



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Marianne Pinheiro Teixeira

**ESTUDO FITOQUÍMICO, DAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS E DO  
EFEITO ANTI HIPERGLICEMIANTE DA *Sida rhombifolia* LINN  
(MALVACEAE) SOBRE PARÂMETROS BIOQUÍMICOS E  
HEMATOLÓGICOS**

Santa Maria, RS

2023

Marianne Pinheiro Teixeira

ESTUDO FITOQUÍMICO, DAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS E DO EFEITO ANTI  
HIPERGLICEMIANTE DA *Sida rhombifolia* LINN (MALVACEAE) SOBRE  
PARÂMETROS BIOQUÍMICOS E HEMATOLÓGICOS

Tese apresentada ao curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito para obtenção do título de Doutora em Ciências Farmacêuticas, Área de Concentração Desenvolvimento e Avaliação de Produtos Farmacêuticos.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Liliane de Freitas Bauermann

Santa Maria, RS

2023

Teixeira, Marianne Pinheiro

Estudo fitoquímico, das atividades biológicas e do efeito anti hiperglicemiante da *Sida rhombifolia* Linn. (MALVACEAE) sobre parâmetros bioquímicos e hematológicos. / Marianne Pinheiro Teixeira.- 2023.

86 p.; 30 cm

Orientadora: Liliane de Freitas Bauermann  
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, RS, 2023

1. *Sida rhombifolia* 2. Guanxuma 3. plantas medicinais  
I. Bauermann, Liliane de Freitas II. Título.

**MARIANNE PINHEIRO TEIXEIRA**

**ESTUDO FITOQUÍMICO, DAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS E DO EFEITO  
ANTI HIPERGLICEMIANTE DA *Sida rhombifolia* LINN. (MALVACEAE) SOBRE  
PARÂMETROS BIOQUÍMICOS E HEMATOLÓGICOS**

Tese apresentada ao curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito para obtenção do título de Doutora em Ciências Farmacêuticas, Área de Concentração Desenvolvimento e Avaliação de Produtos Farmacêuticos.

**Aprovado em 13 de dezembro de 2023:**

---

**Liliane de Freitas Bauermann, Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> (UFSM)  
(Presidente/Orientador)**

---

**Gilberti Helena Hübscher Lopes, Prof.<sup>a</sup>Dr.<sup>a</sup> (UFSM)**

---

**Maria Amália Pavanato, Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> (UFSM)**

---

**Ricardo Bizogne Souto, Prof. Dr. (UFBA)**

---

**Amanda Leitão Gindri, Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> (URI)**

Santa Maria, RS  
2023

Aos meus queridos pais, avós e demais  
ancestrais por terem tecido o meu caminho,  
imensa gratidão pela imensidão dos seus  
sonhos que, de alguma forma, são hoje a minha  
realidade.

## AGRADECIMENTOS

Minha gratidão a Deus e à Nossa Senhora Aparecida, sua benevolência se manifestou em incentivo, amizades, suporte, apoio, parcerias, colaborações e conhecimento, através de muitas pessoas que estiveram me acompanhando nesta jornada.

Agradeço a esta Universidade, aos professores, servidores e colaboradores pela oportunidade, correções e ensinamentos que me permitiram apresentar um melhor desempenho no meu processo de formação profissional ao longo do curso.

Minha gratidão especial à professora Liliane por sua generosidade, paciência e carinho, além de uma orientadora incrível é uma amiga querida, e magnanimamente compartilhou sua vasta sabedoria. Tudo isso se resumiria em uma simples frase de Isaac Newton, “se conseguimos ver mais longe hoje, foi por estar de pé sobre os ombros de gigantes”.

Agradeço ao professor José Edson, por sua generosidade, pois em um dos momentos mais complicados desta jornada, mostrou sua sapiência e humanidade, será sempre um grande exemplo pessoal e profissional.

Agradeço às professoras Gilberti, Maria Amália, Marta, Daniela, Tatiane e Cinthia pelas colaborações, os seus ensinamentos lapidaram e continuarão a lapidar nossos conhecimentos em cada momento de nossas vidas.

Agradeço a Vanessa, por toda amizade, ajuda, disponibilidade e apoio em todos esses anos de trabalho, junto com Maiara e Marina, são os melhores exemplos de amigas, que se pode conhecer numa Pós-graduação. Agradeço ao Robson, Sabrina e Gustavo pela disponibilidade, suporte, auxílio e por compartilharem seu conhecimento no desenvolvimento de atividades. Agradeço a Gabriela, querida IC, pela disponibilidade e dedicação. Agradeço aos colegas de laboratório pelas trocas oportunizadas e amizade construída nesse tempo.

Gratidão à minha mãe Ana Maria, palavras nunca serão suficientes para retribuir tantos anos de amor e dedicação. Todos os seus conselhos me tornaram capaz de encarar qualquer desafio e eu sinto muito orgulho de ser sua filha. Gratidão a minha irmã Taianne, avó Neuza, tia Anira e pai Antônio agradeço pelo companheirismo, pela cumplicidade e pelo apoio em todos os momentos da minha vida. Aos demais familiares meu coração se enche de alegria por todo carinho, apoio e incentivo em todos os momentos.

Agradeço a todos que participaram e contribuíram, direta ou indiretamente, no desenvolvimento deste trabalho de pesquisa, enriquecendo o meu processo de aprendizado. Às pessoas com quem convivi ao longo desses anos de curso, que me incentivaram e que certamente tiveram impacto na minha formação acadêmica.

Agradeço às minhas queridas chefes do trabalho, Fabricia e Carla, pela flexibilidade, compreensão e apoio nesse período. Aos colegas da 4ª Coordenadoria Regional de Saúde, sou grata pelas vibrações positivas, torcida e apoio.

Agradeço a cada um de meus amigos, pelo carinho, presença e pela dádiva da amizade... pessoas que admiro, pessoas que tenho como exemplo... guardo no coração.

Hoje transbordo de felicidade pela finalização deste trabalho, que trouxe desafios e maturidade, alargou meus conhecimentos e enriqueceu de experiências, representa muito mais que um curso e sim a realização de um sonho. Por fim, agradeço a Energia Cósmica, aos meus mentores espirituais e anjos da guarda, pois sem força divina, nenhuma conquista seria possível.

## RESUMO

### **Estudo fitoquímico, das atividades biológicas e do efeito anti hiperglicemiante da *Sida rhombifolia* Linn. (MALVACEAE) sobre parâmetros bioquímicos e hematológicos.**

AUTORA: Marianne Pinheiro Teixeira  
ORIENTADORA: Liliane de Freitas Bauermann

A espécie *Sida rhombifolia* Linn, popularmente conhecida como “guanxuma”, possui diversos usos terapêuticos populares. Portanto este estudo teve como objetivo investigar o extrato etanólico da espécie o qual foi submetido a testes qualitativos e quantitativos quanto ao teor de metabólitos secundários utilizando métodos espectrométricos e testes cromatográficos para traçar seu perfil o estudo também descreve o potencial antioxidante através do DPPH e Testes ABTS e espectro celular. Também analisar a atividade hipoglicemiante e hipolipemiante em ratos Wistar. Para esta avaliação, o extrato foi administrado por via oral em ratos Wistar hígidos e diabéticos induzidos por dieta hipercalórica e ação adjuvante da estreptozotocina. Os animais (n=25) foram divididos em 5 grupos e avaliados periodicamente quanto à glicemia, ingestão hídrica, ingestão alimentar e perda de peso. Ao final do estudo foram coletados sangue, rim, coração e baço para avaliação de parâmetros bioquímicos (glicemia, hepáticos (AST e ALT), renais (creatinina) e lipídicos (colesterol total) e adipocinas inflamatórias) e parâmetros hematológicos. O teor de polifenóis totais foi  $134,0 \pm 0,25$  mg/g, flavonóides totais  $14,46 \pm 0,05$  mg/g e taninos condensados  $30,7 \pm 0,11$  mg/g de VHS. Na análise por HPLC-MS, o composto com maior concentração foi a isoquercetrina ( $3,00 \pm 0,077$  mg/g), seguida pelos resultados da apigenina ( $2,02 \pm 0,01$  mg/100g) e resultados do kaempferol ( $135,87 \pm 0,01$  mg/g). Na análise CG-DIC, específica para ácidos graxos, as maiores concentrações foram de ácidos palmítico, linoléico e alfa-linolênico, respectivamente. O método DPPH apresentou valor de IC50 de  $1554,92 \pm 0,18$  µg/mL e ABTS o valor de FRS% foi de 101,8. Os resultados do MTT não contêm concentração de efeito citotóxico. Os dados observados nesta pesquisa mostram potencial terapêutico na espécie. O extrato de folhas de *Sida rhombifolia*, nas doses de 200 e 400 mg/kg/dia, apresentou algumas interferências fisiológicas positivas, mas moderadas em alguns parâmetros hematológicos e bioquímicos característicos do diabetes. A análise dos resultados obtidos neste trabalho sugere que novos ensaios com doses superiores às utilizadas são necessários para verificar a eficácia da VHS. Os grupos tratados com *S. rhombifolia* apresentaram maior consumo alimentar e peso corporal, e menores índices glicêmicos, a planta melhorou o perfil de interleucinas e adipocinas inflamatórias.

**Palavras-chave:** Guanxuma. Plantas medicinais. Malvaceae.



## ABSTRACT

### **Phytochemical study, biological activities and anti-hyperglycemic effect of *Sida rhombifolia* Linn. (MALVACEAE) on biochemical and hematological parameters.**

AUTORA: Marianne Pinheiro Teixeira  
ORIENTADORA: Liliane de Freitas Bauermann

The species *Sida rhombifolia* Linn, popularly known as “guanxuma”, has several popular therapeutic uses. Therefore, this study aimed to investigate the ethanolic extract of the species, which was subjected to qualitative and quantitative tests regarding the content of secondary metabolites using spectrometric methods and chromatographic tests to outline its profile. The study also describes the antioxidant potential through DPPH and ABTS tests. and cellular spectrum. Also analyze the hypoglycemic and lipid-lowering activity in Wistar rats. For this evaluation, the extract was administered orally to healthy and diabetic Wistar rats induced by a high-calorie diet and the adjuvant action of streptozotocin. The animals (n=25) were divided into 5 groups and periodically evaluated for blood glucose, water intake, food intake and weight loss. At the end of the study, blood, kidney, heart and spleen were collected to evaluate biochemical parameters (glycemia, liver (AST and ALT), kidney (creatinine) and lipid (total cholesterol) and inflammatory adipokines) and hematological parameters. The content of total polyphenols was  $134.0 \pm 0.25$  mg/g, total flavonoids  $14.46 \pm 0.05$  mg/g and condensed tannins  $30.7 \pm 0.11$  mg/g of VHS. In the HPLC-MS analysis, the compound with the highest concentration was isoquercetrin ( $3.00 \pm 0.077$  mg/g), followed by the results of apigenin ( $2.02 \pm 0.01$  mg/100g) and results of kaempferol ( $135.87 \pm 0.01$  mg/g). In the CG-DIC analysis, specific for fatty acids, the highest concentrations were palmitic, linoleic and alpha-linolenic acids, respectively. The DPPH method presented an IC<sub>50</sub> value of  $1554.92 \pm 0.18$  µg/mL and ABTS the FRS% value was 101.8. MTT results do not contain cytotoxic effect concentration. The data observed in this research shows therapeutic potential in the species. *Sida rhombifolia* leaf extract, at doses of 200 and 400 mg/kg/day, showed some positive, but moderate, physiological interferences in some hematological and biochemical parameters characteristic of diabetes. Analysis of the results obtained in this work suggests that new trials with doses higher than those used are necessary to verify the effectiveness of ESR. The groups treated with *S. rhombifolia* showed higher food consumption and body weight, and lower glycemic indexes, the plant improved the profile of interleukins and inflammatory adipokines.

**Keywords:** *Sida rhombifolia*. Guanxuma. Medicinal plants.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1.</b> Organograma de Planejamento Experimental .....	18
<b>Figura 2.</b> Estresse oxidativo e diabetes .....	21
<b>Figura 3.</b> Classificação dos antioxidantes: enzimáticos e não enzimáticos .....	26
<b>Figura 4.</b> <i>Sida rhombifolia</i> . Vista superior (A) e lateral (B) .....	29

### Manuscrito 1

<b>Figure 1.</b> Chromatogram obtained by injection of the ethanolic extract of <i>Sida rhombifolia</i> , profile of phenolic compounds .....	40
<b>Figure 2.</b> Essay regarding the radical ABTS .....	40
<b>Figure 3.</b> MTT- ESR toxicity against the 3T3 and HT-29 cell lines, expressed by the percentage of cell viability. Note: Data are presented as mean $\pm$ standard error. Where $p < 0.05$ . .....	41

### Manuscrito 2

<b>Figure.</b> Design experimental. ....	47
<b>Figure 1.</b> Water (mL) and food intake (g). Data are expressed as mean $\pm$ SD from 5 animals per group. * $p < .05$ from G1; @ $p < .05$ from G2. ....	64
<b>Figure 2.</b> Serum concentration of Cytokines expressed in pg/mL. IL-1 (A); IL-6 (B); IL-10 (C) and IFN $\gamma$ (D) Data were expressed as mean $\pm$ SD from 5 animals per group. * $p < .05$ from G1; @ $p < .05$ from G2; # $p < .05$ from G3 and, & $p < .05$ from G4. ....	65

## LISTA DE TABELAS

### Manuscrito 1

<b>Table 1.</b> Phytochemical evaluation of the aerial parts of <i>Sida rhombifolia</i> .....	38
<b>Table 2.</b> Gas chromatography coupled with mass spectrometry: specific analysis of fatty acids .....	39

### Manuscrito 2

<b>Table 1.</b> Means and standard deviations of weekly casual plasma glucose levels (mg/dL) of the experimental groups (G) during the 28-day period of in vivo treatment. Data were expressed as mean $\pm$ SD from 5 animals per group. *p < .05 from G1; @ p < .05 from G2. ....	62
<b>Table 2.</b> Mean and standard deviation of erythrocyte and platelet counts and evaluation of mean corpuscular volume (MCV) and Mean Corpuscular Hemoglobin Concentration (MCHC) indices. Data were expressed as mean $\pm$ SD from 5 animals per group. *p < .05 from G1; @ p < .05 from G2. ....	62
<b>Table 3.</b> Mean and standard deviation of leukogram. Data were expressed as mean $\pm$ SD from 5 animals per group. *p < .05 from G1; @ p < .05 from G2. ....	62
<b>Table 4.</b> Assessment of the antihyperglycemic effect and other biochemical parameters, such as glucose, total cholesterol and liver function marker enzymes (AST and ALT) and kidney function (creatinine), ex vivo. Data were expressed as mean $\pm$ SD from 5 animals per group. *p < .05 from G1; @ p < .05 from G2; # p < .05 from G3 and, & p < .05 from G4. ....	62
<b>Table 5.</b> Serum concentration of Adipokines and glucocorticoids. Data were expressed as mean $\pm$ SD from 5 animals per group. *p < .05 from G1; @ p < .05 from G2; # p < .05 from G3 and, & p < .05 from G4. ....	63

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

**3T3** linhas celulares de fibroblastos embrionários de camundongos

**ABTS** radical 2,2-azinobis (3-etilbenzotiazolína-6-ácido sulfônico)

**ACTH** hormônio adrenocorticotrófico

**ADA** Associação americana de diabetes

**AdipoQ** adiponectina

**ANOVA** análise de variância unidirecional

**AsA** ascorbato

**ASP** proteína estimuladora da acilação

**AST** aspartato aminotransferase

**ALT** alanina aminotransferase

**CAT** catalase

**CG-DIC** cromatografia Gasosa acoplado a ionização de chama

**CEUA** Comissão de Ética no Uso de Animais

**CFT** concentração total de compostos fenólicos

**CRE** creatinina

**CT** ou **CHOL** colesterol total

**DAC** doença arterial coronariana

**DM** diabetes mellitus

**DM2** diabetes tipo 2

**DNA** ácido desoxirribonucleico, do inglês deoxyribonucleic acid

**DP** desvio padrão

**DPPH** 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl

**DCV** doenças cardiovasculares

**EDTA** ethylenediamine tetraacetic acid

**ELISA** Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay

**EROs** espécies reativas de oxigênio

**ESR** ou **EBSR** extrato bruto de *Sida rhombifolia*

**FDA** Federal Drug Administration

**FT** concentração total de flavonóides

**G1 Group 1**, grupo 1, controle normal: os animais receberam dieta regular e tratados com água

**G2 Group 2**, grupo 2, controle diabético: animais diabéticos tratados com água

**G3 Group 3**, grupo 3, controle positivo: animais diabéticos tratados com metformina (250 mg / kg)

**G4 Group 4**, grupo 4, animais diabéticos tratados com extrato de *S. rhombifolia* (200 mg / kg)

**G5 Group 5**, grupo 5, animais diabéticos tratados com extrato de *S. rhombifolia* (400 mg / kg)

**GC- MS** cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas

**GSH** glutationa

**HAS** hipertensão arterial sistêmica

**HDL-c** lipoproteína de alta densidade

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>** peróxido de hidrogênio

**HPLC** high pressure liquid chromatography

**HT-29** linhagem celular de adenocarcinoma colorretal humano com morfologia epitelial

**IDF** International Diabetes Federation

**IL-1** interleucina 1

**IL-6** interleucina 6

**IL-8** interleucina 8

**IL-10** interleucina 10

**IFN- $\gamma$**  interferon gama

**LDL-c** lipoproteína de baixa densidade

**LPO** peroxidação lipídica

**MCHC** Concentração de hemoglobina corpuscular média, do inglês *Mean Cell Corpuscular Hemoglobin Concentration*

**MCV** Volume corpuscular médio, do inglês *Mean Corpuscular Volume*

**MTT** brometo de 3-(4,5- dimetiltiazol -2-il)-2,5- difenil tetrazólio

**OMS** Organização Mundial da Saúde

**OPAS** Organização Pan-Americana da Saúde

**O<sub>2</sub>** oxigênio molecular

**O<sub>2</sub> •** radical superóxido

**OH•** radical hidroxila

**PAI-1** inibidor-1 do ativador do plasminogênio

**PDA** Photodiode Array Detectors

**pH** potencial hidrogeniônico

**RBC** glóbulos vermelhos

**REPLAME** Relação Estadual de Plantas Medicinais de interesse do Sistema Único de Saúde no Rio Grande do Sul

**RNA** ácido ribonucleico do inglês *ribonucleic acid*

**RNL** razão neutrófilos/linfócitos

**RS** Rio Grande do Sul

**SES** Secretaria de estado da saúde

**SRS%** percentual de sequestro de radicais livres

**STZ** estreptozotocina

**TBA** Ácido tiobarbitúrico

**TBARS** Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

**TNF- $\alpha$**  interferon alfa

**TG** triglicérides

**UFSM** Universidade Federal de Santa Maria

## Sumário

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	17
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	19
2.1 Objetivo geral .....	19
2.2 Objetivos específicos .....	10
<b>3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	20
3.1 Diabetes .....	21
3.2 Dislipidemias.....	24
3.3 Plantas medicinais e políticas públicas na saúde	
3.4 Uso da atividade antioxidante de plantas medicinais no diabetes e nas dislipidemias .....	24
3.5 <i>Sida rhombifolia</i> .....	28
3.4.1 Usos populares .....	29
3.4.2 Composição química e estudos de atividades farmacológicas .....	29
<b>4. DESENVOLVIMENTO</b> .....	31
4.1 Manuscrito 1 .....	32
4.1.1 Abstract .....	34
4.1.2 Introduction .....	35
4.1.3 Results and discussion .....	35
4.1.4 Conclusion .....	37
4.1.5 References .....	38
4.1.6 Supplementary material: methodology .....	42
4.2 Manuscrito 2 .....	46
4.2.1 Abstract .....	47
4.2.2 Introduction .....	48
4.2.3 Material and Methods .....	48
4.2.4 Statistical Analysis .....	52
4.2.5 Results and Discussion .....	52
4.2.6 Conclusion .....	57
4.2.7. References .....	58
<b>5. DISCUSSÃO GERAL</b> .....	<b>64</b>

<b>7. CONCLUSÃO GERAL .....</b>	<b>69</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>68</b>
<b>ANEXO A - COMPROVANTE DE CADASTRO NO SisGen .....</b>	<b>75</b>
<b>ANEXO B - CERTIFICADO DE APROVAÇÃO DA CEUA .....</b>	<b>76</b>
<b>ANEXO C - COMPROVANTE DE PUBLICAÇÃO .....</b>	<b>77</b>
<b>ANEXO D - DIRETRIZES PARA PUBLICAÇÃO .....</b>	<b>78</b>
<b>ANEXO E - COMPROVANTE DE SUBMISSÃO .....</b>	<b>80</b>
<b>ANEXO F - DIRETRIZES PARA PUBLICAÇÃO .....</b>	<b>81</b>



## 1. INTRODUÇÃO

O Diabetes tipo 2 (DM2) tornou-se um grave problema de saúde pública mundial (LEY, 2018). De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), no Brasil, o problema atinge aproximadamente 17 milhões de pessoas (2021). O país ocupa a quinta colocação em número de casos em 2021 segundo dados da Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS). Dados divulgados na décima edição do Atlas do Diabetes, da Federação Internacional de Diabetes (IDF, sigla em inglês), mostram que 537 milhões de pessoas têm diabetes no mundo. Entre 2019 e 2021, houve um aumento de 74 milhões de casos (Federação Internacional de Diabetes). O excesso de peso e a obesidade corporal ou abdominal também contribuem para o desenvolvimento de dislipidemias (CATAPANO et al., 2016). Estima-se que até 2025, metade da população sofrerá de alguma doença crônica degenerativa (OMS, 2018).

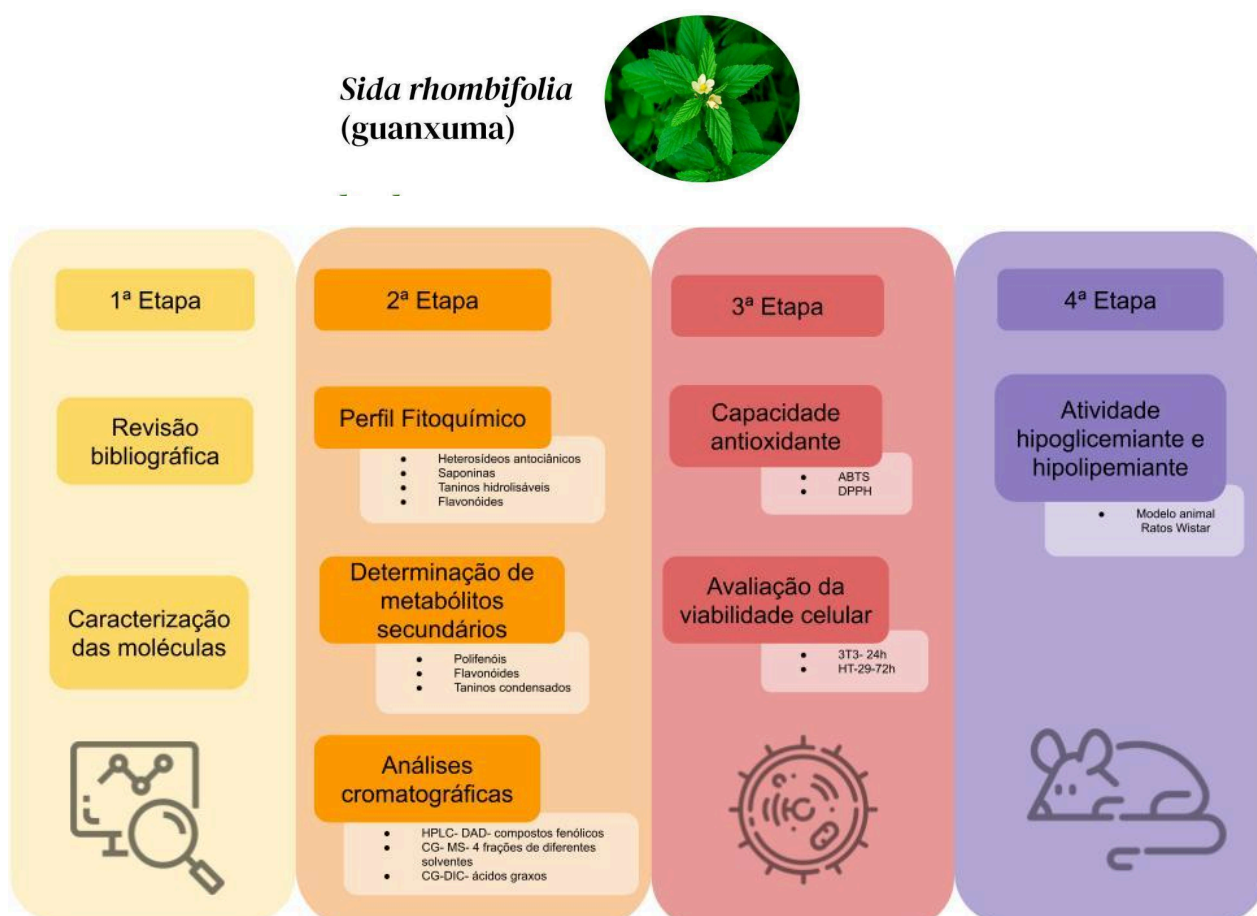
A resistência à insulina no músculo e no fígado são as primeiras anomalias detectáveis na história natural do DM2. Com o tempo, a falha progressiva das células  $\beta$ -pancreáticas ocorre e, na presença de resistência à insulina, os indivíduos progridem da tolerância normal à glicose para a tolerância diminuída à glicose, conseqüentemente, para o DM2 (DEFRONZO, 2018).

Tal característica metabólica acarretada pela resistência à insulina e em consequência há um estado de hiperinsulinemia (ou seja, níveis aumentados de insulina no sangue podem demonstrar uma resposta a um estado inflamatório). Do ponto de vista metabólico, os ácidos graxos livres fornecidos pelo tecido adiposo na lipólise induzem resistência à insulina (no caso de DM2) na utilização periférica de glicose, assim como exercem efeito inibitório sobre a secreção de insulina pela célula beta, constituindo assim a chamada lipotoxicidade, que está relacionada ao fato de que os ácidos graxos, mesmo configurando-se uma via alternativa de energia celular, tornam-se tóxicos quando se encontram em concentrações cronicamente elevadas (COSTA, 2019; NELSON; REUSCH, 2014). Outro efeito adverso da hiperglicemia crônica é a glicotoxicidade caracterizada pelo efeito tóxico direto da hiperglicemia nas células  $\beta$  das ilhotas pancreáticas (COSTA, 2019).

Estratégias de gestão do DM2, incluindo modificações no estilo de vida, apoio social e garantia da adesão ao tratamento farmacológico, são fundamentais para reduzir a incidência de complicações do DM2 (ZHENG et al., 2018).

Os tratamentos usuais para DM incluem a insulinoterapia, através do uso da insulina exógena, e a administração de drogas alopáticas como sulfoniluréias (glibenclamida), biguanidas (metformina) e inibidores da alfa-glicosidase (acarbose e miglitol), podendo ou não ser administradas em conjunto (HSU et al., 2009). A espécie *Sida rhombifolia* L. é conhecida por sua grande variedade de usos etnofarmacológicos, como fortificante, diurética, antidiarreica, antisséptica, antibiótica, tônica e anti-inflamatória e entre eles destaca-se o tratamento do diabetes (LAILI et al., 2022; THOUNAOJAM et al., 2011). Nesse contexto, este projeto tem por objetivo determinar a composição química e analisar as biomoléculas através de parâmetros físico-químicos, farmacocinéticos e toxicológicos *in silico* e *in vitro*, e ainda avaliar a eficácia da atividade hipoglicemiante e hipolipemiante considerando a atividade antioxidante da *S. rhombifolia* (malvaceae).

**Figura 1.** Organograma de Planejamento Experimental



Fonte: (TEIXEIRA, M. P., 2022)

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL:

Determinar o perfil fitoquímico do extrato da *Sida rhombifolia*, atividade antioxidante e viabilidade celular, como também avaliar as atividades anti hiperglicemiante e anti hiperlipemiante em ratos saudios e ratos diabéticos.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

-Preparar o extrato hidroetanólico 70% da planta em estudo através de maceração;

- Determinar o perfil fitoquímico das partes aéreas *S. rhombifolia*;

-Avaliar a viabilidade celular do extrato *in vitro*;

- Verificar a atividade antioxidante do vegetal através dos ensaios DPPH e ABTS;

-Avaliar a ingestão hídrica, ingestão de alimentos, peso corpóreo, glicemia casual em ratos saudios e ratos diabéticos;

-Analisar o efeito antidiabético do extrato da *S. rhombifolia* através da peroxidação lipídica, atividade antioxidante enzimática, marcadores inflamatórios e concentrações de adipocinas;

-Analisar os parâmetros hematológicos e bioquímicos dos ratos *Wistar* após o final do período de tratamento dos animais dos ratos saudios e diabéticos.

### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

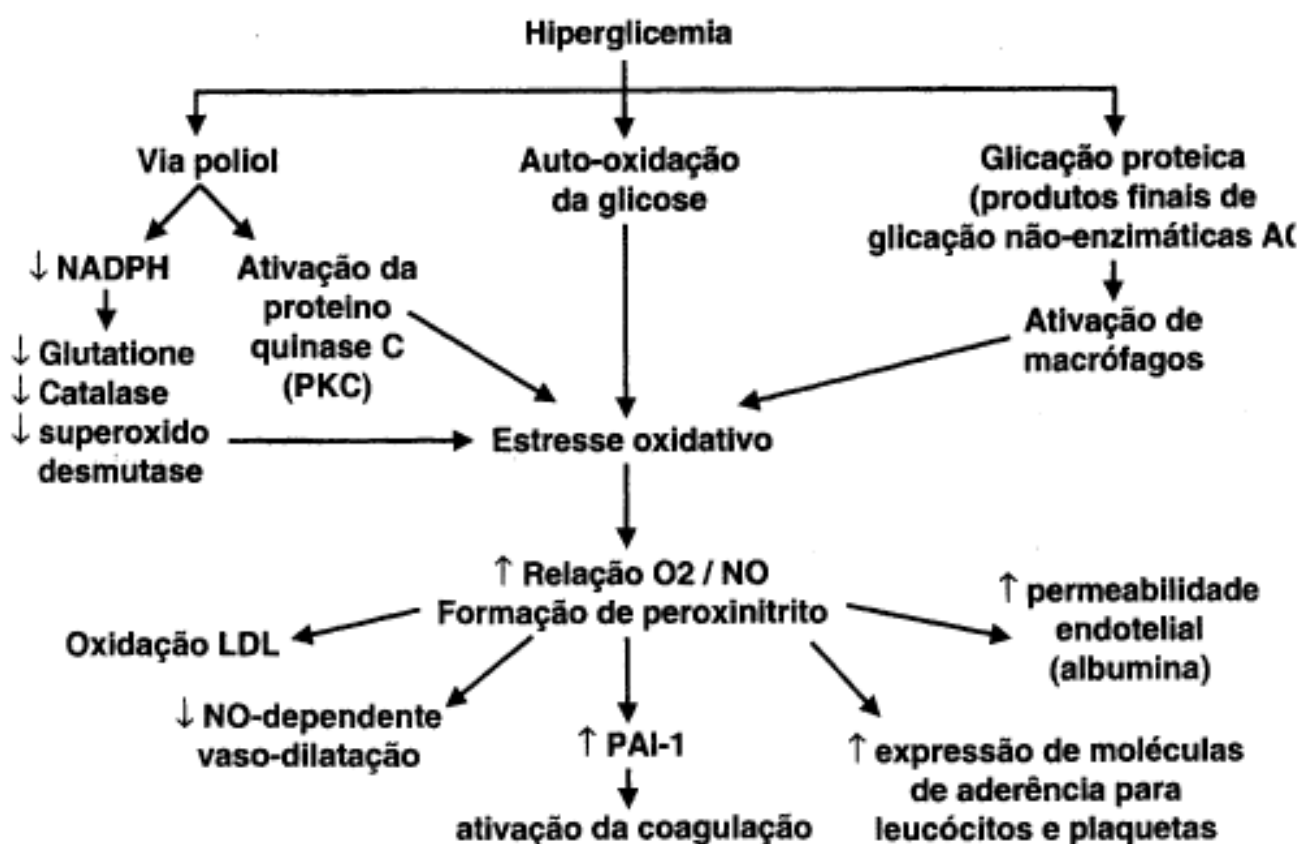
#### 3.1 DIABETES

Diabetes *mellitus* (DM) é uma doença metabólica crônica não transmissível de origem multifatorial caracterizada pela elevação permanente dos níveis glicêmicos decorrente da ausência e/ou incapacidade da insulina de exercer sua função fisiológica, gerando uma série de complicações e disfunções de órgãos essenciais (LIMA et al., 2018).

Os sintomas da hiperglicemia acentuada no paciente diabético incluem poliúria (aumento do volume urinário) polidipsia (aumento da ingestão hídrica), polifagia (aumento da ingestão alimentar) e significativa perda de peso (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2011; LEAL RUIZ et al., 2018). O controle do metabolismo da glicose é mantido através de um sistema hormonal integrado composto pela insulina, hormônio hipoglicemiante, e alguns hormônios hiperglicemiantes como glucagon, cortisol, adrenalina e hormônio de crescimento (ALBUQUERQUE; PIMAZONI NETTO, 2008).

O diabetes *mellitus* Tipo 2 (DM2) ocorre quando o organismo não consegue utilizar adequadamente a insulina que produz; ou não produz insulina suficiente para controlar a taxa de glicemia (SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2023). A insulino-resistência, tanto sistêmica como vascular, tem sido associada à maior incidência de hipertensão e dislipidemia, assim como à tolerância diminuída à glicose, facilitando o processo aterosclerótico e conseqüentemente o desenvolvimento de Doenças Cardiovasculares (AGUIAR et al., 2019; LOW WANG et al., 2016). Existem evidências epidemiológicas que enfatizam os múltiplos fatores de risco comportamentais, metabólicos e genéticos do DM2. Excesso de gordura corporal, especialmente a obesidade central, é o maior fator de risco para DM2 (LEY, 2018), o tecido adiposo torna-se inflamado, devido a infiltração de macrófagos e a produção de citocinas inflamatórias pelas células adiposas, que geram uma cascata de inflamação e estresse oxidativo (AROR, 2013; FARIA, 2019), representado na Figura 1.

Figura 2. Estresse oxidativo e diabetes.



Fonte: (WAJCHENBERG, 2002).

A obesidade é a doença crônica progressiva mais comum: aproximadamente pelo menos 30% dos homens e 35% das mulheres são obesos em todo o mundo (DENG et al, 2022; SABBÁ et al., 2022). Está bem estabelecido que a obesidade, caracterizada por uma ativação crônica do sistema imune e de vias inflamatórias, é um fator crítico no desenvolvimento de resistência à insulina e do DM2 (FARIA et al., 2019).

Existem evidências de que o sobrepeso e a obesidade possam causar disfunção microvascular caracterizada por sensibilidade à insulina diminuída; ativação do sistema nervoso simpático; e resistência vascular periférica aumentada. Ainda, estudos como Scalia et al. (2013) sugerem que alterações na secreção de adipocinas levam ao aumento dos níveis de ácidos graxos livres e mediadores inflamatórios também envolvidos.

A maior parte das doenças metabólicas e cardiovasculares está relacionada à ação do tecido adiposo como órgão endócrino, uma vez que os adipócitos sintetizam diversas substâncias como adiponectina, glicocorticóides, Fator de necrose tumoral (sigla em inglês  $TNF\alpha$ ), hormônios sexuais, interleucina-6 (IL-6) e leptina, que atuam no metabolismo e controle de diversos sistemas (AHIMA et al., 2000; ROMERO et al., 2006). As adipocinas inflamatórias são proteínas de baixo peso molecular, com diversas funções metabólicas e endócrinas, que participam da inflamação e resposta do sistema imune. São consideradas como fatores de risco independentes para doenças da artéria coronária e cerebrovascular (CARVALHO et al., 2006). As principais fontes de adipocinas são os tecidos adiposos subcutâneo e visceral. A IL-6 e o  $TNF-\alpha$  são adipocinas com função imunológica, e são produzidas pelos adipócitos em resposta a estímulos infecciosos ou inflamatórios (HOFFSTEDT et al., 2004).

A ação da leptina no sistema nervoso central (mais especificamente no hipotálamo), em mamíferos, promove a redução da ingestão alimentar e o aumento do gasto energético, além de regular a função neuroendócrina e o metabolismo da glicose e de gorduras (ROMERO et al., 2006). A grelina está relacionada com outros hormônios, como a leptina e a insulina, no controle alimentar (JÚNIOR et al., 2012). A grelina também inibe a expressão de adiponectina, hormônio este que modula a regulação da glicemia e o catabolismo de ácidos graxos. A redução das concentrações de adiponectina tem implicado a patogênese da resistência à insulina e obesidade (MAGER et al., 2008). Em um estudo japonês realizado com pacientes obesos e não obesos com DM2, os autores chegaram à conclusão de que os níveis plasmáticos diminuídos de grelina ativa estão significativamente associados com adiposidade abdominal, hiperinsulinemia e resistência à insulina em pacientes com DM2 e que a hiperinsulinemia associada com a resistência à insulina podem suprimir os níveis plasmáticos de grelina ativa nesses pacientes (KATSUKI et al., 2004).

### 3.2 DISLIPIDEMIAS

As dislipidemias são causadas por alterações metabólicas que ocorrem em resposta a distúrbios nas etapas do metabolismo lipídico. Como resultado, o perfil lipídico sérico sofrerá alterações e estas podem incluir aumento do colesterol total (CT), dos triglicérides (TG), do colesterol da lipoproteína de baixa densidade (LDL-c)

e diminuição do colesterol da lipoproteína de alta densidade (HDL-c) (BAYNES et al., 2019).

Essas alterações no perfil lipídico contribuem para o desenvolvimento da doença arterial coronariana (DAC), aterosclerose e hipertensão arterial sistêmica (HAS), sendo também secundárias à obesidade, podendo surgir durante a infância e se potencializar durante a vida, de acordo com a combinação de outros fatores, como o estilo de vida, hábitos alimentares e histórico familiar (FRANCA et al., 2006; SOUZA et al., 2019). Estudos transversais com base populacional brasileira com o público-alvo composto por infante-juvenis e adultos apontaram uma prevalência de 22,6% e de 49,7% de dislipidemias nos respectivos grupos (CAMARGO et al., 2021; DA SILVA et al., 2022; TEIXEIRA et al., 2021).

Sabe-se ainda que a interação da hiperglicemia com dislipidemias e outras patologias determinam o curso clínico para retinopatia, neuropatia e nefropatia (microvasculares) e cardiopatias (BRASIL, 2014; DO NASCIMENTO BARBOSA et al., 2018).

### 3.3 PLANTAS MEDICINAIS E POLÍTICAS PÚBLICAS NA SAÚDE

O uso de plantas medicinais e a sua inclusão nos serviços de saúde vêm sendo estimulados desde a década de 1970 pela Organização Mundial da Saúde (BRANDÃO, 2009). Em 2006, o governo do Brasil adotou a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) (BRASIL, 2006a), visando, entre outros, ao estímulo à adoção da fitoterapia nos programas de Saúde Pública. No mesmo ano foi instituída Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (PNPMF) (BRASIL, 2006b).

Uma das diretrizes da PNPMF e da PNPIC é o incentivo à pesquisa e ao desenvolvimento de plantas medicinais e de fitoterápicos, priorizando a biodiversidade do país (BRASIL, 2006a; BRASIL, 2006b). Além de possuir amplo potencial para produção, o país possui também um grande potencial para consumo de fitoterápicos, visto que os Fitoterápicos registraram crescimento de 40,9% em embalagens comercializadas e de 13,2% no faturamento segundo dados do Anuário Estatístico do Mercado Farmacêutico (2022). O perfil epidemiológico associado ao potencial biológico brasileiro corroboram a diabetes como um alvo interessante para a busca de novos métodos de tratamento (LIMA et al., 2018) com a possibilidade de

uso de várias espécies de plantas medicinais. A prevalência do DM ressalta a necessidade de desenvolver drogas potentes por meio da sinergia de diferentes compostos bioativos em uma única molécula para desencadear múltiplas ações de drogas (EGU et al., 2022). Dessa forma, a elaboração de pesquisas sobre uso desses recursos é de grande relevância para a produção de medidas terapêuticas que valorizem as tradições familiares, contribuindo para a redução de custos no tratamento do DM, principalmente na produção de medicamentos, garantindo um acesso maior a população (VIANA et al., 2019).

### 3.4 USO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE PLANTAS MEDICINAIS NO DIABETES E NAS DISLIPIDEMIAS

A formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) é uma consequência inevitável em um organismo aeróbio. Porém, se a redução do oxigênio for incompleta, formam-se espécies reativas desta molécula (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1984; MA, 2010).

Os subprodutos normais da respiração incluem o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), o radical superóxido ( $O_2\bullet$ ) e o radical hidroxila ( $OH\bullet$ ) (CABISCOL et al., 2000; KARIHTALA et al., 2007).

As EROs são uma variedade de moléculas derivadas, portanto, do oxigênio molecular ( $O_2$ ), enquanto os radicais livres são espécies com um ou mais elétrons não pareados. Apesar do oxigênio molecular conter dois elétrons desemparelhados na camada exterior, este não é muito reativo uma vez que ambos os elétrons têm a mesma rotação (HERRERO et al., 2008). A reatividade e toxicidade destas espécies reativas de oxigênio aumentam de acordo com o recebimento de um, dois ou três elétrons formando respectivamente o radical superóxido ( $O_2\bullet$ ), o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e o radical hidroxila ( $OH\bullet$ ). Destas espécies reativas de oxigênio, os radicais superóxido e hidroxila são frequentemente denominados de radicais livres por apresentarem um elétron não pareado em sua órbita mais externa (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1984). Em altas concentrações, as EROs causam danos a estruturas celulares devido à oxidação de proteínas, lipídeos e ácidos nucleicos (DNA e RNA), (KLAUNING; KAMENDULIS, 2004), ocasionando frequentemente a perda da viabilidade celular.

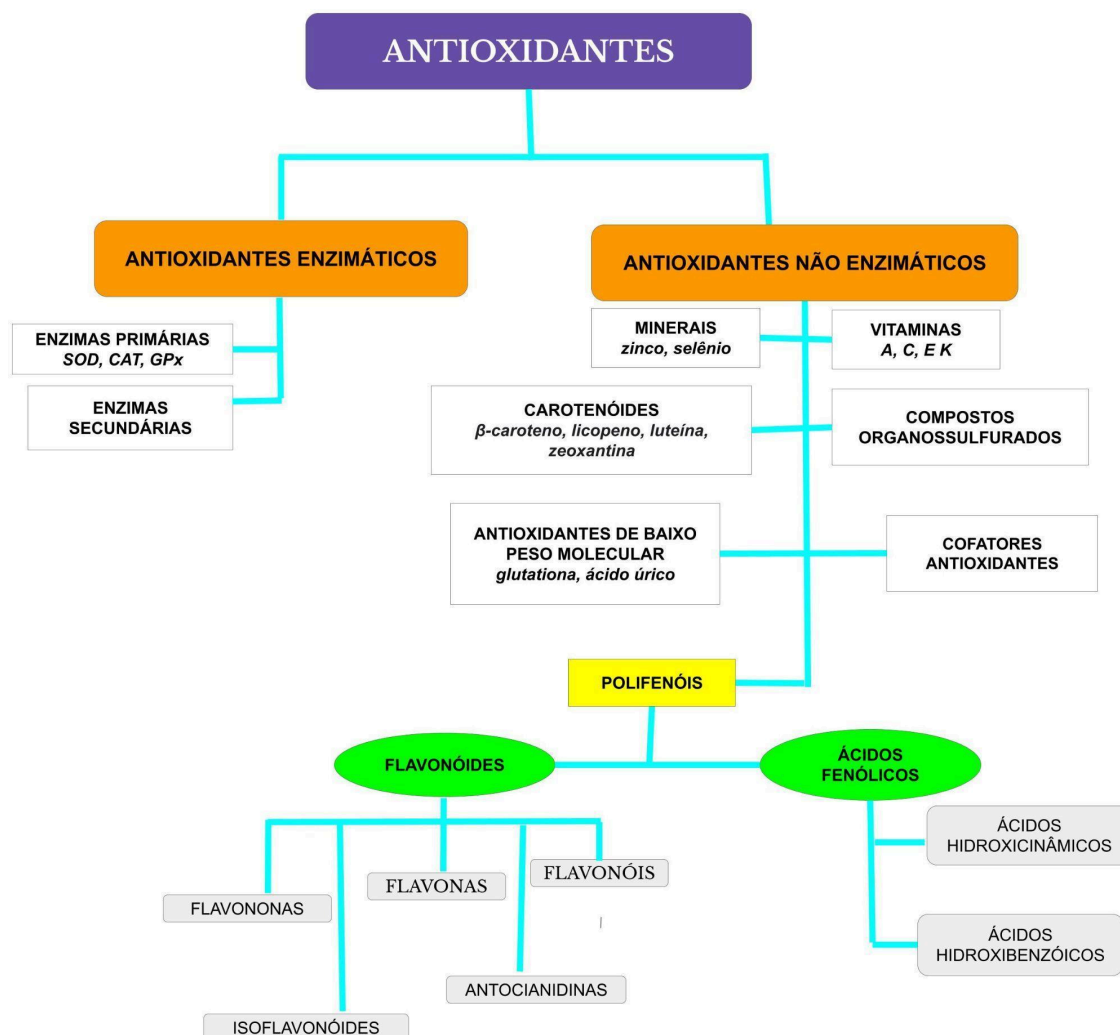


O estresse oxidativo é um desbalanço entre oxidantes e antioxidantes, a favor da oxidação levando a disrupção do controle e sinalização redox e/ou a danos celulares (CORDELLA et al., 2012). Segundo Santos et al. (2022) antioxidantes são moléculas de substâncias químicas que atuam como doadores de elétrons ou agentes redutores, transformando moléculas reativas em produtos relativamente inertes. A capacidade antioxidante pode ser alcançada através da doação de um elétron para o reativo oxidante (JEDRZEJOWSKA et al., 2012).

O sistema de proteção contra os oxidantes são os antioxidantes, classificados em enzimáticos e não enzimáticos (BARBOSA et al., 2010), como podem ser observados na Figura 3. As plantas desenvolveram mecanismos de defesa enzimáticos e não enzimáticos capazes de neutralizar a citotoxicidade das espécies reativas de oxigênio (ROS, do inglês *reactive oxygen species*) (BARBOSA et al., 2014). O sistema enzimático é representado principalmente pelas enzimas Superóxido dismutase, Catalase, Glutathione Peroxidase e Glutathione Redutase (GR) (NETTO et al., 2004; ZIN et al., 2022).

O sistema celular de defesa antioxidante começa com uma cascata enzimática, mas envolve também componentes não enzimáticos, dentre os quais se destacam o ascorbato (AsA), a glutathione (GSH), o  $\beta$ -caroteno e o-tocoferol. Tais antioxidantes podem evitar a formação de radicais livres, sequestrá-los ou promover sua degradação, prevenindo a ocorrência de danos às células das plantas (BARBOSA et al., 2014; SERKEDJIEVA et al., 2011).

**Figura 3.** Classificação dos antioxidantes: enzimáticos e não enzimáticos.



Fonte: (Adaptado de RATNAM et al., 2006; MIRANDA et al., 2014).

A triagem fitoquímica é um procedimento importante para bioprospecção das espécies vegetais de interesse farmacológico e/ou toxicológico (BESSA et al., 2013; MATTOS, 2009). Pois alguns componentes ativos das plantas podem executar mecanismos de ação que baixam os níveis de glicose no sangue. Esses mecanismos são variados, tais como: o aumento da libertação de insulina pelas células- $\beta$  do pâncreas; resistência às hormonas que aumentam a glicemia (glucagon

e somatostatina); aumento do consumo de glicose pelos tecidos e órgãos; poder estimulante da regeneração das células- $\beta$ ; aumento do efeito inibidor contra a enzima inulinase; aumento da síntese de glicogênio hepático ou diminuição da glicogenólise; inibição da absorção intestinal da glucose; etc. (PATEL, et al., 2012).

Estimativas etnobotânicas de 2012 relatam que cerca de 800 plantas que podem possuir propriedades antidiabéticas e mais de 1200 espécies de plantas têm sido testadas com base na etnofarmacologia (PATEL et al., 2012). Algumas plantas medicinais são comprovadamente eficazes para tratamento da DM2, as mais utilizadas são: *Bauhinia forficata* Link; *Cissus sicyoides* L.; *Syzygium cumini* (L) Skeels; *Allium cepa* L., entre outras (SILVA et al., 2017).

O estudo de Cavalli et al. (2007) demonstrou que o extrato bruto da raiz de *Arctium minus*, popularmente conhecida como bardana, nas concentrações de 200 e 500 mg/kg diminuiu os níveis plasmáticos de glicose em ratos, com potência semelhante ao medicamento sintético glibenclamida na dose de 0,071 mg/kg. Kiss et al. (2005) e Macedo et al. (2019) atestaram que o extrato aquoso de *Allium sativum*, o alho, mostrou-se eficiente nas condições experimentais analisadas, em ratas com diabetes induzido por streptozotocina, tratamento com *Allium sativum* nas doses de 200 e 400 mg kg<sup>-1</sup>, podendo este ser utilizado como terapia complementar em pacientes diabéticos. Estudos com a carqueja, *Baccharis trimera*, demonstraram a ação hipoglicemiante da planta (KARAM et al., 2013).

Segundo Rondanelli et. al., (2011), os efeitos benéficos dos extratos de *Cynara scolymus* L., a alcachofra na dose 600 mg/d , na redução dos níveis de glicose já foram demonstrados em diversos estudos em indivíduos. Algumas avaliações, *in vitro*, também demonstram essa atividade hipoglicemiante (SILVA, 2017).

O extrato aquoso de *Cecropia obtusifolia* (Urticaceae) apresentou efeito hipoglicemiante e seu uso terapêutico foi descoberto em experimentos com ratas hiperglicêmicos extrato aquoso na dose de 90 mg / kg (MATEO-RIVERA et al., 2019; REVILLA-MONSALVE et al., 2007). As folhas de *C. spiralis* são matérias-primas vegetais promissoras e ricas fontes de flavonoides bioativos para o desenvolvimento de novos fármacos antidiabéticos, devido às suas ações hipoglicemiantes, antilipidêmicas e antioxidantes (DUARTE et al., 2019).

O tratamento das dislipidemias com a fitoterapia promove o uso da biodiversidade vegetal e seu uso vinculado ao conhecimento tradicional e a

tecnologia para a sua validação (DA SILVA et al., 2022; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014).

Os suplementos contendo *Linum usitatissimum* L., a linhaça, promovem uma melhora notável no perfil lipídico de indivíduos dislipidêmicos e indivíduos saudáveis (MASJEDI et al., 2021; QAMAR et al., 2019).

A espécie *A. sativum* L. (alho), de acordo com Batiha et al. (2020) possui efeitos significativos nas dislipidemias em virtude do seu potencial redutor lipídico (DA SILVA et al., 2022). O vegetal *Avena sativa*, conhecida como aveia, apresenta eficácia ligada às beta-glucanas, as quais demonstraram ação na diminuição dos níveis de LDL-c e de não-HDL-c (CICERO, et al., 2020; DA SILVA et al., 2022; TRAUTWEIN & MCKAY, 2020).

### 3.5 *Sida rhombifolia*

A família Malvaceae inclui 250 gêneros e 4200 espécies distribuídas principalmente nas regiões tropicais do mundo (CAMBRIA et al., 2022; SIMPSON, 2019). O gênero *Sida* é incluído nesta família, e possui em torno de 200 espécies. No Brasil, onde é considerado nativo, apresenta 103 espécies, onde possui ampla distribuição no Nordeste e Sul e em menor extensão no Norte, Centro-Oeste e Sudeste (BOVINI et al., 2015, LAILI et al. 2022; FLORA DO BRASIL, 2019; OLIVEIRA et al., 2019). A espécie *S. rhombifolia* cresce em regiões tropicais e quentes, distribuídas por todo o trópico (LAILI et al. 2022; MABBERLEY, 2000; THOUNAOJAM, 2011).

Também conhecida por guanxuma, mata pasto, vassourinha, relógio é uma planta nativa do continente americano, ocorrendo intensamente na América do Sul. Também ocorre no sul dos Estados Unidos, com menor intensidade (FLORA DO BRASIL, 2019; OLIVEIRA et al., 2019).

A espécie *S. rhombifolia* (Figura 4) está presente na Relação Estadual de Plantas Medicinais de interesse do Sistema Único de Saúde no Rio Grande do Sul e listas complementares (REPLAME/RS), Portaria SES/RS 588/2017 (RIO GRANDE DO SUL, 2017), onde ocupa o 13º lugar entre as plantas medicinais nativas mais utilizadas pela população do Rio Grande Do Sul.

**Figura 4.** *Sida rhombifolia*. Vista superior (A) e lateral (B)

A)



B)



Fonte: (João A. Bagatini)

### 3.4.1 Usos populares

A guanxuma é conhecida por sua grande variedade de usos medicinais. Suas flores são usadas no tratamento de picadas de escorpião, cobra e vespa, seu caule para doenças e feridas na pele, suas raízes tratam distúrbios do estômago, como dor de estômago e problema de digestão. O decocto da raiz pode ser utilizado para malária, flatulência e diarreia, além de disenteria. As raízes e folhas são descritas para tratar a síndrome do intestino irritável, gastrite, enterite, hemorroidas, e diabetes, além de varíola, fadiga (ABAT et al., 2017; CUNHA et al., 2010; LAILI et al., 2022; MAH et al., 2017; THOUNAOJAM et al., 2011). Além disso, frutos da planta são indicados para dor de cabeça e enxaquecas (seus frutos), problemas oculares, conjuntivite, dores de dente (raízes), febre, infecção das gengivas, inchaço, tônica, feridas (raiz e folhas) (SINGH et al., 2010), contra asma (folhas e raízes) (KHEDKAR et al., 2019) oftalmia e inchaço (suas folhas), cortes e feridas (suas folhas) são alguns exemplos para mencionar (ASSAM et al., 2010; LEONARD et al., 2008).

### 3.4.2 Composição química e estudos de atividades farmacológicas

A investigação fitoquímica deste gênero resultou na identificação de cerca de 142 constituintes químicos, dentre os quais alcaloides, flavonoides e ecdisteróides (DEBALKE et al., 2018; MEMBE FEMOE et al., 2022) são os grupos predominantes.

Os extratos brutos e isolados apresentaram um amplo espectro de efeitos farmacológicos *in vitro* e *ex vivo* (DINDA et al., 2015).

Existem relatos de estudos científicos sobre avaliação de atividades biológicas de extratos de diferentes partes morfológicas de *S. rhombifolia*. Em outro relatório, discutiu-se que o extrato metanólico das suas partes aéreas mostrou atividade antiinflamatória em modelo animal (SINGH et al., 2008). Os extratos etanólicos e aquosos de partes aéreas da planta também foram relatados para ser útil no tratamento da artrite (GUPTA et al., 2009).

O extrato aquoso de folhas foi administrado em ratos hiperbilirrubinêmicos e mostraram o potencial desta planta, como fonte de novos medicamentos para indivíduos hiperbilirrubinêmicos (MOHD et al., 2012). O estudo de Narendra, Kannan e Limmy (2010) sugere que o extrato etanólico de *S. rhombifolia* tem atividade antioxidante potente.

As raízes de *S. rhombifolia* suprimem o edema induzido por carragenina em ratos, sendo que o efeito foi comparável ao ibuprofeno (VENKATAKRISHNAN et al., 2014) e indometacina (LOGESWARI et al. 2013). O extrato metanólico de *S. cordifolia* diminuiu a glicose no sangue e, portanto, demonstrou efeito anti-hiperglicêmico em ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina (KAUR et al, 2011). O Extrato etanólico de folhas de *S. rhombifolia* tem efeito cardioprotetor significativo na necrose miocárdica induzida pelo isoproterenol em ratos (THOUNAOJAN et al., 2011).

Experimentos *ex vivo* mostraram que o extrato das folhas de *S. rhombifolia* tem efeito nefroprotetor na nefrotoxicidade induzida por gentamicina em ratos pela diminuição da ureia e creatinina na urina, juntamente com um aumento de antioxidantes renais (THOUNAOJAN et al., 2010). O extrato metanólico de raízes de *S. rhombifolia* pode tratar a diarreia quando esta foi induzida por óleo de mamona em modelos de camundongos (ABAT et al., 2017; SARANGI et al., 2011). O extrato de *n*- hexano possuía atividades farmacológicas relativamente altas em ensaios antiinflamatórios, citotoxicidade e anticolinesterásicos (MAH et al, 2017). O extrato etanólico 70 % de *S. rhombifolia* pode ser mais eficaz sobre cercárias de *S. mansoni* do que o extrato de *S. acuta* (MEMBE FEMOE et al., 2022)

As propriedades antidiabéticas das folhas extraídas aquosas de *S. rhombifolia* usando ratos diabéticos normais e induzida por estreptozotocina também foram relatadas. O extrato mostrou boa hipoglicemia e efeitos hipolipemiantes. Os

resultados foram alegados para fornecer informações científicas e evidência em favor do uso tradicional de *S. rhombifolia* para o tratamento de diabetes *mellitus* (DHALWAL et al., 2010). No entanto, existem lacunas de relatórios sobre a avaliação de atividades hipoglicemiante e hipolipemiante das raízes e conseqüentemente de compostos isolados de suas raízes.

#### 4. DESENVOLVIMENTO

A metodologia, resultados e discussão que fazem parte desta tese estão apresentados sob a forma de dois manuscritos, cada qual estruturado de acordo com as normas das revistas científicas escolhidas para a submissão dos mesmos. O comprovante de cadastro no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen) consta no anexo A, a seguir no anexo B está o comprovante de aprovação na Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFSM.

O Artigo 1 compreende estudos *in vitro*, e é intitulado: “Phytochemical analysis, antioxidant and cytotoxic activities of *Sida rhombifolia* Linn.” publicado no periódico *Journal of Pharmacy and Biological Sciences*, o comprovante de publicação está no anexo C e as normas do periódico constam no anexo D.

O Manuscrito 2 descreve estudos *in vivo* e *ex vivo*. É intitulado: “Evaluation of the antihyperglycemic effect of the crude extract of *Sida rhombifolia* Linn on biochemical and hematological parameters”, e foi submetido no periódico *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*. O comprovante de submissão no anexo E e as normas de publicação estão no anexo F.

#### 4.1 Manuscrito 1

### **Phytochemical analysis, antioxidant activity and cell viability of *Sida rhombifolia* Linn..**

Marianne Pinheiro Teixeira<sup>a\*</sup>, Vanessa Amaral Ribeiro<sup>b</sup>, Sabrina Somacal<sup>d</sup>, Leticia Bueno Machado<sup>b</sup>, Daniela Mathes<sup>b</sup>, Camila Monteiro<sup>b</sup>, Shauanni de Oliveira<sup>e</sup>, Daniele Ruberth Nogueira- Librelotto<sup>b</sup>, Tatiana Emanuelli<sup>e</sup>, Gilberti Helena Hubscher Lopes<sup>e</sup>, Liliane de Freitas Baurmann<sup>a,c</sup>

<sup>a</sup>Postgraduate Program in Pharmaceutical Sciences, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil. <sup>b</sup>Department of Industrial Pharmacy, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil. <sup>c</sup>Department of Pharmacology, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil. <sup>d</sup>Department of Biochemistry and Molecular Biology, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil; <sup>e</sup>Department of Food Science and Technology, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil;

#### **\*Corresponding author**

Postgraduate Program in Pharmaceutical Sciences

Federal University of Santa Maria Santa Maria, RS, Brazil Avenue Roraima, 1000, building 21, 97105-900.

E-mail address: mariannepteixeira@gmail.com

Phone: +55 (55) 999727468

ORCID 0009-0003-8344-858X



## **Phytochemical analysis, antioxidant activity and cell viability of *Sida rhombifolia* Linn.**

### **Abstract**

The *Sida rhombifolia* Linn species, popularly known as “guanxuma”, has a variety of popular therapeutic uses. Therefore, this study aimed to investigate the ethanolic extract of the species, which was subjected to qualitative and quantitative tests for the content of secondary metabolites, using methods microscopes and chromatographic tests to outline its profile, the study also describes the antioxidant potential through DPPH and ABTS tests and the cellular spectrum. The content of total polyphenols was  $134.0 \pm 0.25$  mg/g, total flavonoids  $14.46 \pm 0.05$  mg/g and condensed tannins  $30.7 \pm 0.11$  mg/g of ESR. In the HPLC-MS analysis, the compound with the highest concentration was isoquercetrin ( $3.00 \pm 0.077$  mg/g), followed by results from apigenin ( $2.02 \pm 0.01$  mg/100g) and results from kaempferol ( $135.87 \pm 0.01$  mg/g). In the CG-DIC analysis, specific to fatty acids, the highest concentrations were of palmitic, linoleic and alpha-linolenic acids, respectively. The DPPH method presented an IC<sub>50</sub> value of  $1554.92 \pm 0.18$  µg/mL and ABTS, the FRS% value was 101.8. MTT results do not contain cytotoxic effect concentration. The data observed in this research shows therapeutic potential in the species.

**Keywords:** *Sida rhombifolia*, malvaceae, guanxuma, biological activity, antioxidant activity.

## 1. Introduction

The species *Sida rhombifolia* L. is known as a fortifier, diuretic, antidiarrheal, antiseptic, antibiotic, tonic and anti-inflammatory, among which it is used to treat diabetes (Thou Nao Jam, 2011; Laili *et al.*, 2022). *Sida rhombifolia* is one of 200 species of the genus *Sida*, belonging to the *Malvaceae* family. It grows in tropical and warm regions and is distributed throughout the tropics (Laili *et al.* 2022; Mabberley, 2000; Thou Nao Jam, 2011). The original genus *Sida* is native to Brazil, where has a wide distribution in the Northeast and South and to a lesser extent in the North, Midwest and Southeast of the country (Laili *et al.*, 2022). Also known as ‘guanxuma’, ‘mata pasto’, ‘vassourinha’, ‘relógio’, it is a plant native to the American continent, occurring intensively in South America. It also occurs to a lesser extent in the south of the United States. The genus *Sida* is considered native to Brazil and has 103 species according to Bovini (2015) in the List of species of the Flora of Brazil (Oliveira, 2019). The phytochemical investigation of this genus has resulted in the identification of around 142 chemical constituents, among which alkaloids, flavonoids and ecdysteroids (Debalke, 2018; Membe Femoe *et al.*, 2022) are the predominant groups. The crude and isolated extracts have shown a broad spectrum of pharmacological effects *in vitro* and *ex vivo* (DINDA, 2015).

Plants have developed enzymatic and non-enzymatic defense mechanisms capable of neutralizing the cytotoxicity of reactive oxygen species (ROS) (Barbosa *et al.*, 2014). Therefore, the aim of this study was to conduct a preliminary phytochemical analysis and identify the main classes of secondary metabolites and the antioxidant activity of the species, as well as to evaluate the cytotoxic effect of the extract *in vitro*.

## 2. Results and discussion

The crude extract of *Sida rhombifolia* (ESR) had positive results to anthocyanin heterosides, saponins, hydrolysable tannins and flavonoids (table 1). However, the coumarins had a negative reaction, which differs from the study by Chaves *et al.* (2017), which identified coumarins, scoporone and scopoletin. Genetic factors, seasonality, light and temperature can alter the synthesis of secondary metabolites (Souza, 2022). In other phytochemical tests, the following classes of metabolites have been described as present in *S. rhombifolia* extract: alkaloids, glycosides, tannins, saponins, terpenoids, polyphenols, flavonoids, carbohydrates, oils and fats, resin and mucilage, steroids (Asha *et. al.*, 2018; Assam J. P. *et al.*, 2010; Sundaraganapathy *et al.*, 2013; Thou Nao Jam *et al.*, 2009).

HPLC-PDA analysis of the hydroethanolic extract of *S. rhombifolia* identified some of the phenolic compounds present (Figure 1). The combination of spectral data from the recorded chromatogram and information from the literature allows the provisional identification of 8 phenolic acids and 5 flavonoids (Table S3). The compound with the highest concentration found was isoquercetrin ( $300.86 \pm 7.79$  mg/100g), followed by apigenin derivatives ( $202.02 \pm 1.23$  mg/100g) and kaempferol derivatives ( $135.87 \pm 1.50$  mg/100g). Isoquercitrin was the main phenolic identified by Ferro et al. (2019) in extracts from their study.

The results of the specific analysis of fatty acids (FA) (table 2) are confirmatory of a higher incidence of palmitic acid (C16:0), long-chain FA omega 6: linoleic (C18:2n6) essential, and long-chain FA omega 3: alpha-linolenic (C18:3n3) essential.

The antioxidant capacity was evaluated by ABTS and DPPH assays. Using the DPPH method, the extract showed dose-dependent antioxidant activity with an  $IC_{50}$  value (50% inhibitory concentration) of  $1554.92 \pm 0.18$   $\mu$ g/mL when observed on the ascorbic acid standard (considered to be significantly different when  $p < 0.05$ ), a higher result than that found by Laili et al. (2022) who quantified  $IC_{50}$  at  $547.44$   $\mu$ g/mL in the crude extract of the species. In the ABTS method, ESR showed promising antioxidant activity (figure 2), and ABTS  $IC_{50}$ , the percentage of free radical scavenging (FRS%) value was 101.8.

Phenolic compounds belonging to plants are found in a variety of structures, such as phenolic acids, coumarin derivatives, tannins and flavonoids, which can act as reducing agents, free radical scavengers, metal chelators or singlet oxygen deactivators (Ferreira et al., 2016; Larcher, 2004; Taiz & Zeiger, 2013). Initially, analyses of total phenolic content (CFT) and total flavonoid content (FT) were conducted as indicators of compounds with antioxidant activity (Ferro, 2019).

The MTT test (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) is a cell proliferation test that aims to assess both cell viability, in this study with the 3T3 cell line (24 hours) and the cytotoxicity of ESR in tumor cells (HT-29 line) for 72 hours. The extract did not present a cytotoxic effect at any concentration tested (figure 3). Thounaojam et al. (2011) also evaluated the influence of the aqueous extract of the leaves on the viability of 3T3L1 mouse preadipocyte cells and there were no changes in cell viability from 10 to 1000  $\mu$ g/mL.

It was possible to determine the minimum inhibitory concentration necessary to obtain 50% of viable or non-viable cells due to the cytotoxicity promoted by the tested agent (Ozi et al., 2011; Bournine et al., 2017), with the  $IC_{50}$  HT-29 being  $138.7 \pm 3.02$ .

#### **4. Conclusion**

The results obtained with conventional methodologies for determining total polyphenols, flavonoids and tannins and antioxidant activity by the DPPH, ABTS methods suggest considerable antioxidant activity related to the presence of polyphenolic compounds, such as flavonoids and tannins quantified in this study. The species also presents relevant levels of fatty acids, suggesting that further studies can deepen its applicability. The results of our work allowed us to conclude that the different concentrations of *S. rhombifolia* tested were not cytotoxic in cell culture.

#### **Disclosure statement**

The authors declare that they have no conflicts of interest.

#### **Fundin**

None.

#### **Acknowledgements**

The authors would like to acknowledge the UFSM, both for its physical infrastructure and for the availability of human resources to help develop the research.

## BIBLIOGRAPHICAL REFERENCES

- ASHA, A.; FARSANA, S.; BAIJU, E. C. **Phytochemical profiling and antibacterial activity of selected Sidaspecies against common human pathogenic bacteria: An in vitro study.** Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry, v.7, n.3, p.1201-1205, 2018.
- ASSAM, A. J. **In vitro antibacterial activity and acute toxicity studies of aqueous-methanol extract of *Sida rhombifolia* Linn. (Malvaceae).** BMC Complement Altern Med., 2010.
- BARBOSA, M. R. et al. **Geração e desintoxicação enzimática de espécies reativas de oxigênio em plantas.** Ciência Rural, v. 44, p. 453-460, 2014.
- BOVINI, M. G. et al. **Malvaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil.** Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2015.
- BOURNINE, Lamine et al. **Avaliação das atividades citotóxica e citostática de extratos alcaloides de diferentes partes de *Peganum harmala* L.(Zygophyllaceae).** Jornal Europeu de Medicina Integrativa , v. 91-96, 2017.
- CHAVES, O. S. et al. **Alkaloids and phenolic compounds from *Sida rhombifolia* L.(Malvaceae) and vasorelaxant activity of two indoloquinoline alkaloids.** Molecules, v. 22, n. 1, p. 94, 2017.
- DEBALKE, D. et al. **Avaliações de Efeitos Antibacterianos de Extratos Aquoso-Etanólicos da Parte Aérea de *Sida rhombifolia*.** The Scientific World Journal, 2018.
- DINDA, B. et al. **The genus *Sida* L.–a traditional medicine: Its ethnopharmacological, phytochemical and pharmacological data for commercial exploitation in herbal drugs industry.** Journal of ethnopharmacology, v. 176, p. 135-176, 2015.
- FERREIRA, T. S. et al. **Substâncias fenólicas, flavonoides e capacidade antioxidante em erveiras sob diferentes coberturas do solo e sombreamentos.** Revista Brasileira de Plantas Mediciniais, v. 18, p. 588-596, 2016.
- FERRO, D. M. et al. **Integrated extraction approach to increase the recovery of antioxidant compounds from *Sida rhombifolia* leaves.** The Journal of Supercritical Fluids, v. 149, p. 10-19, 2019.
- LAILI, E. R. et al. **Comparative study of *Sida rhombifolia* from two different locations.** Rasayan Journal of Chemistry, v. 15, n. 1, p. 642-650, 2022.
- LARCHER, W. **Ecofisiologia Vegetal.** 1ª ed. São Carlos: RiMa.531p. 2004.
- MABBERLEY, D. J. **The Plant Book.** Cambridge University Press, Cambridge, 2000.
- MEMBE FEMOE, Ulrich et al. **In Vitro Assessment of the Cercaricidal Activity of *Sida acuta* Burm. F. and *Sida rhombifolia* Linn.(Malvaceae) Hydroethanolic Extracts, Cytotoxicity, and Phytochemical Studies.** Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2022.
- OZI, J. M. *et al.* **In vitro cytotoxic effects of Brazilian plant extracts on squamous cell carcinoma of the oral cavity.** Brazilian oral research, v. 25, p. 519-525, 2011.
- SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento.** 3 ed. Porto Alegre: Ed. Da UFSC, 2007.
- SOUZA, J. A. T. **Composição química e variabilidade sazonal dos óleos voláteis das folhas de *Siparuna guianensis* Aubl. (Siparunaceae).** Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2022.
- SUNDARAGANAPATHY, R. et al. **Phytochemical studies and pharmacological screening of *Sida rhombifolia* Linn.** Hygeia : journal for drugs and medicines, 2013.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal.** 4. ed. Porto Alegre: Artmed. 2013.
- THOU NAO JAM, M. C. et al. ***Sida rhomboidea*. Roxb leaf extract down-regulates expression of PPAR $\gamma$ 2 and leptin genes in high fat diet fed C57BL/6J mice and retards invitro 3T3L1 pre-adipocyte differentiation.** Int J Mol Sci.,v. 12, p. 4661-4677, 2011.
- ZUANAZZI, J. A. S.; MONTANHA, J. A. . **Farmacognosia: da planta ao medicamento.** In: UFSC. 6.ed. 2007.

## Tables

**Table 1.** Phytochemical evaluation of the aerial parts of *Sida rhombifolia*

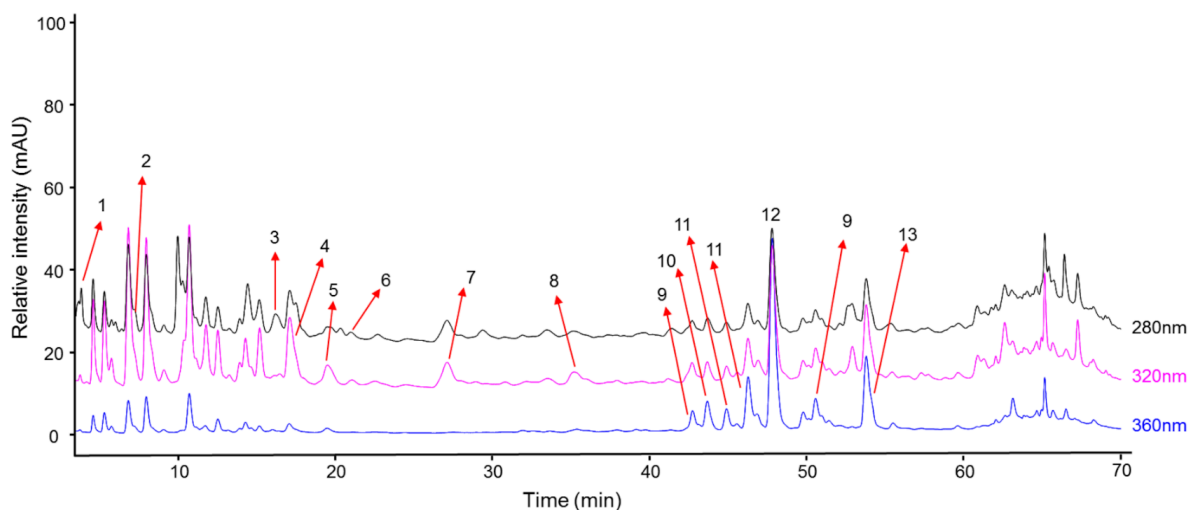
<b>Metabolites</b>	<b><i>Sida rhombifolia</i> aerial parts</b>	<b>Test and Reagents</b>	<b>Positive result</b>
Anthocyanin heterosides	+	Sulfuric acid and sodium picrate	Brown red coloring
Saponins	+	Foam index	Persistent foam formation
Hydrolyzable tannins	+	FeCl <sub>3</sub>	The blue color indicates the possible presence of hydrolyzable tannins
Flavonoids	+	Shinoda/Cyanidin Test	Orange or red coloring
Coumarins	-	Observation under ultraviolet light	Bright blue or green fluorescence

**Table 2.** Gas chromatography coupled to flame ionization detector (GC-DIC): specific analysis of fatty acids.

Nomenclature		Concentrations mg/g
1	<b>C4:00</b>	14,6
2	<b>C6:00</b>	21,2
3	<b>C12:00</b>	10,4
4	<b>C13:00</b>	7,3
5	<b>C14:00</b>	11,8
6	<b>C15:00</b>	4,3
7	<b>C16:00</b>	<b>368,2</b>
8	<b>C16:1</b>	3,3
9	<b>C17:00</b>	9,9
10	<b>C18:00</b>	56,3
11	<b>C18:1n9c</b>	70,3
12	<b>C18:2n6c</b>	<b>318,8</b>
13	<b>C18:3n3</b>	<b>94,4</b>
14	<b>C20:00</b>	8,8
15	<b>C21:00</b>	5,1
16	<b>C22:00</b>	14,2
17	<b>C20:5n3</b>	2,9
18	<b>C23:00</b>	4,3
19	<b>C24:00</b>	3,5
<b>Total</b>		1029,6

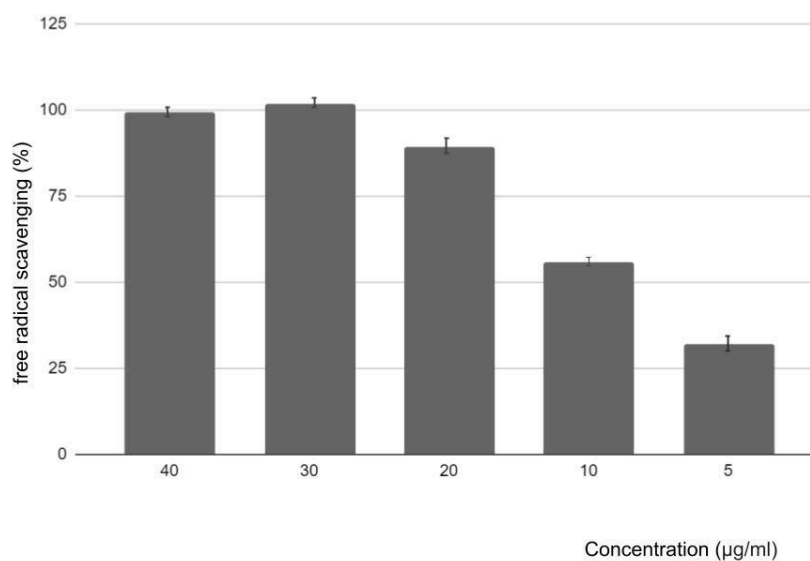
**Figures:**

**Figure 1.** Chromatogram obtained by injection of the ethanolic extract of *Sida rhombifolia*, profile of phenolic compounds.



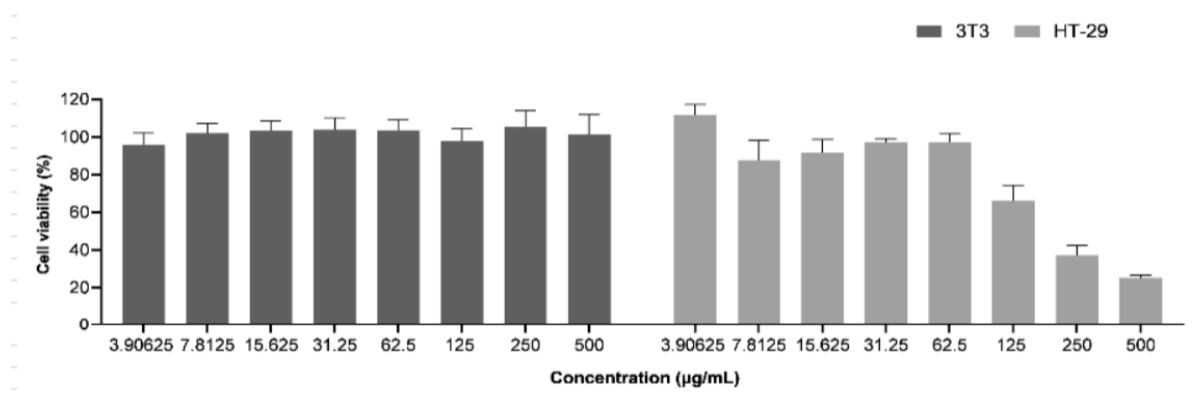
Chromatograms acquired at 280nm, 320 nm, and 360 nm. Peak 1: Gallic acid; Peak 2: 3,4-Dihydroxybenzoic acid; Peak 3: Vanillic acid; Peak 4: Caffeic acid; Peak 5: Chlorogenic acid isomer; Peak 6: Syringic acid Peak 7: *p*-Coumaric acid; Peak 8: *t*-Ferulic acid; Peak 9: Apigenin derivatives; Peak 10: Quercetin derivative; Peak 11: Kaempferol derivatives; Peak 12: Isoquercetrin; Peak 13: Myricetin.

**Figure 2.** Essay regarding the radical ABTS.





**Figure 3.** MTT- ESR toxicity against the 3T3 and HT-29 cell lines, expressed by the percentage of cell viability. Note: Data are presented as mean  $\pm$  standard error. Where  $p < 0.05$ .



## SUPPLEMENTARY MATERIAL

### Phytochemical analysis, antioxidant activity and cell viability of *Sida rhombifolia* Linn

#### 3. Experimental

##### 3.1. Botanical material and extract preparation

Samples of *Sida rhombifolia* were collected in São Gabriel (30° 18' 21S and 54° 19' 41W), Rio Grande do Sul, from December (2018) to February (2019) (summer). They were then authenticated and deposited in the herbarium of the Federal University of Santa Maria, exsiccate number SMDB 17.237. This research was registered in the National System for the Management of Genetic Resources and Associated Traditional Knowledge (SisGen - AFB6706). The aerial parts and roots of the plant were separated and dried in an oven (from 40 to 50°C) and pulverized in a mill. The 70% hydroethanolic extract was obtained by cold maceration with solvent renewal until the plant was completely exhausted. The organic solvent was then evaporated, and the extract was freeze-dried. The final freeze-dried product was stored in a freezer until the biological tests.

##### 3.2. Identification and characterization of the chemical matrix

The phytochemical classes (Cunha, 2014; Matos, 2009; Simões et al., 2010) researched in the aerial parts of the *Sida rhombifolia* plant were saponins (Simões, 2007), tannins (Farmacopeia Brasileira, 2010; Simões, 2007), phenolic compounds and flavonoids (Simões, 2007), coumarins (Simões, 2007) and anthocyanin heterosides (Costa, 1982; Farmacopeia Brasileira, 2010; Moreira, 1979).

### 3.3. Dosage of total polyphenols, flavonoids, and condensed tannins

Total polyphenols were determined using the Folin-Ciocalteu method described by Chandra and Mejia (2004), while flavonoids were determined using the methodology proposed by RIO; 1996; RUSAK et. al. (1993), and condensed tannins were determined by Agostini Costa et. al. (1999) and Agostini Costa et. al. (2003).

### 3.4. High performance liquid chromatography (HPLC) - Quantification of phenolic compounds

The detection and quantification of phenolic compounds in the extract of *S.ida rhombifolia* was conducted following a validated method (Quatrin, 2019) using a High Performance Liquid Chromatography (HPLC) coupled to a Photodiode Array (PDA) Detector. The separation was conducted on a reversed-phase C-18 column (particle size 5 µm, 150 mm, 4.6 mm) at 38°C. The injection volume was 20 µL and the mobile phases consisted of 5% (v/v) methanol in acidified water (0.1% (v/v) formic acid) and 0.1% (v/v) formic acid in acetonitrile. The phenolic compounds were identified by comparison with the retention time of authentic standards and the spectral data obtained from UV-visible absorption spectra. For quantification purposes, chromatograms were obtained at 280 nm, 320 nm and 360 nm.

### 3.5 Gas chromatography coupled with mass spectrometry: Specific Analysis of Fatty Acids

The analyses were conducted on an Agilent Technologies 6890 gas chromatograph equipped with a flame ionization detector (CG-DIC) and auto-injector. The temperature remained constant at 280 °C. The FA separation was conducted on a silica capillary column model number 2560, with a length of 100 m, an internal diameter of 0.25 mm and a stationary phase thickness of 0.20 µm. Nitrogen was used as the carrier gas, under an initial pressure of 15 psi. The flow rate was kept constant at 0.3 mL min<sup>-1</sup>. The furnace temperature (T°) programming was furnace initial T°C = 115°C, maximum T°C: 260°C Tacha = 2.00, T° = 240°C and End time = 7 min, Run time = 62.50 min. The compounds were identified and quantified by comparing the retention times of the peaks found in the samples with the individual retention times of the fatty acid standards under study, under the same working conditions, as well as by comparing the abundance of the majority ions obtained from the reference standards with the ions found in the sample.

### 3.6 Antioxidant capacity *in vitro*

#### 3.6.1 DPPH radical sequestration assay

For the DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) test, the solution containing the extracts was prepared from 5g of crude *S. rhombifolia* extract in 30mL of methanol and

diluted to the final concentrations of 1.30; 2.60; 5.20; 10.41; 20.8; 41.6; 83.3 and 166.7 µg/mL. DPPH added to methanol was used as a negative control. Reading was conducted on a UV/VIS spectrophotometer at a wavelength of 517 nm. The IC<sub>50</sub> was determined by linear regression, using the average values of the duplicates (Choi *et al.*, 2002). The average absorbance of the crude extract was used to determine the percentage of total radical scavenging activity using the formula  $[(A_0 - A_s) / A_0] \times 100$ , where 'A<sub>0</sub>' is the absorbance of the control and 'A<sub>s</sub>' is the absorbance of the sample. A graph of the percentage of total radical scavenging activity versus concentration was plotted to obtain the value of half the maximum effective concentration (IC<sub>50</sub>).

### 3.6.2 ABTS radical sequestration assay

The percentage sequestering activity of the extract was determined using the ABTS assay (Re *et al.*, 1999). The ABTS solution was prepared by mixing 5 mL of 7 mM ABTS in water with 88 µL of 140 mM sodium persulfate, and this solution was kept in the dark at room temperature for 12 hours. The solution was then diluted in 10 mM phosphate solution pH 7.0 to obtain 42.7 µM ABTS in the final solution. The extract was diluted to concentrations of 5, 10, 20, 30 and 40 µg/mL. The samples (75 µL) were placed in 96-well plates with the ABTS solution (150 µL) in water and kept in the dark at room temperature for 30 min. The absorbance was measured at 734 nm using a Multiskan FC microplate reader (Thermo Fisher Scientific, Shanghai, China) (Sample Absorbance). The interference of the extract's turbidity (Blank Abs) was determined by preparing the sample solutions with 150 µL of water instead of the ABTS solution. The negative control (Abs negative control) was evaluated by mixing the ABTS solutions with 75 µL of water. The results were given as a percentage of free radical scavenging activity.

## 3.7 Assessment of cell viability

### 3.7.1 Materials

Dimethyl sulfoxide (DMSO); 3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide bromide 2,5-diphenyl-3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl) tetrazolium (MTT), phosphate buffered saline (PBS), trypsin-EDTA solution (170,000 U/L trypsin and 0.2 g/L EDTA), fetal bovine serum (FBS), Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), supplemented with L- glutamine (584 mg/L ) and antibiotic solution (10,000 units of

penicillin and 10 mg/mL streptomycin) were obtained from Sigma-Aldrich (São Paulo, SP, Brazil).

### 3.7.2 Cell culture

For the test, cell lines 3T3 (murine swiss albino fibroblasts) and HT-29 (human colon adenocarcinoma) were grown in DMEM medium supplemented with 10% (v/v) FBS (v/v), L-glutamine (584 mg/L) and antibiotics (10,000 units of penicillin and 10 mg/mL streptomycin), at 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. The cells were routinely grown in culture flasks of 75 cm<sup>2</sup> and were harvested using trypsin-EDTA when the cells reached approximately 80% confluence.

### 3.7.3 Essay

The cytotoxic effects of the extract were evaluated by the MTT viability assay on 3T3 and HT-29 cells, used as tumor and non-tumor cell models. The MTT endpoint is a measure of cell metabolic activity and is based on the protocol first described by Mossmann (1983). Initially, 3T3 and HT-29 cells were seeded in 96-well plates at a density of  $1 \times 10^5$  cells/mL and incubated for 24 h under 5% CO<sub>2</sub> at 37°C. After this period, the spent medium was replaced with 100 µL of fresh medium supplemented with 5% (v/v) FBS containing the extract in the concentration range of 3.9 to 500 µg/mL. After 24 h (for 3T3 cells) or 72 h (for HT-29), the effects of the treatment on the cell cultures were investigated by assessing cell metabolism (MTT assay). One hundred µL of MTT tetrazolium salt (0.5 mg/mL dissolved in FBS-Free Medium) were added to each well. The plates were further incubated for 3 h to allow purple formazan crystals to form. These crystals were then solubilized by adding 100 µL of DMSO to each well, followed by shaking the plate for 10 min at room temperature.

The absorbance of the solutions was measured at 550 nm on a microplate reader (Thermo Microplate Photometer Scientific™ Multiskan™ FC). Cell viability was finally calculated as the percentage reduction of tetrazolium salt by viable cells for each sample. Viability values were normalized to control cells, which were defined as 100% cell viability.

### 3.8 Statistical analysis

The results were analyzed using one-way analysis of variance (anovaAnova), followed by the Tukey posthoc test (Graphpad Prism software). The data are expressed as mean ± standard deviation (S.D.), with differences between groups being considered statistically significant when  $p < 0.05$ .

## BIBLIOGRAPHICAL REFERENCES

AGOSTINI-COSTA, T. S. et al. **Avaliação de metodologias para determinação de taninos no suco de caju**. Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos, Curitiba, v. 17, n. 2, p.167-176, jul. 1999.

AGOSTINI-COSTA, T. S.; LIMA, A.; LIMA, M. V. **Determinação de taninos em pedúnculo de caju: método da vanilina versus método do butanol ácido**. Química Nova, São Paulo, v. 26, n. 5, p. 763-765, 2003.

- CHANDRA, S. MEJIA, E. G. **Polyphenolic compounds, antioxidant capacity, and quinone reductase activity of an aqueous extract of *Ardisia compressa* in comparison to mate (*Ilex paraguariensis*) and green (*Camellia sinensis*) teas.** Journal of agricultural and food chemistry, v. 52, n. 11, p. 3583-3589, 2004.
- COSTA, A. C. **Farmacognosia.** 2 ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1982.
- CUNHA, A. (org). **Farmacognosia e Fitoquímica.** 4ª ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian. 2014.
- CHOI, C. W. et al. **Antioxidant activity and free radical scavenging capacity between Korean medicinal plants and flavonoids by assay-guided comparison.** Plant Science, v.163, 2002.
- FARMACOPÉIA BRASILEIRA. 5 ed. v.1 São Paulo: Atheneu, 2010.
- MAH, S. H.; TEH, S. S.; EE, **Gwendoline Cheng Lian.** **Anti-inflammatory, anti-cholinergic and cytotoxic effects of *Sida rhombifolia*.** Pharmaceutical biology, v. 55, n. 1, p. 920-928, 2017.
- MATOS, F. J. D. A. **Introdução à fitoquímica experimental.** Fortaleza: edições UFC, 2009.
- MOREIRA, E. A. **Marcha sistemática de análise em fitoquímica.** Tribuna Farmacêutica, v. 47: separata, 1979.
- MOSMANN, T. **Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays.** Journal of immunological methods, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983.
- QUATRIN, A. **Casca de jabuticaba: metabolização e implicações na prevenção das complicações do diabetes.** 2019. Tese de Doutorado. Universidade Federal de Santa Maria.
- RUSAK, G. et al. **The determination of the content of the polyphenols in the areal parts of the species *Centaurea rupestris* L. and *C. fritschii* Hayek (Asteraceae).** Acta pharmaceutica, v. 43, n. 1, p. 121-125, 1993.
- SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento.** 3 ed. Porto Alegre: Ed. Da UFSC, 2007.
- SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia da planta ao medicamento.** 6ª ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora UFRS/ UFS. 2010.
- SOARES, N. et al. **Técnicas de prospecção fitoquímica e sua importância para o estudo de biomoléculas derivadas de plantas.** Enciclopédia Biosfera, v. 13, n. 24, 2016.

## 4.2 Manuscrito 2

### **Evaluation of the antihyperglycemic effect of the crude extract of *Sida rhombifolia* Linn on biochemical and hematological parameters.**

Marianne Pinheiro Teixeira<sup>1</sup>, Vanessa Amaral Ribeiro<sup>2</sup>, Robson Borba<sup>3</sup>, Gabriela Encarnação Marques<sup>3</sup>, Jaime Sardá Aramburú Junior,<sup>3</sup> Ana Barbara Uchoa Soares<sup>4</sup>, Cinthia Melazzo de Andrade<sup>4</sup>, Marta Maria Medeiros Frescura Duarte<sup>3</sup>, Liliane de Freitas Baurmann<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup> Postgraduate Program in Pharmaceutical Sciences, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil. <sup>2</sup> Department of Industrial Pharmacy, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil. <sup>3</sup>Department of Pharmacology, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil. <sup>4</sup> Small animal clinic department

\*Corresponding author

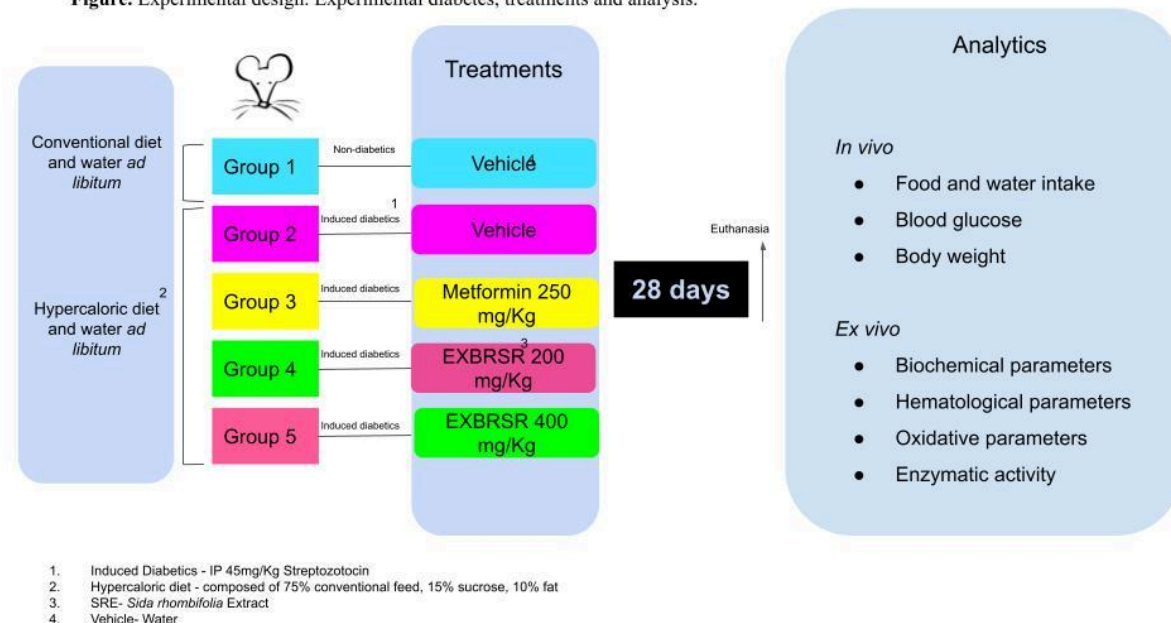
Postgraduate Program in Pharmaceutical Sciences  
Federal University of Santa Maria Santa Maria, RS, Brazil Avenue Roraima, 1000, building 21, 97105-900.  
E-mail address: mariannepteixeira@gmail.com  
Phone: +55 (55) 999727468  
ORCID 0009-0003-8344-858X

## Abstract

Type 2 Diabetes (DM2) and dyslipidemia have become a serious global public health problem. Metabolic changes are associated with an increased risk of cardiovascular events and mortality. Many medicinal plants are used to treat hyperglycemia and dyslipidemia. In this context, *Sida rhombifolia*, popularly known as guanxuma, stands out for its anti-hyperglycemic and anti-hyperlipidemic potential, among others. Thus, this work aimed to analyze the hypoglycemic and lipid-lowering activity in *Wistar rats*. For this evaluation, the extract was administered orally to healthy and diabetic *Wistar rats induced by a high-calorie diet and the adjuvant action of streptozotocin*. The animals (n=25) were divided into 5 groups and periodically evaluated for blood glucose, water intake, food intake and weight loss. At the end of the study, blood, kidney, heart and spleen were collected to evaluate biochemical parameters (glycemia, hepatic (AST and ALT), renal (creatinine) and lipid (total cholesterol) and inflammatory adipokines) and hematological parameters. *Sida rhombifolia* leaf extract, at doses of 200 and 400 mg/kg/day, showed some positive physiological interferences, but moderate in some hematological and biochemical parameters characteristic of diabetes. An analysis of the results obtained in this work suggests that further trials with doses higher than those used are necessary in order to verify the effectiveness of ESR. The groups treated with *S. rhombifolia* showed higher food intake and body weight, and lower glycemic indexes, the plant improved the profile of inflammatory interleukins and adipokines.

**Keywords:** *Sida rhombifolia*, guanxuma, hypoglycemic agent, hematological, biochemical, oxidative parameters.

**Figure.** Experimental design. Experimental diabetes, treatments and analysis.



## 1. Introduction

Type 2 Diabetes Mellitus (DM2) has become a serious global public health problem (ZHENG et al., 2018). Data released in the tenth edition of the Diabetes Atlas, from the International Diabetes Federation (IDF), show that 537 million people have diabetes worldwide. Between 2019 and 2021, there was an increase of 74 million cases.

Diabetes mellitus, according to the American Diabetes Association (ADA) classification, is divided according to pathophysiological aspects, mainly in Type 1 and Type 2: Type 1 diabetes is characterized by the destruction of pancreatic  $\beta$  cells and absolute insulin deficiency, whereas Type 2 diabetes occurs due to insulin resistance or partial insulin deficiency (CARVALHO, et al., 2021; MORAES et al., 2022).

There is epidemiological evidence that emphasizes the multiple behavioral, metabolic, and genetic risk factors for Type 2 diabetes, however, the excess body fat, especially central obesity, is the biggest risk factor (ZHENG et al., 2018). What takes to adipose tissue becomes inflamed, due to the infiltration of macrophages and the production of inflammatory cytokines by adipose cells, which generate a cascade of inflammation and oxidative stress (AROR, 2013; FARIA, 2019). The prevalence of DM highlights the need to develop potent drugs through the synergy of different bioactive compounds in a single molecule to trigger multiple drug actions (EGU et al., 2022).

The species *Sida rhombifolia* L. is known for its wide variety of ethnopharmacological uses, such as fortifying, diuretic, antidiarrheal, antiseptic, antibiotic, tonic and anti-inflammatory. and among them the treatment of diabetes stands out (LAILI et al, 2022; THOUNAOJAM et al., 2011). Da Costa Araldi and collaborators (2021) demonstrate in their study that the hydroethanolic extract of *S. rhombifolia* did not show significant toxic effects when administered orally to male and female rats in both toxicity models, acute doses and repeated doses. In this context, this work aims to evaluate the effectiveness of the hypoglycemic and lipid-lowering activity considering the antioxidant activity of *S. rhombifolia* (malvaceae).

## 2. Material and methods

### 2.1 Obtaining plant material and preparing the extract



To obtain plant material, samples of the aerial parts (stems, leaves and flowers) of *Sida rhombifolia* were collected in the municipality of São Gabriel (30° 18' 21S and 54° 19' 41W), Rio Grande do Sul, in December (2018) to February (2019) (summer). They were then authenticated and deposited in the herbarium of the Federal University of Santa Maria (UFSM), *exsicata* number SMDB 17,237. This research was registered in the National System for Management of Genetic Resources and Associated Traditional Knowledge (SisGen – AFB6706). The aerial parts were dried in an oven (from 40 to 50°C) and pulverized in a mill. The 70% ethanolic extract was obtained through cold maceration. Soon after, the organic solvent was evaporated and then lyophilized. The lyophilized material of the *Sida rhombifolia* (ESR) extract was stored in adequate refrigeration to carry out the biological tests.

## 2.2 Animals and ethical aspects

For this work, *Wistar* rats aged 60±10 days were used, coming from the Central Animal Facility of UFSM. The animals were maintained at a controlled temperature (23 ± 2°C) in a light-dark illumination cycle (12 hours), with free access to food and water, receiving a balanced diet and water *ad libitum*. All experiments followed the experimental protocol that was submitted and approved by the Ethics Committee on the Use of Animals of UFSM, under protocol CEUA n° 9060220322.

## 2.3 Induction of experimental diabetes

The animals were fed a hypercaloric diet consisting of 75% conventional feed, 15% sucrose and 10% fat for an initial period of three weeks. Animals in the normal control group received standard laboratory ration. Streptozotocin (STZ) was administered at a dose of 45 mg/kg (SOUZA NETO et al., 2023). STZ was dissolved in citrate buffer (4.5 pH) and injected intraperitoneally. Based on the average body weight of the animals, the total weight of the medicine was obtained. To do so, the following rule of three was followed:

$$\begin{aligned} &0.045\text{g (weight of medicine for one animal)} - 1000\text{g} \\ &x \text{ (total weight of the medicine)} - y \text{ (sum of the weight of all animals)} \end{aligned}$$

The total volume of solvent was found by multiplying the number of mice times 1 mL of citrate buffer. The entire medicine (x) and the total volume of solvent (citrate buffer) were

homogenized, obtaining the solution. In order to avoid missing solutions during application, were considered a larger number of animals than the actual number, as were observed that adding up the volumes of the individual solutions resulted in a larger number than the total solution, initially predicted.

Blood glucose was measured 2 days after STZ administration using a manual glucometer (G-TECH FREE). Animals with blood glucose levels above 200 mg/dL were considered diabetic. The groups continued to receive their respective diets for another 4 weeks during treatment with the extract (GONÇALVES et al., 2023) and body weight was measured weekly (GUEX et al., 2019).

## **2.4 Groups division**

The animals were separated into 5 groups of 5 individuals, and all treatments were administered by oral gavage, daily for 10 weeks. The groups were divided as follows: G1, normal control: the animals received a regular diet and treated with water; G2, Diabetic control: diabetic animals treated with water; G3, positive control: diabetic animals treated with metformin (250 mg/kg); G4 and G5: diabetic animals treated with *S. rhombifolia extract* (200 mg/kg and 400 mg/kg, respectively). The animals will continue to receive their respective diets during treatment (GUEX et al, 2019).

## **2.5 Animals treatment**

The treatment lasted 4 weeks. The extract solutions were prepared immediately before use, dissolving the extract and metformin in water, and the other groups received only the vehicle, using administration by daily gavage. Blood glucose levels were measured weekly. At the end of the treatment, the animals were anesthetized with Ketamine 100 mg/kg and xylazine hydrochloride 10 mg /kg, intraperitoneally, and blood was collected for biochemical and hematological analyzes and the liver, kidney, heart and pancreas organs for histological analysis.

## **2.6 Assessment of casual plasmatic blood sugar and assessment of body weight**

Animals in all groups will have their blood glucose measured with a glucometer every seven days of treatment. They were also weighed periodically during treatment on an electronic scale and the weights are expressed in grams.

### **2.7 Assessment of water and food intake**

Animals from all groups will have their water and food intake measured daily.

### **2.8 Assessment of biochemical parameters**

The serum obtained was used to quantify triglycerides, total cholesterol, markers of liver and kidney damage and also total proteins using commercial kits and quantified using a spectrophotometer.

#### **2.8.1 Biochemical and hematological parameters**

Blood without anticoagulant was left to clot before centrifugation (4000 rpm for 10 min) to obtain serum, which was used to evaluate total cholesterol levels (CHOL), and creatinine levels (CRE), alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST), using a commercial kit (Bioclin/Quibasa Diagnostic Kits Laboratory, Minas Gerais, Brazil) and semi-automatic biochemical analyzer (Genz, Bioplus: Bio-2000). A rat-specific insulin ELISA kit (Spi-Bio, Bertin Pharma, France) was used to measure serum insulin levels, spectrophotometric reading was performed between 405 and 414 nm. Glucose concentrations were measured using ACCU-Chek Active (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland). Cytokines (interleukins 6 and 10, tumor necrosis factor and interferon- $\gamma$ ) and adipokines (leptin, ghrelin, adiponectin (AdipoQ) and resistin) were also measured using a routine kit (R&D Systems kit, USA).

The total blood was analyzed for hematological parameters: red blood cells (RBC), mean corpuscular volume (MCV), mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC), platelets (PLT) and total white blood cell count was determined using a Mindray BC veterinary automatic counter BC 2800. To perform the glycated hemoglobin test, peripheral blood is collected in an EDTA tube and measured using high-performance liquid chromatography by ion exchange (high pressure liquid chromatography - HPLC) (GONZALEZ *et al.*, 2020). To measure the cortisol hormone, the Coat-A-Count Kit from

Diagnostic Products Corporation-DPC was used; for the corticosterone hormone, the specific kit for rats, Coat-A-Count Kit from Diagnostic Products Corporation-DPC, and for IL1, IL- 6, IL-10, INF-G, eBioscience (San Diego, USA) tests were used.

## **2.9 Oxidative parameters and enzymatic activity**

### **Carbonyl proteins and lipid peroxidation**

To assess protein damage, carbonyl proteins were estimated in the animals' liver and kidneys (REZNICK; PACKER, 1994). After reacting with DNPH (2,4-dinitrophenylhydrazine), the samples were read at 370 nm in a UV-VIS spectrophotometer. Lipid peroxidation (LPO) was estimated using the thiobarbituric acid (TBA) method. Readings were at a wavelength of 532nm following Draper and Hodley (1990). Both assays were performed in duplicate.

The activity levels of catalase enzymes (CAT) were evaluated in the animals' liver, heart, spleen and kidneys. The CAT test was performed according to the method described by Aebi (1984). And the readings were taken at different times at 480 nm.

## **3. Statistical Analysis**

Results were analyzed using one-way analysis of variance (Anova), followed by Tukey's post-hoc test (GraphPad Prism Software, Inc., version 6). Data are expressed as mean  $\pm$  standard deviation (SD) and differences between groups were considered statistically significant when  $p < 0.05$ .

## **4. Results and discussion**

### **4.1 Water intake, food consumption**

There was an increase in the average water intake in the diabetic groups G2, G3, G4 and G5 compared to the non-diabetic G1 (Table 1). Polydipsia is a symptom present in DM2 (American Diabetes Association, 2019). Furthermore, in treatment with the drug metformin (250mg/kg), G3 presented animals with a reduction in water intake and an increase in food consumption compared to G2. Animals treated with ESR had higher food intake compared to G2, and water intake was higher than G3. Treatments at doses of both 200 mg/kg and 400

mg/kg changed the water intake of the diabetic groups. Lipolysis caused by the absence of insulin leads to weight loss, fatigue, and weakness, inducing the animal to ingest more food and thus characterizing polyphagia (FERREIRA, 2008).

#### **4.2 Body weight and blood glucose assessment**

Body mass was assessed weekly (table 2), from the beginning of treatment, and the gain for each group was estimated. There was a statistically significant difference between the groups between the 1<sup>st</sup> and 28<sup>th</sup> day of treatment, indicating that diabetes and the hypoglycemic diet possibly interfered with the weight gain of the rats. The average weight was higher in the control group (non-diabetic) G1 and in the (diabetic) G3 treated with metformin at the end of the evaluated period. Taking the initial weight as a reference, in all periods of the experiment there were variations in the animals' weights, which could be due to the animals' feed intake, genetic variations and even the implementation of the treatment administration technique. The smallest variation between individuals in the same group was in G1. The (diabetic) groups G3, G4 and G5 decreased body weight. Guo et al. (2018) and Santos et al. (2021a), also observed that diabetic animals in their respective studies had a lower weight when compared to non-diabetic animals (SANTOS, 2022b).

Blood glucose was assessed weekly (table 3). Animals that presented blood glucose above 126 mg/dL according to the guidelines of the Brazilian Diabetes Society (2017-2018), after administration of intraperitoneal streptozotocin, were considered diabetic to be part of the experimental groups. The G1 group, non-diabetic, showed variations above 126mg/dL, probably due to the fact that the casual blood glucose measurement was not preceded by fasting. The reference value  $138.72 \pm 30.17$  mg/dL, according to Lima *et al.* (2014) is considerable acceptable for the glycemia of male *Wistar* rats. Groups G2, G4 and G5 showed significantly higher values compared to G3, treated with metformin. The groups treated with ESR had values lower than the value of G2, diabetic without treatment.

#### **4.3 Hematological parameters**

Obesity is a metabolic disease related to a low-grade inflammatory process, which interferes with the homeostasis of several metabolic pathways, namely glucose homeostasis, constituting one of the main risk factors for DM2 (ROMANIUC, 2017). Some studies have described that hematological parameters can be useful in the diagnosis, monitoring and research of diseases related to obesity (PASSOS et al., 2019; YILMAZ et al., 2015).

In the erythrogram (table 4) it was not possible to detect any abnormality that would indicate important pathophysiological phenomena. G1 was the group with the lowest erythrocyte count but is in the range corresponding to reference values. As for the Mean Corpuscular Volume (MCV) and Mean Corpuscular Hemoglobin Concentration (MCHC) indices, they are within the reference values (LIMA et al., 2014), however, the diabetic groups, except G2, have the MCV higher in relation to G1. Platelet values are below what is considered ideal for the species.

The leukogram (table 5) presented results within the normal range of values corresponding to the species. According to Pisi (2016), obesity, the secretion of pro-inflammatory mediators by adipocytes, pre-adipocytes and resident macrophages, leads to the infiltration of cells such as monocytes/macrophages (WEISBERG et al., 2003), T lymphocytes (WU et al., 2011) and neutrophils (ELGAZAR-CARMON et al., 2008).

The neutrophil/lymphocyte ratio (NLR) is a possible inflammatory biomarker in the diagnosis, monitoring, and prognosis of various systemic inflammatory processes (YASAR et al., 2015). Passos et al. (2019) correlated the neutrophil/lymphocyte ratio (NLR) with obesity and central adiposity, in postmenopausal women with Type 2 Diabetes mellitus, pathologies directly related to the pathophysiology of DM2. The NLR in this study was G1:0.137; G2:0.184; G3:0.555; G4:0.434 and G5:0.555. Being the diabetic groups with higher values. Yilmaz et al. (2015) described that the NLR value for DM2 in morbidly obese patients was significantly higher when compared to patients with normal weight. In the present study with *S. rhombifolia*, NLR positively correlates with comorbidities related to DM2, such as obesity and not weight, since the NLR, which is associated with the inflammatory process linked to pathophysiological disorders of chronic diseases (MOTOMURA et al., 2013).

#### **4.4 Biochemical parameters**

The blood glucose values described in table 6 (*ex vivo*) had different values from the *in vivo* evaluation in table 3, this result may be related to the lack of elapsed time measurements when the animals were fed. G1 had  $93.75 \pm 5.85$  mg/dL, a value compatible with a healthy individual, G2, diabetics without treatment, had a low value, compared to the other diabetic groups G3, G4 and G5, with the highest value being G3, group treated with metformin. The blood glucose levels of the groups in general were lower than when measured in animals *in vivo*. Methanolic extract of *S. cordifolia* decreased blood glucose and therefore demonstrated antihyperglycemic effect in streptozotocin-induced diabetic rats (KAUR et al,

2011). The results were claimed to provide scientific information and evidence in favor of the traditional use of *S. rhombifolia* for the treatment of diabetes mellitus (DHALWAL et al., 2010). Regarding liver function, alanine aminotransferase (ALT) values for groups G4 and G5 were considerably high. As for aspartate aminotransferase (AST), all groups, except G2, were elevated. Cholesterol in all groups was significantly high, groups G4 and G5 treated with ESR had a lower value than G3, which was the highest value. Creatinine in groups G1 and G2 was normal, whereas in G3, G4 and G5 it was elevated, indicating that the individuals' renal function is compromised by DM2.

#### **4.4.1 Inflammatory and anti-inflammatory adipokines**

Adipose tissue has several functions, including the production and secretion of inflammatory cytokines (IL-6, TNF- $\alpha$ ), adipokines (leptin, resistin and AdipoQ), acylation-stimulating protein (ASP), plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1), angiotensinogen, in addition to actively participating in energy homeostasis, insulin sensitivity, carbohydrate and lipid metabolism, vascular homeostasis and immune response (GALIC et al., 2010).

Adipose tissue inflammation underlies the secretion of a series of pro-inflammatory adipocytokines, which have a fundamental role in modulating inflammation, inducing  $\beta$ -cell dysfunction and insulin resistance (ROMANIUC, 2017). The inflammatory response promotes, on the one hand, an increase in the synthesis of several adipokines with pro-inflammatory action and, on the other, a reduction in the plasma concentration of AdipoQ, which has an anti-inflammatory action (STEEMBURGO et al., 2019).

Interleukin-1 (IL-1) is an important agent of the cytokine group, being the main mediating agent in the immune response against inflammation, among others (GONZAGA, 2013). It was significantly elevated in G2 and G3, in relation to the other groups, IL-1 induces synthesis of another interleukin, IL-6, by monocytes. IL-6 concentrations are compatible with IL-1 concentrations. The expression of inflammatory cytokines (TNF- $\alpha$  and IL-6) is induced by adipose and liver tissue kinases, in obese people, they have an increased expression (DE OLIVEIRA et al., 2020).

IL-10 had greater expression in G1 and lower in G2, groups G3 and G4 had similar values and G5 had lower values than G1. IL-10 is an anti-inflammatory cytokine capable of inhibiting the synthesis of pro-inflammatory adipokines by T lymphocytes and macrophages. It inhibits the synthesis of TNF, IL-1, IL-6 and IL-8 in monocytes and macrophages and its presence has been demonstrated in atherosclerotic plaques (FERNÁNDEZ et al., 2002;

SIPPEL et al., 2014). Gamma interferon (IFN- $\gamma$ ), a pro-inflammatory cytokine, has immunomodulatory activity, showing low levels in G1 and high levels in other diabetic groups.

Obese individuals have a greater secretion of pro-inflammatory adipokines (TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8, IL-1) and a lower secretion of anti-inflammatory adipokines (IL-10 and AdipoQ), (DE OLIVEIRA et al., 2020; ELLULU et al., 2017; SALTIEL et al, 2017).

AdipoQ presents a higher concentration in G1, and lower values compared to this in the other groups. This cytokine improves insulin sensitivity (GUIMARÃES et al., 2007), has anti-inflammatory action, reducing serum levels of the pro-inflammatory adipokines IL-6 and TNF- $\alpha$ , and contributes to postprandial glucose homeostasis and lipids, causing increased fat oxidation in addition to antiatherogenic properties (BALSAN et al., 2015).

For resistin and leptin levels, the diabetic groups had the highest to lowest value in the following sequence G2, G3, G4, G5 and G1. Resistin plays a significant role in the increased inflammatory state induced by metabolic stress linked to excessive caloric intake, thus contributing to the risk of metabolic syndrome (MS), DM2 and cardiovascular diseases (CVD) (ABATE et al., 2014). Leptin is an important predictor of insulin resistance and other metabolic risks, regardless of the level of obesity (ZUO et al., 2013), it is responsible for inhibiting hunger and increasing energy expenditure through its action on the hypothalamus (PARK, AHIMA, 2014; OLIVEIRA, 2008). In this study, the diabetic groups had higher values compared to G1.

The highest ghrelin level was for G3, followed by G4, G5 and G1, G2 was the lowest. According to De Carvalho et al. (2017) in obese individuals, serum ghrelin levels are lower compared to lean individuals, due to changes in its gene or the presence of antibodies to its receptors (DE OLIVEIRA, 2020; MAKRIS et al., 2017). The cortisol level was higher in G3, followed by G4 and G2 and G5, G1 had the lowest value. There is an observable interrelationship between the stress hormone cortisol and higher blood sugar levels in people with T2DM (OLTMANN et al., 2006; REYNOLDS et al, 2010; SUJINA et al., 2023)

Corticosterone was high in G3 and G4, with intermediate values in G2 and G1 and G5 was the lowest value. According to Gong et al. (2015) there is a need for research on the dynamics and correlation of cortisol and corticosterone under different physiological or stressful conditions.

#### **4.5 Oxidative parameters**



The results indicate that the level of thiobarbituric acid reactive species (TBARS) in rats' livers in group G2 was higher in relation to the other groups, followed by G1 and G5, G4 and G3 were the lowest and had equal values. Spleen TBARS levels were similar between groups, except G5 which was the lowest of all groups. Groups G4 and G5 were low in relation to groups G1, G2 and G3 in the assessment of levels of TBARS in the kidneys. In the heart, there were no significant differences between the groups, as in the other organs evaluated. STZ induction of the experimental DM model increases the levels of lipid peroxidation products (TBARS and lipid hydroperoxides), which are indirect evidence of the intensification of ROS production (PUNITHAVATHI et al., 2011). The TBARS level reached higher values in G2 in all organs evaluated, possibly because they were diabetic, which increased the production of ROS (reactive oxygen species). According to Thomé and collaborators (2012), the increase in the level of TBARS in diabetic animals may occur due to an increase in oxidative stress in kidney cells and others, as a result of a decrease in the activity of antioxidant defense systems. Based on the results of this study, it cannot be suggested that ESR has a protective function in tissues, due to its antioxidant capacity, as there were only reduced levels in G4 and G5 in the kidneys and further analyzes are needed to verify whether ESR can attenuate TBARS levels.

In the present study, the levels of catalase activity showed a significant increase in the liver in G1 and G2 total diabetic rats when compared to the other groups, G3 presented the lowest value and G4 and G5 intermediate values. In the spleen, the highest value was in G5, followed by G4, G1 and G2, the lowest value. In the kidneys, the highest value was in G1, followed by G5, G1 and G3, G2 presented a lower value than the others. In the heart analysis, G5 expressed the highest value, followed by G2, G4 and G1, the lowest value was in G3. The increase in enzyme activity corresponds to the metabolic changes of diabetes induced by streptozotocin, which increases enzymatic activity due to oxidative stress caused in the tissue (SARI, 2018), the results in this trial differed from what would be expected when compared to literature data, as the levels of catalase activity do not correspond to the damage caused by the pathology, as G2 presented the lowest values.

## 5. **Conclusion:**

The analyzes indicate that the use of ESR causes some positive physiological interferences in some hematological and biochemical parameters characteristic of diabetes. It is assumed that higher concentrations of ESR could cause possible therapeutic effects. It is

noteworthy that more studies should be carried out to test its benefits in humans, as the use of this plant would be a complementary method in the treatment of diabetes.

### **Disclosure statement**

The authors declare that they have no conflicts of interest.

### **Funding**

None.

### **Acknowledgements**

The authors would like to acknowledge the UFSM, both for its physical infrastructure and for the availability of human resources to help develop the research.

### **BIBLIOGRAPHIC REFERENCES**

ABATE, N. et al. **Resistin: an inflammatory cytokine. Role in cardiovascular diseases, diabetes and the metabolic syndrome.** Current pharmaceutical design, v. 20, n. 31, p. 4961-4969, 2014.

ADKINS, Y.; KELLEY, D. S. **Mechanisms underlying the cardioprotective effects of omega-3 polyunsaturated fatty acids.** The Journal Nutritional Biochemistry, v. 21, p.781-792, 2010.

AEBI, H. **Catalase in vitro.** Methods Enzymol. 1984.

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. **Standards of Medical Care in Diabetes - 2019** Abridged for Primary Care Providers. Diabetes Care. 2019.

AROOR, A. R. et al. **Maladaptive immune and inflammatory pathways lead to cardiovascular insulin resistance.** Metabolism., v. 62, n. 11, p. 1543-1552, 2013.

BALSAN, G. A. et al. **Relationship between adiponectin, obesity and insulin resistance.** Revista da Associação Médica Brasileira, v. 61, p. 72-80, 2015.

BRÁS, I. P. L.. **Utilização de casca de pinheiro como adsorvente para remoção de pentaclorofenol de águas contaminadas.** Dissertação de doutoramento, Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto, 2005.

CARVALHO, A. C., et al. **Plantas medicinais utilizadas no tratamento do Diabetes Mellitus: Uma revisão.** Brazilian Journal of Health Review, 2021.a

DA COSTA ARALDI, I. C. et al. **Preclinical safety assessment of the crude extract from *Sida rhombifolia* L. aerial parts in experimental models of acute and repeated-dose 28 days toxicity in rats.** Regulatory Toxicology and Pharmacology, v. 124, p. 104974, 2021.

- DE CARVALHO, P. M. et al. **Comportamento de adipocinas séricas em adultos e idosos saudáveis**. 2017.
- DE OLIVEIRA, C. B. C et al. **Obesidade: inflamação e compostos bioativos**. Journal of Health & Biological Sciences, v. 8, n. 1, p. 1-5, 2020.
- DHALWAL, K. et al. **Hypoglycemic and hypolipidemic effect of *Sida rhombifolia* ssp. retusa in diabetic induced animals**. Intl J Phytomed, n. 2, p. 160-165, 2010.
- DRAPER, H. H.; HADLEY, M. **Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation**. Methods Enzymol, v. 186, p. 421-431, 1990.
- EGU, S.I A. et al. **Syntheses, in vitro, and in silico studies of rhodanine-based schiff bases as potential  $\alpha$ -amylase inhibitors and radicals (DPPH and ABTS) scavengers**. Molecular Diversity, p. 1-25, 2022.
- ELGAZAR-CARMON, V.; RUDICH, A.; HADAD, N.; LEVY, R. **Neutrophils transiently infiltrate intra-abdominal fat early in the course of high-fat feeding**. J Lipid Res. 2008.
- ELLULU, M. S. et al. **Obesity and inflammation: the linking mechanism and the complications**. Arch Med Sci. 2017
- FARIA, A. P. de et al . **Proposta de um Escore Inflamatório de Citocinas e Adipocinas Plasmáticas Associado à Hipertensão Resistente, mas Dependente dos Parâmetros de Obesidade**. Arq. Bras. Cardiol., São Paulo, v. 112, n. 4, p. 383-389, 2019.
- FERNÁNDEZ-SÁNCHEZ, A. et al. **Inflammation, oxidative stress and obesity**.International Journal of Molecular Sciences, 2011.
- FERREIRA, R. M. **Efeito da Infusão dos Frutos de *Momordica charantia* L. em Ratas Diabéticas**. Tese (Doutorado em Bioquímica Agrícola) - Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, Brasil, 2008.
- GALIC, S.; OAKHILL, J. S. E.; STEINBERG, G. R. **Tecido adiposo como órgão endócrino**. Endocrinologia molecular e celular , 2010..
- GONÇALVES, Y. M., DA SILVA, L. A., SELICANI, M. A., SANTOS OLIVEIRA, C. H., CORREA SALLES, B. C., BITENCOURT SANTOS. G. **Efeito do Extrato da casca da Aroeira (*Schinus terebinthifolia* Raddi) sobre os parâmetros bioquímicos em ratos diabéticos**. Braz. J. Nat. Sc. 2023.
- GONG, S. et al. **Dinâmica e correlação de cortisol sérico e corticosterona sob diferentes condições fisiológicas ou estressantes em camundongos**. PloS um , v. 10, n. 2, pág. e0117503, 2015.
- GONZAGA, D. V. B. **Interleucina–1: Revisão de literatura das funções biológicas dos membros da família IL–1**. Acervo da Iniciação Científica, n. 1, 2013.
- GONZALEZ, A. et al. **Impact of mismatches in HbA1c vs glucose values on the diagnostic classification of diabetes and prediabetes**. Diabetic Medicine, v. 37, n. 4, p. 689-696, 2020.
- GUEX, C. G. et al. **Antidiabetic effects of *Olea europaea* L. leaves in diabetic rats induced by high-fat diet and low-dose streptozotocin**. Journal of ethnopharmacology, v. 235, p.1-7, 2019.
- GUIMARÃES, D. E. D.; SARDINHA, F. L. C.; MIZURINI, D. M.; CARMO, M. G. T. **Adipocitocinas: uma nova visão do tecido adiposo**. Rev Nutr. 2007.
- GUO, X.; WANG, Y.; WANK, K.; JI, B.; ZHOU, F. **Stability of a type 2 diabetes rat model induced by high-fat diet feeding with low-dose streptozotocin injection**. J Zhejiang Univ Sci B. 2018.
- INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION. **IDF Diabetes Atlas**, 10th edn. Brussels, Belgium: 2021.
- KAUR, G.; KAMBOJ, P.; KALIA, A. N. **Antidiabetic and anti-hypercholesterolemic effects of aerial parts of *Sida cordifolia* Linn. on Streptozotocin-induced diabetic rats**. 2011.

- LAILI, E. R. et al. **Comparative study of sida rhombifolia from two different locations.** Rasayan Journal of Chemistry, v. 15, n. 1, p. 642-650, 2022.
- LIMA, C. M. et al. **Valores de referência hematológicos e bioquímicos de ratos (Rattus norvegicus linhagem Wistar) provenientes do biotério da Universidade Tiradentes.** Scientia plena, v. 10, n. 3, 2014.
- LOTTENBERG, A. M. P. **Importância da gordura alimentar na prevenção e no controle de distúrbios metabólicos e da doença cardiovascular.** Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia, v. 53, p. 595-607, 2009.
- KAHLEOVA H, PELIKANNOVA T. **Vegetarian diets in the prevention and treatment of type 2 diabetes.** j am coll nutr. v. 3, p. 448-58, 2015.
- MAKRIS, M. C. et al. **Ghrelin and Obesity: Identifying Gaps and Dispelling Myths. A Reappraisal.** In Vivo (Brooklyn). 2017
- MORAES, V. G. D. E.; SANTOS, W. C. M. DOS, MONTEIRO, I. L. DOS S., GOMES, A. R. Q., CARTÁGENES, S. DE C., & BRÍGIDO, H. P. C. **Avaliação do efeito hipoglicemiante de Bauhinia forficata (pata-de-vaca) e sua aplicabilidade no tratamento de diabetes mellitus Tipo II.** Revista Eletrônica Acervo Saúde, 2022.
- MOTOMURA, T.; SHIRABE, K.; MANO, Y.; MUTO, J., TOSHIMA, T.; UMEMOTO, Y., et al. **Neutrophillymphocyte ratio reflects hepatocellular carcinoma recurrence after liver transplantation via inflammatory microenvironment.** J. of Hepatology. 2013.
- OLTMANN, K. M.; DODT, B.; SCHULTES, B.; RASPE, H.; HSCHWEIGER, U. **Cortisol correlates with metabolic disturbances in a population study of type 2 diabetic patients.** European Society of Endocrinology. 2006.
- PARK, H-K.; AHIMA, R. **Leptin signaling.** F1000 prime reports, v. 6, 2014.
- PASSOS, F. R. et al. **A correlação da razão neutrófilo-linfócito com a antropometria em mulheres pós-menopáusicas com diabetes mellitus tipo 2.** Salão do Conhecimento, 2019.
- PISI, P. C. B. **Influência da perda de peso induzida por cirurgia bariátrica na resposta imune em paciente com obesidade grau III.** Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo. 2016.
- PUNITHAVATHI, V. R. et al. **Studies with animal and in vitro models Diabetic embryopathy.** European Journal of Pharmacology; 650; 465-471; 2011.
- REYNOLDS, R. M.; STRACHAN, M. W. J.; LABAD, J.; LEE, A. J.; FRIER, B. M.; FOWKE, G., et al. **Morning Cortisol Levels and Cognitive Abilities in People With Type 2 Diabetes.** Diabetes Care. 2010.
- REZNICK, A. Z.; PACKER, L. **Oxidative damage to proteins: spectrophotometric method for carbonyl assay.** Methods Enzymology, v. 233, p. 357-363, 1994.
- ROMANCIUC, M. **Diabetes Mellitus Tipo 2 como Doença Inflamatória: anatomia, fisiopatologia e terapêutica.** Tese de Doutorado, 2017.
- SALTIEL, A. R., OLEFSKY, J. M. **Inflammatory mechanisms linking obesity and metabolic disease.** J Clin Invest. 2017.
- SANTOS, S. M. **Extracção, purificação e determinação da actividade antioxidante de compostos fenólicos da espécie prunus avium.** Dissertação de mestrado, Universidade da Beira Interior. 2011.
- SANTOS, M. M. R., CAVALCANTE, A. C. F. P. S.; AMARA, L. L. A.; SOUZA, G. H. O.; SANTOS, B. S.; PORTUGAL, L. C.; BITTENCOURT-JUNIOR, F. F.; TROQUEZ, T.; RAFACHO, B. P. M.; HIANE, P. A.;

- SANTOS, E. F. **Combination of cafeteria diet with intraperitoneally streptozotocin in rats. A type-2 diabetes model.** Acta Cir Bras. 2021.a
- SANTOS, M. M. R. **Avaliação da toxicidade aguda e subaguda e efeitos metabólicos de *Astrocaryum huaimi* Mart. em ratos diabéticos.** 2022.b
- SARI, R. **Otimização da extração de compostos fenólicos das folhas de *Tabernaemontana catharinensis* e avaliação dos marcadores de estresse oxidativo em ratos diabéticos.** Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Pato Branco, 2018.
- SEGAL, L., PENMANA, M. G., & PIRIOU, Y. **Evaluation of the systemic toxicity and mutagenicity of OLIGOPIN® procyanidolic oligomers (OPC) extracted from French Maritime Pine Bark extract.** Toxicology Reports, v. 5, p. 531–541, . 2013.
- SIPPEL, C. A. et al. **Processos inflamatórios da obesidade.** Revista de Atenção à Saúde, v. 12, n. 42, 2014.
- SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES (SBD). **Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes.** 2017-2018.
- SOUZA NETO, E. G. de et al. **Efeitos do Treinamento Intervalado de Alta Intensidade e do Treinamento Contínuo na Capacidade de Exercício, Variabilidade da Frequência Cardíaca e em Corações Isolados em Ratos Diabéticos.** Arquivos Brasileiros de Cardiologia, v. 120, 2023.
- STEEMBURGO, T.; AZEVEDO, M. J., MARTÍNEZ, J. A. **Interação entre gene e nutriente e sua associação à obesidade e ao diabetes melito.** Arq Bras Endocrinol Metab, São Paulo. 2009;
- SUJINA, S. S. et al. **Correlação das transaminases hepáticas com os níveis de cortisol no diabetes tipo 2.** Biomedicina , v. 43, n. 4, pág. 1143-1147, 2023.
- SYAFITRI, R. AYU, P. ., MUSYABIQ W., S. ., & FAHMI. **Pengaruh pemberian ekstrak seledri (*apium graveolens* l.) organik terhadap kadar high density lipoprotein (hdl) tikus putih (*rattus novergicus*) galur sprague dawley yang diberi pakan tinggi lemak.** Jurnal Kesehatan Tambusai, v. 3. p. 88–95, 2022.
- THOMÉ, G. R. et al. **Avaliação do nível de tbars em rim de ratos diabéticos tratados com ácido gálico,** 2012.
- THOUNAOJAM, M. C. et al. **Sida rhomboidea. Roxb leaf extract down-regulates expression of PPAR $\gamma$ 2 and leptin genes in high fat diet fed C57BL/6J mice and retards invitro 3T3L1 pre-adipocyte differentiation.** Int J Mol Sci.,v. 12, p. 4661-4677, 2011.
- WEISBERG, S. P.; MCCANN, D., DESAI, M.; ROSENBAUM, M., LEIBEL, R. L.; FERRANTE, A. W. JR. **Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue.** J Clin Invest. 2003.
- WU, D., MOLOFSKY, A. B.; LIANG, H. E.; RICARDO-GONZALEZ, R. R.; JOUIHAN, H. A.; BANDO, J. K.; CHAWLA, A.; OCKSLEY, R. M. **Eosinophils sustain adipose alternatively activated macrophages associated with glucose homeostasis.** Science. 2011.
- YASAR, Z.; BUYUKSIRIN, M.; UCSULAR, F. D.; KARGI, A.; ERDEM, F.; TALAY, F.; KURT, O.K. **Is an elevated neutrophil-to lymphocyte ratio as predictor of metabolic syndrome in patients with chronic obstructive pulmonary disease.** Eur Rev Med Pharm. Sci 2015.
- YILMAZ, H.; UCAN, B.; SAYKI, M.; UNSAL, I.; SAHIN, M.; OZBEK, M.; DELIBASI, T. **Usefulness of the neutrophil-to-lymphocyte ratio to prediction of type 2 diabetes mellitus in morbid obesity.** Diab. Metab Syndr 2015.
- ZHENG, Y.; LEY, S. H.; FRANK, B. H. **Etiologia global e epidemiologia do diabetes mellitus tipo 2 e suas complicações.** Nature Reviews Endocrinology, v. 14, p. 88 - 98, 2018.

ZUO, H.; SHI, Z., YUAN, B., DAI, Y.; WU, G.; HUSSAIN, A. **Association between serum leptin concentrations and insulin resistance: a population-based study from China.** Plos One. 2013.

### Tables:

**Table 1.** Means and standard deviations of weekly casual plasma glucose levels (mg/dL) of the experimental groups (G) during the 28-day period of in vivo treatment. . Data were expressed as mean  $\pm$  SD from 5 animals per group. \* $p < .05$  from G1; @ $p < .05$  from G2.

Groups	Blood glucose (mg/dL)			
	1 <sup>a</sup> week	2 <sup>a</sup> week	3 <sup>a</sup> week	4 <sup>a</sup> week
<b>G1</b>	121 $\pm$ 10,94	125,2 $\pm$ 14,5	151,8 $\pm$ 18,5	137 $\pm$ 39,24
<b>G2</b>	417,5 $\pm$ 11,92*	436,5 $\pm$ 7,95*	579,75 $\pm$ 20,25*	575 $\pm$ 24,36*
<b>G3</b>	286 $\pm$ 66,99*.@	218 $\pm$ 14,30*.@	364,8 $\pm$ 56,51*.@	324,75 $\pm$ 168,85*.@
<b>G4</b>	321,2 $\pm$ 78,04*.@	408 $\pm$ 87,36*.@	506,4 $\pm$ 124,06*.@	463,75 $\pm$ 192,57*.@
<b>G5</b>	488,6 $\pm$ 152,68*.@	369,2 $\pm$ 42,56*.@	588,2 $\pm$ 18,99*.@	542,8 $\pm$ 144,04*.@

**Table 2.** Mean and standard deviation of erythrocyte and platelet counts and evaluation of mean corpuscular volume (MCV) and Mean Corpuscular Hemoglobin Concentration (MCHC) indices. Data were expressed as mean  $\pm$  SD from 5 animals per group. \* $p < .05$  from G1; @ $p < .05$  from G2.

Groups	Red Cells ( $10^6 /\mu\text{L}$ )	VCM (f)	CHCM (g/dL)	Platelets ( $10^3/\mu\text{L}$ )
<b>G1</b>	7,995 $\pm$ 0,1	56,25 $\pm$ 0,05	33,75 $\pm$ 0,15	638000 $\pm$ 63000
<b>G2</b>	8,62 $\pm$ 0,4*	53,36 $\pm$ 0,04*	32,2 $\pm$ 0,5*	500000 $\pm$ 70058,7*
<b>G3</b>	8,36 $\pm$ 0,2	57,8 $\pm$ 0,56@	33,3 $\pm$ 0,2@	507000 $\pm$ 73314,1*
<b>G4</b>	8,5 $\pm$ 0,2*	56,7 $\pm$ 1,9@	33,6 $\pm$ 0@	443000 $\pm$ 63625,6*
<b>G5</b>	8,39 $\pm$ 0,2	57,2 $\pm$ 0,9@	33,6 $\pm$ 0,16@	456000 $\pm$ 46684,4*

**Reference values:** Red Cells (  $10^6 /\mu\text{L}$ ) 4,12-10,25; VCM (f) 43,60-52,60; CHCM (g/dL) 31,60-37-37,80; Platelets (  $10^3/\mu\text{L}$ ) 727.000-1.351.000 (Lima et al., 2014).

**Table 3.** Mean and standard deviation of leukogram. Data were expressed as mean  $\pm$  SD from 5 animals per group. \* $p < .05$  from G1; @ $p < .05$  from G2.

Groups	Leukocytes ( $10^3/\mu\text{L}$ )	Neutrophils (%)	Lymphocytes (%)	Monocytes (%)	Eosinophils (%)
<b>G1</b>	8150 $\pm$ 2750	11,5 $\pm$ 5,5	83,5 $\pm$ 6,5	4,5 $\pm$ 0,5	1 $\pm$ 0,5
<b>G2</b>	6700 $\pm$ 1349	14 $\pm$ 0	76 $\pm$ 4,3	8 $\pm$ 0,47*	0 $\pm$ 0,9
<b>G3</b>	3600 $\pm$ 504*.@	35 $\pm$ 7*.@	63 $\pm$ 6,8*	1 $\pm$ 0*.@	1 $\pm$ 0,4
<b>G4</b>	4800 $\pm$ 262*	30 $\pm$ 16*	69 $\pm$ 15,8	1 $\pm$ 0,8*.@	1 $\pm$ 0,8
<b>G5</b>	3600 $\pm$ 810*.@	35 $\pm$ 7,5*.@	63 $\pm$ 6,8*	1 $\pm$ 1,9*.@	1 $\pm$ 1,0

**Valores de referências:** Leukocytes (  $10^3/\mu\text{L}$ ) 3410-13700; Neutrophils (%) 4-49%; Lymphocytes (%) 43,10-93,7%; Monocytes (%) 1-15,20%; Eosinophils (%) 0,00-3,60% (Lima et al., 2014).

**Table 4.** Assessment of the antihyperglycemic effect and other biochemical parameters, such as glucose, total cholesterol and liver function marker enzymes (AST and ALT) and kidney function (creatinine), *ex vivo*. Data were expressed as mean  $\pm$  SD from 5 animals per group. \* $p < .05$  from G1; @ $p < .05$  from G2; # $p < .05$  from G3 and, & $p < .05$  from G4.

Groups	Glucose (mg/dl)	ALT (UI/L)	AST (UI/L)	Cholesterol (mg/dL)	Creatinine (mg/dL)
G1	93,75 $\pm$ 5,85	58,2 $\pm$ 9,51	278,46 $\pm$ 39,51	87,6 $\pm$ 4,49	0,5 $\pm$ 0,03
G2	109 $\pm$ 27,25	51,75 $\pm$ 9,30	136,325 $\pm$ 33,23*	82,25 $\pm$ 14,22	0,425 $\pm$ 0,15*
G3	183 $\pm$ 5,7*.@	62,75 $\pm$ 10,58	218, $\pm$ 30,94@	116 $\pm$ 3,67*.@	0,925 $\pm$ 0,05*.@
G4	160,5 $\pm$ 4,66*.@	80,2 $\pm$ 12,19@	327,6 $\pm$ 24,85@.#	100,4 $\pm$ 2,83@.#	0,86 $\pm$ 0,02*
G5	146,75 $\pm$ 1,37*.@.#	115,25 $\pm$ 52,02*.#	395,4 $\pm$ 34,35*.@.#.&	74,25 $\pm$ 14,49@.#	0,825 $\pm$ 0,03*

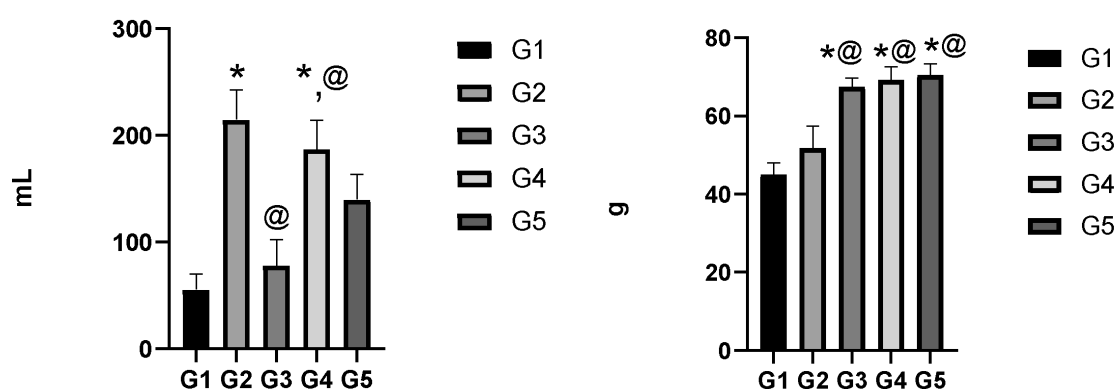
**Reference values:** Glucose (mg/dL) 138,72  $\pm$  30,17; ALT (UI/L) 57,55  $\pm$  11,95; AST (UI/L) 131,33  $\pm$  43,98; Cholesterol (mg/dL) 60,68  $\pm$  6,51; Creatine (mg/dL) 0,58  $\pm$  0,24 (Lima et al., 2014).

**Table 5.** Serum concentration of Adipokines and glucocorticoids. Data were expressed as mean  $\pm$  SD from 5 animals per group. \* $p < .05$  from G1; @ $p < .05$  from G2; # $p < .05$  from G3 and, & $p < .05$  from G4.

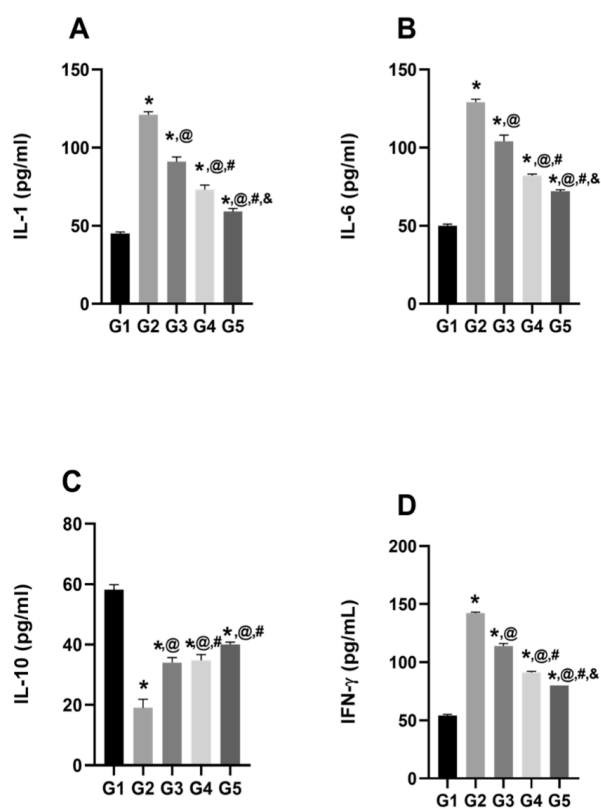
Groups	AdipoQ (ng/ml)	Resistin (ng/ml)	Leptin (ng/ml)	Ghrelin (pg/ml)	Cortisol (ng/mL)	Corticosterone (ng/mL)
G1	74,8 $\pm$ 1,39	49,4 $\pm$ 1,21	86,2 $\pm$ 1,77	31,2 $\pm$ 0,73	16,8 $\pm$ 1,74	74 $\pm$ 4,98
G2	32 $\pm$ 1,08*	80,75 $\pm$ 0,48*	137,5 $\pm$ 4,65*	25 $\pm$ 6,25*	50 $\pm$ 12,5*	78,5 $\pm$ 19,63
G3	45,5 $\pm$ 1,44*.@	77,25 $\pm$ 2,5*.@	135,5 $\pm$ 1,32*	56 $\pm$ 1,47*.@	71,75 $\pm$ 1,75*.@	130 $\pm$ 13,7@
G4	52 $\pm$ 2,35*.@.#	64,75 $\pm$ 1,18*.@.#	123,75 $\pm$ 2,75*.@.#	51,25 $\pm$ 0,95*.@	51,75 $\pm$ 1,55*.#	121,25 $\pm$ 1,75@
G5	54 $\pm$ 2,34*.@.#	58,25 $\pm$ 1,1*.@.#.&	118 $\pm$ 5,0*.@.#	38,25 $\pm$ 2,68*.@.#.&	35,5 $\pm$ 1,5*.@.#.&	45,5 $\pm$ 7,0@.#.&

## Figures:

**Figure 1.** Water (mL) and food intake (g). Data are expressed as mean  $\pm$  SD from 5 animals per group. \* $p < .05$  from G1; @ $p < .05$  from G2.



**Figure 2.** Serum concentration of Cytokines expressed in pg/mL. IL-1 (A); IL-6 (B); IL-10 (C) and IFN $\gamma$  (D) Data were expressed as mean  $\pm$  SD from 5 animals per group. \* $p < .05$  from G1; @ $p < .05$  from G2; # $p < .05$  from G3 and, &  $p < .05$  from G4.



## 5. DISCUSSÃO GERAL:



Com as transformações na saúde ao longo dos séculos cresceu a valorização de terapêuticas que resgatam saberes tradicionais, como um recurso eficaz e seguro, desde que seja utilizado de forma correta para promover a saúde (PATRÍCIO et al., 2022). De acordo com Zeni et al. (2017), o uso das plantas medicinais tem amplo uso por grande parte da população pela credibilidade terapêutica, baixo custo, fácil acessibilidade e por serem consideradas inofensivas. O uso das plantas medicinais traz grandes significados, pois na maioria das vezes é passado de gerações, onde os mais velhos considerados sábios compartilham suas experiências e conhecimentos com os mais novos, ainda, sendo mães e avós consideradas as grandes detentoras de conhecimentos e as maiores incentivadoras do seu uso (SZERWIESKI et al., 2017).

As plantas medicinais demonstraram um efeito hipoglicemiante, sendo as folhas das plantas a parte mais utilizada para preparar infusões (DOS SANTOS FERREIRA et al., 2023; PORTELA et al., 2022). Plantas medicinais, assim como a *Sida rhombifolia* despertam o interesse da ciência, em decorrência dos seus vários compostos bioativos distribuídos por todas as partes da planta, que auxiliam na atividade hipoglicêmica e anti-inflamatória de doenças como o diabetes (VEBER et al., 2015).

Destaca-se que, os objetivos do manejo glicêmico para pacientes com diabetes são prevenir ou retardar complicações e otimizar a qualidade de vida. No entanto, na prática clínica, a meta de controle glicêmico recomendada é difícil de ser alcançada. Em consequência, a insulina é um dos hipoglicemiantes mais utilizados em todas as formas de diabetes, com o benefício de melhorar o controle glicêmico, além de diminuir as taxas de complicações relacionadas à diabetes (ABERA et al., 2022).

As plantas medicinais possuem mecanismo de ação de princípios isolados com propriedades antidiabéticas, devido aos compostos antioxidantes que pela via de supressão do estresse oxidativo, possibilita uma ação direta sobre a liberação de insulina no pâncreas e promove melhoria na ação das células  $\beta$  (RÍOS et al., 2015). Com isso, os experimentos realizados devem ser atenciosamente avaliados, considerando-se a dosagem, a espécie vegetal a droga usada experimentalmente, já que algumas plantas agregadas ao tratamento do diabetes são avaliadas como tóxicas e causam efeitos que podem resultar em hepatotoxicidade e bloqueio  $\beta$ -adrenérgico (SILVA, 2017, SOUZA et al. 2023).

Souza et al. (2023) destaca a possibilidade da utilização de plantas medicinais em uma abordagem complementar no controle do diabetes, destacando o potencial terapêutico, mas também ressaltando a importância da responsabilidade e a regulamentação de sua utilização, a fim de garantir a segurança e eficácia no tratamento do diabetes e outras possíveis condições de saúde.

No entanto, seu fácil acesso, custo baixo e falsa sensação de que “mal não faz, é natural”, corrobora com o uso indiscriminado e automedicação, sem prescrição, orientação ou acompanhamento profissional, podendo acarretar não só em benefícios, mas em malefícios à saúde da população (ZENI et al., 2017). Orientações são necessárias para que a população entenda que o tratamento ser natural não significa ausência de efeitos tóxicos ou colaterais, e ainda é preciso cuidado e evitar uso por longos períodos (GOMES et al., 2023; GONÇALVES et al., 2022).

Ahirrao (2023) descreve a *S. rhombifolia* por seus usos nas formas de extratos/pó/pasta por populações tribais na Índia para tratar doenças comuns como tosse e resfriado, febre, distúrbios estomacais, renais e hepáticos, inflamações etc. com isso é essencial garantir a utilização segura e eficaz de medicamentos fitoterápicos.

As folhas e caules de *S. rhombifolia* possuem ação anti-inflamatória, atividades antinociceptivas e antioxidantes devido a alcalóides, flavonóides e constituintes fenólicos na planta (KUMAR et al., 2023). Neste estudo, comprovou-se a presença de flavonóides e compostos fenólicos entre outros compostos químicos.

A composição e concentração dos metabólitos extraídos podem ser afetadas por muitos fatores, sendo um deles a extração por solvente (KAROMAH et al., 2023). As diferenças na composição e concentração desses metabólitos estariam diretamente relacionadas ao nível de sua atividade biológica (LLORENT-MARTÍNEZ et al., 2020). Além disso, o grande número de metabólitos encontrados no extrato de *S. rhombifolia* pode resultar em interações sinérgicas e antagônicas entre os metabólitos, influenciando a atividade biológica obtida (PERUMAL et al., 2021). Os polifenóis estão presentes em várias plantas, que podem desempenhar um papel importante na adsorção e neutralização de radicais livres e na inibição da peroxidação lipídica (DJERIDANE et al., 2006; RODRIGUES, 2022). Os flavonóides, são uma das principais famílias dos polifenóis, sendo bastante consumidos como parte da dieta humana, são reconhecidos principalmente pelas suas capacidades

antioxidantes existindo também interesse a nível nutricional, na manutenção da saúde humana, como a nível tecnológico, por exemplo estudos indicam que uma dieta rica em quercetina e outros flavonóides diminui o risco de muitas doenças crónicas, como cancro, diabetes e doenças cardíacas. (RASOULI et al., 2017; SANTOS, 2011). Através dos dados encontrados neste estudo, na determinação dos metabólitos secundários, podemos relacionar a atividade biológica nos animais tratados com a espécie.

Os taninos se dividem em duas classes distintas, taninos hidrolisáveis e taninos condensados. Os taninos hidrolisáveis são moléculas cuja zona central consiste num poliol, geralmente D-glucose. Os grupos hidroxilo deste hidrato de carbono estão totalmente ou parcialmente esterificados com grupos fenólicos, como ácido gálico ou ácido elágico (elagitaninos). Pelo contrário, os taninos condensados ou proantocianidinas, já são moléculas mais complexas, oligómeros ou polímeros de unidades flavanóis, podendo mesmo ser superior a 50 unidades ligadas através de ligações carbono-carbono que não são destruídas por hidrólise (BRÁS, 2005; SEGAL; PENMANA; PIRIOUB, 2018; VIEITO, RODRIGUES, PIRES, VAZ-VELHO, 2018).

Segundo Jayachandran et al. (2020) a isoquercetina pode ser eficaz na mitigação das consequências da hiperlipidemia e do DM. Campferol e seus flavonóides derivados melhoram a sensibilidade à insulina devido à fosforilação do substrato do receptor de insulina (IRS) e aumentam a captação de glicose. Além disso, o Canferol também pode aumentar a secreção de adiponectina (DE LIRA et al., 2022; REN et al., 2019). Neste estudo, nos animais diabéticos tratados com a *S. rhombifolia* foi possível observar índices maiores de adiponectina do que nos animais diabéticos não tratados com a planta. A apigenina tem propriedades antioxidantes na prevenção de danos celulares e seus componentes por radicais livres reativos (RAHAYU, 2022; RHEDA et al. , 2010). A espécie, também mostrou boa atividade antioxidante.

Outra importante atividade dos flavonóides é a inibição da 3-Hidroxi-3-Metilglutaril coenzima A (HMG-CoA) redutase, que ocasiona diminuição dos níveis colesterol no corpo (SARAGIH, 2009). Os compostos flavonóides também têm mecanismo que pode aumentar os níveis de HDL aumentando a liberação de colesterol dos macrófagos, aumentando a expressão do ATP-binding cassette (ABC)

A1 e aumentando a apolipoproteína A1 que é o material básico para a formação de HDL (HELLAL et al., 2013; SYAFITRI et al., 2022).

O ácido palmítico é um ácidos graxos saturados aterogênicos encontrados em alimentos, sua ingestão tem sido criticada pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como potencialmente causadora de um risco aumentado de doença cardiovascular. Vários estudos documentaram níveis mais elevados de resistência à insulina em ratos que receberam dietas ricas em ácido palmítico. contribuem para a formação da placa de ateroma, pois elevam o teor de LDL (lipoproteína de baixa densidade) no sangue.

Desta maneira, aumentam o risco de doenças cardiovasculares com efeito similar a gorduras trans (LOTTENBERG, 2009). Já foi demonstrado, em estudos, o auxílio no controle do diabetes de quantidades mais altas de ácido linoleico, estando associadas a melhorias na sensibilidade à insulina e, proporcionando benefícios na redução da incidência de infarto do miocárdio e redução do risco de desenvolver diabetes tipo 2 (KAHLEOVA; PELIKANOVA, 2015). Efeitos positivos podem ser observados com a suplementação de ácidos graxos, como os  $\omega$ -3,, envolvidos na diminuição da agregação plaquetária e alterações na função endotelial (RICHARDSON et al., 2011). Além disso, também foram demonstrados efeitos antiarrítmicos, anti inflamatórios e anti-ateroscleróticos, além de promoverem a redução de triglicédeos (ADKINS; KELLEY, 2010).

Além de produzir mediadores com efeitos antiinflamatórios, sabe-se que os ácidos graxos  $\omega$ -3 produzem mediadores envolvidos na produção de resolvinas e protectinas. Estas moléculas são capazes de reduzir a resposta inflamatória e têm propriedades imunomodulatórias, promovendo redução da migração dos neutrófilos e de citocinas pró-inflamatórias (NASCIUTTI et al., 2015).

Ácidos graxos são relacionados a ganho de peso, inflamação, riscos cardiovasculares e síndrome metabólica (LOPES, 2014). Dashti et al. (2002) identificou que observou-se que o ácido linoléico e palmítico aumentaram a secreção e acumulação celular de colesterol livre e colesterol esterificado, além de reduzir os níveis de TAG e fosfolípidios. Sugeriu-se que os efeitos adversos dos AG trans estão relacionados com a composição e concentração das apolipoproteínas A-I e B (VASCONCELOS COSTA et al.; 2006).

Além de produzir mediadores com efeitos antiinflamatórios, sabe-se que os ácidos graxos  $\omega$ -3 produzem mediadores envolvidos na produção de resolvinas e

protectinas. Estas moléculas são capazes de reduzir a resposta inflamatória e têm propriedades imunomodulatórias, promovendo redução da migração dos neutrófilos e de citocinas pró-inflamatórias (NASCIUTTI et al., 2015).

Esta elevada atividade antioxidante do extrato orgânico obtido de *S. rhombifolia* está relacionada aos polifenóis totais produzidos são em sua maioria flavonóides que estão associados à capacidade antioxidantes pelos dois métodos de DPPH e ABTS. O estudo de Narendhirakannan e Limmy (2010) sugere que o extrato de etanol de *S. rhombifolia* tem atividade antioxidante potente. Os compostos fenólicos pertencentes aos vegetais são encontrados com estruturas variadas, como os ácidos fenólicos, derivados da cumarina, taninos e flavonóides, que podem atuar como agentes redutores, sequestrantes de radicais livres, quelantes de metais ou desativadores do oxigênio singlete (FERREIRA et al., 2016; LARCHER, 2004; TAIZ & ZEIGER, 2013;. Inicialmente as análises de conteúdo de fenólicos totais (CFT) e conteúdo de flavonoides totais (FT) foram realizadas como indicadores de compostos com atividade antioxidante (FERRO, 2019). Os dados obtidos corroboram com resultados descritos na literatura, onde é relatada presença de flavonoides nas espécies do gênero *Sida*, aos quais é atribuída função de defesa dos vegetais que os contém (FERRO, 2019; ZUANAZZI; MONTANHA, 2007).

Através de análises referentes ao perfil de metabólitos secundários, é possível relacionar algumas moléculas com a atividade biológica da planta analisada, pois essas análises apontam que a utilização do EBS causa algumas interferências fisiológicas positivas em alguns parâmetros hematológicos e bioquímicos característicos do diabetes.

## **6. CONCLUSÃO GERAL**

Devido à presença de moléculas de interesse biológico na espécie e aos dados observados nesta pesquisa, a planta em estudo torna-se alvo de interesse para mais pesquisas, a fim de atribuir um uso seguro para a população e isento de riscos de interações com outras plantas, alimentos e medicamentos.

- Os ensaios de análise fitoquímica preliminar identificaram presença de heterosídeos antociânicos, saponinas, taninos hidrolisáveis e flavonóides, enquanto que para as cumarinas, ocorreu reação negativa;

- A determinação de teores resultou em polifenóis totais  $134,0 \pm 0,25$ , flavonóides totais  $14,46 \pm 0,05$  e taninos condensados  $30,7 \pm 0,11$  mg/g do EBSR;
- A análise por HPLC-MS o composto de maior concentração encontrado foi a isoquercetrina ( $300.86 \pm 7.79$  mg/100g), seguido de derivados da apigenina ( $202.02 \pm 1.23$  mg/100g) e derivados do canferol ( $135.87 \pm 1.50$  mg/100g);
- A análise CG-DIC, análise específica de ácidos graxos evidenciou a presença dos ácidos palmítico (C16:00), Linoléico (C:18:2n6c), alfa-linolênico (C:18:3n3), como majoritários nas amostras;
- Com o método DPPH o extrato apresentou atividade antioxidante com valor de IC50 (50% de concentração inibitória) de  $1554,92 \pm 0.18$  µg/mL;
- No método ABTS valores de SRS% de 99,26; 101,88; 89,17; 56,01 e 32,09 para as respectivas concentrações de EBSR 40, 30, 20, 10 e 5 µg/mL;
- Os resultados do MTT foram expressos em porcentagem da viabilidade celular e em nenhuma concentração o EBSR apresentou efeito citotóxico para as linhagens linhagem celular 3T3 (fibroblastos murinos) e HT-29 (câncer colorretal humano), sendo a IC50 HT-29 de  $138,7 \pm 3,02$ ;
- O consumo alimentar foi maior em ratos diabéticos tratados (met e EBS) do que nos ratos não tratados e sadios.
- Os grupos diabéticos tratados (met e EBS) tiveram maior peso corpóreo que o grupo diabético não tratado;
- Grupos tratados com *S. rhombifolia* tiveram glicemia inferior ao grupo diabético não tratado;
- IL- 1 e IL-6 citocina inflamatórias, e IFN-GAMA citocina pró-inflamatória, tiveram valores maiores nos grupos diabéticos não tratado e tratado com metformina, do que nos grupos tratados com *S. rhombifolia*;
- IL-10 citocina anti-inflamatória, inibe a síntese de TNF, IL-1, IL-6 E IL-8; teve maior expressividade no sadios (G1) e menor no grupo diabético não tratado; já nos grupos diabéticos tratado com met (G3), e *S. rhombifolia* ( G4 e G5)teve valores maiores que no diabético não tratado (G2);
- AdipoQ maior concentração no G1, no G4 e G5 está elevada em relação a G2 e G3;
- Resistina e leptina resultados decrescente na ordem G2, G3, G4, G5 e G1.
- Resistina contribui para o risco de síndrome metabólica

- Leptina é preditor de resistência insulínica, G. diabéticos tiveram valores elevados em relação ao G1.
- Grelina em obesos possui valores menores que em indivíduos magros. Foi mais elevada em diabéticos tratados na seguinte ordem G3, G4 e G5 (metf e ESR), que nos G1 e G2.
- O cortisol foi superior no G3, seguido de G4, G2 e G5. G1 teve o menor valor. Esta relacionado com os níveis mais elevados de açúcar em pessoas com DM2.
- Corticosterona foi elevada no G3 e G4, valores intermediários G2 e G1 e menor valor no G5, carece de estudos para as diferentes condições fisiológicas ou estressantes.

Ressalta-se a necessidade de novos estudos para avaliar tais achados preliminares, visando esclarecer os efeitos aqui observados, já que a utilização dessa planta poderia ser um método complementar no tratamento do diabetes.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABAT, J. K.; KUMAR, S.; MOHANTY, A. **Aspectos Etnomedicinais, Fitoquímicos e Etnofarmacológicos de Quatro Plantas Medicinais de Malvaceae Utilizadas em Medicamentos Tradicionais Indianos:Uma Revisão**. Medicamentos v.4, p. 75, 2017.
- ABERA, R. G.; DEMESSE, E. S.; BOKO, W. D. **Evaluation of glycemic control and related factors among outpatients with type 2 diabetes at Tikur Anbessa Specialized Hospital, Addis Ababa, Ethiopia: a cross-sectional study**. BMC endocrine disorders, v. 22, n. 1, p. 1-11, 2022.
- AGUIAR, C.; DUARTE, R.; CARVALHO, D. **Nova abordagem para o tratamento da diabetes: da glicemia à doença cardiovascular**. Revista Portuguesa de Cardiologia, 2019.
- AHIMA, R. S., FLIER, J. S. **Adipose tissue as an endocrine organ**. Trends Endocrinol Metabolism., v. 11, n. 8, p. 327-332, 2000.
- AHIRRAO, P. **Sida rhombifolia Linn., A Traditional Herb: A Review of its Phytochemistry and Pharmacology**. Current Traditional Medicine, v. 10, n. 1, p. 102-113, 2024.
- ALBUQUERQUE, R.; PIMAZONI NETTO, A. **Diabetes na Prática Clínica**. Sociedade Brasileira de Diabetes. 2008.
- AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. **Standards of medical care in diabetes**. Diabetes Care, Alexandria, v. 34, n.1, p.12, 2011.
- AROOR, A. R. et al. **Maladaptive immune and inflammatory pathways lead to cardiovascular insulin resistance**. Metabolism., v. 62, n. 11, p. 1543-1552, 2013.
- ASSAM, A. J. **In vitro antibacterial activity and acute toxicity studies of aqueous-methanol extract of Sida rhombifolia Linn. (Malvaceae)**. BMC Complement Altern Med., 2010.
- BARBOSA, K. B. F.; COSTA, N. M. B.; ALFENAS, R. de C. G.; DE PAULA, S. O.; MINIM, V. P. R.; BRESSAN, J. **Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios**. Rev Nutr., v.23, n. 4, p.43-629, 2010.
- BARBOSA, M. R. et al. **Geração e desintoxicação enzimática de espécies reativas de oxigênio em plantas**. Ciência Rural, v. 44, p. 453-460, 2014.
- BAYNES, J.W.; DOMINICZAK, M. H. (Ed.). **Bioquímica médica**. Elsevier, 2019.
- BESSA, N. G. F. de. et al. **Prospecção fitoquímica preliminar de plantas nativas do cerrado de uso popular medicinal pela comunidade rural do assentamento vale verde – Tocantins**. Campinas: Rev. Bras. Pl. Med., v.15, n.4, p. 692-707, 2013.
- BOVINI, M. G. et al. **Malvaceae in lista de espécies da flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2015.
- BRANDÃO, M. G. L. et al. **Traditional uses of American plant species from the 1st edition of Brazilian Official Pharmacopoeia**. Revista Brasileira de Farmacognosia, v. 19, n. 2A, p. 478-487, 2009.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Gabinete do Ministro. **Portaria nº 971, de 3 de maio de 2006. Aprova a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no SUS**. Diário Oficial da União, Brasília, 2006a.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Decreto nº 5.813, de 22 de junho de 2006. Aprova Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos**. Diário Oficial da União, Brasília, 2006b.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. **Estratégias para o cuidado da pessoa com doença crônica. Caderno da Atenção básica nº 35**. Brasília: Ministério da Saúde, p. 162. 2014.



- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Anuário Estatístico do Mercado Farmacêutico 2022**, 2022.
- CABISCOL, E.; PIULATS E, ECHAVE P.; HERRERO E.; ROS J. **Oxidative stress promotes specific protein damage in *Saccharomyces cerevisiae***. J. Biol Chem. 2000.
- CARVALHO, M. H. C. de. **Citocinas, disfunção endotelial e resistência à insulina**. Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia, v. 50, p. 304-312, 2006.
- CAMBRIA, S. et al. **First record of *Sida rhombifolia* L. (Malvaceae) for Italian flora: taxonomical and ecological investigation**. Acta Botanica Croatica, v. 81, n. 2, 2022.
- CAMARGO, J. S., ZAMARCHI, T. B., BALIEIRO, A. A., PESSOA, F. A., & CAMARGO, L. M. **Prevalência de obesidade, pressão arterial elevada e dislipidemia e seus fatores associados em crianças e adolescentes de um município amazônico**. Rev Bra Cresc e Desv Hum, 31(1), 37-46, 2021.
- CAVALLI, V. L et al. **Avaliação *in vivo* do efeito hipoglicemiante de extratos obtidos da raiz e folha de bardana *Arctium minus* (Hill.) Bernh.** Brazilian Journal of Pharmacognosy, v. 17, n. 1, p. 64-70, 2007.
- CATAPANO, A. L., et al. **Guia ESC/EAS 2016 sobre o tratamento da dislipidemia**. Rev Esp Cardiol. 2017.
- CICERO, A. F. et al. **A Randomized Placebo-Controlled Clinical Trial to Evaluate the Medium-Term Effects of Oat Fibers on Human Health: The Beta-Glucan Effects on Lipid Profile, Glycemia and inTestinal Health (BELT) Study**. Nutrients, v.12(3), p. 686-697, 2020.
- CORDELLA, C. B. Y. PCA: **The Basic Building Block of Chemometrics**. Analytical Chemistry, 2012.
- COSTA, A. C. **Farmacognosia**. 2 ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1982.
- CUNHA, A. H. et al. **Local knowledge of medicinal plants in three artisanal fishing communities (Itapoá, Southern Brazil), according to gender, age, and urbanization**. Acta Bot Bras, v. 24, p. 386-394, 2010.
- DASHTI, N. et al. **Trans polyunsaturated fatty acids have more adverse effects than saturated fatty acids on the concentration and composition of lipoproteins secreted by human hepatoma HepG2 cells**. J Nutr., 2002.
- DA SILVA, R. M. J. et al. **Uso de fitoterápicos no tratamento da dislipidemia: Um estudo de revisão**. Research, Society and Development, v. 11, n. 3, 2022.
- DEBALKE, D. et al. **Avaliações de Efeitos Antibacterianos de Extratos Aquoso-Etanólicos da Parte Aérea de *Sida rhombifolia***. The Scientific World Journal, 2018.
- DEFRONZO, R. A. **Diabetes e Síndrome Metabólica: BRASIL Pesquisa Clínica e Comentários**, v. 12 p. 455-462, 2018.
- DE LIRA, C. F. et al. **Atividade biológica e perfil químico relatados para espécie *Bauhinia forficata***. Research, Society and Development, v. 11, n. 9, p. e0811931476-e0811931476, 2022.
- DENG, Y., PARK, A., ZHU, L., XIE, W., & PAN, C. Q. **Effect of semaglutide and liraglutide in individuals with obesity or overweight without diabetes: a systematic review**. Therapeutic Advances in Chronic Disease, 2022.
- DJERIDANE, A., YOUSFI, M., NADJEMI, B., BOUTASSOUNA, D., STOCKER, P., & VIDAL, N.. **Antioxidant activity of some algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds**. Food Chemistry, v. 97(4), 654-660, 2006.
- DHALWAL, K. et al. **Hypoglycemic and hypolipidemic effect of *Sida rhombifolia ssp. retusa* in diabetic induced animals**. Intl J Phytomed, n. 2, p. 160-165, 2010.

DINDA, B. et al. **The genus *Sida L.*—a traditional medicine: Its ethnopharmacological, phytochemical and pharmacological data for commercial exploitation in herbal drugs industry.** Journal of ethnopharmacology, v. 176, p. 135-176, 2015.

DO NASCIMENTO BARBOSA, V. S.; GOMES, L. S.; PALMA, D. C. A. **Dislipidemia em pacientes com diabetes tipo 2.** Saúde e Pesquisa, v. 10, n. 3, p. 579-585, 2018.

DOS SANTOS FERREIRA, F. et al. **Indicadores físico-químicos e componentes antioxidantes de duas plantas medicinais com alegações antidiabéticas da amazônia.** Revista Científica Multidisciplinar, 2023.

DUARTE, R. C. et al. **Effect of *Costus spiralis* (Jacq.) Roscoe Leaves, Methanolic Extract and Guaijaverin on Blood Glucose and Lipid Levels in a Type II Diabetic Rat Model.** Chemistry & biodiversity, v. 16, n. 1, 2019.

EGU, S.I. A. et al. **Syntheses, in vitro, and in silico studies of rhodanine-based schiff bases as potential  $\alpha$ -amylase inhibitors and radicals (DPPH and ABTS) scavengers.** Molecular Diversity, p. 1-25, 2022.

FARIA, A. P. de et al. **Proposta de um Escore Inflamatório de Citocinas e Adipocinas Plasmáticas Associado à Hipertensão Resistente, mas Dependente dos Parâmetros de Obesidade.** Arq. Bras. Cardiol., São Paulo, v. 112, n. 4, p. 383-389, 2019.

FERREIRA, T. S. et al. **Substâncias fenólicas, flavonoides e capacidade antioxidante em erveiras sob diferentes coberturas do solo e sombreamentos.** Revista Brasileira de Plantas Mediciniais, v. 18, p. 588-596, 2016.

FERRO, D. M. et al. **Integrated extraction approach to increase the recovery of antioxidant compounds from *Sida rhombifolia* leaves.** The Journal of Supercritical Fluids, v. 149, p. 10-19, 2019.

FLORA, DO BRASIL. **Flora do Brasil.** Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2017.

FRANCA, E.; ALVES, J. G. B. **Dislipidemia entre Crianças e Adolescentes de Pernambuco.** Arq Bras Cardiol, v. 87, n. 6, p. 722-727, 2006.

GUPTA, S. R. et al. **Anti-arthritic activity of various extracts of *Sida rhombifolia* aerial parts.** Nat Prod Res, n. 23, p. 689-695, 2009.

HALLIWELL, B. E.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease.** Biochem. J., 1984.

HELLAL, O. et al. **Extra-virgin olive oil consumption improves the capacity of HDL to mediate cholesterol efflux and increases ABCA1 and ABCG1 expression in human macrophages.** British Journal of Nutrition, v. 109, p. 44–55, 2013.

HERRERO, E et al. **Redox Control and Oxidative Stress in Yeast Cells.** Biochim Biophys Acta 1780, 2008.

HOFFSTEDT, J. et al. **Adipose tissue adiponectin production and adiponectin serum concentration in human obesity and insulin resistance.** The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, v. 89, n. 3, p. 1391-1396, 2004.

HSU, Y. J.; LEE, T. H.; CHANG, C. L. T. **Anti-hyperglycemic and mechanism of *Bidens pilosa* water extract.** J Ethnopharmacol., v. 122, p. 379- 383, 2009.

IDF - International Diabetes Federation. **IDF Diabetes Atlas.** 7ed., 2015.

ISMP- Instituto para Práticas Seguras no Uso dos Medicamentos. **Boletim ISMP Brasil,** vol 9, nº 2, 2020.

JAYACHANDRAN, M. et al. **Isoquercetin regulates SREBP-1C via AMPK pathway in skeletal muscle to exert antihyperlipidemic and anti-inflammatory effects in STZ induced diabetic rats.** Molecular Biology Reports, v. 47, p. 593-602, 2020.

JEDRZEJOWSKA, R. W., WOLSKI, J. K., HILCZER, J. S. **The Role Of Oxidative Stress And Antioxidants in Male Fertility.** Central European Journal Of Urology, v.66, n.1, p.60–67, 2012.

JÚNIOR, A. V. V. et al. **A grelina e sua contribuição para obesidade e diabetes mellitus tipo 2.** Revista Conhecimento Online, v. 2, 2012.

KARAM T. K. et al. **Carqueja (*Baccharis trimera*): utilização terapêutica e biossíntese.** Rev Bras PI Med., v. 15, n. 2, p. 280-286, 2013.

KARIHTALA P.; SOINI Y. **Reactive oxygen species and antioxidant mechanisms in human tissues and their relation to malignancies.** APMIS, 2007.

KAROMAH, A. H. et al. **LC-HRMS-based metabolomics of *Sida rhombifolia* and evaluation of its biological activity using different extracting solvent concentrations.** South African Journal of Botany, v. 161, p. 418-427, 2023.

KATSUKI, A. et al. **Circulating levels of active ghrelin is associated with abdominal adiposity, hyperinsulinemia and insulin resistance in patients with type 2 diabetes mellitus.** European Journal of Endocrinology, v. 151, n. 5, p. 573-577, 2004.

KAUR, G.; KAMBOJ, P.; KALIA, A. N. **Antidiabetic and anti-hypercholesterolemic effects of aerial parts of *Sida cordifolia* Linn. on Streptozotocin-induced diabetic rats.** 2011.

KHEDKAR, D. D.; ATRE, N. M. **Medicinal flora of melghat for asthma: A review.** Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry, v. 8, n. 2, p. 2091-2095, 2019.

KLAUNIG, J. E., KAMENDULIS, L. M. **The role of oxidative stress in carcinogenesis.** Annu Rev Pharmacol Toxicol. 2004.

KISS, A. C. I. **Efeito do extrato aquoso de *Allium sativum* L. sobre parâmetros bioquímicos de ratas com diabete induzido por Streptozotocin.** Rev. Bras. Pl. Med., Botucatu, v. 8, n. 3, p. 24-30. 2006.

KUMAR, Amit et al. **Phyto-therapeutic Potential of Aerial Part of *Sida rhombifolia* for Anti-Inflammatory, Antinociceptive, and Antioxidant Activity.** IJPQA, 2023.

LAILI, E. R. et al. **Comparative study of *Sida rhombifolia* from two different locations.** Rasayan Journal of Chemistry, v. 15, n. 1, p. 642-650, 2022.

LARCHER, W. **Ecofisiologia Vegetal.** 1ª ed. São Carlos: RiMa.531p. 2004.

LEAL RUIZ, E.; RODRÍGUEZ MÉNDEZ, L.; FUSTÉ BRUZAIN, M. **Complicaciones crónicas en pacientes con diagnóstico reciente de diabetes mellitus tipo 2.** Medicentro Electrónica, v. 23, n. 2, p. 136-139, 2019.

LEONARD, D. B. **Medicine at your feet: Healing plants of the Hawaiian kingdom Emerson.** 2008.

LEY, S. H.; MEIGS J. B. **Epidemiologia e Fatores de Risco do Diabetes Tipo 2.** In: Bonora E., DeFronzo R. (eds) Diabetes Epidemiologia, Genética, Patogênese, Diagnóstico, Prevenção e Tratamento. Endocrinologia. Springer, Cham., 2018.

LIMA, L. R. de et al. **Qualidade de vida e o tempo do diagnóstico do diabetes mellitus em idosos.** Rev. Bras. Geriatr. Gerontol. Rio de Janeiro, v.21, n.2, p. 180-190, 2018.

LLORENT-MARTÍNEZ E. J. et al. **Impacto de diferentes solventes e técnicas de extração nas atividades biológicas de *Cirsium yildizianum* (Asteraceae: cynareae) Ind.** Culturas Prod., 2020.

LOGESWARI, P. et al. **In-vivo anti-inflammatory effect of aqueous and ethanolic extract of *Sida rhombifolia* L. Root**. International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research, v. 4, n. 1, p. 316, 2013.

LOPES, A. B. **Efeitos do ácido palmítico na captação e metabolismo de glicose e triacilglicerol em adipócitos brancos**. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, 2014.

LOW WANG, C. C. et al. **Clinical update: cardiovascular disease in diabetes mellitus: atherosclerotic cardiovascular disease and heart failure in type 2 diabetes mellitus—mechanisms, management, and clinical considerations**. Circulation, v. 133, n. 24, p. 2459-2502, 2016.

MA, Q. **Transcriptional Responses to Oxidative Stress: Pathological and Toxicological Implications**. Pharmacol Ther, v. 125, nº. 3, p. 376 - 393, 2010.

MABBERLEY, D. J. **The Plant Book**. Cambridge University Press, Cambridge, 2000.

MAGER, T. U. et al. **Variations in the ghrelin receptor gene associate with obesity and glucose metabolism in individuals with impaired glucose tolerance**. PLoS One, v. 3, n. 8, p. e2941, 2008.

MAH, S. H.; TEH, S. S.; EE, **Gwendoline Cheng Lian**. **Anti-inflammatory, anti-cholinergic and cytotoxic effects of *Sida rhombifolia***. Pharmaceutical biology, v. 55, n. 1, p. 920-928, 2017.

MASJEDI, M. S. **Efeitos da semente de linhaça sobre os lipídios do sangue em indivíduos saudáveis e dislipidêmicos: uma revisão sistemática e meta-análise de ensaios clínicos randomizados**. Curr Probl Cardiol, 2021.

MATEO-RIVERA, I. A. et al. **Plantas medicinales usadas en la terapéutica de pacientes con hipertensión y diabetes mellitus tipo II, de la región indígena Tepehuana**. Ciencia Huasteca Boletín Científico de la Escuela Superior de Huejutla, v. 7, n. 13, 2019.

MATTOS, F. J. D. A. **Introdução à fitoquímica experimental**. Fortaleza: edições UFC, 2009.

MEMBE FEMOE, Ulrich et al. **In Vitro Assessment of the Cercaricidal Activity of *Sida acuta* Burm. F. and *Sida rhombifolia* Linn.(Malvaceae) Hydroethanolic Extracts, Cytotoxicity, and Phytochemical Studies**. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2022.

MIRANDA, R. C.; SCHIEFERDECKER, M. E. M; SCHMIDT, S.T. **Inquéritos para Antioxidantes**. Nutrir : rev. Soc. Sutiãs. Alim. Nutr.= J. Brasileiro Soc. Food Nutr., São Paulo, SP, v. 39, n. 1, pág. 154-165, abr. 2014.

MOHD, F. F.; KADIR, H. A.; TAYYAB, S. **Bilirubin clearance in temporarily hyperbilirubinemic rats treated with aqueous extract of *Sida rhombifolia***. Life Sci J., n. 9, p. 2254-2256, 2012.

NARENDHIRAKANNAN, R.T.; LIMMY T. P. **In vitro antioxidant studies on ethanolic extracts of leaf, stem and root of *Sida rhombifolia* L.** International Journal of Pharma and Bio Sciences, 2010.

NASCIUTTI, P. R. et al. **Ácidos graxos e o sistema cardiovascular**. Enciclopédia biosfera, v. 11, n. 22, 2015.

NELSON, R., REUSCH, C. **Animal models of disease: classification and etiology of diabetes in dogs and cats**. The Journal of endocrinology, n. 222, v. 3. p.1-9, 2014.

NETTO, C. B.; SIQUEIRA, I. R.; FOCESATTO, C.; PORTELA, L. V.; TAVARES, M. D. P.; SOUZA, D. O.; GIUGLIANI, R.; GONÇALVES, C. A. **S100B content and SOD activity in amniotic fluid of pregnancies with Down syndrome**. Clinical Biochemistry, v. 37, n. 2, p. 134-137, 2004.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Doenças não comunicáveis**. Genebra: OMS. 2018.

OPAS – Organização Pan-Americana de Saúde. **Doenças cardiovasculares**. 2016.

- PATEL, D.; KUMAR, R.; LALOO, D.; HEMALATHA, S. **Natural medicines from plant source used for therapy of diabetes mellitus: An overview of its pharmacological aspects.** Asian Pacific Journal of Tropical Disease, p. 239-250, 2012.
- LLORENT-MARTÍNEZ E. J. et al. **Impacto de diferentes solventes e técnicas de extração nas atividades biológicas de *Cirsium yildizianum* (Asteraceae: cynareae)** Ind. Culturas Prod., 2020.
- PÉREZ-PEREIRA, A. et al., **Ketamine and norketamine: enantioresolution and enantioselective aquatic ecotoxicity studies,** Environmental toxicology and chemistry, p. 1-11. 2020.
- PERUMAL, V. et al. **Perfil antioxidante do extrato da fruta *Momordica charantia* analisado usando metabolômica baseada em LC-MS-QTOF.** Química Alimentar, 2021.
- PINTO, M. Q. et al., **Effect of copper sulphate in the behavior of Mozambique tilapia under different temperatures,** Fishes in Mediterranean Environments, v. 3. 2018.
- POLÊTO, M. D. **Acesso à flexibilidade molecular de ligantes como estratégia de prospecção de interações fármaco-receptor.** 2019.
- PORTELA, R. de A. et al. **Diabetes mellitus tipo 2: fatores relacionados com a adesão ao autocuidado.** Revista Brasileira de Enfermagem, v.75, 2022.
- QAMAR, H. et al. **Flax: Ancient to modern food.** Pure Appl. Biol., v. 8, p. 2227- 2269, 2019.
- RASHMI, R. S.; UMA, S. M.; PRASANTA, K. C. **Comparative In vitro Antimicrobial Activity Studies of *Sida rhombifolia* Linn fruit extracts.** Inter J Pharm Tech Res, v. 2, p. 1241-1245, 2010.
- RAHAYU, M. T. et al. **Efek pemberian ekstrak etanol seledri (*apium graveolens* L.) terhadap kadar asam urat pada tikus putih (*sprague dawley*) model chronic kidney disease.** Mandala Of Health, v. 15, n. 1, p. 30-40, 2022.
- RASOULI, H., FARZAEI, M. H., & KHODARAHMI, R. **Polyphenols and their benefits: A review.** International Journal of Food Properties, v. 20, p. 1700-1741, 2017.
- RATNAM, D. et al. **Papel de antioxidantes na profilaxia e terapia: uma perspectiva farmacêutica** v. Controle J Liberar. v. 113, p. 189-207, 2006.
- REN, J., LU, Y., QIAN, Y., CHEN, B. & JI, G. **Recent progress regarding kaempferol for the treatment of various diseases.** Exp Ther Med. v. 18, p. 2759-2776, 2019.
- REVILLA-MONSALVE, M. C. et al. **Hypoglycemic effect of *Cecropia obtusifolia* Bertol aqueous extracts on type 2 diabetic patients.** Journal of ethnopharmacology, , v. 111, n. 3, p. 636-640, 2007.
- REDHA, A. **Flavonoid :Struktur antioksidatif dan peranannya dalam sistem biologis.** Journal belian., 2010.
- RIBEIRO, O. et al., **Effects of venlafaxine on zebrafish larvaebaviour - preliminary results.** Poster presented in VIII Congresso da Sociedade Ibérica de Ictiologia, Santiago de Compostela, 2020a.
- RIBEIRO, O. et al., **Genotoxicity assessment using comet assay in mozambique tilapia under the effect of copper and temperature - preliminary data,** Poster presented in VIII Congresso da Sociedade Ibérica de Ictiologia, Santiago de Compostela, 2020b.
- RIBEIRO, O. M. et al., **A dáfnia como sensor da ecotoxicidade,** Revista de Ciência Elementar, 2021.
- RIBEIRO, O. M., PINTO, M. Q., FÉLIX, L., MONTEIRO, S. M., FERNANDES, A. F., CARROLA, J. S., (2022) **O peixe-zebra (*Danio rerio*) como modelo emergente na ecotoxicologia,** Rev. Ciência Elem., 2022.
- RÍOS, J. L.; FRANCINI, F.; SCHINELLA, G. R. **Natural products for the treatment of type 2 diabetes mellitus.** Planta medica, v. 81, n. 12/13, p. 975-994, 2015.

- RODRIGUES, R. M. D.. **Estudo para a aplicação de extratos de córtex do pinheiro-bravo em produtos cárneos fumados**. Dissertação de Mestrado. 2022.
- ROMERO, C. E. M.; ZANESCO, A. **O papel dos hormônios leptina e grelina na gênese da obesidade**. Revista de Nutrição, p. 85-91, 2006.
- RONDANELLI, M. et al. **Appetite control and glycaemia reduction in overweight subjects treated with a combination of two highly standardized extracts from Phaseolus vulgaris and Cynara scolymus**. Phytotherapy research, v. 25, n. 9, p. 1275-1282, 2011.
- SABBÁ, H. B. O.; VIANA, C. A. S.; SILVA, C. B.; ALVES, D. R.; MIRANDA, J. L. F.; RODRIGUES, M. C.; SANTOS, P. H. F. dos. **Ozempic (Semaglutide) for the treatment of obesity: advantages and disadvantages from an integrative analysis**. Research, Society and Development, 2022.
- SARANGI, R.; MISHRA, U.; PANDA, S.; BEHERA, S. **Evaluation of antidiarrhoeal activity of *Sida rhombifolia* Linn. Root**. Int. Res. J. Pharm. n. 2, p.157–160, 2011.
- SARAGIH. **Efeito da infusão de folhas de aipo (*Apium graveolens*) sobre os níveis de colesterol no soro sanguíneo em cobaias (*Cavia Cobaya*)**. [Tese]. Medan: USU, 2009.
- SCALIA, R. **The microcirculation in adipose tissue inflammation**. Rev Endocr Metab Disord v. 14, n. 1, p. 69-76, . 2013.
- SILVA, F. A. **Tratamento do diabetes mellitus tipo 2 através do uso de plantas medicinais**. 2017.
- SIMPSON, M. G. **Sistemática de plantas**. Imprensa Acadêmica, Burlington, 2019.
- SINGH, N. P. et al. **A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells**. Experimental cell research, v. 175, n. 1, p. 184-191, 1988.
- SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES. **Detecção e tratamento das complicações crônicas do Diabetes Mellitus**. 2023.
- SOUZA, L. S., GUEDES, G. DE S., & FERREIRA, T. V. **Plantas medicinais no tratamento do diabetes**. Revista Ibero-Americana De Humanidades, Ciências E Educação, 9(10), 1748–1757, 2023.
- SOUZA, N. A. de et al. **Dislipidemia familiar e fatores associados a alterações no perfil lipídico em crianças**. Ciência & Saúde Coletiva, v. 24, p. 323-332, 2019.
- SZERWIESKI, L. L. D. et al. **Uso de plantas medicinais por idosos da atenção primária**. Revista eletrônica de enfermagem, v. 19, 2017.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed. 2013.
- TEIXEIRA, M. E. et al.. **Fatores de Risco Cardiovascular em Cardiologistas Especialistas pela Sociedade Brasileira de Cardiologia**. Arq. Bras. Cardiol, 116, 774-81., 2021.
- TRAUTWEIN, E. A., & MCKAY, S. **The Role of Specific Components of a Plant-Based Diet in Management of Dyslipidemia and the Impact on Cardiovascular Risk**. Nutrients, v. 12, p. 2671-2692, 2020.
- THOUNAOJAM, M. C. et al. ***Sida rhomboidea*. Roxb leaf extract down-regulates expression of PPAR $\gamma$ 2 and leptin genes in high fat diet fed C57BL/6J mice and retards *in vitro* 3T3L1 pre-adipocyte differentiation**. Int J Mol Sci.,v. 12, p. 4661-4677, 2011.
- VEBER, J. et al. **Determinação dos compostos fenólicos e da capacidade antioxidante de extratos aquosos e etanólicos de Jambolão (*Syzygium cumini*L.)**. Revista Brasileira de plantas medicinais, v. 17, p. 267-273, 2015.
- WAJCHENBERG, B. L. **Disfunção endotelial no diabetes do tipo 2**. Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia, v. 46, p. 514-519, 2002.

VASCONCELOS COSTA, A. G.; BRESSAN, J.; SABARENSE, C. M.. **Ácidos Graxos Trans: Alimentos e Efeitos na Saúde**. ALAN, Caracas , v. 56, n. 1, p. 12-21, 2006.

VENKATAKRISHNAN, R et al. **Estudos sobre a eficácia analgésica e antiinflamatória de *Abutilon indicum* : um medicamento tradicional**. Asian J. Chem. v. 26, 3715, 2014.

VIANA, P. O. **Utilização de plantas medicinais como ferramenta de estímulo para o resgate de cultura e qualidade de vida**. 2019.

VIEITO, C., FERNANDES, É., VAZ VELHO, M., & PIRES, P. **The effect of different solvents on extraction yield, total phenolic content and antioxidant activity of extracts from pine bark (*Pinus pinaster* subsp. atlântica)**. Chemical Engineering Transactions,v. 64, p.127-132, 2018.

ZHENG, Y.; LEY, S. H.; FRANK, B. H. **Etiologia global e epidemiologia do diabetes mellitus tipo 2 e suas complicações**. Nature Reviews Endocrinology, v. 14, p. 88 - 98, 2018.

ZIN, L. et al. **Influência da ingestão de frutose sobre parâmetros gestacionais, bioquímicos e de estresse oxidativo de Ratas Wistar**. Revista Perspectiva, v. 46, n. 173, p. 69-86, 2022.

ZUANAZZI, J. A. S.; MONTANHA, J. A. . **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. In: UFSC. 6.ed. 2007

## ANEXO A

## Cadastro no SisGen



Ministério do Meio Ambiente  
**CONSELHO DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO**  
SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL ASSOCIADO

**Comprovante de Cadastro de Acesso**  
**Cadastro nº AFB6706**

A atividade de acesso ao Patrimônio Genético, nos termos abaixo resumida, foi cadastrada no SisGen, em atendimento ao previsto na Lei nº 13.123/2015 e seus regulamentos.

Número do cadastro: **AFB6706**  
Usuário: **Liliane de Freitas Bauermann**  
CPF/CNPJ: **645.795.900-82**  
Objeto do Acesso: **Patrimônio Genético**  
Finalidade do Acesso:  
 Pesquisa Científica     Bioprospecção     Desenvolvimento Tecnológico

**Espécie**

**Sida rhombifolia**

Título da Atividade: **Estudo do efeito toxicológico, atividade hipoglicemiante e hipolipemiante de Sida rhombifolia L. (malvaceae)**

**Equipe**

<b>Liliane de Freitas Bauermann</b>	<b>UFSM</b>
<b>Marianne Pinheiro Teixeira</b>	<b>UFSM</b>

Data do Cadastro: **06/08/2019 15:54:03**

Situação do Cadastro: **Concluído**

Conselho de Gestão do Patrimônio Genético  
Situação cadastral conforme consulta ao SisGen em **19:59** de **07/08/2020**.



SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO  
DO PATRIMÔNIO GENÉTICO  
E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL  
ASSOCIADO - **SISGEN**



## ANEXO B

## CERTIFICADO DE APROVAÇÃO DA CEUA



Comissão de Ética no Uso de Animais

da  
Universidade Federal de Santa Maria

### CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Estudo da atividade hipoglicemiante e hipolipemiante da *Sida rhombifolia* L. (malvaceae)", protocolada sob o CEUA nº 9060220322 (ID 003834), sob a responsabilidade de **Liliane de Freitas Bauermann (Responsável Técnico)** e equipe; *Marianne Pinheiro Teixeira; James Ramires Penteado Graiczik; Rafaela Castro Dornelles; Jaime Sardá Aramburú Júnior* - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Maria (CEUA da UFSM) na reunião de 05/07/2022.

We certify that the proposal "Study of the hypoglycemic and lipid-lowering activity of *Sida rhombifolia* L. (malvaceae)", utilizing 25 Heterogenics rats (25 males), protocol number CEUA 9060220322 (ID 003834), under the responsibility of **Liliane de Freitas Bauermann (Responsável Técnico)** and team; *Marianne Pinheiro Teixeira; James Ramires Penteado Graiczik; Rafaela Castro Dornelles; Jaime Sardá Aramburú Júnior* - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of Santa Maria (CEUA da UFSM) in the meeting of 07/05/2022.

Finalidade da Proposta: [Pesquisa](#)

Vigência da Proposta: de [08/2022](#) a [12/2023](#)

Área: [Departamento de Fisiologia E Farmacologia](#)

Origem: [Biotério Central UFSM](#)

Espécie: [Ratos heterogênicos](#)

sexo: [Machos](#)

idade: [4 a 6 semanas](#)

N: [25](#)

Linhagem: [Wistar](#)

Peso: [170 a 200 g](#)

Local do experimento: Laboratório de Fisiologia Experimental: Prédio 21, sala 5229- Universidade Federal de Santa Maria

Santa Maria, 15 de agosto de 2022

Dra. Patrícia Bräunig  
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Universidade Federal de Santa Maria

Prof. Dra. Vania Lucia Loro  
Vice-Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Universidade Federal de Santa Maria

## ANEXO C

## Comprovante de publicação

*IOSR Journal Of Pharmacy And Biological Sciences (IOSR-JPBS)*  
 e-ISSN:2278-3008, p-ISSN:2319-7676. Volume 19, Issue 1 Ser. 1 (Jan. – Feb. 2024), PP 52-58  
 www.iosrjournals.org

## Phytochemical Analysis, Antioxidant And Cytotoxic Activities Of *Sida Rhombifolia* Linn.

Marianne Pinheiro Teixeira<sup>1</sup>, Vanessa Amaral Ribeiro<sup>1</sup>, Sabrina Somacal<sup>3</sup>,  
 Letícia Bueno Machado<sup>1</sup>, Daniela Mathes<sup>1</sup>, Camila Monteiro<sup>1</sup>,  
 Shauanni De Oliveira<sup>1</sup>, Daniele Ruberth Nogueira- Librelotto<sup>1</sup>,  
 Tatiana Emanuelli<sup>4</sup>, Gilberti Helena Hubscher Lopes<sup>4</sup>,  
 Liliane De Freitas Baurmann<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Department Of Industrial Pharmacy, Federal University Of Santa Maria, Santa Maria, Rs, Brazil.

<sup>2</sup> department Of Pharmacology, Federal University Of Santa Maria, Santa Maria, Rs, Brazil.

<sup>3</sup> department Of Biochemistry And Molecular Biology, Federal University Of Santa Maria, Santa Maria, Rs, Brazil; <sup>4</sup> department Of Food Science And Technology, Federal University Of Santa Maria, Santa Maria, Rs, Brazil.

### Abstract:

**Background:** The species *Sida rhombifolia* Linn, popularly known as “guanxuma”, has several popular therapeutic uses. Therefore, this study aimed to characterize the ethanolic extract of the species collected in southern Brazil.

**Materials and Methods:** The extract was subjected to qualitative and quantitative tests regarding the content of secondary metabolites, using spectroscopic and liquid and gas chromatographic methods to trace its profile of chemical compounds. The study also investigated the antioxidant potential using the DPPH and ABTS methods. Cell viability was also analyzed using the MTT method.

**Results:** Total polyphenol content was  $134.0 \pm 0.25$  mg/g, total flavonoids  $14.46 \pm 0.05$  mg/g and condensed tannins  $30.7 \pm 0.11$  mg/g of ESR. In the HPLC-MS analysis, the compound with the highest concentration was isoquercetrin ( $3.00 \pm 0.077$  mg/g), followed by the results of apigenin ( $2.02 \pm 0.01$  mg/100g) and results of kaempferol ( $135.87 \pm 0.01$  mg/g). In the CG-DIC analysis, specific for fatty acids, the highest concentrations were palmitic, linoleic and alpha-linolenic acids, respectively. The DPPH method presented an IC50 value of  $1554.92 \pm 0.18$  µg/mL and ABTS the FR5% value was 101.8. The MTT results do not contain concentrations of cytotoxic effects.

**Conclusion:** The data observed in this research show therapeutic potential in the species as *S. rhombifolia* has good antioxidant potential.

**Key Word:** *Sida rhombifolia*, Malvaceae, Guanxuma, Biological activity, Antioxidant activity.

Date of Submission: 15-01-2024

Date of Acceptance: 25-01-2024

### I. Introduction

The species *Sida rhombifolia* L. is known as a fortifier, diuretic, antidiarrheal, antiseptic, antibiotic, tonic and anti-inflammatory, among which it is used to treat diabetes<sup>1,2</sup>. *Sida rhombifolia* is one of 200 species of the genus *Sida*, belonging to the Malvaceae family. It grows in tropical and warm regions and is distributed throughout the tropics<sup>1,2,3</sup>. The original genus *Sida* is native to Brazil, where has a wide distribution in the Northeast and South and to a lesser extent in the North, Midwest and Southeast of the country<sup>2</sup>. Also known as ‘guanxuma’, ‘mata pasto’, ‘vassourinha’, ‘relógio’, it is a plant native to the American continent, occurring intensively in South America. It also occurs to a lesser extent in the south of the United States. The genus *Sida* is considered native to Brazil and has 103 species according to Bovini (2015) in the List of species of the Flora of Brazil<sup>4</sup>. The phytochemical investigation of this genus has resulted in the identification of around 142 chemical constituents, among which alkaloids, flavonoids and cecosteroids<sup>5,6</sup> are the predominant groups. The crude and isolated extracts have shown a broad spectrum of pharmacological effects in vitro and ex vivo<sup>7</sup>.

Plants have developed enzymatic and non-enzymatic defense mechanisms capable of neutralizing the cytotoxicity of reactive oxygen species (ROS)<sup>8</sup>. Therefore, the aim of this study was to conduct a preliminary phytochemical analysis and identify the main classes of secondary metabolites and the antioxidant activity of the species, as well as to evaluate the cytotoxic effect of the extract in vitro.

## ANEXO D

### Diretrizes para publicação Periódico *Journal of Pharmacy and Biological Sciences*

#### Diretrizes e downloads para preparação de manuscritos

---

IOSR Journals é uma organização autossustentável e não recebe financiamento de nenhuma instituição/governo. Assim, o funcionamento da revista é financiado exclusivamente pelas taxas de processamento recebidas dos autores. As taxas de processamento são necessárias para cobrir despesas operacionais, como funcionários, salários, serviços de internet, eletricidade, etc. Por ser uma revista de acesso aberto, a IOSR Journals não recebe pagamento por assinatura, pois as revistas são de acesso gratuito pela internet. Custa dinheiro produzir um artigo revisado por pares, editado e formatado, pronto para publicação on-line, e hospedá-lo em um servidor de acesso gratuito e sem barreiras, 24 horas por dia. Pedimos que – como uma pequena parte do custo da pesquisa – o autor, instituição ou agência financiadora pague uma taxa modesta para ajudar a cobrir o custo real da etapa final essencial, a publicação.

## IOSR Manuscript Preparation Guidelines :

### Margin:

Top	Bottom	Left	Right
<b>1</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>1</b>

### Paper Size: A4 Layout :

Header	Footer
<b>0.79</b>	<b>0.79</b>

### All Font of paper:

Size	Text	Align	Type
<b>10</b>	<b>Normal</b>	<b>Justify</b>	<b>Times New Roman</b>

### Title :

Size	Text	Align
<b>16</b>	<b>Bold</b>	<b>Center</b>

### Authors Name :

Size	Text	Align
<b>14</b>	<b>Normal</b>	<b>Center</b>

### Authors Affiliation :

Size	Text	Align
<b>10</b>	<b>Italic, Normal</b>	<b>Center</b>

### Abstract & Keywords :

Size	Text	Align
<b>10</b>	<b>Italic, Normal</b>	<b>Justify</b>

### Main Headings :

Size	Text	Align	Capitalization
<b>11</b>	<b>Bold</b>	<b>Center</b>	<b>Upper Case</b>

### Sub Headings :

Size	Text	Align	Capitalization
<b>10</b>	<b>Bold</b>	<b>Italic</b>	<b>Sentence Case</b>

### Line Space: 1 Reference:

Size	Text	Align
<b>8</b>	<b>Normal</b>	<b>Justify</b>

### Acknowledgement:

Size	Text	Align
<b>8</b>	<b>Normal</b>	<b>Justify</b>

## ANEXO E

### Comprovante de submissão

Manuscript submitted to *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*   Caixa de entrada x

**Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology** <no-reply@atyonrex.com>  
para mim ▾

 **Imagens não exibidas** Exibir imagens abaixo - Sempre exibir imagens de no-reply@atyonrex.com

 Traduza para o português

X

Dear Marianne Teixeira,

Your manuscript "Evaluation of the antihyperglycemic effect of the crude extract of *Sida rhombifolia* Linn on biochemical and hematological parameters." has been successfully submitted and is being delivered to the Editorial Office of *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* for consideration.

You will receive a follow-up email with further instructions from the journal editorial office, typically within one business day. That message will confirm that the editorial office has received your submission and will provide your manuscript ID.

Thank you for submitting your manuscript to *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*.

Sincerely,  
The Editorial Staff at *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*

By submitting a manuscript to or reviewing for this publication, your name, email address, and affiliation, and other contact details the publication might require, will be used for the regular operations of the publication, including, when necessary, sharing with the publisher (Wiley) and partners for production and publication. The publication and the publisher recognize the importance of protecting the personal information collected from users in the operation of these services and have practices in place to ensure that steps are taken to maintain the security, integrity, and privacy of the personal data collected and processed. You can learn more by reading our [data protection policy](#). In case you don't want to be contacted by this publication again, please send an email to [cepp@wiley.com](mailto:cepp@wiley.com).

## ANEXO F

### **Diretrizes de Submissão do Periódico *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology***

Author Guidelines

Sections

1. SUBMISSION
2. AIMS AND SCOPE
3. MANUSCRIPT CATEGORIES AND REQUIREMENTS
4. PREPARING THE SUBMISSION
5. EDITORIAL POLICIES AND ETHICAL CONSIDERATIONS
6. AUTHOR LICENSING
7. PUBLICATION PROCESS AFTER ACCEPTANCE
8. POST PUBLICATION
9. EDITORIAL OFFICE CONTACT DETAILS

#### 1. SUBMISSION

Authors should kindly note that submission implies (i) that the content has not been published previously, in any language, in whole or in part, except as a brief abstract in the proceedings of a scientific meeting or symposium; and (ii) that the manuscript is not currently under consideration for publication elsewhere.

New submissions should be made via the Research Exchange submission portal <https://submission.wiley.com/journal/cep>. Should your manuscript proceed to the revision stage, you will be directed to make your revisions via the same submission portal. You may check the status of your submission at any time by logging on to [submission.wiley.com](https://submission.wiley.com) and clicking the “My Submissions” button. For technical help with the submission system, please review our FAQs or contact [submissionhelp@wiley.com](mailto:submissionhelp@wiley.com).

Free Format submission

*Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* now offers Free Format submission for a simplified and streamlined submission process.

#### 2. AIMS AND SCOPE

*Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* provides a medium for the rapid online publication of original research papers, rapid communications, and technical papers on the results of clinical and experimental work in pharmacology and physiology. Reviews, research highlights and news/views are also published.

The journal aims to make a substantial contribution to effective and productive communication between scientists throughout the world who are working in these interrelated disciplines. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* has been endorsed by the High Blood Pressure Research Council of Australia (HBPRCA), the Australasian Society of Clinical and Experimental Pharmacologists and Toxicologists (ASCEPT) and the Australian Physiological Society (AuPS).

Peer Review and Acceptance

The acceptance criteria for all papers are the quality and originality of the research and its significance to our readership. Manuscripts are peer reviewed by at least two anonymous

reviewers. A manuscript may be rejected without review, however, if the Editor-in-Chief deems it inappropriate for the journal. The content of the manuscripts will be held in strict confidence by the editors. The decision to accept or reject rests with the Editors. Where contributions are judged as acceptable for publication on the basis of content, the Editor and the Publisher reserve the right to modify manuscripts to eliminate ambiguity and repetition and improve communication between author and reader. If extensive alterations are required, the manuscript will be returned to the author for revision.

If authors are from the editorial board of *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* including Editor-in-Chief, Senior Editors, Associate Editors, Society Editors, Editorial Board Members and Advisory Board Members, they will be excluded from the peer-review process and all editorial decisions related to the publication of this article.

*New Pathways: Transferred and Expedited Peer Review.* The Editors are able to offer expedited peer review for papers that have already been through the review process with a number of select journals. If you have an original article that has been found not to be acceptable for publication by one of a small number of journals on the basis of a perceived lack of priority rather than major flaws in scientific rigour, you may wish to consider using our 'New Pathways' review option. A full list of these journals, along with detailed instructions for submission and information about the expedited review of such manuscripts, can be found online. Articles should be submitted in their original form along with a copy of the decision letter from the journal. The decision letter should include at least two sets of reviewer comments. These manuscripts will then receive expedited review by the Editor.

**Transparent Peer Review:** This journal is participating in a pilot on Peer Review Transparency. By submitting to this journal and opting in this pilot, authors agree that the reviewer reports, their responses, and the editor's decision letter will be linked from the published article to where they appear on Publons in the case that the article is accepted. Authors have the opportunity to opt out during submission, and reviewers may remain anonymous unless they would like to sign their report.

#### Subjects covered

Contributors are invited to submit manuscripts as Original Articles, Review, Technical Papers, Rapid Communications and Letters to the Editor. The content of these papers may be in any of the fields that are covered by the title *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, interpreted in the broadest sense. The journal particularly welcomes papers within the broad subject of translational medicine and has a policy of not publishing papers describing studies of the effects of impure natural substances. Experimental studies that provide new mechanistic insights are given priority over those that are largely descriptive.

### 3. MANUSCRIPT CATEGORIES AND REQUIREMENTS

#### Editorial (by invitation only)

- Word Limit: 2000 words
- Abstract: No abstract
- References: Up to 10
- Description: Proposals for Editorial may be submitted for consideration. An outline of the proposed Editorial Commentary should be submitted in the first instance rather than the full text.

#### Review

- Word limit: 6000 words, including Title Page, Abstract, Text, References and Tables
- Abstract: 250 words maximum
- References: Up to 120 Figures/tables: Maximum 8.
- Description: Reviews are comprehensive analyses of specific topics. Proposals for reviews may be submitted with an outline of the proposed paper, the abstract and the author's publication list for initial consideration. Both solicited and unsolicited review articles will undergo peer review prior to acceptance.

#### Research Highlights

- Word Limit: 3000 words, including Title Page, Abstract, Text, References and Tables
- Abstract: 250 words maximum
- References: Up to 80
- Figures/Tables: Maximum 4
- Description: Research Highlights focus on a particular topic and an editor is appointed to oversee the peer review process. The manuscripts are presented in the form of a mini-review. Original data may be included, but if so, sufficient detail on methods must be provided so that proper peer review can be accomplished.

#### Original Article

- Word limit: 6000 words, including Title Page, Abstract, Text, References and Tables Abstract: 250 words maximum
- References: Up to 60
- Figures/tables: Maximum 8
- Description: Full-length reports of current research in any of the fields covered by the title Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology, interpreted in the broadest sense. The text should be arranged as follows: Abstract, Introduction, Results, Discussion, Methods, Acknowledgements, References. Supporting information should be provided in a separate file.

*New pathways: Transferred Peer Review.* Please read the section 'New Pathways: Transferred Peer Review' above for information on submitting original articles along with reviews from selected other journals. More details on the CEPP New Pathways program can be found [here](#).

#### Technical Note

- Word Limit: 6000 words, including Title Page, Abstract, Text, References and Tables
- Abstract: 250 words maximum
- References: Up to 60
- Figures/tables: Maximum 8
- Description: Technical Notes should focus on projects that did not yield publishable results but represent valuable information regarding new techniques or procedures, testing or critique of existing techniques, protocols, and experimental or computational methods. These should be structured like Original Articles.

#### Rapid Communication

- Word limit: 3000 words (excluding references)
- Abstract: maximum 250 words
- Figures/ tables: 4 maximum
- References: 60 maximum
- Description: Rapid Communications report most important new findings and are given priority by the Editorial Office. The text should include Abstract, Introduction, Results, Discussion, Methods, Acknowledgements and References. Authors should indicate the reasons for Rapid publication.

#### Letter to the Editor

- Word limit: 1200 words
- Abstract: 120 words
- References: Up to 30
- Figures/ tables: 2 maximum
- Description: Letter to the Editor focus on the topics of short cutting edge research. Comments on papers recently published in CEPP will be welcomed. They should include a brief summary and key words, but no subheadings. Name, postal address, telephone, facsimile numbers and email addresses of the corresponding author should be given on the title page.

Letters to the Editor are not subjected to external peer review, but will be reviewed by at least one editor or editorial board member. Submissions may be edited for length, grammatical correctness, and journal style. Authors will be asked to approve editorial changes that alter the substance or tone of a letter or response. Letters that offer perspective on content already published in the Journal can use an arbitrary title, but a response from authors must cite the title of the first Letter:



e.g. Response to [title of Letter]. This ensures that readers can track the line of discussion.

#### 4. PREPARING THE SUBMISSION

##### Manuscript Format and Style

Manuscripts should follow the style of the Vancouver agreement detailed in the *Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals*, as presented in JAMA 1997; 277: 927-34.

Spelling. The journal uses UK spelling and authors should follow the latest edition of the *Oxford Concise English Dictionary*.

Footnotes. Footnotes arising from the text must not be used.

Standard abbreviations. These should be used sparingly. They should be defined in the Summary and on the first mention in the text. In general, terms should not be abbreviated unless they are used repeatedly and the abbreviation is helpful to the reader.

Units of measurement. As far as possible, these should conform to the SI conventions, with the notable exception that blood pressures should be given in mmHg. It is strongly recommended that contributors consult the booklet *Units, Symbols and Abbreviations: A Guide for Biological and Medical Editors and Authors* (Ed. D. N. Baron), 1988, The Royal Society of Medicine Services, London. The recommendations outlined therein will be followed.

##### Methods of statistical analysis

The journal recommends that investigators seek the advice of a professional biostatistician in the design stage of their study, as well as during the stage of actual data analysis. Statistical methods used should be identified, with appropriate citation of statistical texts or articles that describe their use. Reasons for choosing particular methods of analysis, and for the number of experimental units, should be stated. The name and source of commercial statistical computer packages used should be identified. The statistical section should contain sufficient detail for the reader to have a clear idea about how the analysis was performed. The level of statistical significance (alpha) should be defined and it should be stated explicitly whether this refers to one- or two-sided probability. Nevertheless, exact P values should be given to a sensible number of significant figures (e.g. P = 0.01 rather than P = 0.0058). The risk of type 1 error (a false positive inference) should always be controlled. This requires the use of global statistical tests of significance where possible, particularly in experimental designs that involve repeated measurements in the same experimental units (humans, animals, tissues or cells). Multiple comparisons within a single experiment should only be made when this is absolutely necessary and, if so, P values should be conservatively corrected to control the risk of type 1 error. Two techniques that provide excellent control of the type 1 error rate are the 'false discovery rate' procedure (Curran-Everett D, Benos DJ. Guidelines for reporting statistics in journals published by the American Physiological Society. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 2004; 287: R247-9) and the Ryan-Holm stepdown Bonferroni procedure (Ludbrook J. Multiple comparison procedures updated. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 1998; 25: 1032-7). Confidence intervals may be used in addition to P values.

Data should be expressed as mean (SD) when the intention is to indicate the degree of variability of the data around the mean value, and as mean  $\pm$  SEM when the intention is to estimate the population mean from the sample data. In either case, the numbers of observations (n) should be stipulated. This allows the reader to calculate SD from SEM and vice versa. (For further reading, see Ludbrook J. Comments on journal guidelines for reporting statistics. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 2005; 32: 324-6 (Letter). Detailed guidelines on the use and presentation of statistics in *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* can be found online.

##### Chemical substances

These must be properly identified. Except for standard laboratory chemicals, the source of supply

must be given. Drug nomenclature should follow the rules of the International Union of Pharmacology Committee on Receptor Nomenclature and Drug Classification, published in various articles in *Pharmacological Reviews*. Proprietary names should be avoided unless the paper is concerned with a specific formulated product, in which case the nature of the formulation should be stated. Isotopically labelled chemicals should be identified by the atomic number and symbol of the isotope, its location in the molecule and the specific activity in standard (SI) units.

#### Receptors

For receptor types, nomenclature should also follow the conventions established by the IUPHAR Committee on Receptor Nomenclature and Drug Classification (International Union of Basic and Clinical Pharmacology), which are published in *Pharmacological Reviews*.

#### Parts of the Manuscript

Submissions via the new Research Exchange portal can be uploaded either as a single document (containing the main text, tables and figures), or with figures and tables provided as separate files. Should your manuscript reach revision stage, figures and tables must be provided as separate files. The main manuscript file can be submitted in Microsoft Word (.doc or .docx) formats.

Manuscripts should be presented in the following order: (i) Title Page, (ii) Abstract and keywords, (iii) Introduction, (iv) Results, (v) Discussion, (vi) Methods, (vii) Acknowledgements (including disclosure), (viii) References, (ix) tables (each table complete with title and footnotes), (x) figure legends and (xi) figure. Supporting Information should be supplied as a supplementary file.

The first page of the manuscript should contain the following information:

*Title:* The title should be as informative as possible but should avoid over-detailed information about the experimental procedures. Titles should not exceed 250 characters (including spaces).

*Family name for each author, preceded by initial(s) or given name(s):* That part of each family name which is to appear in indexes must be underlined.

*Laboratory or Institute:* The official name (in English) of each place in which the work reported in the manuscript was carried out should be given, together with the larger organization (if applicable), city, state (if applicable) and country.

*Short title:* This will be used as a running heading in the printed text; it must not exceed a total of 45 characters (including spaces) and should be as informative as possible within this limit. Abbreviations should be avoided if possible.

*Author for correspondence:* The name and full postal address, facsimile, telephone and email details of the corresponding author must be provided and clearly identified. All correspondence regarding the manuscripts, proofs and requests for reprints will be sent to this author, using the contact details provided.

*Present addresses of authors:* Should the addresses of other authors differ from that of the author for correspondence, this information should be provided and will be published.

#### *Abstract and keywords*

*Abstract.* This should commence on page two and consist of a continuous paragraph, describing the aim of the study, what was done, the main findings and the conclusions reached. A limit of 250 words applies to article abstracts, and 120 for Letters to the Editor.

*Key words:* These are required for indexing the content of the paper, and should, if possible, be selected from the US National Library of Medicine's Medical Subject Headings (MeSH) browser list. A maximum of 10 words or phrases should be sufficient. Key words should be arranged in alphabetical order.

References: Up to 60

Figures/tables: Maximum 8

Description: Technical Papers should be based mainly on the presentation of new techniques, or the testing or critique of existing techniques. These should be structured like Original Articles.

#### *Introduction*

This section should commence on a new page and contain a concise statement of the reason for doing the work, and should not contain a major statement about either the findings or the conclusions.

#### *Results*

The findings should be presented clearly with adequate reference to figures and tables. The text of Results and the information contained in figures and tables should complement one another; repetitive presentation of the same data should be avoided. Material appropriate to Discussion should not be included in Results. However, brief comments on minor points are acceptable if they help to consolidate the new information being presented or if they assist the reader to follow the progression of ideas in moving from one set of data to another.

#### *Discussion*

This should not be a mere reiteration of the Results. It should deal with the relationship of the new information given in Results to the corpus of knowledge in that field, and should be pertinent to the data presented. The main conclusions should be incorporated in the final paragraph.

#### *Methods*

Sufficient information should be given to permit the work to be repeated in other clinics or laboratories.

#### *Acknowledgements*

The source of financial grants and other funding must be acknowledged, including a frank declaration of the authors' industrial links and affiliations. The contribution of colleagues or institutions should also be acknowledged. Thanks to anonymous reviewers are not appropriate.

#### *References*

Journal article:

2. Thomsen SF, Ulrik CS, Kyvik KO, Larsen K, Skadhauge LR, Steffensen I, Backer V. *The incidence of asthma in young adults*. Chest. 2005;127:1928-34.

Book edition:

2. Storm BC. Asthma. In: Thompson VC, Olson O, editors. *Pulmonary Pathophysiology*. Baltimore: Williams & Wilkins; 1990. p. 27-42.

#### *Tables*

should be numbered consecutively in Arabic numerals. Each table should be presented on a separate page with a comprehensive but concise legend above the table. Tables should be double-spaced and vertical lines should not be used to separate columns. Column headings should be brief, with units of measurement in parentheses; all abbreviations should be defined in footnotes. Footnote symbols: †, ‡, § should be used (in that order) and \*, \*\*, \*\*\* should be reserved for P values. The table and its legend/footnotes should be understandable without reference to the text.

#### *Figures*

All illustrations (line drawings and photographs) are classified as figures. Figures should be cited in consecutive order in the text. Magnifications should be indicated using a scale bar on the illustration.

#### *Cover Image Submissions*

This journal accepts artwork submissions for Cover Images. This is an optional service you can use to help increase article exposure and showcase your research. For more information, including artwork guidelines, pricing, and submission details, please visit the Journal Cover Image page.

*Size.* Figures will be greatly reduced in size for publication. Fonts must therefore be large and consistent and lines should be relatively thick. Authors should prepare figures to fit within the column (84 mm), or the full text width (176 mm).

*Resolution.* Figures must be supplied as high resolution saved as .eps or .tif.

Halftone figures: 300 dpi (dots per inch)

Colour figures: 300 dpi saved as CMYK

Figures containing text: 400 dpi

Line figures: 1000 dpi Color figures.

Files should be set up as CMYK (cyan, magenta, yellow, black) and not as RGB (red, green, blue) so that colors as they appear on screen will be a closer representation of how they will print in the journal. Figures are published in colour in the journal free of charge.

#### *Figure legends*

Type figure legends on a separate page. Legends should be concise but comprehensive. The figure and legend must be understandable without reference to the text. Include definitions of any symbols used and define/explain all abbreviations and units of measurement.

Further information can be obtained at: The CEPP Guidelines for Preparation of Figures: and Wiley's guidelines for preparation of figures.

#### *Equations*

Equations should be numbered sequentially with Arabic numerals; these should be ranged right in parentheses. All variables should appear in italics. Use the simplest possible form for all mathematical symbols.

#### Graphical abstracts

*Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* publishes graphical abstracts for research articles and review articles, displayed online in graphical form with a brief abstract, in addition to the up to 250 word abstract above. The online table of contents will display a schematic figure to convey the core message of your paper, alongside a short abstract highlighting the major findings of the paper. Authors should submit a new and stand-alone image, or designate an image already included in the paper. Your short abstract should consist of 2-3 sentences summarizing the essence of the paper. Graphical abstract entries should be submitted to Scholar One in one of the generic file formats and uploaded as 'Graphical Abstract' during the initial manuscript submission process. The image should fit within the dimensions of 50mm x 60mm, and be fully legible at this size.

#### Supporting Information

Supporting information is information that is not essential to the article, but provides greater depth and background. It is hosted online and appears without editing or typesetting. It may include tables, figures, videos, datasets, etc. Click here for Wiley's FAQs on supporting information.

Note: if data, scripts, or other artefacts used to generate the analyses presented in the paper are available via a publicly available data repository, authors should include a reference to the location of the material within their paper.