

UNIVERSIDADE VILA VELHA – ES
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**EFEITO ANTI-HIPERTENSIVO E IDENTIFICAÇÃO DE SUBSTÂNCIAS
FENÓLICAS E FLAVONOÍDICAS EM EXTRATO METANÓLICO DE
FOLHAS DE *Carica papaya* L.**

GIRLANDIA ALEXANDRE BRASIL

VILA VELHA
FEVEREIRO/2013

UNIVERSIDADE VILA VELHA – ES
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**EFEITO ANTI-HIPERTENSIVO E IDENTIFICAÇÃO DE SUBSTÂNCIAS
FENÓLICAS E FLAVONOÍDICAS EM EXTRATO METANÓLICO DE
FOLHAS DE *Carica papaya* L.**

Dissertação apresentada à
Universidade Vila Velha, como pré-
requisito do Programa de Pós-
graduação em Ciências Farmacêuticas,
para a obtenção do grau de Mestre em
Ciências Farmacêuticas

GIRLANDIA ALEXANDRE BRASIL

VILA VELHA
FEVEREIRO/2013

Catálogo na publicação elaborada pela Biblioteca Central / UVV-ES

B823e Brasil, Girlandia Alexandre.

Efeito anti-hipertensivo e identificação de substâncias fenólicas e flavonoídicas em extrato metanólico de folhas de *Carica papaya L.* / José Carlos Abreu de Carvalho. – 2013.
78 f. : il.

Orientador: Tadeu Uggere de Andrade.

Dissertação (mestrado em Ciências Farmacêuticas) -
Universidade Vila Velha, 2013.

Inclui bibliografias.

1. *Carica papaya L.* 2. Enzima conversora da angiotensina -
Inibidores. 3. Flavonóides. 4. Plantas medicinais – Manuais,
guias, etc. I. Andrade, Tadeu Uggere de. II. Universidade Vila
Velha. III. Título.

CDD 615.7045

GIRLANDIA ALEXANDRE BRASIL

**EFEITO ANTI-HIPERTENSIVO E IDENTIFICAÇÃO DE SUBSTÂNCIAS
FENÓLICAS E FLAVONOÍDICAS EM EXTRATO METANÓLICO DE
FOLHAS DE *Carica papaya* L.**

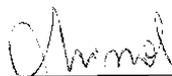
Dissertação apresentada à
Universidade Vila Velha, como pré-
requisito do Programa de Pós-
graduação em Ciências Farmacêuticas,
para a obtenção do grau de Mestre em
Ciências Farmacêuticas

Aprovada em 22 de fevereiro de 2013.

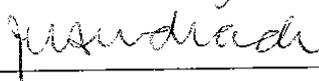
Banca Examinadora:



Prof^a. Dr^a. Cláudia do Ó Pessoa (UFC)



Prof^a. Dr^a. Nazaré Souza Bissoli (UFES)



Prof. Dr. Tadeu Uggere de Andrade (UVV)

(Orientador)

A Deus e a minha família pela oportunidade, apoio e dedicação.

Agradecimentos

A Deus, e minha família, estes sempre foram os alicerces de minha formação. Se hoje consigo realizar um sonho, antes impossível, foi graças a eles. Meu Deus que me deu forças e certeza de que o melhor sempre esteve guardado para mim, e minha família que me apoiou. Meu pai José Leite Alexandre, minha mãe Geronilda Brasil Leite e meu irmão Antonio Ricardo A. Brasil, sempre me apoiaram em tudo, me deram forças mesmo quando nem eu mesma acreditava em mim. Muito obrigada!

Ao meu orientador, Tadeu Uggere de Andrade, que me acompanha desde a graduação, que me deu a oportunidade de vislumbrar uma carreira acadêmica, que me incentivou em todos os aspectos a não desistir do meu sonho. Ele que é mais do que um orientador, é um exemplo de profissional e um amigo. Muito obrigada por tudo.

A Denise Coutinho Endringer, minha co-orientadora, que me ensinou muito sobre química de produtos naturais com muita paciência, afinal a “jovem” de vez em quando falava muita baboseira. Por toda a disponibilidade, motivação, ensinamentos e amizade dispensados, meu muito obrigada

Ah, a amizade! O que seríamos sem ela? E eu tenho muito a agradecer aos amigos. Primeiramente ao Silas, meu companheiro de pesquisas, pessoa maravilhosa que conheci e aprendi a respeitar. Aos amigos do laboratório, Michele, Ana Cláudia, Andrews, Mirian, Drielle, Suelen, Karina amigos para todas as horas, no chororô do laboratório quando algo dava errado, ou na alegria do resultado positivo, vocês sempre estiveram lá. A Ewelyne Lima, eu não esperava que nós nos tornássemos tão amigas, mas hoje sei que é para sempre, muito obrigada pelo ombro amigo, pelas conversas e conselhos e por todas as correções e opiniões neste trabalho. Amigos, sem vocês eu não teria conseguido, muito obrigada por tornarem esses dois anos os melhores da minha vida!!

A todos os professores do programa que de algum modo colaboraram para a conclusão deste trabalho, em especial ao prof. Rodrigo Scherer, pela ajuda e contribuição.

Ao laboratório de Petroleômica e Química Forense da Universidade Federal do Espírito Santo, em especial ao professor Wanderson Romão pelos espectros em MS/MS realizados neste trabalho.

A todas as pessoas que colaboraram para o término deste trabalho, todos os alunos de iniciação científica do laboratório em especial aos alunos que estavam sob minha supervisão, Maria Eduarda, Franciane, Ana Paula, Henrique e Iara. Meninos, vocês são 10!

Não posso esquecer-me do Laboratório de Ciências Químicas – LCQ, em especial a técnica responsável, Adriana Canal, que sempre nos auxiliou quando precisávamos de algum material, inclusive cedendo os seus estagiários. Falando em estagiários, muito obrigada meninos do LCQ! A toda equipe do Biopráticas que permitiram que esse trabalho fosse concluído.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, pela bolsa de estudos e financiamento deste trabalho. A Universidade Vila Velha - UVV por proporcionar conhecimento e estrutura necessários para realização deste trabalho.

Ao Instituto de Pesquisa, Assistência Técnica e Extensão Rural – INCAPER, em especial ao professor José Aires Ventura pelo fornecimento e coleta do material vegetal.

Enfim, a todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para este trabalho.

O que sabemos é uma gota,
o que ignoramos é um oceano.
Isaac Newton

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Valores de percentual de umidade, extraíveis totais e cinzas totais das amostras vegetais de <i>C. papaya</i>	25
Tabela 2	Resultado da quantificação espectrofotométrica de polifenóis e flavonóides totais nas amostras de <i>C. Papaya</i>	26
Tabela 3	Valores de <i>m/z</i> experimentais e teóricos dos principais derivados de polifenólicos encontrados na fração FR4 de <i>C. papaya</i>	28
Tabela 4	Resultados as análises hematológicas e bioquímicas	30

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** Espectros de ESI(-)-FT-ICR MS a partir dos íons de (a) m/z 593, (b) m/z 609, (c) m/z 739, (d) m/z 755 e (e) m/z 793..... 29
- Figura 2** Aumento na PAM após a aplicação *in bolus* de Ang I em ratos WKY, antes e após o tratamento com Captopril ou CP e Ensaio hipotensor agudo, queda na PAM causada por doses crescentes de CP..... 31
- Figura 3** Pressão Arterial Média (MAP) e Atividade da ECA no soro dos animais submetidos ao tratamento crônico com CP (200 mg.kg^{-1}), Enalapril (10 mg.kg^{-1}) ou veículo por 30 dias..... 33
- Figura 4** Resultado do ganho de sensibilidade do barorreflexo arterial à fenilefrina ($100 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$) e nitroprussiato de sódio ($180 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$).. 34
- Figura 5** Análise histológica dos animais SHR e WKY, Relação peso cardíaco/peso corporal (COR/PC) e análises morfométricas..... 35
- Figura 6** Aumento concentração-dependente da inibição do crescimento celular em células de miócitos cardíacos (H9c2) tratadas com extrato metanólico de *C. Papaya* (CP), após 72h de exposição... 37

LISTA DE ABREVIATURAS

COL 1 – Coleta 1

COL 2 – Coleta 2

COL 3 – Coleta 3

COL 4 – Coleta 4

COLMix – Mistura equitativa entre as coletas

WKY – *Wistar-kyoto*

SHR – Spontaneously hypertensive rat

Ang I – Angiotensina I

CP – Extrato metanólico de *Carica papaya* L.

ECA – Enzima conversora de angiotensina

RESUMO

BRASIL, Girlandia Alexandre M.Sc., Universidade de Vila Velha – ES, fevereiro de 2013. **Efeito anti-hipertensivo e identificação de substâncias fenólicas e flavonoídicas em extrato metanólico de folhas de *Carica papaya* L.** Orientador: Tadeu Uggere de Andrade. Co-orientador: Denise Coutinho Endringer

Foram avaliadas a composição química das folhas de *Carica papaya* L. (*C. papaya*), e a atividade hipotensora, anti-hipertensiva, inibitória da Enzima conversora de angiotensina (ECA) *in vivo* e *in vitro*, além da influência desse tratamento sobre a hipertrofia cardíaca, barorreflexo arterial e toxicidade. O teor de flavonóides e polifenóis totais foram quantificados por espectrometria e o extrato metanólico de *C. papaya* (CP) e sua fração tiveram os constituintes químicos identificados por LC-MS/MS e MS/MS. A atividade inibitória da ECA foi verificada *in vitro* por método colorimétrico e *in vivo* utilizando doses crescentes de Ang I. No ensaio hipotensor agudo, ratos *Wistar-kyoto* machos receberam doses crescentes de CP *in bolus* (0,01-100 mg.kg⁻¹). No ensaio anti-hipertensivo ratos SHR e *Wistar-kyoto* machos, foram tratados por 30 dias (100 mg.kg⁻¹), duas vezes ao dia. A sensibilidade do barorreflexo arterial foi avaliada por aplicação de nitroprussiato de sódio e fenilefrina. O coração foi pesado e lâminas foram confeccionadas para verificação da hipertrofia cardíaca, o soro foi submetido à avaliação da atividade da ECA. Verificou-se a toxicidade de CP por meio do ensaio de toxicidade aguda e em células de miócitos cardíacos (H9c2) pelo ensaio do MTT. O material vegetal e CP apresentaram teor de flavonóides e polifenóis totais superior a 700 mg.100g⁻¹. Em CP, quantificaram-se os ácidos ferrúlico, cafeico, gálico e o flavonóide quercetina (195,3; 178,7; 145,7; 47,1 µg.g⁻¹, respectivamente). CP apresentou atividade inibitória da ECA *in vitro* (134,3±56,3%) e *in vivo*. Foi observada atividade hipotensora aguda dose-dependente, e anti-hipertensiva nos animais tratados (SHRC= 206±2mmHg, SHRE= 152±4mmHg, SHRCP= 156±3mmHg) e a redução na PAM foi igual à observada após tratamento com enalapril. Observou-se, ainda, melhora na sensibilidade do barorreflexo após ativação com fenilefrina (SHRC BRS_{PE}= -0,47±0,09, SHRE= -0,83±0,05, SHRCP= -0,79±0,05, WKYC= -0,73±0,06, WKYE= -0,73±0,07, WKYCP = -0,72±0,08) e nitroprussiato (SHRC BRS_{NP}= -1,15±0,11, SHRE= -1,56±0,09, SHRCP= -1,60±0,17, WKYC= -1,60±0,07, WKYE= -1,68±0,14, WKYCP= -1,61±0,1), a atividade da ECA plasmática (SHRC= 119,1±13%, SHRCP= 65,8±13%, SHRE= 67,4±2,6%) e a hipertrofia cardíaca apresentavam-se reduzidas (SHRC= 4,337±0,15mg.g⁻¹, SHRE= 3,184±0,19mg.g⁻¹, SHRCP= 2,988±0,15mg.g⁻¹, WKY= 2,731±0,15mg.g⁻¹, WKYE= 2,789±0,22mg.g⁻¹, WKYCP= 2,754±0,13mg.g⁻¹). Concluiu-se que CP é capaz de inibir a ECA *in vitro* e *in vivo*, tem ação hipotensora e anti-hipertensiva *in vivo* bem como diminui a hipertrofia cardíaca dos animais tratados, além de melhora a sensibilidade do barorreflexo arterial. Possui baixa toxicidade e os resultados biológicos podem estar relacionados com a constituição química do extrato metanólico, rica em flavonóides e substâncias fenólicas.

Palavras chave: barorreflexo, inibição da ECA, hipotensor agudo, flavonoides, polifenóis.

ABSTRACT

BRASIL, Girlandia Alexandre M.Sc., Universidade de Vila Velha – ES, fevereiro de 2013. **Antihypertensive effect and identification of phenolic and flavonoid compounds in methanolic extract from leaves of *Carica papaya* L.** Orientador: Tadeu Uggere de Andrade. Co-orientador: Denise Coutinho Endringer

It was evaluated the chemical composition of leaves of *Carica papaya* L. (*C. papaya*) and the hypotensive and antihypertensive activity, *in vitro* and *in vivo* inhibition of Angiotensin converting enzyme (ACE) activity, beyond the influence of these treatment in cardiac hypertrophy, arterial baroreflex and toxicity. The content of polyphenols and flavonoids were made by spectrometry and the methanolic extract of *C. papaya* (CP) and its fraction had the chemical constituents identified by LC-MS/MS and MS/MS. The inhibition of ACE activity was verified *in vitro* by colorimetric assay and *in vivo* using increases doses of Ang I. For the acute hypotensive assay, male *Wistar-kyoto* rats received increases doses of CP *in bolus* (0.01-100mg.kg⁻¹). For the antihypertensive assay male SHR and *Wistar-kyoto* rats were treated with CP for 30 days (100 mg.kg⁻¹; twice a day). The baroreflex sensibility was evaluated by application of sodium nitroprusside and phenilefrine. The heart was weighed to verify the cardiac hypertrophy, the serum was submitted to ACE activity assay. The CP toxicity was verified by acute toxicity assay and in cardiac myocyte cell line (H9c2) by MTT. The plant material and CP had flavonoid and polifenol content up to 700 mg.100g⁻¹. CP had ferulic., caffeic and gallic acids also quercetin (195.3; 178.7; 145.7; 47.1 µg.g⁻¹, respectively) quantified. CP showed *in vitro* (134.3±56.3%) and *in vivo* inhibition of ACE activity. Was observed acute hypotensive effect in a dose-dependent way, and antihypertensive effect in chronically treated rats (SHRC= 206±2mmHg, SHRE= 152±4mmHg, SHRCP= 156±3mmHg), the decrease in MAP was equal to that observed after the treatment with enalapril. It was further noted improvement on baroreflex sensibility after activation with phenilefrine (SHRC BRS_{PE}= -0.47±0.09, SHRE= -0.83±0.05, SHRCP= -0.79±0.05, WKYC= -0.73±0.06, WKYE= -0,73±0,07, WKYCP = -0,72±0,08) and nitroprusside (SHRC BRS_{NP}= -1.15±0.11, SHRE= -1.56±0.09, SHRCP= -1.60±0.17, WKYC= -1.60±0.07, WKYE= -1.68±0.14, WKYCP= -1.61±0.1). The serum ACE activity (SHRC= 119.1±13%, SHRCP= 65.8±13%, SHRE= 6.4±2.6%) and cardiac hypertrophy was reduced (SHRC= 4.337±0.15mg.g⁻¹, SHRE= 3.184±0.19mg.g⁻¹, SHRCP= 2.988±0.15mg.g⁻¹, WKY= 2.731±0.15mg.g⁻¹, WKYE= 2.789±0.22mg.g⁻¹, WKYCP= 2.754±0.13mg.g⁻¹). In conclusion, CP is capable to inhibit ACE *in vitro* and *in vivo*, has *in vivo* hypotensive and antihypertensive effect as well as reduce cardiac hypertrophy on the treated animals besides the improvement in baroreflex sensibility. It presents low toxicity and the biological results can be related with the chemical constitution of the methanolic extract, enriched in flavonoids and phenolic compounds.

Key-words: baroreflex, ACE inhibition, acute hypotensive, flavonoid, polyphenols.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	
LISTA DE FIGURAS	
RESUMO	
ABSTRACT	
Capítulo.....	13
Resumo.....	14
Introdução.....	15
Métodos	17
Resultados.....	25
Discussão.....	38
Referências.....	45
Apêndice - Detalhamento das técnicas empregadas	
Anexos - Normas da revista	

CAPÍTULO

Efeito anti-hipertensivo e identificação de substâncias fenólicas e flavonoídicas em extrato metanólico de folhas de *Carica papaya* L.

Efeito anti-hipertensivo de *Carica papaya* L.

G A Brasil ¹

S N Ronchi ¹

A M Nascimento ¹

E M Lima ¹

W Romão ²

R Scherer ¹

D C Endringer ^{1,2 † *}

T U Andrade ^{1 † *}

¹ Universidade Vila Velha – UVV. 29102-920, Vila Velha, ES, Brasil.

² Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Espírito Santo - IFES, 29106-010, Vila Velha, ES, Brasil.

† Contribuição equivalente

* Autores para correspondência: Universidade Vila Velha; Avenida Comissário José Dantas de Melo, nº21, Boa Vista, Vila Velha – ES. CEP 29102-920; +55 (27) 3421-2001, e-mail: tadeu.andrade@uvv.br (T U Andrade) e denise.endringer@uvv.br (D C Endringer).

RESUMO

Introdução e Objetivo: Avaliar a composição química das folhas, atividade hipotensora e anti-hipertensiva, inibitória sobre a ECA *in vivo* e *in vitro*, além da influência do tratamento sobre a hipertrofia cardíaca, barorreflexo arterial, e toxicidade do extrato metanólico.

Experimental: CP e sua fração tiveram a composição química avaliada por LC-MS/MS e MS/MS, respectivamente. A inibição da ECA e a atividade desta no soro foram avaliadas *in vitro* por ensaio colorimétrico e *in vivo* com doses crescentes de Ang I. Na avaliação da atividade hipotensora, utilizaram-se doses crescentes de CP (0,01-100mg.kg⁻¹). Para o ensaio anti-hipertensivo, ratos (SHR e WKY) foram tratados por 30 dias (100mg.kg⁻¹ 2x/dia). O barorreflexo arterial foi avaliado com NP e PHE, o coração foi avaliado quanto à hipertrofia cardíaca. Avaliaram-se a toxicidade aguda e a citotoxicidade (H9c2).

Resultados: Os ácidos ferrúlico, cafeico, gálico e o flavonóide quercetina foram quantificados por LC-MS/MS e os flavonóides quercetina, rutina, nicotiflorina, clitorina e magaslina foram identificados por MS/MS. CP apresentou atividade inibitória da ECA *in vitro* e *in vivo*. Observou-se atividade hipotensora aguda dose-dependente e atividade anti-hipertensiva nos animais tratados, pela redução PAM e a redução foi igual à observada após tratamento com enalapril. A sensibilidade do barorreflexo arterial foi melhorada tanto após a ativação com NP quanto PHE. A atividade da ECA plasmática e a hipertrofia cardíaca estavam reduzidas de maneira igual ao grupo enalapril e este foi pouco tóxico.

Conclusões: CP reduziu a PAM dos animais, possivelmente por inibição da ECA. Houve melhora no barorreflexo arterial e redução da hipertrofia cardíaca, tais resultados podem estar associados com a composição química do extrato.

Palavras-chave: barorreflexo, inibição da ECA, quercetina, hipotensor agudo, mamão papaya

Abreviaturas: ECA: Enzima conversora de Angiotensina, CP: extrato metanólico de *Carica papaya*, AngI: Angiotensina I; SHR: Ratos espontaneamente hipertensos, WKY: *Wistar-kyoto*; NP: Nitroprussiato de sódio, PHE: fenilefrina, MTT: (brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difenil-tetrazólio).

INTRODUÇÃO

Carica papaya L (*C. papaya*) é uma planta representante da família Caricaceae, originária da América central (Oliver-Bever, 1986). Seus frutos, sementes e folhas são utilizados pela medicina popular para diversas finalidades (Andrade-Cetto e Heinrich, 2005; Gbolade, 2012; Loh e Hadira, 2011; Lohiya *et al.*, 1999; Satrija *et al.*, 1995). Vários estudos têm relacionado essa planta com o sistema cardiovascular (Eno *et al.*, 2000; Ravikant *et al.*, 2012; Runnie *et al.*, 2004;). Tanto o extrato dos talos (Braga *et al.*, 2007), como o de folhas (Loh e Hadira, 2011) de *C. papaya* demonstraram ação inibitória da ECA *in vitro*. Runnie *et al.* (2004) observaram que o extrato de folhas de *C. papaya* foi capaz de determinar ação vasodilatadora no leito mesentérico e em anéis de aorta. Também foi demonstrado que o suco de mamão possui efeito hipotensor no modelo de hipertensão DOCA-sal (Eno *et al.*, 2000) e que o extrato de raiz de *C. papaya* diminui o aumento da PAM no modelo renovascular (Ravikant *et al.*, 2012). Adicionalmente, Canini *et al.* (2007) identificaram substâncias polifenólicas e flavonoídicas em extrato metanólico de *C. papaya*, substâncias com capacidade inibitória da ECA (Deng *et al.*, 2012; Lucas-filho *et al.*, 2010) e efeito anti-hipertensivo (Balasuriya, Rupasinghe, 2012; Cai *et al.*, 2011; Lapa *et al.*, 2011).

Entretanto, não é do conhecimento dos autores deste estudo a existência de trabalho que tenha avaliado o efeito anti-hipertensivo crônico dessa planta, acompanhado de avaliação *in vivo* da atividade da ECA e do efeito no controle reflexo da pressão pelo barorreflexo arterial.

Portanto, considerando a importância que a hipertensão possui em saúde pública e que o desenvolvimento de alternativas terapêuticas seguras e de menor custo é importante para o seu controle, o objetivo deste estudo foi o de avaliar o efeito do extrato metanólico de *C. papaya* (CP) sobre a pressão arterial e o barorreflexo em ratos espontaneamente hipertensos (SHR),

assim como a possível participação da inibição da ECA nesse efeito. Também foram avaliadas a composição química e a segurança da administração desse extrato.

MÉTODOS

Material vegetal

Folhas de *Carica papaya* L., Caricaceae, variedade rubi (Rubi INCAPER 511, Cattaneo *et al.*, 2010), foram cedidas pelo Instituto Capixaba de Pesquisa, Assistência Técnica e Extensão Rural (INCAPER), coletadas na fazenda experimental de Sooretama no período de junho (12,5 mm³, 29° máx. e 16 °C min.; COL1) e agosto (25 mm³, 30° máx. e 16,1 °C min.; COL2) de 2011 e maio (0 mm³, 29,5° máx. e 18,2 min.; COL3) e julho (62,5 mm³, 29,1° máx. e 15.7 °C min.; COL4) de 2012. O material vegetal foi submetido à secagem em estufa ventilada, 40 °C, por 48h, seguida de trituração em moinhos de facas (Marconi MA 680, Piracicaba, Brasil), sendo, então, denominada droga vegetal. Cada coleta foi submetida à análise de umidade residual, cinzas totais e extraíveis totais em etanol (WHO, 1998; Brasil, 2010) e quantificação de polifenóis e flavonóides totais (Krepski *et al.* 2012).

Obtenção do extrato e frações

Para a obtenção do extrato metanólico, alíquotas das quatro coletas foram reunidas (160 g) na proporção de 1:1:1:1. Em seguida, a amostra reunida foi desengordurada com hexano e extraída com 1L de metanol em aparato de Soxhlet por 12h. O extrato líquido obtido foi concentrado em evaporador rotatório (Fisaton 801, São Paulo, Brasil) à 40°C, até resíduo (25,5 g).

O extrato metanólico seco (CP) foi analisado por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas (LC-MS/MS) e ainda teve sua atividade inibitória da ECA *in vitro* avaliada.

Uma alíquota (9,6 g) do extrato metanólico seco (CP) foi submetida ao fracionamento preliminar em *gateou* de sílica-gel (2,3X52 cm, 12 g, malha 0,063-0,2 mm). Empregou-se

eluição eluotrópica, com solventes de polaridade crescente: hexano, diclorometano, diclorometano: acetato de etila (1:1), acetato de etila:metanol (1:1) e metanol. Foram obtidas cinco frações: hexânica (CPH, 1,6 g), diclorometânica (CPD, 1,2 g), Diclorometano-acetato de etila (CPDA, 0,4 g), acetato de etila-metanol (CPAM, 1,9 g) e metanólica (CPM, 0,2 g), as quais foram submetidas à avaliação de inibição da ECA *in vitro*, para a seleção da fração a ser utilizada nos ensaios posteriores. As frações CPDA, CPAM, CPM foram consideradas ativas e a CPAM foi selecionada para refração em função da atividade biológica e da massa disponível.

A fração CPAM foi ressuspensa em metanol (5 mL) e aplicada em coluna de Sephadex LH-20[®] (1,8 x 24 cm, 6 g, Sigma Aldrich, St. Louis, USA) e eluída com metanol grau HPLC (Sigma Aldrich, St. Louis, USA). Foram obtidas 15 frações agrupadas por similaridade observada em cromatografia em camada delgada (CCD) (FR1-FR15). Na FR4 foram identificadas três bandas semelhantes a flavonóides, sendo então submetidas à identificação por espectrometria de massas.

Identificação de substâncias em CP por Cromatografia Líquida acoplada à espectrometria de massas (LC/MS/MS).

Foi empregado cromatógrafo líquido acoplado à espectrometria de massas (HPLC Agilent1200 equipado com API3200 - Applied Biosystems, Califórnia, USA) com triplo quadrupolo para as análises. Todas as separações foram realizadas em uma coluna Agilent Eclipse C18 (150 mm x 4,6 mm, 5 mm, Califórnia, USA) a 35 °C. A fase móvel foi composta por (A) solução aquosa de ácido fórmico (0,05%, v/v) e (B) acetonitrila (0,3 ml.min⁻¹) usando uma eluição em gradiente de 10-60% de B em 0-8 min, 60-90% de B 8-12 min, 90-10% B por 12-15 min e o tempo de reequilíbrio foi de 6 min. A pressão de nebulizador do MS foi de 50 psi. A temperatura do gás foi de 650°C e voltagem capilar foi de 5500V.

A identificação dos constituintes químicos das amostras por LC/MS/MS foi realizada conforme descrito por Zhu *et al.* (2012), com modificações. Resumidamente, as amostras foram diluídas em metanol grau HPLC (Sigma Alrich, St Louis, USA; 1 mg.mL⁻¹) e filtradas. As substâncias foram identificadas por comparação do tempo de retenção e o espectro com as soluções padrões. A quantificação foi realizada por curva externa com 7 pontos, para as substâncias padrão ácido ferrúlico (0,0172-1,1µg.mL⁻¹), ácido cafeico (0,00781-0,5µg.mL⁻¹), ácido rosmarínico (0,04063-2,6µg.mL⁻¹), ácido gálico (0,14375-9,2µg.mL⁻¹), apigenina (0,00449-0,2875µg.mL⁻¹) e quercetina (0,03125-2µg.mL⁻¹). Os limites de detecção e de quantificação foram determinados pelo ruído de sinal, 3 e 5 vezes, respectivamente.

Identificação de substâncias em FR4 por espectrometria de massas (MS/MS)

Os ensaios de ESI(-)FT-ICR MS foram realizados em um espectrômetro de massas (FT-ICR MS, Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha) de acordo com o previamente descrito por Freitas *et al.* (2013) com modificações. A amostra FR4 foi solubilizada em metanol a 0,1 % de hidróxido de amônia (concentração final de FR4 1 µg.mL⁻¹) para aquisição no modo negativo de íons. Os demais parâmetros da fonte de ESI foram: **i**) voltagem no capilar (cone): + 3000-3500 V; **ii**) *End Plate Offset* = -100 V; **iii**) temperatura e fluxo do gás de secagem: 180 °C e 4 L.min⁻¹; **vi**) pressão do gás nebulizador: 0,5 bar; **v**) *skimmer* = -15 V e **vi**) *collision voltage* = +5 V. Na transmissão de íons, o tempo de acumulação de íons no hexapolo (*ion accumulation time*) e o time of flight (TOF) foram de 0,02 s e 0,9 ms, respectivamente. Os ensaios de ESI(-)FT-ICR MS/MS foram realizados de acordo com Freitas *et al.* (2013).

Avaliação da inibição da ECA *in vitro*

O ensaio de inibição da ECA foi realizado através de método de ELISA colorimétrico de acordo com o descrito por Andrade *et al.* (2012). Foi utilizado pulmão de coelho como fonte

de ECA e o percentual de inibição foi quantificado a partir da ação das frações sobre essa enzima.

Animais experimentais

Os experimentos com animais *Wistar-kyoto* e *Spontaneously Hypertensive Rats* – SHR foram realizados de acordo com os princípios éticos na experimentação animal elaborados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA, 1991), e aprovados pela Comissão de Ética, Bioética e Bem-Estar Animal da Universidade Vila Velha (UVV) (CEUA-UVV; protocolo 237/2012). Os animais foram mantidos em gaiolas de polipropileno com sistema de umidade e temperatura controladas, ciclo claro-escuro de 12h e acesso à água e comida *ad libitum*. Esses animais foram fornecidos pelo Laboratório de Acompanhamento Experimental do Complexo Biopráticas – UVV.

Toxicidade aguda

A determinação da toxicidade aguda foi realizada de acordo com o descrito no guia *Organization of Economic Cooperation and Development* (OECD) 423 (2001). Após o período de observação os animais foram anestesiados, o sangue foi coletado em tubo com citrato de sódio para testes bioquímicos e hematológicos. Após a coleta os animais foram eutanasiados através da aplicação de dose excessiva de anestésico.

Análises bioquímicas e hematológicas

As análises hematológicas de hemácias totais, hemoglobina, proteína total, hematócrito, volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM), concentração da Hemoglobina Corpuscular Média (CHCM) foram realizadas utilizando hemocitômetro (CC550[®], Celm, São Paulo, Brasil). As dosagens bioquímicas de alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), uréia e creatinina foram realizadas utilizando-se

kits comerciais (Bioclin[®], Minas Gerais, Brasil; Biocon[®], Minas Gerais, Brasil). As leituras foram realizadas em leitor bioquímico (BIO-200L, Bioplus[®] São Paulo, Brasil).

Determinação da inibição da ECA *in vivo*

Foram utilizados ratos *Wistar-kyoto* (WKY) machos, com idade entre três e quatro meses e peso corporal variando entre 200-300 g. Os animais foram anestesiados com cetamina e xilasina (100/10 mg.kg⁻¹, Francotar[®], Virbac, São Paulo, Brasil; Xilasin[®], Syntec, São Paulo, Brasil) e cateterizados (artéria e a veia femoral) de acordo com Andrade *et al.* (2008).

Os ensaios foram realizados de acordo com Mangiapane *et al.* (1994) com modificações. Os animais foram divididos em 2 grupos: captopril (C) que recebeu esta droga na dose de 30 mg.kg⁻¹ intra-venoso (IV; Koike *et al.*, 1980) e o grupo CP: tratado com CP na dose de 100 mg.kg⁻¹. Antes e depois da administração de captopril ou CP, os animais receberam doses crescentes de Ang I (0,03; 3 e 300 µg.kg⁻¹, IV). A pressão arterial média (PAM) foi medida antes e depois de cada dose para obtenção da diferença de pressão (Δ PAM). As doses subsequentes só foram administradas após a PAM retornar aos valores basais. A inibição da ECA foi avaliada pela diferença entre a Δ PAM para cada dose de Ang I antes e depois da administração de captopril ou CP.

Avaliação do efeito hipotensor agudo

O efeito hipotensor agudo foi avaliado por meio da construção de uma curva dose-efeito de solução de CP. Animais WKY foram anestesiados, cateterizados (conforme descrição anterior) e receberam acetilcolina (Ach, 5 µg.kg⁻¹, IV) antes e após a curva, como controle positivo. A curva hipotensora foi realizada aplicando-se doses crescentes, *in bolus*, de CP (0,01; 1; 25; 50; 100 mg.kg⁻¹). A aplicação de doses subsequentes só ocorreu após os níveis

de PAM retornarem aos valores basais antes da primeira aplicação. Foi avaliada a queda percentual máxima na PAM após a administração de cada dose (Soncini *et al.*, 2011).

Determinação do efeito anti-hipertensivo

Animais WKY e espontaneamente hipertensos (SHR) foram divididos em seis grupos: controle negativo normotenso (WKYC) e hipertenso (SHRC) que receberam solução salina (NaCl 0,9%, intraperitoneal; IP); controle positivo normotenso (WKYE) e hipertenso (SHRE) que receberam enalapril (10 mg.kg⁻¹, IP; Andrade *et al.*, 2008); e grupos *C. papaya* normotenso (WKYCP) e hipertenso (SHRCP) que receberam CP (100 mg.kg⁻¹ duas vezes ao dia, IP). Todos os tratamentos foram realizados por 30 dias. Os animais foram pesados no início e após o tratamento para avaliação do ganho de peso dos grupos.

Registros hemodinâmicos e avaliação do barorreflexo arterial

Após o período de tratamento os animais foram anestesiados e catetrizados (Andrade *et al.*, 2008). No mínimo 12 horas após, os animais tiveram a PAM e a frequência cardíaca (FC) basais determinadas conforme Andrade *et al.* (2008). Em seguida, o barorreflexo arterial foi avaliado de acordo com Beutel *et al.* (2005). Resumidamente, a PAM e a FC foram controladas momento a momento nos animais acordados e as variações destes parâmetros foram avaliadas através da aplicação de fenilefrina (100 µg.mL⁻¹) e nitroprussiato de sódio (180 µg.mL⁻¹) com o auxílio de uma bomba de infusão (EFF311B, Insight, Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil), sendo a taxa de infusão 0,1 mL por um período máximo de 30 segundos. A relação entre as mudanças na PAM e as respectivas alterações na FC foram avaliadas por análise de regressão. O coeficiente de regressão (inclinação da curva) expresso como batimentos por minuto/mmHg (bpm.mmHg⁻¹) foi utilizado como um índice da sensibilidade do barorreflexo frente à fenilefrina (BRS_{PE}) e ao nitroprussiato (BRS_{NP}) (El-Mas *et al.*, 2001).

Avaliação da atividade da ECA no soro

Após os registros hemodinâmicos os animais foram eutanasiados, tiveram o sangue coletado e o soro separado. O soro dos animais foi mantido a -80°C até a realização da análise. A análise da atividade da ECA no soro foi realizada através de método colorimétrico, de acordo com Franquini *et al.* (2012), com modificações, já que ao invés de determinação da ECA em homogenato cardíaco, foram utilizados 10 μL do soro dos animais tratados cronicamente com CP.

Relação peso cardíaco/peso corporal (COR/PC) e análises histológicas

Após a eutanásia dos animais, os corações foram retirados, lavados em solução salina, secados em papel filtro e pesados. A análise histológica para determinação da hipertrofia cardíaca foi realizada conforme Franquini *et al.* (2012). De forma resumida, a hipertrofia foi avaliada pela contagem do número de núcleos de miócitos por campo e pela medida da área desses núcleos, sendo avaliados dez campos para cada animal, utilizando um sistema de aquisição e análise de imagem (MOTICAM plus, Motic Inc., Canada).

Ensaio de Citotoxicidade Celular

O ensaio colorimétrico do MTT (brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difenil-tetrazólio) (Sigma- Aldrich, St. Louis, MO) foi utilizado para avaliar a citotoxicidade celular (Mosmann, 1983). Foi utilizada linhagem celular de mioblasto embrionário de ratos (H9c2, ATCC-CRL1446TM), mantida em meio de cultura Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (Sigma- Aldrich, St. Louis, MO), suplementado com 10 mL de solução de penicilina G-estreptomicina-l-glutamina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) e 10% de soro fetal bovino (SFB; Gibco, Invitrogen Corporation, Grand Island, NY). Essas células foram semeadas em placas de 96 poços, a 5×10^4 células.mL⁻¹ e incubadas com 190 μL de meio DMEM suplementado com SFB a 10% e 10 μL do extrato CP por 72 h, a 37°C , em 5% CO_2 . Para a determinação da

concentração inibitória média (IC₅₀), os poços foram incubados com diferentes concentrações de CP (1,75; 2,5; 5; 10; 20; 40; 80 e 160 µg.mL⁻¹). A Doxorrubicina foi utilizada como controle positivo (5 µg.mL⁻¹; Zheng *et al.*, 2012). Após o período de incubação o sobrenadante foi substituído por 200 µL de DMEM e 25 µL de MTT (5 mg.mL⁻¹) e as células incubadas por 4 h, a 37 °C, em 5% CO₂. Os cristais de formazana insolúveis foram dissolvidos em 200 µL de isopropanol acidificado em ácido clorídrico (HCl) a 0,04 M. A viabilidade celular foi avaliada de maneira proporcional à absorbância determinada a 570 nm em leitor de ELISA (TP-Reader, Thermoplate, China) e calculada de acordo com a equação: % inibição = (CN – AP) X 100 / CN, onde CN é o controle negativo e AP representa a absorbância do poço.

Análise estatística

Os resultados da avaliação química e biológica foram expressos como média ± erro padrão da média (E.P.M.). Os dados foram submetidos à análise de variância de uma via (ANOVA) e a significância da diferença entre as médias foi determinada por teste *post-hoc* pelo método de *Tukey*, ajustado para múltiplas comparações e com significância aceita quando p<0,05. Foram utilizados os softwares GB Stat[®] e Slide Write[®] para as análises.

RESULTADOS

Determinação de cinzas totais, umidade e extraíveis totais

Os resultados dos ensaios de pureza e integridade (umidade residual, percentual de extraíveis e cinzas totais) estão descritos na tabela 1. A análise dos resultados indica diferenças na maioria das coletas para os parâmetros umidade e extraíveis totais, enquanto o percentual de cinzas não apresentou diferença entre as mesmas.

Tabela 1: Valores de percentual de umidade, extraíveis totais e cinzas totais das amostras vegetais de *C. papaya*.

Amostra	Umidade (%)	Extraíveis totais	Cinzas totais
COL1	5,5±0,06	12,1±1,4 ^{d, e}	11,6±0,5 ^a
COL2	7,07±0,18 ^a	13,5±1,6 ^e	10,9±0,8 ^a
COL3	9,03±0,03 ^b	16,7±1,2 ^e	11,5±0,4 ^a
COL4	11,2±0,46 ^{c, e}	11,1±0,55 ^{a, c, d, e}	12,5±0,2 ^a
COL Mix	11,5±1,15 ^d	14,1±1 ^{a, b, e}	12±0,1 ^a

Letras diferentes na mesma coluna correspondem à diferença significativa ($p < 0.05$). Onde: a: COL1, b: COL2, c: COL3, d: COL4, e: COL Mix;

Determinação de polifenóis e flavonóides totais

Os resultados para polifenóis e flavonóides totais estão apresentados na tabela 2. Nota-se que houve diferença na quantidade destes constituintes entre as coletas, e que o solvente metanol foi ideal para a extração destas substâncias já que houve uma concentração desses

constituintes no extrato metanólico. A análise dos flavonóides e polifenóis totais da mistura equitativa das coletas (COLMix) não representou uma média ponderal entre as mesmas, entretanto nota-se que há uma maior quantidade destas substâncias nesta mistura.

Tabela 2: Resultado da quantificação espectrofotométrica de polifenóis e flavonóides totais nas amostras de *C. papaya*.

Amostra	Flavonóides totais (mg.100g ⁻¹)*	Polifenóis totais (g.100g ⁻¹)**	Polifenóis não-adsorvidos (g.100g ⁻¹)	Taninos totais (g.100g ⁻¹)
COL1	835,6±47,5	11,8±0,3	10,1±0,1	1,7±0,2
COL2	1202,9±32,4 ^c	12,9±0,1 ^a	10,7±0,4 ^a	2,1±0,2 ^a
COL3	962,4±11,3 ^{a,b}	27±0,1 ^d	1,3±0,2 ^d	25,6±0,3 ^d
COL4	708,9±11,4 ^{a,c}	28,4±0,2 ^c	1,3±0,1 ^c	27±0,3 ^c
COL Mix	1273,8±45,8 ^b	14,2±0,5 ^b	10,2±0,2 ^{a,b}	4±0,6 ^{a,b}
CP	2716,3±78 ^f	47±0,6 ^f	33±0,4 ^f	14,3±0,7 ^f

Letras diferentes na mesma coluna correspondem à diferença significativa (p<0.01). Onde: a: COL1, b: COL2, c: COL3, d: COL4, e: COL Mix, f: CP *Resultados expressos em equivalentes de quercetina. **Resultados expressos em equivalentes de pirogalol.

Inibição da ECA *in vitro*

A capacidade de inibição da ECA *in vitro* foi realizada para o extrato e frações de *C. papaya*. CP apresentou 134,3±56,3% inibição significativa, e suas frações foram observadas as seguintes inibições: CPH: 45±41,5 %, CPD: 48,8±81,7 %, CPDA: 107,1±18,6, CPAM: 127,2±34,8% e CPM: 76±19 %, destas as frações CPDA, CPAM e CPM foram consideradas

ativas, com percentual de inibição superior a 50%. O controle foi realizado com captopril, o qual obteve inibição da ECA de $83\pm 20\%$.

Identificação de substâncias em CP por LC MS/MS

Na análise de CP realizada por LC MS/MS foram identificados: ácido ferrúlico $203,4\pm 0,02 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, cafeico $172,6\pm 0,02 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, gálico $145,7\pm 0,02 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ e do flavonóide quercetina $47,1\pm 0,03 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$.

Identificação de substâncias em FR4 por MS/MS

A análise do espectro de ESI(-)-FT-ICR-MS da fração FR4 (dado não mostrado) indica ser a mesma uma mistura de flavonóides. As espécies mais abundantes neste espectro apresentam íons de m/z de 739, 755 e 793, e em menor proporção, encontram-se os íons de m/z 408, 555, 593 e 609. A maioria das substâncias detectadas pelo experimento de ESI(-) usando infusão direta, classifica as espécies como derivados polifenólicos encontrados na fração FR4 de *C. papaya* (Tabela 3). As exceções são os íons com m/z menor que 400 e outros íons mais abundantes como o íon de m/z 408 e 555, oriundos, provavelmente, de contaminantes presentes na matriz.

Tabela 3. Valores de m/z experimentais e teóricos dos principais derivados de polifenólicos encontrados na fração FR4 de *C. papaya*.

m/z experimental	m/z teórico	Fórmula [M-H] ⁻	Erro*	DBE	MS/MS	Molécula
593.1519	593.1512	C ₂₇ H ₂₉ O ₁₅	-1.26	13	593,3 e 285,0	Nicotiflorina
609.1468	609.1261	C ₂₇ H ₂₉ O ₁₆	-1.19	13	609,3 e 300,0	Rutina
739.2096	739.2091	C ₃₃ H ₃₉ O ₁₉	-0.64	14	739,2; 575,1 e 284,0	Clitorina
755.2044	755.2040	C ₃₃ H ₃₉ O ₂₀	-0.54	14	755,2 e 300	manghaslina
793.5147	—	C ₃₃ H ₃₉ O ₂₀ +R	----	--	793,5; 755,2; 537,3 e 300,0	Não- nomeado

*erro (ppm) = $[(m/z_{\text{experimental}} - m/z_{\text{teórico}})/m/z_{\text{teórico}}] \times 10^6$; DBE: Double bond equivalent.

MS/MS: principais fragmentos observados no massas/massas.

Na figura 1a-e, apresenta-se o espectro de ESI(-)-FT-ICR MS/MS referente aos íons de m/z 593 (2a), 609 (2b), 739 (2c), 755 (2d) e 793 (2e). Estas substâncias foram identificadas a partir de comparação com os dados previamente relatados, sendo identificados como os flavonóides nicotiflorina, rutina, clitorina e manghaslina, respectivamente (2a-d). O íon 793 não foi identificado, entretanto sugere-se que ele seja proveniente da molécula com m/z 755, com um radical acoplado.

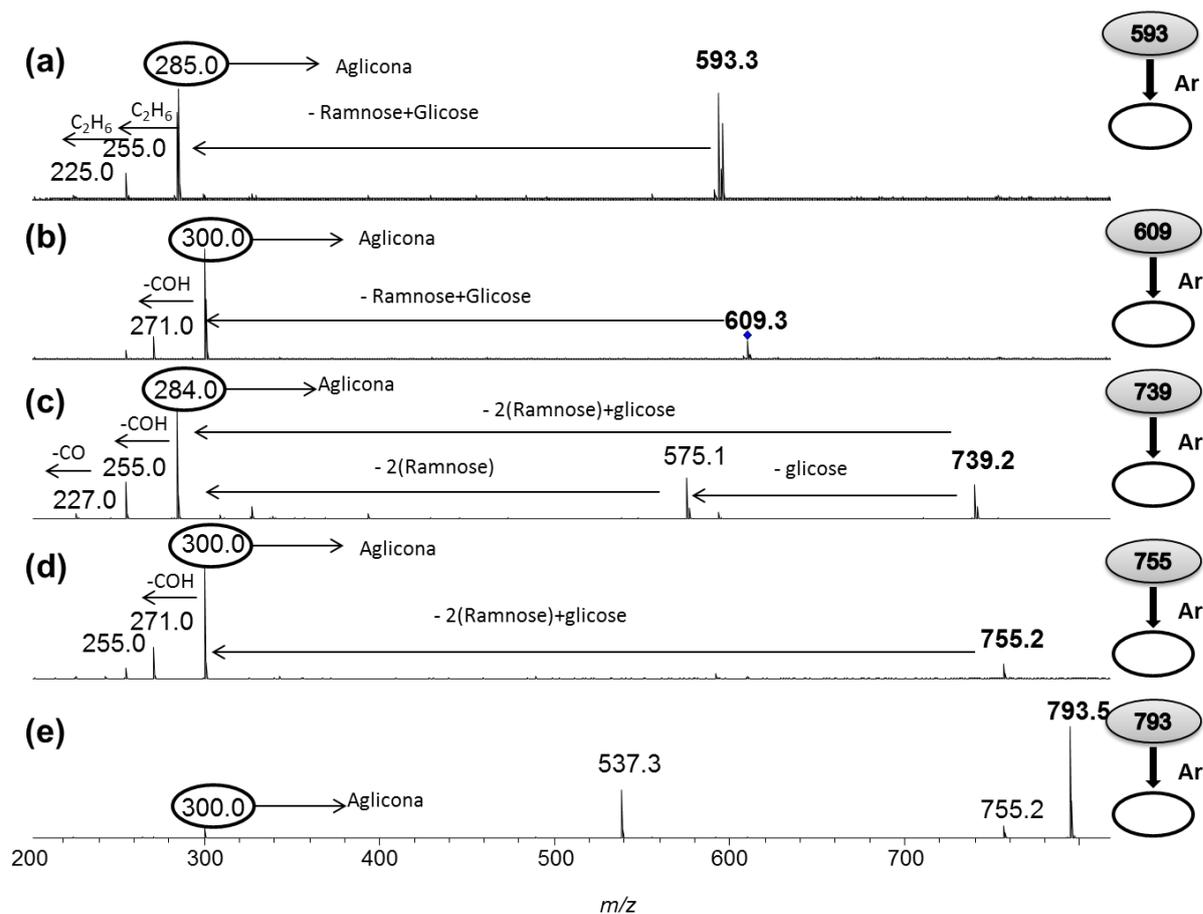


Figura 1. Espectros de ESI(-)-FT-ICR MS a partir dos íons de (a) m/z 593, (b) m/z 609, (c) m/z 739, (d) m/z 755 e (e) m/z 793 . Os flavonóides identificados foram: nicotiflorina (a), rutina (b), clitorina (c) e manghaslina (d).

Ensaio toxicológico agudo e bioquímicos

Não foi observada morte após a administração da dose de 2000 mg.kg^{-1} via oral de CP nem no primeiro dia e nem após 14 dias de observação. Com relação aos dados de peso das vísceras/peso corporal não foi observada alteração nesta relação para o coração (CON= $3,67 \pm 0,14 \text{ mg.g}^{-1}$ e CP= $3,691 \pm 0,04 \text{ mg.g}^{-1}$) e nem para o fígado, (CON= $32,12 \pm 2,08 \text{ mg.g}^{-1}$ e CP= $37,11 \pm 4,02 \text{ mg.g}^{-1}$). Também não foram observadas alterações nos parâmetros

hematológicos e bioquímicos nos animais tratados, quando comparados ao grupo controle (Tabela 4).

Tabela 4: Resultado das análises hematológicas e bioquímicas após 15 dias de dose aguda de 2000 mg.kg⁻¹ de CP.

Parâmetros	CP	CON
Eritrócitos (milhões/uL)	11,0±1,0	9,4±0,30
Hemoglobina (g/dL)	13,2±0,72	12,5±1,66
Hematócrito (%)	41±2,3	41,6±2,4
VCM	38,84±6,50	49,5±3,04
HCM	10,6±0,25	14,2±2,34
CHCM	32,47±0,28	28,53±3,57
Proteína total (%)	6,33±0,06	6,5±0,28
Leucócitos (%x1000/mm ³)	6,83±0,89	8,5±1,23
ALT (UI/L)	55,23±2,09	53,2±2,88
AST (UI/L)	54,0±2,68	54,4±4,1
Uréia (mg/dL)	34,7±1,01	39,34±2,75
Creatinina (mg/dL)	0,60±0,013	0,68±0,13
Troponina I	Negativo	Negativo

Inibição da ECA *in vivo*

A aplicação *in bolus* de Ang I nos animais WKY foi capaz de determinar aumentos crescentes, de mesma magnitude, na PAM antes da administração de captopril ou CP (C: 39 ± 4 mmHg, 86 ± 3 mmHg, 142 ± 2 mmHg vs. CP: 42 ± 3 mmHg, 93 ± 4 mmHg, 150 ± 6 mmHg). Foi observada redução no aumento de PAM induzida por Ang I ($0,03$, 3 e $300 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$) após a administração de captopril $30 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ (9 ± 3 mmHg, 24 ± 4 mmHg e 27 ± 3 mmHg) ou CP $100 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ (10 ± 4 mmHg, 37 ± 2 mmHg, 94 ± 3 mmHg) em relação aos valores anteriores ao bloqueio ($p < 0,01$). Após a administração de CP, o efeito sobre a PAM causado pela Ang I foi menor que o obtido após a administração de captopril nas duas últimas doses de Ang I ($p < 0,01$; Figura 2, Paineis A e B).

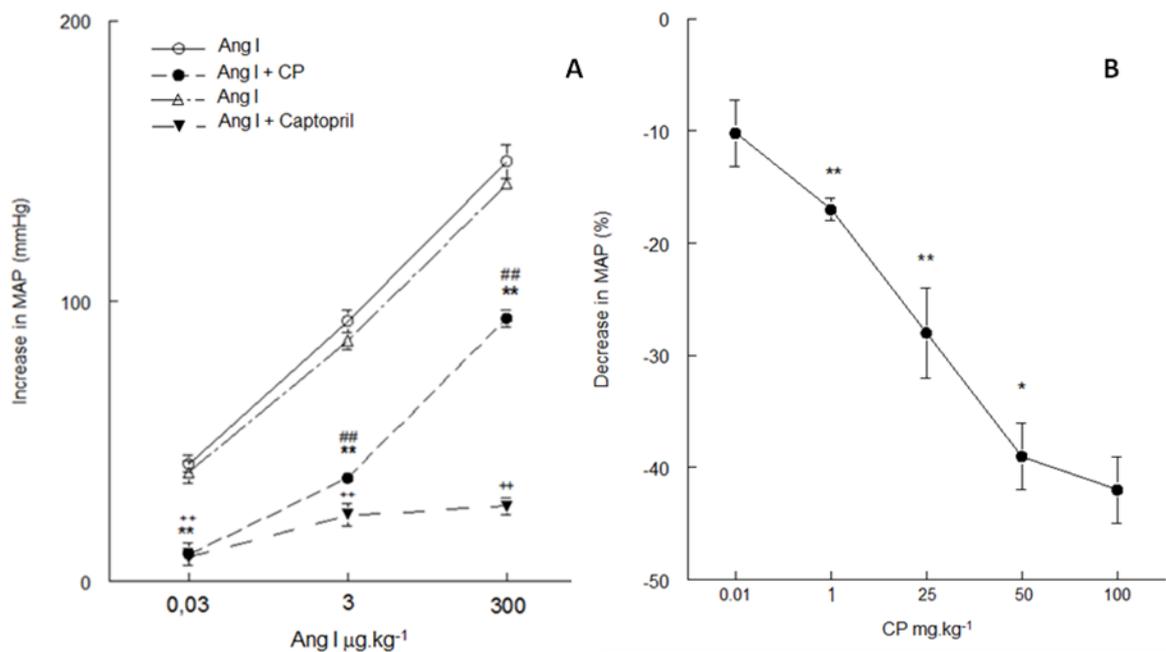


Figura 2: Paineis A e B: aumento na PAM pela aplicação *in bolus* de Ang I ($0,03$, 3 e $300 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$) em ratos WKY, antes e após a administração de captopril ($30 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) ou *C. papaya* (CP $100 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$). Os símbolos \circ e Δ representam o aumento provocado pela aplicação de Ang I antes dos tratamentos com CP e captopril, respectivamente. E os símbolos \bullet e \blacktriangledown representam

o aumento provocado pela Ang I após os tratamentos com CP e captopril, respectivamente. ⁺⁺p<0,01 em relação ao aumento induzido por Ang I antes da aplicação de captopril (30 mg.kg⁻¹); ^{**}p<0,01 em relação ao aumento induzido por Ang I antes da aplicação de *C. Papaya* (100 mg.kg⁻¹); ^{##}p<0,01 em relação ao aumento induzido por Ang I após a aplicação de captopril (30 mg.kg⁻¹). **Painel B:** ensaio hipotensor agudo. Queda na PAM causada por doses crescentes de CP (0,01, 1, 25, 50 e 100 mg.kg⁻¹). *p<0,05 e ^{**}p<0,01 em relação à dose anterior. Os valores em ambos os painéis foram expressos como a média ± E.P.M.

Efeito hipotensor agudo

As doses de CP (0,01, 1, 25, 50 e 100 mg.kg⁻¹) foram capazes de determinar efeito hipotensor agudo dose-dependente (-10±3 mmHg, -17±1 mmHg, -28±4 mmHg, -39±3 mmHg, -42±3 mmHg, respectivamente; Figura. 2, painel B). A queda na PAM determinada pela administração de Ach foi da mesma magnitude antes (-53±5 mmHg) e depois (-48±2 mmHg) da administração de CP, indicando que não houve dano ao endotélio pela administração de CP. A queda determinada pela CP na dose de 100 mg.kg⁻¹ foi semelhante à determinada pela Ach (5 µg.kg⁻¹).

Efeito anti-hipertensivo

O tratamento crônico com CP na dose de 100 mg.kg⁻¹ duas vezes ao dia foi capaz de reduzir a PAM dos animais SHR (Figura 3, Painel A) e essa redução foi comparável à obtida após o tratamento com enalapril (SHRC: 206±2 mmHg, SHRE: 152±4 mmHg, SHRCP: 156±3 mmHg; p<0.01 em relação aos animais SHRC). De forma semelhante ao enalapril, o tratamento não normalizou a pressão arterial (p<0,01 em relação aos animais WKYC), uma vez que esta não atingiu valores semelhantes aos dos animais normotensos (WKYC: 108±1 mmHg, WKYE: 109±2 mmHg, WKYCP: 106±3 mmHg; Figura 3, Painel A). Os animais WKY não apresentaram diferença na PAM entre os grupos (WKYC: 108±3 mmHg, WKYE:

109±4 mmHg, WKYCP: 106±5 mmHg). Não houve diferença na FC entre os grupos (SHRC: 307±6 bpm, SHRE: 318±20 bpm, SHRCP: 293±6 bpm, WKYC: 287±21 bpm, WKYE: 289±26 bpm, WKYCP: 293±20 bpm).

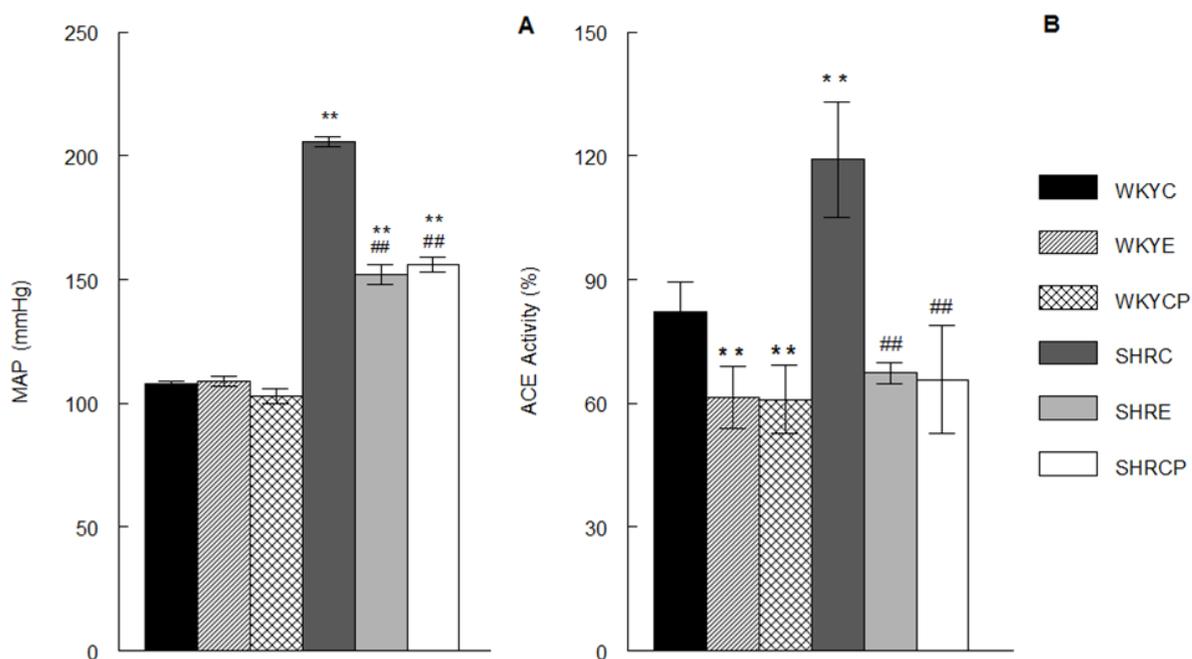


Figura 3: Painel A: pressão arterial média (MAP) dos animais submetidos ao tratamento crônico com CP, enalapril ou veiculo por 30 dias. **p<0,01 em relação aos animais normotensos, ##p<0,01 em relação ao grupo SHRC. **Painel B:** atividade da ECA no soro dos animais após 30 dias de tratamento com CP, enalapril ou veiculo por 30 dias. **p<0,01 em relação aos animais WKYC, ##p<0,01 em relação ao grupo SHRC. Os valores em ambos os painéis foram expressos como a média ± E.P.M.

A avaliação da atividade da ECA no soro dos animais tratados com CP demonstrou que o mesmo foi capaz de diminuir a atividade desta enzima nos animais SHR (SHRC: 119,1±13 %, SHRCP: 65,8±13 %, SHRE: 67,4±2,6 %; p<0,01; Figura 3, Painel B) e não houve diferença na atividade da ECA entre os grupos SHRCP e SHRE. A atividade da ECA plasmática do

grupo WKYCP e WKYE foi inferior ao grupo WKYC (WKYC: $82,3 \pm 7$ %, WKYE: $61,5 \pm 7,4$ %, WKYCP: $61 \pm 8,4$ %).

O tratamento com CP foi capaz de melhorar a sensibilidade do barorreflexo nos animais SHRCP frente à aplicação de fenilefrina (BRS_{PE} : SHRC = $-0,47 \pm 0,09$, SHRE = $-0,83 \pm 0,05$, SHRCP = $-0,79 \pm 0,05$, $p < 0,01$ em relação ao grupo SHRC; Figura 4, Painel A) e nitroprussiato de sódio (BRS_{NP} : SHRC = $-1,15 \pm 0,11$, SHRE = $-1,56 \pm 0,09$, SHRCP = $-1,60 \pm 0,17$; Figura 4, Painel B). Não houve diferença na sensibilidade do reflexo entre os animais SHRCP e SHRE e entre os ratos normotensos (BRS_{PE} : WKYC = $-0,73 \pm 0,06$, WKYE = $-0,73 \pm 0,07$, WKYCP = $0,72 \pm 0,08$; BRS_{NP} : WKYC = $-1,60 \pm 0,07$, WKYE = $-1,68 \pm 0,14$, WKYCP = $-1,61 \pm 0,1$; Figura 5).

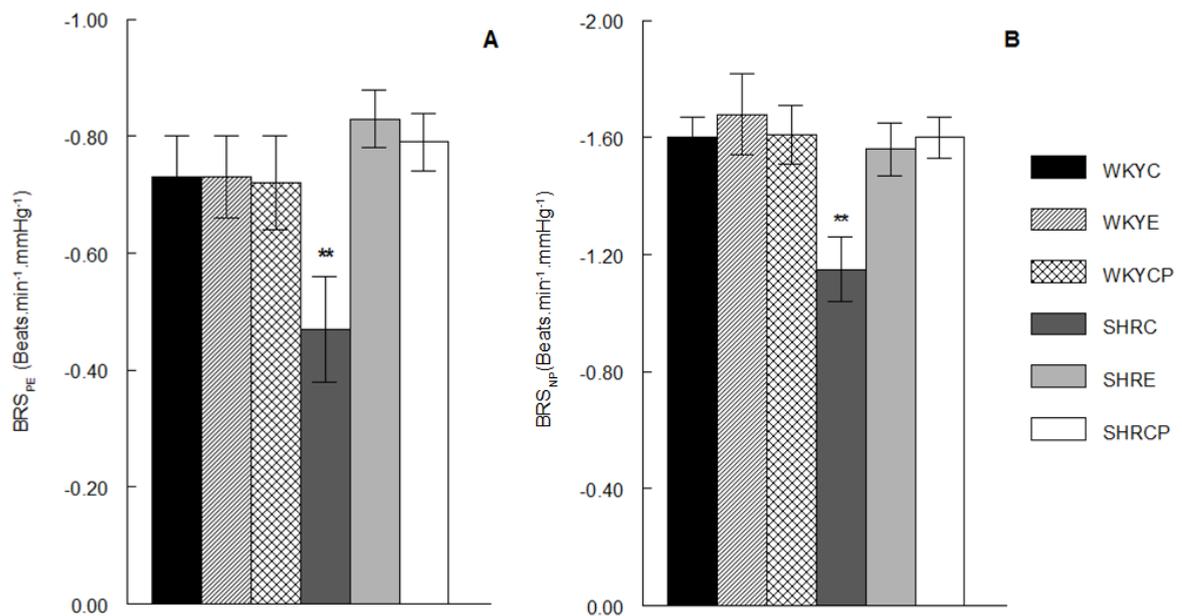


Figura 4. Painel A: resultado do ganho de sensibilidade do barorreflexo arterial após o tratamento crônico com CP (100 mg.kg^{-1}), enalapril (10 mg.kg^{-1}) ou veículo ($\text{NaCl } 0,9\%$) por 30 dias, duas vezes ao dia, frente à fenilefrina (BRS_{PE} ; $100 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$; Painel A) e ao nitroprussiato de sódio (BRS_{NP} ; $180 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$; Painel B). Os valores estão expressos como a média \pm E.P.M. ** $p < 0,01$ em comparação do grupo SHRC com os demais.

O tratamento normalizou a relação COR/PC dos animais SHRCP (SHRC: $4,337 \pm 0,15 \text{ mg.g}^{-1}$, SHRE: $3,184 \pm 0,19 \text{ mg.g}^{-1}$, SHRCP: $2,988 \pm 0,15 \text{ mg.g}^{-1}$; $p < 0,01$ em relação aos animais SHRC; Figura 4, Painel B). Não houve diferença entre os valores dos animais SHR tratados e entre os animais normotensos (WKY: $2,731 \pm 0,15$, WKYE: $2,789 \pm 0,22 \text{ mg.g}^{-1}$, WKYCP: $2,754 \pm 0,13 \text{ mg.g}^{-1}$).

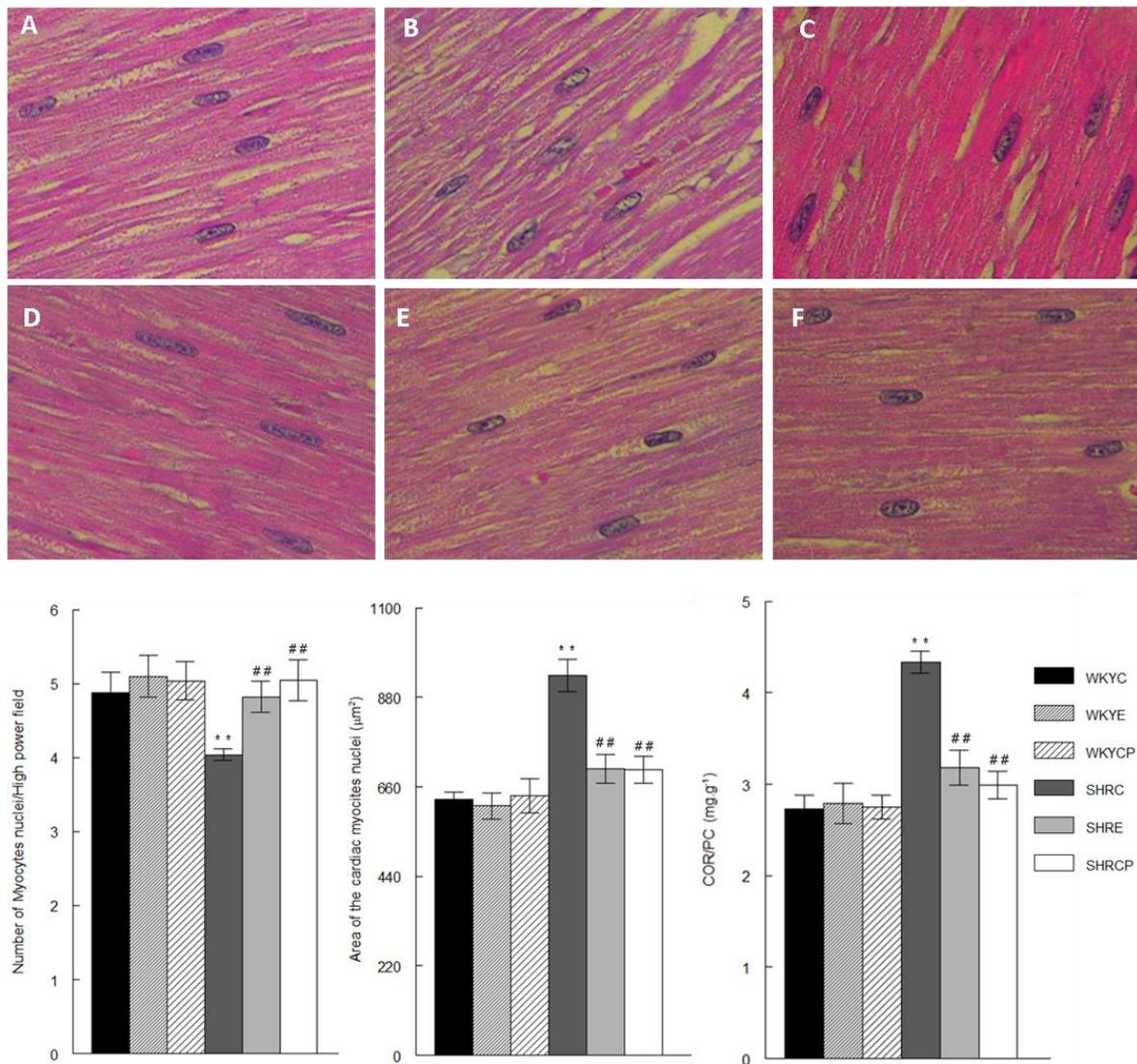


Figura 5: Análise histológica dos corações dos animais SHR e WKY após tratamento crônico com CP. As lâminas foram coradas com hematoxilina/eosina (H&E) e leitura realizada em aumento de 400X (A: WKYC; B: WKYE; C: WKYCP; D: SHRC; E: SHRE; F: SHRCP). Painel G: gráfico em barras correspondente ao número núcleos de miócitos/campo. Painel H:

gráfico em barras com a representação da área do núcleo dos miócitos. Painel I: relação peso cardíaco/peso corporal (COR/PC). ** $p < 0,01$ em relação aos animais WKY, ## $p < 0,01$ em relação ao grupo SHRC.

A figura 5 apresenta o resultado da análise morfométrica que confirmou a reversão da hipertrofia cardíaca no grupo SHRCP já que o número de miócitos por campo ($5,05 \pm 0,27$) e a área dos núcleos ($702,5 \pm 35 \mu\text{m}^2$) foram diferentes quando comparados com o grupo SHRC ($4,04 \pm 0,07$ e $934,6 \pm 40 \mu\text{m}^2$; $p < 0,01$) e não foram diferentes dos animais normotensos (WKYC: $4,9 \pm 0,2$ e $629,4 \pm 18 \mu\text{m}^2$, WKYE: $5,09 \pm 0,27$ e $613 \pm 42 \mu\text{m}^2$, WKYCP: $5,04 \pm 0,28$ e $639,6 \pm 28 \mu\text{m}^2$). Os resultados para o grupo SHRCP não foram diferentes do grupo SHRE ($4,81 \pm 0,21$ e $704,5 \pm 35 \mu\text{m}^2$).

Com relação ao ganho de peso corporal os dados demonstram que os animais SHRC não apresentaram variação de peso, enquanto os outros grupos obtiveram ganho (PF/PI: WKYC: $309 \pm 11 / 237,3 \pm 12$ g; WKYE: $304 \pm 13 / 258,4 \pm 7$ g; WKYCP: $310 \pm 10 / 251,6 \pm 15$ g; SHRC: $269 \pm 13 / 249 \pm 15$ g; SHRE: $287 \pm 11 / 247 \pm 8$ g; SHRCP: $261 \pm 4 / 199 \pm 9$ g).

Ensaio do MTT

O ensaio de citotoxicidade celular foi realizado frente às células de mioblasto de embriões de ratos (H9c2) e a CI_{50} foi de $36,14 \pm 10,01 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (Figura 6).

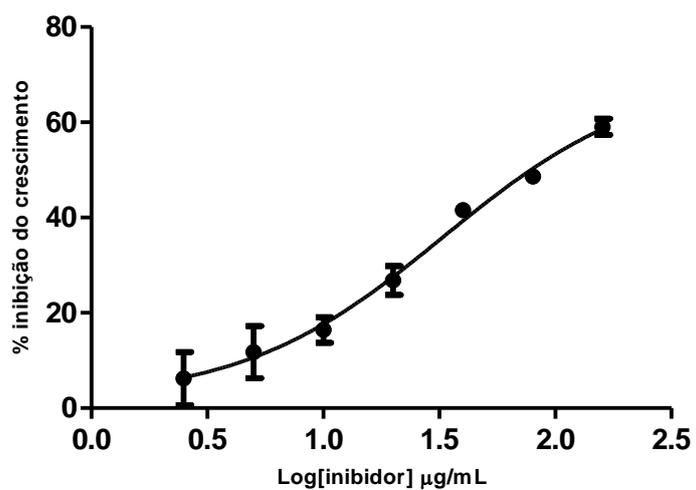


Figura 6. Aumento concentração-dependente da inibição do crescimento celular em células de miócitos cardíacos (H9c2) tratadas com extrato metanólico de *C. Papaya* (CP), após 72h de exposição. Os valores representam média \pm E.P.M.

DISCUSSÃO

Os resultados do presente estudo demonstram, pela primeira vez, efeito anti-hipertensivo de *Carica papaya*, envolvendo inibição da ECA como possível mecanismo de ação e resultando em melhoria do controle reflexo da pressão arterial, reversão da hipertrofia cardíaca e, ainda, a provável participação de substâncias flavonoídicas/polifenólicas na determinação desses efeitos no modelo experimental de hipertensão dos animais SHR.

Em relação à composição química, os resultados encontrados corroboram os dados previamente relatados, onde além de alcalóides, taninos, saponinas, glicosídeos cardíacos e antraquinonas; polifenóis e flavonóides também foram identificados em folhas de *C. papaya* (Ikpeme *et al.*, 2011; Ogan, 1971; Owoyele *et al.*, 2008). Adicionalmente, Canini *et al.* (2007) identificaram os flavonóides quercetina e canferol, além dos ácidos cafeico, cumárico e clorogênico em folhas de *C. papaya* estes foram identificados no presente estudo com exceção dos ácidos cumárico e clorogênico.

Além dessas substâncias presentes em CP, outras também foram identificadas na fração FR4 do CPAM, proveniente de CP, pela técnica de ESI(-)-FT-ICR MS/MS. Para o de m/z 593, figura 1a, observa-se a perda neutra de moléculas de glicose e ramnose (308 Da) formando o íon de m/z 285, referente à aglicona. Esse resultado em conjunto com a fórmula mínima da molécula ($C_{27}H_{30}O_{15}$) contribui para a identificação do flavonóide glicosilado nicotiflorina (Afzan *et al.*, 2012; Engels *et al.*, 2012). Um perfil de fragmentação similar foi observado para o íon de m/z 609, sendo identificada, entretanto, como outro flavonóide, a rutina, figura 1b (Afzan *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2003).

Os íons de m/z 739 e 755, figura 1c-d, foram identificados como flavonóide glicosilado clitorina e manghaslina (Afzan *et al.*, 2012), respectivamente. Ambos se fragmentam gerando

os íons de m/z 284 e 300 por eliminação de duas unidades de ramnose e uma de glicose (455 Da). Esse resultado está de acordo com o descrito previamente, onde o íon de m/z 755 foi também identificado em folhas de *C. papaya* (Afzan *et al.*, 2012; Kazuma, Noda, Suzuli, 2003). Uma espécie inédita não registrada na literatura foi identificada neste trabalho, correspondente ao íon de m/z 793 (Figura 1e). Os resultados de ESI(-) FT-ICR MS/MS, figura 1e, mostram um perfil de fragmentação similar ao íon de m/z 755, sendo a fórmula mínima dessa espécie provavelmente igual a $C_{33}H_{39}O_{20}+R$, onde R tem massa molar de 38 Da.

Diversos autores relataram que a produção de metabólitos secundários pela planta sofrem influência de fatores ambientais como a qualidade do solo (Pavarini *et al.*, 2012; Ncube, Finnie, Staden, 2012) e local de plantio (Dong *et al.*, 2011) e que ainda a técnica utilizada para a extração pode alterar o conteúdo final de metabolitos (Ksouri *et al.*, 2008). Nos ensaios de caracterização química, não foi possível correlacionar o índice pluviométrico e a temperatura dos meses de coleta do material vegetal, com os resultados de flavonóides e polifenóis totais. Portanto, outros fatores podem ter influenciado na diferença encontrada entre o conteúdo de polifenóis e flavonóides totais observados nas diferentes coletas.

O CP apresentou atividade inibitória da ECA *in vitro* ($134,3 \pm 56,3\%$) evidenciando promissora atividade anti-hipertensiva, por isso esta amostra foi avaliada em ensaios *in vivo*. O valor de inibição da ECA encontrado difere do anteriormente relatado na literatura $23,3 \pm 6,2\%$ (Braga *et al.*, 2007), o que pode ser atribuído pela utilização de parte diferente (talo) de *C. papaya* em relação ao presente estudo, que foi realizado com folhas. Estudos demonstram que partes diferentes das espécies vegetais apresentam composição química distinta, o que ocasiona ação biológica diferente (Ksouri *et al.*, 2008; Latoui *et al.*, 2012). Diferenças no percentual de inibição da ECA em partes distintas da mesma planta foram reportadas na literatura (Braga *et al.*, 2007; Tsai *et al.*, 2012).

O flavonóide quercetina foi identificado e quantificado no presente estudo em CP. Os flavonóides rutina, maghaslina, clitorina e nicotiflorina foram identificados por meio de MS/MS em fração proveniente do extrato. Infere-se, portanto, que a presença destas substâncias bem como o teor de flavonóides totais observados possam ter contribuído para a ação inibitória da ECA. Guerrero *et al.* (2012) evidenciaram que flavonóides como quercetina, luteolina e canferol inibem a ECA *in vitro*. Extrato de casca de maçã, rico em flavonóide quercetina, apresentou atividade inibitória da ECA *in vitro* e a quercetina-3-O-glicosídeo apresentou CI_{50} de 71 μM , sendo considerado um potente inibidor da ECA (Balasuriya e Rupasinghe, 2012).

A ação inibitória da ECA *in vitro* foi confirmada *in vivo* no presente estudo, uma vez que o extrato CP na dose de 100 $mg.kg^{-1}$ diminuiu o aumento da PAM provocado pela aplicação de Ang I, tratando-se de resultado inédito para a planta em estudo. Poucos são os dados de avaliação da inibição da ECA aguda *in vivo* com extratos de plantas. Ramesar *et al.* (2008) avaliaram a atividade inibitória da ECA *in vivo* de *Tulbaghia violacea* e esta demonstrou inibição comparável ao captopril (10 $mg.kg^{-1}$) após a infusão de Ang I (0,1 $mg.kg^{-1}$). Em estudo realizado com humanos avaliando a ação de chá verde, chá preto ou *Aspalathus linearis* sobre a atividade da ECA em 30 min., 60 min. e 3h após administração dos chás. *Aspalathus linearis* foi capaz de diminuir a atividade da ECA nos pacientes após 30 e 60 minutos (Persson *et al.*, 2010). Este chá (*Aspalathus linearis*) é conhecidamente rico em flavonóides (Rabe *et al.*, 1994; Snijman *et al.*, 2009). Portanto, parece razoável inferir que as substâncias fenólicas e flavonoídicas presentes em CP foram capazes de contribuir para a inibição da ECA constatada tanto *in vitro* como *in vivo*.

Em relação aos estudos *in vivo* o extrato CP foi capaz provocar queda na pressão arterial dos animais de maneira aguda e dose-dependente. Resultado semelhante já foi reportado para

vegetais como frutos de *Nitraria sibirica* Pall (Senejoux *et al.*, 2012) e *Averrhoa carambola* L. (Soncini *et al.*, 2011) e extratos de plantas (Ferreira *et al.*, 2007; Silva *et al.*, 2011), nos quais a presença de substâncias flavonoídicas foi a principal justificativa para o efeito observado.

Runnie *et al.* (2004) verificou a capacidade vasodilatadora de *C. papaya* e que foi atribuída a aumento de síntese de NO e a fatores relacionados ao endotélio. Portanto, é possível que o efeito hipotensor agudo observado no presente estudo seja em decorrência de ação vasodilatadora do extrato de CP.

Efeito hipotensor agudo já foi reportado para flavonóides (Fusi *et al.*, 2003; Lapa *et al.*, 2011; Woodman e Chan, 2004) como a rutina isolada do extrato de *Polygala paniculata* L. (Lapa *et al.*, 2011). Sendo assim, sugere-se que este efeito de CP, esteja relacionado com estas substâncias, visto que o teor de flavonóides totais foi elevado em CP, bem como o flavonóide rutina foi identificado no mesmo.

O principal resultado de avaliação biológica do presente estudo foi a demonstração de que o tratamento crônico com CP determinou efeito anti-hipertensivo em animais SHR. Ainda, os dados apontam para inibição da ECA como mecanismo de ação que contribui para este efeito, tendo em vista que o extrato, além de apresentar ação inibitória da ECA *in vitro* e *in vivo* (de forma aguda), também foi capaz de reduzir a atividade da ECA no soro dos animais tratados cronicamente para valores semelhantes aos apresentados pelos animais do controle positivo tratados com enalapril. Adicionalmente, Ravikant *et al.* (2012) observaram que o pré-tratamento de ratos com o extrato etanólico de raiz de *C. papaya* diminuiu o aumento da pressão induzido pela oclusão da artéria renal (Ravikant *et al.*, 2012).

Além da redução da PAM, o tratamento crônico com CP reverteu a hipertrofia cardíaca e a redução da sensibilidade do barorreflexo arterial, efeitos esses de grande importância já que a hipertrofia cardíaca pode estar relacionada com a redução do débito cardíaco e com o

desenvolvimento de insuficiência cardíaca (revisado por Dickhout, Carlisle e Austin, 2011) e o barorreflexo é de extrema importância para o controle momento a momento da PAM e, conseqüentemente, para evitar a sua variabilidade (Ding-Feng e Chao-Yo, 2002; Piratello *et al.*, 2010; Thomas *et al.*, 2011).

Tanto a hipertensão (Lorell e Carabello, 2000), como o SRA (Crowley *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2008; Piratello *et al.*, 2010) podem contribuir para o desenvolvimento de hipertrofia cardíaca e, portanto, a redução da PAM e da atividade da ECA pelo tratamento crônico com CP, podem ter contribuído para a reversão da hipertrofia cardíaca nos animais SHRC. Thomas, Head e Woods (1998) demonstraram que o tratamento com perindopril em ratos SHR antes do desenvolvimento de hipertensão preveniu o desenvolvimento tanto da hipertensão como da hipertrofia cardíaca e inúmeros outros estudos mostram a reversão parcial quando a hipertensão está estabelecida.

A recuperação da sensibilidade do barorreflexo arterial dos animais SHRC parece também estar relacionada com o mecanismo de inibição da ECA e conseqüente redução da PAM, diversos estudos com inibidores da ECA demonstram melhoria desse reflexo em pacientes com hipertensão (Mancia *et al.*, 1982), infarto agudo do miocárdio (Marakas *et al.*, 1995), e insuficiência cardíaca (Osterziel *et al.*, 1988). Adicionalmente, estudos recentes com extratos de diferentes plantas demonstram a melhoria da sensibilidade do barorreflexo em animais com insuficiência cardíaca (Parveen *et al.*, 2012) hipertensão induzida por diminuição na síntese do óxido nítrico (Afkir *et al.*, 2008) e, ainda, em modelo de neuropatia diabética induzida por estreptozotocina (Khaliq *et al.*, 2012), efeito esse associado com a presença de substâncias fenólicas nos extratos.

Entretanto, a melhoria da sensibilidade do barorreflexo arterial pelo tratamento com *C. papaya* trata-se de resultado inédito e que parece, também, estar relacionado com as substâncias identificadas no extrato metanólico CP. Monteiro *et al.* (2012), em estudo com

quercetina isolada, um dos flavonóides identificados no presente estudo, observaram diminuição na pressão arterial e ainda melhora na sensibilidade do barorreflexo em animais SHR tratados com 10 e 25 mg.kg⁻¹.dia⁻¹ desta substância.

Outro aspecto avaliado no presente estudo foi a segurança da utilização do extrato de CP, por meio da análise do ganho de peso corporal, ensaio de toxicidade aguda e celular. Os dados apontam para a segurança na administração desse extrato, pois os animais SHR não-tratados ganharam menos peso que os grupos tratados e não houve, ainda, influência no ganho de peso nos animais normotensos, e que o extrato de CP não apresentou toxicidade aguda na dose de 2000 mg.kg⁻¹ e baixa citotoxicidade sobre cardiomiócitos *in vitro*.

Segundo Cai *et al.* (2011), o ganho de peso observado nos animais tratados é um indicativo de que o extrato tem baixa toxicidade. Adicionalmente, Andrade *et al.* (2008), em estudo com animais SHR, observaram que estes apresentam menor ganho de peso que o seu controle WKY e os SHR tratados com enalapril ou hidralazina, dado também observado por outros pesquisadores (Labat *et al.*, 2006; Pinto *et al.*, 2012).

O ensaio de toxicidade aguda não evidenciou alterações nos animais tratados, indicando que, caso haja efeito tóxico, a dose seria superior a 2000 mg.kg⁻¹, ou seja, mil vezes maior que a dose anti-hipertensiva utilizada. Afzan *et al.* (2012), avaliaram a toxicidade sub-aguda de extrato de folhas de *C. papaya* por 28 dias e também não observaram toxicidade na dose de 2000 mg.kg⁻¹. Além disso, os resultados das análises sanguíneas indicam não haver alterações hematológicas e dos marcadores de função hepática, renal e cardíaca. Adicionalmente, o valor de IC₅₀ encontrado para extrato CP no ensaio de citotoxicidade em cardiomiócitos de ratos (H9c2) é considerado alto (C₅₀>20 µg.mL⁻¹; Boyd, 1998). Em conjunto, esses dados indicam segurança para utilização desse extrato. Sumariando, o extrato metanólico de *C. papaya* tem potencial hipotensor *in vivo*, é capaz de inibir a ECA *in vitro* e *in vivo*, apresenta ação anti-

hipertensiva cronicamente, diminui a hipertrofia cardíaca observada nos animais tratados e melhora a sensibilidade do barorreflexo, além de baixa toxicidade, e estes resultados podem ser atribuídos à constituição química do extrato, rica em flavonóides e substâncias fenólicas. Deste modo, o extrato metanólico das folhas de *C. papaya* possui efeito anti-hipertensivo após tratamento crônico, envolvendo mecanismo de inibição da ECA, com melhoria da sensibilidade do barorreflexo.

Agradecimentos

Este trabalho foi financiado pela Comissão de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). Agradecemos ao Tommasi analítica pelo auxílio com as análises em LC-MS/MS.

REFERENCIAS

- Afkir S, Nguielefack TB, Aziz M, Zoheir J, Cuisinaud G, Bnouham M *et al* (2008). *Arbutus unedo* prevents cardiovascular and morphological alterations in L-NAME-induced hypertensive rats Part I: cardiovascular and renal hemodynamic effects of *Arbutus unedo* in L-NAME-induced hypertensive rats. *J Ethnopharmacol* 116:288–295.
- Afzan A, Abdullah NR, Halim SZ, Rashid BA, Semail RHR, Abdullah N *et al* (2012). Repeated dose 28-days oral toxicity study of *Carica papaya* L. leaf extract in sprague dawley rats. *Molecules* 17:4326–4342.
- Andrade TU, Ewald BT, Freitas PR, Lenz D, Endringer DC (2012). *Pavonia alnifolia* a. St. HILL.: *In vivo* hypotensive effect and *in vitro* ACE Inhibitory activity. *Int J Pharm Sci* 4:124–126.
- Andrade TU, Abreu GR, Moysés MR, Cabral AM, Bissoli NS (2008). Role of cardiac hypertrophy in reducing the sensitivity of cardiopulmonary reflex control of renal sympathetic nerve activity in spontaneously hypertensive rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 35:1104–1108.
- Andrade-Cetto A, Heinrich M (2005). Mexican plants with hypoglycaemic effect used in the treatment of diabetes. *J Ethnopharmacol* 99:325–348.
- Balasuriya N, Rupasinghe HPV (2012). Antihypertensive properties of flavonoid-rich apple peel extract. *Food Chem* 135:2320–2325.
- Beutel A, Bergamaschi CT, Campos RR (2005). Effects of chronic anabolic steroid treatment on tonic and reflex cardiovascular control in male rats. *J Steroid Biochem Mol Bio* 93:43–48.
- Boyd MR (1998). The NCI *in vitro* anticancer drug discovery screen. In: Teicher B (ed). *Anticancer drug development guide: preclinical screening, clinical trials, and approval*. Humana Press Inc:Totowa, pp 23–42.

Braga FC, Serra CP, Viana Júnior NS, Oliveira AB, Côrtes SF, Lombardi JA (2007). Angiotensin-converting enzyme inhibition by Brazilian plants. *Fitoterapia* 78:353–358.

Brasil (2010). Farmacopeia brasileira 5ª ed. vol.1, Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), Editora Fiocruz:Brasília, pp 202.

Cai R, Li M, Xie S, Songa Y, Zou Z, Zhu C, Qi Y (2011). Antihypertensive effect of total flavone extracts from *Puerariae Radix*. *J Ethnopharmacol* 133:177–183.

Cattaneo LF, Costa AFS, Serrano LAL, Costa AN, Fanton CJ, Bravim AJB (2010). Instituto Capixaba de Pesquisa, Assistência Técnica e Extensão Rural (INCAPER). Documento nº 187, Editora DCM/Incaper:Vitória pp 1–6.

Canini A, Alesiani D, D’Arcangelo G, Tagliatesta P (2007). Gas chromatography–mass spectrometry analysis of phenolic compounds from *Carica papaya* L. leaf. *J Food Composit Anal* 20:584–590.

Colégio brasileiro de experimentação animal (COBEA), Princípios éticos na experimentação animal. São Paulo, 1991, pp 1.

Crowley SD, Gurley SB, Herrera MJ, Ruiz P, Griffiths R, Kumar AP *et al* (2006). Angiotensin II causes hypertension and cardiac hypertrophy through its receptors in the kidney. *Proc Natl Acad Sci USA* 103:17985–17990.

Deng YF, Aluko RE, Jin Q, Zhang Y, Yuan LJ (2012). Inhibitory activities of baicalin against renin and angiotensin-converting enzyme. *Pharm Biol* 50:401–6.

Dickhout JG, Carlisle RE, Austin RC (2011). Interrelationship between cardiac hypertrophy, heart failure, and chronic kidney disease: endoplasmic reticulum stress as a mediator of pathogenesis. *Circ Res* 108:629–642.

Ding-Feng SU, Chao-Yu MIAO (2002). Arterial baroreflex function in conscious rats. *Acta Pharmacol Sin* 23:673–679.

Dong J, Ma X, Wei Q, Peng S, Zhang S (2011). Effects of growing location on the contents of secondary metabolites in the leaves of four selected superior clones of *Eucommia ulmoides*. *Ind Crop Prod* 34:1607–1614.

El-Mas MM, Afify EA, Mohy El-Din MM, Omar AG, Sharabi FM (2001). Testosterone facilitates the baroreceptor control of reflex bradycardia: role of cardiac sympathetic and parasympathetic components. *J Cardiovasc Pharm* 38:754–763.

Engels C, Gräter D, Esquivel P, Jiménez VM, Gänzle MG, Schieber A (2012). Characterization of phenolic compounds in Jocote (*Spondias purpurea* L.) peels by ultra high-performance liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry. *Food Res Int* 46:557–562.

Eno AE, Owo OI, Itam EH, Konya RS (2000). Blood pressure depression by the fruit juice of *Carica Papaya* (L.) in renal and DOCA-induced hypertension in the rat. *Phyther Res* 14:235–239.

Ferreira HC, Serra CP, Endringer DC, Lemos VS, Braga FC, Cortes SF (2007). Endothelium-dependent vasodilation induced by *Hancornia speciosa* in rat superior mesenteric artery. *Phytomedicine* 14:473–478.

Franquini JVM, Nascimento AM, Lima EM, Brasil GA, Heringer OA, Cassaro KOS *et al* (2012). Nandrolone decanoate determines cardiac remodelling and injury by an imbalance in cardiac inflammatory cytokines and ACE activity, blunting of the Bezold-Jarisch reflex, resulting in the development of hypertension. *Steroids* DOI:<http://dx.doi.org/10.1016/j.steroids.2012.12.009>.

Freitas S, Malacarne MM, Romão W, Dalmaschio GP, Castro EVR, Celante VG *et al* (2013). Analysis of the heavy oil distillation cuts corrosion by electrospray ionization FT-ICR mass spectrometry, electrochemical impedance spectroscopy, and scanning electron microscopy. *Fuel* 104:656–663.

- Fusi F, Saponara S, Pessina F, Gorelli B, Sgaragli G (2003). Effects of quercetin and rutin on vascular preparations. A comparison between mechanical and electrophysiological phenomena. *Eur J Nutr* 42:10–17.
- Gbolade A (2012). Ethnobotanical study of plants used in treating hypertension in Edo State of Nigeria. *J Ethnopharmacol* 144:1–10.
- Guerrero L, Castillo J, Quiñones M, Garcia-Vallvé S, Arola L, Pujadas G *et al* (2012). Inhibition of angiotensin-converting enzyme activity by flavonoids: structure-activity relationship studies. *Plos One* 7:1–11.
- Ikpeme EV, Ekaluo UB, Kooffreh ME, Udensi O (2011). Phytochemistry and haematological potential of ethanol seed leaf and pulp extracts of *Carica papaya* (Linn.). *Pak J Biol Sci* 14:408–411.
- Kazuma K, Noda N, Suzuki M (2003). Malonylated flavonol glycosides from the petals of *Clitoria ternatea*. *Phytochemistry* 62:229–237.
- Khaliq F, Parveen A, Singh S, Hussain ME, Fahim M (2012). *Terminalia arjuna* improves cardiovascular autonomic neuropathy in streptozotocin-induced diabetic rats. *Cardiovasc Toxicology* 13:68–76.
- Koike H, Ito K, Miyamoto M, Nishino H (1980). Effects of long-term blockade of angiotensin converting enzyme with captopril (SQ14,225) on hemodynamics and circulating blood volume in SHR. *Hypertension* 2:299–303.
- Krepsky PB, Isidório RG, Souza-Filho JD, Côrtes SF, Braga FC (2012). Chemical composition and vasodilatation induced by *Cuphea carthagenensis* preparations. *Phytomedicine* 19:953–957.
- Ksouri R, Megdiche W, Falleh H, Trabelsi N, Boulaaba M, Smaoui A *et al* (2008). Influence of biological, environmental and technical factors on phenolic content and antioxidant activities of *Tunisian halophytes*. *C R Biol* 331:865–873.

Labat C, Cunha RSA, Challande P, Safar ME, Lacolley P (2006). Respective contribution of age, mean arterial pressure, and body weight on central arterial distensibility in SHR. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 290:H1534–H1539.

Lapa FR, Soares KC, Rattmann YD, Crestani S, Missau FC, Pizzolatti MG *et al* (2011). Vasorelaxant and hypotensive effects of the extract and the isolated flavonoid rutin obtained from *Polygala paniculata*. *L J Pharm Pharmacol* 63:875–881.

Latoui M, Aliakbarian B, Casazza AA, Seffen M, Converti A, Perego P (2012). Extraction of phenolic compounds from *Vitex agnus-castus* L. *Food Bioprod Process* 90:748–754.

Li L, Yi-Ming W, Li ZZ, Zhao L, Yu YS, Li DJ *et al* (2008). Local RAS and inflammatory factors are involved in cardiovascular hypertrophy in spontaneously hypertensive rats. *Pharmacol Res* 58:196–201.

Loh SP, Hadira O (2011). *In vitro* inhibitory potential of selected malaysian plants against key enzymes involved in hyperglycemia and hypertension. *Mal J Nutr* 17:77–86.

Lohiya NK, Pathak N, Mishra PK, Manivannan B (1999). Reversible contraception with chloroform extract of *Carica papaya* linn. seeds in male rabbits. *Reprod Toxicol* 13: 59–66.

Lorell BH, Carabello BA (2000). Left ventricular hypertrophy: pathogenesis, detection, and prognosis. *Circulation* 102:470–479.

Lucas-Filho MD, Silva GC, Cortes SF, Mares-Guia TR, Perpétua Ferraz V, Serra CP *et al* (2010). ACE inhibition by astilbin isolated from *Erythroxylum gonocladum* (Mart.) O.E. Schulz. *Phytomedicine* 17:383–387.

Mancia G, Parati G, Pomidossi G, Grassi G, Bertinieri G, Buccino N *et al* (1982). Modification of arterial baroreflexes by captopril in essential hypertension. *Am J Cardiol* 49:1415–1419.

- Mangiapane ML, Rauch AL, Macandrew JT, Ellery SS, Hoover KW, Knight DR *et al* (1994). Vasoconstrictor action of angiotensin I-convertase and the synthetic substrate (Pro11,D-Ala12)-angiotensin I. *Hypertension* 23:857–60.
- Marakas SA, Kyriakidis MK, Vourlioti AN, Petropoulakis PN, Toutouzas PK (1995). Acute effect of captopril administration on baroreflex sensitivity in patients with acute myocardial infarction. *Eur Heart J* 16:914–21.
- Monteiro MMO, França-Silva MS, Alves NFB, Porpino SKP, Braga VA (2012). Quercetin improves baroreflex sensitivity in spontaneously hypertensive rats. *Molecules* 17:12997–13008.
- Mosmann T (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 65:55–63.
- Ncube B, Finnie JF, van Staden J (2012). Quality from the field: the impact of environmental factors as quality determinants in medicinal plants. *S Afr J Bot* 82:11–20.
- OECD (2001). Test No. 423: Acute Oral Toxicity - Acute Toxic Class Method. OECD Guidelines for testing of Chemical Organization for Economic Cooperation and Development, Paris, France, pp 1–14.
- Ogan AU (1971). Caricaceae: the basic constituents of the leaves of *Carica Papaya*. *Phytochemistry* 10:2544–2547.
- Oliver-Bever B (1986). Medicinal plants in tropical west Africa. Cambridge University Press:London, pp 342.
- Osterziel KJ, Röhrig N, Dietz R, Manthey J, Hecht J, Kübler W (1988). Influence of captopril on the arterial baroreceptor reflex in patients with heart failure. *Eur Heart J* 9:1137–45.
- Owoyele BV, Adebukola OM, Funmilayo AA, Soladoye AO (2008). Anti-inflammatory activities of ethanolic extract of *Carica papaya* leaves. *Inflammopharmacology* 16:168–173.

- Parveen A, Babbar R, Agarwal S, Kotwani A, Fahim M (2012). *Terminalia arjuna* enhances baroreflex sensitivity and myocardial function in isoproterenol-induced chronic heart failure rats. *J Cardiovasc Pharmacol Ther* 17:199–207.
- Pavarini DP, Pavarini SP, Niehues M, Lopes NP (2012). Exogenous influences on plant secondary metabolite levels. *Anim Feed Sci Technol* 176:5–16.
- Persson IAL, Persson K, Hägg S, Andersson RGG (2010). Effects of green tea, black tea and rooibos tea on angiotensin converting enzyme and nitric oxide in healthy volunteers. *Public Health Nutr* 13:730–737.
- Pinto V, Pinho MJ, Silva E, Simão S, Igreja B, Afonso J *et al* (2012). Long-term food restriction attenuates age-related changes in the expression of renal aldosterone-sensitive sodium transporters in Wistar-Kyoto rats: A comparison with SHR. *Exp Gerontol* 47:644–653.
- Piratello AC, Moraes-Silva I, Paulini J, Souza PR, Sirvente R, Salemi V *et al* (2010). Renin angiotensin system and cardiac hypertrophy after sinoaortic denervation in rats. *Clinics* 65:1345–1350.
- Rabe C, Steenkamp JA, Joubert E, Burger JFW, Ferreira D (1994). Phenolic metabolites from rooibos tea (*Aspalathus Linearis*). *Phytochemistry* 35:1559–1565.
- Ramesar S, Baijnath H, Govender T, Mackraj I (2008). Angiotensin I-converting enzyme inhibitor activity of nutritive plants in KwaZulu-Natal. *J Med Food* 11:331–336.
- Ravikant T, Nishant G, Shashipal S, Samriti T, Kumar TR, Vikas V *et al* (2012). Antihypertensive effect of Ethanolic Extract of Indian *Carica papaya l.* Root bark (caricaceae) in Renal Artery Occluded Hypertensive Rats. *IJPCR* 4:20–23.
- Runnie I, Salleh MN, Mohameda S, Headb RJ, Abeywardena MY (2004). Vasorelaxation induced by common edible tropical plant extracts in isolated rat aorta and mesenteric vascular bed. *J Ethnopharmacol* 92:311–316.

Satrija F, Nansen P, Murtini S, He S (1995). Anthelmintic activity of papaya latex against patent *Heligmosomoides polygyrus* infections in mice. *J Ethnopharmacol* 48:161–164.

Senejoux F, Girard C, Aisa HA, Bakri M, Kerram P, Berthelot A *et al* (2012). Vasorelaxant and hypotensive effects of a hydroalcoholic extract from the fruits of *Nitraria sibirica* Pall. (Nitrariaceae). *J Ethnopharmacol* 141:629–634.

Silva GC, Braga FC, Lima MP, Pesquero JL, Lemos VS, Cortes SF (2011). *Hancornia speciosa* Gomes induces hypotensive effect through inhibition of ACE and increase on NO. *J Ethnopharmacol* 137:709–713.

Snijman PW, Joubert E, Ferreira D, Li XC, Ding Y, Green IR *et al* (2009). Antioxidant activity of the dihydrochalcones aspalathin and nothofagin and their corresponding flavones in relation to other rooibos (*Aspalathus linearis*) flavonoids, epigallocatechin gallate, and Trolox. *J Agric Food Chem* 57:6678–6684.

Soncini R, Santiago MB, Orlandi L, Moraes GOI, Peloso ALM, Santos MH *et al* (2011). Hypotensive effect of aqueous extract of *Averrhoa carambola* L. (Oxalidaceae) in rats: an *in vivo* and *in vitro* approach. *J Ethnopharmacol* 133:353–357.

Thomas GD (2011). Neural control of the circulation. *Adv Physiol Educ* 35:28–32.

Thomas JC, Head GA & Woods RL (1998). ANP and bradycardic reflexes in hypertensive rats. Influence of cardiac hypertrophy. *Hypertension* 32:548–555.

Tsai H, Deng H, Tsai S, Hsu Y (2012). Bioactivity comparison of extracts from various parts of common and tartary buckwheats: evaluation of the antioxidant- and angiotensin converting enzyme inhibitory activities. *Chem Cent J* 6:78.

Wang M, Tadmor Y, Wu Q, Chin C, Garrison SA, Simon JE (2003). Quantification of protodioscin and rutin in asparagus shoots by LC/MS and HPLC methods. *J Agric Food Chem* 51:6132–6136.

WHO- World Health Organization (1998). Quality control methods for medicinal plant materials. Geneva:Switzerland, pp 25–26.

Woodman OL, Chan ECH (2004). Vascular and anti-oxidant actions of flavonols and flavones. Clin Exp Pharmacol P 31:786–790.

Zheng J, Liu Q, Yang J, Ren Q, Cao W, Yang J *et al* (2012). Co-culture of apoptotic breast cancer cells with immature dendritic cells: a novel approach for DC-based vaccination in breast cancer. Braz J Med Biol Res 45:510–515.

Zhu Z, Li J, Gao X, Amponsem E, Kang L, Hu L *et al* (2012). Simultaneous determination of stilbenes, phenolic acids, flavonoids and anthraquinones in *Radix polygoni multiflori* by LC–MS/MS. J Pharm Biomed Anal 62:162–166.

APÊNDICE

Cinzas totais

A determinação do teor de cinzas totais foi avaliada de acordo com as orientações da World health organization (WHO, 1998). A amostra foi pesada (1 g) e transferida para cadinho, previamente pesado. A incineração foi realizada com aumento gradativo da temperatura, 30 minutos à 200 °C, 60 minutos à 400 °C e 90 minutos à 600 °C, em mufla (Q318M24, Quimis[®], Diadema, São Paulo) até total incineração da droga. Os cadinhos foram levados a dessecador até total resfriamento e pesados. O cálculo da porcentagem de cinzas foi realizado em relação à droga seca.

Umidade residual

Para a umidade residual 1 g da amostra foi pesado em cadinho, previamente seco até estabilização do peso, e levado à estufa à 105°C por 2 horas. Após resfriamento, em dessecador, o cadinho com a amostra foi pesado, havendo diferença maior que 0,25% entre os pesos, o procedimento foi repetido, até estabilização na pesagem (WHO, 1998).

Extraíveis totais por álcool

A determinação dos extraíveis totais foi realizada de acordo com a Farmacopéia brasileira 5 ed. A amostra vegetal (1 g) foi pesada em papel filtro e levada para extrator de soxhlet. No balão do extrator foram adicionados 0,2 g de NaOH e ½ litro de etanol. A extração foi realizada por 5 horas. Após esse período, o cartucho foi levado à estufa (105 °C; 30 minutos) para total retirada do solvente. O resíduo foi pesado e o percentual de extraíveis é calculado através da diferença no peso no

início e após a extração. A análise foi realizada em triplicata e o resultado foi expresso como média \pm erro padrão da média.

Flavonóides totais

A quantificação de flavonoides totais foi realizada de acordo com Krepsky *et al.*, 2012, este método por sua vez baseou-se na farmacopeia europeia para *Calêndula officinalis* L. com adaptações. Primeiramente foi construída uma curva padrão de quercetina ($1-12 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), 1 mL de cada solução foi reagida com 1 mL de cloreto de alumínio (2% p/v) e o volume final do balão (25 mL) foi completado com metanol acidificado (ácido acético 5%), a leitura foi realizada em espectrofotômetro (T80+ UV/VIS Spectrometer, PG Instruments Ltd, Leicester England) à 425 nm. Cada ponto foi realizado em triplicata e a curva foi repetida em três dias diferentes.

Para as análises das amostras, 150 mg do material vegetal ou 60 mg do extrato foram pesados e transferidos após completa solubilização para balão de fundo redondo. A este balão foi adicionado 1 mL de solução de metenamina (0,5% p/v), 3,5 mL de ácido clorídrico (25% v/v) e 10 mL de acetona. O balão foi então mantido em ebulição sob refluxo por 30 minutos. Após resfriado o material contido no balão foi filtrado cuidadosamente com algodão para balão volumétrico de 50 mL atentando-se para a retirada de qualquer vestígio do extrato, e o balão teve o volume final completado com acetona.

Em funil de separação, 10 mL desta solução foram adicionados juntamente com 10 mL de água mili-Q. Realizou-se então extração com 8 mL de acetato de etila, esse procedimento foi repetido três vezes utilizando 5 mL em cada. A fase acetato de etila foi reunida, lavada com água mili-Q duas vezes (25 mL), filtrada em algodão com sulfato de magnésio seco para balão volumétrico de 25 mL, este teve o volume completado com acetato de etila. Desta solução retirou-se uma alíquota de 10 mL e

completou-se o volume com metanol acidificado (ácido acético 5%), esta solução foi denominada branco. Para o teste, nova alíquota de 10 mL foi transferida para novo balão volumétrico de 25 mL, a este foi adicionado 1 mL de cloreto de alumínio (2% p/v) e o volume foi completado com metanol ácido. Após 30 minutos ao abrigo da luz, ambos tiveram a absorvância lida em espectrofotômetro (T80+ UV/VIS Spectrometer, PG Instruments Ltd, Leicester England) à 425 nm. O aparelho foi zerado com a solução ácida e a leitura do teste foi subtraída do valor encontrado no branco. A concentração de flavonoides encontrada na amostra é calculada como porcentagem de flavonoides totais expresso em quercetina anidra, de acordo com a equação da reta obtida.

Polifenóis totais

Foi realizada uma curva analítica com pirogalol ($3,125-37,5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) e cada ponto foi analisado em triplicata e em três dias diferentes. Para a confecção da curva em um balão volumétrico de 50 mL foram adicionados 5 mL de cada solução padrão, juntamente com 2 mL do reagente de folin-ciocalteu, e o volume do balão foi completado com carbonato de sódio (10,6% p/v), após 3 minutos ao abrigo da luz foi realizada a leitura em espectrofotômetro (T80+ UV/VIS Spectrometer, PG Instruments Ltd, Leicester England) em 715 nm.

Para as análises dos constituintes químicos foram pesados 150 mg do material vegetal ou 60 mg dos extratos, estes após a total solubilização foram transferidos para balão de fundo chato juntamente com 150 mL de água isenta de gás carbônico, obtida através de fervura de 15 minutos, o balão foi então mantido em banho-maria à 60°C por 30 minutos. Após resfriamento essa solução foi transferida para balão volumétrico de 250 mL, o volume foi completado com água isenta de gás carbônico,

e todo o conteúdo do balão foi filtrado, sendo os primeiros 50 mL desprezados, este foi denominado solução A. Desta solução retirou-se 20 mL e adicionou-se 0,2 g de Polivinilpirrolidona (PVPP; Sigma Aldrich, St Louis MO), em um erlenmeyer, este foi levado a plataforma giratória (Agitador kline NT151, Nova técnica[®], Piracicaba, São Paulo) por 60 minutos. A solução foi então filtrada em papel filtro, sendo denominada solução B. Para as quantificações 5 mL da solução A ou B foram transferidos para balão volumétrico de 50 mL juntamente com 2 mL de reagente de folin-ciocalteu e o volume foi completado com carbonato de sódio (10,6% p/v), após 3 minutos a leitura foi realizada em espectrofotômetro (T80+ UV/VIS Spectrometer, PG Instruments Ltd, Leicester England) em 715 nm.

Identificação de substâncias por espectrometria de massas (MS/MS)

ESI(-)FT-ICR MS: Os experimentos foram realizados em um espectrômetro de massas (FT-ICR MS, Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha) e a amostra FR4 foi solubilizada em metanol a 0,1 % de hidróxido de amônia (concentração final de FR4 $1 \mu\text{g.mL}^{-1}$) para aquisição no modo negativo de aquisição de íons. A solução foi injetada na fonte de ESI a um fluxo de $5 \mu\text{L.min}^{-1}$. A faixa dinâmica de aquisição de íons na cela de ICR foi de m/z 200–2000. Os demais parâmetros da fonte de ESI foram: **i)** voltagem no capilar (cone): + 3000-3500 V; **ii)** End Plate Offset = -100 V; **iii)** temperatura e fluxo do gás de secagem: 180 °C e 4 L.min^{-1} ; **vi)** pressão do gás nebulizador: 0,5 bar; **v)** skimmer = -15 V e **vi)** collision voltage = +5 V. Na transmissão de íons, o tempo de acumulação de íons no hexapolo (ion accumulation time) e o time of flight (TOF) foram de 0,02 s e 0,9 ms, respectivamente. Cada espectro foi adquirido a partir da acumulação de 100 scans com um domínio de

tempo de 4 M (mega-point). Antes da aquisição, o equipamento foi externamente calibrado a partir de uma solução de NaTFA na faixa dinâmica de m/z 200-1200.

ESI(-)FT-ICR MS/MS: Para os experimentos de MS/MS, a janela do quadrupolo foi fechada em um intervalo de 4 Da, ou seja, m/z selecionado ± 4 , proporcionando o isolamento do íon de interesse. Posteriormente, o íon foi conduzido para o interior de uma cela de colisão (hexapolo) com energia de colisão variando entre 3-10 V, sendo Argônio o gás de colisão utilizado. A fim de aumentar a quantidade de íons na cela ICR (analisador do FTMS), o tempo de acumulação de íons no hexapolo (ion accumulation time) foi aumentado de 0,02 para 1 s. Cada espectro foi adquirido a partir da acumulação de 32 scans com um domínio de tempo de 4 M (mega-point).

Ensaio de inibição da ECA

As amostras foram pesadas (1,1 mg) e solubilizadas em MeOH:Hepes, pH 8, em ultrassom por 15 minutos, após esse período as soluções foram centrifugadas à 3,000 g por 10 minutos. Em uma placa de 96 poços foram adicionados 10 μL da amostra (concentração final (CF) 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$). Como controle positivo foram utilizados 10 μL de captopril (64 μM , CF: 5,8 μM), ao controle negativo e ao branco foi adicionado somente tampão fosfato pH 8,3 (50 $\mu\text{mol.L}^{-1}$), foram então adicionados 10 μL de solução da pulmão de coelho (CF: 9,1 mg.mL^{-1}) em todos os poços, exceto ao branco. A placa foi então, levada a banho maria (37 $^{\circ}$; 10 minutos). A reação foi iniciada ao adicionarem-se 60 μL de tampão Hepes (pH 8,15) e 30 μL de Hyp-Gly-Gly (CF:27,27 μM) a placa foi levada à incubação por 45 minutos (37 $^{\circ}\text{C}$). Após esse período a reação foi interrompida adicionando-se 100 μL de tungstato de sódio (0,3 M) e 100 μL de ácido sulfúrico (0,33 M), foram ainda

adicionados ao poço branco 10 µL de pulmão de coelho. Desta placa transferiram-se 64 µL para uma nova placa juntamente com 100 µL de água mili-Q. Retiraram-se então 75 µL desta placa para outra. A esta última foram adicionados 100 µL de tampão fosfato (pH: 8,5) e 5 µL de TNBS (69 mM), a placa foi mantida no escuro e em repouso por 20 minutos e, após esse período, foi realizada a leitura em leitor de Elisa (TP-Reader, Thermoplate, China) à 420 nm. O percentual de inibição foi calculado levando em consideração as absorbâncias do controle negativo, positivo e da amostra. Pela fórmula: $\text{inibição} = 100 - (\text{amostra} * 100 / \text{controle negativo})$. Os resultados são expressos como média \pm erro padrão da média.

Toxicidade aguda

A determinação da toxicidade aguda foi realizada de acordo como descrito no guia OECD 423 (2001). Os animais foram divididos em dois grupos ($n=6$), o grupo tratado (CP) recebeu extrato metanólico (CP, 2000 mg.kg⁻¹), por via oral, em dose única; o grupo controle (CON) recebeu o veículo (salina 0,9%) em volume médio ao do extrato, por via oral, em dose única, 15 dias antes da eutanásia. Após o tratamento, os animais foram observados atentamente por 8 h e, em seguida, diariamente por 14 dias e qualquer alteração comportamental foi anotada. No 15º dia, os animais foram anestesiados, o sangue foi coletado em tubo com citrato de sódio, para testes bioquímicos e hematológicos, após a coleta os animais foram eutanasiados.

Procedimentos cirúrgicos e registros hemodinâmicos

Um cateter de polietileno (PE50 – Clay Adams®, EUA) foi conectado à artéria e veia femoral. Sob anestesia, com uma mistura de cetamina e xilasina (100/10 mg.kg⁻¹, Francotar®, Virbac, São Paulo - Brasil; Xilasin®, Syntec, São Paulo - Brasil), foi realizada uma incisão na região inguinal, com um posterior isolamento do plexo

vascular do nervo que permitiu a cateterização da aorta através da artéria femoral e da veia femoral. A terminação do cateter foi mantida preenchida com solução salina (NaCl 0,9%) e ocluída com pinos de aço inoxidável. Foram colocados cateteres na artéria femoral para registro da pressão arterial e na veia femoral para administração da droga vegetal, bem como das outras drogas utilizadas durante os ensaios. O cateter femoral foi conectado a transdutor de pressão (Spectramed – Statham[®], P23XL, EUA) através de um cateter flexível, os valores de registro de pressão arterial média (PAM) foram obtidos através de um sistema informatizado (Pentium MMX 233 MHz) e um programa para aquisição de dados biológicos (Biopac[®] - Biopac Systems, Inc., Santa Barbara, Califórnia, EUA, mod.100^a/serie 94111065 MP). Após a conexão dos animais ao transdutor de pressão, seguida de estabilização, registraram-se as medidas iniciais da PAM e da frequência cardíaca (FC).

Atividade da ECA no soro

De maneira breve 10 µL do soro, captopril ou pulmão de coelho, foram adicionados à placa de 96 poços juntamente com tampão fosfato e o substrato (Hip-Gly-Gly). Depois de homogeneizado e incubado (37°C; 35 min) a reação foi interrompida com adição de tungstato de sódio e ácido sulfúrico. A mistura foi então diluída e o reagente cromógeno (TNBS) foi adicionado, após 20 minutos no escuro foi realizada a leitura em leitor de elisa (TP-Reader, Thermoplate, China) à 420 nm. O branco foi preparado de maneira similar, entretanto a solução de pulmão de coelho só foi adicionada após o tungstato e ácido sulfúrico, as análises foram realizadas em sextuplicata.

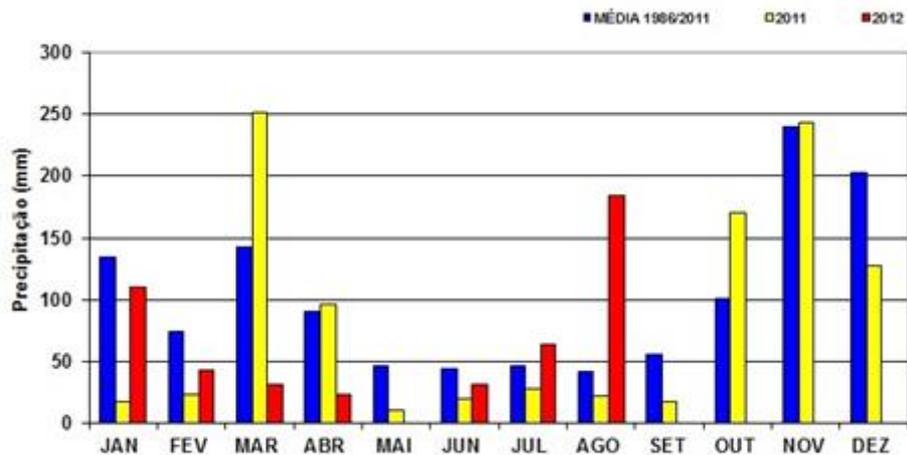


Figura 7: Precipitação média dos meses no ano de 2011 e 2012 e comparação com a precipitação média histórica (1986-2011). Fonte: Instituto capixaba de pesquisa, assistência técnica e extensão rural – INCAPER, disponível em: <<http://hidrometeorologia.incaper.es.gov.br/?pagina=sooretama_sh>>, acesso em 04.01.2013.

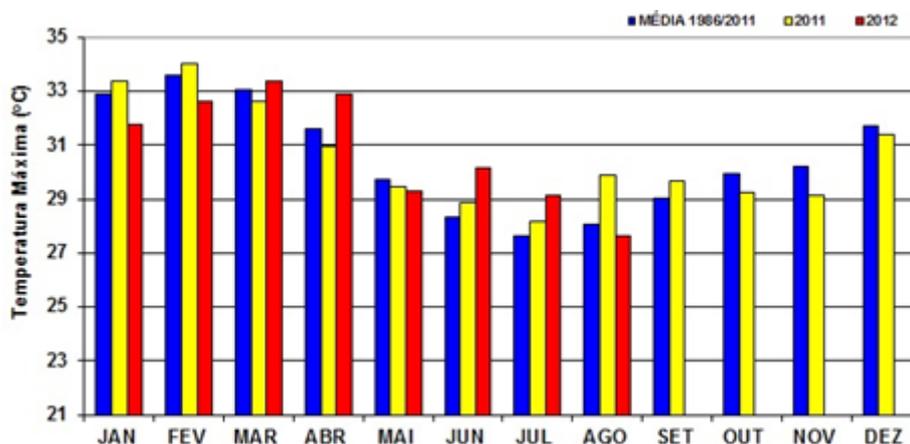


Figura 8: Temperatura máxima média dos meses no ano de 2011 e 2012 e comparação com a temperatura máxima média histórica (1986-2011). Fonte: Instituto capixaba de pesquisa, assistência técnica e extensão rural – INCAPER, disponível em: <<http://hidrometeorologia.incaper.es.gov.br/?pagina=sooretama_sh>>, acesso em 04.01.2013.

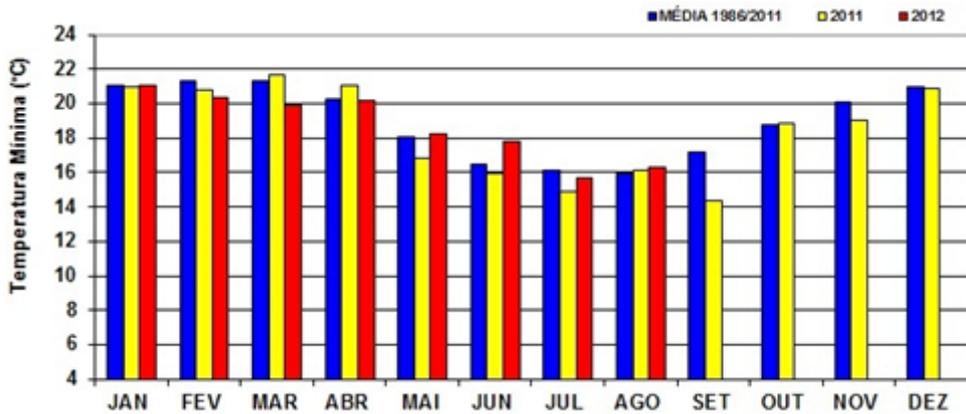


Figura 9: Temperatura mínima média dos meses no ano de 2011 e 2012 e comparação com a temperatura mínima média histórica (1986-2011). Fonte: Instituto capixaba de pesquisa, assistência técnica e extensão rural – INCAPER, disponível em: <<http://hidrometeorologia.incaper.es.gov.br/?pagina=sooretama_sh>>, acesso em 04.01.2013.

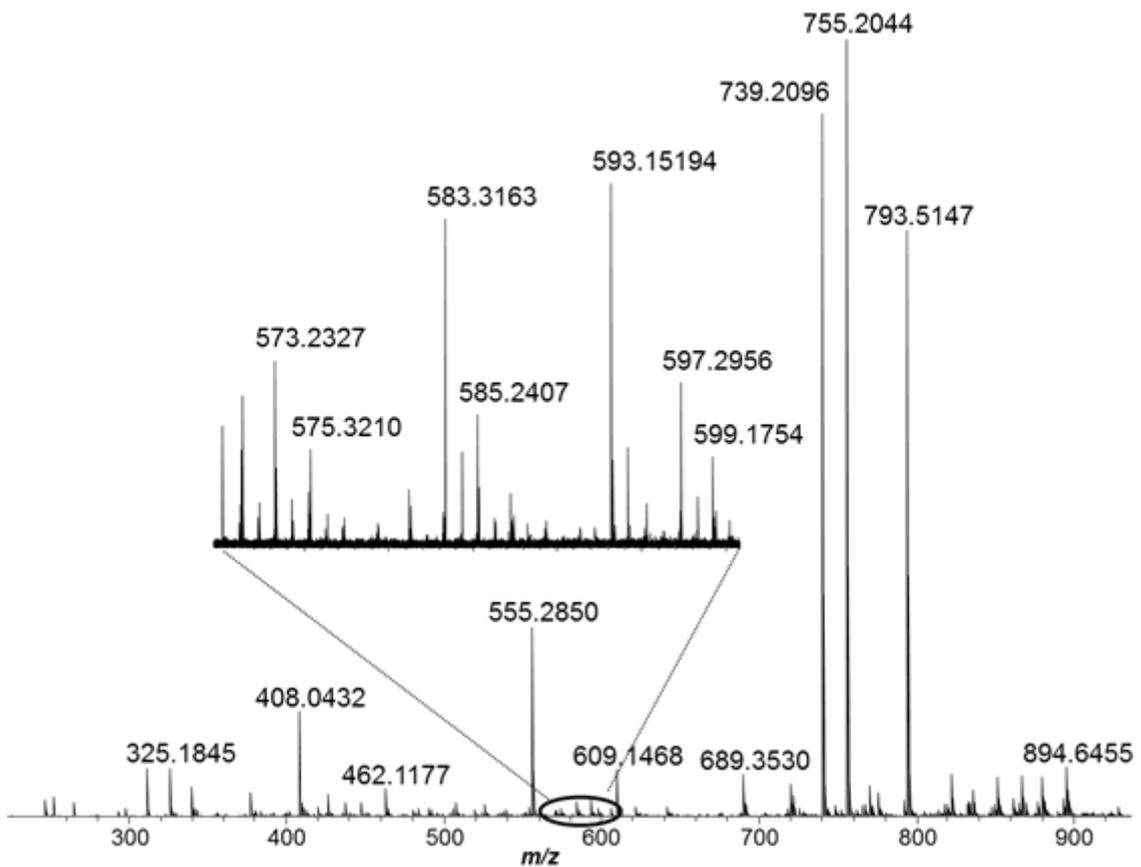


Figura 10. Espectro de ESI(-)-FT-ICR MS de FR4, demonstrando os principais picos m/z presentes na fração.

ANEXOS

Author Guidelines

Scope and types of articles published

The *British Journal of Pharmacology* (BJP) welcomes contributions in all fields of pharmacology. The work should have a direct bearing on drug effects, mechanisms or uses, or the development of new drug targets.

BJP publishes Research Papers, Review Articles, Commentaries and Correspondence. Reviews and Commentaries are normally commissioned by the journal, but consideration will be given to unsolicited contributions.

Research papers must constitute a significant contribution to pharmacological knowledge. Papers that reassess pharmacological concepts based on earlier results will also be considered, as well as purely theoretical papers. Papers describing new methods in pharmacology that embody new principles are also welcome.

Reviews, normally 5000–8000 words, should present an update of recent developments in an active field. Authors of unsolicited review articles should submit a title and outline to the Reviews Editor for approval in principle. Please also refer to our Reviews Guidelines.

Commentaries, normally less than 1000 words, are intended to put into context the material presented in a particular paper. BJP editors normally commission commentaries on papers in press, but unsolicited commentaries on recent papers published in BJP will also be considered. Please also refer to our Commentary Guidelines.

Correspondence is limited to specific comments or criticisms relating to a recent BJP paper, whose authors will be invited to reply in print.

Studies on Natural Products BJP does not publish work on the actions of biological extracts of unknown chemical composition. Compounds studied must be of known chemical structure and concentration.

Originality of material

Manuscripts must not contain the same information as manuscripts under review, accepted or published. This restriction does not apply to results published by the authors as abstracts, letters to editors, or contributions to symposia, provided that the manuscript submitted adds significantly to the previously published contribution. Authors must ensure that copyright restrictions do not preclude the reuse of any text or figures from other publications. It is the author's responsibility to obtain permission to use any copyrighted material, such as reproducing a figure from another article, in print and electronic forms, and to acknowledge the source of the material.

Submission of a manuscript will be taken to indicate:

- that authors have, if necessary, obtained permission to publish from their employers or institutions;
- that approvals are held from any persons acknowledged, or cited as having provided personal communication;
- that all authors have seen and approved the final version of the submitted paper;
- that the content of the manuscript is original and that it has not been published or accepted for publication, either in whole or in part, other than as short abstracts, communications or conference proceedings;
- that no part of the manuscript is currently under consideration for publication elsewhere.

Copyright

Authors (or their employers) retain copyright in their articles published in BJP. All authors must grant Wiley-Blackwell Ltd an exclusive licence to publish their article on behalf of the British Pharmacological Society, by completing and returning our Exclusive Licence Form.

Once published in BJP, papers are available in print and online to BJP subscribers. After 1 year from the date of hard copy publication all papers become freely available

(open access). Immediate open access can be provided *via* our Online Open service, upon payment of a fee of \$3000.

Formal acceptance of material for publication in BJP is conditional upon receipt at the BJP office of the Exclusive License Form. Ideally, all authors should sign the form, with additional signatures attached separately if necessary. However, if it is not possible to obtain a physical signature from all authors, the corresponding author must obtain agreement in writing from the remaining authors to enable them to sign the form on their behalf. Hard copy, fax and electronic copies are acceptable. This indicates that the work is original, and that all authors have seen and approved the final accepted version of the work, which will be published only when one of these forms has been received.

OnlineOpen is available to authors who wish to make their article available to non-subscribers on publication, or whose funding agency requires grantees to archive the final version of their article. With OnlineOpen, the author, the author's funding agency, or the author's institution pays a fee to ensure that the article is made available to non-subscribers upon publication *via* Wiley Online Library, as well as deposited in the funding agency's preferred archive. For the full list of terms and conditions, see http://wileyonlinelibrary.com/onlineopen#OnlineOpen_Terms

Any authors wishing to send their paper Online Open will be required to complete the payment form available from our website at:

https://authorservices.wiley.com/bauthor/onlineopen_order.asp

Prior to acceptance there is no requirement to inform the Editorial Office that you intend to publish your paper OnlineOpen if you do not wish to. All OnlineOpen articles are treated in the same way as any other article. They go through the Journal's standard peer-review process and will be accepted or rejected based on their own merit.

Ethical and Animal Welfare Issues

BJP requires that the conditions under which human and animal experiments are performed are consistent with prevailing standards in the UK. Studies on animals

must comply with the prevailing standards of animal welfare embodied in UK laws governing animal experimentation. For advice on ethical and animal welfare issues, authors may wish to consult the British Pharmacological Society's Ethics Committee *via* the BJP editorial office.

Authors must make it clear that the procedures they used were as humane as possible and complied with the guidelines for animal care of their institutions or with national/ international guidelines.

For all *in vivo* studies involving animals authors must consult the ARRIVE guidelines for reporting experiments involving animals and the BJP editorial explaining how this applies to pharmacological studies, and should state in the body of the manuscript that they have done so.

Studies involving human subjects must be carried out with the formal approval of the relevant Ethical Committee, and evidence of such approval must be provided. Papers concerned with clinical trials of drugs on patients are not appropriate for BJP.

A link to the full ethical policy for BJP can be found near the top of this page above the Instructions to Authors

Sharing of structures, reagents and data

The chemical structures of any drugs or other compounds used must be in the public domain or provided in the submitted manuscript. The provenance of all materials, particularly new reagents (such as novel drugs, biological therapeutics, cell lines, antibodies, DNA, *etc.*), developed as part of the work being published, that are not available from commercial suppliers, should be given in sufficient detail to allow application for its acquisition. We encourage authors to share materials with other scientists, where practicable, since validation by others greatly increases the value of their work.

Microarray data, nucleic acid or protein sequences and X-ray crystallographic coordinates must be deposited in a suitable broadly recognized repository (such as GEO, Swiss-Prot *etc.*). Release embargos are permitted up to the date of publication and the accession number of each database entry must be provided in the text.

Language and style

Authors are strongly urged to keep their manuscripts as short as possible. Particular care should be given to drafting titles and summaries, since these appear in literature search engines, and determine whether or not readers will wish to consult the research paper.

BJP attaches importance to the use of correct, clear, reader-friendly English. As a service to authors, particularly those whose first language is not English, BJP employs a Press Editor and Copy Editor who provide a free of charge language and copy-editing service to improve the quality of all manuscripts that are acceptable for publication on scientific grounds. Note that whereas text, Tables (usually) and legends to Figures can be corrected by the Press Editor, Figures needing changes have to be returned to the author for correction and re-submission. It is therefore particularly important to ensure Figures comply, in detail, with the instructions for figures and legends given below.

Abbreviations

Abbreviations should be used as little as possible, and explained in brackets – for example, bradykinin (BK). An alphabetical list of non-standard abbreviations should be provided – for example HUVEC, human umbilical vein endothelial cells; VSMC, vascular smooth muscle cells. The full name plus abbreviation should also be used in the text on first mention. Commonplace abbreviations need not be included in the list.

Nomenclature

Standard pharmacological nomenclature should be used. Nomenclature of ion channels, receptors, transporters, *etc.* should conform to BJP's Guide to Receptors & Channels (Vol. 164, S1), and to the IUPHAR guidelines, as published in Pharmacological Reviews. Further information can also be found online at the Guide to Pharmacology.

Preparation of Manuscript

Research Papers

Manuscripts must be accompanied by a covering letter, stating clearly why the work is considered suitable for publication in BJP, and explaining the importance of the work for the understanding of drugs and drug action. Please note that details of any preliminary publication of the work must be given in the submission letter and where possible a manuscript tracking reference provided.

Word limits: BJP imposes the following word limits and will unsubmit your manuscript if you exceed them. You will be asked to declare the number of words and references in your manuscript during the submission.

- The summary should be no more than 250 words
- The limit for the main body of the manuscript is 5000 words *excluding references*
- There should nor normally be more than 60 references
- You must use Times New Roman, Font size 12, Double spaced throughout your manuscript

If your manuscript exceeds the above limits, and you are unable to reduce the size, please include a statement in your cover letter declaring that you have exceeded the limits and justify the reasons for doing so for the Editors' consideration.

Manuscripts must include:

- Title page
- Summary
- Introduction
- Methods
- Results
- Discussion and conclusions
- Acknowledgements
- List of references
- Tables

- Figures and Legends
- Statement of conflicts of interest.

Title page

Text should be double spaced throughout the manuscript. The title page should be paginated as page 1 of the manuscript. The title should normally contain no more than 150 characters (including spaces) and should not consist of more than one sentence. It must clearly indicate the subject matter of the paper and any assertions must be justified by the results presented in the paper. Titles should be drafted carefully to indicate broadly what the paper is about and to encourage readership. Cumbersome chemical names, technical details, and unfamiliar abbreviations should be avoided. A short running title containing not more than 50 characters (including spaces) is also required.

The title page should include the names and addresses of authors. Author names should be written Initials followed by Family name. In order to ensure correct citation of your article on PubMed, should your article be accepted for publication, please include spaces in-between author's initials on the title page of your manuscript e.g. A E Smith. If author's initials do not appear on the title page of your manuscript according to these guidelines they may appear incorrectly on PubMed until your article has been typeset and published in an issue.

Authors' present addresses differing from those at which the work was carried out should be given as footnotes on the title page and indicated in the author list by superscript numbers. The author to whom correspondence should be sent should be identified in a footnote, and an e-mail address must be given. No other footnotes are permitted.

Summary

The summary will be printed at the beginning of the paper. It must not exceed 250 words and should be easily readable and intelligible to the non-specialist, and suitable for direct transcription by abstracting services. The summary should convey

clearly the key messages of the work. References must not be included in the summary. Abbreviations must be kept to a minimum and non-standard abbreviations explained in brackets. The summary must be organized under the following subject headings (not as undivided text or numbered paragraphs):

Background and purpose. This must indicate why the study was performed, and what question it was intended to answer.

Experimental approach. This should state in outline what methods were used. Details of incubation media, buffers, drug concentrations, time-points, animal strains, statistical tests *etc.* should not be given unless they are important in relation to the question that was addressed.

Key results. The main results relevant to the question addressed should be summarised, without quantitative elaboration. (E.g. 'Drug X increased coronary blood flow by 25%, whereas drug Y had no effect' rather than 'Coronary blood flow after drug X (10 $\mu\text{mol min}^{-1}$ i.v. for 15 min) was increased from $19.4 \pm 3.2 \text{ ml min}^{-1}$ (mean \pm s.e.m., $n = 6$) to $26.2 \pm 4.1 \text{ ml min}^{-1}$ ($n = 6$). The effect was statistically significant ($0.01 < P < 0.05$). After drug Y... *etc.*'

Conclusions and Implications. As well as summarizing the main inferences that follow from the results, and mentioning important shortcomings and caveats, this paragraph must clearly indicate in what way the work has advanced understanding in the field.

Keywords. Up to 10 keywords or phrases of two to three words (including names and terms used in the title) should be displayed at the end of the summary. Avoid unhelpful or unqualified terms such as 'inhibition', 'drug' *etc.* Abbreviations and keywords should be detailed at the foot of the summary page.

Introduction

The introduction should give a short and clear account of the background of the problem and the rationale of the investigation. Only previous work that has a direct bearing on the present problem should be cited. The final sentence should summarise the broad conclusions of the paper.

Methods

The methods must be described in sufficient detail to allow the experiments to be interpreted and repeated by an experienced investigator. Where published methods are used, references should be given, together with a brief outline. For experiment studies, the methods are presented in headed paragraphs covering:

- Test systems used (animal tests, isolated tissues, cultured cells, *in vitro* systems, *etc.*);
- Measurements made (with technical details);
- Experimental design;
- Data analysis and statistical procedures;
- Drugs, chemicals reagents and other materials (including sources).

For animal studies, the species, strain and total number used must be stated, as well as conditions of maintenance (food, water, light/dark cycles and compliance with ethical guidelines). The doses (initial and subsequent) of anaesthetics and analgesics should be clearly stated; the method of assessing anaesthesia, particularly after the administration of neuromuscular blocking drugs, must be clearly stated. For animal studies performed under anaesthesia vital signs (e.g. blood pressure, heart rate and blood gases) should be monitored and these data be included in the Methods.

The description of drugs, chemicals and other materials should include the names and brief address of the relevant suppliers. Drug names should be International Non-proprietary Names (INN). See website <http://mednet.who.int> for a full list. If a drug has no INN its full chemical name must be used (for nomenclature rules, see Handbook for Chemical Society Authors (London, Chemical) Society – <http://rsc.org>), or its structural formula given. Cumbersome chemical names should be suitably abbreviated for later reference in the paper.

Results

The description of the experimental results should be succinct, but in sufficient detail to allow the experiments to be analysed and interpreted by an independent reader. Typical single experiments may be presented with a clear statement that n number of

similar experiments had similar results. Where appropriate, however, the mean results with confidence limits or standard errors, and the number of observations, should be given. Statistical tests of significance should be performed where appropriate. Headed paragraphs should be used to subdivide the text for ease of reference. Repetition of data in the text, tables and figures should be avoided. The rationale for performing the experiments may be briefly mentioned in the Results section, but conclusions should not be presented. Theoretical considerations may be included if appropriate to the results.

Discussion and Conclusions

The purpose of the discussion is to present a brief (normally not exceeding 1500 words) and pertinent interpretation of the results against the background of existing knowledge. Any assumptions on which conclusions are based must be stated clearly. Recapitulation of the results should be avoided. A review-like treatment, which reduces the impact on the reader, should also be avoided. The main conclusions should be conveyed in a final paragraph with a clear statement of how the study advances knowledge and understanding in the field.

Acknowledgements

Acknowledgements should be brief but should include reference to sources of financial support. Sources of drugs not widely available commercially should be acknowledged.

References

In the text, references to other work should take the form: (Connor and Kitchen, 2006) or 'Connor and Kitchen (2006) showed that'. References to 'unpublished observations' or 'personal communications' should be mentioned in the text only, and not included in the list of references. Papers which have been accepted for publication may be included in the list of references as 'in press'. Copies of these papers should be included as supplementary information accompanying the submitted manuscript. Papers in preparation or which have been submitted but not yet finally accepted for publication must not be included in the list of references.

The reference list at the end of the manuscript must be arranged alphabetically according to the surname of the first author. When the surnames of first authors are identical, the alphabetical order of the surnames of subsequent authors takes precedence over the year of publication. If more than one paper by the same authors in one year is cited, a, b, c, *etc.* are placed after the year of publication, both in the text and in the list of references. All authors should be quoted for papers with up to six authors; for papers with more than six authors, the first six should be quoted followed by *et al.* Entries in the reference list should conform to Harvard style. For example:

Journal Reference

Connor M, Kitchen I (2006). Has the sun set on $\kappa 3$ -opioid receptors? *Br J Pharmacol* 147: 349–350.

Book Reference

McGrath JC, Daly CJ (2005). Imaging adrenergic receptors and their function: the use of fluorescent-ligands and receptors to visualize adrenergic receptors. In: Perez DM (ed). *The Adrenergic Receptors, in the 21st Century*. Humana Press: New Jersey, pp 65–72.

Tables

Each table should be given on a separate page, paginated as part of the paper. Tables should be numbered consecutively with Arabic numerals and the number should be followed by a brief descriptive caption, occupying not more than two lines, at the head of the table. Tables should normally be self-explanatory, with necessary descriptions provided underneath the table. Tables should if possible not exceed 120 characters per line (absolute limit 180), with spaces between columns counted as four characters. Each column should have a heading and the units of measurement should be given in parentheses in the heading. Numbers up to four digits should be shown without spaces; longer numbers should be spaced in 3 digit groupings, without commas. Additional information should be given below the table and 'call outs' are superscript letters (not symbols).

Figures and Legends

To avoid unnecessary figures, only critical points of the text should be illustrated. Authors are encouraged to use colour to enhance the impact and clarity of figures. There is no charge for using colour in *British Journal of Pharmacology*. The use of colour in diagrams and cartoons is to aid clarity, so please avoid lurid clashes (such as yellow on a purple background with red borders) and bear in mind that coloured text on a coloured background, such as red on blue or black, is indistinguishable to a substantial proportion of the population. Follow the principle that a figure should make sense in monochrome. Further guidelines on ensuring that figures are intelligible to colour-blind readers can be found in Saper, C. B. (2007), In living color. *The Journal of Comparative Neurology*, 502: 173–174 and authors are asked to follow the principles outlined therein. For figures supplied in parts, please use A, B, C, etc. to label the panels or parts of the figure. For details of required formats for figures, see the Artwork Instructions section.

Figure legends should be typed on a separate page of the main manuscript document. Legends should explain the figures in sufficient detail that, whenever possible, they can be understood without reference to the text. Legends, captions and labels should be consistent with terminology or nomenclature used in the text.

Statement of conflicts of interest

This should indicate any past or present financial links including consultancies with manufacturers of material or devices described in the paper as well as links to the pharmaceutical industry or regulatory agencies or any other potential conflicts of interest. Industry-based authors must state if they are employed by a company that sells one or more of the drugs or devices mentioned in the article. If no conflicts of interest exist “None” must be entered under this heading.

Review Articles, Commentaries and Correspondence

The same conventions as described for Full Papers, with respect to text style, figures, tables and references, apply also to other publication types. A summary (up to 250 words) is required for Reviews, although the subject headings stipulated for Research Paper summaries do not apply. Additional guidelines for reviews and commentaries are available by following the links above.

The use of explanatory figures in the form of cartoons, flow-diagrams, *etc.* is encouraged. A conflict of interest statement must be included.

Submission of manuscripts

To submit a manuscript, log on to <http://mc.manuscriptcentral.com/bjp> and follow the online submission procedure. Before submitting a manuscript, please make sure you have the following information to hand in addition to your files: The first and last names and e-mail addresses of all authors, and full contact information of any preferred peer reviewers (e-mail address, phone number and institution).

Artwork Instructions

Detailed guidelines for submitting artwork can be found at our Author Resources site: <http://authorservices.wiley.com/bauthor/illustration.asp>. Using the guidelines, please submit production quality artwork with your online submission. We request that at submission, ALL figures are of a high enough quality to be assessed in the peer review process, preferably in .eps or .tiff format. Minimum Resolutions are: 600 dpi for illustrations, graphs and annotated artwork, and 300 dpi for micrographs and photographs. Recommended sizes are: Figure width to be matched to fit into a single column or double column of the printed journal; Text and labelling in standard fonts at 8-10 point font size; Line Width at 0.3 to 1 point size. Use hatching rather than shading in graphs.

Units and Symbols

SI units and symbols should be used for physicochemical quantities. Negative index notation (e.g. mg kg⁻¹, pmol mm⁻² min⁻¹) should be used rather than solidus notation (e.g. mg/kg, pmol/mm²/min). Please refer to the SI Guide www.bipm.org/en/si/ for standard units.

Supplementary Information

Supplementary information is peer-reviewed material directly relevant to the conclusion of an article that cannot be included in the printed version owing to space or format constraints. The printed article must be complete and self-explanatory without the supplementary information. Supplementary information is not subedited,

so authors should ensure that it is supplied ready for publication online. Accepted supplementary file formats are: Microsoft Office files (.doc/.xls/.ppt), Plain ASCII text (.txt), Graphics files (.jpg/.jpeg/.gif/.tif/.tiff/.png/.bmp/.eps/.ps), HTML files (.html), movie files (.mov/.mpg), Sound files (.wav/.mp3/.wma), Acrobat files (.pdf). File sizes must be as small as possible, so that they can be downloaded quickly.

Review process

Once submitted, manuscripts will be quality checked by the editorial office before being sent for review, usually by an Editor and two or more referees. The referees' comments and Editor's recommendation will be reviewed by the appropriate Senior Editor, who will communicate the decision to the Author. This process takes one month on average from submission to the initial decision.

Post Acceptance

Accepted Articles

Within days of acceptance in BJP, manuscripts are made publicly available online. 'Accepted Articles' have been peer-reviewed and accepted for formal publication, but have not been subject to copyediting, composition or proof correction. The service provides for the earliest possible dissemination of research data following article acceptance. Accepted Articles appear in PDF format only and are given a Digital Object Identifier (DOI), which allows them to be cited and tracked. The DOI remains unique to a given article in perpetuity and can continue to be used to cite and access the article further to print publication.

More information about DOIs can be found online at <http://www.doi.org/faq.html>. Accepted Articles will be indexed in PubMed.

Neither the British Pharmacological Society nor Wiley-Blackwell can be held responsible for errors or consequences arising from the use of information contained in Accepted Articles; nor do the views and opinions expressed necessarily reflect those of the British Pharmacological Society or Wiley-Blackwell.

Page proofs

Following publication as an Accepted Article, manuscripts are copy edited and after any required changes have been made are then sent for proof collation. Page proofs will be sent electronically to the corresponding author and should be returned within 3 days of receipt to the Production Editor. Significant textual alterations are unacceptable at proof stage without the written approval of the Editor, and they are likely to result in the delay of publication.

The corresponding author will receive an e-mail alert containing a link to a secure web site. A working e-mail address must therefore be provided for the corresponding author. In the absence of the corresponding author, please arrange for a colleague to access the e-mail to retrieve the proofs. Please note that you have final responsibility for what is stated in the proofs of your manuscript.

Proofed articles will usually be assigned to the next available issue of the journal. The fully reviewed, revised and edited version will replace the Accepted Article when the article is published in an issue. The DOI of the article will remain the same and can continue to be used to cite and access the article. The date of publication of the article is the date of its first appearance online as an Accepted Article.

Author Services

Author Services enables authors to track their article once it has been accepted through the production process to publication online and in print. Submitting authors can check the status of their articles online and choose to receive automated e-mails at key stages of production, so that they don't need to contact the production editor to check progress. Visit <http://authorservices.wiley.com/bauthor/default.asp> for more details on online production tracking and for a wealth of resources, including FAQs, tips on article preparation, submission, and more.

Offprints

Authors will be provided with electronic offprints of their article. Paper offprints can be ordered at prices quoted on the order form that accompanies the proofs, provided that the form is returned with the proofs. The cost is higher if the order arrives too late for the main print run. Electronic offprints are sent to the first author at his or her first e-mail address on the title page of the paper, unless advised otherwise; please therefore ensure that the name, address, and e-mail address of the corresponding

author are clearly indicated on the manuscript title page if he or she is not the first author of the paper.