

Investigação da Atividade Citotóxica e da Composição Química por Espectrometria de Massa de Extratos Polares de *Cissus verticillata*

Investigation of Cytotoxic Activity and the Chemical Composition by Mass Spectrometry of Polar Extracts from *Cissus verticillata* Leave

Augusto César Santos Oliveira,^a  Iasmini Nicoli Galter,^a Suiany Vitorino Gervásio,^b Maria do Carmo Pimentel Batitucci,^b  Milene Praça Fontes,^a  Sílvia Tamie Matsumoto,^{a,b}  Hildegardo Seibert França^{*b,c} 

^a Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências Agrárias e Exatas, Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, CEP 29500-000, Alegre-ES, Brasil

^b Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências Humanas e Naturais, Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal, CEP 29075-910, Vitória-ES, Brasil

^c Instituto Federal do Espírito Santo, Campus Vila Velha, CEP 29106-010, Vila Velha-ES, Brasil

E-mail: hildegardo.franca@ifes.edu.br

Recebido: 25 de Agosto de 2023

Aceito: 11 de Abril de 2024

Publicado online: 16 de Abril de 2024

The use of medicinal plants by the population is increasingly common as a therapeutic tool for primary health care. *Cissus verticillata*, a plant popularly known as vegetable insulin, is used by the population as antiglycemic, anticonvulsant, antirheumatic agent, among others. The objective of this work was to evaluate the cytotoxic, genotoxic and antioxidant effect of aqueous and ethanolic extracts of *Cissus verticillata* leaves. Were evaluated the cell cycle and genetic alterations in *Allium cepa*, the cell viability in HTC cell culture, and the antioxidant activity by the DPPH method. The chemical analysis was performed by mass spectrometry FT-ICR MS. The extracts at the concentration of 2.5, 1.6, and 0.8 mg mL⁻¹ caused a decrease in the mitotic index without any change in the cell viability. The antioxidant activity was measured with EC50s of 364.65 µg mL⁻¹ and 982.51 µg mL⁻¹ for the aqueous and ethanolic extracts of *Cissus verticillata* leaves, respectively. FT-ICR MS results indicated the presence of sugars, flavonoids, and tannins. The aqueous extract showed the gallic tannin as the major compound, while the ethanolic extract showed the myricitrin dimer as the major compound. It was the first time that quercitrin was mentioned in *C. verticillata*. These findings have helped in the understanding of the activities of the plant and the collaboration for a safer use of the plant.

Keywords: Phytochemical screening; cytotoxicity; genotoxicity; MTT; DPPH.

1. Introdução

O uso de plantas medicinais pode ser uma ferramenta terapêutica para a atenção primária em saúde, no entanto, o uso indevido ou irracional dessas plantas pode acarretar riscos à saúde, como efeitos adversos, interações medicamentosas e toxicidade. Por isso, é fundamental que sejam realizadas pesquisas científicas sobre a eficácia e a segurança das plantas medicinais, especialmente na fase pré-clínica, antes de serem testadas em seres humanos.¹ Essas pesquisas incluem ensaios para avaliar o potencial citotóxico, genotóxico e mutagênico das plantas, ou seja, a capacidade de causar danos às células e ao DNA, respectivamente. Assim, esses ensaios permitem identificar possíveis efeitos das plantas e garantir a sua qualidade e segurança para o uso humano.^{2,3}

O estudo de citogenotoxicidade e mutagenicidade avaliada por meio de organismos modelos como o *Allium cepa* e cultura de células tem sido bastante utilizado para verificar desde poluição ambiental a citotoxicidade de plantas medicinais,^{4,5} sendo validado seu uso em estudos pelo Programa das Nações Unidas para o Meio Ambiente (PNUMA), pela Organização Mundial da Saúde (OMS) e Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (USEPA).⁶

O gênero *Cissus* pertence à família Vitaceae e é distribuída entre o México e a América do Sul, com 77 espécies registradas.⁷ A espécie *Cissus verticillata* (L.) Nicolson & CE Jarvis (syn = *Cissus sicyoides*) é tradicionalmente utilizada para o tratamento de diabetes, reumatismo, hipertensão e convulsões e é conhecida popularmente como cipó-pucá, uva-branca, insulina vegetal.³ Estudos demonstram a sua atividade anti-inflamatória, antioxidante e antidiabética.^{8,9}

As atividades farmacológicas da *Cissus verticillata* são atribuídas aos seus diversos metabólitos secundários, que são compostos químicos produzidos pela planta com funções biológicas específicas. Entre os metabólitos secundários encontrados, destacam-se os polissacarídeos, os compostos fenólicos simples, os flavonoides, os taninos e os alcaloides. Esses compostos apresentam diferentes mecanismos de ação no organismo humano, como

modulação da resposta imune, inibição de enzimas, captação de radicais livres, entre outros.¹⁰ Os polissacarídeos presentes na planta são responsáveis pela redução da glicose no sangue, os flavonoides pela redução dos triglicerídeos e das transaminases (enzimas que indicam lesão hepática), e os alcaloides e taninos pela atividade antinociceptiva (redução da sensação de dor).^{10,11,12}

O diabetes está atrelado a um desbalanço entre os oxidantes e antioxidantes nas células, levando ao aumento das espécies reativas de oxigênio (ERO) e uma das formas de defesa para o estresse oxidativo é a utilização de extratos vegetais com atividade antioxidantes, que impedem ou retardam a ação dos radicais livres.^{13,14} Neste contexto, o uso de plantas com a presença de compostos fenólicos é uma das formas de atuação como antioxidantes, que dependendo da sua estrutura química e do meio em que estão podem doar um elétron ou um hidrogênio para os radicais livres, neutralizando-os e formando produtos estáveis. Eles também podem quelar metais de transição, como ferro e cobre, que podem catalisar reações de oxidação. Além disso, eles podem modular a atividade de enzimas e genes envolvidos na defesa antioxidante do organismo.^{13,14} Neste sentido, os objetivos deste trabalho foram avaliar os potenciais citotóxico, genotóxico e a capacidade antioxidante, assim como a caracterização química dos extratos aquoso e etanólico das folhas de *Cissus verticillata*.

2. Experimental

2.1. Material vegetal

Folhas de *C. verticillata* foram coletadas no período da manhã na região de Nova Almeida, município da Serra, Espírito Santo, Brasil (20°06'60" S, 40°18'52" W). Após a coleta o material vegetal foi identificado e catalogado no Herbário VIES da Universidade Federal do Espírito Santo, com número VIES 50100.

2.2. Obtenção dos extratos foliares

Foram preparados extratos aquosos (EA) e etanólico (EE) das folhas de *C. verticillata*. O EA foi preparado pelo método de infusão utilizando 30 g de folhas frescas, trituradas e colocadas em 300 mL de água destilada aquecida a 100 °C. Após descanso de 10 minutos, o extrato foi filtrado, congelado e liofilizado. O EE foi produzido a partir de 30 g de folhas frescas, trituradas e colocadas em 300 mL de álcool etílico 70%, e extraído por maceração até o esgotamento total da droga vegetal. Após isso, o etanol foi completamente retirado por evaporação rotatória, seguido pela liofilização. O rendimento na obtenção dos extratos foram 1,47 g de EA e 1,21 g EE. Os extratos foram armazenados em frasco âmbar sob refrigeração de -4°C até o momento do experimento.

2.3. Citotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade pelo sistema de *Allium cepa*

Para a realização dos ensaios biológicos *in vivo*, os extratos foram diluídos em água destilada para obtenção das seguintes concentrações: 3,3 mg mL⁻¹; 2,5 mg mL⁻¹; 1,6 mg mL⁻¹; 0,8 mg mL⁻¹ e 0,4 mg mL⁻¹ para o extrato etanólico, já para o extrato aquoso as concentrações utilizadas foram: 4,8 mg mL⁻¹; 3,6 mg mL⁻¹; 2,4 mg mL⁻¹; 1,2 mg mL⁻¹ e 0,6 mg mL⁻¹. Foram utilizados o herbicida glifosato (1 mL L⁻¹) e o metano sulfonato de metila (MMS) (0,004 M) como controle positivo e água destilada como controle negativo.

Para avaliar os efeitos citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos dos extratos foliares de *C. verticillata*, foram realizados testes com *A. cepa* utilizando o método de Fiskesjö¹⁵, com alterações. Inicialmente 25 sementes de *A. cepa* foram dispostas em placas de Petri e foram molhadas com 3 mL das diferentes concentrações dos extratos, controle positivo e negativo. Cinco placas de Petri foram usadas para cada tratamento. Após 96 h de exposição as raízes foram coletadas e fixadas em solução Carnoy 3:1 (etanol:ácido acético) e armazenadas a -18°C em freezer. Foram realizadas duas trocas do fixador, uma após 10 minutos e a segunda após 24 horas. Para o preparo das lâminas, as raízes foram previamente lavadas 3 vezes em água destilada por um tempo de 10 minutos, em seguida foram hidrolisadas em solução de HCl 5 mol L⁻¹ por 18 minutos em temperatura ambiente, e lavadas em água destilada novamente.

Lâminas com os meristemas foram preparadas pela técnica de esmagamento e coradas comorceína acética 2%. Para a preparação das lâminas permanentes, as lamínulas foram destacadas pelo congelamento em nitrogênio líquido e posteriormente vedadas com verniz vitral. Foram analisadas 1000 células por lâmina e cinco lâminas para cada tratamento, totalizando 5000 células por tratamento.⁴

Os parâmetros avaliados foram índice mitótico (IM) para determinar a citotoxicidade, alterações cromossômicas, como ponte cromossômica, quebra, c-metáfase, aderência e perda cromossômica para o potencial genotóxico e para a mutagenicidade avaliou a presença de micronúcleos.

2.4. Cultura de células

Para o ensaio *in vitro*, foram utilizadas células da linhagem de hepatoma de *Rattus norvegicus* (HTC), essa linhagem de células expressa enzima metabolizadora de drogas fase I e fase II, sendo característica de células metabolizadoras. As células foram cultivadas em 5.0 mL de meio de cultura DMEM/F12 (Gibco), suplementado com 10 % de soro bovino fetal (FBS, Gibco) e solução antibiótica-antimicótica 0,1 % (meio completo) e mantidas em frascos de cultura (25 cm²) em monocamada. Os frascos de cultura foram incubados em uma incubadora de demanda bioquímica de oxigênio (DBO) a 37°C, permitindo o ciclo celular de 24 horas. Para obter as concentrações de 100; 50;

25; 12,5 e 6,25 $\mu\text{L mL}^{-1}$ onde as células cultivadas foram expostas, os extratos foram diluídos em meio incompleto (1:3), para os controles negativo e positivo, PBS e MMS (4 10^{-4} mM) foram usados, respectivamente.

2.5. Ensaio citotóxico de MTT

Para a avaliação citotóxica, por meio do ensaio de MTT (3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil brometo de tetrazolína - Sigma-Aldrich), utilizou-se a metodologia baseada em Mosmann.⁵ Primeiro, 1×10^5 células HTC (Banco de células do Rio de Janeiro – BCRJ) foram semeadas em placas de 96 poços contendo meio DMEM/F12. Posteriormente as placas foram mantidas na incubadora DBO a 37°C por um período de 24 h para estabilização. Após esse período, todos os meios de cultura presentes nos poços da placa foram descartados e foram adicionados 200 μL das concentrações dos extratos e incubadas por mais 24 h. Após isso, os tratamentos foram removidos e adicionado 100 μL de solução de MTT (5,0 mg mL^{-1}) diluída em meio isento de soro em cada poço e, em seguida, as células foram incubadas por 4 h. Posteriormente, a solução de MTT foi aspirada e adicionados 200 μL de Dimetilsulfóxido puro (DMSO - Dinamica). A solução de formazan, oriunda da degradação do MTT juntamente com o DMSO puro foram homogeneizadas nos poços da placa e realizou-se a leitura das placas em espectrofotômetro modelo Epoch2, *Biotech* a 550 nm. O experimento foi repetido três vezes de forma independente, e os resultados foram expressos em termos de inibição da viabilidade.

2.6. Análise da atividade antioxidante

Para avaliar a atividade antioxidante dos extratos aquoso e etanólico de *C. verticillata* foi utilizado o teste colorimétrico de eliminação do radical livre 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH) - Sigma-Aldrich, seguindo a metodologia descrita por Re *et al.*,⁶ e Rufino *et al.*,¹⁶ com modificações. Para a realização do teste, inicialmente foram preparadas soluções de DPPH a 0,3 mM, e dos extratos aquoso e etanólico de *C. verticillata* na concentração de 1 mg mL^{-1} , ambos em álcool etílico. Os padrões utilizados para efeito de comparação foram o Ácido ascórbico e o Trolox. Os padrões foram feitos na concentração de 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$, sendo preparado em álcool etílico. A partir da concentração preparada foram realizando diluições seriadas em álcool etílico até obter as seguintes concentrações: 1000; 500; 250; 125; 62,5; 31,25; 15,62; 7,81 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

Após o preparo das soluções, 100 μL de cada concentração dos extratos e dos padrões foram adicionados aos poços na placa e em seguida foram adicionados 200 μL de DPPH. Como branco foi utilizado 300 μL de álcool etílico e como controle 100 μL de álcool etílico juntamente com 200 μL da solução de DPPH. A placa foi incubada na ausência de luz por 30 minutos, após o tempo realizou a leitura da placa em espectrofotômetro a 740 nm. O cálculo da concentração necessária para neutralizar 50% do radical (EC50) foi:

2.7. Análises químicas por espectrometria de massa

Para determinar os principais compostos presentes nos extratos aquoso e etanólico das folhas de *C. verticillata*, foi realizada Espectrometria de Massa de íon ciclotrônico com Transforma de Fourier (FT-ICR MS). As amostras foram solubilizadas em metanol na concentração de 1 mg mL^{-1} e inseridas por infusão direta no equipamento (Solarix modelo 9.4T, Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha) com fonte de *electrospray* no modo negativo com fluxo de 5 $\mu\text{L min}^{-1}$ e ajustado para operar numa variação de m/z de 150 a 1500. A fonte de *electrospray* foi condicionada para pressão de nebulização do gás de 1,0 bar, voltagem do capilar de 3,8 kV e capilar de transferência na temperatura de 200 °C. Os espectros de fragmentação de MS-MS foram obtidos em um analisador quadrupolo acoplado ao FT-ICR MS com 1 s de tempo de acúmulo e energia de colisão variando de 25 a 45 %.

Os espectros de massas foram analisados pelo *software* Data Analysis (Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha). Para a proposição dos compostos foram utilizados, o íon gerado, fórmula molecular, equivalente de ligações duplas e dados da literatura de substâncias na espécie ou gênero e comparados com os dados da literatura no Chemspider e Basemol.

2.8. Análise estatística

Os dados de citogenotoxicidade, mutagenicidade e viabilidade celular foram expressos em médio seguidos por erro padrão. Após verificar a distribuição normal dos dados pelo teste de Shapiro-Wilks, foi utilizado análise de variância (ANOVA) seguido do teste de Dunnet para comparar os tratamentos com os controles. Já para obter o EC50 da ação antioxidante dos extratos foi realizado regressão. A estatística foi realizada através do *software* R Studio versão 4.2.2.

3. Resultados e Discussão

3.1. Citotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade pelo sistema de *Allium cepa*

Os extratos etanólico e aquoso de *C. verticillata* foram testados quanto à sua capacidade citotóxica e de induzir danos genotóxicos e mutagênicos em células meristemáticas de *A. cepa*. Para isso, utilizou-se o índice mitótico (IM) como indicador de citotoxicidade e a frequência de anomalias celulares como indicador de genotoxicidade e os resultados estão expressos na Tabela 1. Os resultados mostraram que o extrato etanólico apresentou um efeito citotóxico significativo nas concentrações de 2,5; 1,6 e 0,8 mg mL^{-1} , reduzindo o IM em mais de 40 % em relação ao controle negativo. Além disso, o extrato etanólico diminuiu a frequência de metáfases, anáfases e telófases

nessas concentrações, indicando um efeito mitodepressivo. O extrato aquoso também reduziu o índice mitótico na concentração de 4,8 mg mL⁻¹, mas não afetou as outras fases do ciclo celular, exceto a anáfase.

Conforme Leme & Marin-Morales,²⁰ a avaliação do Índice Mitótico (IM) é um parâmetro que permitem avaliar a atividade citotóxica de uma substância. Os resultados demonstraram que os extratos foliares de *Cissus verticillata* apresentam efeito citotóxico nas concentrações mais elevadas do extrato etanólico (2,5; 1,6 e 0,8 mg mL⁻¹) e na maior concentração do extrato aquoso (4,8 mg mL⁻¹). Esse resultado vai contra ao reportado por Vicentini e colaboradores,²¹ onde não encontraram efeito citotóxico do extrato aquoso de *C. verticillata* na concentração de 0,7 mg mL⁻¹. Por outro lado, Schmitz,³ encontraram resultados semelhantes em comparação aos evidenciados no nosso trabalho.

A diminuição do IM pode ser explicada pela redução significativa nas fases do ciclo celular, principalmente na metáfase, anáfase e telófase. A redução da anáfase pode estar associada ao último ponto de controle do ciclo celular, que verifica se os cromossomos estão ligados corretamente ao fuso mitótico.^{29,30} Uma alteração na ligação dos cromossomos ao fuso mitótico sugere que os extratos tenham uma ação aneugênica, interferindo nas proteínas que regulam e formam o fuso mitótico.

Quanto aos danos genotóxicos, foram consideradas as células com alterações cromossômicas. A exposição aos extratos aquoso e etanólico de *Cissus verticillata* causou algumas alterações cromossômicas (AC), como: C-metáfase, ponte, quebra e perda cromossômica, porém as porcentagens dessas alterações não apresentaram diferença significativa em relação ao controle negativo em nenhum dos tratamentos (Tabela 2). Micronúcleos também foram

observados nas células meristemáticas de *Allium cepa*, mas não apresentaram diferença significativa em comparação com o controle negativo, exceto a concentração 3,3 mg mL⁻¹ do extrato etanólico, que apresentou diferença significativa em relação ao controle negativo, sendo similar ao controle positivo MMS.

Ainda que tenha observado efeito citotóxico em algumas concentrações dos extratos da planta, não foram significativas as alterações cromossômicas encontradas, demonstrando que os extratos não apresentam atividade genotóxica e mutagênica. Esse resultado pode ser explicado por outra atividade encontrada dos extratos que foi a capacidade antioxidante.¹⁸ Estudos de Ihegboro *et al.*,²³ e Khan *et al.*²⁴ demonstraram que os antioxidantes apresentam a capacidade de melhorar o reparo do DNA, assim como modular o efeito tóxico de uma substância.

3.2. Ensaio do MTT

As células HTC submetidas ao tratamento com diferentes concentrações dos extratos aquoso e etanólico não apresentaram perda significativa da função mitocondrial em comparação com o controle negativo, uma vez que os tratamentos apresentaram uma alta porcentagem de viabilidade celular (Tabela 3). Assim podemos concluir que pelo teste de MTT os extratos foliares de *C. verticillata* não apresentam efeito citotóxico em linhagens de células HTC.

A ausência de citotoxicidade em células de linhagens HTC está de acordo com alguns trabalhos que avaliaram o efeito citotóxico dos extratos em outras linhagens de células, como é o caso de Ponath *et al.*² que analisaram o efeito do extrato aquoso em linhagens de células de fibroblastos Balb/c 3 T3, onde não apresentou efeito citotóxico, relataram que a redução da viabilidade ocorreu a partir da concentração de

Tabela 1. Frequência das fases do ciclo celular e IM (índice mitótico) de células meristemáticas avaliadas em *Allium cepa* tratada com diferentes concentrações de extrato aquoso e extrato etanólico de *Cissus verticillata*

Tratamentos	(mg mL ⁻¹)	Interfase	Prófase	Metáfase	Anáfase	Telófase	IM (%)
EE	3,3	64,82 ± 2,70 *	8,4 ± 0,87 *	1,36 ± 0,51 bc	1,14 ± 0,37 bc	1,72 ± 0,39 bc	12,62 ± 1,57 abc
	2,5	84,36 ± 2,70 abc	4,28 ± 0,87 abc	1,06 ± 0,51 bc	0,80 ± 0,37 b	1,18 ± 0,39 bc	7,32 ± 1,57 bc
	1,6	86,12 ± 2,70 abc	4,22 ± 0,87 abc	1,10 ± 0,51 bc	1,26 ± 0,37 bc	1,62 ± 0,39 bc	8,20 ± 1,57 bc
	0,8	89,50 ± 2,70 abc	3,64 ± 0,87 abc	1,72 ± 0,51 bc	1,32 ± 0,37 bc	1,64 ± 0,39 bc	8,32 ± 1,57 bc
	0,4	80,50 ± 2,70 ab	3,92 ± 0,87 ab	3,56 ± 0,51 abc	2,46 ± 0,37 bc	2,80 ± 0,39 abc	12,74 ± 1,57 abc
EA	4,8	88,04 ± 2,70 abc	2,86 ± 0,87 abc	2,52 ± 0,51 bc	1,80 ± 0,37 b	2,26 ± 0,39 abc	9,44 ± 1,57 bc
	3,6	84,18 ± 2,70 abc	3,74 ± 0,87 abc	3,36 ± 0,51 abc	2,98 ± 0,3 bc	3,22 ± 0,39 abc	13,30 ± 1,57 abc
	2,4	87,77 ± 2,70 abc	3,80 ± 0,87 abc	1,78 ± 0,51 bc	2,40 ± 0,37 bc	2,44 ± 0,39 abc	10,43 ± 1,57 abc
	1,2	86,27 ± 2,70 abc	3,40 ± 0,87 abc	3,26 ± 0,51 abc	3,14 ± 0,37 abc	2,48 ± 0,39 abc	12,31 ± 1,57 abc
	0,6	86,94 ± 2,70 abc	2,80 ± 0,87 abc	3,34 ± 0,51 abc	2,90 ± 0,37 bc	3,16 ± 0,39 abc	12,20 ± 1,57 abc
Água	-	82,8 ± 2,74 a	3,60 ± 0,87 a	4,56 ± 0,51 a	4,36 ± 0,37 a	3,34 ± 0,39 a	15,86 ± 1,57 a
MMS	-	82,6 ± 2,70 b	2,62 ± 0,87 b	2,54 ± 0,51 b	2,46 ± 0,37 b	2,04 ± 0,39 b	9,66 ± 1,57 b
Glifosato	-	8832 ± 2,70 c	1,86 ± 0,87 c	2,52 ± 0,51 c	2,00 ± 0,37 c	2,12 ± 0,39 c	8,50 ± 1,57 c

Médias ± D.P seguidas pela letra a são estatisticamente iguais a água; médias seguidas pela letra b são estatisticamente iguais ao MMS (metanossulfonato de metila); médias seguidas pela letra c são estatisticamente iguais ao glifosato, médias seguidas por * diferiram significativamente de todos os controles pelo teste de Dunnett (p<0,05). S.E: Erro padrão. EE: Extrato etanólico. EA: Extrato aquoso. IM: Índice mitótico.

Tabela 2. Alterações cromossômicas e nucleares em células meristemáticas avaliadas em *Allium cepa* tratadas com diferentes concentrações de extrato aquoso e extrato etanólico de *Cissus verticillata*

Tratamentos	(mg mL ⁻¹)	Perda Cromossômica	Aderência Cromossômica	C-Metáfase	Ponte	Quebra	AC TOTAIS	Micronúcleo (%)
EE	3,3	0,01 ± 0,03 ab	0,01 ± 0,01 abc	0,04 ± 0,06 ab	0,06 ± 0,11 ab	0 ± 0,03 abc	0,12 ± 0,16 a	0,48 ± 0,11 b
	2,5	0,02 ± 0,03 ab	0,01 ± 0,01 abc	0,12 ± 0,06 ab	0,32 ± 0,11 ab	0,02 ± 0,03 abc	0,50 ± 0,16 a	0,24 ± 0,11 ab
	1,6	0,08 ± 0,03 abc	0,01 ± 0,01 abc	0,02 ± 0,06 ab	0,22 ± 0,11 ab	0,02 ± 0,03 abc	0,38 ± 0,16 a	0,2 ± 0,11 ab
	0,8	0,01 ± 0,03 ab	0,01 ± 0,01 abc	0,10 ± 0,06 ab	0,08 ± 0,11 ab	0 ± 0,03 abc	0,18 ± 0,16 a	0,12 ± 0,11 ab
	0,4	0,08 ± 0,03 abc	0,02 ± 0,03 ab	0,32 ± 0,06 b	0,26 ± 0,11 ab	0,02 ± 0,03 abc	0,72 ± 0,16 a	0,34 ± 0,11 ab
EA	4,8	0,02 ± 0,03 ab	0,01 ± 0,01 abc	0,18 ± 0,06 ab	0,24 ± 0,11 ab	0 ± 0,03 abc	0,44 ± 0,16 a	0,12 ± 0,11 ab
	3,6	0,04 ± 0,03 ab	0,01 ± 0,01 abc	0,02 ± 0,06 ab	0,14 ± 0,11 ab	0,04 ± 0,03 abc	0,24 ± 0,16 a	0,04 ± 0,11 ab
	2,4	0,00 ± 0,03 abc	0,01 ± 0,01 abc	0,02 ± 0,06 ab	0,1 ± 0,11 ab	0,02 ± 0,03 abc	0,14 ± 0,16 a	0,06 ± 0,11 ab
	1,2	0,04 ± 0,03 ab	0,01 ± 0,01 abc	0 ± 0,06 a	0,24 ± 0,11 ab	0,02 ± 0,03 abc	0,30 ± 0,16 a	0,04 ± 0,11 ab
	0,6	0,01 ± 0,03 abc	0,01 ± 0,01 abc	0,04 ± 0,05 ab	0,20 ± 0,11 ab	0,06 ± 0,03 abc	0,32 ± 0,16 a	0 ± 0,11 ab
Água	-	0,04 ± 0,03 a	0,01 ± 0,01 a	0,06 ± 0,06 a	0,18 ± 0,11 a	0,08 ± 0,03 a	0,40 ± 0,16 a	0,08 ± 0,11 a
MMS	-	0,10 ± 0,03 b	0,01 ± 0,01 b	0,22 ± 0,06 b	0,30 ± 0,11 b	0,06 ± 0,03 b	0,68 ± 0,16 b	0,24 ± 0,11 b
Glifosato	-	0,14 ± 0,03 c	0,01 ± 0,01 c	0,68 ± 0,06 c	0,86 ± 0,11 c	0,06 ± 0,03 c	1,82 ± 0,16 c	1,62 ± 0,11 c

Médias ± D.P seguidas pela letra a são estatisticamente iguais a água; médias seguidas pela letra b são estatisticamente iguais ao MMS (metanossulfonato de metila); médias seguidas pela letra c são estatisticamente iguais ao glifosato, médias seguidas por * diferiram significativamente de todos os controles pelo teste de Dunnett (p<0,05). S.E: Erro padrão. EE: Extrato etanólico. EA: Extrato aquoso. AC TOTAIS: Alterações cromossômicas totais

Tabela 3. Viabilidade celular em linhagens de células HTC expostas aos extratos etanólico e aquoso de *Cissus verticillata*

Tratamentos	(µL mL ⁻¹)	Viabilidade Celular (%)
EE	100	94,91 ± 11,89 a
	50	89,74 ± 14,45 a
	25	86,68 ± 10,44 a
	12,5	96,39 ± 15,06 a
	6,25	96,50 ± 13,73 a
EA	100	85,16 ± 11,52 a
	50	97,94 ± 26,37 a
	25	100,59 ± 24,86 a
	12,5	106,46 ± 29,77 a
	6,25	107,27 ± 34,19 a
CN	-	100 ± 0.0 a

Médias ± D.P. seguidas pela letra a são estatisticamente iguais ao CN pelo teste de Dunnett (p<0,05). D.P: Desvio Padrão. EE: Extrato etanólico. EA: Extrato aquoso. CN: Controle Negativo

30 mg mL⁻¹. Trabalhos de Sáenz *et al.*,²⁵ e Schmitz *et al.*,³ também demonstraram baixo efeito citotóxico.

3.3. Atividade antioxidante

Para avaliar a atividade antioxidante dos extratos aquoso e etanólico, levou em consideração o EC₅₀, que informa a concentração necessária da amostra para neutralizar 50% do radical livre. Através do teste de DPPH foi possível observar a atividade antioxidante do extrato aquoso e etanólico das folhas de *Cissus verticillata*, com EC₅₀ de 364,65 µg mL⁻¹ e 982,51 µg mL⁻¹ respectivamente (Tabela 4).

Tabela 4. Valores de EC₅₀ representando a atividade antioxidante dos extratos aquoso e etanólico de *Cissus verticillata* pelo método DPPH

Amostra	DPPH EC ₅₀ (µg mL ⁻¹)
Ácido Ascórbico (Padrão)	826,33
Trolox (Padrão)	53,01
Extrato Aquoso	364,65
Extrato Etanólico	982,51

Esses resultados demonstram que os extratos possuem atividade antioxidante significativa, que pode ser atribuída à presença de compostos fenólicos, especialmente flavonóides e taninos no extrato aquoso. Esses compostos são capazes de doar elétrons ou hidrogênio para os radicais livres, impedindo a propagação da reação em cadeia. A atividade antioxidante dos extratos de *C. verticillata* já foi relatada anteriormente Schmitz e colaboradores³ demonstraram alto poder antioxidante do extrato através do método de Poder Antioxidante Redutor Férrico (FRAP), indo de encontro com os resultados obtidos no presente trabalho. Portanto, os extratos das folhas de *C. verticillata* podem ser considerados como fontes potenciais de antioxidantes naturais, com possíveis aplicações na prevenção ou tratamento de doenças relacionadas ao estresse oxidativo.^{2,26,31}

3.4. Caracterização química dos extratos foliares de *C. verticillata* por espectrometria de massas

Os espectros de massas e as substâncias propostas obtidas dos extratos aquoso e etanólico das folhas de *C. verticillata* indicaram a presença de açúcares, flavonóides e taninos, conforme Figura 1 e Tabela 5.

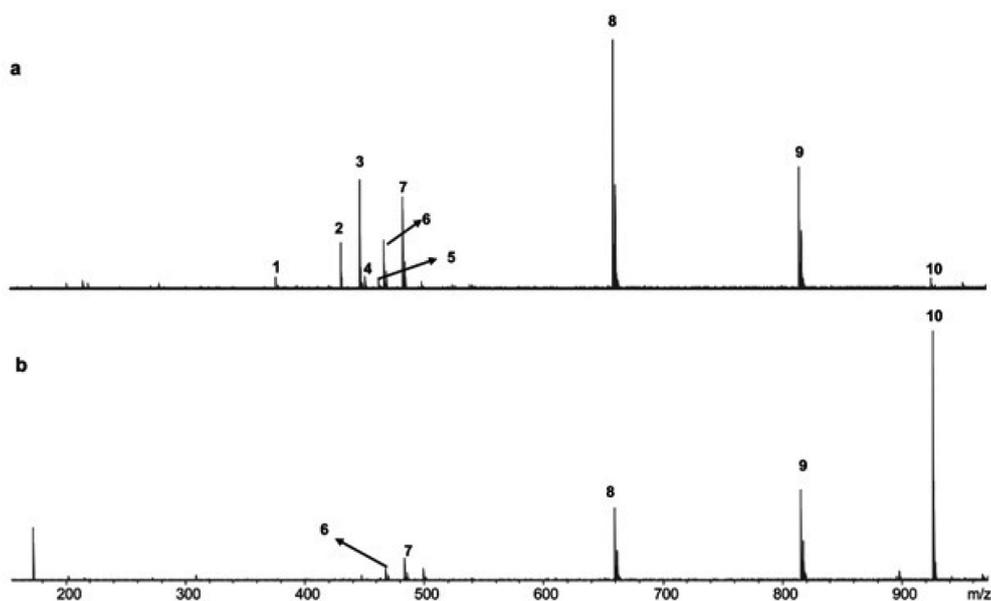


Figura 1. Espectro de massas de íon ciclotrônico com Transformada de Fourier (FT-ICR MS) dos extratos aquoso e etanólico das folhas de *Cissus verticillata*. (a) Extrato aquoso; (b) Extrato etanólico. 1) Sacarose; 2) Vitexina; 3) Quercitrina; 4) Xilitriitol; 5) Miricitrina; 6) Aduto de cloro de vitexina; 7) Aduto de cloro de quercitrina; 8) Tanino derivado do ácido gálico; 9) Catequina-(4- α -8)-epigallocatequina-3-galato; 10) Dímero de miricetina

Tabela 5. Proposta da composição química dos extratos aquoso e etanólico de *Cissus verticillata* por Espectrometria de Massa de íon ciclotrônico com Transformada de Fourier (FT-ICR MS)

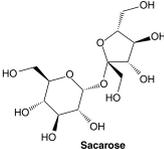
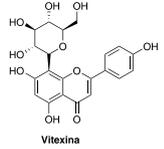
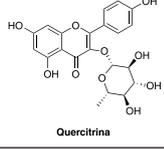
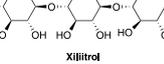
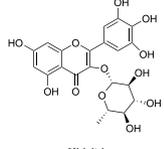
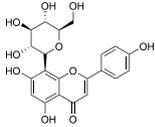
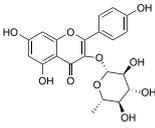
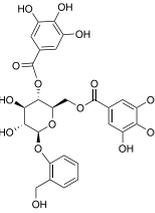
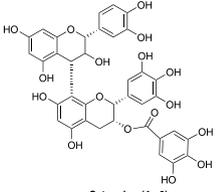
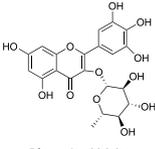
<i>m/z</i> Medido	<i>m/z</i> Teórico	Fórmula Molecular [M-H] ⁻ ; [M-Cl] ⁻ ; 2[M-H] ⁻	Error (ppm)	IDH	Poder de Resolução	Estrutura Proposta	Extrato Aquoso	Extrato Etanólico	
1)	377.08582	377.08561	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁ Cl	1,5	365472	 Sacarose	+	-	
2)	431.09856	431.09837	C ₂₁ H ₁₉ O ₁₀	-0,45	12,5	339044	 Vitexina	+	-
3)	447.09348	447.09329	C ₂₁ H ₁₉ O ₁₁	-0,44	12,5	328944	 Quercitrina	+	-
4)	451.12264	451.12239	C ₁₅ H ₂₈ O ₁₃ Cl	-0,25	1,5	327772	 Xilitriitol	+	-
5)	463.08861	463.08820	C ₂₁ H ₁₉ O ₁₂	-0,88	12,5	265669	 Miricitrina	+	-

Tabela 5. Proposta da composição química dos extratos aquoso e etanólico de *Cissus verticillata* por Espectrometria de Massa de íon ciclotrônico com Transformada de Fourier (FT-ICR MS) (cont.)

<i>m/z</i> Medido	<i>m/z</i> Teórico	Fórmula Molecular [M-H] ⁻ ; [M-Cl] ⁻ ; 2[M-H] ⁻	Error (ppm)	IDH	Poder de Resolução	Estrutura Proposta	Extrato Aquoso	Extrato Etanólico	
6)	467.07535	467.07505	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀ Cl	-0,67	11,5	303574	 Aduto de cloro de vitexina	++	+
7)	483.07022	483.06996	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁ Cl	-0,26	11,5	290087	 Aduto de cloro de quercitrina	++	+
8)	659.05701	659.05760	C ₂₇ H ₂₅ Cl ₂ O ₁₅	0,89	14,5	226898	 Tanino derivado de ácido gálico	++	+
9)	815.07903	815.07873	C ₃₇ H ₂₉ Cl ₂ O ₁₇	-0,37	22,5	186046	 Catequina-(4a-8)-epigallocatequina-3-galato	+	+
10)	925.17023	925.16803	C ₄₂ H ₃₈ O ₂₄	-2,39	24,5	188487	 Dímero de miricitrina	+	+

IDH = Índice de deficiência de hidrogênios

Para o extrato aquoso, foi observado um pico majoritário com *m/z* de 659, que foi identificado como um tanino hidrossolúvel do tipo gálico, já no extrato etanólico esse composto ocorre em uma proporção menor. Os picos *m/z* de 377 e 451 foram característicos dos açúcares sacarose e xilotriitol, respectivamente. Os flavonoides glicosilados como a vitexina (*m/z* 467), quercitrina (*m/z* 447) e miricitrina (*m/z* 463) foram identificados predominantemente no extrato aquoso. Tanino condensado de catequina em *m/z* de 815 foi caracterizado nos dois extratos.

Para o extrato etanólico, formou-se um pico majoritário em *m/z* 925, referente a um dímero de miricitrina. A caracterização desse dímero se dá pela sequência de fragmentação, onde ocorre a perda de 2 açúcares de rhamnose (*m/z* 146), dando inicialmente o pico desprotonado *m/z* 799 e em seguida o pico referente ao dímero de miricetina em *m/z*

633. A partir do dímero aglicona, 2 vias de fragmentações são possíveis, uma é a perda de 2 hidroxilas (-OH) de *m/z* 34 originando o íon desprotonado *m/z* 599 e a outra é pela sequência de quebras de ligações carbono-carbono e carbono-oxigênio, dando origem aos íons de *m/z* 435, 391 e 259 respectivamente. Com isso, foi proposto que a ligação entre os monômeros ocorra nas posições 4'-2'' do anel A do flavonoide (Figura 2). Está proposta de fragmentação se assemelha à caracterização por espectrometria de massas do dímero de miricetina-3-*O*-galactosídeo.²⁹

A presença de compostos fenólicos complexos nos extratos aquoso e etanólico de *C. verticillata* serviu de subsídio para compreender os efeitos biológicos encontrados nesse trabalho. Além da identificação das classes de metabólitos presentes nos extratos, foi possível caracterizar, por espectrometria de massa, os compostos com porcentagem

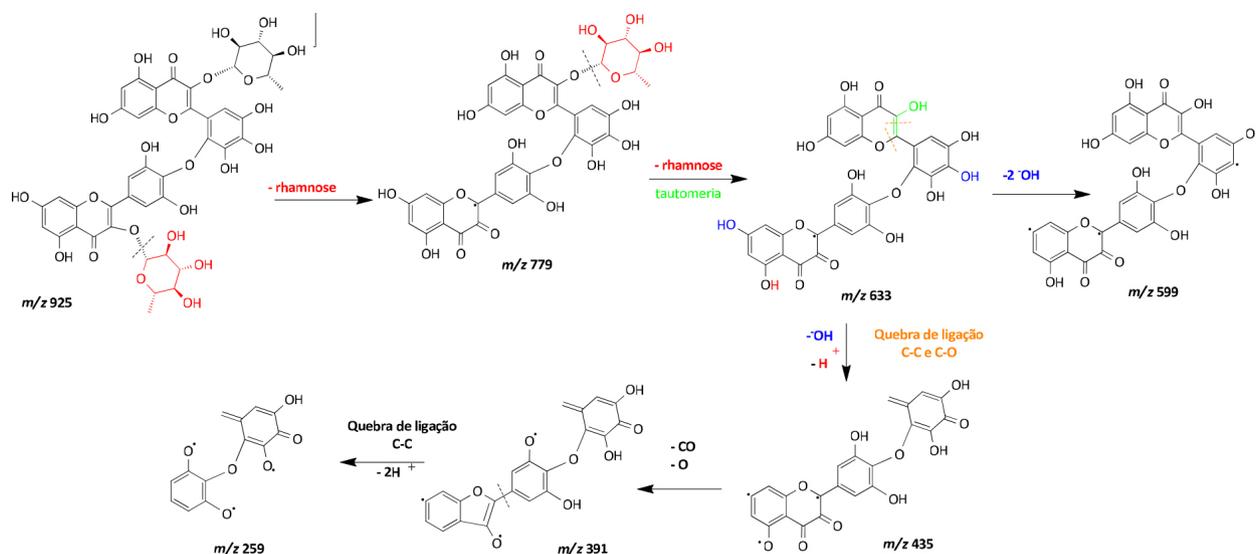


Figura 2. Mecanismo de fragmentação que explica a formação do dímero de miricitrina

relativas de cada um, sendo o tanino de ácido gálico o majoritário no extrato aquoso e o dímero de miricitrina no extrato etanólico. A formação do dímero de miricitrina pode estar relacionada com a utilização de alta temperatura no processo de eliminação do solvente do extrato etanólico, tendo em vista que a estabilidade estrutural dos polifenóis está ligada a alterações como pH, temperatura, luz, oxigênio entre outros fatores.^{16,32,33} Cao e colaboradores³⁴ relataram a instabilidade na estrutura da miricetina quando exposta a temperatura de 37 °C por 5 minutos quando ocorreu a formação do dímero de miricetina.

Os compostos identificados no presente trabalho, como os taninos de ácido gálico e de catequina, já foram identificados no extrato de *Cissus verticillata* por Feitosa *et al.*³⁵ O flavonoide vitexina foi caracterizado por cromatografia líquida acoplada ao espectrômetro de massa em tintura.³⁶ A presença da quercitrina que nunca tinha sido relatada na *C. verticillata*, apenas em outra espécie do gênero *Cissus*.³⁷ A diferença na composição química dos extratos pode estar relacionada com o tipo de solvente utilizado na extração, que influencia na solubilidade dos metabólitos secundários.

4. Conclusões

Os extratos foliares de *Cissus verticillata* apresentaram efeito citotóxico em *Allium cepa* nas concentrações de 2,5; 1,6 e 0,8 mg mL⁻¹ do extrato etanólico e na maior concentração do extrato aquoso (4,8 mg mL⁻¹). Entretanto, mesmo nas concentrações mais altas de 3,3 e 4,8 mg mL⁻¹ de cada extrato não foi observado potencial genotóxico e mutagênico. Já em relação ao efeito citotóxico em linhagens de células HTC, as concentrações testadas não alteraram a viabilidade celular, não apresentando citotoxicidade. Além disso, foi possível demonstrar o poder antioxidante dos extratos, resultado esse que explica a ausência de

alterações cromossômicas e mutagênicas, sendo essa atividade diretamente relacionada aos constituintes químicos encontrados no extrato aquoso, como a presença de flavonoides e taninos. Foi relatado pela primeira vez a presença da quercitrina na espécie estudada. Portanto, de acordo com os achados acima, podemos inferir que a população que faz uso do extrato de *Cissus verticillata* em concentrações mais baixas para a terapia de vários distúrbios metabólicos não correm o risco de sofrerem alterações nas células e no material genético. No entanto, para confirmar e validar esta investigação, são necessários mais estudos em animais e humanos.

Agradecimentos

Este estudo foi parcialmente financiado pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código Financeiro 001., à Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Espírito Santo (FAPES), ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) e ao IFES pelo apoio financeiro para publicação desse artigo junto ao edital PRODIF.

Contribuições do Autor

Augusto César S. Oliveira – Pesquisa e Redação do rascunho original, Pesquisa. Iasmini Nicoli Galter – Curadoria de dados, Pesquisa, Redação do rascunho original. Suiany Vitorino Gervásio - Curadoria de dados, Pesquisa. Maria do Carmo Pimentel Batitucci - *Software*, Pesquisa. Milene Miranda Praça Fontes – *Software*, Pesquisa, Redação do rascunho original. Silvia Tamie Matsumoto - Aquisição de financiamento para análise formal, Recursos. Hildegardo Seibert França - Redação-revisão e edição, *Software*, Pesquisa.

Referências Bibliográficas

- Charen, E.; Harbord, N.; Toxicity of Herbs, Vitamins, and Supplements. *Advances Chronic Kidney Disease* **2020**, *27*, 67. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
- Ponath, A. S.; Volz, D. R.; Suyenaga, E. S.; Ziulkoski, A. L.; Perassolo, M. S.; Assessment of potential in vitro toxicity of *Cissus sicyoides* L. and *Wedelia paludosa* DC. leaves water extracts. *Toxicology Research* **2022**, *11*, 881. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
- Schmitz, A. P.; Weimer, P.; Weschenfelder, A. M.; Hansen, A. W.; Maluf, R. W.; Rossi, R. C.; Basso, L. S.; Ziulkoski, A. L.; Perassolo, M. S.; Suyenaga, E. S.; In vitro cytotoxic and genotoxic effects of *Cissus verticillata* and *Sphagneticola trilobata* used for treatment of Diabetes Mellitus in Brazilian folk medicine. *Acta Scientiarum Biological Sciences* **2021**, *43*, e56549. [[Crossref](#)]
- Aragão, F. B.; Palmieri, M. J.; Ferreira, A.; Costa, A. V.; Queiroz, V. T.; Pinheiro, P. F.; Andrade-Vieira, L. F.; Phytotoxic and cytotoxic effects of *Eucalyptus* essential oil on lettuce (*Lactuca sativa* L.). *Allelopathy Journal* **2015**, *35*, 259. [[Link](#)]
- Mosmann, T.; Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods* **1983**, *65*, 55. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
- Re, R.; Pellegrini, N.; Progettente, A.; Pannala, A.; Yang, M.; Rice-Evans, C.; Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine* **1999**, *26*, 1231. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
- Martínez-Mendoza, A. A.; Franco-Mora, O.; Castañeda-Vildózola, A.; Sánchez-Pale, J. R.; González-Romero, S. L.; Fruit characteristics of *Cissus verticillata* (L.) Nicholson and C. E. Jarvis and *C. tiliacea* Kunth during two complete harvest seasons. *Genetic Resources and Crop Evolution* **2020**, *67*, 1627. [[Crossref](#)]
- Salazar, M. A. R.; Urbina, G. R. O.; Bezerra, P. N.; Cunha, V. M. B.; da Silva, M. P.; Pires, F. C. S.; De Sousa e Silva, A. P.; de Sousa, S. H. B.; de Carvalho Jr., R. N.; Em *Antioxidants*; Shalaby, E.; Brzozowski, T., eds.; IntechOpen: London, 2019, cap. Antioxidant and Biological Activity of *Cissus sicyoides* and *Rosmarinus officinalis* extracts. [[Crossref](#)]
- Kim, W.; Kwon, H. J.; Jung, H. Y.; Lim, S.-S.; Kang, B.-G.; Jo, Y.-B.; Yu, D.-S.; Choi, S. Y.; Hwang, I. K.; Kim, D. W.; *Cissus verticillata* Extract Decreases Neuronal Damage Induced by Oxidative Stress in HT22 Cells and Ischemia in Gerbils by Reducing the Inflammation and Phosphorylation of MAPKs. *Plants* **2021**, *10*, 1217. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
- Viana, G. S. B.; Medeiros, A. C. C.; Lacerda, A. M. R.; Leal, L. K. A. M.; Vale, T. G.; de Matos, F. J. A.; Hypoglycemic and anti-lipemic effects of the aqueous extract from *Cissus sicyoides*. *BMC Pharmacology* **2004**, *4*, 9. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
- Ramprasath, V. R.; Shanthi, P.; Sachdanandam, P.; Immunomodulatory and Anti-inflammatory Effects of *Semecarpus anacardium* Linn. Nut Milk Extract in Experimental Inflammatory Conditions. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* **2006**, *29*, 693. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
- Uche, F. I.; Aprioku, J. S.; The phytochemical Constituents, Analgesic and Anti-inflammatory effects of methanol extract of *Jatropha curcas* leaves in Mice and Wister albino rats. *Journal of Applied Sciences and Environmental Management* **2008**, *12*, 99. [[Crossref](#)]
- Li, J.; O, W.; Li, W.; Jiang, Z.-G.; Oxidative Stress and Neurodegenerative Disorders. *International Journal of Molecular Sciences* **2013**, *14*, 24438. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
- Barbosa, K. B. F.; Costa, N. M. B.; Alfenas, R. C. G.; De Paula, S. O.; Bressan, J.; Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. *Revista de Nutrição* **2010**, *23*, 629. [[Crossref](#)]
- Fiskesjo, G.; The Allium test as a standard in environmental monitoring. *Hereditas* **1985**, *102*, 99. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
- Rufino, M. S. M.; Fernandes, F. A. N.; Alves, R. E.; De Brito, E. S.; Free radical-scavenging behavior of some north-east Brazilian fruits in a DPPH system. *Food Chemistry* **2009**, *114*, 693. [[Crossref](#)]
- Souza, T. S.; Barone, L. S. F.; Lacerda, D.; Vergilio, C. S.; de Oliveira, B. C. V.; de Almeida, M. G.; Thompson, F.; de Rezende, C. E.; Cytogenotoxicity of the water and sediment of the Paraopeba River immediately after the iron ore mining dam disaster (Brumadinho, Minas Gerais, Brazil). *Science of The Total Environment* **2021**, *775*, 145193. [[Crossref](#)]
- Kurupparachchi, S. U.; Jayawardena, U. A.; Gunathilake, V. K.; Use of the *Allium cepa* Model to Assess the Cytogenotoxicity of *Luffariella herdmani* Marine Sponge Extract. *Alternatives to Laboratory Animals* **2023**, *51*, 175. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
- Ribeiro, T. P.; Sousa, T. R.; Arruda, A. S.; Peixoto, N.; Gonçalves, P. J.; Almeida, L. M.; Evaluation of cytotoxicity and genotoxicity of *Hancornia speciosa* latex in *Allium cepa* root model. *Brazilian Journal of Biology* **2016**, *76*, 245. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
- Leme, D. M.; Marin-Morales, M. A.; *Allium cepa* test in environmental monitoring: A review on its application. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research* **2009**, *682*, 71. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
- Vicentini, V. E. P.; Camparoto, M. L.; Teixeira, R. O.; Mantovani, M. S.; *Averrhoa carambola* L., *Syzygium cumini* (L.) Skeels and *Cissus sicyoides* L.: medicinal herbal tea effects on vegetal and animal test systems. *Acta Scientiarum Biological Sciences* **2001**, *23*, 593. [[Link](#)]
- Owolarafe, T. A.; Salawu, K.; Ihegboro, G. O.; Ononamadu, C. J.; Alhassan, A. J.; Wudil, A. M.; Investigation of cytotoxicity potential of different extracts of *Ziziphus mauritiana* (Lam) leaf *Allium cepa* model. *Toxicology Reports* **2020**, *7*, 816. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
- Ihegboro, G. O.; Ononamadu, C. J.; Owolarafe, A. T.; Afor, E.; Zaharadeen, I. K.; Antioxidants in plant extracts may contribute to the modulation of their toxicity: an insight with *Allium cepa* model. *NISEB J* **2018**, *18*, 92. [[Link](#)]
- Khan, S.; Anas, M.; Malik, A.; Mutagenicity and genotoxicity evaluation of textile industry wastewater using bacterial and plant bioassays. *Toxicology Reports* **2019**, *6*, 193. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
- Sáenz, M. T.; Garcia, M. D.; Quilez, A.; Ahumada, M. C.; Cytotoxic activity of *Agave intermixta* L. (Agavaceae) and *Cissus*

- sicyoides* L. (Vitaceae). *Phytotherapy Research* **2000**, *14*, 552. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
26. Gökbulut, A.; Ozhan, O.; Karacaoglu, M.; Sarer, E.; Radical scavenging activity and vitexin content of *Vitex agnus-castus* leaves and fruits. *FABAD Journal of Pharmaceutical Sciences* **2010**, *35*, 85. [[Link](#)]
27. An, F.; Yang, G.; Tian, J. M.; Wang, S.; Antioxidant effects of the orientin and vitexin in *Trollius chinensis* Bunge in D-galactose-aged mice. *Neural Regeneration Research* **2012**, *7*, 2565. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
28. Li, X.; Jiang, Q.; Wang, T.; Liu, J.; Chen, D.; Comparison of the Antioxidant Effects of Quercitrin and Isoquercitrin: Understanding the Role of the 6 -OH Group. *Molecules* **2016**, *21*, 1246. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
29. Li, X.; Ouyang, X.; Liang, M.; Chen, D.; Comparative Analysis of Radical Adduct Formation (RAF) Products and Antioxidant Pathways between Myricetin-3-*O*-Galactoside and Myricetin Aglycone. *Molecules* **2019**, *24*, 2769. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
30. Shahidi, F.; Zhong, Y.; Lipid oxidation and improving the oxidative stability. *Chemical Society Reviews* **2010**, *39*, 4067. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
31. Kandaswami, C.; Middleton Jr., E.; *Em Free Radical Scavenging and Antioxidant Activity of Plant Flavonoids.*. Armstrong, D., Eds. Springer: Boston, 1994. [[Crossref](#)]
32. Liu, W.-N.; Zhao, X.-H.; Changes of the stability and bioactivity of quercetin and myricetin in BGC-823 cells in response to heat treatment and Fe²⁺/Cu²⁺ addition. *Journal of Food Measurement and Characterization* **2019**, *13*, 3285. [[Crossref](#)]
33. Ramos-Pineda, A. M.; García-Estévez, I.; Dueñas, M.; Escribano-Bailón, M. T.; Effect of the addition of mannoproteins on the interaction between wine flavonols and salivary proteins. *Food Chemistry* **2018**, *264*, 226. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
34. Cao, H.; Yi, L.; Zhong, J.; Högger, P.; Wang, M.; Prieto, M.-A.; Simal-Gandara, J.; Xiao, J.; Investigation of new products and reaction kinetics for myricetin in DMEM via an in situ UPLC-MS-MS analysis. *Food Frontiers* **2020**, *1*, 243. [[Crossref](#)]
35. Feitosa, J. M.; Santos, R. C.; Ramos, R. M.; Lima, M. E. N.; Siqueira, J. S.; Lima, V. S.; da Silva, G. C.; Phychemical characterization, preliminary toxicity and biological potential of *Cissus sicyoides* leaves *Research, Society and Development* **2021**, *10*, e31710615771. [[Crossref](#)]
36. Barbosa, W. L. R.; Vincieri, F. F.; Gallori, S.; Pinto, L. N.; Silva, A. S. B.; Anunciação, J. N.; Characterisation of flavonoid glycosides in pharmacopoeial preparation of *Cissus verticillata* (l. nicolson & c. e. jarvis) using HPLC-DAD and HPLC-MS. *Internacional Journal of Pharmarceutical Sciences and Research* **2013**, *4*, 3871. [[Crossref](#)]
37. Sinhoin, A. P.; Godoy, B. S. A.; Sinhoin, V. D. G.; Castoldi, L.; Sugui, M. M.; Bicudo, R. C.; First phytochemical study and biological activity of the leaves ethanolic extract from *Cissus spinosa* Cambess. *Scientia Medica* **2020**, *30*, e34860. [[Crossref](#)]