

**UNIVERSIDADE DE CAXIAS DO SUL
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA
NÍVEL MESTRADO**

**AVALIAÇÃO NUTRICIONAL, ANTIOXIDANTE, MUTAGÊNICA E
ANTIMUTAGÊNICA DE SUCOS DE UVA ORGÂNICOS E
CONVENCIONAIS.**

CAROLINE DANI

Caxias do Sul

2006

CAROLINE DANI

**AVALIAÇÃO NUTRICIONAL, ANTIOXIDANTE, MUTAGÊNICA/ANTIMUTAGÊNICA
DE SUCOS DE UVA ORGÂNICOS E CONVENCIONAIS.**

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

Orientador: Prof. Dr. João Antônio Pegas Henriques

Co-Orientadora: Profª Drª Mirian Salvador

*Dedico esse trabalho às pessoas que desde sempre acreditaram e confiaram em mim:
A toda minha família, meus pais, Vânia e Darci,
e minha irmã Gabi. Obrigado pela dedicação, carinho e apoio.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço àqueles que contribuíram e acreditaram no sucesso deste trabalho, especialmente:

Ao Prof. Dr. João Antônio Pegas Henriques, pela orientação, apoio, confiança, carinho e muitos ensinamentos;

À Profª Drª Mirian Salvador, pela co-orientação insessante, pelo carinho, confiança e dedicação;

Ao Prof. Dr. Diego Bonatto, pela ajuda, dedicação, ensinamentos e atenção;

A Profª Drª Regina Vanderlinde e a todo pessoal do Laboratório de Referências Enológicas pelo ensinamento e auxílio na realização dos testes;

Ao Prof. Dr. Bernardo Erdtmann pela idéia inicial e pelo auxílio em todo trabalho;

Ao Programa de Mestrado em Biotecnologia, PPGP/UCS, CAPES, CNPq e FAPERGS pelo apoio financeiro para realização deste projeto;

Aos professores do curso de Mestrado em Biotecnologia desta Universidade, especialmente ao coordenador do Curso, Prof. Dr. Mauricio M. da Silveira;

Aos funcionários do INBI, especialmente à Claudia Marques pela paciência e amizade;

Aos colegas do Laboratório de Alimentos;

As amigas, colegas, companheiras do Laboratório de Estresse Oxidativo e Antioxidantes, em especial Patrícia Spada, Fernanda Umezzi, Gabrielle Nunes de Souza e Lívia Soldatelli Oliboni, por tudo que me ensinaram e pela ajuda, carinho e amizade que por mim sempre tiveram;

Aos meus pais, Darcy e Vânia, a minha irmã Gabi, pois sem o apoio e a paciência deles esse sonho com certeza não teria se realizado;

Ao meu amor Leonardo, que apesar do tão pouco tempo, tem sido e será sempre imprescindível na minha vida, muito obrigado pelo carinho, paciência e atenção;

A Deus, ser supremo, por ter me permitido chegar até aqui na companhia de pessoas que amo.

ÍNDICE

| | |
|---|-----------|
| 1. INTRODUÇÃO..... | 7 |
| 1.1 Suco de uva..... | 7 |
| 1.2 Radicais Livres e Espécies Reativas do Oxigênio..... | 9 |
| 1.3 Antioxidantes..... | 11 |
| 1.3.1 Superóxido dismutase e catalase..... | 11 |
| 1.3.2 Polifenóis..... | 12 |
| 1.4 Avaliação da atividade antioxidante in vitro, ex-vivo e in vivo..... | 16 |
| 1.5 Avaliação da atividade mutagênica e antimutagênica..... | 18 |
| 2. OBJETIVOS..... | 20 |
| 2.1 Objetivo geral:..... | 20 |
| 2.2 Objetivos específicos:..... | 20 |
| 3. MATERIAL E MÉTODOS E RESULTADOS..... | 21 |
| 3.1 ARTIGO 1- | 21 |
| 4. CAPÍTULO II - Artigo 2 –..... | 56 |
| 5. DISCUSSÃO GERAL | 75 |
| 6. CONCLUSÕES..... | 79 |
| 7. PERSPECTIVAS..... | 80 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 81 |

LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|-----------------------------|-----------------------------------|
| CAT | enzima catalase |
| DNA | ácido desoxirribonucléico |
| DPPH [•] | 1,1-difenil, 2-picrilhidrazil |
| ERO | espécie(s) reativa(s) do oxigênio |
| HClO | ácido hipocloroso |
| MM | meio mínimo |
| O ₂ | gás oxigênio |
| ¹ O ₂ | oxigênio singlet |
| O ₂ [•] | radical superóxido |
| OH [•] | radical hidroxila |
| RL | radicais livres |
| SC | Meio sintético completo |
| SC-his | Meio sintético sem histidina |
| SC-lys | Meio sintético sem lisina |
| SC-hom | Meio sintético sem homoserina |
| SOD | enzima superóxido dismutase |
| t-BOOH | <i>terc</i> -butil hidroperóxido |

RESUMO

Apesar da existência de estudos sobre a atividade antioxidante de vinhos, pouco se sabe sobre a atividade antioxidante de sucos de uva, sejam brancos e tintos, orgânicos e convencionais. Neste sentido, um dos objetivos deste estudo foi avaliar a atividade antioxidante, empregando testes in vitro, in vivo (modelo da levedura *S. cerevisiae*) e ex-vivo, de sucos de uva brancos e tintos, produzidos a partir das cultivares Niágara e Bordo, respectivamente, ambas *Vitis labrusca*, convencionais e orgânicos. Entre outros objetivos propostos para este trabalho foram avaliadas a atividade antimutagênica e mutagênica destes sucos citados acima, utilizando o organismo eucariótico da levedura *S. cerevisiae*.

Com base nos resultados, observou-se que os sucos são fontes ricas em substâncias antioxidantes, principalmente os polifenóis, e para tanto apresentam atividade antioxidante e antimutagenica importante. Sendo assim, ao consumo de suco de uva pode ser atribuída uma alternativa para minimizar o aparecimento de doenças geradas por radicais livres.

Palavras-chave: sucos de uva; *S. cerevisiae*; antioxidante

1. INTRODUÇÃO

1.1 Suco de uva

Segundo a legislação brasileira, Lei N°. 7678 artigo 4º, parágrafo 5º, de 8 de novembro de 1988, suco de uva é uma bebida extraída da uva através de processo tecnológico adequado, não fermentado, não alcoólico, de cor, aroma e sabor característico, submetido a tratamento que assegure a sua conservação e apresentação até o momento do consumo (Rizzon *et al.*, 1998).

O suco de uva, bem como todos os produtos provenientes da uva, possui um importante papel econômico na região da Serra Gaúcha, e a todo o Estado do Rio Grande do Sul. Em 2005, o Rio Grande do Sul teve 35.263,07 hectares plantados com videiras, sendo 15.448,33 hectares de cultivares americanas, 12.718,06 hectares de cultivares híbridas, 6.955,11 hectares de viníferas e 141,57 hectares de mistura de cultivares em coleções e porta-enxertos. As cultivares americanas apresentaram crescimento de 5,25% na última década, com destaque para a tinta bordô com aumento de 9,77% ao ano. As tradicionais niágara branca e niágara rosada cresceram em média 5,39% e 3,6% ao ano, respectivamente (Cadastro Vinícola – IBRAVIN, 2005).

Devido a facilidade de elaboração, aliada às características organolépticas e ao seu valor nutricional, o suco pode contribuir na dieta alimentar. A princípio, o suco pode ser elaborado com uva de qualquer variedade, desde que esta alcance uma maturação adequada e apresente bom estado sanitário. O suco produzido em muitos países de tradição vitícola é elaborado com uvas *Vitis vinifera* tanto de cultivares brancas quanto tintas. Já o suco de uva brasileiro é elaborado principalmente com uvas dos grupos das *Vitis labrusca*, ou conhecidas como americanas e híbridas tintas, principalmente Bordo e Concord (Rizzon *et al.*, 1998). No entanto, recentemente, tem sido utilizadas também uvas das variedades Niágara branca (sucos brancos) e Goethe (sucos rosados).

A composição química do suco de uva difere muito pouco da composição do fruto, exceto quanto ao conteúdo de fibra bruta e óleo, componentes encontrados em maior quantidade nas sementes. A tecnologia de elaboração utilizada, especialmente no que se refere à temperatura e tempo de extração, regula a solubilidade e a intensidade de difusão das substâncias contidas na película para o mosto, exercendo influência marcante na composição química e na tipicidade do produto final (Rizzon *et al.*, 1998).

Atualmente, o mercado brasileiro vem contando com duas classes distintas de sucos de uva, um denominado convencional, que é elaborado a partir de uvas provenientes de vinhedos que receberam tratamento com fitodefensivos e outro denominado orgânico, ou seja, elaborado a partir

de uvas colhidas de vinhedos nos quais o uso de fitodefensivos ou demais produtos químicos são proibidos.

Na viticultura convencional, utiliza-se, tradicionalmente, herbicidas, inseticidas e fungicidas, principalmente dos grupos químicos ditiocarbamatos e organofosforados (Rizzon et al., 1998). Entretanto os sucos orgânicos são elaborados segundo as diretrizes de padrão de qualidade (1^a ed. de 31 de outubro de 1989) que tiveram por base as normas da IFOAM (*International Federation of Organic Movements*), sendo produzidos a partir de uvas colhidas de vinhedos sem uso de fitodefensivos e/ou engenharia genética, entre outras normas pré-estabelecidas pelas diretrizes citadas acima.

A produção de alimentos orgânicos é caracterizada pela ausência ou limitação no uso de produtos químicos sintéticos. Alguns destes podem aumentar ou diminuir a produção de compostos fenólicos em plantas. Isto ocorre pois, entre outras funções, os compostos fenólicos fazem parte do sistema de defesa da planta, ou seja o conteúdo nas plantas é influenciado pelas condições de cultivo e colheita, assim como condições de crescimento, grau de amadurecimento, tamanho dos frutos, e a variedade da planta (Herrmann, 1976).

Geralmente as plantas provindas da agricultura orgânica têm um período de amadurecimento maior em comparação com as convencionais, principalmente devido a uma liberação mais lenta de nutrientes. Como os flavonóides são formados durante o período de amadurecimento, acredita-se que o conteúdo destes seja maior nas plantas com manejo orgânico (Grinder-Pedersen et al., 2003). No entanto, um limitado número de estudos tem investigado o efeito da técnica de cultivo no conteúdo fenólico, e os resultados são contraditórios (Asami et al., 2003; Lombardi-Boccia et al., 2004). Asami e colaboradores (2003) observaram um aumento significativo na quantidade de polifenóis em morangos orgânicos quando comparados as culturas convencionais. Até o momento não existem estudos comparando o conteúdo polifenólico de sucos de uva orgânicos e convencionais.

O suco de uva, principalmente os elaborados a partir das variedades tintas, assim como o vinho, é uma fonte de flavonóides como, por exemplo, catequina, epicatequina e antocianidinas (Fuleki & Ricardo-da-Silva, 2003). Recentemente demonstrou-se que sucos tintos e brancos produzidos a partir de *Vitis vinifera*, apresentam importante atividade antioxidante *in vitro* (Dávalos et al., 2005). Entretanto não há estudo sobre a atividade antioxidante, seja *in vitro* ou *in vivo*, de sucos de uva brancos, tintos e rosados elaborados a partir de *Vitis labrusca*.

A ingestão de aproximadamente 125 - 480 mL/dia de suco de uva tinta convencional, principalmente provindos da variedades *Vitis vinifera*, foi capaz de aumentar a atividade antioxidante (Day *et al.*, 1997; Osman *et al.*, 1998; Freedman *et al.*, 2001; O'Byrne *et al.*, 2002). Ao suco de uva também é atribuída a diminuição de doenças cardiovasculares, e a inibição de processos tumorais, através da redução de danos oxidativos ao DNA (Vinson *et al.*, 2001; Singletary *et al.*, 2003; Park *et al.*, 2003; Sanchez-Moreno *et al.*, 1999).

Por outro lado, estudos mostraram que alguns sucos de uva branca são capazes de induzir mutagenese em linhagens de *Salmonella typhimurium* no teste de Ames (Patrineli *et al.*, 1996 a, b). Em vista disso torna-se importante a realização de ensaios que elucidem a possível atividade antioxidante, mutagência e/ou antimutagênica de sucos de uva.

1.2 Radicais Livres e Espécies Reativas do Oxigênio

Os radicais livres (RL) podem ser definidos como estruturas altamente instáveis e reativas que possuem um elétron desemparelhado na última camada eletrônica, conforme revisado por Garcez *et al.*, 2004. Nos organismos vivos encontram-se diversos RL, entre eles estão o radical hidroxila (OH^\bullet), ânion superóxido ($\text{O}_2^{\bullet^-}$), óxido nítrico (NO^\bullet), alcoxil (RO^\bullet), peroxil (ROO^\bullet), peroxinitrito (ONOO^\bullet) e a ubiseminquinona (UqN^\bullet). O ácido hipocloroso (HClO), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o oxigênio singlet (${}^1\text{O}_2$) e o ozônio (O_3) não são radicais livres, mas estão envolvidos em reações químicas que geram radicais livres em organismos vivos e são portanto, denominados, de espécies reativas de oxigênio (ERO) (Halliwell & Gutteridge, 2000; Henriques *et al.*, 2001; Picada *et al.*, 2003).

O processo de transferência de elétrons, ou a absorção de energia, pode levar o oxigênio a gerar as ERO (Oga, 2003). A estabilidade é adquirida pela remoção de elétrons de moléculas vizinhas, produzindo um par eletrônico. A presença de um único radical pode iniciar uma seqüência em cadeia de reações de transferência de elétrons. Essas espécies altamente reativas têm potencial para oxidar moléculas biológicas, incluindo proteínas, lipídios e DNA. Quantidades aumentadas de metabólitos oxidativos destas moléculas têm sido detectados em pacientes com uma variedade de doenças, entre elas: câncer, diabetes melito, doença de Parkinson, esclerose múltipla, distrofia muscular, catarata, retinopatias, aterosclerose, infarto do miocárdio, síndrome de isquemia e reperfusão, enfisema pulmonar, cirrose hepática, entre outras (Salvador *et al.*, 2004; Halliwell & Gutteridge, 2000).

As ERO e outros RL podem ser produzidos por fontes exógenas ou endógenas. Dentre as fontes exógenas pode-se citar compostos xenobióticos, exposições à radiação, fumo, estresse e administração de alguns medicamentos. Dentre as fontes endógenas que produzem as ERO estão a cadeia transportadora de elétrons mitocondrial, a NADPH oxidase nos fagócitos e a atividade combinada da xantina oxidase e xantina desidrogenase, que produzem O_2^- e H_2O_2 respectivamente (Hauptmann & Cadenas, 1997).

Os radicais livres podem produzir diversas lesões ao DNA, danificando bases, causando quebras simples de cadeia, sitos apurínicos/apirimídicos e ligações cruzadas entre DNA e proteínas (Dizdaroglu, 2000; Picada *et al.*, 2003; Saffi & Henriques, 2003).

O O_2^- , embora não ataque o DNA diretamente (Halliwell & Gutteridge, 2000), participa da Reação de Haber-Weiss (Figura 1.a) gerando O_2 e Fe^{+2} , o qual catalisa a Reação de Fenton (Figura 1.b), formando o radical OH^\bullet (Babior, 1997).

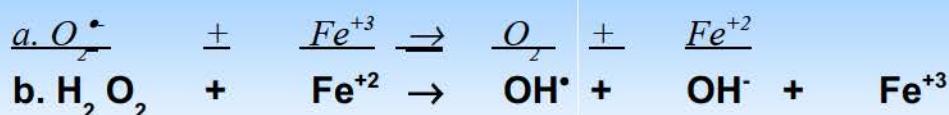


Figura 1. a. Reação de Haber Weiss e b. Reação de Fenton (adaptada de Halliwell & Gutteridge, 2000).

O radical hidroxila é cerca de 10^{14} vezes mais reativo do que o íon hidroxila, sendo lesivo às células (Halliwell & Gutteridge, 2000). Uma vez formado, o radical hidroxila reage com qualquer molécula biológica, inclusive o DNA (Picada *et al.*, 2003). A capacidade desse radical em lesar células é superior às demais ERO, uma vez que o organismo humano não dispõe de um sistema enzimático de defesa contra esse radical (Halliwell & Gutteridge, 2000). Sendo assim a melhor forma de defesa é a de prevenir que seja gerado. Isso pode acontecer pelo controle da homeostase metálica, complexação com proteínas e enzimas, compartimentação de metais de transição e ação da ferritina (Halliwell & Gutteridge, 2000).

As ERO podem também peroxidar lipídeos, particularmente ácidos graxos insaturados (Peres, 1999; Henriques *et al.*, 2001). Estas em contato com os fosfolipídios e com o colesterol provocam diversas alterações na estrutura e no metabolismo daquelas membranas e da própria células (Henriques *et al.*, 2001). Este dano pode ser medido pela reação do ácido tiobarbitúrico (TBARS), no qual o MDA (malondialdeído), formado durante a peroxidação lipídica, reage com o

ácido tiobarbitúrico para gerar um composto colorido que é detectado espectofotometricamente em 530nm (Wills, 1996; Halliwell & Gutteridge, 2000)

Eritrócitos são altamente suscetíveis ao estresse oxidativo devido ao alto conteúdo de ácidos graxos poliinsaturados em suas membranas e a alta concentração de oxigênio e hemoglobina, potentes promotores de processos oxidativos (Clemens et al., 1987). A ação das espécies reativas, principalmente gerando oxidação da membrana lipídica, pode levar a lise dos eritrócitos. A peroxidação lipídica é uma das consequências do dano oxidativo e tem sido sugerido com um mecanismo geral de dano e morte celular (hemólise) (Vives-Corrons et al., 2001).

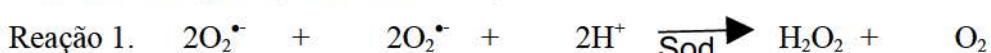
Em condições normais, as ERO produzidas numa célula reagem com as defesas enzimáticas e/ou não enzimáticas. Entretanto, quando ocorre um desequilíbrio entre a formação dos compostos oxidantes e antioxidantes do organismo, estabelece-se uma condição denominada de estresse oxidativo, onde os radicais livres em excesso começam a produzir danos às macromoléculas biológicas como lipídios, proteínas e DNA (Beckman & Ames, 1998; Salvador & Henriques, 2004).

1.3 Antioxidantes

Os antioxidantes são compostos que funcionam como bloqueadores dos processos óxido-reduktivos desencadeados pelos radicais livres. Freqüentemente, o termo “antioxidante” é implicitamente restrito aos compostos inibidores da lipoperoxidação, entretanto, pode ser definido mais amplamente como “uma substância que, quando presente em baixas concentrações, comparada a outras que oxidam um substrato, previnem significativamente, a oxidação deste substrato” (Halliwell & Gutteridge, 2000; Borella & Varela, 2004). Entre os antioxidantes, incluem-se sistemas de enzimas, tais como: superóxido dismutase, catalase, glutatona peroxidase, glutatona redutase. Como antioxidantes não enzimáticos pode-se citar as vitaminas, o ácido úrico, a glutatona, a melatonina, polifenóis, entre outros.

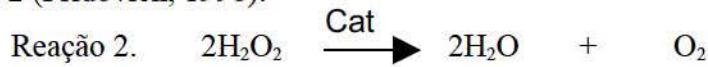
1.3.1 Superóxido dismutase e catalase

A enzima superóxido dismutase (Sod) foi descrita, pela primeira vez, por Mc Cord & Fridovich, em 1969. Essa enzima é responsável por transformar os ânions superóxido em H₂O₂ e O₂, conforme a reação 1 (Fridovich, 1998):



A enzima catalase (Cat) dismuta o peróxido de hidrogênio em água e oxigênio, conforme a

reação 2 (Fridovich, 1998):



A enzima Cat é um tetrâmero formado por unidades idênticas, sendo que cada monômero contém um grupo prostético heme no centro catalítico (Spevak *et al.*, 1986). Alguns compostos podem apresentar atividade similares das enzimas Sod e Cat, sendo capazes de transformar superóxido em peróxido de hidrogênio e água e dismutar o peróxido de hidrogênio em água e oxigênio, respectivamente (Halliwell&Gutteridge, 2000).

1.3.2 Polifenóis

Os constituintes fenólicos são de grande importância na enologia pelas características direta ou indiretamente ligadas à qualidade do vinho e suco, especialmente em relação à cor e à adstringência. Estes compostos também são de interesse nutricional e farmacológico (Riberéau-Gayon *et al.* 2003). A uva contém compostos não flavonóides na polpa e flavonóides nas cascas e sementes. Isto permite adaptar as condições de extração dos polifenóis a partir das diferentes partes dos grãos de maneira essencial à composição fenólica dos vinhos e sucos (Riberéau-Gayon *et al.* 2003)

Os polifenóis possuem, pelo menos, um anel aromático no qual, ao menos um hidrogênio é substituído por um grupamento hidroxila. Podem ser classificados segundo o tipo de esqueleto principal, dividindo-se em flavonóides e os não-flavonóides (Ferguson, 2001).

Aos polifenóis em geral, atribui-se a capacidade de quelar metais, inibir a atuação do radical livre superóxido e do oxigênio *singlet*. Além disso, os polifenóis apresentam também, atividades antitrombótica, antinflamatória, antiviral, antialérgica e de proteção aos hepatócitos, como também atividade anticancerígena (por inibição das enzimas topoisomerase I e II) (Ferguson, 2001; Trueba & Sánchez, 2001; Landrault *et al.*, 2003).

Em videiras, a biossíntese de polifenóis é, diretamente influenciada pela variedade de uva e de suas características genéticas (Bowers *et al.*, 1993; Boulton *et al.*, 1995). Diversos fatores vitícolas estão intrinsecamente ligados ao processo de biossíntese, tais como, porta-enxerto utilizado (susceptibilidade a doenças, vigor, etc), temperatura (gradiente térmico ideal entre o dia e a noite próximo de 15° C), umidade (incidência de doenças fúngicas), exposição solar (horas de incidência direta dos raios do sol sobre as uvas em processo de maturação), tipo de solo e adubação (altos teores de matéria orgânica favorecem um rendimento excessivo, prejudicando a qualidade do

fruto), manejo do dossel vegetativo (maior controle sobre maturação e rendimento) (Boulton *et al.*, 1995; Cortell *et al.*, 2005), entre outros.

A concentração de polifenóis em sucos varia de acordo com diversos fatores, como: método de elaboração escolhido, rendimento da prensagem, tempo e temperatura de maceração, estabilização e filtração (Singleton *et al.*, 1980; Fuleki & Ricardo-da-Silva, 2003), entre outros.

1.3.2.1 Flavonóides

As substâncias relacionadas a esta grande família são divididas em várias subclasses que se distinguem pelo grau de oxidação de seu núcleo pirano. Segundo Riberéau-Gayon *et al.* (2003), os flavonóides baseiam-se na forma geral em estruturas do fenil-2-benzopirona, e estão principalmente representados na uva pelos flavonóis. Entretanto, os flavonóides em seu sentido amplo, compreendem igualmente os antocianos e os 3-flavanóis. Encontram-se na uva, também, outros grupos de menor importância como os di-hidroflavonóis (flavanóis) e, nas folhas, as flavanas (Cheynier *et al.* 2000).

Os taninos são, por definição, substâncias capazes de combinar-se com as proteínas e com outros polímeros vegetais como os polissacarídeos, e são os responsáveis pela estrutura e adstringência dos vinhos, e também estão presentes no suco. Sua configuração química é compostas por moléculas fenólicas relativamente volumosas, resultantes da polimerização de moléculas elementares de função fenol. Estas estruturas estão subdivididas em taninos hidrolisáveis ou gálicos e os taninos condensados ou catequicos (Riberéau-Gayon *et al.* 2003).

Os taninos condensados da uva e do vinho são polímeros complexos de 3-flavanóis ou catequinas, cujas unidades estruturais de base são a catequina e a epicatequina (Figura 5).

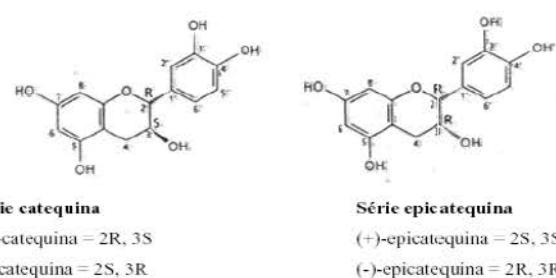


Figura 5 – Estrutura dos 3-flavanóis, precursores das procianidinas e dos taninos (Riberéau-Gayon^b *et al.* 2003).

Figura 2 – Estrutura dos 3-flavanóis, precursores das procianidinas e dos taninos (Adaptada de Riberéau-Gayon *et al.* 2003).

Os 3-flavanóis estão presentes na uva na forma de monômeros e, em menor forma, representados polimericamente como constituintes dos taninos catéquicos. As principais formas na uva são a (+)-catequina e seu isômero (-) epicatequina.

As procianidinas dímeras podem ser subdivididas em dois tipo ('A' e 'B'). As procianidinas do tipo B ($C_{30}H_{26}O_{12}$) são dímeros resultantes da condensação das unidades 3-flavanóis unidas entre elas por ligações C4-C8 (B1 a B4) ou C4-C6 (B5 a B8). As procianidinas do tipo A ($C_{30}H_{24}O_{12}$) são dímeros que possuem uniões interflavano C4-C8 ou C4-C6 e uma ligação éter entre os carbonos C5 ou C7 da unidade terminal com o carbono C2 da unidade superior. As procianidinas trímeras também podem ser classificadas em duas categorias ('C' e 'D'). As procianidinas trímeros do tipo C apresentam uniões interflavano correspondentes ao tipo B dos dímeros, enquanto que as procianidinas trímeras do tipo D possuem uma ligação interflavano do tipo B e outra do tipo A (Riberéau-Gayon *et al.* 2003).

O suco de uva possui principalmente, (+)-catequina, (-)-epicatequina e quatro procianidinas (B1, B2, B3 e B4), sendo, de modo geral, observadas concentrações maiores de (-)-epicatequina, seguida de catequina e da procianidina B3. Entretanto esta ordem sofre alterações de acordo com o método de elaboração escolhido, quente ou frio, e ainda a variedade utilizada (Fuleki & Ricardo-da-Silva, 2003)

Fazem parte dos compostos flavonóides, também, um grupo especial de substâncias denominadas antocianos que constituem uma vasta família de polifenóis em plantas e são responsáveis pela coloração de muitas frutas e flores (Wang *et al.*, 2003). De forma geral, estes pigmentos são também encontrados na polpa das cepas tintórias. No nível subcelular, estão presentes no vacúolo onde podem estar inclusos em organelas especializadas, definidas como antocianoplastos (Cheynier *et al.* 2000; Riberéau-Gayon *et al.* 2003). Em sucos de uva Concord foram detectadas delphinidina, cianidina, petunidina, malvidina e peonidina, nesta ordem de quantidade (Wang *et al.*, 2003)

Os flavonóides atuam como sequestradores de radicais livres, quelante de íons metálicos, principalmente ferro e cobre os quais são os de maior importância para as reações iniciais de formação de radicais e inibição de enzimas responsáveis pela geração de radicais livres (Hollman *et al.*, 1999). Dependendo da sua estrutura, os flavonóides são capazes de seqüestrar praticamente todas as espécies reativas conhecidas, incluindo ânios superóxido, peróxido de hidrogênio, radical hidroxil, oxigênio singlet, alcoxil, aroxil e radical peroxy. Sendo assim, os flavonóides podem proteger as células contra o ataque dos radicais livres (Edenharder & Grünhage, 2003).

Embora seja relatada atividade antioxidante para os flavonóides torna-se interessante salientar que muitos podem exercer efeitos pró-oxidantes, principalmente os que possuem o anel pirogalol (Trueba & Sánchez, 2001). Este efeito está relacionado, no entanto, com outros aspectos, tais como exposição a metais de transição níveis de estresse celular, pH e concentração do antioxidante no meio (Ferguson, 2001).

1.3.2.2 Não-flavonóides

Entre os compostos denominados não-flavonóides, os derivados do ácido benzóico e cinâmico, além dos estilbenos, merecem atenção especial. O resveratrol (trans 3,5,4' – trihidroxiestilbeno) é uma fitoalexina presente em videiras (Flanz, 2003). O conteúdo de resveratrol em vinhos brancos é em torno de 1-5% do valor encontrado nos tintos. Sucos apresentam cerca de um terço da concentração de resveratrol de vinhos tintos produzidos a partir da mesma variedade de uva. Esta diferença de valores está intimamente ligada com o tempo de permanência das cascas e sementes no processo de elaboração (Soleas et al., 1997). Jandet et al.(2002), afirma que estes valores podem aumentar em dez vezes quando a maceração é realizada em presença da casca, seja em vinhos brancos ou tintos. Por ser um dos compostos responsáveis pela resposta imune da planta à ataques fúngicos, o seu teor é dependente do nível de estresse sob o qual se encontrava a videira durante a produção do fruto, como condições do solo e clima (Soleas et al., 1997). O resveratrol apresenta atividade antioxidante *in vivo*, propriedade antiaterogênica, apoptótica e de redução dos riscos de câncer (Soleas et al., 1997).

1.3.3 Ácido Ascórbico

O ácido ascórbico é um importante antioxidante com diversas funções metabólicas em plantas, animais e fungos. (Smirnoff et al., 2001). Humanos, além de outros primatas e mamíferos, não são capazes de sintetizar L-ácido ascórbico, pois o gene responsável pela codificação da enzima responsável pelo último passo na via encontra-se não funcional. Devido à sua importância para o organismo humano (formação do tecido conjuntivo, transporte de íons, proteção das células contra os danos causados por radicais livres, etc.), o consumo de alimentos, que contenham ácido ascórbico vem sendo incorporado à dieta já há muito tempo (Newaz et al., 2005). Em plantas, o seu papel protetor contra as espécies reativas formadas durante os processo de fotossíntese e respiração é também muito importante, uma vez que, está associado ao crescimento celular atuando como co-

fator para diversas enzimas envolvidas na síntese de ácido giberélico (regulador), antocianinas e inúmeros metabólitos secundários (Smirnoff *et al.*, 2001).

Diferentes espécies de plantas e tecidos possuem characteristicamente distintas concentrações de ácido ascórbico. Em uvas, de acordo com o estágio de maturação, as quantidades oscilaram em torno de 50 mg.L⁻¹ (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2003). Em *Vitis vinifera*, a clivagem do ácido ascórbico pode ocorrer em diferentes organelas, originando ácido oxálico e ácido tartárico. Nos sucos, diferentes teores podem ser encontrados, em função da variedade e grau de maturação das uvas, além de práticas de elaboração (Boulton *et al.*, 1995; Ribéreau-Gayon *et al.*, 2003). Entretanto, até o momento nenhum estudo apresentou relatos acerca da quantidade de ácido ascórbico em sucos de uva *Vitis americana*, variedades Bordo, Niágara e Goethe.

Durante o amadurecimento das frutas ocorrem muitas reações, como: transformação de cor, síntese de açúcar e renovação de células. Estes fenômenos podem causar estresse tecidual necessitando assim da ação antioxidante do ascorbato a fim de prevenir danos celulares. Sendo assim, o processo de amadurecimento pode gerar alterações no conteúdo de ácido ascórbico, podendo variar de acordo com a fruta em questão (Smirnoff *et al.*, 2001).

A vitamina C está envolvida em reações de hidroxilação e de oxi-redução, doando elétrons em reações intra e extracelulares. Pode proteger outros antioxidantes como a vitamina A, vitamina E e os ácidos graxos da ação dos radicais livres, entre eles o superóxido, peróxido de hidrogênio, hipocloritos, radical hidroxila, radical peroxil e oxigênio singlet (Sies *et al.*, 1992; Halliwell & Gutteridge, 2000).

Na presença de íons de metais de transição, a vitamina C e alguns flavonóides podem causar danos no DNA pela formação de ERO através da reação de Haber-Weiss (Figura 1 A). Nessa situação, a vitamina C pode apresentar atividade pró-oxidante e mutagênica (Halliwell & Gutteridge, 2000). A interação da vitamina C com o cobre aumenta o dano ao DNA cinco vezes, quando comparados com a interação desta vitamina e outro metal, por exemplo o ferro (Yoshino *et al.*, 1999).

1.4 Avaliação da atividade antioxidante *in vitro*, *ex-vivo* e *in vivo*

Diferentes metodologias têm sido desenvolvidas para obter uma medição, seja qualitativa ou quantitativa, da capacidade antioxidante de compostos, tanto através de testes sem a utilização de células ou utilizando culturas celulares. Dentre os ensaios *in vitro* existentes, um dos mais utilizados é o radical DPPH[•] (1,1 difenil 2-picrilhidrazil) que vem sendo utilizados para medir a capacidade de varredura dos antioxidantes (Rice-Evans *et al.*, 1995). O método de varredura do radical DPPH[•] (1,1-difenil-2-picrilhidrazil) é um método amplamente utilizado para avaliar a atividade antioxidante em um tempo relativamente curto comparado com outros métodos (Brand-Williams *et al.*, 1995; Mensor *et al.*, 2001). Os antioxidantes reagem com o DPPH[•], que é um radical livre estável, e provocam a diminuição da coloração indicando o potencial de varredura da solução antioxidante. A atividade da amostra a ser testada é atribuída a sua capacidade de doar elétrons (Murthy *et al.*, 2002).

Além dos ensaios *in vitro*, testes *ex-vivo*, como a inibição de hemólise pelo radical AAPH e a inibição da peroxidação lipídica em soro, tem sido extensamente utilizados (Edenharder & Grünhage, 2003; Bub *et al.*, 2003).

Dados obtidos através de testes *in vitro*, *ex-vivo* e *in vivo* podem apresentar diferentes resultados quanto à avaliação da capacidade antioxidante. Em células, a expressão da atividade antioxidante é mais complexa, pois envolve questões de permeabilidade celular e possível metabolização dos compostos ensaiados, além de um complexo sistema regulatório enzimático de defesas antioxidantes endógenas celulares (Raspor *et al.*, 2003).

Os ensaios microbianos têm se mostrado muito adequados na triagem rotineira de vários produtos, sendo testes rápidos, sensíveis, econômicos, reproduutíveis quando comparados à ensaios realizados com animais, e apresentando resultados confiáveis na identificação da atividade biológica (Henriques *et al.*, 1987; Rabello-Gay *et al.*, 1991).

Várias razões, tem tornado a levedura *Saccharomyces cerevisiae* um excelente modelo para se estudar oxidação intracelular e estresse oxidativo, sendo que os resultados obtidos nas células de levedura podem ser extrapolados a células humanas (Raspor *et al.*, 2005). Trata-se de um organismo provido de núcleo e de organelas com metabolismo semelhante à de eucariotos superiores. A facilidade e a rapidez na obtenção de gerações permite sua manipulação em

laboratório para a realização dos mais diversos experimentos (Zimmermann *et al.*, 1984; Costa & Ferreira, 2001; Lopes *et al.*, 2004).

Linhagens isogênicas de *S. cerevisiae* deficientes em defesas antioxidantes têm sido utilizadas para o estudo do mecanismo de ação de agentes físicos e químicos que interferem com o estado redox da célula (Brennan & Schiestk, 1998; Lee *et al.*, 2001). Um método utilizado para determinação da natureza das lesões induzidas por agentes oxidantes, consiste em comparar a sensibilidade de mutantes deficientes em enzimas antioxidantes com uma linhagem selvagem isogênica proficiente naquele tipo de defesa antioxidante. Pode-se também combinar um oxidante conhecido, como H₂O₂ e paraquat, com uma substância com potencial antioxidante, e avaliar o efeito do tratamento na modulação do estresse. O aumento da viabilidade celular ao tratamento está sugerindo atividade protetora (antioxidante) e a diminuição da viabilidade a um efeito deletério (Henriques *et al.*, 2001; Picada *et al.*, 2003).

1.5 Avaliação da atividade mutagênica e antimutagênica

Os ensaios com levedura têm sido de grande utilidade na determinação de agentes mutagênicos ambientais ou farmacológicos e servem para complementar os ensaios de mutagenicidade realizados em bactérias (Henriques *et al.*, 1987; Poli *et al.*, 1999). As mutações são detectadas através da expressão fenotípica, causada por uma mudança súbita e hereditária no genótipo do organismo, alterando suas características. A ocorrência de mutações, no entanto, depende da natureza da lesão e das respostas celulares aos danos no DNA, podendo assim ser divididas em dois grupos: mutações gênicas e cromossômicas. As mutações gênicas são alterações que ocorrem na seqüência de nucleotídeos do DNA e as cromossômicas são as que produzem alterações no número ou estrutura dos cromossomos (Waters *et al.*, 1999; Macgregor *et al.*, 2000; Dearfield *et al.*, 2002).

A levedura *S. cerevisiae* tem sido amplamente estudada, tornando-se uma ferramenta importante nas pesquisas sobre mutagênese. Experimentos de mutações reversas são os mais comumente utilizados. Estes testes baseiam-se na restauração ou compensação de um defeito gênico responsável por um requerimento nutricional (Zimmermann, 1975; Zimmermann *et al.*, 1984). A restauração se deve a uma reversão exata do defeito original, enquanto que a compensação pode ser devida a uma mutação secundária dentro do gene (mutação supressora interna) ou por uma mutação

externa, como no caso dos alelos sem sentido (nonsense- mutação que resulta na alteração de um códon que codifica um aminoácido para um códon de terminação da síntese proteíca) (Hawthorne & Leopold, 1974; Atkin *et al.*, 1993). Reversão de auxotrofia para prototrofia pode ser causada por uma substituição, inserção ou deleção de pares de bases, ou ainda uma mutação induzida por supressor do gene original (Henriques *et al.*, 1987). Para que seja identificada a mutação reversa é necessário a utilização de uma linhagem com alterações genéticas adequadas, como por exemplo, a linhagem haplóide de *S. cerevisiae* XV 185-14C, isolada por Von Borstel. (Parry & Parry, 1984) Esta linhagem permite a detecção de dois tipos de mutações locus específicas: reversão do alelo ocre *lys1-1* (alteração para o códon UAA de término de cadeia) ou do alelo *missense his1-7* (códon alterado codifica um aminoácido diferente), e reversão por deslocamento do quadro de leitura do DNA (*frameshift*) verificadas no locus *hom3-10*. As células revertentes podem ser detectadas através da utilização de meios seletivos nos quais o fator de crescimento inicialmente requerido não está presente, ou está em quantidades muito pequenas, permitindo um *background* de crescimento.

Os testes usados em avaliações de atividade mutagênica e carcinogênica também são cada vez mais utilizados para identificar potencial antimutagênico e anticarcinogênico devido a sua flexibilidade para variações metodológicas (De Flora *et al.*, 1992; De Flora *et al.*, 2001). Substâncias que apresentam atividade antimutagênica em leveduras também podem ter este efeito antimutagênico em sistemas de cultura com células de mamíferos (Kuroda & Inoue, 2003; Raspor *et al.*, 2003). Para que uma substância possa ser considerada antimutagênica ela precisa reverter a mutagênese induzida por um agente mutagênico, como por exemplo, o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (Henriques *et al.*, 2001).

Estudos epidemiológicos já vêm demonstrando que dietas ricas em frutas e verduras e pobres em gorduras estão associadas a baixa incidência de câncer. Muitos polifenóis presentes em plantas têm sido descritos como potentes antimutagênicos e anticarcinogênicos. Entre os inúmeros mecanismos propostos para a atividade antimutagênica dos polifenóis estão a possibilidade de enfraquecer a ativação dos carcinógenos pelas enzimas do citocromo P450, a captura de genotóxicos intermediários e ação antioxidante, como quelantes de metais (Ferguson, 2000). Entretanto, alimentos que contém fenóis e quinonas podem também induzir mutagenicidade por sua habilidade de realizar ciclos redox, gerando espécies reativas de oxigênio deletérias resultado do estresse oxidativo e danos ao DNA (Patrineli *et al.*, 1996a).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral:

- ✓ Avaliar a possível atividade antioxidante, mutagênica/antimutagênica de sucos de uva elaborados a partir das variedades de *Vitis labrusca*, brancos (Niágara) orgânicos e convencionais, tintos (Bordo) orgânicos e convencioais, e rosados (Goethe).

2.2 Objetivos específicos:

- ✓ Determinar o conteúdo de ácido ascórbico, carboidratos, fibra alimentar, gorduras totais, proteína, umidade, cinzas e valor calórico das diferentes amostras de suco de uva.
- ✓ Avaliar os principais parâmetros enológicos (acidez total, acidez volátil, teor de açúcar, densidade relativa, pH, graduação alcóolica e SO₂ total) das amostras de suco de uva;
- ✓ Quantificar o conteúdo de polifenóis totais, específicos e possíveis resíduos de pesticidas nas amostras de suco de uva tintos e brancos, convencionais e orgânicos.
- ✓ Avaliar a capacidade antioxidante dos sucos *in vitro* (capacidade de varredura do radical DPPH), *ex-vivo* (inibição da peroxidação lipídica sérica e da hemólise eritrocitária) e *in vivo* (utilizando células eucarióticas da levedura *S. cerevisiae*)
- ✓ Avaliar a capacidade mutagênica e antimutagênica das amostras de suco de uva utilizando a linhagem de *S. cerevisiae* XV-185-14C como modelo de estudo;
- ✓ Correlacionar os dados obtidos em sucos de uva convencionais e orgânicos, comerciais ou elaborados em escala piloto.

3. MATERIAL E MÉTODOS E RESULTADOS

3.1 ARTIGO 1-

ANTIOXIDANT, MUTAGENIC AND ANTIMUTAGENIC ACTIVITIES OF THE ORGANIC AND CONVENTIONAL, WHITE AND PURPLE GRAPE JUICE

CAROLINE DANI, LÍVIA S. OLIBONI, REGINA VANDERLINDE, DIEGO BONATTO,
MIRIAN SALVADOR AND JOÃO ANTONIO PEGAS HENRIQUES.

Artigo submetido a Food Chemical and Toxicology em 17/03/2006

Apesar da existência de estudos sobre a atividade antioxidante de vinhos, pouco se sabe sobre a atividade antioxidante de sucos de uva, sejam brancos e tintos, orgânicos e convencionais. Neste sentido, um dos objetivos deste estudo foi avaliar a atividade antioxidante, empregando testes *in vitro*, *in vivo* (modelo da levedura *S. cerevisiae*) e *ex-vivo*, de sucos de uva brancos e tintos, produzidos a partir das cultivares Niágara e Bordo, respectivamente, ambas *Vitis labrusca*, convencionais e orgânicos. Entre outros objetivos propostos para este trabalho foram avaliadas a atividade antimutagênica e mutagênica destes sucos citados acima, utilizando o organismo eucariótico da levedura *S. cerevisiae*.

Com base nos resultados, observou-se que os sucos são fontes ricas em substâncias antioxidantes, principalmente os polifenóis, e para tanto apresentam atividade antioxidante e antimutagenica importante. Sendo assim, ao consumo de suco de uva pode ser atribuída uma alternativa para minimizar o aparecimento de doenças geradas por radicais livres.

**Antioxidant, Mutagenic and Antimutagenic Activities of the Organic and Conventional,
White and Purple Grape Juice**

CAROLINE DANI, LÍVIA S. OLIBONI, REGINA VANDERLINDE, DIEGO BONATTO,
MIRIAN SALVADOR AND JOÃO ANTONIO PÊGAS HENRIQUES*

Instituto de Biotecnologia, Universidade de Caxias do Sul, Caxias do Sul (UCS), Rio Grande do
Sul, Brazil.

Short title: Biochemical activities in vivo and in vitro of grape juices

*Address to which proofs should be sent:

João Antonio Pegas Henriques

Instituto de Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul,
Universidade de Caxias do Sul,
Rua Francisco Getúlio Vargas 1130, Caxias do Sul, RS, Brazil, 95070-560.
Telephone: +55 54 218-2105. Fax: +55 54 218-2664.

E-mail: henriques@cbiot.ufrgs.br

ABSTRACT

Although the beneficial effects of the moderate intake of wine are already well known, data about the grape juice antioxidant capacity are fewer and contradictionaries. The purpose of this study was to evaluate the antioxidant, mutagenic and antimutagenic activity, as well as quantifying the amount of total polyphenols, catechin, epicatechin, procyanidins (B1, B2, B3 e B4) and ascorbic acid of the purple and white, organic and conventional, grape juices samples. The results obtained showed relevant antioxidant and antimutagenic activity in all samples. The purple juices, mainly the organic ones, showed higher values of total polyphenols, catechin, epicatechin and procyanidins B1, B2, B3 e B4. In the *in vitro* tests the purple juices showed the highest antioxidant activity, in which a positive correlation was observed ($r: 0.680; p<0.01$). In the *ex-vivo* assays the grape juices showed an excellent protecting activity against the erythrocyte haemolysis and the lipid peroxidation. The highest values in the lipid peroxidation protection were observed in by one purple grape juice (BCS), showing that, in general, the purple ones provide more protection. Through *in vivo* assays, we could observe that purple and white juices showed an excellent antioxidant activity, and this activity couldn't be attributed to only one compound, but to all compounds in synergism activity. But, if selecting only the purple grape juice, the antioxidant activity through the *in vivo* assays could be attributed to the resveratrol content. Most grape juices were antimutagenic in a concentration of 10% (v/v); however in a concentration of 50% the juices had a slight mutagenic activity. The antimutagenic activity showed a positive correlation with the phenolic content, indicating a possible role for these compounds in the antimutagenic activity of these juices.

KEYWORDS: grape juice; antioxidant; mutagenic; antimutagenic; phenolic compounds

1. Introduction

Increasing experimental data suggest that the cellular oxidative damage induced by reactive species (RS) has a relevant pathophysiological role in several types of human diseases, such as atherosclerosis and cancer (Ames et al., 1993). In order to neutralize these RS, our cells have developed a complex biochemical redox mechanism, composed by both enzymatic and non-enzymatic components (Park et al., 2003). Moreover, the food intake in our diets, specially fruits and vegetables, also have an important role on the maintenance of physiological redox equilibrium, in which many antioxidants can be supplied to the organism, e.g. vitamin C, vitamin E, carotenoids, and several polyphenolic compounds (Ferguson, 2003). Grapes are rich in phenolic compounds such as flavonoids (catechin, epicatechin, quercetin, anthocyanins, procyanidins) and resveratrol (3,5,4'-trihydroxy-stilbene), mainly found in red grapes products (Wang et al., 2002; Soleas et al., 1997; Fuleki and Ricardo-da-Silva, 2003). It has already been reported that the compounds present in the grape juices can inhibit: (i) platelet activity, (ii) LDL oxidation and oxidative damage to DNA, (iii) coronary and atherosclerosis (Frankel et al., 1998; Osman et al., 1998; Day et al., 1997; Singletary et al., 2003).

Since the grape juices are a relevant source of polyphenolic compounds, many individuals are getting aware of their importance on the daily diet. In this sense, it should be noted that there are an increasing public concern towards a better health and food's quality, resulting in final consumers that consider the type of agronomical practices (conventional or organic) a possible choice for their diet. The organic practice has been standing out among the other agriculture ones because no pesticides are used during the cultivation, resulting in fruits or vegetables rich in secondary metabolites (e.g. polyphenolic compounds), once they suffer more fungal infection (Asami et al., 2003; Lombardi-Boccia et al., 2004). To our knowledge, there is nothing in the literature

concerning the organic cultivation of grapes and how this practice alters the chemical characteristics of its derivatives (wine and juices). Besides, no comparisons have been made between organic and conventional white and purple varieties of grapes.

The purpose of this study was to evaluate the antioxidant capacity of different types of grape juices (white and purple, organic or conventional) using standard *in vitro* assays such as scavenging of DPPH[•] radical, haemolysis and lipid peroxidation inhibition. The results of these *in vitro* assays were corroborated by an *in vivo* analysis using the yeast *Saccharomyces cerevisiae* as a model, exposed to different types of juices alone or combined with RS-inducing agents, such as hydrogen peroxide and *terc*-BOOH (t-BOOH). The mutagenic and antimutagenic (against hydrogen peroxide) activities of the grape juices were also observed and correlated with the amounts of phenolic compounds present in the grape juices. Additionally, the contents of (+)-catechin, (-)-epicatechin, *trans*-resveratrol, anthocyanidins, and individual procyanidins was evaluated by HPLC in juices produced from *Vitis labrusca* cultivars.

2. Material and methods

2.1. Chemicals. DPPH[•], *trans*-resveratrol, (+)-catechin, (-)-epicatechin, gallic acid, and procyanidin dimer B₃ were all obtained from Sigma-Aldrich, (St. Louis, MO). The procyanidins B₁, B₂ and B₄ were generously provided by Dr. Regina Vanderlinde (Brazilian Wine Institute, Brazil). The anthocyanin pigments cianidin 3-glucoside, delphinidin 3-glucoside, peonidin 3-glucoside and malvidin 3-glucoside were obtained from Extrasynthese (Gennay, France). Methyl-paration was obtained from Bayer, and the acetylcolinesterase kit was bought from UFRJ (Rio de Janeiro, Brazil). All other chemicals were from E. Merck (Damstadt, Germany)

2.2. Grapes and Grape Juices. Grape juice samples produced from *Vitis labrusca*, varieties Bordo and Niagara were analysed in eight distinct groups (Table 1). The organic grapes, cultivated without

synthetic pesticides, and commercial organic juices were obtained from the Cooperativa Aecia (Antonio Prado, Rio Grande do Sul (RS), Brazil). The conventional grapes, cultivated in the traditional methods, and commercial conventional juices were obtained from Vinhos Monte Reale (Flores da Cunha, RS, Brazil) observing the expiry dates and keeping the same trademarks throughout the tests. The grapes were cultivated in 2005, and all the juices produced in the same year. The commercial organic juices, purple and white, were elaborated by steam extraction and then, hot bottled. The organic juices, elaborated in a pilot scale were produced in a similar way to the conventional ones with an exception for the pasteurization stage, since these juices are hot bottled (about 80 °C). The commercial conventional juices were elaborated by a heating extraction (about 50 °C), with a subsequent pressing in order to separate the pulp and submitted to a previous pasteurization before bottling. The conventional juices produced in a pilot scale were elaborated in the same way that the commercial ones, with an exception for the pasteurization stage which used only in commercial, since these were hot bottled.

2.2. Chemical Analysis and Nutritional Evaluation of the Grape Juices. Alcoholic grade, total acidity, volatile acidity, pH, total SO₂, and ascorbic acid were determined using methods described by Zoecklein *et al.* (Zoecklein et al., 2000). All analyses were performed in duplicate. Carbohydrates, alimentary fiber, saturated fats, proteins, humidity and caloric value levels were evaluated according to the official methodologies of analysis from AOAC International (AOAC, 1995).

2.3. Pesticides Determination and Phenolic Compounds . Organophosphorus and carbamate pesticides were determined in the juice samples as methyl parathion-equivalent activity, which causes the inhibition of the enzyme acetylcholinesterase (AChE), as previously described by Bastos et al. (1991) and Lima et al. (1996). The methyl parathion (Folidol 600®- Bayer, Brazil) calibration curve was used in order to express AChE activity in ppm of methyl parathion.

Total phenolic content was measured using Singleton and Rossi's modification of the Folin-Ciocalteau colorimetric method (Singleton et al., 1999). High performance liquid chromatography (HPLC) analysis was used in order to quantify the presence of individual phenolic compounds. Before the HPLC analysis, 5 mL of each sample were filtrated through a cellulose membrane with 0.20 mm diameter. The equipment used in the analysis consisted of chromatographic system of liquid gradient, LC-DAD Series 1100 (Palo Alto, CA), with a detector system of diode array (DAD). It was used pre-column Zorbax 300 SB C18 (12 mm × 4.6 mm × 5 μ m) and C18-ODS column (150 mm × 4mm × 5 μ m) (Agilent Technologies, USA).

2.3.1. Trans-resveratrol analysis. In order to quantify the trans-resveratrol compound, it was used a mobile phase of ultra-pure water and acetonitrile (75:25 v/v) pH 3.0, in a constant flow of 1.0 mL·min⁻¹ for 20 min in a controlled temperature room at 20°C. The peak was detected in 306 nm, and the amount of sample injected was 20 μ L (Jeandet et al., 1995).

2.3.2. Anthocyanins analysis. In order to determinate the cyanidin-3-glucoside, delphinidin-3-glucoside, peonidin-3-glucoside and malvidin-3-glucoside, it was used a mobile phase with solvents A: ultra-pure water, formic acid, acetonitril (87:10:3 v/v/v) and B: ultra-pure water, formic acid, acetonitril (40:10:50 v/v/v), in a constant flow of 0.8 mL·min⁻¹, in a controlled temperature room at 25 °C. The peak detected was 518 nm and the amount of sample injected was 50 μ L. The elution conditions were: 50-60% (30 min), 60-100% (30 min) and 100-50% (10 min) (Office International de la Vigne et du Vin, 2003).

2.3.3. Procyanidins analysis. In order to determinate the procyanidins B₁, B₂, B₃ e B₄, (+)-catechin, (-)-epicatechin and gallic acid it was used a mobile phase with the solvent A (ammonium hydroxide diphosphate 50 mMol·L⁻¹, pH 2.6), solvent B (20% of solvent A and 80% of acetonitril) and solvent C (orthophosphoric acid 0.2 Mol·L⁻¹, pH 1.5), in a constant flow of 0.5 mL·min⁻¹, in a controlled temperature room at 40 °C. The peak was detected in 204 nm and the amount of sample injected

was 5 µL. The elution conditions were: 100% of solvent A for 5 min; 96% of solvent A and 4% of solvent B for 10 min; 92% of solvent A and 8% of solvent B for 10 min; 8% of solvent B and 92% of solvent C for 20 min; 30% of solvent B and 70% of solvent C for 5 min; 40% of solvent B and 60% of solvent C for 5 min; 80% of solvent B and 20% of solvent C for 5 min and, 100% of solvent A for 5 min. (Lamuela-Raventós and Waterhouse, 1994).

2.4. Chemical Measurement of DPPH^{*} Radical-Scavenging Activity. Scavenging of DPPH^{*} radical was measured using a modified Yamaguchi *et al* (1998) method in which white and purple grape juices solutions were added to the final concentrations of 0.1, 1.0, 10.0, 50.0 or 100.0% v/v. The tubes were stored in dark for 20 min, and after that, the optical density was measured at 517 nm. The results were expressed as the amount of DPPH^{*} radical reduced by the antioxidants and the amount of juice necessary to scavenge 50% of DPPH^{*} radical (IC₅₀). Controls used distilled water in place of the antioxidant solutions.

2.5. Assay for Free Radical-Mediated Haemolysis. The radical scavenging activities of the grape juices were also determined using the haemolysis of human red blood cells mediated by the water-soluble peroxy radical initiator 2-2'-azobis (2-amidinopropane) dihydrochloride (AAPH), according to the methods described by Miki *et al.*(1987). The underlying principle is radical-mediated oxidation of lipids in cell membrane and thereby induction of haemolysis. In brief, the procedure was as follows: 250 µL of preserved blood centrifuged at 1500 × g for 20 min. After that, the plasma was discarded and the sediment was resuspended in 250 µl phosphate-buffered saline (PBS; NaCl 8 g, KCl 0.2 g, Na₂HPO₄.2H₂O 1.8 g per litre, pH 7.4) and once again centrifuged as described above. This procedure was repeated once more, and then the (erythrocyte) sediment was suspended in PBS at a dilution of 1:10. One mL of this suspension, 0.250 mL of grape juice and 0.5 mL AAPH (0,2 M) in PBS solution were incubated at 37 °C for 2 h by gentle shaking in a rotary shaker. Then, 2 mL of PBS solution were added and the diluted reaction mixture was centrifuged

for 10 min at 1500 rpm. All measurements were performed in duplicate. The absorbance of the supernatant was determined at 540 nm and inhibition percentage was calculated using the formula: inhibition (%) = $A - A_1/A \times 100$, where A was the control absorbance (tube with water), and A1 was the test sample absorbance.

2.6. Lipid Peroxidation Assays. The lipid peroxidation was determined by using a modification of the method described elsewhere (Durak et al., 1999). One mL of pooled fresh human serum, 150 μ L of grape juices samples and 150 μ L of CuSO₄ (5 mM; positive control) were incubated for 1 h at 37 °C. After this hour, the oxidative stress levels were measured spectrophotometrically by the concentration of the thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) as described by Wills (1996). TBARS results were expressed as nmol/mL.

2.7. Superoxide Quenching and H₂O₂ Degradation Abilities. Superoxide quenching ability was spectrophotometrically determined in grape juice samples by measuring the inhibition of the auto 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 kept at 30 °C for 3 min (25). The assay of H₂O₂ degradation abilities was performed according to the method described by Mahely and Chance (1954). Its principle is based on the determination of hydrogen peroxide decomposition rate at 240 nm. This reaction was conducted in a constant temperature (30 °C) for 1 min. All the enzyme activities were expressed as nanomoles of substrate converted \times min⁻¹ \times milligram of protein⁻¹.

2.8. Total protein. The total proteins levels were analyzed by Biureto method (Total Proteins Kit-Labtest Diagnostica S.A., Brazil) and spectrophotometric determination at 545 nm.

2.9. Yeast culture media and growth conditions. Complete liquid medium (YPD), containing 0.5% yeast extract, 2% bactopeptone, and 2% glucose was used for routine growth. The minimal medium (MM) containing 0.67% yeast nitrogen base without amino acids, 2% glucose, 2% bacto-agar and

0.25% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. The synthetic complete medium (SC) was MM supplemented with 2 % adenine, 5 % lysine, 1 % histidine, 2 % leucine, 2 % methionine, 2 % uracil, 2 % tryptophan and 24 % threonine w/v. For mutagenesis and antimutagenesis, the deficient media, lacking lysine (*SC-lys*), histine (*SC-his*), or homoserine (*SC-homo*) were used to confirm these activities. A 0.9% NaCl solution was employed for dilution of cell suspension. Exponential phase cultures (2×10^7 cells/mL) were obtained by inoculating the cells that were removed from the stationary phase and placed in 5 mL of fresh YEPD medium. Cells were harvested and washed twice with saline. Both cell concentration and percentage of budding cells in each culture were determined using a Neubauer chamber.

***Saccharomyces cerevisiae* Strain.** The haploid wild-type *Saccharomyces cerevisiae* strain XV 185-14c (MAT α , *ade2-2*, *arg4-17*, *his1-7*, *lys1-1*, *trp5-48*, *hom3-10*) was kindly provided by Dr. R.C. Von Borstel (Genetics Department, Alberta University, Canada).

2.10. Evaluation of Antioxidant Capacity Using Yeast Cells. The evaluation of the *in vivo* antioxidant activity of the eight juices was performed using the yeast *S. cerevisiae* XV 185-14C. In order to determine the antioxidant capacity of the grape juices, suspensions containing exponential phase (2×10^7 cells/mL) with and without stressing agents, such as hydrogen peroxide (75 mM) and t-BOOH (2 mM) and the juices (10, 25, 50% v/v) were incubated for 1 h. After incubation, samples were diluted in 0.9 % (w/v) sodium chloride solution, plated onto YPD, and incubated for 48 h at 28°C. After this time, colonies were counted and compared to the control plates, which were considered to represent 100 % survival of yeast cell.

2.11. The mutagenicity and antimutagenicity assays. A suspension of 2×10^8 cells/mL of the yeast strain XV 185-14C grew until the exponential phase was incubated for 3 h in several different grape juices concentrations (10, 25, 50% v/v). Survival was determined on SC (3-5 days, 28 °C) and mutation induction (LYS+, HIS+ or HOMO+ revertants) was performed on appropriate deficient

media. Whereas *his 1-7* is a non-suppressible missense allele and reverions result from mutations at the locus itself (Hawthorne and Leopold, 1974), *lys1-1* is a suppressible ochre nonsense mutant allele (Zimmermann, 1975), which can be reverted either by locus-specific or by forward mutation in a suppressor gene. It is believed that *homo3-10* contains a frameshift mutation due to its response to a range of diagnostic mutagens (Zimmermann, 1975). Assays were repeated at least three times and plating was done in triplicate for each dose. As a positive control it was used 4-nitroquinoline-1-oxide, (4NQO; 5 μ M) throughout mutagenic and antimutagenic experiments. For the antimutagenic assays it was performed co-treatment treatment, i.e., the strain was incubated along with 10% (v/v) of grape juice and hydrogen peroxide 75 mM, shaking at 28°C, for 3 h. After that the samples were plated onto the same medium described above.

3. Results

3.1. Chemical Analysis and Nutritional Evaluation of the Grape Juices.

The alcoholic levels of different groups of grape juices varied between 0.03 and 0.3 % (v/v), with a total acidity between 0.40 e 0.96 g/100 tartaric acid. The medium levels of volatile acidity, pH and total sulfur dioxide of grape juices were 0 g/100 acetic acid, 3.29, and 0.028 g/L respectively. The highest values of the volatile acidity were found in white and purple commercial conventional grape juice. The carbohydrates content in the grape juices varied between 7.82 and 12.93 %, in which the highest values were found in the juices produced in pilot scale. The vitamin C (ascorbic acid) contents in juices ranged between 4.4 e 57.2 mg/L, where the purple juices showed the high amount of vitamin C. The caloric values of grape juices varied between 135.72 and 217.86 kJ (Table 2).

3.2. Pesticides Determination and Total Phenolic Content .

No organophosphorus and carbamate pesticides were detected in the fresh grape juice samples. In terms of phenolic compounds, there was a strong difference in phenolic content between purple and white juice ($p<0.01$; Figure 1). It was observed that the BOS purple grape juice was the richest in phenolic content (404.5 ± 9.19 mg catechin/ml; Figure 1), statistically differing from the poorest, NCS white grape juice (16.85 ± 0.91 mg catechin/ml; Figure 1). Considering the purple grape juices there is a significant difference ($p<0.01$) in the producing processes, where the juices produced in the pilot scale showed higher values of phenolic compounds than the commercial ones. This was not observed among the white ones, in which the highest value was found in a commercial juice (57.30 ± 0.70 mg catechin/ml), with a significative difference when compared to the organic (57.30 ± 0.70 mg catechin/ml) and commercial conventional (39.95 ± 1.06 mg catechin/ml; $p<0.01$).

3.3. Resveratrol and Anthocyanidins Contents.

The resveratrol and anthocyanidins contents were only measured in the purple grape juices, where the making process is responsible for the transference of these phenolic compounds from the grapes' skin to the juice. We have observed a strong difference in the resveratrol content between organic and conventional culture (Figure 2a). The BOC showed values as 0.23 ppm (Figure 2a), twice more than the BCC (0.08 ppm). Moreover, the organic grape juices showed more anthocyanins (Figure 2b). Considering again BOC, it presented the highest malvidin values as 240 ppm, different from BCC, that presented 100 ppm of malvidin (Figure 2b). For the organic juices the pilot scale presented twice more malvidin content (60 ppm) than the commercial (25 ppm; Figure 2b)

3.4. Catechins and procyanidins content.

It was observed several differences in the tannins content of purple and white juices. In general, the purple juices present more tannins than the white ones (Table 3). For example, BCS

showed the highest catechin value. As described above the poorest juice in catechin content was the NOS. BOS have procyanidins values (25.68 ppm) higher than NOS (7.47 ppm; Table 3). Despite other juices did not show such strong differences, all purple juices were the richest in procyanidins content when compared to the white ones (Table 3).

3.5. Scavenging of the DPPH[•] Radical.

Most grape juices at 100% and 50% concentrations showed similar antioxidant activity when compared to a 1% catechin solution (data not showed). Among all the samples assayed (Figure 3), the BOS presented the highest antioxidant activity ($IC_{50} = 5.18 \pm 0.00\%$). The antioxidant activity *in vitro* of juices, by means of DPPH[•] radical-scavenging assay, showed a correlation with the total phenolic content ($r=0.616$), procyanidins B1 ($r=0.689$) and B3 ($r=0.521$), and catechin ($r=0.545$), all the correlation show $p \leq 0.05$. The antioxidant activity of purple grape juices showed a positive correlation with anthocyanidins (malvidin, cyanidin, peonidin and delphinidin; $r=0.781$), catechin (0.741), and procyanidin B1 ($r=0.781$) contents, all showed $p < 0.01$.

3.6. Assay for free radical-mediated haemolysis.

We tested the efficacy of different kinds of grape juices as a potential inhibitor of AAPH-induce erythrocyte haemolysis. Interestingly, the oxidative hemolysis of erythrocytes induced by AAPH was suppressed by grape juices at high levels. One sample (NOC) showed a lesser activity than the others samples, but it was capable to inhibit 84.5% of haemolysis (Figure 4).

3.7. Assays of lipid peroxidation.

The inhibition of CuSO₄-induced lipid peroxidation was tested with the eight grape juices samples. Again, we found that the serum lipid peroxidation induced by CuSO₄ was suppressed by grape juices, even at low concentrations (Table 4). Among all the samples assayed, the BCS showed the highest lipoperoxidation protecting activity (2.94 ± 0.03 nmol/mL; Table 4), when compared to CuSO₄ presence (4.88 ± 0.03 nmol/ml; Table 4). Only one sample (NCS) did not show a protection

activity against the peroxidation induced by the CuSO₄, giving values (4.90±0.00 nmol/ml; Table 4) similar to CuSO₄ (4.88±0.03 nmol/ml; Table 4).

3.8. Superoxide quenching ability and H₂O₂ degradation ability

In our study, the activities of superoxide quenching and H₂O₂ degradation abilities activities of different kinds of grape juices were tested. Among all samples assayed (Table 5), the NCC showed the highest superoxide quenching ability (7.42 ΔA; Table 5) and the NCS, the highest H₂O₂ degradation ability (3.61 ΔA; Table 5). We also observed a significant difference among the purple and white samples, with the white samples showing the highest superoxide quenching and H₂O₂ degradation abilities (Table 5).

3.9. Antioxidant Activity in vivo

The majority of the juices showed important *in vivo* antioxidant activity at concentration of 20%, the highest no citotoxic concentration, avoiding the damages caused by the RS generated in the presence of hydrogen peroxide (Table 6). The only exception was the BCC sample, which induced a low protection for the yeast cell (survival values of 51.56%; Table 6). Among all samples assayed, the white juices had a significant protecting activity when compared to the purple ones ($p<0.01$). Considering all samples, there was not noted a positive correlation with the polyphenolic content and the *in vivo* antioxidant activities. When only the purple grape juices were considered, the antioxidant activities were correlated positively to the resveratrol content ($r=0.898$). Among the commercial purple grape juices tested, the best one was the BOC (70.25%; Table 6) which showed the highest resveratrol content (0.23 ppm). On the other hand, all grape juices (at concentration of 20%) showed important antioxidant activity against the damages caused by the RS generated by t-BOOH (Table 6), independent of cultivar, agriculture practice or making process.

3.10. Mutagenicity and Antimutagenicity Assays.

In this study the juices did not present a strong mutagenic activity. At concentrations of 50 and 25% (v/v) some juices showed a slight mutagenic action (Figure 5). When we used 50% (v/v) of grape juice to analyse the number of Lis-revertants yeast colonies (a locus mutation specific), it was found a positive correlation with carbohydrates content ($r=0.763$; $p<0.01$), but low correlation with polyphenols. In the case of His-revertants yeast colonies, (a locus specific mutation), it was found indication of a positive correlation with carbohydrates ($r=0.840$; $p<0.01$) contents. For the homo-revertants yeast colonies (frameshift events), the resveratrol content showed a negative correlation ($r=-0.778$; $p<0.01$; Figure 5). When used grape juice at 25% (v/v), only the Lis-revertants showed a negative correlation with the cianidin content ($r=-0.738$; $p<0.01$; Figure 5). At concentration of 10% (v/v) the resveratrol showed a negative correlation with the number of Lys-revertant colonies ($r=-0.881$; $p<0.01$). This negative correlation was observed too the malvidin ($r=-0.857$; $p<0.01$), cianidin ($r=-0.812$; $p<0.01$) and delphinidin ($r=-0.738$; $p<0.01$).

The antimutagenic effects of the grape juices against H_2O_2 were also analysed in yeast cells (Table 7). The co-treatment of yeast cells with grape juices and H_2O_2 showed the highest antimutagenic potential of the juices. For example, the sample NCC inhibited 100% of the mutagenicity induced by H_2O_2 in the medium without histidine (Table 7), and an important and significant protection against the H_2O_2 was also observed in all samples tested (Table 7). The sample NOE was the unique sample able to inhibit 100% of mutagenicity of yeast cells in the culture medium without lysine. On the other hand, all juices were not capable to inhibit 100% of yeast cell mutagenicity in the medium without homoserine, although they were able to reduce the mutagenicity induced by peroxide hydrogen in this culture medium (Table 7).

The antimutagenic response observed in this work showed significant differences between cultivars, purple and white juices, specially in the culture medium without homoserine ($p<0.05$) (Table 7). When considering only the white juices, it could be suggested that the polyphenols

showed an antimutagenic activity in the assays using the medium without lysine ($r=0.883$; $p<0.05$) and without homoserine ($r=0.733$; $p<0.01$), being slightly correlated with other phenolic compounds. Considering only the purple grape juices, the amount of procyanidins B2 showed a positive correlation ($r=0.805$; $p<0.01$) with the antimutagenic activity increase, in the medium without lysine and homoserine.

4. Discussion

4.1 .Phenolic Compounds, vitamin C quantify and others analysis in grape juices.

Phenolic compounds are secondary metabolites produced and accumulated in plants' tissues. Depending on the presence of biotic and abiotic factors (e.g. phytopathogenesis, water availability), this could result in different amounts of these compounds in the plant organs. Nowadays, the organic farming is a widely, small scale practice, where there is not the use of chemical substances like pesticides or artificial fertilizers to promote the plant growth. Once pesticides are not used, the plants are more susceptible to the action of phytopathogenic organisms, resulting in the production of larger amounts of phenolic compounds (Soleas et al., 1997). We observed that the choice of grape's agricultural practice (organic versus conventional) results in different amounts of resveratrol, anthocyanins and tannins (Figure 3 and Table 3). Additionally, there are different methodologies described about juice making process. According to Fuleki and Ricardo-da-Silva (2003), the hot method is responsible for the great phenolic compounds incorporation in the juice. The contact time of juice with grape's skin also results in the larger incorporation of phenolic compounds (Fuleki and Ricardo-da-Silva, 2003). In this study, we also observed that the grape juice making process affected the carbohydrates, anthocyanins and tannins values. In this case, the juices produced in the pilot scale (heating in contact with the skin for the purple ones), were able to incorporate more phenolic compounds than other making processes.

Interestingly, the making process influenced on the procyanidins B1, B2, B4 ($p<0.01$), and epicatechin ($p<0.05$) values in the white juices, while it was noted in the purple juice a difference between procyanidin and catechin values ($p<0.01$). This difference has been already related in other studies, and could be attributed to the pressing method, the manufacture process or the grape variety (Fuleki and Ricardo-da-Silva, 2003; Dávalos et al., 2005).

It should be noted that this study is the first one to relate the difference of resveratrol contents between organic and conventional grape juices. Once conventional pesticides are not used in the organic culture, the plants probably are more susceptible to from fungus attack. Thus, as a defense constituent of the plant, more resveratrol is produced, corroborating the fact that organic grapes are more susceptible to phytophathogenic attack. Moreover, we also found that the different tannins compounds have the following distribution in grape juices (from high to low concentration): catechin>B3>B1>epicatechin>B4>B1. This finding was different of other studies, with grapes from *Vitis vinifera*, which show that catechin>epicatechin>procyanidins (Fuleki and Ricardo-da-Silva, 2003). These differences can be explained considering the different grape varieties used in both studies.

Additionally to phenolic compounds, vitamin C (ascorbic acid) is also present in grape juices. In plants, the vitamin C shows a protective role against RS generated during the photosynthesis and respiration processes. Vitamin C is also related to cellular growth, and acts as a co-factor for several enzymes involved with in the gibberellic acid, anthocyanins and many secondary metabolites synthesis (Barata Soares et al., 2004). Vitamin C levels showed a positive correlation with polyphenol ($r=0.878; p<0.01$), procyanidins B1 ($r=0.676; p<0.01$) and B2 (0.852; $p<0.01$), and catechin content (0.799; $p<0.01$). The significant variation noted in vitamin C level between purple and white juices can be attributed to the grape variety, ripening grade and hours of sun exposition (36). According to other research, white or purple grapes have the lowest vitamin C

content compared to kiwi fruit, strawberry, orange, grapefruit, honeydew melon and tomato (Wang et al., 1996). On the other hand, among commercial fruit and vegetable juices, the grape juice had the highest antioxidant activity, which could be attributed to the presence of flavonoids (Wang et al., 1996).

There are many things that can provoke modification in the nutritional and chemical analyses, such as cultivar produced, soil, clime, processing methods and others (Fuleki and Ricardo-Silva, 2003). In our study there are differences between organic and conventional, but the mainly one is that between the commercial and pilot scale produced grape juices where the last ones are richer in carbohydrates than the commercial.

4.2. The antioxidant properties of grape juice

All studies on grape juice antioxidant activity were related to purple grape juices, mainly the ones provided from Concord cultivar (Day et al., 1997), with an exception for one study that showed the *in vitro* antioxidant activity of white grape juices (Dávalos et al., 2005). In both cases grape juices produced from cultivars of *V. vinifera* species were used (Dávalos et al., 2005), different from our study, which used cultivars of *V. lambrusca* species (Bordo and Niagara) which are often used in the grape juices production in Brazil. It has been reported that purple grape juice is better than the white one in terms of antioxidant properties (Dávalos et al., 2005), which was also observed in this study using *in vitro* assays (Figure 3). Previous works on grape juices showed that the haemolysis inhibition might be attributed to gallic acid, procyanidins and other tannins analysed by HPLC (Abajo et al., 2004). In this sense, we were not able to find a correlation between the polyphenols content and haemolysis inhibition, but only a significative difference between the purple and white grape juices, with the purple juice being more efficient than the white juices (Figure 4). On the other hand, the superoxide quenching and peroxide degradation abilities of grape

juices could explain their antioxidant activity *in vivo*. We found a positive correlation with *in vivo* antioxidant activity and superoxide quenching ($r=0.680$) and peroxide degradation abilities (0.788), respectively, but not with the total phenolic content.

This study is the first to describe the *in vivo* antioxidant activity differences of white and purple juices. The main difference reported between red and white wines is the maceration process, which is employed in the initial phase of red wine fermentation, increasing the extraction of phenolic substances from grape solids (Whithead et al., 1995), as observed for purple grape juices. In this sense, the making grape juice process is also an important factor when considering the proteins, carbohydrates and ashes values ($p<0.05$). As reported by other study, the orange juice samples with a higher level of sugar have the worst antioxidant activity (Franke et al., 2004), which was also observed in this work ($r=-0.527$; $p<0.01$).

4.3. The mutagenic and antimutagenic effects of grape juice.

There are a few studies reporting the mutagenic activity of grape juice. One of them showed that the white grape from *Vitis vinifera* species juice is able to induce mutagenesis in the Ames test (Franke et al., 2004). However, most grape juices used in this study did not show mutagenic activity or did it only faintly. This finding is corroborated with other study which analyses different types of wines, where the white and rose wines, as well as the must not fermented, showed low mutagenic levels (Nguyen et al., 1989). Additionally, phenolic compounds can suffer oxi-reduction reactions in the presence of some metallic ions, generating mutagenic processes and pro-oxidant activity (Valko et al., 2005; Ferguson, 2001; Patrinelli et al., 1996a; Patrinelli et al., 1996b). In this last case, the pro-oxidant activity of phenolic compounds could be enzymatically induced by polyphenol oxidase, which is present in grapes and is able to produce quinines. The quinines molecules can be converted to the radical semiquinon, which reacts with the DNA and other cellular constituents, causing oxidative stress and DNA damage (Patrinelli et al., 1996b).

In this study, the grape juice was a good antimutagenic and antioxidant source. The agriculture practice could be responsible for the significant difference observed between organic and conventional juices in relation to protective activities. Considering only the conventional juices, the antimutagenic activity can be attributed to the polyphenol contents (Table 6). In the organic samples there was not any correlation with the polyphenols contents, but with procyanidin (Table 6).

According to Sanchez, when comparing wines with juices, wines present a higher antioxidant activity than the grape juices, both produced with *Vitis vinifera* grapes (Sanchez-Moreno et al., 1999). However, as observed in this study, the grape juice could be also cited as a good antioxidant and antimutagenic source. Moreover, for not being an alcoholic beverage, the grape juice could be administrated to children as a diet supplement. In this sense, according to Coimbra *et al.* (Da Luz and Coimbra, 2004) there is a relation between alcohol consumption and clinical outcomes in humans, where the protective effect of beverages is only related to light/moderate drinking. The wine is a good source to prevent the cardiac diseases, but there are some clearly contraindications in certain types of patients such as those with hepatic disorders, cardiomyopathies or mental disorders. In these cases, the grape juices, white and purple, might be recommended (Dávalos et al., 2005).

Acknowledgment

We thank the University of Caxias do Sul (Caxias do Sul, Rio Grande do Sul, Brazil), CAPES, IBRAVIN, CNPq and FAPERGS for the financial support of this research.

References

- Abajo, C.; Boffill, M. A.; del Campo, J.; Méndez, M. A.; González, Y. Mitjans, M.; Vinnardell, M. P. In vitro study of the antioxidant and immunomodulatory activity of aqueous infusion of *Bidens pilosa*. *J. Ethnopharmacol.* 2004, 93, 319-323.
- Ames, B.N.; Shigenaga, M.K.; Hagen, T.M. Oxidants antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proc. Natl. Acad. Sci USA.* 1993, 90, 7915-7922.
- AOAC – Official Methods of Analysis of AOAC International (OMA), 18th Edition, 1995.
- Asami, D.K.; Hong, Y-J.; Barrett, D.; Mitchell, A. E. 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.* 2003, 51, 1237-1241.
- Barata Soares, A. D.; Gomez, M.L.P.A.; De Mesquita, C.; Lajolo, F.M. Ascorbic acid biosynthesis: a precursor study on plants. *Braz. J. Plant Physiologic.* 2004, 16, 147-154.
- Bastos, V. L. F. C.; Cunha, J. C. B.; Lima, J. S. Brain Acetylcholinesterase as in vitro detector of organophosphorus and carbamate insecticides in water. *Wat. Res.* 1991, 25, 835-840.
- Carbonaro, M.; Mattera, M.; Nicoli, S.; Bergamo, P.; Capelloni, M. Modulation of antioxidant compounds in organic vs conventional fruit (Peach, *Prunus persica* L., and Pear, *Pyrus communis* L.). *J. Agric. Food Chem.* 2002, 50, 5458-5462.
- Coimbra, S. R.; Lage, S.H.; Brandizzi, L.; Yoshida, V.; da Luz, P.L. The action of red wine and purple grape juice on vascular reactivity is independent of plasm lipids in hypercholesterolemic patients. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 2005, 38, 1339-1347.
- Da Luz, P.L.; Coimbra, S.R. Wine, alcohol and atherosclerosis: clinical evidences and mechanisms. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 2004, 37, 1275-1295.

- Dávalos, A.; Bartolomé, B.; Gómez-Cordovés, C. Antioxidant properties of commercial grape juices and vinegars. *Food Chem.* 2005, 93, 325-330.
- Day, A. P.; Kemp, H.J.; Bolton, C.; Hartog, M. Stansbie, D. Effect of concentrated red grape juice consumption on serum antioxidant capacity and low-density lipoprotein oxidation. *Ann. Nutr. Metab.* 1997, 41, 353-357.
- Durak, I.; Avci, A.; Kaçmaz, M.; Büyükköçak, S.; Burak Çimen, M. Y.; Elgün, S. Öztürk, S. Comparison of antioxidant potentials of red wine, white wine, grape juice and alcohol. *Curr. Med. Res. Opin.* 1999, 15, 316-320.
- Ferguson, L. R. Role of plant polyphenols in genomic stability. *Mut. Res.* 2001, 475, 89-111.
- Franke, S.I.R.; Ckless, K.; Silveira, J.D.; Rubensam, G.; Brendel, M.; Erdtmann, B.; Henriques, J.A.P. Study of antioxidant and mutagenic activity of different orange juices. *Food Chem.* 2004, 88, 45-55.
- Frankel, E. N.; Bosanek, C. A.; Meyer, A. S.; Silliman, K.; Kirk, L. L. Commercial Grape Juices inhibit the in vitro oxidation of human low-density lipoproteins. *J. Agric. Food Chem.* 1998, 46, 834-838.
- Fuleki, T.; Ricardo-da-Silva, J. M. Effects of cultivar and processing method on the contents of catechins and procyanidins in grape juice. *J. Agric. Food Chem.* 2003, 51, 640-646.
- Hawthorne, D.C.; Leopold, U. Current topics in microbiology and immunology. Springer Verlag, Berlin, 1974.
- Jeandet, P.; Bessis, R.; Maume, B. F.; Mennler, P.; Peyron, D.; Trollat, P. Effect of enological practices on the resveratrol isomer content of wine. *J. Agric. Food Chem.* 1995, 43, 316-319.
- Lamuela-Raventós, R. M.; Waterhouse, A. A direct HPLC separation if wine phenolic. *Am. J. Enol. Viti.* 1994, 45, 1-5.

- Lima, J. S.; Cunha Bastos, J.; Cunha Bastos, V. L. F. Methyl parathion activation by a partially purified rat brain fraction. *Toxicol. Lett.* 1996, 87, 53-60.
- Lombardi-Boccia, G.; Lucarini, M.; Lanzi, S.; Aguzzi, A.; Capelloni, M. Nutrients and antioxidant molecules in yellow pluma (*Prunus domestica* L.) from conventional and organic productions: a comparative study. *J. Agric. Food Chem.* 2004, 52, 90-94.
- Mahely, A. C.; Chance, B. The assay of catalases and peroxidases. *Methods Biochem. Anal.* 1954, 1, 357-424.
- Miki, M.; Tamai, H.; Mino, M.; Yamamoto, Y.; Niki, E. Free-radical chain oxidation of rat red blood cells by molecular oxygen and its inhibition by a α -tocopherol. *Arch. Biochem. Biophys.* 1987, 186, 343-355.
- Misra H. P.; Fridovich, I. The generation of superoxide radical during the autoxidation of hemoglobin. *J. Biol. Chem.* 1972, 247, 6960-6972.
- Nguyen, T.; Fluss, L.; Madej, R.; Ginther, C.; Leighton, T. The distribution of mutagenic activity in red, rose and white wines. *Mut. Res.* 1989, 223, 205-212.
- Office International de la Vigne et du Vin. HPLC- Determination of nine major anthocyanins in red and rosé wine. Resolution OENO 22/2003.
- Osman, H. E.; Maalej, N.; Shanmuganayagam, D.; Folts, J. D. Grape juice but not orange or grapefruit juice inhibits platelet activity in dogs and monkeys (*Macaca fascicularis*). *J. Nutr.* 1998, 128, 2307-2312.
- Park, Y.K.; Park, E.; Kim, J.; Kang, M. Daily grape juice consumption reduces oxidative DNA damage and plasma free radical levels in healthy Koreans. *Mut. Res.* 2003, 529, 77-86.
- Patrinelli, A.; Clifford, M. N.; Ioannides, C. Contribution of phenols, quinines and reactive oxygen species to the mutagenicity of white grape juice in the Ames test. *Food Chem. Toxicol.* 1996b, 34, 869-872.

- Patrinelli, A.; Clifford, M. N.; Walker, R.; Ionnides, C. Mutagenicity of white grape juice in the Ames test. *Food Chem. Toxicol.* 1996a, 34, 559-562.
- Sanchez-Moreno, C.; Larruari, J.A.; Calixto-Saura, F. Free radical scavenging capacity and inhibition of lipid oxidation of wines, grape juices and related polyphenolic constituents. *Food Res. Int.* 1999, 32, 407-412.
- Singletary, K. W.; Stansbury, M. J.; Giusti, M.; van Breemen, R. B.; Wallig, M.; Rimando, A. Inhibition of rat tumorigenesis by concord grape juice constituents. *J. Agric. Food Chem.* 2003, 51, 7280-7286.
- Singleton, V. L.; Orthofer, R.; Lamuela-Raventós, R. M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteau reagent. In *Methods in enzymology, oxidant and antitoxidantss (Part A)*; Packer, L., Ed; Academic Press: San Diego, CA, 1999; Vol. 299., pp 159-178.
- Soares, D. G.; Andreazza, A. C; Salvador, M. Sequestering ability of butylated hydroxytoluene, propyl gallate, resveratrol and vitamins C and E against ABTS, DPPH, and hydroxyl free radical in chemycal and biological system. *J. Agric. Food Chem.* 2003, 51, 1077-1080.
- Soleas, G. J.; Diamandis, E. P.; Goldberg, D. M. Resveratrol: A molecule whose time has come? And gone?. *Clin. Biochem.* 1997, 30, 91-113.
- Valko et al., 2005 Valko, M.; Morris, H.; Cronin, M.T.D. Metals, Toxicity and Oxidative Stress. *Curr. Med. Chem.* 2005, 12, 1161-1208.
- Wang, H.; Cao, G.; Prior, R. L.; Total antioxidant capacity of fruits. *J. Agric. Food Chem.* 1996, 44, 701-705.
- Wang, Y.; Catana, F.; Yang, Y.; Roderick, R.; Van Breemen, R.B. An LC-MS Method for Analyzing Total Resveratrol in grape juice, cranberry juice and in wine. *J. Agric. Food Chem.* 2002, 50, 431-435.

- Whitehead, T.P.; Robinson, D.; Allaway, S.; Syms, J.; Hale, A. Effect of red wine ingestion on the antioxidant capacity of serum. *Clin. Chem.* 1995, 41, 32-35.
- Wills ED. Mechanism of lipid peroxide formation in animal tissues. *Biochem. J.* 1996, 99, 76-667.
- Yamaguchi, T.; Takamura, H.; Matoba, T. C.; Terão, J. HPLC method for evaluation of the free radical-scavenging activity of foods by using 1,1 diphenyl-2 picrylhydrazyl. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 1998, 62(6), 1201-1204.
- Zimmermann, F. K. Procedures used in the induction of mitotic recombination and mutation in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mut. Res.* 1975, 31, 71-86.
- Zoecklein, B. W.; Fugelsang, K. C.; Gump, B. H.; Nury, F.S. Wine analysis and production. Aspen Publishers; Maryland, Australia. 2000.

Tables and Figures

Table 1. The grape juices were divided into 8 types.

| Name | Cultivar | Agriculture Practice | Making process |
|------|----------|----------------------|----------------|
| BCC | Bordo | Conventional | Commercial |
| BCS | Bordo | Conventional | Pilot scale |
| BOC | Bordo | Organic | Commercial |
| BOS | Bordo | Organic | Pilot scale |
| NCC | Niagara | Conventional | Commercial |
| NCS | Niagara | Conventional | Pilot scale |
| NOC | Niagara | Organic | Commercial |
| NOS | Niagara | Organic | Pilot scale |

Table 2. Nutritional analyses and acid ascorbic level in different grape juices

| Samples | | | Caloric values (KJ) | Carbohydrates (%) | Proteins (%) | Alimentary fiber (%) | Humity(%) | Ashes (%) | Ascorbic Acid |
|-------------|---------|--------------|--------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|--------------------------|-------------------------|------------------------|
| Commercial | Bordo | Conventional | 39.04±0.05 ^{d*} | 9.43±0.01 ^d | 0.317±0.05 ^d | 0.010±0.00 ^e | 90.02±0.02 ^b | 0.199±0.00 ^b | 30.8±0.40 ^c |
| | | Organic | 32.47±0.02 ^e | 7.82±0.07 ^e | 0.240±0.05 ^f | 0.105±0.05 ^d | 91.65±0.08 ^a | 0.132±0.00 ^c | 57.2±0.70 ^a |
| | Niagara | Conventional | 46.03±0.01 ^c | 11.19±0.03 ^c | 0.310±0.05 ^e | 0.271±0.01 ^a | 88.10±0.03 ^c | 0.110±0.00 ^d | 17.6±0.30 ^e |
| | | Organic | 35.07±0.09 ^e | 8.43±0.02 ^e | 0.327±0.01 ^c | 0.170±0.05 ^b | 90.84±0.02 ^{ab} | 0.224±0.00 ^a | 22.0±0.80 ^d |
| Pilot Scale | Bordo | Conventional | 53.68±0.10 ^a | 12.93±0.02 ^a | 0.487±0.05 ^a | 0.250±0.01 ^a | 86.12±0.02 ^d | 0.197±0.00 ^b | 44.0±0.13 ^b |
| | | Organic | 48.36±0.08 ^b | 11.76±0.02 ^b | 0.332±0.05 ^b | 0.120±0.00 ^c | 87.56±0.01 ^c | 0.216±0.00 ^a | 30.8±0.90 ^c |
| | Niagara | Conventional | 52.12±1.72 ^a | 12.68±0.46 ^a | 0.316±0.05 ^d | 0.093±0.01 ^d | 86.79±0.46 ^d | 0.106±0.00 ^d | 4.4±0.10 ^g |
| | | Organic | 50.92±0.08 ^a | 12.48±0.02 ^a | 0.327±0.05 ^c | 0.120±0.00 ^c | 86.88±0.55 ^d | 0.226±0.00 ^a | 8.8±0.21 ^f |

*Different letters correspond to mean values statistically different by analysis of variance (ANOVA) and Tukey pos-test, for p<0.01

Table 3. Catechins and procyanidins content in different grape juices.

| Samples | | Catechins | | Procyanidins | | | | |
|---------|--------------|-------------|-------------|--------------|------|------|-------|------|
| | | Catechin | Epicatechin | B1 | B2 | B3 | B4 | |
| Bordo | Organic | Pilot scale | 76.69 | 4.91 | 14.0 | 1.13 | 25.68 | 2.93 |
| | | Commercial | 33.89 | 2.72 | 7.53 | 2.32 | 10.03 | 0.64 |
| | Conventional | Pilot scale | 86.43 | 2.11 | 7.98 | 1.88 | 27.04 | 2.27 |
| | | Commercial | 2.06 | 22.13 | 1.33 | 1.83 | 7.95 | 4.66 |
| Niagara | Organic | Pilot scale | 0.38 | 0.92 | 0.76 | 0.61 | 7.47 | 1.23 |
| | | Commercial | 0.90 | 1.81 | 3.45 | 1.58 | 18.5 | 3.59 |
| | Conventional | Pilot scale | 0.79 | 0.97 | 0.93 | 0.94 | 14.78 | 1.68 |
| | | Commercial | 7.39 | 5.95 | 7.53 | 1.32 | 13.06 | 2.45 |

Table 4. Peroxidation levels in serum treated with or without CuSO₄ and grape juice.

| SAMPLE | TBARS (nmol MDA/mL) |
|-------------------------|-------------------------|
| Control | 3.29±0.03 ^{a*} |
| CuSO ₄ | 4.88±0.03 ^b |
| CuSO ₄ + BCC | 4.41±0.00 ^c |
| CuSO ₄ + BCS | 2.94±0.03 ^d |
| CuSO ₄ + BOC | 4.58±0.00 ^e |
| CuSO ₄ + BOS | 3.51±0.03 ^a |
| CuSO ₄ + NCC | 3.77±0.03 ^a |
| CuSO ₄ + NCS | 4.90±0.00 ^b |
| CuSO ₄ + NOC | 4.33±0.06 ^c |
| CuSO ₄ + NOS | 4.01±0.00 ^f |

*Different letters correspond to mean values statistically different by analysis of variance (ANOVA) and Tukey pos-test, for p<0.01

Table 5. Superoxide quenching and H₂O₂ degradation abilities in different grape juices

| SAMPLE | Superoxide quenching ability | H ₂ O ₂ degradation ability |
|--------|-------------------------------------|---|
| | ΔA (min x mg protein) ⁻¹ | ΔA (min x mg protein) ⁻¹ |
| BCC | 1.98±0.01 ^{f*} | 0.20±0.09 ^d |
| BCS | 2.43±0.02 ^e | 0.33±0.16 ^c |
| BOC | 1.97±0.01 ^f | 1.10±0.08 ^b |
| BOS | 0.51±0.02 ^g | 0.24±0.11 ^c |
| NCC | 7.42±0.03 ^a | 0.63±0.30 ^{bc} |
| NCS | 4.35±0.04 ^c | 3.61±0.39 ^a |
| NOC | 5.44±0.04 ^b | 1.35±0.09 ^b |
| NOS | 4.00±0.04 ^d | 1.07±0.30 ^b |

* Different letters correspond to mean values statistically different by analysis of variance (ANOVA) and Tukey pos-test, for p<0.01

Table 6. Survival curve of the *Saccharomyces cerevisiae* yeast treated with hydron peroxide 75mM and t-BOOH 2mM in the presence and absence of different samples (20% v/v).

| | | | Survival (%) | |
|--|--------------|------------|------------------------------------|--------------------------|
| | | | H ₂ O ₂ 75mM | t-BOOH 2mM |
| Bordo | Conventional | Pilot | 81.30±2.10 ^{b*} | 100.00±0.00 ^a |
| | | Commercial | 55.65±2.10 ^c | 100.00±0.00 ^a |
| | Organic | Pilot | 74.40±0.00 ^b | 98.8±1.20 ^a |
| | | Commercial | 70.25±1.95 ^b | 100.00±0.00 ^a |
| Niagara | Conventional | Pilot | 100.00±0.00 ^a | 100.00±0.00 ^a |
| | | Commercial | 98.95±1.05 ^a | 96.7±3.30 ^a |
| | Organic | Pilot | 100.00±0.00 ^a | 100.00±0.00 ^a |
| | | Commercial | 100.00±0.00 ^a | 100.00±0.00 ^a |
| H ₂ O ₂ 75mM/ t-BOOH 2Mm | | | 46.50±4.94 ^d | 61.2±5.3 ^b |

* Different letters correspond to mean values statistically different by analysis of variance (ANOVA) and Tukey pos-test, for p<0.01

Table 7. Induction of punctual mutation (*his 1-7*), ochre allele (*lys 1-1*) and frameshift mutation (*hom 3-10*) in a haploid *Saccharomyces cerevisiae* strain XV185-14C after a co-treatment with the juices (10% v/v) and H₂O₂ 50mM in a growth exponential stage, for 3 h.

| Samples | Survival (%) | His 1/10 ⁷ survivors ^b | Lys1/10 ⁷ survivors ^b | Hom3/10 ⁷ survivors ^a |
|------------------------------------|--------------|--|---|---|
| 0 | 100.0 | 1.58± 0.83 | 0.00 ± 0.00 | 0,00 ± 0,00 |
| H ₂ O ₂ 75mM | 45.0 | 24.70 ± 1.09** | 1.66± 0.00** | 5,55± 0,32** |
| BCC (10%) | 73.1 | 2.18± 1.01* | 4.55± 0.69** | 13,22± 1,44** |
| BCE (10%) | 74.7 | 3.80± 0.95* | 0.76± 0.38* | 3,80± 0,95** |
| BOC (10%) | 100 | 12.93± 0.63* | 0.74± 0.37* | 2,03± 0,18* |
| BOE (10%) | 100 | 4.87± 1.85* | 3.81± 2.18** | 5,71± 1,65** |
| NCC (10%) | 80.71 | 0.16± 0.02* | 1.41± 0.10* | 3,08± 0,18* |
| NCE (10%) | 100 | 5.38± 1.38* | 0.37± 0.13* | 0,73± 0,18* |
| NOC (10%) | 73.5 | 6.16± 0.028* | 1.41± 0.10* | 2,71± 0,01* |
| NOE (10%) | 100 | 6.02± 1.14* | 0.00± 0.00* | 2,03± 0,18* |

^a Locus-specific revertants.

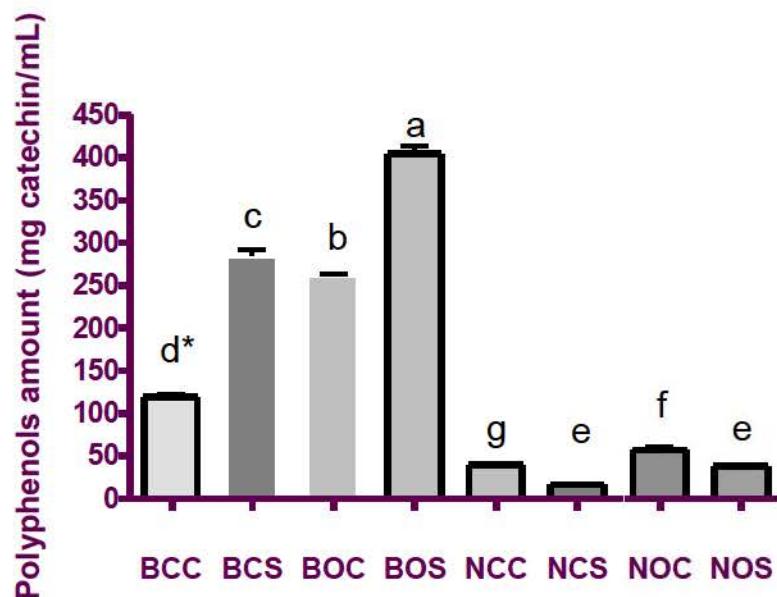
^b Locus non-specific revertants (forward mutations).

^c Standard deviation

** Statistic differences p< 0.05 for t test to the negative control (0)

* Statistic differences p< 0.05 for t test to the positive control (H₂O₂)

Figure 1. Polyphenols amount in different grape juices



* Different letters correspond to mean values statistically different by analysis of variance (ANOVA) and Tukey pos-test, for $p<0.01$

Figure 2. **Resveratrol (a) and anthocyanidins (b)** contents in different purple grape juices

Figure 2a

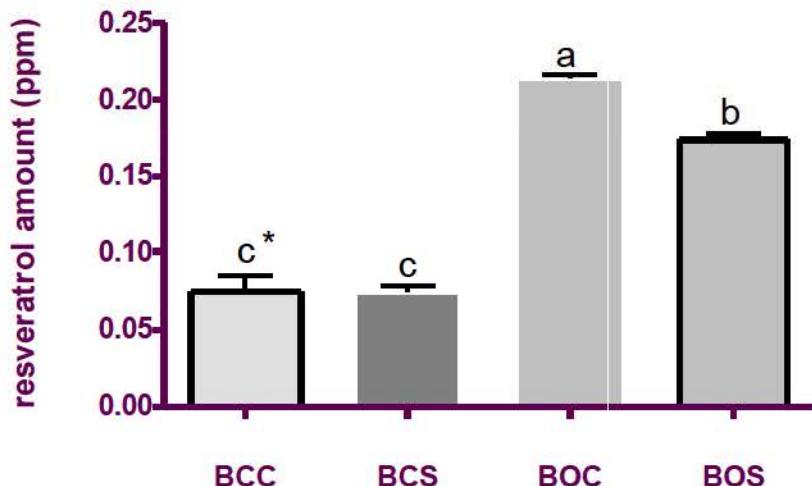
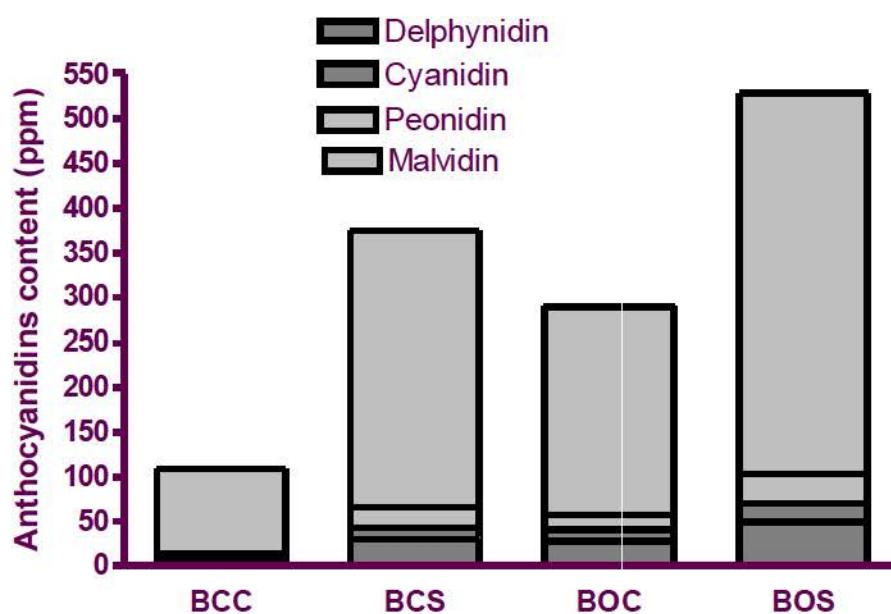


Figure 2b.



* Different letters correspond to mean values statistically different by analysis of variance (ANOVA) and Tukey pos-test, for $p<0.01$

Figure 2b. Anthocyanidins levels

Figure 3. The grape juice amount necessary to reduce 50% DPPH radical.

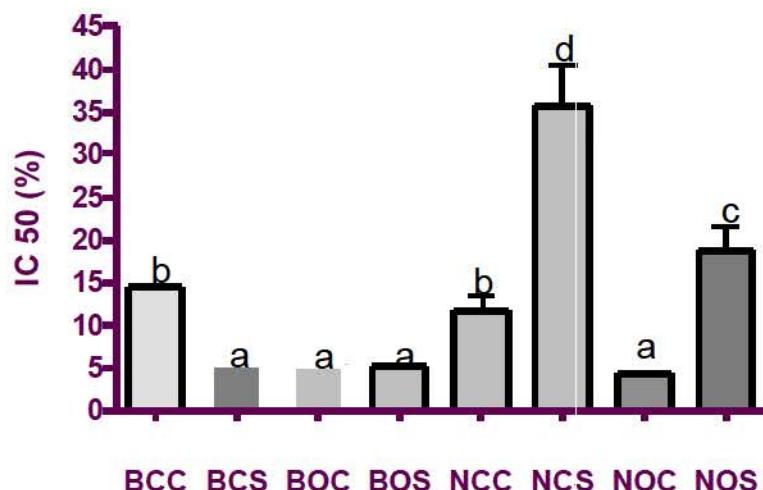
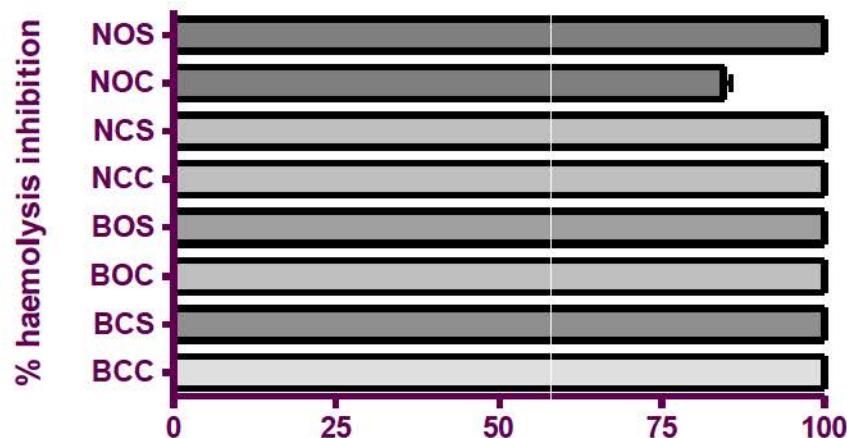


Figure 4. Haemolysis inhibition percentile in different grape juices



* Different letters correspond to mean values statistically different by analysis of variance (ANOVA) and Tukey pos-test, for $p < 0.01$

Figure 5. Mutagenicity assay in different grape juices and in different mutagenesis locus: induction of ochre allele mutation (*lys 1-1*), figure a; punctual mutation (*his 1-7*), figure b and frameshift mutation (*homo 3-10*), figure c.

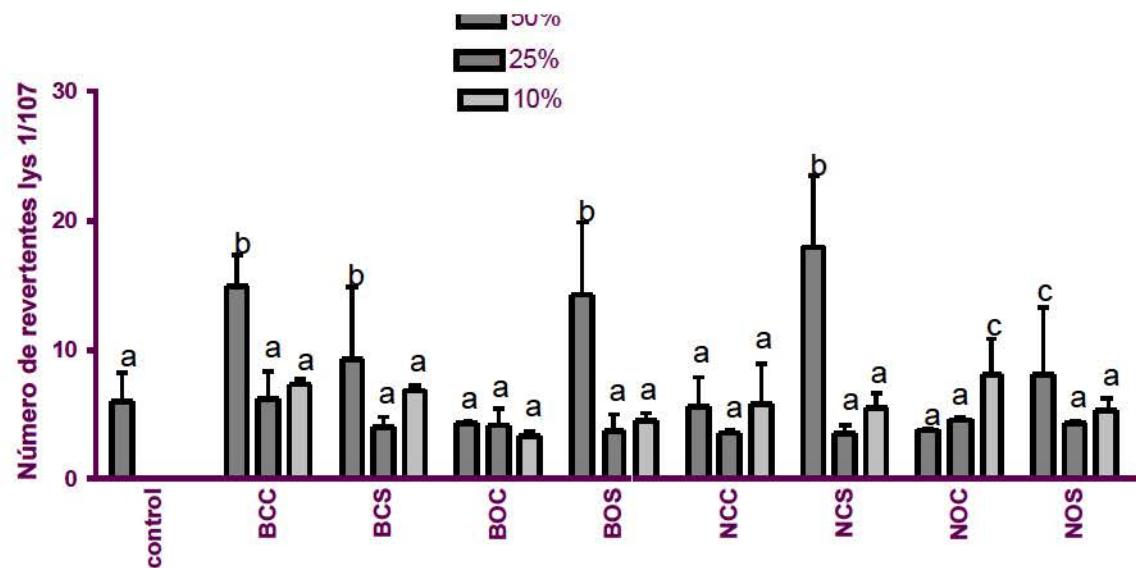
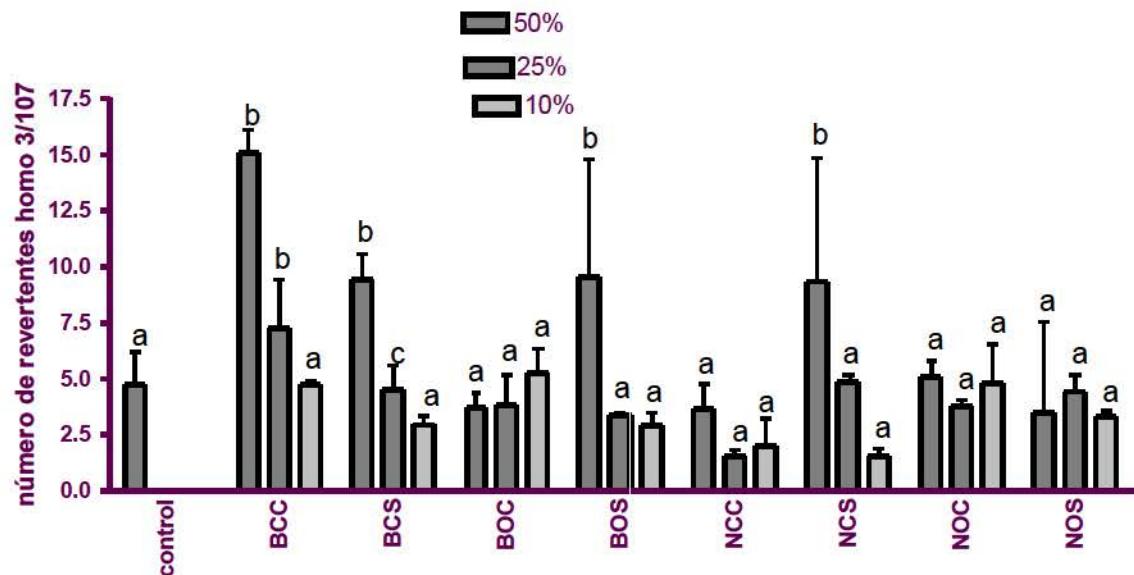


Figure 5.c.



Values to the positive control 4NQO: locus *his* ($16,01 \pm 0,05$), locus *lys* ($16,25 \pm 2,48$) and *homo* ($18,51 \pm 4,13$).

* Different letters correspond to mean values statistically different by analysis of variance (ANOVA) and Tukey pos-test, for $p < 0.01$

4. CAPÍTULO II - Artigo 2 –

ANTIOXIDANT ACTIVITY OF THE ROSE GRAPE JUICE

Caroline Dani, Lívia S. Oliboni, Regina Vanderlinde, Diego Bonatto, Mirian Salvador and João Antonio Pegas Henriques.

Artigo submetido a British Journal of Nutrition em 23/05/2006

Muitos são os estudos que relatam a atividade benéfica de derivados da uva, principalmente vinhos, das mais diversas variedades de uva existentes no mundo. Entretanto poucos são os estudos que atribuem ao suco a atividade protetora aos radicais livres. Sendo assim, um dos objetivos deste estudo foi avaliar a atividade antioxidante, através de *testes in vitro*, *in vivo* (modelo da levedura *S. cerevisiae*) e *ex-vivo*, do suco de uva rose, produzido a partir das cultivar Goete, *Vitis labrusca*.

Com base nos resultados, observou-se que este suco Rosado é uma fonte de substâncias antitoxicantes, principalmente os polifenóis, e sendo assim apresenta atividade antioxidante importante podendo ser comparada a sucos tintos e/ou até mesmo a vinhos. Sendo assim o consumo de suco de uva, entre eles o Rosado, pode ser um fator responsável pela redução de doenças como aterosclerose, ou o próprio envelhecimento, acontecimentos atribuídos aos radicais livres.

ANTIOXIDANT ACTIVITY OF ROSE GRAPE JUICE

Running title: Antioxidant activity of rose grape juice

Caroline Dani, Lívia S. Oliboni, Regina Vanderlinde, Diego Bonatto, Mirian Salvador and

João A. P. Henriques *

Instituto de Biotecnologia, Universidade de Caxias do Sul, Caxias do Sul, RS, Brasil

Corresponding author:

Dr. João Antonio Pegas Henriques

Universidade de Caxias do Sul – Instituto de Biotecnologia

Rua Francisco Getúlio Vargas, 1130- CEP 95070-560

Caxias do Sul – RS- Brazil

TEL/FAX: (0xx54) 218-2664

E-mail: henriques@cbiot.ufrgs.br

Abstract

There are many studies related to the antioxidant activity of grape's products; however most of them concerns about purple varieties. Up to now, there have not been reported any studies on the rose variety Goethe, either on its antioxidant activity or phenolic compounds quantification. Thus, the purpose of this study was to evaluate *in vitro*, *in vivo* and *ex-vivo* antioxidant activity, as well as performing nutritional analyses and quantifying total phenolic compounds, catechin, epicatechin, procyanidins (B1, B2, B3 and B4) and ascorbic acid contents, in rose grape juice sample. The results obtained showed that, in agreement with other studies about purple and white grape juices, rose grape juice is a great polyphenol source, containing many kinds of polyphenols as catechin, epicatechin and others. Therefore, this fact could suggest an excellent antioxidant activity of this juice. In our study, this activity was proved in *in vitro*, *in vivo* and *ex-vivo* assays, which could be attributed to the phenolic compounds that were found in rose grape juice, as well as to the ascorbic acid. All results showed that rose grape juice is an excellent antioxidant source, which could be used in the prevention of many diseases related to oxidative stress, as atherosclerosis, Parkinson syndrom and others.

Keywords: grape juice; antioxidant; mutagenic; antimutagenic; phenolic compounds

1. Introduction

The moderate intake of grape products, wines or juices, has been already reported to have health protection effect. In this sense, some of these activities can be attributed to the phenolic compounds, which are present in grape (Day *et al.* 1997). Grape juices are made from hundreds of different world grape varieties, but most of used grapes are from *Vitis Labrusca* species. Within these species, the most important cultivars in the world production are Concord, Isabel and Bordo, representing more than 90% of grape juice total production (IBRAVIN, 2005). However, there are many white grape juices that are produced from Niagara variety and, actually, commercialized all over the world. Besides purple and white juices, another type of juice has been produced, the Goethe, also known as Roger's. According to European *Vitis* Database, 2002, this is a rose variety from USA, which can also be found in many countries, e.g. Brazil, China, Germany, France, India and Italy. However, this variety is used only in Brazil to elaborate the rose grape juice with a wonderful aroma and taste.

As already related in other studies, white and purple grape juices are a source of antioxidants, especially because they are rich in phenolic compounds such as catechin and procyanidins, which have a well known antioxidant activity (Fuleki & Ricardo-da-Silva, 2003). Moreover, no study has been performed on rose grape juices chemical or phenolic compounds quantification and either on its antioxidant activity.

Thus, the purpose of this study was to evaluate the capacity of rose grape juice (RGJ) to scavenge DPPH[•] radical as well as its *in vivo* antioxidant activity, by using *Saccharomyces cerevisiae* yeast cells exposed to the stressing agents, hydrogen peroxide and terc-butil hidroperoxide (t-BOOH). Additionally, haemolysis capacity and lipid peroxidation inhibition of the juice were evaluated. Superoxide quenching and hydrogen peroxide degradation abilities in this

grape juice were also analyzed. This study was undertaken to extend the database on (+)-catechin, (-)-epicatechin, individual contents of procyanidins and vitamin C amount in juices produced from Goethe variety.

2. Experimental methods adopted

2.1. Samples

Rose grape juices produced from *Vitis labrusca*, variety Goethe, were gently donated by a regional winery. Juices were kept in a controlled temperature room and their expiry dates were observed. Grapes and juices were cultivated and produced in 2005.

2.2. Chemicals

DPPH[•], *trans*-resveratrol, (+)-catechin, (-)-epicatechin and procyanidin dimer B₃ were obtained from Sigma-Aldrich, (St. Louis, MO). Procyanidins B₁, B₂ and B₄ were generously provided by Dr. Regina Vanderlinde (Wine Brazilian Institute, Brazil) and all other chemicals were from E. Merck, Damstadt, Germany.

2.3. Chemical Analysis and Nutritional Evaluation of Grape Juices

Alcoholic grade, total acidity, volatile acidity, pH, total SO₂, reducing sugars, and ascorbic acid were determined using methods described by Zoecklein *et al.* (2000). All analyses were performed in duplicate. Carbohydrates, alimentary fiber, saturated fats, proteins, humidity and caloric value levels were evaluated according to official methodologies of analysis from AOAC International (2005).

2.4. Phenolic Compounds Determination

Total phenolic content was measured using Singleton and Rossi's modification of Folin-Ciocalteau colorimetric method (Singleton et al. 1999). High performance liquid chromatography (HPLC) analysis was used in order to quantify the presence of individual phenolic compounds. Before HPLC analysis, 5 mL of each sample were filtrated through a cellulose membrane with 0.20 mm diameter. The equipment used in the analysis consisted of chromatographic system of liquid gradient, LC-DAD Series 1100 (Palo Alto, CA), with a detector system of diode array (DAD). It was used pre-column Zorbax 300 SB C18 (12 mm × 4.6 mm × 5µm) and C18-ODS column (150 mm × 4mm × 5µm) (Agilent Technologies, USA).

2.5. Procyanidins analysis

In order to determinate procyanidins B₁, B₂, B₃ e B₄, (+)-catechin, (-)-epicatechin and gallic acid it was used a mobile phase with solvent A (ammonium hydroxide diphosphate 50 mMol.L⁻¹, pH 2.6), solvent B (20% of solvent A and 80% of acetonitril) and solvent C (orthophosphoric acid 0.2 Mol.L⁻¹, pH 1.5), in a constant flow of 0.5 mL.min⁻¹, in a controlled temperature room at 40 °C. The peak was detected in 204 nm and the amount of sample injected was 5 µL. The elution conditions were: 100% of solvent A for 5 min; 96% of solvent A and 4% of solvent B for 10 min; 92% of solvent A and 8% of solvent B for 10 min; 8% of solvent B and 92% of solvent C for 20 min; 30% of solvent B and 70% of solvent C for 5 min; 40% of solvent B and 60% of solvent C for 5 min; 80% of solvent B and 20% of solvent C for 5 min and, 100% of solvent A for 5 min (Lamuela-Raventós & Waterhouse, 1994).

2.6 Particle-induced X-ray emission (PIXE)

Metals quantified in grape were analyzed by means of PIXE method (Johansson et al., 1995). In this assay, 400 mL of RGJ were dried and transformed in tablets. PIXE analysis was carried out at 3MV Tandetron accelerator facility at Instituto de Física da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brazil. All measurements were performed using a 2 MeV proton beam with an average current of 5nA. The acquisition time for each sample was in the order of 10-20 min. The beam spot at the target position was about 9 mm². The filters containing grape juice, blank, and calibration targets were placed in a target holder, which accommodates up to 10 specimens. Each sample was positioned in the proton beam by means of an electric-mechanical system. The characteristic X-rays induced by proton beam were detected by a HPGe detector from EG&G (GLP series, EG&G Ortec, CA, USA), with an energy resolution of 180 eV at 5.9 keV. The detector was positioned at 45°C with respect to the beam axis. The electronics consisted of a Telenec 245 amplifier associated with a PCA3 multichannel analyzer (Oxford Instrument, TN, USA), running in a PC-compatible computer. GUPIX cod (Maxell et al., 1989) was used for data analysis.

2.7. *Chemical Measurement of DPPH[•] Radical-Scavenging Activity*

Scavenging of DPPH[•] radical was measured using a modified method described by Yamaguchi *et al.* (1998) in which grape juices solutions were added (in different concentrations of 0.1, 1, 10, 50 or 100% v/v). The tubes were stored in dark for 20 min, and after that, the absorbency was measured at 517 nm. The results were expressed as the amount of DPPH[•] radical reduced by antioxidants and the amount of juice necessary to scavenge 50% of DPPH radical (IC₅₀). Controls used distilled water in place of the antioxidant solutions.

2.8. Assay for free radical-mediated haemolysis

The radical scavenging activities of grape juices were also determined using haemolysis of human red blood cells mediated by water-soluble peroxy radical initiator 2-2'-azobis (2-amidinopropane) dihydrochloride (AAPH), according to the method described by Miki *et al.* 1987. The underlying principle is radical-mediated oxidation of lipids in cell membrane and thereby induction of haemolysis. In brief, the procedure was as follows: 250µL of preserved blood were centrifuged at $1,52 \times g$ for 20 min. After that, the plasma was discarded and the sediment was resuspended in 250 µl phosphate-buffered saline (PBS: 8g NaCl, 0.2 g KCl, 1.8 g Na₂HPO₄.2H₂O per litre, pH 7.4) and once again centrifuged as described above. This procedure was repeated once more, and then the sediment (erythrocyte) was suspended in PBS at a dilution of 1:10. In the test tube 1 mL of this suspension, 0.5mL of AAPH (0.2 M) in PBS solution and 0.250 mL of grape juice were incubated at 37°C for 2 h by gentle shaking in a rotary shaker. In the control, saline was added instead of juice. Thus, 2 mL of PBS solution were added and the diluted reaction mixture was centrifuged for 10 min at $1,52 \times g$. All measurements were performed in duplicate. The absorbance of the supernatant was determined at 540nm and the inhibition percentage was calculated using the following formula: Inhibition (%) = $A - A_1/A \times 100$, where A was the control absorbance (tube with water), and A1 was the test sample absorbance.

2.9. Lipid peroxidation assays using a pool sample serum

Lipid peroxidation was determined by using a modification of the method described elsewhere (Wills, 1966; Durak *et al.* 1999). One mL of pooled fresh human serum was incubated with 150µL of CuSO₄ (5mM; positive control) and 150µL of grape juice samples for 1 h at 37°C. After incubation, oxidative stress levels were measured spectrophotometrically by the concentration

of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS), as described by Wills et al, 1966. TBARS results were expressed as nMol.mL⁻¹.

2.10. Superoxide quenching and H₂O₂ degradation abilities

Superoxide quenching ability was spectrophotometrically determined in grape juice samples by measuring the inhibition of auto catalytic adrenochrome formation rate at 480 nm, in a reaction medium containing adrenaline 1 mMol.L-1 (pH 2.0) and glycine 50 mMol.L-1 (pH 10.2). This reaction was kept at 30 °C for 3 min (Mirsa & Fridovich, 1972). The assay of H₂O₂ degradation ability was performed according to the method described by Mahely & Chance, 1954. Its principle is based on the determination of hydrogen peroxide decomposition rate at 240 nm. This reaction was conducted in a constant temperature (30 °C) for 1 min. Superoxide quenching and H₂O₂ degradation abilities were expressed as nanomoles of substrate converted × min⁻¹ × milligram of protein⁻¹.

2.11. Total protein

Total protein levels were analyzed by Biureto method (Total Proteins Kit- Labtest Diagnostica S.A., Brazil), and determined spectrophotometrically at 545 nm.

2.12. Evaluation of Antioxidant Capacity Using Yeast Cells

Evaluation of *in vivo* antioxidant activity of both juices was performed using the yeast *S. cerevisiae* XV 185-14C (MAT α , *ade2-2, arg4-17, his1-7, lys1-1, trp5-48, hom3-10*). In order to determine the antioxidant capacity of grape juice, suspensions containing exponential phase cells (2 x 10⁷ cells/mL), juices (10, 25, 50% v/v) and stressing agent (hydrogen peroxide 75 mM) were incubated for 1 h at 28°C. After incubation, samples were diluted in 0.9 % (w/v) sodium chloride

solution, plated onto YPD, and incubated for 48 h at 28° C. After this time, colonies were counted and compared to the control plates, which were considered to represent 100 % of yeast cell survival.

2.13. Statistical Analyses

All assays were performed in triplicate. Statistic was done by means of analysis of variance (ANOVA) and Tukey test, using SPSS 12.0 package.

3. Results and Discussion

3.1 Chemical Analyses and nutritional evaluation

According to Brazilian rules, it can be affirmed that this grape juice is within the normal standard, once it showed all results bellow the limit; total and volatile acidities (0.492; 0.017, respectively), density (1.077), ethanol level (0.10) and pH (3.37).

In nutritional assays the values were expressed in 100g of juice. They showed 214 kJ of caloric level, carbohydrates 12.51%, protein 0.24, alimentary fiber 0.51%, humidity 86.49% and ashes 0.25%. Table 1.

When comparing the values found in rose grape juice with the others showed in another study, with white and purple juices (Dani et al. 2006), it can be noticed important differences, mainly in parameters as caloric value, carbohydrates and fiber. White and rose grape juices presented higher values than the purple one. This difference could be explained in accordance with the making process choice, the maturation grade, the variety and/or the cultivation year (Fuleki & Ricardo-da-Silva, 2003).

Table
1

3.1. Total phenolic content

Total phenolic compounds found in this study were 156.6 ± 57.15 mg catechin/mL of juice. Each specific content of phenolic compounds was: catechin (2.2 ppm), epicatechin (1.68 ppm), procyanidins B1 (4.22 ppm), B2 (1.95 ppm), B3 (2.14 ppm) and B4 (1.71 ppm).

As observed in the results described above, rose grape juice showed to be an important phenolic compounds source. The phenolic compounds found in this juice are also described in other studies; however, they used other varieties, as Concord or *Vitis viniferas* (Fuleki & Ricardo-da-Silva, 2003; Dávalos et al. 2005). Many factors could effect on the phenolic content, some examples are the grape juice making process and the ripening grade (Frankel *et al.* 1998; Fuleki & Ricardo-da-Silva, 2003).

According to the literature, the main compounds found in grape juices, mainly from *Vitis vinifera*, are (+)-catechin, (-)-epicatechin and the procyanidins dimmers, in this sequence (Frankel *et al.* 1998). When comparing our results with a Concord purple grape juice one, it was observed that the rose grape juice showed higher catechin values (Fuleki & Ricardo-da-Silva, 2003). On the other hand, tannins values were higher in purple ones. These differences in tannins values are due to the same factors described above. Rose grape juice results could be compared to those from the white one (evaluated in the other study, and produced from Niagara cultivar), once its activity is also attributed mainly to catechin and procyanidins contents, among other compounds and their associations (Fuleki & Ricardo-da-Silva, 2003).

3.4. Mineral Composition Analysis by PIXE

Fifteen metals in rose grape juice were identified. Most metals contained in this juice were potassium (290.9 ppm), calcium (97.7 ppm), magnesium (96.5 ppm) and iron (65.8 ppm). Other

metals were found, but in lower levels (< 10 ppm), phosphorus, chloride, sulfur, copper, zinc and manganese. The metal compound difference between different grape juices could be attributed to grape variety, maturation level, weather and other aspects as the process used to produce the grape juice (Angelova *et al.*, 1999).

3.3. Scavenging of DPPH[•] Radical

The chemical assay showed that RGJ (100, 50 and 10% v/v) significantly reduced the level of DPPH[•] radical (data not show). The result for IC₅₀ found in this sample was 14%.

When comparing IC 50 in this sample with the one from other study, which used purple and white juices (Dani *et al.* 2006), the results showed that there is a significant difference in the need to scavenge 50% of DPPH radical. In this sense, purple grape juice showed a higher value (14.5). The antioxidant activity expressed in % DPPH radical scavenger or in IC₅₀, showed a significant correlation ($r=1.000$; $p<0.01$) with (+)-catechin and (-)-epicatechin amounts, proving the already known antioxidant activity of tannins (Ferguson, 2001). Besides, rose grape juice showed important *in vitro* antioxidant activity and amount of phenolic compounds, proving the activity of these last ones.

3.4. Assay for free radical-mediated haemolysis and lipid peroxidation using a pool sample serum

This juice was capable to inhibit 45% of the haemolysis caused by AAPH radical, when compared with the positive control.

RGJ was capable to inhibit the lipid peroxidation caused by CuSO₄. When using only CuSO₄, the lipid peroxidation levels increased to 4.9 nmols.mL⁻¹; however, by adding rose grape juice, the levels decreased to 3.9 nmols.mL⁻¹, protecting about 20% of lipid peroxidation (Figure 1).

The antioxidant activity of RGJ could be also proved through other assays performed in this study, as haemolysis inhibition and lipid peroxidation. According to Frankel *et al.* (1998), both white and purple grape juices showed a lipid peroxidation inhibition activity, by means of TBARS *ex vivo* assay, being related to phenolic compounds. In this sense, phenolic compounds could also be responsible for this activity showed in our study.

Although there has been already reported the antioxidant activity in Concord purple grape juice, related to commercial grape juices that are capable to inhibit *in vitro* human low-density lipoproteins oxidation (Frankel *et al.* 1998), there is nothing in the literature concerning to antioxidant activity in rose grape juice. This last author showed that the antioxidant activity of Concord grape juices seems to be associated with the levels of anthocyanins, whereas in white grape juice samples the antioxidant activity was related to flavan-3-ols (catechin) levels. Therefore, rose grape juice in this study was capable of protecting the yeast cells from the damage induced by hydrogen peroxide. This activity showed an excellent correlation ($r=1.000$) with catechins compounds ((+)-catechin and (-)-epicatechin), but there was not observed a correlation with procyanidins contents.

By analyzing the results obtained in this study, it's possible to include the rose grape juice, as a good food supplement to the antioxidant needs, which could be able to reduce lipid peroxidation levels and inhibit the erythrocyte haemolysis. If comparing our results with those from the other study, where white grape juice inhibited copper-induced LDL oxidation by 70-75%, and Concord grape juices by 64-70% (Frankel *et al.* 1998), we can say that rose grape juice, from Goethe variety, showed the lowest protection in cooper-induced LDL oxidation.

3.5. Superoxide quenching and H₂O₂ degradation abilities

The results for RGJ superoxide quenching and H₂O₂ degradation abilities were 1.26±0.08 ΔA (min ×mg prot)⁻¹ and 1.35±0.68 (min × mg prot)⁻¹, respectively.

3.6. Evaluation of Antioxidant Capacity Using Yeast Cells

Noncytotoxic concentrations (10%, 25% and 50% v/v) of rose grape juice were chosen for this test. Rose grape juice was able to inhibit damages provoked by the stressing agent, hydrogen peroxide, in all concentrations. According to the results obtained in this study, the highest antioxidant activity was found in the highest grape juice concentration. Thus, the highest concentration of juice (50%) showed the highest antioxidant activity (97.0±3.0). However, no statistic difference was observed in 25% (90.0±10.0), therefore these two concentrations were better than the 10% (81.7±3.75) (Figure 2).

Figure 2

Although antioxidant activity in Concord purple grape juice has been already related in other study, which can be possibly compared with purple wine antioxidant activity (Frankel *et al.* 1998), nothing is known about antioxidant activity in rose grape juice. In this study, RGJ was more able to protect the yeast cells from damages induced by hydrogen peroxide than PGJ (Dani *et al* 2006). This turns this juice out to be a promising antioxidant agent for the prevention of many diseases (Fuleki & Ricardo-da-Silva, 2003). This activity showed an excellent correlation ($r=1,000$) with catechin compounds ((+)-catechin and (-)-epicatechin), but there was not a correlation with procyanidins contents.

However more studies are needed, these results showed an important antioxidant activity of rose grape juice, for all assays: *in vitro*, *in vivo* and *ex-vivo*. In spite of in other studies with wine only the purple showed antioxidant activity, in this study, rose grape juice showed an important

activity against free radicals (Mahely & Chance, 1954; Park *et al.* 2003; Dávalos *et al.*, 2005). These data are very useful because this juice could be an important component in adults and children diet. Besides, the cultivar used is important and traditional in South Brazil (northeast), once it was one of the first cultivated in this region. Therefore, our findings reported that rose grape juice could be considered as a potentially active compound to be used in conditions where reactive oxygen species are implicated, protecting against important diseases, such as arterioscleroses, Parkinson, cancer and others.

Acknowledgment

We thank Universidade de Caxias do Sul (Caxias do Sul, Rio Grande do Sul, Brazil), Brazilian National Research Council (CAPES) and Brazilian Institute of Wine (IBRAVIN) for helping and financing us throughout this research.

References

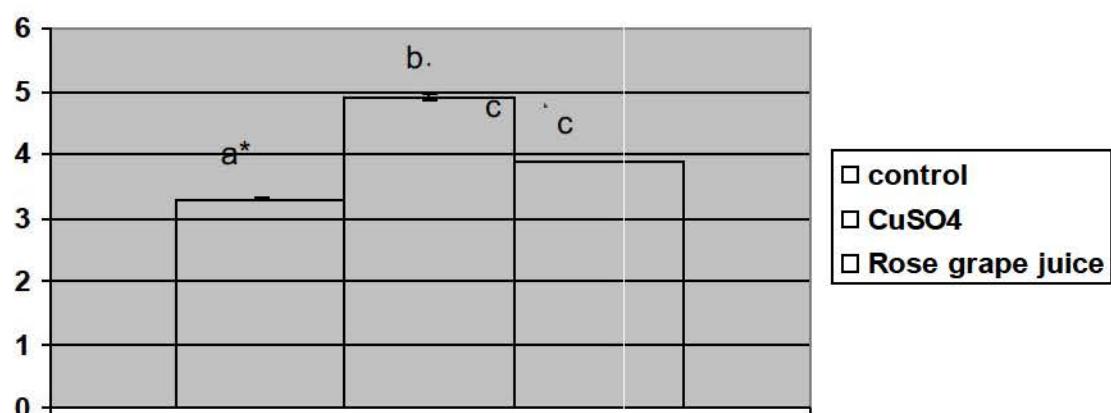
- AOAC, 18th edition of official methods of analysis, 2005.
- Angelova VR, Ivanov AS, Braikov DM (1999) Heavy metals (Pb, Cu, Zn and Cd) in the system soil – gravevine – grape. *J. Sci. Food Agric.*, **79** (5), 713-721.
- Cadastro Vitivinicola - IBRAVIN
- Dávalos A, Bartolomé B, Gómez-Cordovés C (2005) Antioxidant properties of commercial grape juices and vinegars. *Food Chem.*, **93**, 325-30.
- Day AP, Kemp HJ, Bolton C, Hartog M, Stansbie D (1997) Effect of concentrated red grape juice consumption on serum antioxidant capacity and low-density lipoprotein oxidation. *Ann. Nutr. Metab.*, **41**, 353-357.
- Durak I, Avci A, Kaçmaz M, Büyükköçak S, Burak Çimen MY, Elgün S, Öztürk S (1999) Comparison of antioxidant potentials of red wine, white wine, grape juice and alcohol. *Cur. Med. Res. and opinion.*, **15**, 316-20.
- Ferguson, L. R.(2001) Role of plant polyphenols in genomic stability. *Mut. Res.*, **475**, 89-111.
- Frankel EN, Bosanek CA, Meyer AS, Silliman K, Kirk LL (1998) Commercial Grape Juices inhibit the in vitro oxidation of human low-density lipoproteins. *J. Agric. Food Chem.*, **46**, 834-8.
- Fuleki T, Ricardo-da-Silva JM (2003) Effects of cultivar and processing method on the contents of catechins and procyanidins in grape juice. *J. Agric. Food Chem.*, **51**, 640-646.
- Lamuela-Raventós RM, Waterhouse A (1994) A direct HPLC separation if wine phenolic. *Am. J. Enol. Viti.*, **45**, 1-5.
- Mahely, AC, Chance B (1954) The assay of catalases and peroxidases. *Methods Biochem. Anal.*, **1**, 357-424.

- Miki M, Tamai H, Mino M, Yamamoto Y, Niki E (1987) Free-radical chain oxidation of rat red blood cells by molecular oxygen and its inhibition by a α -tocopherol. *Arch. Biochem. Biophys.* **186**, 343-55.
- Misra HP & Fridovich I (1972) The generation of superoxide radical during the autoxidation of hemoglobin. *J. Biol. Chem.* **247**, 6960-72.
- Park YK, Park E, Kim J, Kang M (2003) Daily grape juice consumption reduces oxidative DNA damage and plasma free radical levels in healthy Koreans. *Mutation Research.* **529**; 77-86.
- Singleton VL, Orthofer R, Lamuela-Raventós RM (1999) Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteau reagent. In *Methods in enzymology, oxidant and antitoxidantss (Part A)*; Packer, L., Ed; Academic Press: San Diego, CA. **299**, 159-178.
- Wills ED (1966) Mechanism of lipid peroxide formation in animal tissues. *Biochem J.* **99**, 667-76.
- Yamaguchi T, Takamura H, Matoba TC, Terão J (1998) HPLC method for evaluation of the free radical-scavenging activity of foods by using 1,1 diphenyl-2 picrylhydrazyl. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **62(6)**, 1201-1204.
- Zoecklein BW, Fugelsang, KC, Gump BH, Nury FS (2000) Wine analysis and production. *Aspen Publishers*; Maryland, Australia. 2000.

Table 1. Major characteristics of rose grape juice

| | |
|---------------------------------------|--------|
| Total acidity (g/100 mL) | 0.497 |
| Volatile acidity (g/100 mL) | 0.018 |
| Ethylic alcohol (% v/v) | 0.10 |
| Relative density 20/20° C | 1.0770 |
| pH | 3.37 |
| Ascorbic acid (mg/L of ascorbic acid) | 48.4 |
| Carbohydrates (%) | 12.51 |
| Proteins (g) | 0.24 |
| Alimentary fiber (g) | 0.51 |
| Humity (g) | 86.48 |
| Ash (g) | 0.25 |

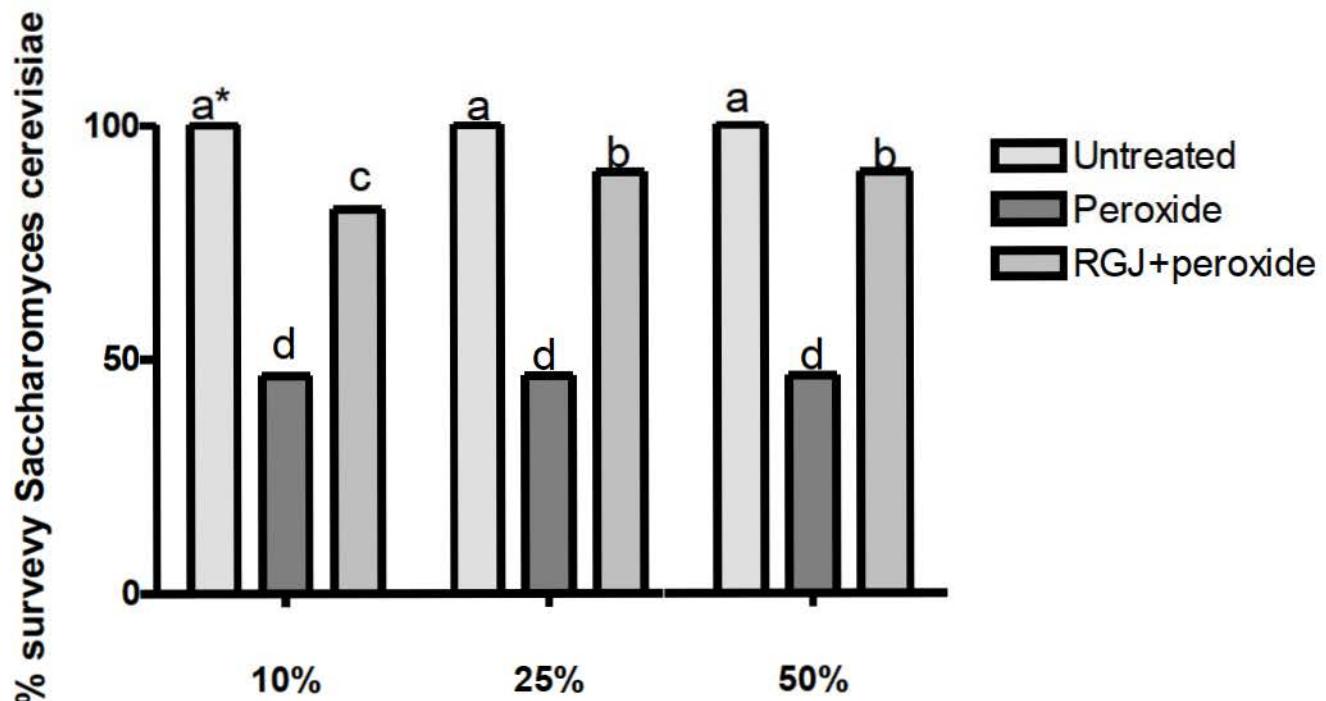
Figure 1. Peroxidation level (nMol MDA.mL^{-1}) induced in serum pool by CuSO_4 and RGJ inhibition.



*Different letters correspond to mean values statistically different by analysis of variance (ANOVA) and Tukey pos-test, for $p<0.01$.

Figure 2. Survival of *Saccharomyces cerevisiae* strains treated and untreated with rose grape juice and/or the stressing agent hydrogen peroxide.

* Different letters correspond to mean values statistically different by analysis of Variance



(ANOVA) and Tukey posttest, for $p \leq 0.05$.

5. DISCUSSÃO GERAL

Os sucos de uva são ricos em flavonóides (principalmente catequinas, epicatequinas, antocianidinas) e vitamina C, sendo, portanto, potencialmente, capazes de minimizar os efeitos causados pelas espécies reativas de oxigênio (Wang, 1996). Este produto é de fundamental importância para a região nordeste do estado do Rio Grande do Sul, a qual é a maior produtora do país. No ano de 2004 foram comercializados 404.591 milhões de litros de vinhos, sucos e derivados no Brasil, sendo 4.520 milhões de litros de suco de uva natural, 17.864 milhões de quilos de suco concentrado e 1.686 milhões de suco de uva adoçado (Cadastro Vinícola, IBRAVIN, 2005).

De modo geral, pode-se obter sucos de uva brancos, tintos e rosados com características nutricionais e composições fenólicas distintas, porém muito pouco estudadas. Além das diferentes variedades que podem ser utilizadas, o mercado atual conta com outras classes de sucos, os convencionais e os orgânicos, sendo os últimos produzidos sem a presença de fitodefensivos ou engenharia genética. Existem alguns trabalhos na literatura que estudaram diferenças, seja na composição nutricional ou fenólica, entre algumas frutas (morango, pêssego e ameixa) conduzidas no método tradicional e orgânico (Asami *et al.*, 2003; Lombardi-Boccia *et al.*, 2004). Entretanto, nestes trabalhos, não há um consenso de qual seria o melhor, como também não se sabia o quanto o manejo da videira poderia influenciar na composição do produto final, no nosso estudo o suco de uva.

Em nosso estudo os sucos tintos apresentaram, em geral, maior conteúdo fenólico (principalmente taninos) do que os brancos e o rosado. Quanto à diferença entre sucos orgânicos e convencionais, os sucos orgânicos incorporaram maior nível de compostos fenólicos, resveratrol, catequinas e antocianidinas. Este fato pode ser explicado pois os compostos fenólicos são metabólitos secundários da planta, produzidos em situação de estresse, que no caso da videira orgânica é gerado pois ela não recebe proteção dos fitodefensivos, ou outros agentes (Soleas, 1997).

O método de elaboração dos sucos também apresenta diferenciações, principalmente na produção de sucos brancos e tintos, onde geralmente os primeiros são produzidos no método a frio e os outros na metodologia a quente, ou seja, se aquece o suco em contato com a casca e semente, fato este que pode ser considerado responsável pela maior incorporação de compostos fenólicos e demais composto (Fuleki & Ricardo-da-Silva, 2003). Em nosso trabalho os sucos elaborados em escala piloto, ou seja, aquecimento para tintos e a frio para os brancos, apresentaram diferenças em alguns parâmetros nutricionais, como carboidratos e valor calórico. Esta afirmação pode vir a

contribuir para a escolha do melhor processo de produção de sucos, para a maior incorporação de compostos nutricionais importantes.

Os dados acerca da capacidade antioxidante e/ou mutagênica de suco de uva são poucos e contraditórios (Patrinelli et al., 1996^a; 1996^b). Em nosso trabalho os sucos se mostraram excelentes fontes antioxidante, sejam através de testes *in vitro* ou *in vivo*. Nos testes *in vitro* os sucos tintos, principalmente os orgânicos, apresentaram melhores valores, mostrando correlações positivas com o conteúdo fenólico total, resveratrol, catequinas (Ferguson, 2000). Conforme afirmado por Franke et al., 2004, no presente trabalho observou-se uma correlação negativa da atividade antioxidante com a quantidade de açúcar. Esta atividade foi comprovada por diversos testes, entre eles a capacidade de varredura do radical DPPH, neste teste os sucos tintos, destacando-se tinto orgânico comercial como o melhor. Sanchez-Moreno *et al.* mostraram por meio deste mesmo teste, DPPH, que vinhos e sucos tintos apresentam atividade antioxidante superior a dos produtos brancos.

Entretanto, o teste inibição de hemólise, utilizando como indutor de hemólise o agente estressor o AAPH, com exceção do suco niágara orgânico comercial os demais sucos apresentaram uma excelente atividade antioxidante, conseguindo inibir em 100% a atividade hemolítica dos eritrócitos induzida pelo AAPH. Este método já foi validado por outros trabalhos nos quais foram considerados excelentes antioxidante compostos que possuíam esta atividade inibitória, como por exemplo, o extrato aquoso de *Bidens pilosa* e alguns flavonóides isolados (Abajo et al., 2004; Edenharder & Grünhage, 2003).

Somente o suco niágara convencional escala piloto não apresentou capacidade de inibir a peroxidação lipídica induzida pelo reconhecido agente estressor, sulfato de cobre. Os demais sucos apresentaram excelente inibição da peroxidação lipídica. Se considerados somente os sucos tintos esta atividade antioxidante pode ser atribuída aos compostos fenólicos e das procianidinas. Estudos mostraram que o consumo de sucos de frutas e vinho é capaz de reduzir peroxidação lipídica através do teste TBARS, mostrando assim a atividade apresentada neste trabalho (Fuhrman et al., 1995).

As habilidades de seqüestrar superóxido e degradar peróxido de hidrogênio também foram dosadas nos sucos e observou-se que em geral os sucos tintos apresentaram os menores valores. Este fato em parte pode ser explicado pois estes também são os mais ricos em polifenóis e em estudo realizado observou-se que extratos ricos em polifenóis preservam atividade de enzimas antioxidantes devido a sua atividade seqüestradora de radicais livres e/ou indução de defesa de expressão das enzimas (Chidambara Murthy et al., 2002b).

Nos testes *in vivo*, os sucos brancos apresentaram atividade protetora aos danos gerados pelo peróxido de hidrogênio, entretanto entre os sucos tintos, os orgânicos mostraram valores melhores quanto a proteção, atividade que apresentou correlação positiva com o conteúdo do não-flavonóide, resveratrol. Outro estudo já relatou a capacidade do resveratrol em inibir peroxidação lipídica e principalmente antioxidante (Vinson, 1995).

Apesar dos brancos e do rosado apresentarem os menores valores polifenóis, foram como citados acima os melhores quanto a proteção aos danos gerados pelo peróxido de hidrogênio e do terc-butil. Esta afirmação pode em parte ser explicada, pois segundo Soleas *et al.* (1997) o conteúdo fenólico não é o único fator que influencia na atividade antioxidante de derivados da uva, existem outros compostos bioativos como vitaminas e minerais (selênio), bem como o sinergismo entre eles pode também estar relacionado com a atividade protetora aos danos gerados pelas ROS.

As diferenças apresentadas nos efeitos antioxidantes observados em modelos *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo* (utilizando a levedura eucariótica *S. cerevisiae*), poderia ser atribuída ao metabolismo dos polifenóis. Diferença esta já apresentada em estudos os quais mostraram que os efeitos antioxidantes *in vivo* dos polifenóis dependem de sua ingestão e da sua biodisponibilidade (Vinson *et al.*, 2004). Segundo Manach *et al.* (2004), a biodisponibilidade dos polifenóis pode ser influenciada pela estrutura dos compostos, absorção, interação com outros compostos e metabolismo. A partir dos resultados discutidos acima, estudos adicionais investigando os efeitos dos sucos de uva em animais são necessários, sendo assim o melhor entendimento de como eles protegem biomoléculas contra dano oxidativo é um objetivo para estudos futuros.

No entanto, as frutas, assim como a uva, também podem causar mutagenicidade e toxicidade, uma vez que a presença de pesticidas e/ou alguns compostos químicos podem apresentar efeitos adversos, podendo atuar na proliferação de tumores (Ames *et al.*, 1997). Além disso, antioxidantes presentes na frutas podem vir a sofrer auto-oxidação e gerar substâncias reativas pró-oxidantes dependendo das condições celulares (Halliwell & Gutteridge, 2000).

Os sucos neste trabalho, em concentrações maiores (50 e 25 %), apresentaram uma fraca atividade antimutagênica, a qual pode ser atribuída em parte ao conteúdo de polifenóis totais, vitaminas, ou até mesmo a combinação destes fatores. Entretanto, na concentração de 10% a maioria dos sucos apresentou atividade antimutagênica importante, sendo capazes de reverter mutações geradas pelo agente reconhecidamente mutante, o peróxido de hidrogênio.

A atividade antimutagênica apresentou correlação positiva com o conteúdo fenólico na maioria dos sucos, sendo que nos tintos esta atividade foi principalmente correlacionada ao conteúdo de

resveratrol. A atividade antimutagênica de polifenóis, sejam flavonóides ou não-flavonóides já foi relatada pela literatura, o que leva a população a busca de dietas ricas nos mesmos (Ferguson, 2003; Jandet *et al.*, 1995; Bub *et al.*, 2003).

Apesar de mais estudos serem necessários, é possível afirmar que o suco é uma excelente fonte nutricional, capaz de fornecer componentes nutricionais e/ou polifenólicos. Muitos são os projetos desenvolvidos em nossa região para a incorporação do suco de uva na merenda escolar de escolas estudais e municipais, apesar de mais estudos serem necessários, através deste trabalho pode se afirmar que o suco de uva é um alimento rico em diversos compostos e que se ingerido desde a infância terá grande importância na melhoria da qualidade de vida. Este melhoria é conquistada pelo fato do suco ter se mostrado um excelente antioxidante, capaz de reduzir os danos gerados pelo estresse oxidativo, reduzindo assim doenças importantes como o câncer, doenças neurológicas, entre outras.

6. CONCLUSÕES

Este estudo teve como objetivo avaliar a capacidade antioxidante, mutagênica/antimutagênica de sucos de uva tintos, brancos e rosado. Os sucos brancos e tintos (variedades Niágara e Bordo, respectivamente), produzidos em escala piloto ou adquiridos comercialmente, foram elaborados a partir de uvas provenientes de manejo orgânico ou convencional. O suco rosado, proveniente de *Vitis labrusca* (variedade Goethe) foi adquirido comercialmente. Os resultados obtidos permitem concluir que:

- a) Os sucos de uva tintos apresentaram o maior teor de compostos fenólicos totais, resveratrol, catequina, epicatequina, procianidinas e antocianidinas em relação aos sucos brancos e rosado.
- b) Os sucos orgânicos, tanto brancos quanto tintos, mostraram maior conteúdo de compostos fenólicos totais do que os produzidos através do manejo convencional.
- c) O suco bordo orgânico produzido em escala piloto apresentou a maior atividade antioxidante *in vitro*, a qual apresentou correlação positiva com o conteúdo de polifenóis total, procianidinas B1 e B3 e com catequina.
- d) Os sucos de uva brancos apresentaram maior atividade antioxidante *in vivo* do que os tintos e o rosado. Entre os sucos tintos, os orgânicos mostraram-se mais efetivos do que os produzidos a partir de manejo convencional. Observou-se uma correlação positiva entre o conteúdo de resveratrol e a atividade antioxidante *in vivo* dos sucos tintos.
- e) Todos os sucos estudados apresentaram capacidade de inibir a hemólise induzida pelo radical AAPH, e, com exceção do niágara orgânico comercial, os sucos inibiram, também, a peroxidação lipídica sérica induzida por sulfato de cobre.
- f) O suco niágara comercial convencional apresentou a maior capacidade de seqüestrar o ânion superóxido e o suco niágara convencional produzido em escala piloto, a maior habilidade em degradar peróxido de hidrogênio.
- g) Os sucos estudados mostraram-se fracamente mutagênicos na linhagem *S. cerevisiae* 185-14c, sendo que a atividade mutagênica foi dependente da concentração de suco utilizada e do tipo de mutação avaliada.
- h) Todos os sucos apresentaram importante atividade antimutagênica em células da levedura *S.cerevisiae* tratadas com peróxido de hidrogênio.

7. PERSPECTIVAS

Neste trabalho observou-se que os sucos são fontes de substâncias antioxidantes, atividade esta comprovada por testes *in vitro* e *in vivo*. Sendo assim, através dos itens citados abaixo buscaremos o melhor entendimento da atividade protetora dos sucos de uva:

- ✓ Modulação genética/molecular de polifenóis isolados em *S. cerevisiae*;
- ✓ Estudo dos mecanismos moleculares dos polifenóis e sua ação contra a geração de estresse oxidativo por metais pesados em diferentes modelos celulares;
- ✓ Modulação/inibição de genotoxicidade em ratos tratados com sucos tintos orgânicos e convencionais;
- ✓ Avaliação do nível de estresse oxidativo em ratos tratados com sucos tintos orgânicos e convencionais;
- ✓ Dosagem de marcadores neurológicos (GFAP, S100 β , óxido nítrico, GDNF, NOS neuronal, entre outros) em cérebro e soro de ratos tratados com sucos tintos orgânicos e convencionais;

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abajo, C; Boffill, M.A.; del Campo, J.; Alexandra Mendez, M.; Gonzalez, Y.; Mitjans, M.; Pilar Vinardell, M (2004).In vitro study of the antioxidant and immunomodulatory activity of aqueous infusion of Bidens pilosa. **Journal Ethnopharmacology.** 93(2-3):319-23.
- Ames, B.N.; Shigenaga, M.K.; Hagen, T.M. (1993) Oxidants, antioxidants and the degenerative disease of aging. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.**90: 7915-7922.
- Aruoma, O.I. (1994). Nutrition and health aspects of the radicals and antioxidants. **Food and Chemical Toxicology.** 32(7): 671-683.
- Asami, D. K.; Hong, Y.; Barret, D. M.; 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. **Journal of Agriculture and Food Chemistry.** 51: 1237-1241.
- Atkin, A.L.; Riazi, M.A.; Greer, C.L.; Roy, K.L.; Bell, J.B. (1993) The functional analysis of nonsense suppressors derived from in vitro engineered *Saccharomyces cerevisiae* tRNA (Trp) genes. **Genes.** 134: 57-65.
- Barata Soares, A. D.; Gomez, M.L.P.A.; De Mesquita, C.; Lajolo, F.M (2004). Ascorbic acid biosynthesis: a precursor study on plants. **Brazilian Journal of Plant Physiological.** 16, 147-154.
- Bastos, V.L.F.C.; Cunha, J.C.B.; Lima, J.S.(1991) Brain acetylcholinesterase as in vitro detector of organophosphorus and carbamate insecticides in water. **Water Research.** 25(7): 835-840
- Beckman, K.B. & Ames, B. N. (1998) The free theory of aging matures. **Physiological Reviews.** 78(2): 547-581.
- Brand-Williams, W.; Cuvelier, M.E.; Berset, C. (1995). Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. **Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie.** 28: 25-30.
- Babior, B.M. (1997) Superoxide: a two-edged sword. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research.** 30(2): 141-155.

- Borella, M.L.L.; Varela, Q.D. (2001). Antioxidantes enzimáticos. In: .Salvador, M & Henriques, J.A. (Ed) **Radicais Livres e a Resposta Celular ao Estresse Oxidativo**. Canoas, ULBRA. 1: 35-49.
- Boulton, R.B.; Singleton, V. L.; Bisson, L.F. & Kunkee, R.E. (1995). **Principles and practices of winemaking**. New York: International Thomson Publishing. 603p.
- Bowers, J.E.; Bandman, E.B.; Meredith, C.P. (1993). DNA fingerprint characterization of some wine grape cultivars. **Am. J. Enol. Vitic.** 44: 266-274.
- Brennan, R.J. & SchiestK, R.H (1998). Free radicals generated in yeast by the Salmonella test negative carcinogens benzenes, urethane, thiourea and auramine O. **Mutation Research**. 403, 65-73.
- Brozmanová, J.;Dudás, A.; Henriques, J.A.P.(2001) Repair of oxidative DNA damage an important factor reducing cancer risk. **Neoplasma**, 48: 85-93
- Bub, A.; Watzl, B.; Blockhaus, M.; Biriva, K.; Liegibel, U.; Muller, H.; Pool-Zobel, B.L.; Rechkemmer, G (2004). Fruit juice consumption modulates antioxidant status, immune status and DNA damage. **Journal of Nutritional Biochemistry**. 14, 90-98
- CADASTRO VÍNICOLA (2004). Bento Gonçalves,RS, IBRAVIN.
- Cadete, J.; Delatour, T.;Douki, T.; Gasparutto, D.; Pouget J.P.; Ravanat, J.L.; Sauvaigo, S. (1999) Hydroxyl radical and DNA base damage. **Mutation Research**. 424: 9-21.
- Chidambara- Murthy, K.N.C.; Singh, R.P.; Jayaprakasha, G.K. (2002). Antioxidant activities of grape (*Vitis vinifera*) pomace extracts. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**. 50(21): 5909-5914.
- Cheynier, J.; Derfler, B.; Maskati, A.; Samson, L. (1990). Cloning a eukariotic DNA glycosylase repair gene by the supression of a DNA repair defect in *Escherichia coli*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**. 86 (20): 7961-7965.

- Clemens, M.R.; Ruess, M.; Bursa, Z.; Walter, H.D.(1987) The relationship between lipid composition of red blood cells and their susceptibility to lipid peroxidation. **Free Radical research communication.** 3: 265-271.
- Cortell, J.M.; Halbleib, M.; Gallagher, A.V.; Righetti, T.L.; Kennedy, J.A.(2005) Influence of vine vigor on grape (*Vitis vinifera* L.Cv. Pinot Noir) and wine proanthocyanidins. **Journal of Agriculture and Food Chemistry.** 53(14), 5798-808.
- Costa, V. & Ferreira, P.M. (2001) Oxidative stress and signal transduction in *Saccharomyces cerevisiae*: insights into aging, apoptosis and diseases. **Molecular Aspects of Medicine.** 22: 217-246.
- Day, A. P.; Kemp, H. J.; Bolton, C.; Hartog, M.; Stansbie, D. (1997). Effect of concentrated red grape juice consumption on serum antioxidant capacity and low-density lipoprotein oxidation. **Annals of Nutrition & Metabolism.** 41: 353-357
- Dearfield, K.L., Cimino, M.C., McCarroll, N.E., Mauer, I., Valcovic, L.R (2002). Genotoxicity risk assessment: a proposed classification strategy. **Mutation Research,** 521: 121-135.
- De Flora, S.; Camoirano, A.; D'Agostini, F.; Balansky, R.(1992) Modulation of the mutagenic response in prokaryotes. **Mutation Research.** 267 (2), 183-92.
- De Flora, S.; Izzoti, A., D'Agostini, F.; Balansky, R.M.; Noonan, D.; Albini, A. Multiple points of intervention in the prevention of cancer and other mutation related diseases. **Mutation Research.** 480-481, 9-22.
- Dizdaroglu, M. (2000) Oxidative DNA damage: Mechanisms of product formation and repair by base-excision pathway. In: Yoshikawa, T; Toyokuni, S.; Yamamoto, Y.; Naito, Y. (eds.) **Free radicals in chemistry, biological and medicine.** London: OICA, 518p.
- Edenharder, R. & Grunhage, D (2003). Free Radical scavenging abilities of flavonoids as mechanism of protection against mutagenicity induced by ter-butyl hydroperoxide or cumene hydroperoxide in *Salmonella typhimurium* TA102. **Mutation Research.** 540(1), 1-18.
- Ferguson, L.R. (2001) Role of plant polyphenols in genomic stability. **Mutation Research.** 475: 89-111.

- Flanzy, C. (2003). Enología: **Fundamentos científicos y tecnológicos**. 2 ed. Madrid: AMV Ediciones & Mundo- Prensa, 797p.
- Freedman, J.E.; Parker III, C.; Li, L.; Perlman, J.A.; Frei, B.; Ivanov, V.; Deak, L.D.; Iafrati, M. D.; Folts, J. D.(2001) Select Flavonoids and whole juice from purple grapes inhibit platelet function and enhance nitric oxide release. **Circulation**. 103: 2792-2798.
- Fridovich, I. (1998) Oxygen toxicity: a radical explanation. **The Journal of Experimental Biology**. 201: 1203-1209.
- Fuleki T, Ricardo-da-Silva JM (2003) Effects of cultivar and processing method on the contents of catechins and procyanidins in grape juice. **J. Agric. Food Chem.** **51**, 640-646.
- Fuhrman, B.; Lavy, A.; Aviram, M.(1995) Consumption of red wine with meals reduces the susceptibility of human plasma and low-density lipoprotein to lipid peroxidation. **American Journal of Clinical Nutrition**. 61(3), 594-54.
- Garcez, M.; Bordin, D.; Peres, W.; Salvador, M. (2001). Radicais livres e espécies reativas. In: . Salvador, M & Henriques, J.A. (Ed) **Radicais Livres e a Resposta Celular ao Estresse Oxidativo**. Canoas, ULBRA. 1: 35-49.
- Giannessi, P. & Matta, M.(1987) **Trattato di scienza e tecnica enologica: analisi e controllo dei mosti e dei vini**. Vol.1. Brescia: AEB. 349 p.
- Grinder- Pedersen, L.; Rasmussen, S.E.; Bugel, S.; Jorgensen, L.V.; Dragsted, L.O.; Gundersen, V.; Sandström, B. Effect of diets based on foods from conventional versus organic production on intake and excretion of flavonoids and markers of antioxidative defense in humans. (2003). **Journal of Agriculture and Food Chemistry**. 51, 5671-5676.
- Halliwell, B.& Gutteridge, J.M.C. (2000). **Free Radicals in Biology and Medicine** 3. ed. Clarendon, Oxford.
- Hauptmann, N. & Cadenas, E. (1997) The oxygen paradox: biochemistry of active oxygen.In: Scandalios, J.D. (ed.) **Oxidative stress and the molecular biology of antioxidants defenses**. New Youk: Cold Spring Harbor Laboratory Press. P 1-20.

- Henriques, J.A.P.; Dafré, A.L.; Picada, J.N.; Maris, A.F.; Salvador, M. (2001). Espécies restivas de oxigênio e avaliação de antioxidantes em sistemas biológicos. In: Serafini, L. A.; Barros, N. M.; Azevedo, J. L. (Ed) **Biotecnologia na Agricultura e na Agroindústria**. Guaíba, Agropecuária. 1: 227-252.
- Henriques, J.A.P.; Valsa, J.O.; Gomes, R. A (1987). Utilização de testes com microorganismos para detecção de atividades mutagênicas e/ou potencialmente oncogênicas. In: Pinto, S. O. C., **Genética Molecular de Microorganismos**, Manole, São Paulo.
- Hawthorne, D.C.; Leopold, U. (1974). **Current topics in microbiology and immunology**. Springer Verlag, Berlin.
- Herrmann, K(1976). Flavonols and flavones in food plants: a review. *J. Food Technol.* 11:433-448.
- Hollman, P.C.H.& Katan, M.B(1999). Dietary flavonoids: intake, health effects and bioavailability. *Food Chem. Toxicol.* 37: 937-942.
- Iland, P.; Ewart, A.; Sitters, J.; Markides, A. & Bruer, N. (2000). **Techniques for chemicals analysis and quality monitoring during winemaking**. Campbeltown: Patrick Iland Wine Promotions. 111p.
- Lee, D. H.; O'Connor, T.R.;Pfeifer, G.P. (1999) Oxidative DNA damage induced by cooper and hydrogen peroxide promotes CG-TT tandem mutations at methylated CpG dinucleotides in nucleotide excision repair-deficient cells. *Nucl.Acids Res.* 30, 3566-3573.
- Jeandet, P.; Bessis, R.; Maume, B. F.; Mennler, P.; Peyron, D.; Trollat, P (1995. Effect of enological practices on the resveratrol isomer content of wine. **Journal of Agriculture and Food Chemistry.** 43, 316-319.
- Lima, V.L.A.G.; Cunha Bastos, J. Cunha Bastos, V.L.F et al. (1996) Methyl parathion activation by a partially purified rat brain fraction. **Toxicoly Letters.** 87(1): 53-60.
- Lombardi-Boccia, G.; Lucarini, M.; Lanzi, S.; Aguzzi, A.; Capelloni, M. (2004) Nutrients and antioxidant molecules in yellow pluma (*Prunus domestica* L.) from conventional and organic productions: a comparative study. **J. Agric. Food Chem** 52, 90-94.
- Lopes, M. I.; Saffi, J.; Echeverrigaray, S.; Henriques, J.A.P.; Salvador, M. (2004) Mutagenic and antioxidant activities of *Croton lechleri* sap in biological system. **Journal of Ethnopharmacology.** 95: 437-445

- Manach C, Scalbert A, Morand C, Remesy C & Jimenez L (2004) Polyphenols: food sources and bioavailability. **Am J Clin Nutr** 79, 727-747.
- Mccgregor, J.T.; Casciano, D.; Muller, L. (2000) Strategies and testing methods for identifying mutagenic risks. **Mutation Research**. 455, 3-20.
- Maron, D.M. & Ames, B.N.(1983) Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. **Mutation Research**. 113: 173-215
- Mensor, L.L; Menezes, F.S.; Leitão, G.G.; Reis, A.S.; Dos Santos, T.C.; Coube, C.S.; Litão, S.G. (2001). Screening of brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. **Phytother. Res.** 15: 127-130.
- Meyer, C.R. & Leygue-Alba, N.M. (1991). **Manual de métodos analíticos enológicos**. Caxias do Sul: EDUCS. 45p.
- Middleton, J.E.;Kadaswami, C.; Theoharides, T.C.(2000) The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. **Pharmacological Reviews**. 52: 673-751.
- Mortelmans, K.& Zeiger, E.(2000) The Ames Salmonella/microsome mutagenicity assay. **Mutation Research**. 455: 185-216.
- Murthy, K.N.C.; Singh, R.P.; Jayaprakasha, G.K. (2002). Antioxidant activities of grape (*Vitis vinifera*) pomace extracts. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**. 50:5909-5914.
- Newaz, M.A.; Yousefipour, Z.; Nawal, N.N. (2005). Modulation of nitric oxide synthase activity in brain, liver and blood vessels of spontaneously hypertensive rats by ascorbic acid: protection from free radical injury. **Clinical Exp Hypertensive**. 27(6), 497-508.
- Oga, Z. (2003). **Fundamentos de toxicologia**. 2 ed. Editora: Atheneu, São Paulo, p.39-42
- Osman, H. E.; Maalej, N. M.; Shanmuganayagam, D.; Folts, J. D.(1998). Grape Juice but not orange or grapefruit juice inhibits platelet activity in dogs and monkeys (*Macaca fascicularis*). **Journal of Nutrition**. 128: 2307-2312.

- O'Byrne, D. J.; Devaraj, S.; Grundy, S. M.; Jialal, I. (2002). Comparison of the antioxidant effects of concord grape juice flavonoids α -tocopherol on markers of oxidative stress in healthy adults. **American Journal of Clinical Nutrition.** 76: 1367-1374.
- Park, Y. K.; Park, E.; Kim, J-S.; Kang, M-H. Daily grape juice consumption reduces oxidative DNA damage and plasma free radical levels in healthy Koreans. (2003) **Mutation Research.** 529: 77-86.
- Parry, E.M. & Parry, J.M. (1984) The assay of genotoxicity of chemicals using the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. In: Mutagenicity testing: A practical approach, Venitt, S.; Parry, S.M. (Eds.) **ORL Press**, Oxford, Washington DC.
- Patrineli, A.; Clifford, M. N.; Walker, R.; Ioannides, C.(1996a). Mutagenicity of white grape juice in the Ames Teste. **Food and Chemical Toxicology.** 34: 559-562
- Patrineli, A.; Clifford, M. N.; Ioannides, C.(1996b). Contribution of phenols, quinines and reactive oxygen species to the mutagenicity of white grape juice in the Ames Teste. **Food and Chemical Toxicology.** 34: 869-872.
- Peres, A.(1999) Efeitos dos alcalóides harmina, harmalina, harmol, harmalol, harmano sobre a resposta proliferativa in vitro de linfócitos periféricos humanos estimulados por fitoemaglutinina. **Dissertação de Mestrado, curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – Bioquímica, UFRGS.**
- Picada, J.A.; Maris A. F.; Ckless, K.; Salvador, M.; Shromov-Borisov, N.; Henriques, J. A. P.(2003) Diferencial muagenic, antimutagenic and cytotoxic responses induced by apomorphine and its oxidation product, 8-oxo-apomorphine-semiquinone, in bacteria and yeast. **Mutation Research.** 539: 29-41
- Poli, P., Buschini, A., Candi, A., Rossi, C.(1999) Bleomycin genotoxicity alteration by glutathione and cytochrome P-450 cellular content in respiratory proficient and deficient strains of *Saccharomyces cerevisiae*. **Mutagenesis,** 14: 233-238.
- Rabello-Gay, M.N.; Rodrigues, M.A.L.A.R.; Neto, R.M. (1991). Mutagênese Teratogênese e Carcinogênese: métodos e critérios de avaliação. **Sociedade Brasileira de Genética**, São Paulo.

- Raspor, P.; Plesnicar, S.; Gazdag, Z.; Pesti, M.; Miklavcic, M.; Lah, B.; Logar-Marinsek, R. & Poljsak, B. (2005). Prevention of intracellular oxidation in yeast: the role of vitamin E analogue, Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylkroman-2-carboxyl acid). **Cell Biol. Int.** 29 (1): 57-63.
- Ribéreau-Gayon, P.; Dubourdieu, D.; Donéche, B. & Lonvaud, A. (2003). **Tratado de Enología: microbiología del vino- vinificaciones.** Vol. 1. Buenos Aires: Editorial Hemisferio Sur. 636p.
- 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 Research.** 22(4): 375-383.
- Rizzon, L.A; Manfroi, V; Meneguzzo, J. (1998). **Elaboração de suco de uva na propriedade vitícola.** Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho. 21:7-21.
- Ross, J.A. & Kasum, C.M. (2002). Dietary flavonoids: bioavailability, metaboliceffects, and safety. **Annual Review of Nutrition.** 22: 19-34.
- Saffi, J. & Henriques, J.A.P. (2003) Reparação de DNA em células eucarióticas. **Genética Toxicológica.** Org.: Juliana da Silva, Bernardo Erdtmann, João Antonio Pegas Henriques. Porto Alegre: Alcance, 2003. 424p.
- Sánchez-Moreno, C.; Larrauri, J.A.; Saura-Calixto, F. (1999). Free radical scavenging capacity and inhibition of lipid oxidation of wines, grape juices and related polyphenolic constituents. **Food Research International.** 32, 407-412.
- Salvador, M. & Henriques, J.A.P. (2004) Radicais livres e espécies reativas. **Radicais livres e a resposta celular ao estresse oxidativo.** Org.: Mirian Salvador, João A.P. Henriques. Canoas: Ed. ULBRA, 2004. 204p.
- Sato, Y.; Kamo, S.; Rakahasi, T.; Suzuki, Y.(1995) Mechanism of free radical-induced hemolysis of human erythrocytes: hemolysis by a water-soluble radical initiator. **Biochemistry** 34: 8940-8949.
- Sies, H. (1997) Oxidative stress: oxidants and antioxidants. **Experimental Physiology.** 82: 291-295.

- Singletary, K. W.; Stansbury, M. J.; Giusti, M.; van Breemen, R. B.; Wallig, M.; Rimando, A. (2003) Inhibition of rat tumorigenesis by concord grape juice constituents. **J. Agric. Food Chem.** 51, 7280-7286.
- Smirnoff, N.; Conklin P. L.; Loewus F.A. (2001). Biosyntheses of ascorbic acid in plants: a renaissance. **Annu. Rev. Plant Physiol. Plant. Mol. Biol.** 52: 437-467.
- Soleas, G. J.; Diamandis, E. P.; Goldberg, D. M. (1997) Resveratrol: A molecule whose time has come? And gone?. **Clin. Biochem.** 30, 91-113.
- Spevak, W.; Hartig, A.; Meindl, P. & Ruis, H. (1986). Heme control region of the catalase T gene of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Molecular and General Genetics.** 203: 73-78.
- Terziyska, A., Waltschewa, L., Venkov, P.(2000) A new sensitive test based on east cells for studying environmental pollution. **Environmental Pollution**, 109: 43-52.
- Trueba, G.P. & Sánchez, M. (2001). Los flavonoides como antioxidantes naturales. **Acta Farmaceutica Bonaerense.** 20(4):297-306.
- Vinson, J.A.; Teufel, K.; Wu, N (2001). Red wine, dealcoholic wine, and especially grape juice, inhibit atherosclerosis in a hamster model. **Atherosclerosis.** 156, 67-72
- Vives-Corrons, J.L.; Miguel-Garcia, A.; Pujades, M.A.; Miguel-Sosa, A.; Cambiazzo, S.; Linares, M.; Dibarrarts, M.T.; Calvo, M.A.(1995). Increased susceptibility of microcytic red blood cells to in vitro oxidative stress. **European Journal of Haematology.** 55:327-331.
- Zimmermann, F.K. (1975) Procedures used in the induction of mitotic recombination and mutation in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Mutation Research.** 9: 19-21.
- Zimmermann, F.K.; Van Borstel, R.C.; Von Halle, E.S.; Parry, J.M.; Siebert, G.; Zetterberg, G.; Barale, R.; Loprieno, N. (1984). Testing chemicals for genetic activity weith *Saccharomyces cerevisiae*: a report the U.S. environmental protection agency genotox program mutation. **Mutation Research.** 133:199-24.
- Wang, H.; Cao, G.; Prior, R. L.(1996) Total antioxidant capacity of fruits. **J. Agric. Food Chem.** 1996, 44, 701-705.

- Wang, H.; Race, E.J.; Shrikhande, A.J. (2003). Characterization of anthocyanins in grape juices by ion trap liquid chromatography-mass spectrometry. **J. Agric. Food Chem.** 51, 1839-1844.
- Waters, M.D.; Stack, H.F.; Jackson, M.A. (1999). Genetics toxicology data in the evaluation of potential human environmental carcinogens. **Mutation Research**. 437, 21-49.
- Wills ED (1996). Mechanism of lipid peroxide formation in animal tissues. **Biochem. J.** 99, 76-667.
- Yoshino, M., Haneda, M., Naruse, M., Murakami, K. (1999). Prooxidant activity of flavonoids: copper-dependent strand breaks and the formation of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in DNA. **Mol Genet Metab.** 68(4): 468-72.