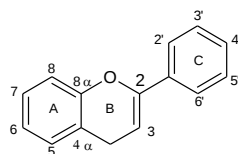
Existem dois sistemas de defesa contra os danos causados pelas ER: os não enzimáticos e os enzimáticos. O sistema de defesa não enzimático é formado pelas vitaminas, em especial a vitamina A, C e E, os carotenóides e os compostos fenólicos entre outros (para revisão ver, Halliwell & Gutteridge, 2007; Singh *et al.*, 2008; Tsao, 2010).

Os compostos fenólicos são amplamente distribuídos no reino vegetal e podem ser classificados em flavonoides e não flavonoides. Os flavonoides apresentam estrutura hidrocarbonada do tipo C6-C3-C6 (difenilpropano), derivada do ácido chiquímico e de três resíduos de acetato (para revisão ver, Trueba & Sánchez, 2001; Aron & Kennedy, 2008; Singh *et al.*, 2008; Tsao, 2010), podendo ainda ser divididos em diversas subclasses (flavan-3-ol, flavona, flavonol, flavanona, flavononol, antocianidina, chalcona, aurona) (Figura 2). Em geral, os flavonoides apresentam-se hidroxilados, metoxilados e/ou glicosilados (para revisão, ver Sing *et al.*, 2008; Tsao, 2010).

Os compostos não-flavonoides são derivados de estruturas químicas específicas como por exemplo, derivados do ácido benzoico (C6-C1), como os ácidos gálico e vanílico e os derivados do ácido ácidos cinâmico (C6-C3) como os ácidos caféico e p-cumárico (Figura 3) Trueba & Sanchez, 2001).

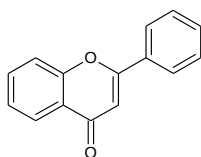
Quanto às defesas antioxidantes enzimáticas, pode-se citar as enzimas superóxido dismutase (Sod), catalase (Cat) e a glutathione peroxidase (GPx) (Bonney *et al.*, 2002).

Núcleo Fundamental dos Flavonoides

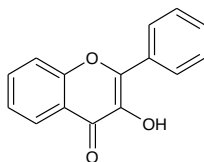


Diferentes classes dos flavonoides

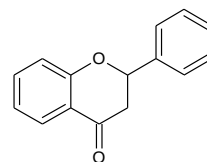
Flavona



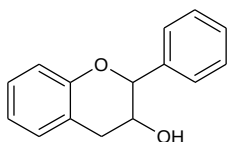
Flavonol



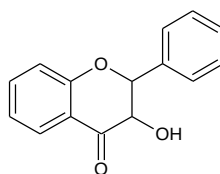
Flavanona



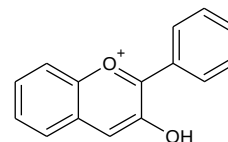
Flavan-3-ol



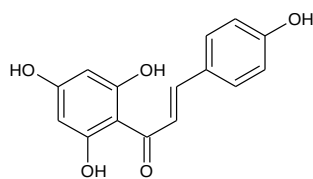
Flavononol



Antocianina



Chalcona



Aurona

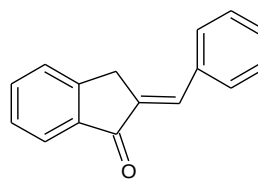


Figura 2: Núcleo fundamental e diferentes classes dos flavonoides (adaptado de Aron & Kennedy, 2008).

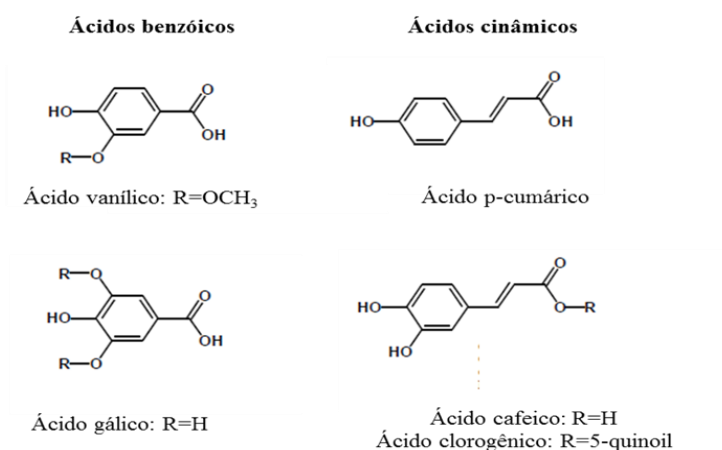


Figura 3: Principais ácidos fenólicos não flavonoides (adaptado de Tsao, 2010).

A enzima Sod dismuta o radical $O_2^{\bullet -}$ à H_2O_2 por alternadas reações de redução e reoxidação (Figura 4, Fukai & Ushioi-Fukai, 2011). Em células eucarióticas, existem várias isoformas do tipo Sod, e estas encontram-se em diversos compartimentos celulares distintos (Fridovich, 1998). A Sod1 ou SodCuZn é a principal Sod intracelular e encontra-se principalmente no citosol, mas com pequena fração no espaço intermembrana da mitocôndria (Sturtz *et al.*, 2001; Okado-Matsumoto & Fridovich, 2001). A Sod2 ou SodMn, pode ser encontrada na matriz mitocondrial da maioria das células eucarióticas (Fridovich, 1998). A Sod3 ou EcSod possui um peptídeo sinalizador que a direciona exclusivamente para o espaço extracelular e já foi encontrada no plasma, linfa e fluido cerebrospinal (Zelko *et al.*, 2002).

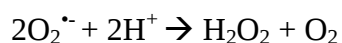


Figura 4: Ação simplificada da enzima superóxido dismutase (adaptada de Fukai & Ushioi-Fukai, 2011)

O H_2O_2 gerado pela SOD pode ser decomposto pela GPx e/ou catalase em água e oxigênio molecular (Figura 5).

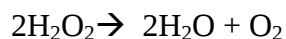


Figura 5: Ação da enzima catalase (adaptado de Halliwell & Gutteridge, 2007).

A GPx é uma seleno-enzima (utiliza selênio como co-fator), cuja ação é baseada na oxidação da glutathione (GSH) ao dissulfeto correspondente (GSSH). É uma enzima que age sobre o H_2O_2 , neutralizando-o. A GPx, em associação com outras enzimas, previne a interação do $\text{O}_2^{\bullet-}$, H_2O_2 e íons metálicos que levariam à formação do $\text{OH}^{\bullet}$ (Bhabak & Mugesh, 2010).

A Cat é uma ferrihemoenzima, um tetrâmero formado por unidades idênticas, sendo que cada monômero contém um grupo prostético heme no centro catalítico. Em animais, a catalase está presente em concentrações elevadas no fígado e nos eritrócitos, mas é possível detectá-la em todos os órgãos em concentrações menos significativas (Halliwell & Gutteridge, 2007; Goyal & Basak, 2010; Heck *et al.*, 2010).

A atividade da catalase apresenta um K_m superior ao da glutathione peroxidase para o H_2O_2 , o que implica na detoxificação de H_2O_2 quando a concentração deste é elevada. Já a glutathione peroxidase atua em baixas concentrações de H_2O_2 (Halliwell & Gutteridge, 2007).

Em condições fisiológicas, as ER formam-se em proporções que são facilmente controladas pelos mecanismos de defesa das células. Por outro lado, em situações patológicas, essa produção pode aumentar exacerbadamente e causar danos às células. Assim, a produção elevada de ER e/ou a deficiência nos sistemas de defesa resulta em uma condição conhecida como estresse oxidativo, caracterizado por danos a lipídios, proteínas e ao DNA. Quantidades aumentadas de metabólitos oxidativos têm sido detectadas em pacientes com uma variedade

de doenças, tais como Parkinson, mal de Alzheimer, esclerose múltipla, câncer, *diabetes mellitus*, aterosclerose e cirrose (Halliwell & Gutteridge, 2007).

2.2 Antigenotoxicidade e antimutagenicidade

As lesões genotóxicas são caracterizadas por alterações de natureza química e/ou física no DNA. Essas alterações levam ao dano de funções como a replicação e a transcrição, processos que necessitam que o DNA esteja íntegro e intacto. As lesões genotóxicas podem ser quebras simples, quebras duplas, ligações cruzadas entre as fitas de DNA, entre DNA e proteínas e entre DNA e xenobióticos, distorções na hélice, formação de dímeros, pontes intercadeias, alquilações, perda e oxidações de bases, entre outras (Figura 6) (Pages & Fuchs, 2002; Luch, 2005; Houtgraaf *et al.*, 2006; Roos & Kaina, 2006).

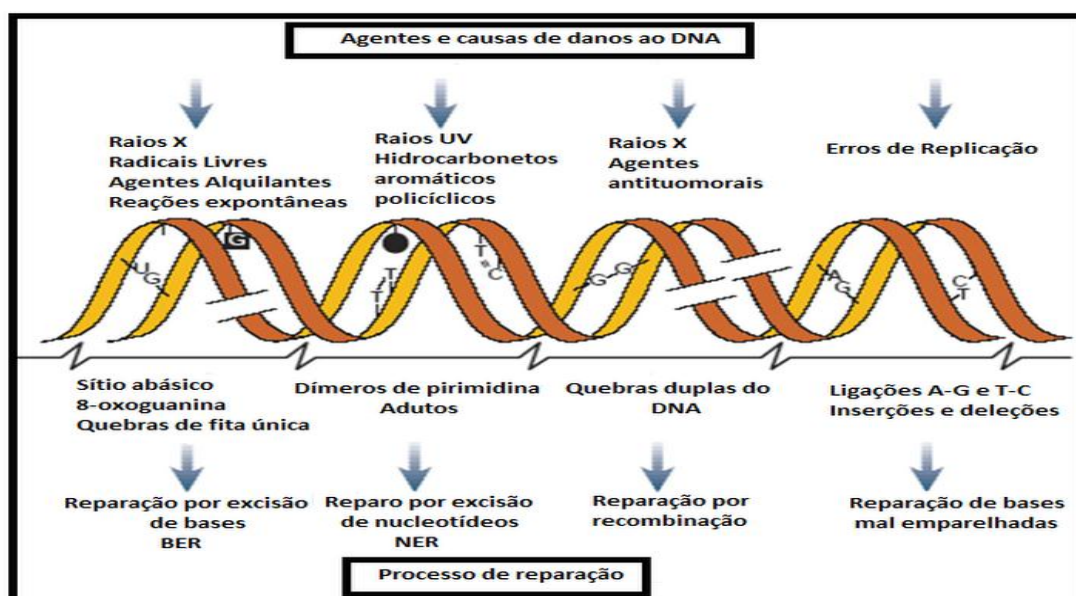


Figura 6: Diferentes tipos de danos ao DNA (adaptado de Hoeijmaker, 2001).

Um dos principais danos causados por ER é a oxidação de resíduos de guanina. Essa oxidação leva à formação de 7, 8-dihidroxi-8-oxo-2'-desoxiguanina (8-oxo-G). A guanina

oxidada tem grande importância biológica, uma vez que pode causar emparelhamento errôneo com a adenina (A), gerando uma transversão de GC para TA. Além disso, aparentemente 8-oxodGuo é capaz de bloquear o processo de transcrição (Saffi & Henriques, 2003).

No entanto, as células possuem vários mecanismos de reparação que são responsáveis pelo processamento dos diferentes tipos de danos que ocorrem no DNA e são fundamentais para evitar o acúmulo de mutações (Figura 6). De acordo com o tipo de lesão presente, diferentes proteínas são recrutadas para reconhecer e processar ou até mesmo tolerar o dano. Para a reparação dos danos oxidativos destacam-se os mecanismos de reparação por excisão de bases (BER) e o reparo por excisão de nucleotídeos (NER) (para revisão, ver Saffi & Henriques, 2003).

O BER é uma via de reparo livre de erros. É responsável por processar lesões que causam leve distorção da dupla hélice (metilação, desaminação, alquilação e oxidação), e/ou processar as bases que foram incorporadas durante a replicação, de maneira errônea. O reparo por BER possui uma via curta que remove apenas 1 nucleotídeo e uma longa na qual são substituídos de 2 a 13 nucleotídeos (para revisão, ver Memisoglu & Samson, 2000; Brozmanová *et al.*, 2001; Ataian & Krebs, 2006; Svilar *et al.*, 2011). De maneira simplificada, os danos são reconhecidos por uma DNA glicosilase que é responsável por remover a base errônea ou danificada, formando um sítio apurínico/apirimídico ou abásico pela hidrólise entre a base e a cadeia desoxirribose fosfato da cadeia do DNA. Em seguida, uma AP endonuclease ou DNA glicosilase/AP liase cliva a ligação fosfodiéster do DNA e uma DNA polimerase livre de erro insere o nucleotídeo correto. Por fim, as extremidades são unidas pela enzima DNA ligase (Boiteux & Guillet, 2004; Dizdaroglu, 2005; Friedberg *et al.*, 2006; Wilson *et al.*, 2007; Svilar *et al.*, 2011).

Quanto ao NER, trata-se também de uma via de reparação livre de erros que processa

lesões que causam significativas distorções na dupla hélice de DNA, como os fotoadutos gerados pela luz UV, os adutos gerados por espécies reativas de oxigênio, e pontes inter e intra-cadeia de DNA (Jeppesen *et al.*, 2011). Essa via envolve cerca de 30 proteínas, sendo que inicia pelo reconhecimento da lesão e remoção de um fragmento de DNA de fita simples com 24 a 30 nucleotídeos que contém o dano. A enzima DNA polimerase re-sintetiza a cadeia de DNA e a ligase une as extremidades restaurando a fita (Friedberg *et al.*, 2006; Fagbemi *et al.*, 2011). O NER apresenta duas vias: a reparação acoplada à transcrição (TCR: “*transcription coupled repair*”) e a reparação global do genoma (GGR: “*global genome repair*”). A TCR repara lesões presentes em fitas transcritas de genes expressos, enquanto a GGR atua no restante do genoma (para revisão, ver Sarasin & Stary, 2007; Hanalwalt & Spivak, 2008; Fagbemi *et al.*, 2011; Palomera-Sanchez & Zurita, 2011).

Todavia, quando uma lesão genotóxica não é reparada antes da divisão celular, tem-se uma situação que, frequentemente, acarreta eventos recombinacionais, aberrações cromossômicas e instabilidade genômica (Baute & Depicker, 2008; Hanawalt & Spivak, 2008). As falhas em reparar as lesões estão associadas com disfunção mitocondrial, neurodegeneração, inflamação, envelhecimento e câncer, enfatizando então, a importância dos mecanismos envolvidos na reparação de lesões ao DNA (Svilar *et al.*, 2011). A perda de cromossomos e os erros de segregação são eventos importantes na carcinogênese, e são causados principalmente por defeitos na formação do fuso, centrômero e alterações na condensação da cromatina antes que a metáfase ocorra (Fenech, 2006). Sabe-se que essas alterações mutagênicas no DNA são processos iniciais na carcinogênese e que as mutações afetam a expressão e/ou a função gênica dos genes de supressão tumoral e dos proto-oncogenes, levando a um crescimento desregulado de células cancerígenas (Marnett, 2000).

Assim, estudos com o objetivo de investigar compostos com capacidade de modular o

sistema de reparação celular e os processos de replicação do DNA ou inativar diretamente o agente mutagênico se tornam importantes (Abib *et al.*, 2010; Degrandi *et al.*, 2010).

Em vista disso, extratos de plantas bem como produtos de origem vegetal têm sido estudados e parecem apresentar uma significativa atividade antioxidante, antigenotóxica e antimutagênica, capaz de diminuir os efeitos nocivos gerados pelas ER e consequentemente o surgimento de doenças associadas (Barcelos *et al.*, 2007; Rosa *et al.*, 2007; Spada *et al.*, 2008).

2.3 Aspectos fitoquímicos e farmacológicos das folhas de videiras

A partir da introdução do cultivo da videira no Brasil, ocorrida em 1535, muitas regiões brasileiras em diferentes Estados chegaram a experimentar e a desenvolver o cultivo da uva e a produção de vinhos. Contudo, a vitivinicultura somente ganhou impulso e tornou-se atividade de importância sócio-econômica a partir do final do século XIX, com a chegada dos imigrantes italianos, sobretudo no Estado do Rio Grande do Sul (RS). O RS é o maior produtor, com três regiões vitivinícolas: a Serra Gaúcha, a região da Campanha e a Serra do Sudeste (Guerra *et al.*, 2009). Atualmente, a ocorrência de vinhedos se dá desde a metade do sul do Rio Grande do Sul até a região Nordeste, passando por polos de importância crescente como os localizados nos Estados de Minas Gerais, São Paulo, Mato Grosso e Goiás (Guerra *et al.*, 2009).

As videiras (Figura 7) classificam-se na família *Vitaceae* ou *Ampelidaceae* (Giovannini, 1999). No gênero *Vitis* destaca-se a *V. labrusca* e a *V. vinifera*, as mais utilizadas no mundo para a elaboração de sucos e vinhos (Sousa, 1996).

As videiras de *V. labrusca* são mais rústicas e mais produtivas, apresentando custo de

produção inferior ao da *vinífera* e no Brasil é utilizada principalmente para a produção de vinhos comuns (Giovannini, 1999). Entre os principais cultivares americanos (*Vitis labrusca*) está a variedade Isabel, sendo que em 2010, a produção dessa variedade no Rio Grande do Sul foi de cerca de 198 milhões de quilogramas (Brasil, 2011).



Figura 7: Videira (Brasil, 2011)

Nos últimos anos, tem se observado tentativas de restringir a utilização de pesticidas no cultivo de produtos alimentares em vista de uma melhor qualidade de vida, o que impulsionou o desenvolvimento de práticas orgânicas. Atualmente, o mercado brasileiro de uvas e derivados conta com dois diferentes tipos de manejos no cultivo das videiras. Um tipo de manejo é o convencional, cujas videiras recebem tratamento com agrotóxicos, e o outro manejo é o orgânico, ou seja, as uvas são produzidas sem o uso de agrotóxicos ou outros produtos químicos, e sem a utilização de recursos de engenharia genética (IFOAM, 2005).

Os agrotóxicos podem estar relacionados com o conteúdo de compostos fenólicos uma vez que esses compostos fazem parte do sistema de defesa das plantas. As plantas

provenientes da agricultura orgânica não recebem nenhum tipo de proteção exógena e estão mais suscetíveis à ação de patógenos e fatores ambientais. Essa situação as deixa em condição de estresse e são estimuladas a produzir metabólitos secundários, como os compostos fenólicos, com o objetivo de defender-se contra os agentes estressores.

Alguns estudos comparando o conteúdo de polifenóis entre produtos orgânicos e convencionais estão disponíveis na literatura. No entanto, ainda não se tem um consenso. Ameixas cultivadas de maneira orgânica, mostraram menor conteúdo de polifenóis que as de manejo convencional (Lombardi-Boccia *et al.*, 2004), entretando, morangos, pêssegos, peras, uvas e tomates provenientes de manejo orgânico apresentaram maior conteúdo de polifenóis quando comparados aos provenientes de manejo convencional (Carbonaro *et al.*, 2002; Asami, 2003; Dani *et al.*, 2007; Hallman, 2012). Ainda, estudos comparando tomates, cenouras e cebolas, bem como extratos hidroalcoólicos de folhas da variedade bordô provenientes de manejo orgânico e convencional não apresentaram diferença entre o conteúdo de polifenóis entre os dois cultivares avaliados (Hakkinen & Toroonen, 2000; Dani *et al.*, 2009; Jurozsek *et al.*, 2009).

Na medicina popular extratos das folhas de videiras têm sido utilizados para tratamentos de distúrbios gastrointestinais e hepatites (Hebash *et al.*, 1991; Peterson, 1991; Bombardelli & Morazzoni, 1995; Bruneton, 1999). Orhan *et al.* (2006) avaliando extratos de folhas de *V. vinifera* preparados com solventes orgânicos, verificaram a capacidade desses extratos em reduzir os níveis glicêmicos e de marcadores de danos oxidativos como o malondialdeído (MDA) em ratos diabéticos após tratamento agudo e crônico. Extratos de folhas de *V. vinifera*, variedade sultani apresentaram atividade analgésica e anti-inflamatória em ratos (Kosar *et al.*, 2007). Extratos de folhas de *V. vinifera* mostraram efeitos hepatoprotetores frente a danos causados pelo acetaminofeno e tetracloreto de carbono (Montvale, 2002; Orhan *et al.*, 2007).

Existem somente três estudos acerca de extratos preparados com folhas de *V. labrusca*, sendo dois desenvolvidos pelo nosso grupo. O extrato hidroalcoólico das folhas da variedade Bordô apresentou efeitos neuroprotetores (Dani *et al.*, 2009), hepatoprotetores, cardioprotetores e de proteção renal frente a danos causados pelo H₂O₂ em modelo de estudo *ex vivo*, utilizando ratos Wistar (Oliboni *et al.*, 2011). Estudo *in vitro* utilizando células HepG2 e A549 tratadas com extrato metanólico de folhas de *V. labrusca*, variedade Isabel, apresentou efeito antiproliferativo, além de efeito antioxidante em ensaios utilizando ácido linoleico, albumina bovina e o radical livre DPPH[•] (Pacífico *et al.*, 2011).

Contudo, até o momento não existem dados acerca dos efeitos biológicos de extratos aquosos de folhas de videiras da variedade Isabel em células de mamífero. A utilização de água como solvente viabiliza a utilização desses extratos pela indústria alimentícia, farmacêutica e cosmética, uma vez que se trata de um extrato livre de resíduos de solventes orgânicos. Ainda, esse é o primeiro estudo que utiliza célula de mamífero V79 em extratos aquosos de folhas de videiras. Trata-se de uma linhagem reconhecida e amplamente utilizada como modelo para a realização de ensaios de antigenotoxicidade, antimutagenicidade e antioxidante (Barcelos *et al.*, 2007; Rosa *et al.*, 2007; Miorelli *et al.*, 2008; Yoo *et al.*, 2009).

2.4 Metodologias para a avaliação da atividade anticitotóxica, antigenotóxica, antimutagênica e antioxidante.

O cultivo de células de mamíferos tem grande importância na pesquisa de compostos com atividade antioxidante, antigenotóxica e antimutagênica uma vez que facilita a análise de propriedades e processos que não seriam facilmente realizados com o organismo íntegro (Doyle & Griffiths, 1998; Zucco *et al.*, 2004).

As células de fibroblastos de pulmão de hamster chinês (V79) são uma linhagem de

fácil cultivo e manutenção, pois apresentam um rápido crescimento e um curto período de adaptação. O tempo de geração é entre 12 e 16 horas e apresentam capacidade de iniciar um rápido crescimento exponencial a partir de um pequeno inóculo (Bradley *et al.*, 1981). As células V79 têm sido amplamente empregadas em estudos de diferentes áreas, como estresse oxidativo (Rosa *et al.*, 2007; Miorelli *et al.*, 2008; Catanzaro *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2012), mutagênese e reparação de DNA (Maistro *et al.*, 2004; Baum *et al.*, 2005; Deng *et al.*, 2006; Jagetia *et al.*, 2007; Cavalcanti *et al.*, 2008; Catanzaro *et al.*, 2012) além de mecanismos de morte celular programada (Wang *et al.*, 2007).

Para determinar a proliferação celular e citotoxicidade de compostos, um método colorimétrico rápido utilizado é a redução do 3-(4,5-dimetiltiazol 2-il)-2,5difênil brometo de tetrazolina (MTT). O MTT, quando incubado com células metabolicamente ativas é reduzido por enzimas mitocondriais, transformando-se de um composto amarelo em um composto azul escuro (formazan). Já o ensaio clonogênico permite verificar a capacidade de uma célula em proliferar-se indefinidamente, mantendo assim a sua capacidade reprodutiva e a habilidade de formar colônias após o tratamento com os compostos em estudo (Munshi *et al.*, 2005).

Diferentes biomoléculas podem ser lesadas durante o estresse oxidativo e os lipídios são alvos fáceis das ER. O dano aos lipídios inicia com o ataque de uma ER que leva à desestabilização da membrana celular. Essa desestabilização ocasiona um aumento na permeabilidade, permitindo a passagem de substâncias que normalmente não cruzariam a bicamada lipídica (cálcio, por exemplo), ocasionando inúmeros eventos intracelulares. Entre os produtos finais da peroxidação lipídica estão os compostos de baixo peso molecular, como hidrocarbonetos (etano e pentano) e aldeídos (malondialdeído - MDA). A quantificação desses compostos de baixo peso molecular pelo método que mensura os produtos capazes de reagir com o ácido tiobarbitúrico (TBARS) é um importante indicativo dos níveis de dano oxidativo

nos lipídios (Halliwell & Gutteridge, 2007).

A quantificação das proteínas carboniladas também pode ser considerada um importante e sensível marcador de estresse oxidativo. As proteínas oxidadas podem afetar a função de receptores, enzimas, anticorpos e proteínas de transporte. O processo de carbonilação protéica pode ocorrer pela oxidação direta dos aminoácidos pelas cadeias laterais, pela interação das proteínas com produtos finais da peroxidação lipídica como 4-hidroxinonenal e o MDA e também através de reações de glicação (Chakravarti & Chakravarti, 2007). A técnica que tem como princípio a reação dos grupos carbonílicos com 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH) formando 2,4-dinitrofenilhidrazona tem sido bastante utilizada como método de avaliação do conteúdo de proteínas carboniladas (Levine *et al.*, 1990).

As ER produzem uma ampla variedade de danos ao DNA. A determinação das lesões ao DNA pode ser medida pelo ensaio cometa ou *Single Cell Gel Electrophoresis*. Por necessitar de um pequeno número de células, sem que elas estejam necessariamente em divisão, essa técnica se torna vantajosa diante de outras metodologias bioquímicas e citogenéticas. (Hartmann & Speit, 1994). As células englobadas em gel e dispostas sobre lâminas são submetidas a uma corrente elétrica que propicia a migração dos fragmentos de DNA resultantes de quebras para fora do núcleo. Após a eletroforese, as células que apresentam um núcleo redondo são identificadas como normais, sem dano perceptível ao DNA. As células que apresentam qualquer tipo de lesão são identificadas visualmente por uma espécie de cauda formada pelos fragmentos de DNA, similar a um cometa. A identificação do dano no DNA pode ser realizada pela mensuração dos fragmentos do DNA migrante com a utilização de microscópio com ocular de medidas após a coloração com nitrato de prata. As células são classificadas de acordo com o tamanho da cauda formada. Assim, tem-se que a classe 0 corresponde a uma célula sem cauda, ou seja, sem dano; na classe 1, a cauda é menor que o

diâmetro do núcleo; na classe 2, a cauda apresenta-se com comprimento entre uma a duas vezes o diâmetro do núcleo; na classe 3, a cauda é longa, apresentando comprimento superior a duas vezes o diâmetro do núcleo; e na classe 4, a cauda é longa e bastante espalhada (Olive & Banáth, 2006) (Figura 8).

O ensaio cometa é utilizado amplamente na genética médica, genética toxicológica, ecotoxicológica, em diagnósticos e tratamentos médicos, medicina ambiental, ocupacional, biomonitoramento ambiental, além de outras aplicações (Tice *et al.*, 2000; Valverde & Rojas, 2009; Casanova *et al.*, 2012; García-Lestón *et al.*, 2012).

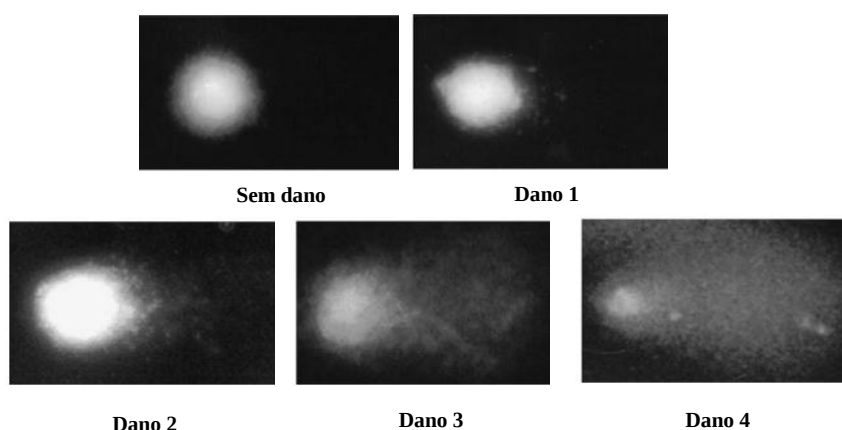


Figura 8: Imagens das classes 0 – 4 de danos no DNA analisados visualmente pelo ensaio cometa (adaptado de Heuser *et al.*, 2007).

Existem dois protocolos principais para a realização desse teste, de acordo com o pH do tampão a ser utilizado: a versão neutra (pH 7-8) conforme o método original de Östling e Johanson (1984) que utiliza a eletroforese em tampão com pH neutro, que possibilita detectar quebras duplas nas moléculas de DNA. A versão alcalina, utilizada no presente trabalho (pH >13), desenvolvida por Singh *et al.* (1988) a partir do método original, que realiza a eletroforese em tampão alcalino produzindo, assim, desnaturação do DNA, detectando

quebras de fita simples e dupla na cadeia do DNA, reparo por excisão, pontes intercadeia de DNA (crosslinks) e danos alcalilábeis. Ainda é possível utilizar o pH 12,1, que com exceção dos danos alcalilábeis, é semelhante ao de pH >13.

O ensaio cometa permite o reconhecimento de lesões que se manifestam somente como quebras de cadeia, tornando-se um pouco limitado, uma vez que não detecta danos oxidativos gerados pelas oxidações das bases nitrogenadas. Uma alternativa para essa limitação é o emprego de endonucleases de reparação do DNA antes da eletroforese. As endonucleases são capazes de reconhecer sítios de lesões específicos gerando uma quebra de cadeia de DNA que pode então ser detectada pelo ensaio cometa. Assim, a diferença entre o índice de dano de uma amostra tratada com uma enzima de reparação de DNA para um dano específico e a mesma amostra não tratada fornece a quantificação da lesão em análise. Essa adaptação torna o ensaio cometa uma ótima ferramenta na elucidação dos mecanismos genotóxicos (Costa-Medina *et al.*, 2008; Pereira *et al.*, 2009). As enzimas mais empregadas e que estão envolvidas na remoção de danos oxidativos são a endonuclease III (ENDO) e a formamidopiridina DNA glicosilase (FPG), as quais são capazes de detectar pirimidinas e purinas oxidadas, respectivamente (Karakaya *et al.*, 1997; Dizdaroglu, 2005).

Somando-se a isso, a determinação dos danos ao DNA em nível cromossômico é importante uma vez que as mutações estão diretamente relacionadas com a carcinogênese. Para isso, utiliza-se a técnica que visualiza a formação de micronúcleos, os quais são originados de fragmentos cromossômicos ou cromossomos inteiros após a anáfase (Fenech, 2000).

O ensaio de micronúcleos é considerado um dos testes citogenéticos *in vivo* mais bem estabelecido e reconhecido mundialmente. O teste é baseado no acesso ao dano cromossômico *in vivo* pela medida do micronúcleo, também conhecido como corpos de Howell-Jolly

(Fenech, 2000). A avaliação da frequência de micronúcleos é considerada um índice de quebras cromossômicas e de perda cromossomal que pode ser detectado em células que tenham completado ao menos uma divisão celular. Para otimização do método, utiliza-se a citocalasina B. As células que completaram pelo menos uma divisão celular são bloqueadas no momento da citocinese por ação da citocalasina B e são identificadas pelo aspecto binucleado. A citocalasina B inibe a polimerização da actina, processo necessário para a formação dos microfilamentos que constroem o citoplasma entre os núcleos filhos durante a citocinese. Dessa forma, o uso da citocalasina B possibilita o acúmulo das células em divisão no estágio binucleado da população, independente da sincronização e proporção de células em divisão (Figura 9) (Fenech, 2006).

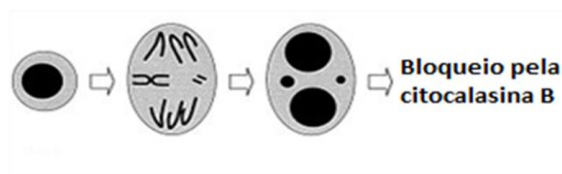


Figura 9: Diagrama ilustrando a origem do micronúcleo a partir de um fragmento cromossômico acêntrico ou de um cromossomo inteiro (Adaptado de Fenech, 2006).

Diferentes metodologias têm sido desenvolvidas para avaliar qualitativamente ou quantitativamente a capacidade redutora de diferentes compostos. Considerando que a atividade antioxidante de um composto é influenciada pelo modelo de estudo (Halliwell & Gutteridge, 2007), costuma-se empregar mais de um tipo de teste para avaliação dos compostos. Dentre os testes *in vitro* existentes, a medida da capacidade da varredura do radical livre 2,2-difenil 1-picrilhidrazil (DPPH[•]) vem sendo utilizada para elucidar mecanismos de ação antioxidante de diferentes compostos, sendo considerado um método bastante fácil e rápido. (Brand-Williams *et al.*, 1985; Rice-Evans *et al.*, 1995; Cheng *et al.*,

2006). Pode-se utilizar também os ensaios de SOD- e CAT-like, que avaliam a capacidade das amostras em mimetizar a ação das enzimas SOD e CAT (Dani *et al.*, 2007; Spada *et al.*, 2008).

Tendo em vista os efeitos benéficos de produtos vegetais descritos na literatura, neste trabalho buscou-se estudar possíveis atividades antioxidantes, antígeno-tóxicas, antimutagênicas e de extratos aquosos de folhas de videiras, em células de mamífero V79 tratadas com H₂O₂ ou MMS compostos reconhecidamente oxidante e mutagênico, respectivamente. Somando-se a isso, estudos a cerca da composição fenólica das folhas de videiras também se tornam importantes, uma vez que os extratos poderão vir a ser utilizados na indústria farmacêutica, cosmética e de alimentos.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

- Avaliar a atividade antioxidante, antigenotóxica e antimutagênica de extratos aquosos das folhas de *Vitis labrusca* da variedade Isabel, orgânica e convencional, em fibroblastos de pulmão de hamster chinês (V79).

3.2 Objetivos específicos

- Determinar o conteúdo de polifenóis e quantificar os compostos majoritários dos extratos aquosos de folhas de *Vitis labrusca* da variedade Isabel provenientes de manejo orgânico e convencional.
- Avaliar o efeito dos extratos na viabilidade celular após tratamento com H_2O_2 pelos ensaios de redução do MTT e sobrevivência clonogênica.
- Verificar os danos oxidativos a lipídios e proteínas em células V79 tratadas com os extratos aquosos das folhas de videiras e expostas ou não ao H_2O_2 .
- Avaliar o efeito antigenotóxico dos extratos de folhas de videiras em células de mamífero V79 após tratamento com H_2O_2 , utilizando os ensaios cometa alcalino e enzimático.
- Avaliar o efeito antimutagênico dos extratos de folhas de videiras em células de mamífero V79 após o tratamento com metil metano sulfonado.
- Determinar a capacidade de varredura do radical livre DPPH[•] e da atividade de Sod- e Cat-like dos extratos aquosos de folhas de *Vitis labrusca* da variedade Isabel provenientes de manejo orgânico e convencional.

4. RESULTADOS

Os resultados desse trabalho estão apresentados na forma de artigo científico intitulado **Antioxidant, antigenotoxic and antimutagenic activities of the aqueous extracts of organic and conventional grapevine *Vitis labrusca* cv. Isabella leaves in V79 cells** que será submetido à revista Food and Chemical Toxicology.

CAPÍTULO I:

ANTIOXIDANT, ANTIGENOTOXIC AND ANTIMUTAGENIC ACTIVITIES OF THE AQUEOUS EXTRACTS OF ORGANIC AND CONVENTIONAL GRAPEVINE *VITIS LABRUSCA* CV. ISABELLA LEAVES IN V79 CELLS

Giovana Vera Bortolini¹, Cristiano Trindade², Bárbara Segalotto Costa¹, Joanna Carra Anghinoni¹, Temenouga Nikolova Guecheva², Ximena Arias³, Verônica Césio³, Horácio Heinzen³, Mirian Salvador¹, João Antonio Pêgas Henriques^{1,2}

1. Instituto de Biotecnologia, Universidade de Caxias do Sul, Rua Francisco Getúlio Vargas, 1130, CEP: 95070-560, Caxias do Sul, Rio Grande do Sul, Brazil.
2. Departamento de Biofísica, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brazil.
3. Universidad de La Republica de Motevideo, Uruguay.

Corresponding author: Tel: +55 54 32182105

ABSTRACT

Grape production plays an important role in the world's economy. There are two vineyard management methods: the conventional method, which allows the utilization of pesticides, and the organic method, which does not permit chemicals and genetic engineering. During each harvest, an enormous amount of vine leaves is produced, and the leaves are mainly disposed of in the environment. The objective of this study was to evaluate the antigenotoxic, antimutagenic and antioxidant activities of the aqueous extracts from organic and conventional *Vitis labrusca* cv. *Isabella* leaves. Initially, the contents of the leaf extracts, including polyphenols, ascorbic acid and other major compounds, were determined. The V79 cell line was treated with the leaf extracts and then exposed to hydrogen peroxide or methyl methanesulfonate mutagen (MMS). Then, cell viability was analyzed by 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT) reduction and clonogenic survival assays. Lipid peroxidation and protein carbonylation levels were also measured. The extracts' antigenotoxic activities were analyzed by an alkaline comet assay and also by using the enzymes endonuclease III (ENDO III) and formamidopyrimidine DNA glycosylase (FPG). The extracts' antimutagenic properties were observed in a micronucleus assay. *In vitro* antioxidant activity was determined by 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH[•]) radical scavenging and Superoxide dismutase- and catalase-like assays. The organic extract had the highest polyphenol, ascorbic acid, quercetin-3-glucoside and rutin contents. Treatment with both the organic and conventional extracts prevented cell death. Nevertheless, the organic extract showed higher antigenotoxic and antimutagenic activities, a greater ability for DPPH[•] scavenging and higher sod- and cat-like activities than the conventional extract. Our results show that the organic and conventional grapevine leaf extracts, cv. *Isabella*, have powerful antioxidant, antigenotoxic and antimutagenic activities that could be attributed to their polyphenol and ascorbic acid contents.

Key words: *Vitis labrusca*, cv. *Isabella*, antigenotoxic, antimutagenic, antioxidant.

1. Introduction

Grapes are one of the most commonly consumed fruits, in both fresh and processed forms. In 2010, 7.7 billion tons of grapes were produced worldwide (OIV, 2011). The economic and historic impact of commercial grapes makes them the most studied fruit. The best known and most cultivated vines in the world are the *Vitis* genus, *V. labrusca* and *V. vinifera* species, whose fruits have been used for wine and juice production. In South America, *V. labrusca* cv. *Isabella* has been widely used in the production of common wines because it is more hardy and productive than other grapes, thereby reducing the cost of production compared to other varieties of *V. vinifera* (Grigoletti and Sônego, 1993).

Grapes are rich in phenolic compounds, such as flavonoids (catechin, epicatechin, quercetin, anthocyanins and procyanidins) and resveratrol (3,5,4'-trihydroxyl-stilbene), (Wang et al., 2002; Yu et al., 2012), which are important because they act against oxidative damage induced by reactive species. Reactive species are related to pathological processes such as atherosclerosis, Alzheimer's and Parkinson's diseases and several types of cancer (Firuzi et al., 2011, Hu, 2011).

The cultivation of grapevines can be conducted by two management types: organic or conventional. Conventional management is widespread and allows treatment with soluble synthetic fertilizers, pesticides and genetic engineering. In organic management, grapevines are grown without the use of pesticides, synthetic substances or genetic engineering resources (IFOAM, 2005).

The impact of different agricultural practices on the phenolic content of fruits and vegetables has been investigated. Some studies have reported higher amounts of phenolic compounds in organic strawberries (Asami et al., 2003), tomatoes (Hallman, 2012), grapes

and grapevine leaves (Dani et al., 2007, 2009) compared to conventional ones; however, this date remains controversial (Hakkinen and Torronen, 2000, Juroszek et al., 2009, Lombardi-Boccia et al., 2004, Soltoft et al., 2010).

Grapevine leaves, traditionally used as food and in drink preparation, have not been studied extensively. *V. vinifera* leaves have been used to treat hypertension (Basoglu et al. 2004), diarrhea, hemorrhaging and varicose veins (Bombardelli and Morazzoni 1995; Baytop 1999). Some studies reported that grapevine leaves have anti-inflammatory and analgesic properties (Kosar, 2007), as well as the capability to reduce blood glucose levels in diabetics (Orhan et al. 2006). There are only three scientific studies evaluating the biological effects of *V. labrusca* leaves. The ethanolic extracts of organic and conventional *V. labrusca* L. cv. Bordo showed neuroprotective (Dani et al., 2009), hepatoprotective, renal-protective and cardioprotective effects (Oliboni et al., 2011). The methanolic extract of *V. labrusca* cv. Isabella showed *in vitro* antioxidant activity and antiproliferative properties in HepG2 and A549 cells (Pacifico et al., 2011).

The cultivation of mammalian cells is important for studying the biological activities of various compounds and for analyzing the properties and processes that could not be easily examined at the organismal level (Doyle and Griffiths 1998; Zucco et al., 2004). V79 cells are easily cultivated and maintained, are fast growing and have a short period of adaptation (Bradley et al., 1981), thus making them suitable for an investigation of biological parameters.

In this context, the aim of the present study was to evaluate the antigenotoxic, antimutagenic and antioxidant effects of the aqueous extracts of organic and conventional *V. labrusca* grapevine leaves against H₂O₂- or MMS-induced toxicity in a lung fibroblast cell line derived from Chinese hamsters (V79 cells). Furthermore, DPPH[•] scavenging activity, Sod- and Cat-like activities and phenolic content were also evaluated.

2 Materials and Methods

2.1 Chemicals

Dulbecco's modified eagle medium (DMEM), fetal bovine serum (FBS), Trypsin-EDTA and antibiotics were purchased from Gibco BRL (Grand Island, NY, USA). 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH[•]), [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium] bromide (MTT), hydrogen peroxide (H₂O₂) at 30% and cytochalasin-B were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Low-melting point agarose and normal agarose were purchased from Invitrogen (Carlsbad, CA, USA). Formamidopyrimidine DNA glycosylase - FPG (8.000 U/mL) and Endonuclease- ENDO III (10.000 U/mL) were purchased from New England BioLabs® (USA). The HPLC solvents were from Mallinckrodt Baker Inc. (Phillipsburg, NJ).

2.2 Plant material and preparation of Organic Grapevine leaf (OGL) and Conventional Grapevine leaf (CGL) extracts.

Vitis labrusca were cultivated in the northeast region of the Serra Gaucha, Rio Grande do Sul, Brazil. Voucher specimens were identified and deposited in the herbarium of the University of Caxias do Sul, Rio Grande do Sul, Brazil (Voucher HUICS 31066). The organic leaves received ECOCERT certification. The leaves were dried at 37°C and sheltered from light. Extracts were obtained using 5 g of leaves/100 ml distilled water under reflux (100 °C) for 30 minutes. After cooling to 25 °C, extracts were filtered and lyophilized (Edward freeze dryer) at 60 °C and 10⁻¹ bar. The extracts were stored and protected from humidity and light.

2.3 Determination of total and major polyphenols

Total phenolic content of the grapevine leaf extracts were measured using Singleton and

Rossi's modification (1965) of the Folin–Ciocalteu colorimetric method. Two hundred microliters of the extracts were assayed with 1000 μ L of Folin–Ciocalteu reagent and 800 μ L of sodium carbonate (7.5%, w/v). After 30 minutes, the absorption was measured at 765 nm and the total phenolic content was expressed as mg of gallic acid/g.

Identification of the various compounds in the organic and conventional samples of *V. labrusca* was performed by HPLC (High Performance Liquid Chromatography) analysis in an Agilent HP 1050 equipped with a MetaPhor column 150 x 4.6 mm, 5 μ m ODS-3 and DAD (Diode array Detector). Solvent A was water/glacial-acetic acid (99:1 v/v), and solvent B was methanol. The solvents were delivered at a total flow rate of 1.0 mL/minute. The gradient profile was as follows: 10% B isocratic for 5 minutes, 10% B to 30% B linearly in 5 minutes, then 30% B to 50% linearly in 10 minutes, 50% B to 70% linearly in 10 minutes, finally 70% B to 90% linearly in 15 minutes and a return to 30% B linearly in 13 minutes. The injection volume was 20 μ L, and the chromatograms were registered at 280, 258 and 355 nm. The UV spectra and retention times were used for identification purposes, comparing them with those of pure standards under the same conditions.

The linearity of the standard curve was confirmed by plotting the peak areas (y , mAU*s) and their corresponding concentrations (x , mg/L). All solutions used in the HPLC analysis were filtered by a 0.45 μ m polyamide membrane filter.

2.4 Ascorbic Acid content

The ascorbic acid content of extracts was determined according to the method of AOAC (Association of Official Analytical Chemists) (AOAC, 1990).

2.5 V79 cell culture and treatments

V79 cells were cultivated under standard conditions in DMEM supplemented with 10 % heat-inactivated FBS and 100 IU/mL of penicillin and 100 IU/mL of streptomycin. The cells were kept in tissue-culture flasks at 37 °C in a humidified atmosphere containing 5 % CO₂ and were harvested by treatment with 0.15 % trypsin-0.08 % EDTA in phosphate-buffered saline solution (PBS). Cells (3×10^4) were seeded in 5 mL of complete medium in a 25cm² flask and grown to 60-70% confluence before treatment with the extracts.

The lyophilized extracts were dissolved in culture medium to achieve concentrations of 1 µg/mL and 5 µg/mL immediately before use. This concentration range was established in a previous study that evaluated the extracts' cytotoxicity, wherever neither of the grapevine leaf extracts had a cytotoxicity effect on the growth of V79 cells within the concentration range of 0.1-5 µg/mL.

The cells were incubated with the extracts for 3 hours in a FBS-free medium using appropriate non-cytotoxic concentration and subsequently submitted to H₂O₂ (150 µM or 20 mM) or MMS (40 µM) for 1 hour (Rosa et al., 2007).

2.6 Viability assay

2.6.1 MTT assay

The MTT assay was performed according to Denizot and Lang (1986). The cells were washed once with PBS before the addition of serum-free medium containing yellow tetrazolium salt dye (MTT; 1 mg/mL). This process was followed by incubation for 2 hours at 37°C. After incubation, the supernatant was removed. The residual purple formazan product was solubilized in DMSO, stirred for 20 minutes, and then its absorbance was measured at 570 nm. The results were expressed as percentage of cell proliferation relative to control (cells

without any test compounds).

2.6.2 Colony-forming ability (clonal survival)

Exponentially growing V79 cells were treated according to the experimental protocol described above. Thereafter, the cultures were trypsinized, and 200 cells were seeded for determination of their colony-forming ability. After 5 days of incubation, the colonies were fixed with methanol and acetic acid (3:1), stained with crystal violet (0.1%) and counted. Survival was calculated as a percentage relative to the survival of the control cells.

2.7 Measurement of lipid peroxidation and carbonylated protein content

Lipid damages were monitored by the formation of thiobarbituric acid reactive species (TBARS) during an acid-heating reaction, which has been widely adapted as a sensitive method for evaluating lipid peroxidation. The assays were performed according to Salgo and Pryor (1996) with minor modifications. After treatment, the cells were washed with cold PBS, then scraped and homogenized in ice-cold PBS. Samples containing 400 μ L of the cell lysates were combined with 600 μ L of 15% TCA and 0.67% TBA. The mixture was heated at 100 °C for 20 minutes. After cooling to room temperature, the samples were centrifuged at 4000 rpm for 10 minutes. The supernatant fraction was isolated, and its absorbance was measured at 532 nm. Hydrolyzed TMP was used as a standard, and the results were expressed as MDA equivalents.

Oxidative damage to proteins was measured by determining the carbonyl group based on its reaction with DNPH. Two hundred microliters of DNPH (10 mM) or 200 μ L of HCl (2 M) were added as a control to 50 μ L of supernatant. The reaction mixture was incubated in the dark for 30 minutes with agitation every 10 minutes. After that, 250 μ L of 20% TCA was

added and the precipitate was centrifuged at 4000 rpm for 8 minutes. The supernatant was discarded, and the pellet was washed 3 times with ethanol-ethyl acetate (1:1) to remove the free reagent. The samples were centrifuged, and the pellets were resuspended in 600 μ L of guanidine solution (6 M) at 37 °C for 15 minutes. Absorbance was read at 365 nm, with the results expressed as nmol of DNPH/mg of protein (Levine, 1990). Protein concentration was determined by the Lowry method using bovine serum albumin as a standard (Lowry et al., 1951).

2.8 Antigenotoxic effects evaluated by alkaline comet assay

An alkaline comet assay was performed as described by Singh et al. (1988) with minor modifications. After treatment, cells were washed with ice-cold PBS, trypsinized, and resuspended in a complete medium. Then, 20 μ L of cell suspension were dissolved in 0.75% low-melting point agarose and spread onto a glass microscope slide that was pre-coated with a layer of 1.5% normal melting point agarose. The slides were then incubated overnight in ice-cold lysis solution (2.5 M NaCl, 10 mM Tris, 100 mM EDTA, 1% triton X-100 and 10% DMSO, pH 10.0) to remove cellular proteins and membranes. In the enzymatic comet assay, the slides were removed from the lysing solution, washed three times in an enzyme buffer (40 mM Hepes, 100 mM KCl, 0.5 mM EDTA, 0.2 mg/mL BSA, pH 8.0) and incubated with 60 μ L of FPG (100 mUnits per gel; 45 minutes at 37°C) or ENDO III (100 mUnits per gel; 30 min at 37°C). The slides were placed on a horizontal electrophoresis unit and incubated in fresh buffer (300 mM NaOH, 1 mM EDTA, pH 13), enough to cover the slides for 20 minutes at 4°C, to allow for DNA unwinding and the expression of alkali-labile sites. Electrophoresis was conducted for 20 min at 25 V and 300 mA. All of the above steps were performed in the dark to prevent additional DNA damage. The slides were then neutralized (0.4 M Tris, pH

7.5), stained with silver nitrate and analyzed using an optic microscope. Two hundred cells (100 cells from each of the two replicate slides) per concentration of each test substance were analyzed. Cells were visually scored according to tail length in five classes: (1) class 0: undamaged with no tail, (2) class 1: with tail shorter than the diameter of the head (nucleus), (3) class 2: with tail as long as 1-2 times the diameter of the head, (4) class 3: with tail more than 2 times the diameter of the head, and (5) class 4: comets with no heads. The damage index (DI) is an arbitrary score calculated for each sample, which ranges from 0 (no tail: 100 cells $\times$ 0) to 400 (with maximum migration: 100 cells $\times$ 4).

2.9 Cytokinesis block micronucleus assay

The micronucleus assay was performed according to Bonacker et al. (2004) with minor modifications. After treatment, cultures were washed twice with the medium, and cytochalasine-B (Cyt-B) was added at a final concentration of 3 μ g/mL. Cultures were harvested 21 hours after Cyt-B addition. Cells were trypsinized and the cellular suspension was centrifuged at 1000 rpm for 5 minutes. Cells were then resuspended in 75 mM KCl solution and maintained at 4°C for 3 minutes (mild hypotonic treatment). Subsequently, the cells were centrifuged and a methanol/acetic acid (3:1) solution was gently added. This fixation step was repeated twice. The cells were then resuspended again in a small volume of methanol/acetic acid and dropped onto clean slides. The slides were stained with 3% Giemsa (pH 6.8) for 3-4 minutes, mounted and then coded prior to analysis. Micronuclei were counted in 2,000 binucleated cells (BNCs) with well-preserved cytoplasms. The identification of micronuclei was carried out according to Fenech (2007).

2.10 Antiradical activity against DPPH[•], SOD- and CAT-like activities

The antioxidant activity of both extracts was measured by 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical (DPPH[•]) scavenging activity (Yamaguchi, 1998). The organic and conventional extracts were added to a Tris-HCl buffer (100 mM, pH 7.0) and 250 µM DPPH[•] dissolved in ethanol. The tubes were kept in the dark for 20 min, and absorbance was measured at 517 nm (UV-1700 spectrophotometer, Shimadzu, Kyoto, Japan). The results are represented as IC₅₀ (amount of extract necessary to scavenge 50% of the DPPH[•] radical). To evaluate the antioxidant's enzyme-like activities, extracts were prepared at a concentration of 1 µg/mL. SOD-like activity was spectrophotometrically determined by measuring the inhibition of the self-catalytic adrenochrome formation rate at 480 nm in a reaction medium containing 1 mmol/L adrenaline (pH 2.0) and 50 mmol/L glycine (pH 10.2). This reaction was performed at 30°C for 3 minutes (Bannister and Calabrese, 1987). The results were expressed in units of SOD. The CAT-like activity assay was performed according to the method described by Aebi (Aebi, 1984) by determining the hydrogen peroxide decomposition rate at 240 nm. The results were expressed as µmol of H₂O₂ decomposed/minute. Ascorbic acid at 50 µg/mL was used as a positive control.

3. Statistical analysis

All measurements were performed at least in triplicate, and the values were averaged and reported along with the standard deviation (S.D.). The data were subjected to Student's t-test or an analysis of variance (ANOVA, followed by Tukey's *post hoc* test) using the SPSS version 17.0 (SPSS, Chicago, IL) software package.

4. Results

4.1 Total contents of phenolic compounds, ascorbic acid and major compounds in grapevine leaf extracts

In the Table 1 we can see that the total phenolic contents of aqueous grapevine leaf extracts studied in this work were 56.05 ± 1.09 mg/g and 28.93 ± 0.88 mg/g for OGL and CGL extracts, respectively. The ascorbic acid contents were 9.7 µg/g and 6.5 µg/g for extracts from organic and conventional management, respectively. HPLC analysis showed that the major compounds in both extracts were quercetin-3-O-glucoside and rutin. Indeed, quercetin-3-O glucoside concentration was higher in the OGL extract (54.66 ± 0.01 mg/g) than in the CGL extract (34.11 ± 0.05 mg/g). OGL extract presented 5.41 ± 0.05 mg/g of rutin, and CGL extract showed 3.27 ± 0.04 mg/g.

4.2 Protective effect of grapevine leaf extracts on H₂O₂-induced cytotoxicity in V79 cells

In this study, we investigated the cytotoxic effect of aqueous extracts from organic and conventional grapevine leaves by a MTT assay in V79 cells. In Figure 1A, neither of the grapevine leaf extracts had a cytotoxic effect on the growth of V79 cells within the concentration range of 0.1-5 µg/mL. At 10 µg/mL, cell viability decreased significantly. Thus, we chose to work with concentrations of 1 and 5 µg/mL in further experiments.

As shown in figure 2A, exposure to 150 µM H₂O₂ decreased cell viability compared to the negative control. However, when the cells were treated with both grapevine leaf extracts prior to exposure to hydrogen peroxide, cell viability was maintained between 60 and 70% showing a protective effect against toxicity generated by H₂O₂. In addition, we also

evaluated cell viability by a clonal survival assay. Our findings showed that the viability of the cells exposed to hydrogen peroxide was 50% of the control group (Figure 2B). However, when the cells were pre-treated with both grapevine leaf extracts, the 1 and 5 µg/mL concentrations of the organic and conventional extracts significantly suppressed H₂O₂ toxicity in V79 cells.

4.3 Lipid peroxidation and protein carbonyl formation

In an attempt to explain the observed cytoprotective properties, we investigated the effects of organic and conventional grapevine extracts on lipid peroxidation and protein damage in V79 cells. The treatment only consisting of organic and conventional grape leaf extracts was not able to induce lipid and protein damage in cells, while a treatment with H₂O₂ (20 mM) resulted in increases in TBARS and carbonyl group production. Pre-treatment with organic and conventional grapevine leaf extract, in both concentrations, was able to prevent H₂O₂-induced lipid peroxidation and protein carbonyl formation (Table 2).

4.4 Antigenotoxic effects of grapevine leaf extracts in the comet assay

DNA damage was analyzed using the alkaline version of the comet assay, a sensitive method for detecting single- and double-stranded DNA breaks, crosslinks and alkali-labile sites in individual cells (Burlinson, 2012). The ability of non-toxic concentrations of organic and conventional grapevine leaf extracts to reduce H₂O₂ toxicity was analyzed. Table 3 shows that treatment with organic and conventional grapevine leaf extracts did not cause a significant amount of DNA strand breaks in V79 cells compared to the negative control. The exposure of cells to H₂O₂ (150 µM) leads to a significant increase in the level of DNA damage, whereas pre-treatment with organic grapevine leaf extracts at 1 µg/mL and 5 µg/mL

prevented the DNA damage induced by H₂O₂ 42% and 54%, respectively.

In addition to the alkaline comet assay, we also performed a modified comet assay. The use of the enzymes ENDO III and FPG allows evaluation of oxidized base formation. Employing a modified comet assay with ENDO III and FPG repair proteins, we found that the organic and conventional grapevine leaf extracts did not induce oxidative damage (Table 4). The organic grapevine extracts prevented 67% (at concentration 1 µg/mL) and 73% (at concentration 5 µg/mL) of the oxidative damage recognized by FPG repair protein as compared to H₂O₂. Conventional grapevine extracts at the same concentrations prevented 21% and 26% of the oxidative damage, respectively. In comparison, induction of the oxidative damage recognized by the ENDO III repair protein was 57% and 26%, respectively, for organic and conventional grapevine leaf extracts at a concentration of 1 µg/mL and was 61% and 36%, respectively, at a concentration of 5 µg/mL as compared to H₂O₂, suggesting antigenotoxic activity.

4.5 Antimutagenic potential of grapevine leaf extracts in the micronucleus test

As observed in Figure 3A, the number of BNCs was similar in cultures treated with organic and conventional grapevine extracts, indicating no toxicity in V79 cells. There was no increase in the micronucleus frequency in both grapevine leaf extracts compared to MMS, the positive control (Figure 3B). However, only pre-treatment with a 5 µg/mL dose of organic grapevine leaves protected the cells against MMS-induced micronucleus formation, suggesting antimutagenic activity against a typical monofunctional alkylating agent.

4.6 *In vitro* antioxidant activities of grapevine leaf extracts

To elucidate the antioxidant mechanism of the organic and conventional grapevine

extracts, we evaluated their DPPH[•] radical scavenging ability. The organic grapevine leaf extract presents a higher antioxidant activity (IC₅₀: 32.85 ± 0.001 mg%) than the conventional extract (83.80 ± 0.001 mg%). Organic grapevine leaves showed the same activity as ascorbic acid. In addition, both extracts showed SOD- and CAT-like activities. The SOD-like activity and CAT-like activity were 9 times higher and 2 times higher, respectively, in the organic grapevine leaves than in the conventional grapevine leaf extract (Table 5).

5. Discussion

Grapes are the most widely cultivated fruit crop in the world. This large-scale production generates a significant amount of leaves that have been traditionally used in the diet and for treating several pathologies (Basoglu et al., 2004; Kosar et al., 2007). Nevertheless, this is the first study of the biological activities of the aqueous extract of *V. labrusca* (cv. Isabella) leaves, the main species cultivated in South America.

The determination of polyphenol and ascorbic acid contents showed a marked abundance of phenolic phytochemicals and vitamin C in the aqueous extract of grapevine leaves. The aqueous extract from organic grapevine leaves showed higher levels of polyphenols and ascorbic acid than the conventional extract (Table 1). These data are in good accordance with those reported for other *Vitis* species, whose phenols are mainly distributed in the leaf (Pastrana-Bonilla et al., 2003, Pacifico et al., 2011). The major phenolic compounds in the grapevine leaf extracts were quercetin 3-O-glucoside and rutin. The highest concentration of these components was found in the leaf extracts from organically managed grapevines. This result could be attributed to the effects of organic cultivation. However, beyond the absence of fertilizers and/or fungicides, other factors, such as different humidity and temperature conditions (Bruno and Sparapano, 2007), as well as the harvest season and the

age of the plants, are important in the biosynthesis of phenolic compounds (Juroszec et al., 2009). As pesticides are not used, plants are more exposed to the actions of phytopathogens, and this challenge stimulates the plant to produce higher amounts of polyphenols in self-defense (Dani et al., 2007; Soleas et al., 1997).

Polyphenols and vitamins are important bioactive compounds and were reported as the primary contributors to the biological activities of *Vitis* leaves (Dani et al., 2009, Pacifico et al., 2011, Park and Cha, 2003). Moreover, the cell viability by MTT assay and the clonal survival assay both showed that grapevine leaf extracts had a cytoprotective effect against H₂O₂-induced (150 µM) oxidative damage (Figure 2A and 2B). Consistent with this cytoprotective effect, the extracts were able to prevent H₂O₂-induced lipid peroxidation and protein carbonyl formation in V79 cells. These data suggest that the observed effect is not dose dependent, at least in the concentration range used in this study. This result is in good accordance with previous results described by Xia et al. (2010) and Nadour et al. (2012), which showed that low concentrations of polyphenols might exert significant protection to cells.

Results from the alkaline comet assay showed that both grapevine leaf aqueous extracts prevented the occurrence of DNA damage at 1 and 5 µg/mL concentrations. Reinforcing these results, pre-treatment with both aqueous extracts led to decreased oxidative damage by reducing the number of FPG- and ENDO III-sensitive sites. This effect most likely occurred by reducing the formation of oxidized bases. The organic grape leaf extract demonstrated a stronger protective effect to purine and pyrimidine base oxidation than the conventional extract. This effect could be explained by the complex mixture of polyphenols, vitamins and possibly other compounds in the extract acting synergistically. However, it's important to note that these results are consistent with previous studies showing that polyphenols, such as

quercetin, decreased the amount of DNA damage associated with oxidative stress, (Min and Ebeler, 2009) showing a strong radical scavenging activities and antioxidant effects in various cell lines (Watjen et al., 2005; Min and Ebeler, 2009; Cho et al., 2011). It has been suggested that quercetin can act as an antioxidant in cells by modulation of gene expression (Bouhlef et al., 2008; Granado-Serrano et al., 2010) and moreover, Moon et al. (2006) showed that quercetin inhibits the formation of single strand breaks and 8-oxoGua in U937 cells that were exposed to 3-morpholinocydnnonimine N-ethylcarbamide. These results are interesting since that the two isolated polyphenols from *V. labrusca* leaves are glycosides of quercetin. Adding to this, the protective effects of Acerola fruit (*Malpighia glabra* L.) against H₂O₂-induced oxidative damage of DNA were attributed to ascorbic acid's radical scavenging activity (Nunes et al., 2011). In this scenario, Franke et al. (2005) and Melo-Cavalcante (2010) suggested that the protective effects could be mediated by vitamin C, which competes with DNA as target thereby reduces the genotoxicity induced by hydrogen peroxide (Vijayalaxmi and Venu, 1999) and also modulating the DNA repair (Sram et al., 2012).

The antimutagenic activity of *V. labrusca* cv. Isabella extract was evaluated using a micronucleus assay with MMS, a commonly used mutagen (Franke et al., 2005). At a dose of 5 µg/mL, the organic extract showed potent antimutagenic activity against MMS-induced damage. The increase in cell proliferation (BNCs) and decrease in micronucleus frequency, when compared to MMS alone, indicates repair activity. The protective effect of *V. labrusca* cv. Isabella can be attributed to its high polyphenol content. Polyphenols can quench free radicals or modulate transcription factors with chemopreventive activity, such as Nrf2, by attaching to specific sequences of DNA and modulating the expression of numerous antioxidant and anti-inflammatory genes and enzymes that can decrease or inhibit the effects of carcinogens (Murakami et al., 2008). In addition, polyphenols can increase the activity of

O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT), which repairs alkylated DNA bases by removing the methyl group from O⁶-methylguanine (Niture et al., 2007). Recent results show that rutin, one of the polyphenols characterized in *V. labrusca* leaves ameliorates the cyclophosphamide induced reproductive toxicity in male rats (Abarikwu et al., 2012). In other studies, antimutagenic activity was positively associated with the presence of vitamin C, which can compete with DNA as a target for alkylation, thereby reducing the cellular alkylation by MMS (Franke et al., 2005; Melo-Cavalcante et al., 2010).

To verify the possible antioxidant mechanism of the grapevine cv. *Isabella*, the protective effect of its DPPH[•] scavenging ability was evaluated. The aqueous extracts of organic grapevine leaves showed a stronger radical scavenging activity (IC₅₀ 32.85 mg/mL) than conventional grapevine extract (IC₅₀ 83.80 mg/mL). In addition, the extracts of organic grapevine leaves presented the highest SOD- and CAT-like activity levels. SOD plays a key role in detoxifying the superoxide anions from hydrogen peroxide and oxygen (Fridovich, 1998). The hydrogen peroxide that is formed may be decomposed by CAT in water and oxygen (Naziroglu et al., 2009). Polyphenols such as quercetin, rutin and its glycosides have been reported to be scavengers of the superoxide radical, H₂O₂, and methylglyoxal (Farrar et al., 2007). These results corroborate the data obtained by Pari and Sureh (2008), Kosar et al. (2007) and Pacifico et al. (2011) in *V. vinifera* and *V. labrusca* leaf extracts obtained with organic solvents.

6. Conclusions

In summary, the data obtained in the present study lead us to conclude that under the experimental conditions employed, grapevine leaf aqueous extracts have a powerful protective effect on H₂O₂- and MMS-induced damage to DNA. Thus, the applications of *V.*

labrusca cv. Isabella in folk medicine may be ideal candidates for a cost-effective, readily exploitable and natural phytochemical preparation.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), and Fundação de Amparo à Pesquisa no Rio Grande do Sul (FAPERGS) for their financial support.

References

- Abarikwu, S., O., Otuechere, A., A., Ekor, M., Monwuba, K., Osobu, D., 2012 Rutin ameliorates cyclophosphamide-induced reproductive toxicity in male rats. *Toxicol Int.* 19(2), 207-214.
- Aebi, H., 1984. Catalase in vitro. *Meth. Enzymol.* 105, 121-126.
- Asami, D., K., Hong, Y.,-J., Barrett, D., Mitchell, A. E., 2003. Comparison of the total phenolic and ascorbic acid content of freeze-dried and air-dried marionberry, strawberry, and corn grown using conventional, organic, and sustainable agricultural practices. *J. Agric. Food Chem.* 51, 1237–1247.
- Bannister, J.V., Calabrese, L., 1987. Assays for Sod. *Methods Biochem. Anal.* 32, 279-312.
- Basoglu, F., Sahin, I., Korukluoglu, M. Uylaser, V., Akpinar, A. Cu. O., 2004. Improvements in brineless processing of vine leaves. *Acad. Food.* 2, 7–12.
- Baytop T., 1999. Therapy with Plants in Turkey. Istanbul University Publications, n. 3255 Turkey, 374 p.
- Bombardelli, E., Morazzoni, P., 1995. *Vitis vinifera* L. *Fitoterapia* 66, 291-317.
- Bonacker, D., Stoiber, T., Wang, M., Böhm, K. J., Prots, I., Unger, E., Their, R., Bolt, H. M., Degen, G. H., 2004. Genotoxicity of inorganic mercury salts based on disturbed microtubule functions. *Arch. Toxicol.* 78,575-583.
- Bouhlef, I., K., Skandrani, I., Ben Amar, R., Nefatti, A., Laporte, F., Hininger-Favier, I., Ghedira, K., Chekir-Ghedira, L., 2008. *Acacia salicina* extracts protect against DNA damage and mutagenesis in bacteria and human lymphoblast cell k562 cultures. *Nut. Res.* 28(3),190-197.
- Bradley, M.O., Bhuyan, B., Francis, M. C., Langenbach, R., Peterson, A., Huberman, E., 1981 Mutagenesis by chemical agents in V79 chinese hamster cells: a review and analysis of the literature. A report of the Geve-Tox program. *Mutat. Res.* 87, 81-142.
- Bruno, G., Sparapano, L., 2007. Effects of three esca-associated fungi on *Vitis vinifera* L.:V. Changes in the chemical and biological profile of xylem sap from disease vc. Sangiovese vines, *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 71, 210-229.
- Burlinson, B., 2012. The in vitro and in vivo comet assays. *Meth. Mol. Biol.* 817,143-163.
- Cho, J. H., Park, S. Y., Lee, H. S., Whang, W. K., Sohn, U. D., 2011. The protective effect of quercetin 3-O-B-D-glucuronopyranoside on ethanol-induced damage in cultured feline esophageal epithelial cells. *Korean J. Physiol. Pharmacol.* 15(6), 319-326.
- Dani, C., Oliboni, L.S., Vanderlinde, R., Bonatto, D., Salvador, M., 2007. Phenolic content and antioxidant activities of White and purple juices manufactured with organically or conventionally-produced grapes. *Food Chem. Toxicol.* 45(12), 2574-2580.
- Dani C., Oliboni, L., S., Agostini, F., Funchal, C., Serafini, L., Henriques, J. A. P., Salvador, M., 2009. Phenolic content of grapevine leaves (*Vitis labrusca* var. Bordo) and its neuroprotective effect against peroxide damage. *Toxicol. In vitro* 24 (1),148-153.
- Denizot, F., Lang, R., 1986. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival, modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *J.*

Immunol. Meth. 89(2), 271-277.

Doyle, A., Griffiths, J. B., 1998. Cell e Tissue Culture: laboratory procedures in biotechnology, New York: Wiley.

Farrar, J. L., Hartle, D. K., Hargrove, J. L., Greenspan, P., 2007. Inhibition of protein glycation by skins and seeds of the muscadini grape. Biofactors. 30, 193-200.

Fenech, M. (2007) Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. Nat. Proc. 2,1084-1104.

Firuzi, O., Miri, R., Tavakkoli, M., Saso, L., 2011. Antioxidant therapy: current status and future prospects. Curr Med Chem 18(25), 3871-3888.

Franke, S. I. R., Prá, D., Erdtamn B., Henriques, J. A. P., Silva da, J., 2005. Influence of Orange juice over the genotoxicity induced by alkalating agents: an *in vivo* analysis. Mutagenesis. 20(4), 279-283.

Fridovich, I., 1998. Oxygen toxicity: a radical explanation. J. Exp. Biol. 201, 1203-1209.

Grigoletti, J. A., Sônego, O. R. (1993). Principais doenças fúngicas da videira no Brasil. Bento Gonçalves: Embrapa, 36p.

Granado-Serrano, A. B., Martín, M. A., Bravo, L., Goya, L.L., Ramos, S., 2010. Quercetin modulates NF-Kappa β and AP-1/jnk pathways to induce cell death in human hepatoma cells. Nutri. Cancer. 62(3), 390-401.

Hakkinen, S., H., Torronen, A., R., 2000. Content of flavonols and selected phenolic acids in strawberries and *Vaccinium* species: influence of cultivar, cultivation site and technique. Food Res. Int. 33,517–524.

Hallmann, E., 2012. The influence of organic and conventional cultivation systems on the nutritional value and content of bioactive compounds in selected tomato types. J. Sci.Food Agric. feb 20. DOI: 10.1002/jsfa.5617.

Hu, M. L., 2011. Dietary polyphenols as antioxidants and anticancer agents: more questions than answers. Chang gung Med. J. 34(5),449-460.

IFOAM – INTERNATIONAL FEDERATION OF ORGANIC AGRICULTURE MOVEMENTS (2005). Available in:<<http://www.ifoam.org>>. Accessed in 26 March 2012.

Juroszek, P., Lumdkin, H. M., Yang R. Y., 2009. Fruit quality and bioactive compounds with antioxidant activity of tomatoes grown-on farm: comparasion of organic and conventional management systems. J. Agric. Food Chem. 57,1188-1194.

Kosar, M., Küpeli, E., Malyer, H., Uysaler V., Türkben C., baser, K. H. C. 2007. Effect of brining on biological activity of leaves of *Vitis vinifera* L. (cv. Sultani Cekirdeksiz) from Turkey. J. Agr. Food Chem. 55, 4596-4603.

Levine, R.,L., Garland, D., Oliver, C.N., Amici, A., Climent, I., Lenz, A.G., Ahn, B.W., Shaltiel, S., Stadtman, E. R., 1990. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins assay and repair of biological damage. Meth. Enz.186,464-478.

Lombardi-Boccia, G., Lucarini, M., Lanzi, S., Aguzzi, A., Capelloni, M., 2004. Nutrients and antioxidant molecules in yellow plums (*Prunus domestica* L.) from conventional and organic productions: a comparative study. J. Agric. Food Chem. 52, 90–94.

Lowry, O. H., Rosebrough, N.J., Farr, L., Randall, R. J.,1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193, 265-275.

- Melo-Cavalcante, A. A. de C., Dantas, S. M. M. de M., Leite, A. de S., Matos, L. A., Castro e Sousa, J. M., Picada, J. N., da Silva, J., 2011. *In vivo* antigenotoxic and anticlastogenic effects of fresh and processed cashew (*Anacardium occidentale*) Apple juices. J. of Med. Food. 14(7/8), 792-198.
- Min, K., Ebeler, S.E., 2009. Quercetin inhibits hydrogen peroxide-induced dna damage and enhances dna repair in caco-2 cells. Food Chem. Toxicol.47(11),2716-2722.
- Moon, H. K., Yang, E. S., Park, J. W., 2006. Protection of peroxyxynitrite-induced DNA damage by dietary antioxidants. Arch. Pharm. Res. 29(3), 213-217.
- Murakami, A., Ashida, H., Terão, J., 2008. Multitargeted câncer prevention by quercetin. Cancer Lett. 269, 315-325.
- Nadour, M., Michaud, P., Moulti-Mati, F., 2012. Antioxidant activities of polyphenols extracted from Olive (*Olea europeae*) of *Chamlae* variety. App. Bichem. Biotechnol. DOI 10.1007.
- Naziroglu, M., Kutluhan, S., Uğuz, A.C., Celik, O., Bal, R., Butterworth, P.J., 2009. Topiramate and Vitamin E Modulate the Electroencephalographic Records, Brain Microsomal and Blood Antioxidant Redox System in Pentylenetetrazol-Induced Seizure of Rats. J. Membrane Biol. 229, 131–140.
- Niture, S. K., Velu, C. S., Smith, Q. R., Bhat, G. J., Srivenugopal, K. S., 2007. Increased expression of the mgmt repair protein mediated by cysteine prodrugs and chemopreventative natural products in human lymphocytes and tumor cell lines. Carcinogenesis. 28(2), 378-389.
- Nunes, R. da S., Kahl, V. F., Sarmiento, M. da S., Richter, M. F., Costa-Lotufo, L. V., Rodrigues, F. A., Abin-Carriquiry, J. A., Martinez, M. M., Ferronato, S., Ferraz, A. de N., da Silva, J., 2011. antigenotoxicity and antioxidant activity of acerola fruit (*malpighia glabra* l.) at two stages of ripeness. Plan. Foods Hum. Nutr. 66(2),129-35.
- OIV. *Note on the World Situation March 2010*. Organisation International de la Vigne et du Vin: Paris, France, 2010.
- Oliboni, L., S., Dani, C., Funchal, C. Henriques, J. A. P., Salvador, M., 2011. Hepatoprotective, cardioprotective, and renal-protective effects of organic and conventional grapevine leaf extracts (*Vitis labrusca* var. Bordo) on wistar rat tissues. An. Acad. Bras. Cienc. 83(4),1-9.
- Orhan, N., Aslan, M., Orhan, D.,D., Ergun, F., Yesilada, E., 2006. In-vivo assessment of antidiabetic and antioxidant activities of grapevine leaves (*Vitis vinifera*) in diabetics rats. J Ethnopharmacol.108, 280-286.
- Pacifico, S., D’Abrosca, B., Scognamiglio, M., Gallicchio, M., Potenza, N., Piccolella S., Russo, A., Monaco, P., Fiorentino, A.. 2011. Metabolic profiling of strawberry (*Vitis x labruscana* cv. “Isabella”) Components by nuclear magnetic resonance (NMR) and Evaluation of Their antioxidant and antiproliferative properties. J. Agric. Food Chem. 59,7679-7689.
- Pari, L., Suresh, A., 2008. Effect of grape (*Vitis vinifera* L.) leaf extract on alcohol induced oxidative stress in rats. Food Chem. Toxicol. 46, 1627-1634.
- Park, H. J., Cha, H. C. 2003. Flavonoids from leaves and exocarps of grape Kyoho. K J Biol. Science 7, 327-330.

- Pastrana-Bonilla, E., Akoh, C. C., Sellappan, S., Krewer, G., 2003. Phenolic content and antioxidant capacity of muscadine grapes. *J. Agric. Food Chem.* 51, 5497-5503.
- Rosa, R. M.; Moura, D. J.; Melecchi, M. I. S.; dos Santos, R. S.; Ritchter, M. F.; Camarão, E. B.; Henriques, J. A. P.; de Paula Ramos, A. L. Saffi, J. (2007). Protective effects of *Hibiscus tiliaceus* L. methanolic extract to V79 cells against cytotoxicity and genotoxicity induced by hydrogen peroxide and tert-butyl-hydroperoxide. *Toxicol. in vitro* 21:1442-1452.
- Salgo, M., G., Pryor, W., A., 1996. Trolox inhibits peroxynitrite-mediated oxidative stress and apoptosis in rat thymocytes. *Arch. Biochem. Biophys.* 333,482-488.
- Singh, N.P., McCoy, M.T., Tice, R.R., Schneider, E. L., 1988. A simple technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell Res.* 175,184-191.
- Singleton, V. L., Rossi, J. A. 1965. Colorimetric of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am. J. Enol. Viticult.* 6,144-158.
- Soleas, G.J., Diamandis, E.P., Goldberg, D.M., 1997. Resveratrol: a molecule whose time has come? And gone? *Clin. Biochem.* 30, 91-113.
- Soltoft, M., Nielsen, J., Laursen, H. K., Husted, S., Halekoh, U., Knuthsen, P., 2010. Effects of organic and conventional growth systems on the content of flavor onions and phenolic acids in carrots and potatoes. *J. Agric. Food Chem.* 58, 10323-10329.
- Sram, R. J.; Binkova, B.; Rossner, P. Jr, 2012. Vitamin C for DNA damage prevention. *Mutat. Res.* 733 (1-2), 39-49.
- Vijayalaxmi, K. K., Venu, R., 1999. In vivo anticlastogenic effects of L-ascorbic acid in mice. *Mutat Res.* 438, 47-51.
- Wang, Y., Catana, F., Yang Y., Roderick, R., Van Breemen, R. B., 2002. An LC-MS method for analyzing total resveratrol in grape juice, cranberry juice and in wine. *J. Agric. Food Chem.* 50, 431-435.
- Wätjen, W., Michels, G., Steffan, B., Niering, P., Chovolou, Y., Kampkötter, A., Tran-thi, Q. H., Proksch, P., Kahl, R., 2005. Low concentrations of flavonoids are protective in rat h4iie cells whereas high concentrations cause dna damage and apoptosis. *J. Nutr.L.* 35(3),525-531.
- Xia, E. Q., Deng, G. F., Guo, Y. J., Li, H. B., 2010. Biological Activities of Polyphenols from Grapes. *Int J Mol Sci.* 11, 622-646.
- Yamaguchi, T., Takamura, M., Matoba, T., Terao, J., 1998. HPLC method for evaluation of the free radical-scavenging of foods by using 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl. *Biosci. Bio. Biochem.* 62(6), 1201-1204.
- Yu, W., Fu, Y. C., Wang, W., 2012. Cellular and Molecular effects of resveratrol in health and disease. *J. Cell Biochem.* 113 (3),752-759.
- Zucco, F., De Angelis, I., Testai, E., Stamatii, A. 2004. Toxicology investigations with cell culture systems: 20 years after. *Toxicol. In vitro* 18(2),153-163.

Table 1: Total polyphenol and ascorbic acid contents in grapevine leaf extracts

Grape leaf extract	Polyphenol content	Ascorbic acid
	(mg/g)	(µg/g)
Organic	56.05 ± 1.09	9.7±0.35
Conventional	28.93 ± 0.88*	6.5±0.34*

Data are represented as the mean ± SD values of three independent experiments.

* Values are significantly different from the organic leaf extract according to Student's t-test ($p \leq 0.05$).

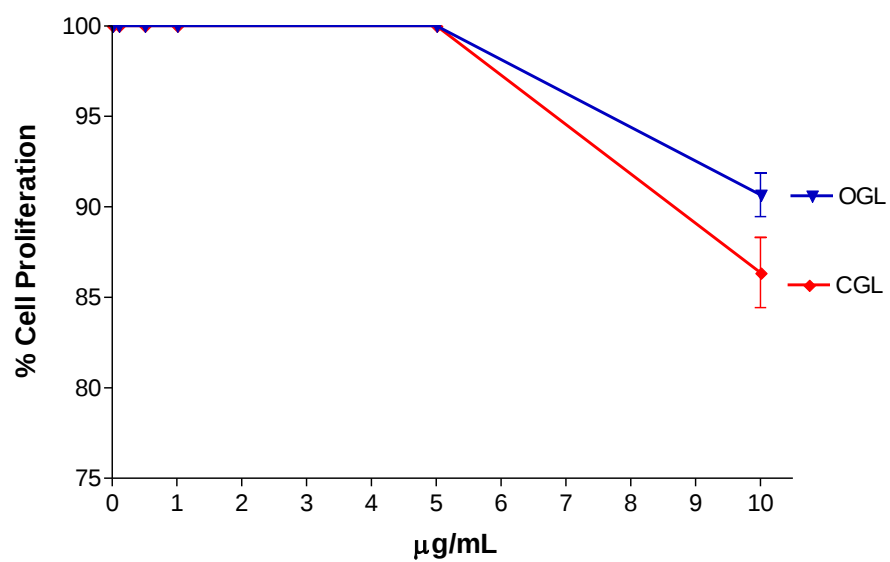
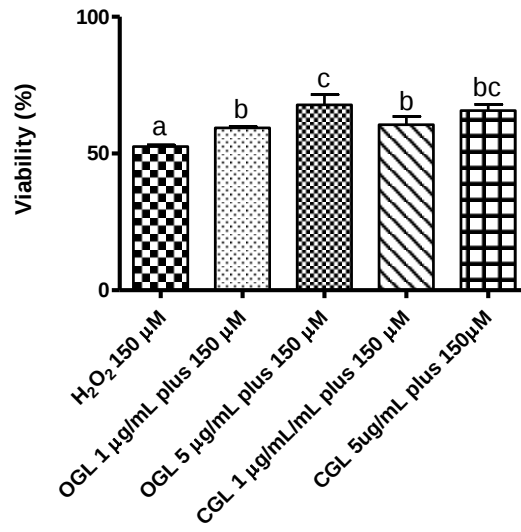


Figure 1: MTT assay of V79 cells treated with several OGL or CGL concentrations for 3 h in FBS-free medium at 37°C in the dark. The results are expressed as the mean $\pm$ SD values, n=3.

(A)



(B)

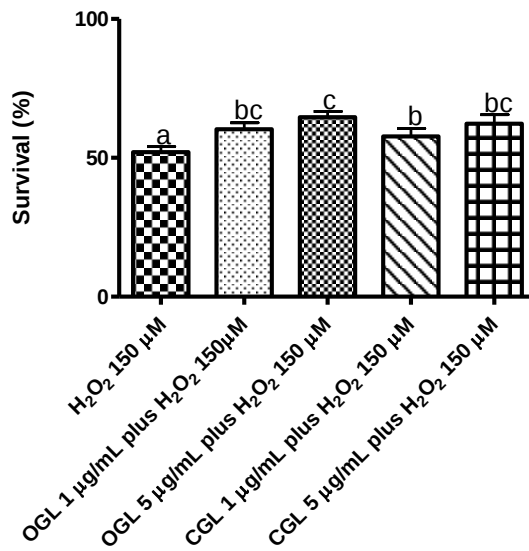


Figure 2: (A) Viability of V79 cells treated for 3 h with OGL and CGL at the indicated concentrations in FBS-free medium and subsequently submitted to H₂O₂ (150 μM) for 1 h in MTT assay. (B) Clonogenic survival of V79 cells treated for 3 h with OGL and CGL at indicated concentrations in FBS-free medium and subsequently submitted to H₂O₂ (150 μM) for 1 h. The results are expressed as the mean ± SD values, n=3. Different letters indicate a difference according to an analysis of variance and Tukey's post hoc test (p≤0.05).

Table 2: Protective effects of organic and conventional grapevine leaf extracts against H₂O₂-induced lipid peroxidation and carbonyl group production in V79 cells.

Treatment	MDA equivalents (μmol/mg protein)	nmol DNPH/mg of protein
NC	0.32 ± 0.006 ^{a*}	1.67 ± 0.17 ^{ab}
H ₂ O ₂ 20 mM	0.94 ± 0.005 ^b	5.14 ± 0.40 ^c
OGL 1 μg/mL	0.24 ± 0.036 ^a	2.08 ± 0.09 ^b
OGL 5 μg/mL	0.23 ± 0.003 ^a	0.69 ± 0.06 ^a
CGL 1 μg/mL	0.21 ± 0.023 ^a	1.38 ± 0.02 ^{ab}
CGL 5 μg/mL	0.23 ± 0.009 ^a	1.92 ± 0.29 ^b
OGL 1 μg/mL plus H ₂ O ₂ 20 mM	0.25 ± 0.022 ^a	1.07 ± 0.12 ^{ab}
OGL 5 μg/mL plus H ₂ O ₂ 20 mM	0.26 ± 0.030 ^a	2.11 ± 0.14 ^b
CGL 1 μg/mL plus H ₂ O ₂ 20 mM	0.34 ± 0.070 ^a	2.11 ± 0.08 ^b
CGL 5 μg/mL plus H ₂ O ₂ 20 mM	0.38 ± 0.006 ^a	2.03 ± 0.17 ^b

Determination of TBARS and carbonyl groups in cells treated for 3 h with OGL and CGL at the indicated concentrations in FBS-free medium and subsequently submitted to H₂O₂ (20 μM) for 1 h. Values are mean ± SD (n=3). *Different letters indicate a difference according to an analysis of variance and Tukey's post hoc test (p≤0.05).

Table 3: Evaluation of antigenotoxicity of grapevine leaf extract against H₂O₂- induced damage in V79 cells using a standard comet assay.

Treatment	Damage Index (DI)
NC	8.45 ± 0.89 ^{a*}
H ₂ O ₂ 150 µM	170.75 ± 7.01 ^f
OGL 1 µg/mL	7.85 ± 1.73 ^a
OGL 5 µg/mL	10.00 ± 0.76 ^a
CGL 1 µg/mL	10.44 ± 1.18 ^a
CGL 5 µg/mL	10.50 ± 0.38 ^a
OGL 1 µg/mL plus H ₂ O ₂ 150 µM	99.13 ± 9.23 ^c
OGL 5 µg/mL plus H ₂ O ₂ 150 µM	79.50 ± 8.73 ^b
CGL 1 µg/mL plus H ₂ O ₂ 150 µM	139.38 ± 9.55 ^e
CGL 5 µg/mL plus H ₂ O ₂ 150 µM	125.25 ± 13.31 ^d

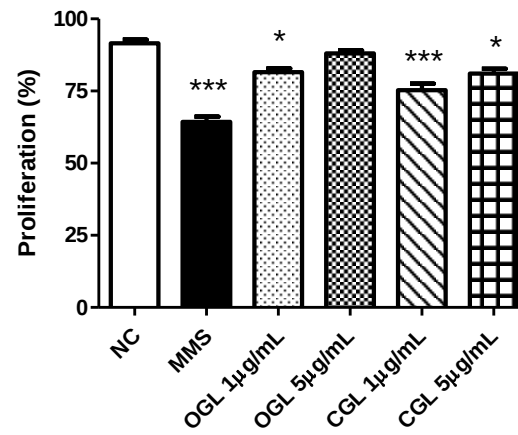
Data are presented as the mean ± SD, (n=4). *Different letters indicate a difference according to an analysis of variance and Tukey's post hoc test (p≤0.01). DI: damage Index, NC: negative control, OGL: Organic grapevine leaf extract, CGL: Conventional grapevine leaf extract.

Table 4: Effect of grapevine leaves on H₂O₂-induced DNA damage and purine and pyrimidine oxidation in V79 cells.

Treatment	FPG (DI)	ENDOIII (DI)
NC	7.13 ± 2.90 ^{a*}	6.85 ± 0.99 ^{a*}
H ₂ O ₂ 150 µL	54.88 ± 5.38 ^d	53.00 ± 5.18 ^d
OGL 1 µg/mL	3.75 ± 0.63 ^a	2.25 ± 0.63 ^a
OGL 5 µg/mL	3.25 ± 0.82 ^a	1.25 ± 0.63 ^a
CGL 1 µg/mL	2.50 ± 0.38 ^a	2.63 ± 0.31 ^a
CGL 5 µg/mL	3.00 ± 0.53 ^a	2.31 ± 0.62 ^a
OGL 1 µg/mL plus H ₂ O ₂ 150 µM	18.00 ± 1.51 ^b	22.39 ± 3.73 ^b
OGL 5 µg/mL plus H ₂ O ₂ 150 µM	14.40 ± 1.66 ^b	20.33 ± 7.04 ^b
CGL 1 µg/mL plus H ₂ O ₂ 150 µM	43.18 ± 3.14 ^c	39.15 ± 4.52 ^c
CGL 5 µg/mL plus H ₂ O ₂ 150 µM	40.50 ± 5.35 ^c	34.13 ± 5.44 ^c

The levels of FPG- and ENDO III- sensitive sites were calculated as a score obtained with enzyme incubation minus the score with enzyme buffer only after treatment with H₂O₂. Values are the mean ± SD (n=4) and the number of cells analyzed in each treatment was 100. *Different letters indicate a difference according to an analysis of variance and Tukey's post hoc test (p≤0.01). DI: Damage Index, NC: negative control, OGL: Organic grapevine leaf extract, CGL: Conventional grapevine leaf extract.

(A)



(B)

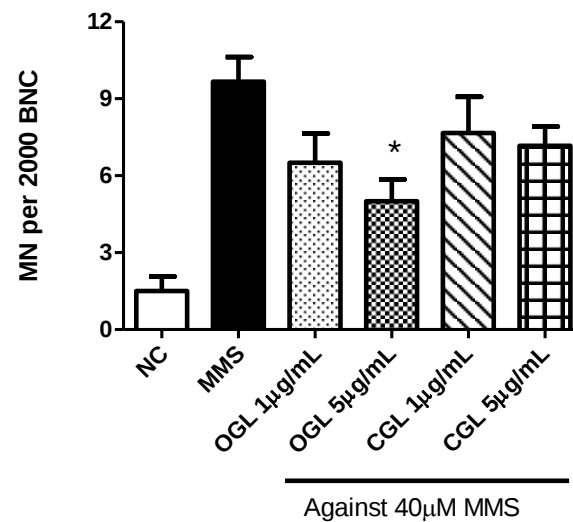


Figure 3: (A) Effect of OGL or CGL treatment on cell proliferation, measured as a percentage of BNCs in a micronucleus assay; (B) Antimutagenic activity of V79 cells treated with OGL or CGL for 3 h in FBS-free medium and challenged with MMS (40 µM) for 1 h. Results are expressed as the mean $\pm$ SD (n=4). Different symbols indicate the level of significance as tested by a one-way ANOVA (Tukey test): * represents $p < 0.05$, ** represents $p < 0.01$ and *** represents $p < 0.001$. OGL or CGL were compared to the cells only exposed to a mutagen. OGL: Organic grapevine leaf extract, CGL: Conventional grapevine leaf extract.

Table 5: *In vitro* antioxidant activity of grapevine extracts

SAMPLE	DPPH[·] (IC₅₀)^A	Sod-like activity (U SOD)^B	Cat-like activity (μmol of decomposed H₂O₂/minute
Organic grape leaf extract	32.85 ± 0.001 ^{a*}	5.98 ± 0.12 ^b	30.00 ± 5.30 ^b
Conventional grape leaf extract	83.80 ± 0.001 ^b	0.66 ± 0.01 ^a	13.13 ± 2.65 ^a
Ascorbic acid	26.5 ± 0.001 ^a	27.76 ± 0.33 ^c	15.00 ± 2.65 ^a

Data are mean ± SD values of three independent experiments

^AIC₅₀ value (mg% of samples needed to scavenge 50% of DPPH[·])

^BU Sod-like value (U SOD)

*Different letters indicate a difference according to an analysis of variance and Tukey's post hoc test (p≤0.05).

5. DISCUSSÃO GERAL

O cultivo de videiras possui importância histórica e econômica no país. Existem diversos estudos acerca dos efeitos biológicos das uvas e seus derivados, incluindo os sucos (Dani *et al.*, 2007; Rodrigues *et al.*, 2012) e os resíduos de vinificação (Scola *et al.*, 2010). No entanto, existem poucos estudos avaliando diferentes efeitos biológicos das folhas das videiras (Tabela 1), as quais são produzidas em grande quantidade a cada safra.

Embora em alguns países as folhas das videiras sejam comumente utilizadas para a preparação de alimentos, bebidas e na medicina tradicional, em nossa região a sua utilização ainda é limitada e essas folhas são principalmente descartadas no meio ambiente.

As videiras mais conhecidas e cultivadas no mundo são provenientes das espécies *vinífera* e *labrusca*, sendo que as pesquisas com folhas de videiras disponíveis na literatura utilizam, sobretudo, extratos de folhas de videiras da espécie *vinífera*. Os extratos utilizados nesses estudos são preparados principalmente com solventes orgânicos, o que limita sua utilização, tanto para a indústria farmacêutica como cosmética, devido à presença de resíduos de solventes (Tabela 1).

Entre as castas de *V. labrusca*, destaca-se a variedade Isabel, que é a uva mais cultivada na América do Sul, sendo responsável por cerca de 30% da produção de uvas do Brasil (Protas & Camargo, 2010). Essa variedade pode ser produzida através de manejo orgânico ou convencional. Por ser bastante rústica e resistente às variações climáticas bem como aos ataques de pragas e insetos, a variedade Isabel é produzida em grande quantidade e utilizada principalmente para a elaboração de sucos e vinhos de mesa.

Já tem sido mostrado que os extratos de folhas de *Vitis* são ricos em polifenóis, compostos com reconhecida atividade antioxidante (Orhan *et al.*, 2006; 2007; Kosar *et al.*, 2007; Dani *et al.*, 2009; Pacifico *et al.*, 2011). Porém, até o momento, não há dados sobre os possíveis efeitos antioxidantes, antigenotóxicos e antimutagênicos e de extratos obtidos a

partir de folhas *V. labrusca* da variedade Isabel que compare os extratos preparados com folhas oriundas de manejo orgânico e convencional e, sobretudo, que utilize água como solvente na preparação dos extratos.

Para a realização desse trabalho, utilizou-se as células de fibroblasto de pulmão de hamster chinês, uma linhagem bastante empregada para estudos de genotoxicidade, mutagenicidade e de atividade antioxidante. As células V79 possuem propriedades que facilitam a sua utilização na pesquisa, destacando-se o tempo de geração entre 12 e 16 horas, seu rápido crescimento a partir de um pequeno inóculo e recuperação rápida após estocagem, além de apresentarem baixa frequência de mutações espontâneas (Bradley *et al.*, 1981).

Para os ensaios de viabilidade, as células foram tratadas durante 3 horas com os extratos aquosos das folhas de videiras e, após, expostas por 1 hora com o agente oxidante H₂O₂. No ensaio de redução do MTT observou-se que ambos os extratos preveniram de maneira significativa a morte celular induzida por danos oxidativos (Figuras 2A e 2B, CAPÍTULO I). Nesse sentido, cabe ressaltar que os efeitos de citoproteção de extratos vegetais têm sido observados utilizando linhagens celulares submetidas a agentes oxidantes ou radiação ultravioleta (Barcelos *et al.*, 2007; Yoo *et al.*, 2009; Pereira *et al.*, 2009; Paul *et al.*, 2012; Dias *et al.*, 2012). Somando-se a isso, o pré-tratamento das células V79 com os extratos orgânico e convencional preveniu de maneira semelhante a oxidação de lipídios e de proteínas induzida pelo peróxido de hidrogênio, mostrando assim importante propriedade antioxidante. Neste contexto, estudos têm mostrado uma diminuição nos níveis de lipoperoxidação e de proteínas carboniladas em tecidos de ratos Wistar, tratados com extratos etanólicos de folhas de videiras e expostos ao tetracloreto de carbono ou peróxido de hidrogênio (Orhan *et al.*, 2007; Pari & Suresh, 2008; Dani *et al.*, 2009; Oliboni *et al.*, 2011).

Embora o extrato aquoso de folhas oriundas do cultivo orgânico tenha apresentado maior conteúdo de polifenóis totais que o extrato convencional, é possível inferir que, mesmo

em baixas concentrações, compostos fenólicos exerçam efeitos biológicos significativos. De fato, Xia *et al.* (2010) mostraram que alguns polifenóis apresentam atividades biológicas (antioxidante, cardioprotetora, anticancerígena, anti-inflamatória e antimicrobiana) na faixa de concentração de nano ou micromoles por litro e, recentemente, Scola *et al.* (2010) e Rodrigues *et al.* (2012) mostraram ausência de efeito antioxidante dose-dependente em estudos com resíduos de vinificação utilizando diferentes variedades de uvas e de sucos de uva.

Além de apresentar um maior conteúdo de polifenóis totais, o extrato aquoso das folhas de videiras provenientes de manejo orgânico também apresentou uma maior concentração de ácido ascórbico, em comparação ao extrato oriundo de folhas manejo convencional ($p \leq 0,05$). A influência dos métodos de cultivo sobre a biossíntese de compostos pelas plantas ainda é bastante controversa. Dani *et al.* (2009) não encontraram diferenças no conteúdo de polifenóis e ácido ascórbico entre os extratos hidroalcoólicos de folhas de videiras da variedade Bordô provenientes dos cultivos orgânico e convencional. Nesse cenário e de maneira semelhante a esse trabalho, alguns estudos mostram níveis de polifenóis superiores no cultivo orgânico de pêssegos, peras, morangos e tomates (Carbonaro *et al.*, 2002; Asami *et al.*, 2003; Hallmann, 2012), enquanto que para ameixas provenientes de cultivo convencional o conteúdo de polifenóis foi superior ao cultivo orgânico (Lombardi-Boccia *et al.*, 2004). Essas observações sugerem que além do emprego de agrotóxicos, fertilizantes, recursos de engenharia genética e da metodologia utilizada para as extrações, outros fatores, possivelmente as condições de clima, solo e fase de crescimento da planta, podem exercer influência no conteúdo de polifenóis presentes nas folhas de videiras (Bruno & Sparapano, 2007).

Comparando o conteúdo de polifenóis totais dos extratos aquosos de folhas de *V. labrusca* utilizados nesse trabalho com extratos de folhas de *V. vinifera*, percebe-se que em

alguns estudos, os extratos de folhas de *V. vinifera* apresentam conteúdo de polifenóis superior quando a extração é realizada com água ou solventes orgânicos. No entanto, salienta-se que esses extratos foram preparados utilizando-se metodologias que favorecem a extração de maior conteúdo de polifenóis, como maceração em álcool 70° durante 72 horas (Pari & Suresh 2008), água a 45°C durante 8 horas de extração e posteriores extrações com solventes orgânicos (Orhan *et al.*, 2006) e em maceração com água durante 120 dias (Kosar *et al.*, 2007) (Tabela 1). Recentemente, Pacífico *et al.* (2011) mostraram que o conteúdo de polifenóis em extratos metanólicos das folhas da variedade Isabel é inferior ao encontrado nos extrato aquosos proveniente dos cultivares orgânico e convencional utilizado nesse estudo (Tabela 1). O conjunto dessas observações demonstra a importância dos resultados obtidos, uma vez que os extratos aquosos de folhas de videiras apresentam quantidade significativa de polifenóis, o que amplia sua aplicabilidade em saúde e biotecnologia.

A análise cromatográfica dos extratos aquosos orgânico e convencional das folhas de videiras apresentaram como compostos majoritários a quercetina 3-O-glicosídeo e a rutina, sendo esses em maior quantidade no extrato aquoso orgânico. Embora em diferentes quantidades, esses compostos têm sido detectados em extratos de folhas de *V. vinifera* e *V. labrusca* (Kosar *et al.*, 2007; Schneider *et al.*, 2008; Dani *et al.*, 2009).

Os resultados obtidos nesse trabalho demonstram que os extratos aquosos de folhas de videiras, tanto orgânico quanto convencional, nas condições estudadas, não são genotóxicos ou mutagênicos e, ainda, são capazes de reduzir os danos genotóxicos e as mutações provocadas por agentes oxidantes e mutagênicos, como o H₂O₂ e o MMS. Nesses ensaios, percebe-se uma melhor atividade protetora do extrato orgânico quando comparado ao extrato convencional. Uma vez que o extrato aquoso das folhas orgânicas apresenta conteúdo de ácido ascórbico superior ao convencional, é possível que os efeitos antígeno-tóxicos e antimutagênicos sejam mediados, não somente pelos polifenóis que inativam moléculas

genotóxicas, endógenas e exógenas, incluindo as ER e também induzindo a expressão de genes de enzimas antioxidantes e de detoxificação, mas também pelo ácido ascórbico que atua como alvo das espécies reativas e dos agentes alquilantes, prevenindo assim o ataque às moléculas de DNA (Vijayalaxmi & Venu, 1999). Os efeitos antígenotóxicos e antimutagênicos do ácido ascórbico já foram relatados para o suco de laranja e para o cajú (Franke *et al.*, 2005; Melo-Cavalcante *et al.*, 2011).

Com o objetivo de estudar o mecanismo de ação antioxidante dos extratos aquosos das folhas de videiras, realizaram-se os ensaios para a determinação da capacidade de redução do radical livre DPPH[•], bem como as atividades Sod e Cat-like. Ambos os extratos apresentaram importante capacidade de doar átomos de hidrogênio para o radical DPPH[•] (Tabela 5, CAPÍTULO 1) e de mimetizar a ação das enzimas antioxidantes superóxido dismutase e catalase. É importante destacar que o extrato orgânico apresentou melhor desempenho nos três parâmetros *in vitro* avaliados e em adição, no ensaio de DPPH[•], o extrato orgânico apresentou resultados semelhantes aos encontrados por Kosar *et al.* (2007) em folhas de *V. vinifera*. Atividades importantes de Sod e Cat-like têm sido descritas para misturas complexas como polpas de frutas congeladas e sucos de uva (Dani *et al.*, 2007; Spada *et al.*, 2008) e possivelmente essas atividades estejam relacionadas com os efeitos citoprotetores, antígenotóxicos e antimutagênicos observados no presente estudo. Em se tratando de folhas de *V. labrusca*, o extrato metanólico de folhas da variedade Isabel, produzida na região de Garzano, na Itália, também apresentou importante atividade antioxidante *in vitro*, mostrando um IC₅₀ inferior ao encontrado nesse estudo. Acredita-se que isso se deva principalmente pela utilização do metanol como solvente, que permite a extração de maior quantidade de compostos com atividade antioxidante (Pacífico *et al.*, 2011).

Uma vez que os polifenóis agem suprimindo a formação de espécies reativas pela inibição da depleção enzimática, quelação de metais, varredura de espécies reativas (Halliwell

& Gutteridge, 2007), a partir dos resultados encontrados nesse trabalho é possível sugerir que além de potentes antioxidantes, os compostos presentes nos extratos podem agir também modulando sistema redox, de crescimento celular e agindo como agentes sinalizadores celulares (Aggarwal & Shisodia, 2004).

Por fim, salienta-se que já existe no mercado farmacêutico o fitoterápico Antistax[®], que é composto unicamente por extrato seco de folhas de *V. vinifera*, indicado para o tratamento de patologias relacionadas à má circulação sanguínea. Nesse contexto, o presente trabalho abre novas perspectivas no estudo do mecanismo de ação antígeno-tóxico, antimutagênico e antioxidante de folhas de videiras para a utilização nas indústrias farmacêutica, cosmética e alimentícia. Além disso, esse trabalho vem a contribuir para a valorização do cultivo de videiras, destacando uma nova aplicação da viticultura na bioeconomia nacional.

Tabela 1. Conteúdo de polifenóis, composição e propriedades observadas em diferentes extratos preparados a partir de folhas de videiras.

Espécie	Variedade	Manejo	Solvente	Polifenóis totais	Compostos identificados	Efeitos observados	Sistema utilizado	Referência
<i>Vitis vinifera</i> (produto comercial 1)	ND	ND	Metanol: ácido clorídrico (1000:1)	84 mg ácido gálico/g do produto	Antocianinas, derivados de ácidos hidroxicinâmicos e flavonols	Antioxidante	ORAC	Monagas <i>et al.</i> , 2006
<i>Vitis vinifera</i> (produto comercial 2)	ND	ND	Metanol: ácido clorídrico (1000:1)	60,4 mg ácido gálico/g do produto	Antocianinas, derivados de ácidos hidroxicinâmicos e flavonols	Antioxidante	ORAC	Monagas <i>et al.</i> , 2006
<i>Vitis vinifera</i> (produto comercial 3)	ND	ND	Metanol: ácido clorídrico (1000:1)	64,7 mg ácido gálico/g do produto	Antocianinas, derivados de ácidos hidroxicinâmicos e flavonols	Antioxidante	ORAC	Monagas <i>et al.</i> , 2006
<i>Vitis vinifera</i>	ND	ND	Água destilada seguida de acetato de etila	205,79 mg ácido gálico/g do extrato seco	ND	Antioxidante e antidiabético	Ratos Wistar	Orhan <i>et al.</i> , 2006
<i>Vitis vinifera</i>	ND	ND	Água destilada seguida de n-butanol	57,17 mg ácido gálico/g do extrato seco	ND	Antioxidante e antidiabético	Ratos Wistar	Orhan <i>et al.</i> , 2006
<i>Vitis vinifera</i>	ND	ND	Água	37,97 mg ácido gálico/g do extrato seco	ND	Antioxidante e antidiabético	Ratos Wistar	Orhan <i>et al.</i> , 2006
<i>Vitis vinifera</i>	ND	ND	Álcool: água (80:20) seguida de n-butanol	91,2 mg de ácido gálico/g do extrato seco	ND	Hepatoprotetor	Ratos Wistar	Orhan <i>et al.</i> , 2007
<i>Vitis vinifera</i>	ND	ND	Álcool: água (80:20) seguida de acetato de etila	216,0 mg de ácido gálico/g do extrato seco	ND	Hepatoprotetor	Ratos Wistar	Orhan <i>et al.</i> , 2007

<i>Vitis vinifera</i>	ND	ND	Água	68,6 mg de ácido gálico/g do extrato seco	ND	Hepatoprotetor	Ratos Wistar	Orhan <i>et al.</i> , 2007
<i>Vitis vinifera</i>	Sultani	ND	Água	152,06 mg ácido gálico/g do extrato seco	Ácido cafeico, quercetina e derivados de ácidos hidroxicinâmicos	Antioxidante, analgésico e antiinflamatório	DPPH [•] , ABTS ⁺ redução do ferro e camundongos albinos	Kosar <i>et al.</i> , 2007
<i>Vitis vinifera</i>	ND	ND	Álcool: Água (70:30)	98,84 mg ácido gálico/g do extrato seco	ND	Antioxidante	DPPH [•] , ABTS ⁺ e ratos Wistar	Pari & Suresh, 2008
<i>Vitis labrusca</i>	Bordô	Orgânico	Álcool: Água (70:30)	20,2 mg ácido gálico/ml de extrato	Catequina, resveratrol, quercetina, rutina e canferol	Neuroprotetor	Estruturas cerebrais de ratos Wistar	Dani <i>et al.</i> , 2009
<i>Vitis labrusca</i>	Bordô	Convencional	Álcool: Água (70:30)	19,0 mg ácido gálico/ml de extrato	Catequina, resveratrol, quercetina, rutina, canferol e naringinina	Neuroprotetor	Estruturas cerebrais de ratos Wistar	Dani <i>et al.</i> , 2009
<i>Vitis labrusca</i>	Bordô	Convencional	Álcool: Água (70:30)	19,0 mg ácido gálico/ml de extrato	Catequina, resveratrol, quercetina, rutina, canferol e naringinina	Cardioprotetor, hepatoprotetor e protetor renal	Estruturas de ratos Wistar	Oliboni <i>et al.</i> , 2011
<i>Vitis labrusca</i>	Isabel	ND	Metanol	8,28 mg ácido gálico /g de extrato seco	Ácido cafeico, quercetina, catequina.	Antioxidante e citotóxico em células HepG2	DPPH [•] , ABTS ⁺ , Redução do ferro e células HepG2	Pacífico <i>et al.</i> , 2011

ND: Não determinado, ORAC: capacidade de absorvência do radical oxigênio, DPPH[•]:capacidade de varredura dor radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazil, ABTS: capacidade de captura do radical 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico).

6. CONCLUSÕES

Os dados obtidos nesse estudo permitem concluir que:

- 6.1 O extrato aquoso de folhas de *Vitis labrusca* da variedade Isabel proveniente do manejo orgânico apresentou maior concentração de compostos fenólicos totais, quercetina-3-O-glicosídeo e rutina do que o extrato convencional.
- 6.2 Ambos os extratos aquosos de folhas de *Vitis labrusca*, nas concentrações estudadas, não apresentaram efeitos citotóxicos em células de mamífero V79 e preveniram a morte celular induzida pelo peróxido de hidrogênio.
- 6.3 Os extratos orgânico e convencional estudados preveniram de maneira semelhante os danos oxidativos a lipídios e proteínas.
- 6.4 Ambos os extratos apresentaram capacidade de prevenir danos ao DNA diminuindo os danos oxidativos a purinas e pirimidinas.
- 6.5 O extrato orgânico de folhas de videiras da variedade Isabel (5µg/mL) reduziu significativamente a formação de micronúcleos e o extrato convencional apresentou uma tendência na diminuição de mutações.
- 6.6 O extrato das folhas orgânicas apresentou maior capacidade de varredura do radical livre DPPH[•] e maior atividade Sod e Cat-like que o extrato convencional.

7. PERSPECTIVAS

Como continuidade desse trabalho, seria importante:

7.1 Quantificar demais compostos fitoquímicos presentes nos extratos de folhas de *Vitis labrusca*, variedade Isabel, a fim de identificar outros compostos com possível atividade biológica.

7.2 Quantificar os constituintes fenólicos no interior das células de mamífero tratadas com os extratos das folhas de *Vitis labrusca*, variedade Isabel.

7.3 Determinar a atividade e expressão (immunoblotting) das enzimas tais como Sod, Cat e o complexo glutathione (GSSG, GSH, GPx e GST) em células de mamífero tratadas com os extratos das folhas de videiras e expostas ao peróxido de hidrogênio.

7.4 Avaliar o efeito de diferentes doses dos extratos aquosos de folhas de *Vitis labrusca*, variedade Isabel, em células tumorais e não tumorais.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abib, R. T.; Quincozes-Santos, A.; Zanutto, C.; Zeidán-Chuliá, F.; Lunardi, P. S.; Gonçalves, C. A.; Gottfried, C. (2010). Genoprotective effects of the green tea-derived polyphenol/epicatechin gallate in C6 astroglial cells. **J. Med. Food.** 13(5):1111-5.
- Aggarwall, B. B.; Shishodia, S. (2004). Suppression of the nuclear factor-kappaB activation pathway by spice-derived phytochemicals reasoning for seasoning. **Ann. N. Y. Acad. Sci.** 1030:434-441.
- Aron, P. M.; Kennedy, J. A. (2008). Flavan-3-ols: Nature, occurrence and biological activity. **Mol. Nutr. Food. Res.** 52: 79-104
- Asami, D.K.; Hong, Y.-J.; Barrett, D.; Mitchell, A. E. (2003). Comparison of the total phenolic and ascorbic acid content of freeze-dried and air-dried marionberry, strawberry, and corn grown using conventional, organic, and sustainable agricultural practices. **J. Agric. Food Chem.** 51:1237–1247.
- Ataian, Y.; Krebs, J. E. (2006). Five repair pathways in one context: chromatin modification during DNA repair. **Biochem. and Cell Biol.** 84: 490-504.
- Babior, B. M. (2000). Phagocytes and oxidative stress. **Am. J. Med.** 109(1): 33-44.
- Barcelos, G. R. M.; Shimabukuro, F.; Maciel, M. A.M.; Cólus, I. M. S. (2007). Genotoxicity and antigenotoxicity of cashew (*Anacardium occidentale* L.) in V79 cells. *Toxicol. In vitro.* 21:1468-1475.
- Basoglu, F.; Sahin, I.; Korukluoglu, M.; Uylaser, V.; Akpınar, A., (1996) . A research on the effects of fermentation type and additives on quality and preservation and development of adequate technique in brined vine-leaves production. **The Turkish Journal of Agriculture and Forestry** 20, 535–545
- Basoglu, F.; Sahin, I.; Korukluoglu, M.; Uylaser, V.; Akpınar, A.; Cu, O. (2004). Improvements in brineless processing of vine leaves. **Acad. Food.** 2: 7–12.
- Baum, M.; Fauth, E.; Fritzen, S.; Herrmann, A.; Mertes, P.; Merz, K.; Rudolphi, M.; Zankl, H.; Eisenbrand, G.(2005). Acrylamide and glycidamide: genotoxic effects in V79-cells and human blood. **Mutat. Res.** 580(1-2):61-9.
- Baute, J.; Depicker, A. (2008). Base excision repair and its role in maintaining genome stability. **Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.** 43(4):239-76.
- Baytop, T. (1999). Therapy with plants in Turkey, **Istanbul University publications:** Istanbul, Turkey, 3255, p.374.
- Bhabak, K. P.; Mugesh, G. (2010). Functional mimics of glutathione peroxidase: bioinspired synthetic antioxidants. **Acc. Chem. Res.** 43(11):1408-1419.
- Boiteux, S.; Guillet, M. (2004). Abasic sites in DNA: repair and biological consequences in *Saccharomyces cerevisiae*. **DNA Repair.** 3: 1-12.
- Bombardelli, E.; Morazzoni, P. (1995) . *Vitis vinifera* L. **Fitoterapia** 66: 291-317.
- Bonnefoy, M.; Draï, J.; Kostka, T. (2002). Antioxidants to slow aging, facts and perspectives. **Presse. Med.** 31(25):1174-84.
- Boubaker, J.; Mansour, H. B.; Ghedira, K.; Chekir-Ghedira, L. (2011). Antimutagenic and free radical scavenger effects of leaf extracts from acacia salicina. **Ann. Clin. Microbiol.**

Antimicrob. 1:10:37.

Bradley, M.O.; Bhuyan, B.; Francis, M. C.; Langenbach, R.; Peterson, A.; Huberman, E. (1981). Mutagenesis by chemical agents in V79 chinese hamster cells: a review e analysis of the literature. A report of the Geve-Tox program. **Mutat. Res.** 87:81-142.

Brand-Williams, W.; Cuvelier, M. E.; Bersert, C. (1985). Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. **Lebensm. Wiss.Technol.** 28: 25-30.

Brasil. Embrapa Uva e Vinho (2012). Vitivinicultura brasileira: Panorama 2011. **Disponível (on line):** <http://www.cnpuv.embrapa.br/publica/artigos/vitbras2011.pdf> (05 de julho).

Brasil. Embrapa Uva e Vinho (2011). Dados da vitivinicultura. **Disponível (on line):** <http://www.cnpuv.embrapa.br/prodserv/vitivinicultura> (05 de janeiro).

Brozmanová, J.; Dudás, A.; Henriques J. A.(2001) Repair oxidative damage - an important factor reducing câncer risk. **Neoplasma.** 48(2): 85-93.

Bruneton, J. (1999). **Pharmacognosy, phytochemistry, Medicinal Plants**, 2nd ed. Lavoisier, Paris.

Bruno , G., Sparapano, L., 2007. Effects of three esca-associated fungi on *Vitis vinifera* L.:V. Changes in the chemical and biological profile of xylem sap from disease vc. Sangiovese vines. **Physiol. Mol. Plant Pathol.** 71, 210-229.

Carbonaro, M.; Mattera, M.; Nicoli, S.; Bergamo, P.; capelloni, M. (2002). Modulation of antioxidant compounds in organic vs conventional fruit (peach, *Prunus persica* L., and pear, *Pyrus communis* L.). **Food Chem.** 19: 5458-5462.

Casanova, N. A.; Ariagno, J. I.; López Nigro, M. M.; Mendeluk, G. R.; Gette, M. D.; Petenatti, E.; Palaoro, L. A.; Carballo, M. A.(2012). In vivo antigenotoxic activity of watercress juice (*Nasturtium officinale*) against induced DNA damage. **J. Appl. Toxicol.** DOI 10.1002.

Catanzaro, I.; Caradonna, F.; Barbata, G.; Saverini. M.; Mauro. M.; Sciandrello G. (2012). Genomic instability induced by α -pinene in Chinese hamster cell line. **Mutagenesis.** 27(4): 463-469.

Cavalcanti, B. C.; Moura, D. J.; Rosa, R. M.; Moraes, M. O.; Araujo, E.C.; Lima, M. A.; Silveira, E. R.; Saffi, J.; Henriques, J. A.; Pessoa, C.; Costa-Lotufo, L. V. (2008) Genotoxic effects of tanshinones from *Hyptis martiusii* in V79 cell line. **Food. Chem. Toxicol.** 46(1):388-92

Chakravarti, B.; Chakravarti, D.N. (2007). Oxidative modification of proteins: age-related changes. **Gerontology** 53: 128-139.

Cheng, Z.; Moore, J.; Yu, L. (2006). High-throughput relative DPPH radical scavenging capacity assay. **J. Agric. Food. Chem.** 54: 7429-7436.

Costa-Medina, L. F.; Viau, C. M.; Moura, D. J.; Saffi, J.; Stefani, V.; Brandelli, A.; Henriques, J. A. P. (2008). Genotoxicity of aminohydroxynaphthoquinones in bacteria, yeast, and chinese hamster lung fibroblast cells. **Mutat. Res.** 650(2):140-149.

Dani, C.; Oliboni, L.S.; Vanderlinde, R.; Bonatto, D.; Salvador, M. (2007). Phenolic content and antioxidant activities of White and purple juices manufactured with organically or conventionally-produced grapes. **Food Chem. Toxicol.** 45(12): 2574-2580.

Dani C.; Oliboni, L. S.; Agostini, F.; Funchal, C.; Serafini, L.; Henriques, J. A. P.; Salvador, M.(2009). Phenolic content of grapevine leaves (*Vitis labrusca* var. Bordo) and its

- neuroprotective effect against peroxide damage. **Toxicol. In vitro** 24(1):148-153.
- Davis, K. L.; Martin, E.; Turko, I.; Murad, F. (2001) Novel effects of nitric oxid. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.** 41:203-236.
- Degrandi, T. H.; de Oliveira, I. M.; d'Almeida, G. S.; Garcia, C. R.; Villela, IV.; Guecheva, T. N.; Rosa, R. M.; Henriques, J. A. (2010). Evaluation of the cytotoxicity, genotoxicity and mutagenicity of diphenyl ditelluride in several biological models. **Mutagenesis.** 25(3):257-69.
- Deng, C. Z.; Fons, M. P.; Rosenblatt, J.; El-Zein, R. A.; Abdel-Rahman, S. Z.; Albrecht, T. (2006). Nickel potentiates the genotoxic effect of benzo[a]pyrene in Chinese hamster lung V79 cells. **Environ. Mol. Mutagen.** 47(3):150-61.
- Denicola, A.; Radi, R. (2005). Peroxynitrite and drug-depending toxicity. **Toxicology.** 208: 273-288.
- Dias, T.; Liu, B.; Jones, P.; Houghton, P. J.; Mota-Filipe, H.; Paulo, A. (2012). Cytoprotective effect of *Coreopsis tinctoria* extracts and flavonoids on tbhp and cytokine-induced cell injury in pancreatic min6 cells. *J. Ethnopharmacol.* 139(2):485-492.
- Dizdaroglu, M. (2005). Base-excision repair of oxidative DNA damage by DNA glycosylases. **Mutat. Res.** 591: 45-59.
- Dizdaroglu, M.; Kirkali, G.; Jaruga, P. (2008). Formamidopyrimidines in DNA: mechanisms of formation, repair, and biological effects. **Free Radic. Biol. Med.** 45(12): 1610-1621.
- Doyle, A.; Griffiths, J. B. (1998). **Cell e Tissue Culture: laboratory procedures in biotechnology**, New York: Wiley.
- Fagbemi, A. F.; Orelli, B.; Schärer, O. D. (2011). Regulation of endonuclease activity in human nucleotide excision repair. **DNA Repair.** 10(7):722-9.
- Fenech, M. (2000) The in vitro micronucleus technique. **Mutat Res.** 455: 81 – 95.
- Fenech, M. (2006) Cytokinesis-block micronucleus assay involves into a “cytome” assay of chromosomal instability, mitotic dysfunction and cell death. **Mutat. Res.** 600: 58-66.
- Fenech, M. (2007) Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. **Nat. Proc.** 2:1084-1104.
- Firuzi, O.; Miri, R.; Tavakkoli, M.; Saso, L. (2011) Antioxidant therapy: current status and future prospects. **Curr. Med. Chem.** 18(25):3871-3888.
- Franke, S. I. R., Prá, D., Erdtamn B., Henriques, J. A. P., Silva da, J., 2005. Influence of Orange juice over the genotoxicity induced by alkalating agents: an *in vivo* analysis. *Mutagenesis.* 20(4), 279-283.
- Fridovich, I. (1998). Oxygen toxicity: a radical explanation. **J. Exp. Biol.** 201: 1203-1209.
- Friedberg, E. C.; Walker, G. C.; Siede, W.; Wood, R. D.; Schlitz, R. A.; Ellenberger, T. (2006). **DNA repair and Mutagenesis.** 2^oed. ASM Press, Washington.
- Fukai, T.; Ushio-Fuhai, M. (2011). Superoxide dismutases: role in redox signaling, vascular function, and diseases. **Antioxid. Redox Signal.** 15(6):1583-1606.
- García-Lestón, J.; Roma-Torres, J.; Vilares, M.; Pinto, R.; Prista, J.; Teixeira, J. P.; Mayan, O.; Conde, J.; Pingarilho, M.; Gaspar, J. F.; Pásaro, E.; Méndez, J.; Laffon, B. (2012). Genotoxic effects of occupational exposure to lead and influence of polymorphisms in gene involved in lead toxicokinetics and in DNA repair. **Environ. Int.** 43:29-36
- Giovannini, E. (1999). **Produção de Uvas para Vinho, Suco e Mesa.** Porto Alegre: Ed. Renascença. p 96-107.

- Goyal, M. N.; Basak, A. (2010). Human catalase: looking for complete identity. **Protein Cell.** 1(10):888-897.
- Guerra, C. C.; Mandelli, F.; Tonietto, J.; Zanús, M. C.; Camargo, V. A. (2009). **Conhecendo o essencial sobre uvas e vinhos.** Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 69p.
- Gutteridge, J. M. C.; Halliwell, B. (2010). Antioxidants: molecules, medicines, and myths. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 393: 561-564.
- Hakkinen, S., H.; Torronen, A., R. (2000). Content of flavonols and selected phenolic acids in strawberries and *Vaccinium* species: influence of cultivar, cultivation site and technique. **Food Res. Int.** 33:517-524.
- Halliwell, B.; Gutteridge, J. M. C. (2007). **Free Radicals in Biology and Medicine.** 4th ed. Oxford Univ Press: New York, United States.
- Hallmann, E., (2012). The influence of organic and conventional cultivation systems on the nutritional value and content of bioactive compounds in selected tomato types. *J. Sci. Food Agric.* Feb 20.
- Hanawalt, P. C.; Spivak, G. (2008). Transcription-coupled DNA repair: two decades of progress and surprises. **Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.** 9(12):958-70.
- Hartmann, A.; Speit, G. (1994). Genotoxic effects of chemicals in the single cell gel (SCG) test with human blood cells in relation to the induction of sister-chromatid exchanges (SCE). **Mutat. Res.** 346: 49-56.
- Hebashi, K. A. H.; Fadel, H. M.; Soliman, M. M. A. (1991). Volatile components of grape leaves. **J. of Islamic academy of science** 4, 26-28.
- Heck, D. E.; Shakarjian, M.; Kim, H. D.; Laskin, J. D.; Vetrano, A. M. (2010). Mechanisms of oxidant generation by catalase. **Ann. N. Y. Acad. Sci.** 1203:120-5.
- Heuser, V. D.; Erdtmann, B.; Kvitko, K.; da Silva, J. (2007). Evaluation of genetic damage in Brazilian footwear-workers: biomarkers of exposure, effect, and susceptibility. **Toxicology,** 232: 235-247.
- Hoeijmakers, J. H. J (2001). Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature* 411:366-374.
- Houtgraaf, J.H.; Versmissen, J.; Giessen, W.J. Van Der (2006). A concise review of DNA damage checkpoints and repair in mammalian cells. **Cardiovasc. Resc. Med.** 7: 165-172.
- Hu, M. L. (2011) Dietary polyphenols as antioxidants and anticancer agents: more questions than answers. **Chang Gung Med. J.** 34(5):449-460.
- IFOAM. International Federation of Organic Moviments (2005). **Disponível (online)** <http://www.ifoam.org>. (18 de junho).
- Jagetia, A.; Jagetia, G. C.; Jha, S. (2007). Naringin, a grapefruit flavanone, protects V79 cells against the bleomycin-induced genotoxicity a decline in survival. **J. Appl. Toxicol.** 27:122-132.
- Jeppesen, D. K.; Bohr, V. A.; Stevnster, T. (2011). DNA repair deficiency in neurodegeneration. **Prog. in Neurobiol.** 94: 166-200, 2011.
- Juroszek, P.; Lumdkin, H. M.; Yang, R.Y. (2009). Fruit quality and bioactive compounds with antioxidant activity of tomatoes grown-on farm: comparasion of organic and conventional management systems. **J. Agric. Food Chem.** 57:1188-1194.

- Karakaya, A.; Yucesoy, B.; Burgaz, S.; Karakaya, A. E. (1997). Immune function in n-hexane-exposed workers. **Ann. N. Y. Acad. Sci.** 837 :122-125.
- Kosar, M.; Küpeli, E.; Malyer, H.; Uysaler V.; Türkben C.; Baser, K. H. C. (2007). Effect of brining on biological activity of leaves of *Vitis vinifera* L. (cv. Sultani Cekirdeksiz) from Turkey. **J. Agr. Food Chem.** 55: 4596-4603.
- Levine, R. L.; Garland, D.; Oliver, C.N.; Amici, A.; Climent, I.; Lenz, A.G.; Ahn, B.W.; Shaltiel, S.; Stadtman, E. R. (1990). Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins assay and repair of biological damage. **Meth. Enz.** 186: 464-478.
- Lombardi-Boccia, G.; Lucarini, M.; Lanzi, S.; Aguzzi, A.; Capelloni, M. (2004). Nutrients and antioxidant molecules in yellow plums (*Prunus domestica* L.) from conventional and organic productions: a comparative study. **J. Agric. Food.Chem.** 52: 90–94.
- Luch, A. (2005) Nature and nurture – lessons from chemical carcinogenesis. **Nat. Rev. Cancer.** 5: 113-125.
- Maistro, E. L.; Carvalho, J. C.; Mantovani, M. S. (2004). Evaluation of the genotoxic potential of the *Casearia sylvestris* extract on HTC and V79 cells by the comet assay. **Toxicol. In Vitro.**18(3):337-42.
- Marnett, L. J. (2000). Oxyradicals and DNA damage. **Carcinogenesis.** 21(3)361-370.
- Melo-Cavalcante, A. A. de C.; Dantas, S. M.; Leite, A. de S.; Matos, L. A.; Sousa, J. M.; Picada, J. N.; da Silva, J. (2011). In vivo antigenotoxic and anticlastogenic effects of fresh and processed cashew (*Anacardium occidentale*) Apple Juices. **J. Med. Food.**14(7/8):792-798.
- Memisoglu, A.; Samson, L.(2000). Base excision repair in yeast and mammals **Mutat. Res.** 451: 39–51.
- Miorelli, S. T.; Rosa, R. M., Moura, D. J., Rocha, J. C.; Lobo, L. A. Henriques, J. A. P.; Saffi, J. (2008). Antioxidant and antimutagenic effects of ebselen in yeast and in cultured mammalian V79 cells. **Mutagenesis.** 23(2):93-99.
- Monagas, M., Hernández-Ledesma, B., Gomez-Cordovez, C. Bartolome, B. (2006). Commercial dietary ingredients from *Vitis vinifera* L. leaves and grape skins: antioxidant and chemical characterization. **J. Agr. Food Chem.** 54: 319-327
- Montvale, N.J. **PDR for Herbal Medicines.** Medical Economics. p. 362–363, 2002.
- Munshi, A.; Hobbs, M.; Meyn, R. E. (2005). Clonogenic cell survival assay. **Methods Mol. Med.** 110:21-28.
- Oga Z. (2003). **Fundamentos de Toxicologia.** 2ed. Editora Atheneu, São Paulo, p.39-44.
- Okado-Matsumoto, A.; Fridovich, I. (2001) Subcellular Distribution of superoxide dismutases (SOD) in rat liver: Cu, Zn-sod in mitochondria. **J. Biol. Chem.** 276(42):38388-93
- Oliboni, L.S.; Dani, C.; Funchal, C.; Henriques, J. A. P.; Salvador, M. (2011). Hepatoprotective, cardioprotective , and renal-protective effects of organic and conventional grapevine leaf extracts (*Vitis labrusca* var. Bordo) on wistar rat tissues. **An. Acad. Bras. Cienc.** 83(4):1-9.
- Olive, P. L.; Banáth, J. P. (2006). The comet assay: a method to measure DNA damage in individual cells. **Nat Protoc.**1(1):23-9.
- Orhan, N.; Aslan, M.; Orhan, D.; Ergun, F.; Yesilada, E. (2006). In-vivo assessment of antidiabetic and antioxidant activities of grapevine leaves (*Vitis vinifera*) in diabetics rats. **J**

Ethnopharmacol.108: 280-286.

Orhan, D.D.; Orhan, N.; Ergun, E.; Ergun, F. (2007) Hepatoprotective effect of *Vitis vinifera* L. leaves on carbon tetrachloride-induced acute liver damage in rats. **J. ethnopharmacol.**112:145-151.

Ostling, O.; Johanson, K. J. (1984). Microelectrophoretic study of radiation induced DNA damages in individual mammalian cells. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 123:291-298.

Pacifico, S.; D'Abrosca, B.; Scognamiglio, M.; Gallicchio, M.; Potenza, N.; Piccolella S.; Russo, A.; Monaco, P.; Fiorentino, A. (2011). Metabolic profiling of strawberry (*Vitis x labruscana* cv "Isabella") Components by nuclear magnetic resonance (NMR) and Evaluation of Their antioxidant and antiproliferative properties. **J. Agric. Food Chem.** 59:7679-7689.

Pages, V.; Fuchs, R.P. (2002). How DNA lesions are turned into mutations within cells? **Oncogene.** 21: 8957-8966.

Palomera-Sanchez, Z.; Zurita, M. (2011). Open, repair and close again: Chromatin dynamics and the response to UV-induced DNA damage. **DNA Repair.** 10: 119–125, 2011.

Pari, L.; Suresh, A. (2008). Effect of grape (*Vitis vinifera* L.) leaf extract on alcohol induced oxidative stress in rats. **Food Chem. Toxicol.** 46:1627-1634.

Paul, P.; Bansal, P.; Nayak, P. G.; Pannakal, S. T.; Priyadarsini, K. I.; Unnikrishnan, M. K. (2012). Polyphenolic fraction of *Pilea microphylla* (L.) protects chinese hamster lung fibroblasts against γ -radiation-induced cytotoxicity and genotoxicity. **Environ. Toxicol. Pharmacol.** 33(1):107-119.

Pereira, B. K.; Rosa, R. M.; da Silva, J.; Guecheva, T. N.; Oliveira, I. M.; Ianisicki, M.; Benvegnú, V. C.; Furtado, G. U.; Ferraz, A.; Richter, M. F.; Schroder, N.; Pereira, A. B.; Henriques, J. A. P. (2009). Protective effects of three extracts from Antarctic plants against ultraviolet radiation in several biological models. **J. Photochem. Photobiol. B.** 96:117-129.

Peterson, L. (1991). **A field guide to edible wild plants: eastern and central north America.** The Peterson Field guide Series, 23. USA.

Protas, J. F. da S.; Camargo, U. A. (2010). Vitivinicultura brasileira: panorama setorial de 2010. **Disponível (online):** www.cnpqv.embrapa.br/publica/livro.pdf. (12 de junho)

Rice-Evans, C. A.; Miller, N. J.; Bolwell, P. G.; Bramley, P. M.; Pridham, J. B. (1995). The relative antioxidants activities of plant-derived polyphenolic flavonoids. **Free Radical Res.** 22(4): 375-383.

Rodrigues, A. D.; Scheffel, T. B.; Scola, G.; Santos, M.T.; Fank, B.; de Freitas, S. C.; Dani, C.; Vanderlinde, R.; Henriques, J. A.; Coitinho, A. S.; Salvador, M. (2012). Neuroprotective and anticonvulsant effects of organic and conventional purple grape juices on seizures in Wistar rats induced by pentylentetrazole. **Neurochem. Int.** 60(8),799-805.

Roos, W.P.; Kaina, B. (2006). DNA damage-induced cell death by apoptosis. **Trends. Mol. Med.** 12: 440-450.

Rosa, R. M.; Moura, D. J.; Melecchi, M. I. S.; dos Santos, R. S.; Richter, M. F.; Camarão, E. B.; Henriques, J. A. P.; de Paula Ramos, A. L. Saffi, J. (2007). Protective effects of *Hibiscus tiliaceus* L. methanolic extract to V79 cells against cytotoxicity and genotoxicity induced by hydrogen peroxide and tert-butyl-hydroperoxide. **Toxicol. in vitro** 21:1442-1452.

Saffi, J.; Henriques, J. A. P. **Reparação de DNA em células eucarióticas**, In Silva, J.; Erdtman, B.; Henriques, J. A. P. **Genética Toxicológica**. Editora Alcance, Porto Alegre, 2003.

- Sarasin, A.; Stary, A. (2007). New insights for understanding the transcription-coupled repair pathway. **DNA Repair**. 6: 265-269, 2007.
- Scheffrin, E. L. (2010). Antioxidants in hypertension and cardiovascular disease. **Mol. Inter.** 10 (6):354-362.
- Schneider, E.; Heydt, H. V. D.; Esperester, A. (2008). Evaluation of polyphenol composition on red leaves from different varieties of *Vitis vinifera*. **Planta Med.** 74:565-572.
- Scola, G.; Danusa, Conte.; Spada, P. W. D. S.; Dani, C.; Vanderlinde, R.; Funchal C.; Salvador M. (2010). Flavan-3-ol Compounds from Wine Wastes with *in Vitro* and *in Vivo* Antioxidant Activity. **Nutrients**. 2:1048-1059.
- Singh, N. P.; McCoy, M. T.; Tice, R. R.; Schneider, E. L. (1988) A simple technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cells. **Exp. Cell. Res.** 175:184-191.
- Singh, M.; Arsenault, M.; Sanderson, T.; Murthy, V.; Ramassamy, C. (2008). Challenges for research on polyphenols from foods in Alzheimer's disease: bioavailability, metabolism, and cellular and molecular mechanisms. **J. Agric. Food. Chem.** 56(13):4855-4873.
- Sousa, J. S. I. (1996). **Uvas para o Brasil. Piracicaba: FEALQ.**
- Spada, P. D. S.; de Souza, G. G. N.; Bortolini, G. V.; Henriques, J. A. P.; Salvador, M. (2008) Antioxidant, Mutagenic and Antimutagenic activity of frozen fruits. **J. Med. Food.** 11(1):144-151.
- Sturtz, L. A.; Diekert, K.; Jensen, L. T.; Lill, R.; Culotta, V.C. (2001). A fraction of yeast Cu,Zn-superoxide dismutase and its metallochaperone, CCS, localize to the intermembrane space of mitochondria. A physiological role for SOD1 in guarding against mitochondrial oxidative damage. **J. Biol. Chem.** 276(41):38084-38089.
- Svilar, D.; Goellner, E. M.; Almeida, K. H.; Sobol, R. W. (2011). Base excision repair and lesion-dependent subpathways for repair of oxidative DNA damage. **Antioxid. Redox Signal.** 14(12):2491-507.
- Tice, R. R.; Agurell, E.; Anderson, D.; Hartmann, A.; Kobayash, H.; Miyamae, Y.; Rojas, E.; Ryu, J-C.; Sasaki, Y. F. (2000). Single cell/gel comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. **Environ. Mol. Mutagen.** 35:206-221.
- Trueba, G. P.; Sánchez, M. (2001). Los flavonóides como antioxidantes naturales. **Acta Farm. Bonaer.** 20(4): 297-306.
- Tsao, R. (2010). Chemistry and Biochemistry of Dietary polyphenols. **Nutrients** 2:1231-1246.
- Valko, M.; Morris, H.; Cronin, M. T. D. (2005) Metals, toxicity and oxidative stress. **Current. Med. Chem.** 12: 1161-1208.
- Valko, M.; Leibfritz, D.; Moncol, J.; Cronin, M. T.; Mazur, M.; Telser, J. (2007). Free Radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **Int. J. Biochem. Cell** 39:44-84.
- Valverde, M.; Rojas, E. (2009). Environmental and occupational biomonitoring using comet assay. **Mutat. Res.** 681, 9d3-109.
- Vijayalaxmi, K. K., Venu, , R., 1999. In vivo anticlastogenic effects of L-ascorbic acid in mice. **Mutat Res.** 438, 47-51.

- Wang, L.; Roy, S. K.; Eastmond, D. A. (2007). Differential cell cycle-specificity for chromosomal damage induced by merbarone and etoposide in V79 cells. **Mutat. Res.** 616(1-2):70-82.
- Wilson, III. D. M.; Bohr, V. A. (2007). The mechanisms of base excision repair, and its relationship to aging and disease. **DNA Repair.** 6: 544-559.
- Xia, E. Q.; Deng, G. F.; Guo, Y. J.; Li, H. B. (2010). Biological Activities of Polyphenols from Grapes. **Int. J. Mol. Sci.** 11, 622-646.
- Yoo, K. M.; Hwang, I. K.; Park, J. H.; Moon, B. (2009). Major Phytochemical composition of 3 Native Korean Citrus Varieties and bioactivity on V79-4 cells induced by oxidative stress. **Food Chem.** 74(6):462-468.
- Zelko, I.N.; Mariani, T.J.; Folz, R.J. (2002). Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the Cu-Zn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2) and EC-SOD (SOD3) gene structure, evolution and expression. **Free Radic. Biol. Med.** 33(3): 337-49.
- Zhang, Y.; Ying, J.; Chen, J.; Hu, C. (2012) Assessing the genotoxic potentials of roxarsone in V79 cells using the alkaline Comet assay and micronucleus test. **Mutat. Res.** 24;741(1-2):65-9.
- Zucco, F.; De Angelis, I.; Testai, E.; Stamatii, A. (2004). Toxicology investigations with cell culture systems: 20 years after. **Toxicol. In vitro.** 18(2):153-163.