

Universidade Federal da Paraíba
Centro de Ciências da Saúde
Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e
Sintéticos Bioativos

**A 7-metoxiflavona apresenta efeito tocolítico por modulação negativa da
via Rho cinase e da calmodulina em ratas**

Laiz Aline Silva Brasileiro

João Pessoa-PB

2018

Laiz Aline Silva Brasileiro

**A 7-metoxiflavona apresenta efeito tocolítico por modulação negativa da
via Rho cinase e da calmodulina em ratas**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, do Centro de Ciências da Saúde, da Universidade Federal da Paraíba, como parte dos requisitos para obtenção do título de **Mestre em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos**. Área de concentração: **Farmacologia**

Orientadora: Profa. Dra. Fabiana de Andrade Cavalcante

João Pessoa-PB

2018

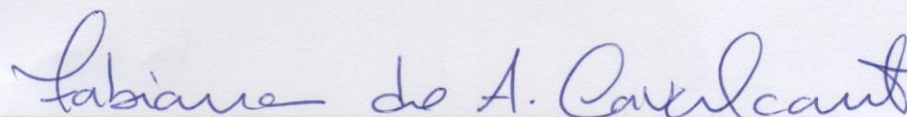
Laiz Aline Silva Brasileiro

**A 7-metoxiflavona apresenta efeito tocolítico por modulação negativa da via
Rho cinase e da calmodulina em ratas**

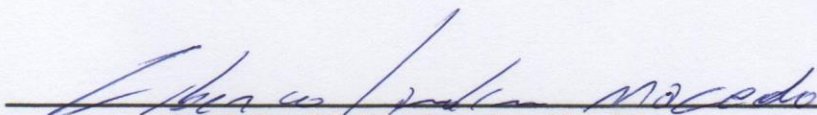
Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, do Centro de Ciências da Saúde, da Universidade Federal da Paraíba, como parte dos requisitos para obtenção do título de **Mestre em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos**. Área de concentração: **Farmacologia**

Aprovada em 27/08/2018

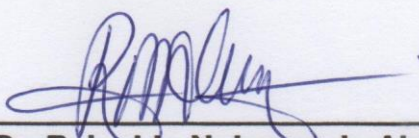
Banca Examinadora



Profa. Dra. Fabiana de Andrade Cavalcante
(Universidade Federal da Paraíba)
Orientadora



Prof. Dr. Cibério Landim Macêdo
(Faculdade de Ciências Médicas da Paraíba)
Examinador externo



Prof. Dr. Reinaldo Nobrega de Almeida
(Universidade Federal da Paraíba)
Examinador interno

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

B8237 Brasileiro, Laiz Aline Silva.

A 7-metoxiflavona apresenta efeito tocolítico por modulação negativa da via Rho cinase e da calmodulina em ratas / Laiz Aline Silva Brasileiro. - João Pessoa, 2018.

129 f. : il.

Orientação: Fabiana de Andrade Cavalcante.

Dissertação (Mestrado) - UFPB/Ciências da Saúde.

1. 7-metoxiflavona, tocolítico, útero de rata, RhoA. I. Cavalcante, Fabiana de Andrade. II. Título.

UFPB/BC

Dedicatórias

Primeiramente a Deus, por ter me criado, por me dar sentido quando me faltavam as forças e, principalmente, por seu amor incondicional em meio a minha infidelidade, proporcionando-me sempre uma nova chance para recomeçar todos os dias de minha vida.

Aos meus pais, Fernandes Antônio Brasileiro Rodrigues e Aurení Maria da Silva, que me criaram com todo esforço para que eu pudesse chegar onde cheguei. Em especial a minha mãe que me deu todo apoio para que eu recebesse este título e suportou todas as minhas alterações emocionais durante todo o processo.

À minha família consanguínea, de modo geral, que sempre torceu e apoiou todos os meus planos e sonhos. Especialmente meus irmãos, que me proporcionaram alegria em meio ao cansaço diário.

À minha família espiritual, Fraterno Amor, pelos ensinamentos, pela paciência, pela compreensão, pelo apoio e incentivo durante todo o processo do mestrando, estimulando-me quando pensei em desistir, me dando saídas quando eu já não as via mais, orando por mim, quando acabavam minhas forças, poupando-me de problemas, para que não me preocupasse, por fim, enchendo-me de amor e mimos, apontando o céu, ajudando-me a direcionar todas as coisas a Deus.

Agradecimientos

À Deus, que na Sua grandeza e no Seu amor me cumulou de graças para que eu chegasse até onde cheguei, minha vida, meus estudos, tudo que tenho e sou não teria sentido sem Ele, por isso minha eterna gratidão a tudo que Ele tem feito e tudo que ainda vai fazer.

À minha irmã de Comunidade Tamyris Freires, que além do vínculo fraterno de comunidade, é farmacêutica e dedicou seu tempo a me ajudar com a dissertação. A Andrei Alves, meu fundador, que mesmo sem entender do assunto, se interessava e buscava de diversas formas me ajudar a encontrar saídas para a conclusão deste trabalho. E a todos da Comunidade de Vida que me incentivaram e me deram todo suporte nesses momentos finais para que eu pudesse concluir o mestrado.

A todos do Laboratório de Biologia Celular e Molecular que participaram da minha vida, durante o primeiro período do mestrado, sempre me incentivando e apoiando, mesmo quando mudei de laboratório. Ao Prof. Dr. Demetrius Antonio Machado de Araújo que aceitou me orientar, me acolhendo em seu laboratório, me encheu de entusiasmo com seu amor pela pesquisa científica e me incentivou a fazer o mestrado.

À Profa. Dra. Fabiana de Andrade Cavalcante que se dispôs gentilmente a me orientar mesmo faltando apenas oito meses para a conclusão do mestrado, com sua doçura e simplicidade, me orientou e correu atrás junto comigo para que este projeto pudesse ser desenvolvido em pouco tempo, eu sei que se não fosse por ela eu não teria conseguido chegar aqui tão rápido.

A todos do Laboratório de Farmacologia Funcional Prof. George Thomas que sempre estavam disponíveis a me ajudar e me deram todo apoio nesta pesquisa. Especialmente, agradeço à Maria da Conceição Correia Silva que me ensinou pacientemente e se disponibilizou a me ajudar sempre que necessário. À Sarah Rebeca Dantas Ferreira que, mesmo com toda a sua pesquisa para ser finalizada, dividiu a bancada comigo e me ajudou em todos os experimentos. E a Thiago Afonso Melo que me ajudou em praticamente todos os experimentos, administrando o hormônio nas ratas sem nunca reclamar.

À Profa. Dra. Bagnólia Araújo da Silva, minha professora desde a graduação, por todos os ensinamentos científicos e não científicos durante todo esse tempo, bem

como, por toda a sua ajuda durante a reta final para que eu fizesse um bom trabalho.

Ao Prof. Dr. Marcelo Sobral da Silva e sua então mestranda Anne Dayse Soares da Silva por ceder gentilmente o flavonoide, objeto de estudo deste trabalho.

Aos professores doutores Cibério Landim Macêdo e Reinaldo Nóbrega de Almeida por aceitarem participar da banca examinadora de defesa de mestrado, bem como Robson Veras e Camille Balarini, como membros suplentes.

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos (PPgPNSB), em especial aqueles que estão sempre instigando a curiosidade dos discentes e por serem exemplos de bons profissionais: Sandra Mascarenhas, Márcia Piuvezam, Bagnólia Araújo, Demetrius Araújo, Fabiana Cavalcante e Marcos Scotti.

Ao coordenador do PPgPNSB, Prof. Dr. Josean Fachine Tavares e ao vice coordenador, Prof. Dr. Damião Pergentino, pela competência com que coordenam esse programa.

À Caroline Manguiera e Nilmar Nincia Neves de Medeiros, secretárias do PPgPNSB, por todo apoio, paciência, dedicação e disponibilidade sempre que solicitado.

Aos funcionários do Biotério, Roberta Parentoni, veterinária que sempre nos ajudou e orientou, José Crispim Duarte e Luís Cordeiro da Silva, sempre disponíveis para nos ajudar nos experimentos.

À Mônica Rodrigues da Silva, pela disponibilidade e prontidão em nos atender.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela bolsa concedida.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES) pelo suporte técnico-científico através do Portal Periódicos.

À Direção do Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos (IPeFarM), na pessoa do Prof. Dr. Rui Macêdo, pelo apoio Institucional.

E aos que não citei, mas que estão em meu coração, que direta ou indiretamente contribuíram para que eu concluísse mais esta etapa em minha vida, meus sinceros agradecimentos.

RESUMO

Uma vez que o flavonoide 7-metoxiflavona (7-MF), um dos componentes majoritários isolados de *Zornia brasiliensis* Vogel, apresentou efeito tocolítico *in vitro* em ratas, resolveu-se caracterizar esse mecanismo de ação. O útero de rata era montado em cubas de banhos para órgão isolado onde as contrações isotônicas e isométricas eram monitoradas ($n = 5$). Observou-se que a 7-MF relaxou o útero de rata pré-contráído tanto por ocitocina (OCI) ($CE_{50} = 3,5 \pm 0,3 \times 10^{-5}$ M) como por KCl ($CE_{50} = 2,2 \pm 0,2 \times 10^{-5}$ M) sendo cerca de 2 vezes mais potente frente a este último agente contrátil, sugerindo a participação dos canais de cálcio dependentes de voltagem (Ca_v) no efeito tocolítico da 7-MF. Para confirmar essa hipótese, foram realizadas curvas cumulativas ao $CaCl_2$ na ausência e na presença da 7-MF e observou-se um deslocamento da curva controle para direita com redução do seu efeito máximo apenas na concentração de 3×10^{-5} M (30%), indicando que provavelmente o bloqueio do influxo de Ca^{2+} através dos Ca_v não seja o principal mecanismo tocolítico do flavonoide. Resolveu-se avaliar uma possível participação dos canais de potássio no efeito tocolítico da 7-MF, utilizando o cloreto de cério, um bloqueador não seletivo de canais de K^+ , e na sua presença a curva controle de relaxamento da 7-MF não foi alterada ($CE_{50} = 3,3 \pm 0,6 \times 10^{-5}$ M), descartando uma modulação positiva dos canais de K^+ no efeito tocolítico da 7-MF. Uma vez que as prostaglandinas estão envolvidas em processos fisiopatológicos uterinos e sendo os inibidores de ciclo-oxigenases (COXs) uma das principais classes utilizadas para o tratamento da dismenorreia, resolveu-se avaliar o possível envolvimento da via da COX no mecanismo de ação tocolítica da 7-MF e observou-se que na presença da indometacina, um inibidor não seletivo das COXs, a curva controle não foi deslocada ($CE_{50} = 4,8 \pm 0,6 \times 10^{-5}$ M), indicando que a inibição destas enzimas não está envolvida na ação tocolítica da 7-MF. Outra via de relaxamento do músculo liso é a dos receptores adrenérgicos- β . Para avaliar uma possível ativação destes receptores na ação da 7-MF, utilizou-se o (S)-(-)-propranolol, um antagonista dos receptores adrenérgicos- β , e observou-se que não houve alteração da potência relaxante na presença do bloqueador ($CE_{50} = 2,2 \pm 0,5 \times 10^{-5}$ M), indicando que a 7-MF não age por modulação positiva desses receptores para induzir o efeito tocolítico. Como uma das principais vias de relaxamento do músculo liso é a via do óxido nítrico (NO), avaliou-se a participação dessa via no efeito tocolítico da 7-MF e observou-se que na presença de L-NAME, um inibidor não seletivo de sintase do NO (NOS), não houve alteração da potência relaxante ($CE_{50} = 4,4 \pm 1,2 \times 10^{-5}$ M), descartando também essa via no efeito tocolítico da 7-MF. Um passo *downstream* em comum das vias Gs e do NO é a ação da enzima fosfodiesterase (PDE). Na presença da aminofilina, um bloqueador não seletivo de PDE, observou-se que não houve alteração da potência relaxante da 7-MF ($CE_{50} = 2,8 \pm 0,5 \times 10^{-5}$ M), indicando que provavelmente não é por ativação desta que o flavonoide exerce seu efeito tocolítico. A inibição de vias contráteis também pode ocasionar relaxamento muscular liso, desta forma avaliou-se a participação da via RhoA/Rho cinase (ROCK) no efeito tocolítico da 7-MF. Na presença de Y-27632, um bloqueador não seletivo de ROCK, a curva controle foi deslocada para a esquerda, com aumento da potência relaxante em torno de 22 vezes ($CE_{50} = 1,6 \pm 0,7 \times 10^{-6}$ M), sugerindo que a 7-MF modula negativamente a via ROCK para exercer seu efeito tocolítico. Ainda no mecanismo contrátil, dá-se um destaque para a calmodulina, um dos principais mediadores para a sinalização do Ca^{2+} . Para avaliar a sua participação no efeito tocolítico da 7-MF, utilizou-se o calmidazolium, um bloqueador da calmodulina, e observou-se uma potencialização do efeito relaxante da 7-MF ($CE_{50} = 6,5 \pm 1,6 \times 10^{-7}$ M), em torno de 54 vezes, confirmando a modulação negativa da calmodulina no seu efeito tocolítico. Dessa forma, o mecanismo de ação tocolítica proposto para a 7-MF em ratas é a inibição da via ROCK e da calmodulina.

Palavras-chave: 7-metoxiflavona, tocolítico, útero de rata, RhoA/Rho cinase, calmodulina.

ABSTRACT

Since the 7-methoxyflavone flavonoid (7-MF), one of the major components isolated from *Zornia brasiliensis* Vogel, showed *in vitro* tocolytic effect in rats, it was decided to characterize this mechanism. The rat uterus was placed in baths for isolated organ where isotonic and isometric contractions were monitored (n = 5). It was observed that 7-MF relaxed the pre-contracted rat uterus by both oxytocin (OCI) ($EC_{50} = 3.5 \pm 0.3 \times 10^{-5}$ M) and KCl ($EC_{50} = 2.2 \pm 0.2 \times 10^{-5}$ M) being about 2 times more potent compared to this contractile agent, suggesting a participation of voltage-dependent calcium channels (Ca_v) in tocolytic effect of 7-MF. To confirm this hypothesis, cumulative curves to $CaCl_2$ were performed in the absence and presence of 7-MF and a shift of the control curve to the right was observed, with a reduction of maximum effect only at the concentration of 3×10^{-5} M (30%), indicating that probably blocking Ca^{2+} influx through Ca_v is not the main tocolytic mechanism of flavonoid. It was decided to evaluate a possible participation of the potassium channels in tocolytic effect of 7-MF using cesium chloride, a non-selective K^+ channel blocker, and in this presence control curve of 7-MF relaxation was not deviated ($EC_{50} = 3.3 \pm 0.6 \times 10^{-5}$ M), discarding positive modulation of the K^+ channels in tocolytic effect of 7-MF. Once prostaglandins are involved in physiopathological uterine processes and the inhibitors of cyclooxygenase (COXs) are one of the main classes used for the treatment of dysmenorrhea so, it was decided to evaluate the possible involvement of the COXs pathway in the tocolytic mechanism of 7-MF and it was observed that in the presence of indomethacin, a non-selective COXs inhibitor, the control curve was not displaced ($EC_{50} = 4.8 \pm 0.6 \times 10^{-5}$ M), indicating that the inhibition of these enzymes are not involved in the tocolytic effect of 7-MF. Another pathway of smooth muscle relaxation is adrenergic- β receptors. In order to evaluate a possible activation of these in the action of 7-MF, used (S)-(-)-propranolol, a adrenergic- β receptor antagonist, was used and it was observed that there was no change in the relaxing potency in the presence of the blocker ($EC_{50} = 2.2 \pm 0.5 \times 10^{-5}$ M), indicating that 7-MF does not act by positive modulation of these receptors to induce the tocolytic effect. As a major route of relaxation of the smooth muscle is the nitric oxide (NO) pathway, it was decided to evaluate the participation of this pathway in the tocolytic effect of 7-MF and it was observed that in the presence of L-NAME, a non-selective inhibitor of NO synthase (NOS), there was no change in the relaxing potency ($EC_{50} = 4.4 \pm 1.2 \times 10^{-5}$ M), also discarding this pathway in tocolytic effect of 7-MF. A common downstream step of the Gs and NO pathways is the enzyme phosphodiesterase (PDE). In the presence of aminophylline, a non-selective PDE, it was observed that there was no change in the relaxing potency of 7-MF ($EC_{50} = 2.8 \pm 0.5 \times 10^{-5}$ M) indicating that it is probably not by its activation that the flavonoid exerts its tocolytic effect. Inhibition of contractile pathways can also lead to smooth muscle relaxation, thus the RhoA/Rho kinase pathway (ROCK) participation in the tocolytic effect of 7-MF was evaluated. In the presence of Y-27632, a non-selective ROCK blocker, the curve was shifted to the left, with an increase in the relaxation potency around 22 times ($EC_{50} = 1.6 \pm 0.7 \times 10^{-6}$ M) suggesting that 7-MF negatively modulates the RhoA/ROCK pathway to exert its tocolytic effect. Still in the contractile mechanism, calmodulin is one of the main mediators for Ca^{2+} signaling. In order to evaluate its participation in the tocolytic effect of 7-MF used calmidazolium, a calmodulin blocker, and was observed a potentiation of the relaxing effect of 7-MF ($EC_{50} = 6.5 \pm 1.6 \times 10^{-7}$ M), around 54 times, confirming negative modulation of calmodulina in tocolytic effect. Thus, the mechanism of tocolytic action proposed for 7-MF in rats is the inhibition of the ROCK pathway and calmodulin.

Keywords: 7-methoxyflavone, tocolytic, rat uterus, RhoA/Rho kinase, calmodulin.

“Deus tem a sua sabedoria, é essa a única e a verdadeira que merece ser amada e procurada como grande tesouro.”

São Luís M. G. de Montfort

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Distribuição geográfica mundial da família Leguminosae	30
Figura 2 – Distribuição geográfica mundial do gênero <i>Zornia</i>	31
Figura 3 – Foto da espécie <i>Zornia brasiliensis</i> Vogel (Leguminosae).....	32
Figura 4 – Estrutura básica de um flavonoide.....	34
Figura 5 – Estrutura básica de uma flavona	36
Figura 6 – Estrutura química da 7-metoxiflavona	37
Figura 7 – Mecanismo de acoplamento eletromecânico da contração muscular lisa uterina pelo aumento da concentração extracelular de K^+	39
Figura 8 – Mecanismo farmacomecânico da contração muscular lisa uterina pela ativação do sistema efetor $G_{q/11}$ - PLC β 1.	42
Figura 9 – Síntese dos principais eicosanoides contráteis do útero.....	43
Figura 10 – Mecanismo de manutenção da contração no músculo liso uterino pela ativação da via $G_{12/13}$ -ROCK	45
Figura 11 – Mecanismo do relaxamento no músculo liso uterino induzido pelas vias efetoras do cAMP e cGMP	47
Figura 12 – Aparelhos utilizados nos experimentos <i>in vitro</i>	58
Figura 13 – Registros originais representativos do efeito tocolítico da 7-MF em útero isolado de rata pré-contraído com 60 mM de KCl (A) e com 10^{-2} UI/mL de ocitocina (B).....	68
Figura 14 – Registros originais representativos do efeito tocolítico da 7-MF sobre as contrações tônicas induzidas por 10^{-2} UI/mL de ocitocina na ausência (A) e na presença (B) de 5 mM de CsCl em ratas.	73

Figura 15 – Registros originais representativos do efeito tocolítico da 7-MF sobre as contrações tônicas induzidas por 10^{-2} UI/mL de ocitocina na ausência (A) e na presença (B) de 10 μ M de indometacina em ratas.....	76
Figura 16 – Registros originais representativos do efeito tocolítico da 7-MF sobre as contrações tônicas induzidas por 10^{-2} UI/mL de ocitocina na ausência (A) e na presença (B) de 300 nM de (S)-(-)-propranolol em ratas.....	79
Figura 17 – Registros originais representativos do efeito tocolítico da 7-MF sobre as contrações tônicas induzidas por 10^{-2} UI/mL de ocitocina na ausência (A) e na presença (B) de 10^{-4} M de L-NAME em ratas	82
Figura 18 – Registros originais representativos do efeito tocolítico da 7-MF sobre as contrações tônicas induzidas por 10^{-2} UI/mL de ocitocina na ausência (A) e na presença (B) de 10^{-4} M de aminofilina em ratas	85
Figura 19 – Registros originais representativos do efeito tocolítico da 7-MF sobre as contrações tônicas induzidas por 10^{-2} UI/mL de ocitocina na ausência (A) e na presença (B) de 10^{-4} M de Y-27632 em ratas	88
Figura 20 – Registros originais representativos do efeito tocolítico da 7-MF sobre as contrações tônicas induzidas por 10^{-2} UI/mL de ocitocina na ausência (A) e na presença (B) de 10^{-4} M de calmidazolium em rata	91
Figura 21 – Proposta de mecanismo de ação tocolítica da 7-MF em útero de rata.....	102

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1** – Efeito tocolítico da 7-MF sobre as contrações tônicas induzidas por 60 mM de KCl (○) e 10^{-2} UI/mL de ocitocina (●) em ratas 69
- Gráfico 2** – Efeito inibitório da 7-MF frente às contrações induzidas por CaCl_2 em meio despolarizante nominalmente sem Ca^{2+} na ausência (■) e na presença da 7-MF nas concentrações de 10^{-5} (□), 3×10^{-5} (▲) e 10^{-4} (Δ) M, em ratas..... 71
- Gráfico 3** – Efeito tocolítico da 7-MF sobre as contrações tônicas induzidas por ocitocina na ausência (●) e na presença (▽) de CsCl em ratas..... 74
- Gráfico 4** – Efeito tocolítico da 7-MF sobre as contrações tônicas induzidas por ocitocina na ausência (●) e na presença (◇) de indometacina em ratas 77
- Gráfico 5** – Efeito tocolítico da 7-MF sobre as contrações tônicas induzidas por ocitocina na ausência (●) e na presença (○) de (S)-(-)-propranolol em ratas 80
- Gráfico 6** – Efeito tocolítico da 7-MF sobre as contrações tônicas induzidas por ocitocina na ausência (●) e na presença (□) de L-NAME em ratas 83
- Gráfico 7** – Efeito tocolítico da 7-MF sobre as contrações tônicas induzidas por ocitocina na ausência (●) e na presença (Δ) de aminofilina em ratas..... 86
- Gráfico 8** – Efeito tocolítico da 7-MF sobre as contrações tônicas induzidas por ocitocina na ausência (●) e na presença (▽) de Y-27632 em ratas 89
- Gráfico 9** – Efeito tocolítico da 7-MF sobre as contrações tônicas induzidas por ocitocina na ausência (●) e na presença (◇) de calmidazolium em ratas..... 92

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

5,7-DMF	5,7-dimetoxiflavona
7-MF	7-metoxiflavona
[Ca²⁺]_c	concentração citosólica de Ca ²⁺
AA	ácido araquidônico
AC	ciclase de adenilil
ANOVA	análise de variância
ATP	trifosfato de adenosina
cAMP	monofosfato cíclico de adenosina
Ca_v	canais de Ca ²⁺ dependentes de voltagem
CE₅₀	concentração de uma droga que promove 50% de seu efeito máximo
CI₅₀	concentração de uma droga que inibe 50% do efeito de um agonista
cGMP	monofosfato cíclico de guanosina
CICR	liberação de Ca ²⁺ induzida pelo Ca ²⁺
CPI -17	Proteína inibidora potencializada pela PKC de 17KDa
COX	ciclo-oxigenase
CsCl	cloreto de cério
DAG	diacilglicerol
e.p.m.	erro padrão da média
E_{max}	efeito máximo
FP	receptor da prostaglandina F _{2α}
G_{12/13}	proteína G ₁₂ ou G ₁₃
G_{q/11}	proteína G _q ou G ₁₁
G_s	proteína G _s

G$\alpha_{q/11}$	subunidade α da proteína G $_{q/11}$
Gα_s	subunidade α da proteína G $_s$
GDP	difosfato de guanosina
GPCR	receptor acoplado à proteína G
GTP	trifosfato de guanosina
IP$_3$	1,4,5-trisfosfato de inositol
IP$_3$R	receptor de IP $_3$
L-NAME	cloridrato de <i>N</i> $_{\omega}$ -nitro-L-arginina metil éster
MLC	cadeia leve da miosina
MLCK	cinase da MLC
MLCP	fosfatase da MLC
MYPT1	subunidade catalítica da MLCP
NCX	trocador sódio/cálcio
NO	óxido nítrico
NOS	sintase do NO
OCI	ocitocina
OT	receptor da ocitocina
PGE$_2$	prostaglandina E $_2$
PGF$_{2\alpha}$	prostaglandina F $_2$ alfa
PIP$_2$	4,5-bisfosfato de fosfatidilinositol
PKA	proteína cinase A
PKC	proteína cinase C
PKG	proteína cinase dependente de cGMP
PLA$_2$	fosfolipase A $_2$
PLCβ_1	fosfolipase C do tipo beta 1
PMCA	Cálcio ATPase da membrana plasmática

Propan	(S)-(-)-propranolol
R²	coeficiente de correlação não linear
RAS	proteína codificada pelo oncogene do vírus do sarcoma murino de Harvey
Rho	proteína G monomérica
RND1	proteína G monomérica Rnd1
ROCK	proteína cinase associada à Rho
RS	retículo sarcoplasmático
RyR	receptor de rianodina
SERCA	Cálcio ATPase do retículo endo-sarcoplasmático
sGC	ciclase de guanilil solúvel
STPM	síndrome de tensão pré-menstrual
SUR	receptor de sulfonilureia
TDPM	transtorno disfórico pré-menstrual
TEA⁺	íon tetraetilamônio
TPP	Trabalho de parto prematuro
V_m	potencial de membrana
ZB-EtOH_{PA}	extrato etanólico bruto obtido das partes aéreas de <i>Zornia brasiliensis</i> Vogel
ZIPK	Proteína Cinase de interação Zíper

OBS: as abreviaturas e os símbolos utilizados neste trabalho e que não constam nesta relação, encontram-se descritas no texto ou são convenções adotadas universalmente.

SUMÁRIO

1 Introdução	23
2 Fundamentação teórica	26
2.1 Produtos naturais	27
2.2 Família Leguminosae	28
2.3 Gênero <i>Zornia</i>	30
2.4 <i>Zornia brasiliensis</i> Vogel	32
2.5 Flavonoides.....	33
2.6 Contração e relaxamento do músculo liso uterino	36
2.7 Desordens que acometem a musculatura lisa uterina	45
2.8 Tratamento das desordens que acometem a musculatura lisa uterina	47
3 Objetivos.....	51
3.1 Gerais	52
3.2 Específicos.....	52
4 Material e métodos.....	53
4.1 Material	54
4.1.1 Material botânico	54
4.1.2 Substância-teste	54
4.1.3 Animais	55
4.1.4 Substâncias e reagentes	55
4.1.5 Soluções nutritivas	56
4.1.6 Aparelhos	56
4.2 Métodos	58
4.2.1 Preparação da solução-mãe da 7-MF para os ensaios farmacológicos.....	58
4.2.2 Efeito tocolítico da 7-MF sobre as contrações tônicas induzidas por KCl ou por ocitocina em útero isolado de rata.....	58
4.2.3 Avaliação da participação dos canais de cálcio dependentes de voltagem no efeito tocolítico da 7-MF em útero isolado de rata	59
4.2.3.1 Efeito tocolítico de 7MF frente às contrações induzidas por cloreto de cálcio em meio despolarizante (KCl 60 mM) nominalmente sem Ca^{2+}	59
4.2.4 Avaliação do envolvimento dos canais de potássio no efeito tocolítico produzido por 7-MF em útero isolado de rata.....	59

4.2.4.1 Efeito da 7-MF sobre as contrações tônicas induzidas por ocitocina na ausência e na presença de CsCl.....	58
4.2.5 Avaliação do envolvimento da via da ciclo-oxigenase no efeito tocolítico promovido por 7-MF em útero isolado de rata.....	59
4.2.5.1 Efeito da 7-MF sobre as contrações tônicas induzidas por ocitocina na ausência e na presença de indometacina	59
4.2.6 Avaliação da participação da via adrenérgica no efeito tocolítico produzido por 7-MF em útero isolado de rata	59
4.2.6.1 Efeito da 7-MF sobre as contrações tônicas induzidas por ocitocina na ausência e na presença de (S)-(-)-propranolol	60
4.2.7 Avaliação do envolvimento da via do óxido nítrico no efeito tocolítico da 7-MF em útero isolado de rata	60
4.2.7.1 Efeito tocolítico da 7-MF sobre as contrações tônicas induzidas por ocitocina na ausência e na presença de L-NAME	60
4.2.8 Avaliação da participação da fosfodiesterase no efeito tocolítico produzido por 7-MF em útero isolado de rata	61
4.2.8.1 Efeito da 7-MF sobre as contrações tônicas induzidas por ocitocina na ausência e na presença de aminofilina	61
4.2.9 Avaliação da participação da via da Rho cinase no efeito tocolítico produzido por 7-MF em útero isolado de rata	61
4.2.9.1 Efeito da 7-MF sobre as contrações tônicas induzidas por ocitocina na ausência e na presença de Y-27632	61
4.2.10 Avaliação da participação da calmodulina no efeito tocolítico produzido por 7-MF em útero isolado de rata	62
4.2.10.1 Efeito da 7-MF sobre as contrações tônicas induzidas por ocitocina na ausência e na presença de calmidazolium.....	62
4.2.11 Análise estatística	63
5 Resultados.....	64
5.1 Efeito tocolítico da 7-MF sobre as contrações tônicas induzidas por KCl ou por ocitocina em útero isolado de rata.....	65
5.2 Avaliação da participação dos canais de cálcio dependentes de voltagem no efeito tocolítico da 7-MF em útero isolado de rata	68
5.2.1 Efeito tocolítico da 7-MF frente às contrações induzidas por cloreto de cálcio em meio despolarizante (KCl 60 mM) nominalmente sem Ca^{2+}	68

5.3 Avaliação do envolvimento dos canais de potássio no efeito tocolítico produzido por 7-MF em útero isolado de rata	71
5.3.1 Efeito da 7-MF sobre as contrações tônicas induzidas por ocitocina na ausência e na presença de CsCl.....	71
5.4 Avaliação do envolvimento da via da ciclo-oxigenase no efeito tocolítico promovido por 7-MF em útero isolado de rata.....	74
5.4.1 Efeito da 7-MF sobre as contrações tônicas induzidas por ocitocina na ausência e na presença de indometacina	74
5.5 Avaliação da participação da via adrenérgica no efeito tocolítico produzido por 7-MF em útero isolado de rata	77
5.5.1 Efeito da 7-MF sobre as contrações tônicas induzidas por ocitocina na ausência e na presença de (S)-(-)-propranolol	77
5.6 Avaliação do envolvimento da via do óxido nítrico no efeito tocolítico de 7-MF em útero isolado de rata	80
5.6.1 Efeito tocolítico da 7-MF sobre as contrações tônicas induzidas por ocitocina na ausência e na presença de L-NAME.....	80
5.7 Avaliação da participação da enzima fosfodiesterase no efeito tocolítico produzido por 7-MF em útero isolado de rata.....	83
5.7.1 Efeito da 7-MF sobre as contrações tônicas induzidas por ocitocina na ausência e na presença de aminofilina	83
5.8 Avaliação da participação da via da Rho cinase no efeito tocolítico produzido por 7-MF em útero isolado de rata	86
5.8.1 Efeito da 7-MF sobre as contrações tônicas induzidas por ocitocina na presença de Y-27632.....	86
5.9 Avaliação da participação da calmodulina no efeito tocolítico produzido por 7-MF em útero isolado de rata	89
5.9.1 Efeito da 7-MF sobre as contrações tônicas induzidas por ocitocina na ausência e na presença de calmidazolium.....	89
6 Discussão	92
7 Conclusões.....	102
Referências.....	104
Anexo.....	127
Anexo 1.....	128

1 Introdução

Por milênios, as plantas medicinais têm sido utilizadas como uma fonte valiosa de agentes com finalidade terapêutica. Atualmente, ainda muitos dos medicamentos utilizados são naturais ou derivados de produtos naturais (KINGHORN et al., 2011; NEWMAN; CRAGG, 2012; BERLINCK et al., 2017).

Os interesses pelos produtos naturais de origem vegetal têm aumentado, principalmente pela presença de seus constituintes ativos, com estrutura diversificada, uma vez que estes podem servir de base para o desenvolvimento de modelos sintéticos desafiadores, despertando o interesse da indústria farmacêutica e de atividades econômicas relacionadas (KHAN, 2018). Neste contexto, o Brasil é o detentor de uma das maiores riquezas naturais do planeta e apresenta grande potencial para descoberta de biomoléculas ativas, mesmo que ainda seja pouco explorado (BOLZANI, 2016).

Os produtos naturais vegetais já foram relatados apresentando as mais diversas atividades, porém destaca-se as atividades sobre a musculatura lisa uterina, como a atividade uterotônica de *Abrus precatorius* (NWODO; BOTTING, 1983) e *Dichrostachys cinerea* (SAMSENY et al., 2015) e a atividade tocolítica de *Cajanus cajan* (OLATUNJI-BELLO; OBIJEIH; MOJIMINIYI, 2000) e de *Pentaclethra macrophylla* (OKUNROBO; NWAGWUOGBE; BAFOR, 2012).

Substâncias com propriedades tocolíticas são promissoras para o tratamento de diversas desregulações que podem acometer a população feminina como a dismenorreia, também agir para prevenção do aborto e de parto prematuro, entre outras. Porém, ainda não existe um agente tocolítico ideal, que seria aquele com alta especificidade para a musculatura lisa uterina e apresentando mínimos efeitos colaterais, tanto para a mãe, como para a criança, em caso de gestação (GRUBER; O'BRIEN, 2011; DIAS et al., 2018).

Neste contexto surgem os flavonoides como uma possível fonte para a busca de novos agentes com atividade tocolítica. Trata-se da maior classe de compostos fenólicos encontrados em vegetais como metabólitos secundários, abrangendo mais de 10.000 estruturas (AGATI et al., 2012). Alguns já foram relatados na literatura apresentando atividade tocolítica, como genisteína, campferol e quercetina (REVUELTA; HIDALGO; CANTABRANA, 1999), diplotropina (LIMA, 2008), isoliquiritigenina (SHI et al., 2012) e 3,6-dimetil éter galetina (CARREIRO et al., 2017).

Diante destas premissas e sabendo que o extrato etanólico bruto obtido das partes aéreas de *Zornia brasiliensis* Vogel (ZB-EtOH_{PA}) já apresentou atividade espasmolítica em vários músculos lisos, incluindo o efeito tocolítico em rata, tanto frente às contrações fásicas (OLIVEIRA et al., 2014; OLIVEIRA, 2016), como sobre o componente tônico (FERREIRA, 2018), aliado ao fato de os flavonoides serem os principais marcadores químicos desta espécie, e tendo sido relatado que 5,7-dimetoxiflavona (5,7-DMF) e 7-metoxiflavona (7-MF) isolados desta espécie, antagonizaram as contrações fásicas induzidas por carbacol (CCh) e por ocitocina (FERREIRA, 2018), resolveu-se avaliar o possível mecanismo de ação tocolítica em rata da 7-MF.

2 Fundamentação teórica

2.1 Produtos Naturais

Os produtos naturais podem ser definidos de maneira ampla como um conjunto de moléculas derivadas do ambiente e que não estão envolvidas no metabolismo primário (PYE et al., 2017). Trata-se de compostos orgânicos de baixo peso molecular com estrutura química diversa que, em geral, apresentam atividades biológicas diversas e são fontes abundantes na descoberta e desenvolvimento de novas moléculas (KATZ; BALTZ; RICHARD, 2016).

Há relatos da utilização de plantas medicinais, produtos animais e minerais por civilizações muito antigas como a mesopotâmia, antigo Egito, Grécia antiga, bem como a utilização de remédios à base de plantas também na idade média na Europa (ATANASOV et al., 2015).

Dá-se um destaque especial aos produtos naturais de origem vegetal, uma vez que incluem um grande número de espécies e consequente produção de uma vasta quantidade de compostos bioativos com estruturas químicas diversas, aliado ao fato de terem sido utilizados há milênios como agentes terapêuticos, inicialmente apenas de maneira empírica, sem base dos mecanismos de ação ou das atividades biológicas dos constituintes (VERPOORTE, 1998; VERPOORTE, 2000; FABRICANT; FARNSWORTH, 2001; CRAGG; NEWMAN, 2013; ATANASOV et al., 2015).

Após a descoberta da morfina a partir do ópio, houve uma intensificação pela busca de moléculas advindas destes produtos naturais vegetais (DIAS; URBAN; ROESSNER, 2012) e com o passar dos anos outras moléculas de suma importância foram isoladas e purificadas, como a cafeína, a codeína, a atropina, a morfina, o ipratrópio, a escopolamina, entre outras (HOSZTAFI, 1997; CORSON; CREWS, 2007). Atualmente, os estudos etnobotânicos e etnofarmacológicos ainda são os principais norteadores para a escolha das plantas de interesse (TAN et al., 2015; AZAM et al., 2016).

Historicamente reconhecidos como fontes inestimáveis de inspiração para a química, biologia e medicina (RODRIGUES et al., 2016; PATRIDGE et al., 2016), pode-se citar entre as inúmeras vantagens que os produtos naturais podem apresentar a diversidade de estruturas químicas, o fato de terem sido selecionados pela natureza para interações sob estresses bióticos e abióticos e serem

evolutivamente otimizados como compostos bioativos incluindo as propriedades para ligação de proteínas (HARVEY; EDRADA-EBEL; QUINN, 2015; SCHULZ; HOTLING, 2015; FLÓREZ et al., 2015; TRAXLER; KOLTER, 2015).

A exploração desses produtos facilitou o uso de medicamentos que os utilizem como base e atualmente estima-se que entre 50 e 70% de todos os medicamentos utilizados na clínica, advém ou são inspirados em produtos naturais. Também se têm relatos que dos 112 primeiros medicamentos aprovados pela *Food and Drug Administration (FDA)* entre 1999 e 2013, 31 deles, o equivalente a 28%, foram desenvolvidos baseado em moléculas naturais (DING et al., 2016).

No Brasil esta utilização deveria ser ainda mais forte, uma vez que se trata de um dos países com a maior diversidade do mundo, sendo descritas mais de 40 mil espécies vegetais em mais de nove ecossistemas diferentes. Entretanto, apesar da tradição de uso e aceitação de plantas medicinais pela população brasileira, o número de medicamentos à base de plantas licenciados no país ainda é pequeno, quando comparado com outras nações, fazendo-se necessários mais estudos com essa finalidade (CARVALHO et al., 2014).

2.2 Família Leguminosae

A família Leguminosae encontra-se na ordem Fabales e está dividida em três subfamílias: Caesalpinioideae, Mimosoideae e Papilionoideae (FERREIRA; TROVÃO; MELO, 2015). Esta família passou a ser chamada posteriormente de Fabaceae, entretanto, de acordo com o Código Internacional de Nomenclatura para Algas, Fungos e Plantas (*International Code of Nomenclature for algae, fungi and plants, ICNafp*), atualmente esses dois nomes são igualmente válidos – Leguminosae e Fabaceae. Este código autoriza o uso de dois nomes para uma mesma família quando o antigo nome já possui uso prolongado de publicações, e dentro desta exceção, estão oito famílias, das quais uma delas é a Leguminosae (IAPT, 2017).

Abrangendo uma grande quantidade de espécies, conseqüentemente, esta família é composta por variadas formas vegetais, desde grandes árvores de florestas tropicais, arbustos, subarbustos, ervas anuais ou perenes e trepadeiras, que vivem em diferentes altitudes e latitudes. Possuem folhas dispostas de forma alterna, compostas, pari ou imparipinadas, com estípulas ou estipelas que as vezes podem

ser transformadas em espinhos (VIRTUOSO et al., 2005). E com representantes dos mais diversos tipos de hábito: árvores conhecidas como o “pau-brasil” (*Caesalpinia echinata* Lam.) e o “jacarandá-da-Bahia” (*Dalbergia nigra* (Vell.) Allemão ex Benth.), arbustos como “topete-de-cardeal” (*Calliandra tweediei* Benth), lianas como a “estojo-de-luneta” (*Dioclea violacea* Mart. ex Benth) e até plantas aquáticas como a “malícia-d’água” (*Neptunia pubescens* Benth) (SILVEIRA; MIOTTO, 2013).

Esta família tem importância econômica devido a sua utilização diversificada, sendo especialmente utilizada na alimentação humana, visto que vários legumes estão incluídos nela, motivo pelo qual recebe o nome de Leguminosae. Pode-se citar como exemplos o “feijão” (*Phaseolus vulgaris* L.), “ervilha” (*Pisum sativum* L.), “lentilha” (*Lens culinaris* Medik), “fava” (*Vicia faba* L.), “grão de bico” (*Cicer arietinum* L.), “soja” (*Glycine max* L.) e “amendoim” (*Arachis hypogaea* L.), que são fontes ricas em proteínas, bem como, em conteúdo mineral (DOYLE; LUCKOW; 2003; WOJCIECHOWSKI, 2003; RIBEIRO; QUEIROZ; MORIM, 2016).

Também são bastante utilizadas na indústria como “goma-arábica” (*Astragalus gummifer*) e “anil” (*Indigofera hirsuta* L. e *Indigofera anil* L.). Bem como, são utilizadas as madeiras de suas espécies, por exemplo, de “caviúna” (*Dalbergia brasilienses* Vog. e *Dalbergia nigra* All.), “cabriúva” ou “bálsamo” (*Myroxylon balsamum* L.), “jacarandá” (*Machaerium ocutifolium* Vog. e *Machaerium scleroxylon* Tul.), “araribá” (*Centrolobium robustum* Mart., *Centrolobium microchaete* Mart. e *Centrolobium tomentosum* Guill.), “sucupira” (*Bowdichia nítida* Spruce., *Bowdichia virgilioides* H. B. K. e *Bowdichia martiusii* Benth), “angelim” (*Andira bahiensis* N.) e “cumarú” (*Dipteryx odorata* Aubl.). E até mesmo plantas forrageiras como o “trevo-branco” (*Melilotus alba*) e “alfafa” (*Medicago sativa* L.) (JOLY, 2002; SILVA; SOUZA; CARREIRA, 2004).

Frequentemente, é relatada na família Leguminosae a presença de metabólitos secundários que contém nitrogênio em sua estrutura, como as aminas, aminoácidos não proteicos, compostos cianogênicos, peptídicos, além de compostos fenólicos como flavonoides, catequinas, taninos, lignanas, entre outros (WINK, 2013), tendo os estudos mais voltados para os flavonoides devido a sua diversidade nesta família (PIZZOLATTI et al., 2003; OLIVEIRA et al., 2009).

Apresentando distribuição cosmopolita (Figura 1), espécies desta família podem ser encontradas nas regiões temperadas, frias e especialmente nas regiões tropicais e subtropicais (VIRTUOSO et al., 2005; LPWG, 2017).

A família das leguminosas possui ocorrência no Brasil em torno de 222 gêneros e 2.807 espécies, dentre estes, 168 gêneros e 1.083 espécies estão distribuídas na região Nordeste. Já foram registrados 127 gêneros e 593 espécies na região da Caatinga, sendo 149 endêmicas (LIMA; MELO 2015). Encontram-se documentadas 71 espécies de 34 gêneros na microrregião do Cariri Paraibano, dentre estes, destacam-se em abundância a subfamília Papilionoideae, sendo encontrado de modo mais variado taxonomicamente o gênero *Senna* Mill. (Caesalpinioideae), com cinco espécies, seguido de *Zornia* J. F. Gmel. (Papilionoideae), com quatro espécies (BARBOSA et al., 2007; FERREIRA; TROVÃO; MELO, 2015).

Figura 1 – Distribuição geográfica mundial da família Leguminosae.



Fonte: tropicos.org/NamePage.aspx?nameid=42000184&tab. Acesso em 02 de janeiro de 2018.

2.3 Gênero *Zornia*

Pertencente à família Leguminosae, subfamília Papilionoideae, o gênero *Zornia* tem como sua principal característica as inflorescências espiciformes, encontradas em suas flores dispostas com bractéolas peltadas, aos pares, protegendo cada flor e por possuírem estípulas semelhantes às bractéolas (PEREZ, 2009).

Este gênero possui cerca de 80 espécies no mundo, sendo 41 na América, 16 na África, 13 na Oceania e 7 na Ásia. No entanto, o principal centro de diversidade deste gênero é o Brasil (Figura 2), com 36 espécies, onde 15 são endêmicas, distribuídas em várias regiões do país, tais como Nordeste (21 spp.), Sudeste (20 spp.) e Sul (14 spp.), sendo Bahia e Minas Gerais os estados de maior concentração de espécies (20 spp.). Entretanto, o estado da Bahia é o único que apresenta toda a diversidade do gênero (PEREZ, 2009).

Figura 2 – Distribuição geográfica mundial do gênero *Zornia*.



Fonte: <http://tropicos.org/Name/40028793?tab=maps>. Acesso em 02 de janeiro de 2018.

Estudos etnofarmacológicos mostraram que *Zornia diphylla* Pers. é utilizada popularmente para o tratamento da disenteria, doenças venéreas e indução do sono em crianças (KHARE, 2008). Já *Z. virgata* é utilizada como contraceptiva (ELISABETSKY; POSEY, 1989).

Alguns estudos já demonstraram atividades farmacológicas para espécies do gênero *Zornia*, tais como: atividade antibacteriana para as espécies *Z. elegans* (L) Pers (CHIAPPETA; MELLO, 1984), *Z. tenuifolia* Moric. (NASCIMENTO; MELO; CHIAPPETA, 1985), *Z. reticulata* Pers (MEDEIROS et al., 2012) e *Z. milneana* Mohlenbr (OBI et al., 2007). Também foram observadas atividades antibacteriana, antifúngica e anti-inflamatória do óleo essencial de *Z. diphylla* Pers. (ARUNKUMAR; NAIR; SUBRAMONIAM, 2012) e atividade larvicida contra os mosquitos vetores da

malária e arbovírus do extrato aquoso das folhas de *Z. diphylla* Pers. (GOVINDARAJAN et al., 2016).

Algumas espécies de *Zornia* também exibiram atividade sobre a musculatura lisa como *Z. venous* Mohlenbr (ROJAS et al., 1995) e *Z. diphylla* Pers. (ROJAS et al., 1999) que apresentaram atividade espasmolítica em íleo de rato e *Z. brasiliensis* Vogel que apresentou atividade espasmolítica em traqueia e íleo de cobaia, corpo cavernoso, aorta de rato e efeito tocolítico em útero de ratas (OLIVEIRA et al., 2014, 2016; FERREIRA, 2018).

2.4 *Zornia brasiliensis* Vogel

Conhecida popularmente como “urinária”, “urinana” ou “carrapicho”, trata-se de uma espécie herbácea (Figura 3), que cresce de maneira espontânea e está distribuída em quase todas as regiões do Brasil (Norte, Nordeste, Centro-Oeste e Sudeste), em especial na região Nordeste. Geralmente está associada a regiões de floresta Amazônica, caatinga e Mata Atlântica (BFG, 2015), também podendo ser encontrada em outros países da América do Sul como a Venezuela (MOHLENBROCK, 1961; ALBUQUERQUE et al., 2007; PEREZ, 2009; PEREZ et al., 2011; PEREZ, 2016; MISSOURI BOTANICAL GARDEN, 2017).

Figura 3 – Foto da espécie *Zornia brasiliensis* Vogel (Leguminosae).



Fonte: <http://rubens-plantasdobrasil.blogspot.com.br/search/label/Zornia>. Acesso em 02 de janeiro de 2018.

Esta espécie é utilizada na medicina popular como diurética, para o tratamento de doenças venéreas e para desordens gastrintestinais, geralmente sendo utilizado o decocto da planta inteira, até os sintomas desaparecerem (DINIZ et al., 2002; AGRA; FREITAS; BARBOSA-FILHO, 2007; ALBUQUERQUE et al., 2007; AGRA et al., 2008).

Algumas atividades biológicas já foram relatadas para esta espécie, como atividade moluscicida contra a espécie *Biomphalaria glabrata* (DAVID et al., 2007), tripanossomicida (AMBROZIN et al., 2008), atividade antitumoral (COSTA et al., 2015), quimioprotetora (TA; WALLE, 2007), fotoprotetora (GOMES, 2016) e atividade antioxidante e tóxica frente à *Artemia salina* (ROUQUAYROL et al., 1980; DAVID et al., 2007). O extrato hidroalcoólico obtido das partes aéreas apresentou baixa toxicidade por via oral em modelo murino (BATISTA, 2013), já o extrato etanólico apresentou atividade antidiarreica em camundongos (OLIVEIRA, 2016) e atividade espasmolítica em diversos músculos lisos, entre eles, traqueia e íleo isolados de cobaia, corpo cavernoso e aorta isolados de rato e útero isolado de rata (OLIVEIRA et al., 2014, 2016; FERREIRA, 2018).

Em estudos fitoquímicos realizados com *Zornia brasiliensis* já foram isolados diversos compostos, entre eles chalconas (2',4'-dihidroxichalcona e zorniozideo), pterocarpanos (3-hidroxi-9-metoxipterocarpano e medicarpina), uma saponina (soyasaponina), um álcool cíclico (D-pinitol), terpenos (diidromelilotosideo e roseosideo), ácidos fenólicos (ácido (Z)-O-cumárico glicosilado e ácido (E)-O-cumárico glicosilado) e flavonoides (isoorientina-3-O-metiléter, isovitexina, ononina, 5-hidroxi-7-metoxiflavona, 7,4-dimetoxi-isoflavona, 5,7-dimetoxiflavona e 7-metoxiflavona) (SILVA et al., 2013; NASCIMENTO et al., 2015; NASCIMENTO et al., 2016; NASCIMENTO et al., 2018).

2.5 Flavonoides

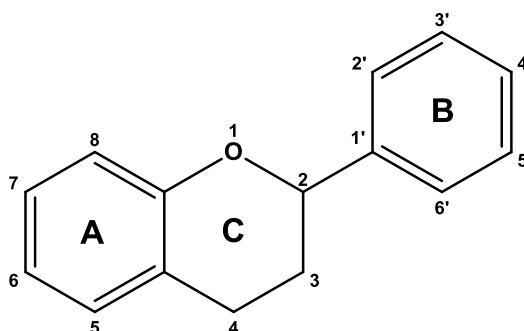
Nas últimas décadas houve um aumento do interesse pelos estudos com os flavonoides. Inicialmente, alimentados pela reconhecida importância de consumir frutas e legumes para alcançar melhor saúde, os pesquisadores se interessaram em saber como esses compostos sintetizados por plantas poderiam alterar a biologia animal e se eles podiam realmente fazer o corpo humano funcionar melhor (PEREZ-VIZCAINO; FRAGA, 2018).

Os flavonoides são produtos naturais resultado do metabolismo secundário de plantas e fungos, sendo considerada a maior classe, com mais de 10 mil estruturas conhecidas (AGATI et al., 2012). Nas plantas apresentam funções diversas, dentre elas, dar coloração as flores para atração de insetos polinizadores, podem estar envolvidas na filtração dos raios ultravioleta e na fixação de nitrogênio em vegetais maiores, como também podem agir como mensageiros químicos, reguladores fisiológicos e inibidores do ciclo celular (KABERA et al., 2014).

Estes podem ser encontrados em diversos alimentos como vinho, algumas frutas, incluindo as cítricas e legumes, o cacau, o chocolate, entre outros (PEREZ-VIZCAINO; FRAGA, 2018). Já foi relatado que dietas ricas em flavonoides estão associadas a diminuição de doenças cardiovasculares, uma vez que esses alimentos podem ajudar a prevenir doenças como aterosclerose, a reduzir os níveis de colesterol total no sangue e também produzir efeito antioxidante, diminuindo assim os riscos de doença coronariana (XU; YUAN; CHANG, 2007).

Quimicamente, os flavonoides podem ser definidos como compostos de 15 átomos de carbono (Figura 4), formados por dois anéis aromáticos (A e B) ligados entre si através de três carbonos, geralmente formando um heterociclo oxigenado (anel C), apresentando então, um anel benzopirano como núcleo estrutural básico (OTEIZA et al., 2017).

Figura 4 – Estrutura básica de um flavonoide.

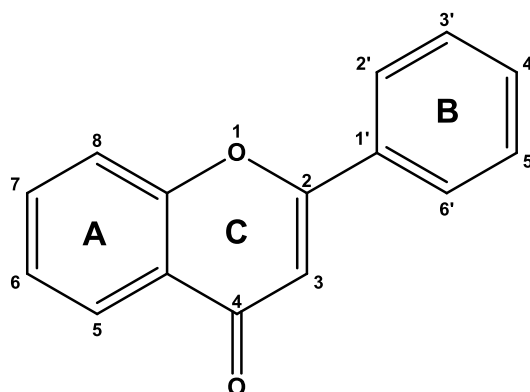


Anéis aromáticos (**A** e **B**), anel heterocíclico pirano (**C**).

Fonte: Autor, 2018.

O anel C é característico de cada subfamília de flavonoide, podendo haver variação número de substituintes, na localização e no tipo destes. Desta forma, eles podem ser divididos em flavanas, flavonóis, flavanonas, flavanonois, flavanas, antocianidinas e isoflavonoides, a depender destas substituições (RAFFA et al., 2017).

Dentre a grande família dos flavonoides, as flavonas (Figura 5) têm sido consideravelmente exploradas, uma vez que compreendem um dos maiores grupos. Elas são caracterizadas pela presença de uma ligação dupla entre C-2 e C-3 e a ligação do anel B a C através do carbono 2 (JIANG; DOSEFF; GROTEWOLD, 2016).

Figura 5 – Estrutura básica de uma flavona.

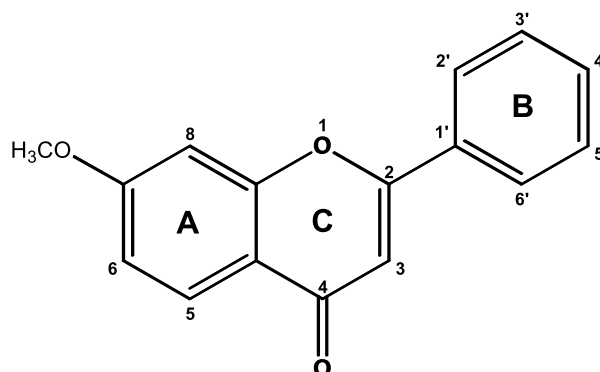
Fonte: Autor, 2018.

Todas as classes de flavonoides exibem uma grande variedade de atividades biológicas já relatadas, entre elas pode-se citar anti-inflamatória (GUARDIA et al., 2001; ZHANG; TSAO, 2016), antimicrobiana (ALCARAZ et al., 2000; CUSHNIE; LAMB, 2005; CAMARGO et al., 2017), antioxidante (CHEN; TAIT; KITTS, 2017), antialérgica (HAVSTEEN, 1983; MLCEK et al., 2016), antitumoral (CABRERA et al., 2007; MASUELLI et al., 2017), citotóxica (MICELI et al., 2016), antidiabética (VINAYAGAM; XU, 2015) e espasmolítica em vários músculos lisos (YANG et al., 2014; BROWN et al., 2016; LIU et al., 2018; QIU et al., 2017; VASCONCELOS et al., 2015; CARREIRO et al., 2017; FERREIRA, 2018).

Os flavonoides isolados de *Z. brasiliensis* apresentaram diversas atividades biológicas, como a isoorientina-3-O-metiléter e isovitexina que apresentaram atividade antioxidante (KUMAR et al., 2008), ononina que além de atividade antioxidante (YU et al., 2005), possui atividade anti-inflamatória (DONG et al., 2017), inibidora da enzima lactato desidrogenase (LI et al., 2017), antifibrótica (KAUR et al., 2017), cicatrizadora de feridas (ÖZ et al., 2018) e vasorrelaxante (ZHANG et al., 2018). A 5-hidroxi-7-metoxiflavona apresentou efeito anticâncer (BHARDWAJ et al., 2016), antialérgico (TEWTRAKUL; SUBHADHIRASAKUL; KUMMEE, 2008) e anti-inflamatório (CHO et al., 2004). A 5,7-dimetoxiflavona, por sua vez, apresentou atividade antitumoral (WEN; WALLE; WALLE, 2005; WEN; WALLE, 2005; TSUJI; WALLE, 2006; WEN; WALLE, 2007; LI; ZHANG; WANG, 2017; BAE et al., 2018), antiviral (SOOKKONGWAREE et al., 2006), anticolinesterásica (SAWASDEE et al., 2009), melanogênica (KANG et al., 2011), antiobesidade por suprimir a adipogênese

(SONG et al., 2016), anti-inflamatória (SAE-WONG et al., 2011), antipirética (PANTHONG et al., 1989), antioxidante (KANG et al., 2011; KIM et al., 2012), anti-osteoartrite (KOBAYASHI et al., 2018), antimutagênica (AZUMA et al., 2011), anti-inflamatória (KIM et al., 2012), vasorrelaxante em aorta de rato (TEP-AREENAN; SAWASDEE; RANDALL, 2010; FIGUEIREDO, 2018), espasmolítica em íleo e traqueia de cobaia (FIGUEIREDO, 2018) e tocolítica em ratas (FERREIRA, 2018). Já para a 7-metoxiflavona (7-MF), produto-teste deste estudo (Figura 6), foi relatado na literatura um efeito quimioprotetor (TA; WALLE, 2007), tripanossomicida (AMBROZIN et al., 2008), antinociceptivo em camundongos (SILVA et al., 2013) e tocolítica em ratas por inibir as contrações fásicas induzidas por ocitocina e por carbacol (FERREIRA, 2018).

Figura 6 – Estrutura química da 7-metoxiflavona.



Fonte: Autor, 2018.

2.6 Contração e relaxamento do músculo liso uterino

O útero é um órgão oco, piriforme, composto por várias camadas: o endométrio, que realiza o revestimento interno; o miométrio, uma espessa camada muscular média e uma camada serosa. Entre as diversas funções fisiológicas desempenhadas pelo útero, pode-se citar a importância nos processos de transporte do espermatozoide para a ovulação e também a implantação do embrião (AGUILAR; MITCHELL, 2010).

O miométrio está disposto de maneira que as forças contráteis podem ser exercidas em qualquer direção, permitindo que este assuma praticamente qualquer

forma e consiga aumentar de tamanho para abrigar o feto de maneira adequada (GRUBER; O'BRIEN, 2011; SOUZA et al., 2017).

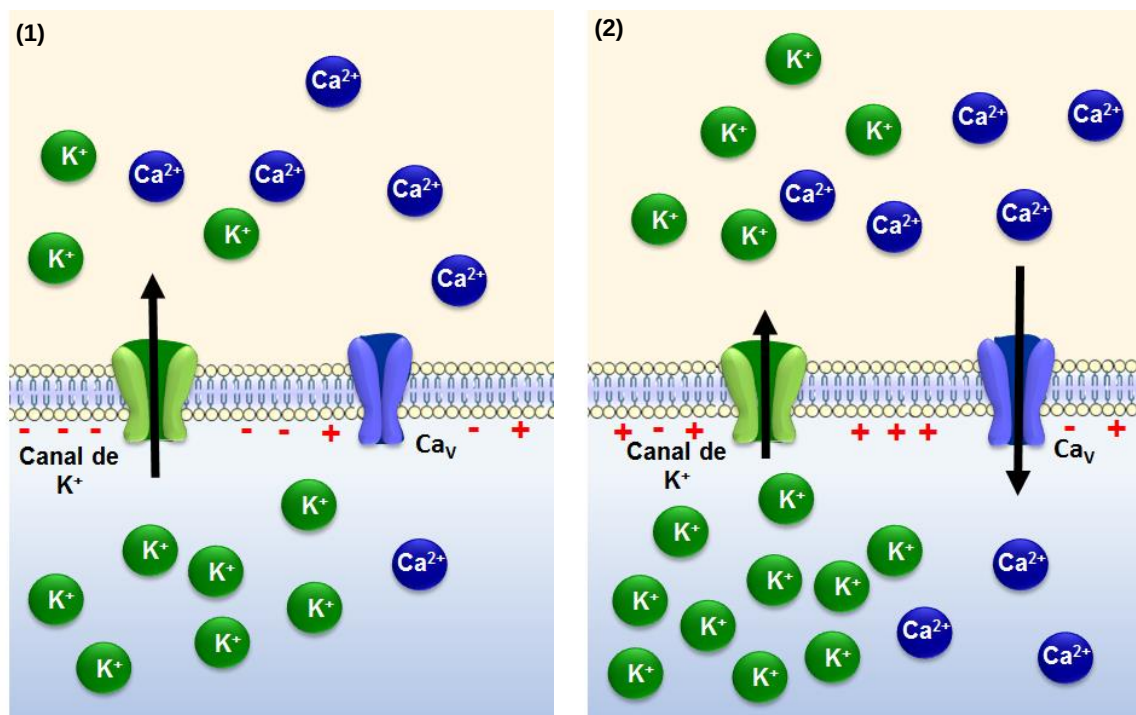
As fibras musculares uterinas, semelhantemente a outros músculos lisos são compostas de células fusiformes, uninucleadas e estas se apresentando centralmente. Geralmente, o diâmetro médio é de 2-10 μm e o comprimento de algumas centenas de μm . Estas células geralmente estão imersas em uma matriz extracelular composta principalmente por colágeno, com a finalidade de facilitar a transmissão das forças contráteis (ALBERTS et al., 1989).

Podendo se organizar de duas maneiras, essas fibras uma vez estando orientadas no mesmo sentido do órgão, são denominadas de camada longitudinal, enquanto que se estiverem dispostas concentricamente ao eixo longitudinal, são denominadas de camada circular. A contração da camada longitudinal faz com que o órgão se dilate, enquanto a contração da camada circular faz com que este se alongue, alternando a contração e relaxamento destas camadas, o órgão exerce suas funções (CSAPO, 1962; GRUBER; O'BRIEN, 2011).

A célula muscular lisa uterina apresenta um potencial de repouso entre -35 e -80 mV (SANBORN, 2000), uma vez que ocorre a despolarização desta, ou seja, alteração do potencial de membrana, deixando-o menos negativo em relação ao exterior, tem-se um acoplamento eletromecânico de contração (REMBOLD, 1996; WRAY et al., 2015). Um exemplo pode ser o aumento da concentração extracelular de potássio, diminuindo o efluxo deste, gerando seu acúmulo no interior da célula e consequente despolarização (Figura 7).

Outra maneira de ocasionar a contração da musculatura lisa uterina é através do acoplamento farmacomecânico (Figura 8). Neste caso, o agonista se liga ao receptor acoplado à proteína G (GPCR) desencadeando uma via de sinalização que também culminará com o aumento da concentração citosólica de Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_c$). Algumas substâncias exercem seu mecanismo contrátil desta maneira, por exemplo, a ocitocina se ligando ao seu receptor OT, bem como as prostaglandinas E_2 e $\text{F}_{2\alpha}$ ($\text{PGF}_{2\alpha}$) se ligando aos seus receptores EP_1 e FP, respectivamente (BERNAL, 2007; OTAIBI, 2014).

Figura 7 – Mecanismo de acoplamento eletromecânico da contração muscular lisa uterina pelo aumento da concentração extracelular de K^+ .



(1) Durante o repouso, o gradiente químico favorece o efluxo de íons K^+ através de seus canais de vazamento, deixando a região perimembranar interna das células musculares lisas polarizadas negativamente; (2) um aumento na $[K^+]_e$ diminui o efluxo desses íons, havendo acúmulo de cargas positivas na região perimembranar interna; a célula despolariza, ocasionando a ativação dos Ca_v que leva ao influxo de Ca^{2+} com consequente contração.

Fonte: FERREIRA, 2018.

Uma vez o agonista tendo se ligado ao seu receptor, este sofre mudança conformacional ganhando afinidade pelas proteínas G_q ou G_{11} , estas quando inativas são compostas por um heterotrímero (subunidades α , β e γ) ligado ao difosfato de guanosina (GDP). Ao serem ativadas, perdem a afinidade pelo GDP e ganham pelo GTP (trifosfato de guanosina), que devido ao impedimento estérico, gera a dissociação da subunidade α ligada ao GTP que ativa a fosfolipase $C\beta 1$ ($PLC\beta 1$). Esta irá clivar o fosfolípido de membrana 4,5-bisfosfato de fosfatidil inositol (PIP_2) em 1,4,5-trisfosfato de inositol (IP_3) e diacilglicerol (DAG). O IP_3 se liga ao seu receptor (IP_3R) no retículo sarcoplasmático (RS), induzindo a liberação de Ca^{2+} , que por sua vez, induz a liberação de mais íons Ca^{2+} , através da sua ligação no receptor de rianodina (RyR) também presente no RS. Uma vez aumentado no citosol, o Ca^{2+} induz a translocação da proteína cinase C (PKC) para a membrana plasmática, onde

é ativada pelo DAG, podendo então realizar fosforilações nas proteínas-alvo específicas, a exemplo dos canais de cálcio dependentes de voltagem (Ca_v), ativando-os e promovendo o influxo de Ca^{2+} , aumentando ainda mais a concentração deste íon no citosol (SANBORN; WANG; DODGE, 1998; BERRIDGE, 2008; BERRIDGE, 2012).

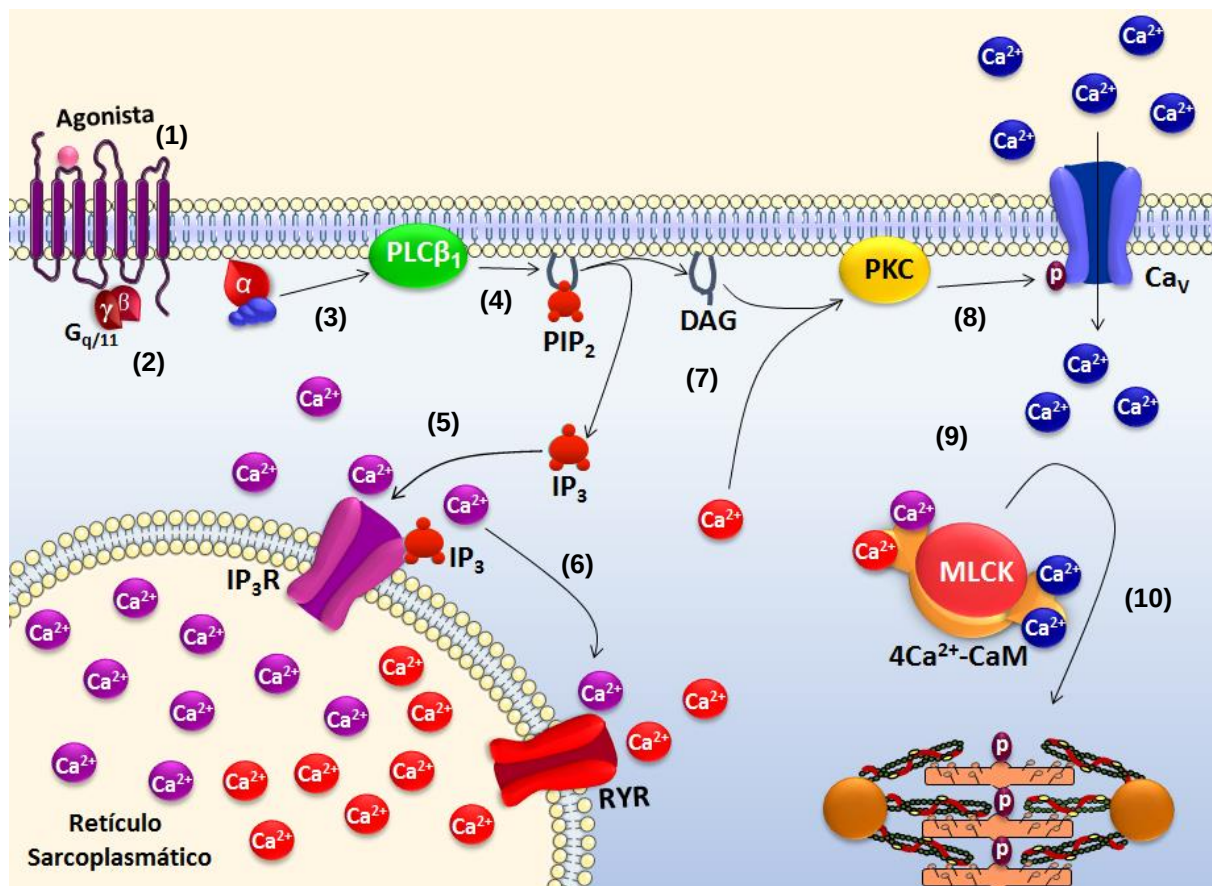
O aumento da $[\text{Ca}^{2+}]_c$ independente do mecanismo (eletro ou farmacomecânico) levará a ligação destes íons com a calmodulina (CaM) na proporção 4:1, ativando a cinase da cadeia leve da miosina (MLCK) que irá fosforilar o resíduo 19 da serina na cadeia leve da miosina, permitindo a ligação entre os filamentos de actina e miosina, ocasionando a contração (SHOJO; KANEKO, 2001) (Figura 8).

As prostaglandinas, membros da família dos eicosanoides, também são de extrema importância na regulação da contratilidade uterina. Trata-se de mediadores lipídicos produzidos pelo útero, pela membrana fetal e pela placenta, com a capacidade de modular as contrações uterinas (MITCHELL et al., 1995). A ligação do derivado prostanoide no seu receptor específico pode desencadear no útero tanto respostas contráteis quanto relaxantes (BRODT-EPPLEY; MYATT, 1999).

A síntese destes prostanoides pode se dar por aumento da $[\text{Ca}^{2+}]_c$ que ativa a fosfolipase A_2 (PLA_2), e irá clivar fosfolipídios de membrana (fosfatidilcolina e fosfatidiletanolamina) liberando o ácido araquidônico (AA), um substrato para as enzimas ciclo-oxigenases (COXs), em especial a 1 e a 2, que irão convertê-lo em prostaglandina G_2 (PGG_2). Em seguida, esta é transformada em prostaglandina H_2 (PGH_2), que sofre ação da sintase de prostaglandina E_2 gerando a PGE_2 , bem como da sintase de prostaglandina $\text{F}_{2\alpha}$, formando a $\text{PGF}_{2\alpha}$, os principais eicosanoides contráteis da musculatura lisa uterina (Figura 9) (SMYTH; GROOSER; FITZGERALD, 2012; BERRIDGE, 2012).

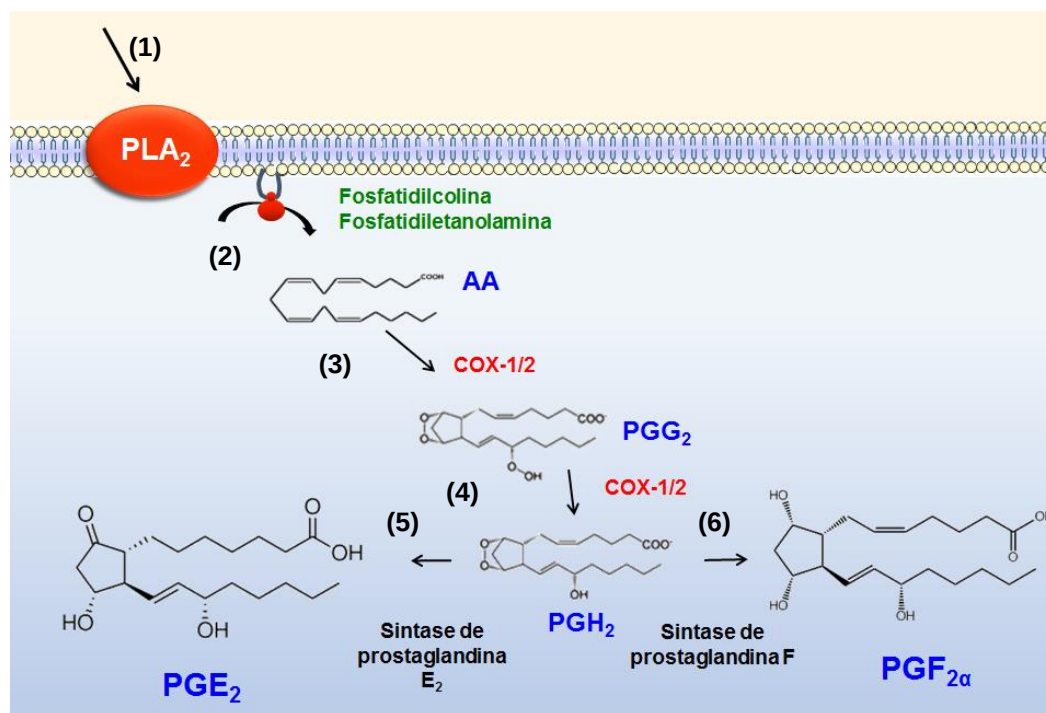
Por conseguinte, a PGE_2 e a $\text{PGF}_{2\alpha}$ irão se ligar aos seus receptores EP_1 e FP , respectivamente, que por serem GPCRs e acoplarem as proteínas G_q e G_{11} , desencadeiam a via $\text{PLC}\beta_1\text{-IP}_3\text{-Ca}^{2+}$, que culminará na contração muscular. Desta forma, substâncias que inibem a produção destes prostanoides, como os anti-inflamatórios não esteroidais, são muito utilizados na terapêutica para o tratamento da dismenorreia, por exemplo (CARSTEN; MILLER, 1977; MOLNAR; HERTELENDY, 1990; BRODT-EPPLEY; MYATT, 1999; BERNAL, 2003).

Figura 8 – Mecanismo farmacomecânico da contração muscular lisa uterina pela ativação do sistema efetor $G_{q/11}$ - $PLC\beta_1$.



(1) O agonista se liga ao seu receptor do tipo GPCR na membrana plasmática; (2) As proteínas $G_{q/11}$ trocam GDP por GTP na sua subunidade α (não mostrado na figura), tornando-se ativa; (3) A subunidade $\alpha_{q/11}$ -GTP ativa a enzima $PLC\beta_1$; (4) A $PLC\beta_1$ cliva o fosfolípido de membrana PIP_2 em IP_3 e DAG; (5) O IP_3 migra pelo citoplasma e ativa o IP_3R presente na membrana do RS, liberando o Ca^{2+} dos estoques; (6) O Ca^{2+} liberado ativa o RyR , fazendo com que mais Ca^{2+} seja liberado para o citoplasma; (7) O Ca^{2+} que foi liberado, juntamente com o DAG ativam a PKC; (8) A PKC ativada fosforila os Ca_v promovendo o influxo de Ca^{2+} através dos mesmos; (9) O aumento da $[Ca^{2+}]_c$ aumenta a afinidade pela CaM formando o complexo $4Ca^{2+}$ - CaM e ativando a MLCK; (10) A MLCK ativada fosforila a MLC, esta se torna ativa e interage com os filamentos de actina, desencadeando a contração do músculo liso. As definições das abreviaturas estão presentes na lista de abreviaturas e no texto.

Fonte: FERREIRA, 2018.

Figura 9 – Síntese dos principais eicosanoides contráteis do útero.

(1) Um estímulo ativa a PLA₂; (2) PLA₂ cliva fosfolipídios de membrana liberando o AA; (3) o AA é metabolizado pelas COXs-1/2 produzindo PGG₂; (4) PGG₂ é metabolizada pelas COXs-1/2 produzindo PGH₂; (5) PGH₂ é metabolizada pela sintase de PGE₂ produzindo PGE₂; (6) PGH₂ é metabolizada pela sintase de PGF_{2α} produzindo PGF_{2α}.

Fonte: Autor, 2018.

Na musculatura lisa também ocorre um fenômeno conhecido como "sensibilização ao Ca²⁺", nestes casos, mesmo na ausência de altas concentrações deste íon, a contração se mantém. Situações como o aumento da concentração extracelular de potássio ([K⁺]_e) ou a ligação de um agonista ao seu receptor acoplado as proteínas G_{12/13} poderá ocasioná-la (SAKURADA et al., 2003).

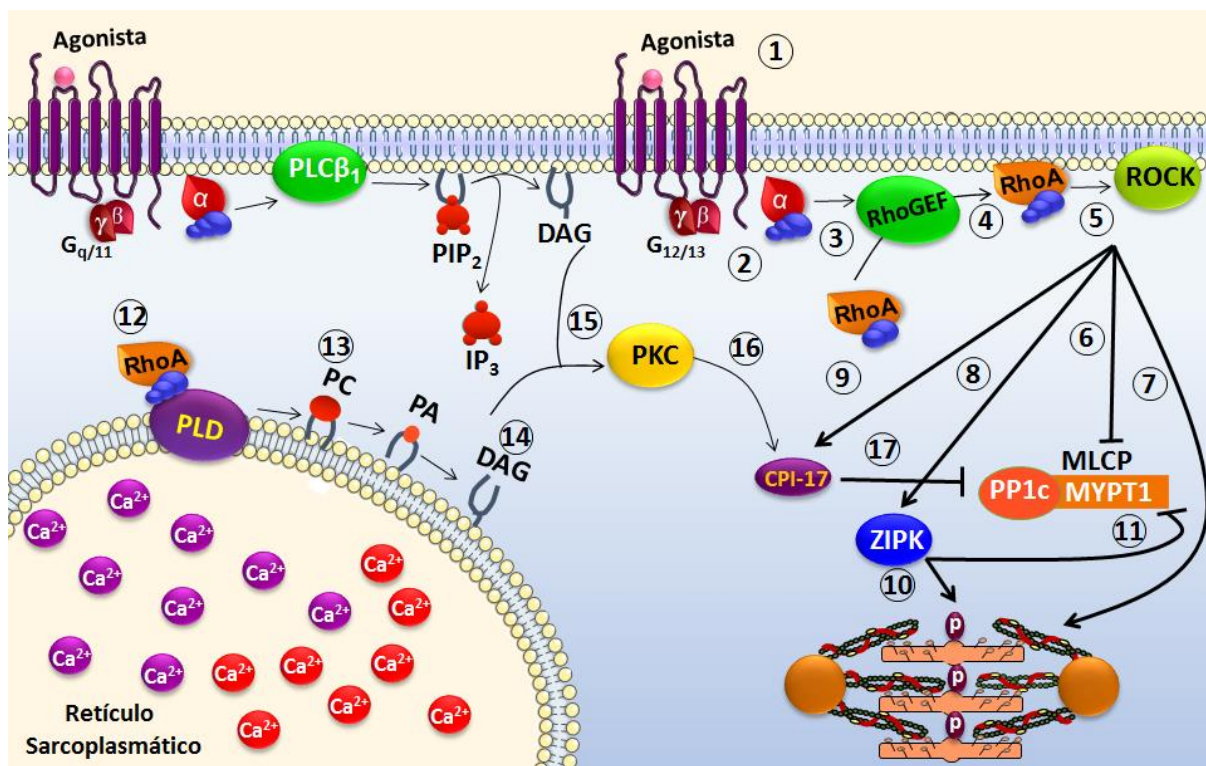
Esta via envolve diversas proteínas cinases, em especial a proteína RhoA e o seu sistema efetor. A RhoA faz parte da grande família das proteínas Rho que significa proteína homologa a RAS (RAS homology), apresentam mais de 10 subtipos diferentes, sendo citadas de A-D (RhoA, RhoB, RhoC e RhoD), além de Rho GTPase 1–3 (RND1, RND2 e RDN3), proteína relacionada com RAS (RAC1 e RAC2), proteína de ligação ao GTP no ciclo de divisão celular 42 (CDC42), Rho F em filopodia (RIF) também conhecida como RhoF, além de Rho Q (RhoQ) também

conhecida como TC10 e fatores de ADP-ribosilação (ARF1 e ARF6). Estas proteínas estão envolvidas em funções diversas como transcrição gênica, polimerização da actina e dá-se um destaque especial para a contração da musculatura lisa (LARTEY; BERNAL, 2009).

A RhoA é uma proteína G monomérica, também chamada de pequena proteína G. Na musculatura lisa, a ativação desta pode ocorrer através de proteínas G heterotriméricas, como G_{12}/G_{13} (KOZASA et al., 1998; KLAGES et al., 1999). No estado inativo, a RhoA está ligada à proteína inibidora da dissociação do GDP (GDI). Ao ser ativada, pela subunidade α das proteínas G_{12}/G_{13} , esta proteína vai ativar o fator de troca de nucleotídeo guanina (GEF), que irá trocar GDP por GTP, levando-a a ativar a sua respectiva proteína cinase, proteína cinase associada à Rho, ou Rho cinase (ROCK), que irá fosforilar a subunidade de ligação à miosina (MYPT1) da fosfatase da cadeia leve da miosina (MLCP), impedindo-a de expor seu sítio catalítico (PP1c), tornando-a inativa. Dessa forma, a cadeia leve regulatória da miosina (rMLC) não pode ser desfosforilada, mantendo a contração da musculatura lisa (FUKUMOTO et al., 1990; KITAZAWA; MAASUO; SOMLYO, 1991; BOURMEYSTER et al., 1992; HANCOCK; HALL, 1993; NODA et al., 1995; KIMURA et al., 1996).

A atividade da MLCP também é modulada negativamente pela CPI-17, um peptídeo que serve como substrato tanto para a ROCK como para a PKC (OZAKI et al., 2003; LARTEY et al., 2007). A RhoA-GTP também estimula a fosfolipase D (PLD), que cliva o fosfolípido de membrana, a fosfatidilcolina (PC), liberando o ácido fosfatídico (PA) que, através da ação da enzima fosfo-hidrolase, é desfosforilado a DAG, que como descrito anteriormente ativa a PKC (ETO et al., 1995; BERRIDGE, 2009). Esta ativação pela via da $PLC\beta_1$ sinergiza com a via da PLD (Figura 10), de modo que a PKC ativada de maneira sustentada pode fosforilar a CPI-17, aumentando assim sua potência inibitória sobre a PP1c, inibindo a ação da MLCP e mantendo a contração (SOMLYO; SOMLYO, 2003). A ROCK também pode ativar uma proteína cinase independente de Ca^{2+} , mais conhecida como proteína cinase de interação zíper (ZIPK). A ZIPK pode fosforilar diretamente a MLC, no entanto seu alvo principal é a MYPT1, a qual é fosforilada inibindo a ação da MLCP (MACDONALD et al., 2001; MURTHY, 2006).

Figura 10 – Mecanismo de manutenção da contração no músculo liso uterino pela ativação da via $G_{12/13}$ -ROCK.



(1) O agonista se liga ao seu receptor do tipo GPCR na membrana plasmática; (2) As proteínas $G_{12/13}$ trocam GDP por GTP nas suas subunidades α (não mostrado da figura), tornando-se ativas; (3) A subunidade $\alpha_{12/13}$ -GTP ativa o RhoGEF; (4) O RhoGEF faz com que a RhoA troque GDP por GTP, sendo translocada para a membrana; (5) A RhoA-GTP ligado estimula a sua cinase ROCK; A ROCK possui vários alvos: (6) Inibe a MLCP; (7) Fosforila a MLC; (8) Ativa a ZIPK; (9) Ativa a CPI-17; (10) A ZIPK fosforila diretamente a MLC; (11) A ZIPK fosforila a MLCP, inibindo-a; (12) A RhoA-GTP ligado estimula a PLD; (13) A PLD cliva o lípido de membrana PC em PA; (14) O PA é desfosforilado a DAG pela ação da enzima fosfo-hidrolase; (15) O DAG ativa a PKC, de maneira sustentada; (16) A PKC fosforila a CPI-17, ativando-a; (17) A CPI-17 inibe a ação da MLCP. Todos esses mecanismos favorecem o estado fosforilado a MLC e sua interação com os filamentos de actina, mantendo o músculo liso contraído. As definições das abreviaturas estão presentes na lista de abreviaturas e no texto.

Fonte: Modificado de Ferreira (2018).

O relaxamento muscular uterino também pode ocorrer via acoplamento farmacomecânico através, por exemplo, da ativação dos receptores adrenérgicos- β_2 , que estão acoplados à proteína G_s e quando a subunidade α está ligada ao GTP, ativa a ciclase de adenilil (AC) que irá hidrolisar e ciclar o trifosfato de adenosina (ATP), transformando-o em monofosfato cíclico de adenosina (cAMP), que por sua vez irá ativar a proteína cinase dependente de cAMP (PKA). Entre os principais alvos desta proteína estão o trocador Na^+/Ca^{2+} , promovendo o efluxo Ca^{2+} e o influxo

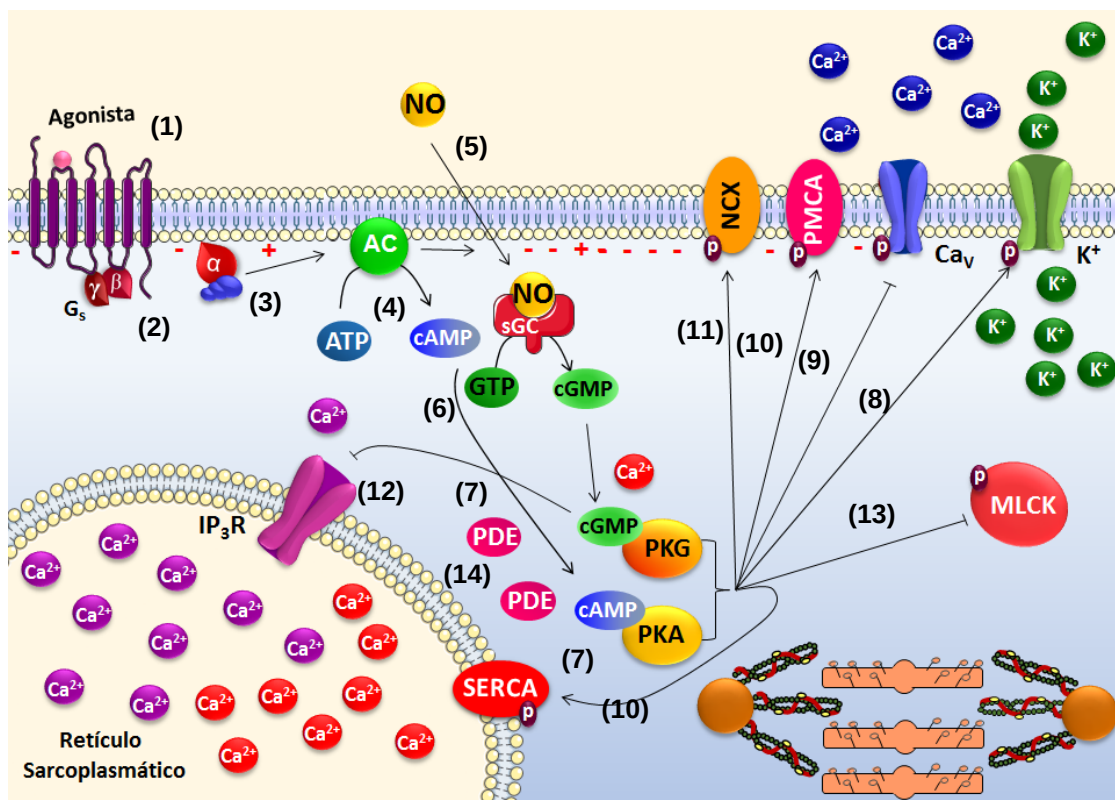
de Na^+ , com cinética 1:3; ativação da Ca^{2+} -ATPase da membrana plasmática (PMCA) e do retículo sarcoplasmático (SERCA), promovendo a extrusão de Ca^{2+} do meio intracelular e reestoque deste no retículo, respectivamente; ativação dos canais de K^+ , ocasionando hiperpolarização e bloqueio indireto de Ca_v , além de bloqueio indireto dos Ca_v . Cita-se também a inibição da MLCK, levando desta forma ao relaxamento muscular liso (MURTHY, 2006; TAYLOR et al., 2013) (Figura 11).

Outra via que pode levar ao relaxamento do músculo liso uterino é a via do óxido nítrico (NO), que foi descrita originalmente em vasos sanguíneos (PALMER; FERRIGE; MONCADA, 1987). Sendo conhecido como um fator relaxante derivado do endotélio/epitélio, o NO também é produzido nos nervos. Este, é sintetizado pela sintase do NO (NOS), presente nas células do miométrio (BULBUL et al., 2007), que converte L-arginina, na presença de alguns co-fatores como tetrahidrobiopterina (BH_4), fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina (NADPH), flavina adenina dinucleotídeo (FAD), flavina mononucleotídeo (FMN) e grupo heme (MONCADA; PALMER; HIGGS, 1991; FARREL; BLAKE, 1996) em L-citrulina e NO, que por ser um gás lipossolúvel atravessa a membrana da célula e se liga ao seu receptor, ciclase de guanilil solúvel (sCG), que ao ser ativado vai clivar e ciclicizar o GTP em monofosfato cíclico de guanosina (cGMP). Níveis aumentados de cGMP ativam a proteína cinase dependente de cGMP (PKG), estimulando-a a fosforilar os alvos semelhantes ao da PKA (Figura 11), anteriormente citados (TRAN; OHASHI; WATANABE, 2000; CHANG et al., 2010; JIN et al., 2011; KIM; LEE; RHYU, 2011).

A enzima fosfodiesterase (PDE) é responsável por clivar os nucleotídeos cíclicos (cAMP e cGMP), desta forma, substâncias que são inibidoras de PDE também são promissores relaxantes da musculatura lisa, uma vez que ocorrerá o aumento destes nucleotídeos cíclicos e, conseqüente, ativação das suas respectivas proteínas cinases que exercerão seus efeitos anteriormente citados (Figura 11) (MIYAHARA et al., 1995).

Existem onze isoformas de PDE em mamíferos, e estas foram classificadas em três grupos de acordo com a especificidade dos substratos. Por exemplo, as PDEs 4, 7 e 8 hidrolisam apenas cAMP; as 5, 6 e 9 hidrolisam apenas cGMP; e 1, 2, 3, 10 e 11 apresentam especificidade dual, agindo tanto em cAMP quanto cGMP (LEROY et al., 1985; SETTER et al., 2005; CONTI; BEAVO, 2007). Em útero de rata já foi relatado a presença de PDE-5 (BUHIMSCHI et al., 2004).

Figura 11 – Mecanismo do relaxamento no músculo liso uterino induzido pelas vias efetoras do cAMP e cGMP.



(1) O agonista se liga ao seu receptor do tipo GPCR na membrana plasmática; (2) a proteína G_s troca GDP por GTP na sua subunidade α (processo não mostrado na figura), tornando-se ativa; (3) a subunidade $G_{\alpha s}$ -GTP ativa a AC; (4) a AC converte o ATP em cAMP; (5) o NO gerado tanto dos nervos como das células epiteliais estimula a atividade da sGC; (6) a sGC converte o GTP em cGMP; (7) os nucleotídeos cíclicos, cAMP e cGMP, ativam suas respectivas proteínas cinases, PKA e PKG. Ambas as proteínas cinases fosforilam vários substratos: (8) ativam os canais de K^+ ; (9) inibem os Ca_v ; (10) aumentam a atividade da SERCA e da PMCA; (11) ativam o NCX; (12) A PKG inibe os IP_3R . Todos esses mecanismos diminuem a $[Ca^{2+}]_i$; (13) inibem a MLCK, reduzindo sua afinidade pelo complexo $4Ca^{2+}$ -CaM. Todos esses mecanismos impedem a fosforilação da MLC e, conseqüentemente, a interação dos filamentos de miosina com os de actina, promovendo o relaxamento do músculo liso. (14) Uma inibição das PDEs leva ao aumento do nucleotídeos cíclicos, também ocasionando relaxamento. As definições das abreviaturas estão presentes na lista de abreviaturas e no texto.

Fonte: Ferreira, 2018.

2.7 Desordens que acometem a musculatura lisa uterina

A principal função uterina está relacionada com a geração de uma nova vida. Mensalmente, este órgão se prepara para uma futura gravidez, e em caso de ausência da concepção, ocorre a descamação da camada endometrial com eventual sangramento, denominado de menstruação. Porém, alterações da contratilidade

muscular lisa uterina, em especial o excesso desta, podem ocasionar alguns quadros clínicos que necessitam de tratamento, como a dismenorreia, geralmente associada à síndrome de tensão pré-menstrual (STPM) e/ou o transtorno disfórico pré-menstrual (TDPM) (SMITH, 2018).

A dismenorreia, também conhecida como cólica menstrual, é caracterizada por dor na região inferior do abdômen (FRENCH, 2005; LENTZ et al., 2012), podendo ser classificada em primária, quando a mulher apresenta uma anatomia pélvica normal e as cólicas se restringem a aparecer próximo ao período menstrual (NGUYEN et al., 2015), ou secundária que está geralmente relacionada com a presença de condições pélvicas patológicas como endometriose, ovários policísticos, miomas uterinos ou pólipos (ANDERSCH; MILSOM, 1982; HARLOW, 1996).

Acompanhado às cólicas uterinas, algumas mulheres apresentam um grupo de sintomas físicos e psicológicos como dores nas costas, dor de cabeça, fadiga, ganho de peso, náuseas e vômitos, onde nestes casos, denomina-se o quadro de STPM (ENDERSON, 2000; FRENCH, 2005). Já os sintomas psicológicos, comportamentais, somáticos cíclicos, previsíveis e que são agravados na fase lútea tardia do ciclo menstrual, melhorando após o início da menstruação, incluindo principalmente alterações de humor, depressão, ansiedade, irritabilidade e raiva, são denominados, por sua vez, de TDPM, podendo então ser considerado um agravamento do STPM (RAPKIN; WINER, 2009; EPPERSON et al., 2012; YONKERS; SIMONI, 2018).

É citada na literatura, entre as principais causas para esses quadros, a variação hormonal feminina, a deficiência de vitaminas, o estresse, o tabagismo, determinados hábitos alimentares e ainda a falta de exercícios físicos (CERIN et al., 1993; DAWOOD, 2006).

Arafa et al. (2018) relataram em um estudo com mais de 4 mil mulheres em idade fértil (12-25 anos), que 92% apresentaram quadros de dismenorreia, 86,3% de STPM e 81% manifestaram ambos os quadros. Além de atingir uma grande parcela da população feminina, os principais problemas acarretados por essas condições clínicas estão nas adversidades comportamentais, que acabam afetando as atitudes individuais de cada pessoa, bem como a sua relação interpessoal com a família e amigos, a interação social, a prática de exercício físico, o desempenho escolar, que neste caso inclui as ausências nas aulas, baixa concentração e não execução das

atividades que são enviadas para casa. Também são citados a diminuição da produtividade no trabalho e os altos gastos com medicamentos (CAKIR et al., 2007; BALLAGH; HEYL, 2008).

A desregulação da contratilidade uterina durante a gravidez ou durante o parto também podem ter implicações clínicas como o trabalho de parto prematuro, que é a maior causa de mortalidade materna e pré-natal no mundo ocidental, bem como um dos principais responsáveis por problemas de desenvolvimento infantil, principalmente devido à imaturidade dos órgãos, bem como as chances de distúrbios do neurodesenvolvimento, como paralisia cerebral, deficiência intelectual, deficiências auditivas e de visão. Cerca de 15 milhões de recém-nascidos prematuros nascem todos os anos e as maiores taxas ocorrem na África e na América do Norte (SLATTERY; MORRISON, 2002; BLENCOWE et al., 2012; MWANIKI et al., 2012).

O aborto também pode ser um dos problemas ocasionados por alterações na contratilidade uterina. Trata-se de um quadro ainda muito recorrente, considerado a falha reprodutiva mais comum, sendo relatados que cerca de 40 abortos a cada mil mulheres ocorrem todos os anos (SEDGH et al., 2016; FRAZIER et al., 2018).

2.8 Tratamento das desordens que acometem a musculatura lisa uterina

A dismenorreia pode ser causada por fatores diversos, como anormalidades hormonais, deficiência de vitaminas, estresse, cigarro, falta de exercícios físicos, certos hábitos alimentares, entre outros (CERIN et al., 1993; DAWOOD, 2006).

Em alguns casos, o tratamento não farmacológico é o indicado incluindo mudanças de alimentação, prática de exercício físico, uma vez que este está associado com a diminuição da retenção de água e reações autonômicas que protegem contra desordens menstruais (JOHNSON; CARR-NANGLE; BERGERON, 1995), também a não utilização do cigarro, uma vez que a nicotina já é relatada como vasoconstritora, podendo diminuir o fluxo sanguíneo endometrial (PARAZZINI et al., 1994; JOHNSON; CARR-NANGLE; BERGERON, 1995; DALEY, 2009), podendo-se citar também a acupuntura e a ingestão de vitamina E (RYAN, 2017).

Uma vez que uma das principais causas da dismenorreia é o aumento da concentração de prostaglandinas, em especial $\text{PGF}_{2\alpha}$, que induz a contração uterina

e isquemia, ocasionando dor (LUMSDEN; KELLY; BAIRD, 1983; DELIGEOROGLOU, 2000; WANG et al., 2004), uma das classes de medicamentos mais utilizados são os anti-inflamatórios não esteroidais, como o ácido mefenâmico e ibuprofeno (RYAN, 2017).

A utilização de contraceptivos orais, em especial nos casos de dismenorreia secundária, é muito indicada, porém efeitos colaterais diversos são relatados, como retenção de água e náusea, diminuindo então a adesão ao tratamento (HARADA et al., 2008 SUN et al., 2016;).

Em condições de STPM e TDTM também podem ser prescritos tratamento com psicotrópicos, como a classe dos inibidores da recaptação da serotonina, tais como paroxentina, sertralina, fluoxentina, etc (YONKERS et al., 2015).

O tratamento para o trabalho de parto prematuro (TPP) não farmacológico envolve a hidratação por via intravenosa (IV) de soro glicosado. Quanto ao tratamento farmacológico há mais de 50 anos são utilizadas drogas tocolíticas na tentativa de prevenir partos prematuros, entretanto apenas duas foram desenvolvidas com esta finalidade: o atosiban (antagonista do receptor de ocitocina) e a ritodrina (agonista beta-adrenérgico). Além disso, outros medicamentos que também são utilizados para inibir o TPP, como por exemplo, o sulfato de magnésio, os inibidores de prostaglandinas e os doadores de óxido nítrico carecem de comprovação quanto à sua eficácia ou são responsáveis por efeitos colaterais importantes tanto para mãe quanto para o feto (BITTAR, ZUGAIB, 2009; DIAS, 2017).

Quanto à gestante com ameaça de abortamento algumas intervenções não farmacológicas, como repouso no leito e abstinência sexual são indicadas. Em nível farmacológico, alguns medicamentos como antiespasmódicos do tipo fenoterol e a isoxsuprina, agonistas adrenérgicos- β_2 , são eventualmente prescritos. Também a progesterona, tais como a progesterona natural, o acetato de medroxiprogesterona, o caproato de 17-alfa-hidroxi-progesterona e a didrogesterona são utilizadas para manter o útero relaxado e também aumentar a concentração plasmática do fator bloqueador dos linfócitos, que é imunomodulador, antiabortivo e melhorar a vascularização uterina (ALVES et al., 2010).

Sabendo então que a utilização de agentes tocolíticos podem ser úteis no tratamento dessas e outras condições clínicas, aliado ao fato de que diversos flavonoides já exibiram efeito sobre a musculatura lisa (YANG et al., 2014; BROWN

et al., 2016; LIU et al., 2018; QIU et al., 2017), em especial, a 7-MF, que apresentou efeito tocolítico *in vitro* (FERREIRA, 2018), resolveu-se avaliar seu possível mecanismo de ação tocolítica.

3.1 Gerais

Investigar o mecanismo de ação tocolítica *in vitro* de 7-metoxiflavona (7-MF), isolada do extrato etanólico bruto obtido das partes aéreas de *Zornia brasiliensis* (ZB-EtOH_{PA}) em ratas.

3.2 Específicos

- Caracterizar o mecanismo de ação tocolítica da 7-MF avaliando, em nível funcional, a participação de:
 - Canais de Ca²⁺ dependentes de voltagem
 - Canais de K⁺
 - Receptores adrenérgicos-β
 - Ciclo-oxigenases
 - Via do NO
 - Fosfodiesterases
 - RhoA/Rho cinase
 - Calmodulina

4.1 Material

4.1.1 Material botânico

As partes aéreas de *Zornia brasiliensis* foram coletadas no município de Serra Branca-PB em setembro de 2009. Esta espécie foi identificada pela Profa. Dra. Maria de Fátima Agra, do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal da Paraíba (UFPB). Uma exsicata dessa espécie encontra-se depositada no Herbário Professor Lauro Pires Xavier, do Centro de Ciências Exatas e da Natureza, da UFPB sob o código AGRA-6833.

4.1.2 Substância-teste

Para a realização desta pesquisa era utilizado o flavonoide 7-metoxiflavona (7-MF), cedido gentilmente pela equipe dos Professores Dr. Marcelo Sobral da Silva e Dr. Josean Fachine Tavares da Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos (PgPNSB) do Centro de Ciências da Saúde (CCS), da Universidade Federal da Paraíba (UFPB).

As partes aéreas de *Zornia brasilienses* foram secas em estufa com ar circulante à temperatura de 45 °C durante 72 horas. Após a secagem, o material foi pulverizado em moinho mecânico, obtendo-se o pó. Em seguida, o pó foi submetido a uma maceração exaustiva com etanol (EtOH) 95% por 72 horas, em macerador de aço inoxidável, sendo esse processo repetido por quatro vezes, obtendo-se a solução extrativa. A solução extrativa foi concentrada sob pressão reduzida, em evaporador rotativo a uma temperatura de 40 °C para eliminação do solvente, obtendo-se o extrato etanólico bruto (ZB-EtOH_{PA}), retirou-se uma alíquota que foi submetida a uma cromatografia líquida à vácuo (CLV) com o solvente diclorometano. A fração resultante desse processo foi concentrada em rotaevaporador, obtendo-se 20,0 g da fase diclorometano que por processos fitoquímicos resultou no isolamento de 7-metoxiflavona (7-MF).

4.1.3 Animais

Eram utilizadas ratas Wistar (*Rattus norvegicus*) virgens pesando $195,2 \pm 2,9$ g, provenientes do Biotério Prof. Thomas George do Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos (IPeFarM)/UFPB.

Antes dos experimentos os animais eram mantidos sob rigoroso controle alimentar com uma dieta balanceada a base de ração tipo *pellets* (Labina®) com livre acesso a água, com ventilação e temperatura (21 ± 1 °C) controladas e constantes, submetidos diariamente a um ciclo claro-escuro de 12 horas, sendo o período claro das 06 às 18 horas. Os experimentos eram realizados no período entre 8 e 20 horas. Todos os procedimentos experimentais eram realizados seguindo os princípios de cuidados com animais, submetidos e aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA (certidão 103/2017) da UFPB (Anexo 1).

4.1.4 Substâncias e reagentes

O cloreto de cálcio di-hidratado ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) e o cloreto de magnésio hexa-hidratado ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) foram adquiridos da Vetec (Brasil). A glicose ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$), o hidróxido de sódio (NaOH) e o ácido clorídrico (HCl) absoluto foram obtidos da Nuclear (Brasil). O bicarbonato de sódio (NaHCO_3), o cloreto de sódio (NaCl) e o cloreto de potássio (KCl) foram adquiridos da Fmaia (Brasil). Estas substâncias, exceto a glicose e o bicarbonato de sódio, eram dissolvidas e diluídas em água destilada para obtenção de cada solução-estoque e eram mantidas sob refrigeração.

A ocitocina foi obtida da União Química (Brasil), o dietilestilbestrol, o óleo de castor (Cremophor®), o cloreto de cério (CsCl), o cloridrato de *N*_ω-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME), indometacina, aminofilina e calmidazolium foram adquiridos da Sigma-Aldrich (Brasil). O N-(4-piridil)-4-(1-aminoetil) ciclohexano carboxamida (Y-27632) e o (S)-(-)-propranolol foram adquiridos da Cayman Chemical Company (EUA). Estas substâncias, exceto o Cremophor®, foram mantidas em um “freezer” à temperatura de -20 °C. Todas eram solubilizadas e diluídas em água destilada, exceto o dietilestilbestrol e o (S)-(-)-propranolol que foram dissolvidos em álcool etílico absoluto. A mistura carbogênica (95% de O_2 e 5% de CO_2) foi adquirida da White Martins (Brasil).

4.1.5 Soluções nutritivas

De acordo com os experimentos realizados eram utilizadas várias soluções nutritivas (ajustadas ao pH 7,4, com uma solução de HCl ou NaOH, 1 N), todas gaseificadas com carbogênio (95% de O₂ e 5% de CO₂) e mantidas a 32 °C, cujas composições estão descritas abaixo:

Composição da solução de Locke Ringer (REVUELTA; CATABRANA; HIDALGO, 1997) (mM): NaCl (154,0), KCl (5,6), MgCl₂ (2,1), CaCl₂ (2,2), glicose (5,6), NaHCO₃ (6,0).

Composição da solução de Locke Ringer nominalmente sem Ca²⁺ (REVUELTA; CATABRANA; HIDALGO, 1997) (mM): NaCl (154,0), MgCl₂ (2,1), glicose (5,6), NaHCO₃ (6,0).

4.1.6 Aparelhos

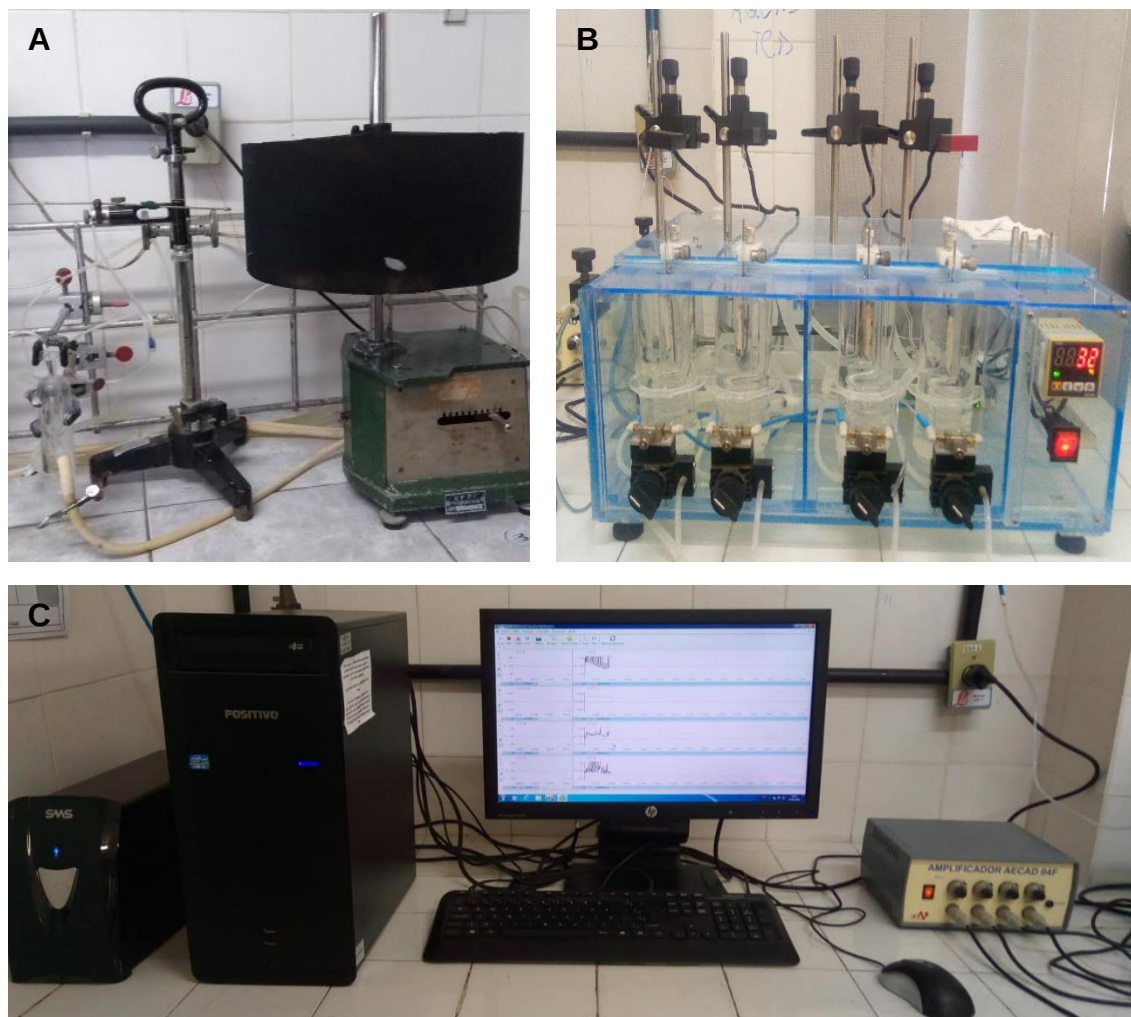
Para o registro das contrações isotônicas, os órgãos eram suspensos em cubas de banho para órgãos isolados (5 mL) e conectados a uma alavanca isotônica de inscrição frontal acoplados a cilindros esfumaçados de um quimógrafo (DTF, Brasil) (Figura 12A). A temperatura das cubas (32 °C) era controlada com bombas termostáticas (BANHO-MARIA AVS-BM, Brasil, ou POLYSTAT 12002, Cole-Palmer, EUA).

Para registrar as contrações isométricas, os órgãos eram suspensos em cubas de banho para órgãos isolados (6 mL) modelo BOI-04 e conectados a transdutores de força isométricos modelo TIM 05 acoplados a um amplificador modelo AECAD04F. Este, por sua vez, estava conectado a um sistema de aquisição digital com o software AQCAD versão 2.1.6 para aquisição dos dados e ANCAD para análise (Figura 12B e C). O sistema contém uma bomba termostática modelo BT-60 que controla a temperatura das cubas. Estes foram adquiridos da AVS Projetos (São Paulo, SP, Brasil).

Todas as substâncias eram pesadas em balança analítica modelo AG200 e os animais em balança semianalítica modelo BG4001, ambas da Gehaka (Brasil).

Os valores de pH eram verificados através de um pHmetro digital PG 2000 (GEHAKA, Brasil).

Figura 12 – Aparelhos utilizados nos experimentos *in vitro*.



A) Cilindro esfumaçado de um quimógrafo, **B)** sistema de banho para órgãos isolados composto por cubas de vidro, transdutores isométricos e bomba termostática, **C)** amplificador e sistema de aquisição digital.

Fonte: Autor, 2018.

4.2 Métodos

4.2.1 Preparação da solução-mãe da 7-MF para os ensaios farmacológicos

O flavonoide era solubilizado em Cremophor® e diluído em água destilada para obtenção da solução-estoque (10^{-2} M, 3% Cremophor® v/v) que era estocado a uma temperatura de 0 °C. A concentração do flavonoide era utilizada em múltiplos de 3, sendo a concentração submáxima 10^{-4} M e a máxima 3×10^{-4} M. Uma vez que na concentração submáxima o efeito observado ultrapassou 50% e na concentração máxima ultrapassou 70%, se fez necessário a determinação de uma curva concentração-resposta completa testando concentrações menores para verificar o zero e concentrações maiores para obter o efeito máximo ($E_{\max}$) do flavonoide.

4.2.2 Efeito tocolítico da 7-MF sobre as contrações tônicas induzidas por KCl ou por ocitocina em útero isolado de rata

As ratas eram tratadas 24 horas antes com dietilestilbestrol (0,1 mg/kg) por via subcutânea para sincronização hormonal do estro. Decorrido este tempo, eram eutanasiadas por decapitação com o auxílio de uma guilhotina. A cavidade abdominal era aberta com um corte longitudinal, o útero retirado e limpo de todo o tecido conectivo e adiposo. Em seguida os dois cornos uterinos eram separados por meio de uma incisão, abertos longitudinalmente e suspensos verticalmente em cubas de banho para órgãos isolados, contendo solução nutritiva de Locke Ringer, aquecidas à 32 °C e aeradas com carbogênio. Estes tecidos eram mantidos sob tensão de 1 g e permaneciam em repouso por 40 minutos, tempo necessário para perfeita estabilização da preparação. Durante este período a solução nutritiva era trocada a cada 10 minutos (Adaptado de REVUELTA; CANTABRANA; HIDALGO, 1997).

Após o período de estabilização, uma contração submáxima, registrada através de transdutores isométricos acoplados a um sistema de aquisição digital, era obtida com 60 mM de KCl para verificação da funcionalidade do órgão. Durante a fase tônica sustentada de uma segunda contração induzida por 60 mM de KCl ou por 10^{-2} UI/mL de ocitocina, o flavonoide era adicionado de maneira cumulativa à cuba em preparações diferentes.

O relaxamento produzido pelo flavonoide era expresso como a percentagem reversa da contração inicial induzida por KCl ou por ocitocina. A potência e a eficácia relaxante da 7-MF foram calculadas e avaliadas comparando-se os valores da concentração do flavonoide que promovia 50% do seu efeito máximo (CE_{50}) e do efeito máximo (E_{max}), respectivamente.

4.2.3 Avaliação da participação dos canais de cálcio dependentes de voltagem no efeito tocolítico da 7-MF em útero isolado de rata

4.2.3.1 Efeito tocolítico da 7-MF frente às contrações induzidas por cloreto de cálcio em meio despolarizante (KCl 60 mM) nominalmente sem Ca^{2+}

O órgão era montado como descrito no item anterior. Após o período de estabilização do órgão, a solução de Locke Ringer era substituída pela solução Locke Ringer nominalmente sem Ca^{2+} por um período de 30 minutos, em seguida era adicionado 60 mM de KCl causando uma despolarização de membrana. Após 10 minutos, era induzida uma curva concentração-resposta cumulativa ao $CaCl_2$. As contrações eram registradas através de uma alavanca isotônica de inscrição frontal em um cilindro esfumaçado de um quimógrafo. Após a obtenção da curva-controle, o flavonoide (em várias concentrações) era incubado e, na presença deste, era obtida uma segunda curva concentração-resposta cumulativa ao $CaCl_2$ (REVUELTA; CANTABRANA; HIDALGO, 1997).

Os resultados foram avaliados comparando-se a percentagem da resposta contrátil na presença do flavonoide com aquela obtida pela amplitude média da curva-controle na ausência do flavonoide.

4.2.4 Avaliação do envolvimento dos canais de potássio no efeito tocolítico produzido por 7-MF em útero isolado de rata

4.2.4.1 Efeito da 7-MF sobre as contrações tônicas induzidas por ocitocina na ausência e na presença de CsCl

O órgão era montado como descrito no item 4.2.2. Após o período de estabilização, era induzida uma contração com 60 mM de KCl para verificar a

funcionalidade deste. A preparação era lavada e após 15 minutos, uma contração era induzida por 10^{-2} UI/mL de ocitocina e sobre o componente tônico dessa contração era adicionado o flavonoide de forma cumulativa (curva-controle). Em experimento diferente, era adicionada à cuba 5 mM de CsCl, um bloqueador não seletivo dos canais de potássio (LATORRE et al., 1989) e após 20 min, na presença do bloqueador, era induzida uma contração com 10^{-2} UI/mL de ocitocina, e sob o componente tônico dessa contração era adicionado o flavonoide de forma cumulativa.

O relaxamento produzido por 7-MF foi expresso como a percentagem reversa da contração inicial induzida pelo agonista. Os valores de CE_{50} e de E_{max} do flavonoide foram calculados a partir das curvas concentrações-resposta na ausência e na presença do bloqueador.

4.2.5 Avaliação do envolvimento da via da ciclo-oxigenase no efeito tocolítico promovido por 7-MF em útero isolado de rata

4.2.5.1 Efeito da 7-MF sobre as contrações tônicas induzidas por ocitocina na ausência e na presença de indometacina

O útero era montado como descrito no item 4.2.2. Após o período de estabilização, era induzida uma contração com 60 mM de KCl para verificar a funcionalidade do órgão. A preparação era lavada e após 15 minutos, uma contração era induzida por 10^{-2} UI/mL de ocitocina e sobre o componente tônico dessa contração era adicionado o flavonoide de forma cumulativa (curva-controle). Em experimento diferente, era adicionado a cuba 10 μ M de indometacina, um inibidor da ciclo-oxigenase e após 20 minutos era induzida uma contração com 10^{-2} UI/mL de ocitocina e sobre o componente tônico era adicionado 7-MF de maneira cumulativa (SHI et al., 2012).

O relaxamento produzido pelo flavonoide foi expresso como a percentagem reversa da contração inicial induzida por ocitocina. Os valores de CE_{50} foram calculados a partir das curvas de relaxamento e a potência tocolítica do flavonoide foi comparada na ausência (controle) e na presença do inibidor.

4.2.6 Avaliação da participação da via adrenérgica no efeito tocolítico produzido por 7-MF em útero isolado de rata

4.2.6.1 Efeito da 7-MF sobre as contrações tônicas induzidas por ocitocina na ausência e na presença de (S)-(-)-propranolol

O útero era montado como descrito no item 4.2.2. Após o período de estabilização, era induzida uma contração com 60 mM de KCl para verificar a funcionalidade do órgão. A preparação era lavada e após 15 minutos, uma contração era induzida por 10^{-2} UI/mL de ocitocina e sobre o componente tônico dessa contração era adicionado o flavonoide de forma cumulativa (curva-controle). Em experimento diferente, era adicionado a cuba 300 nM de (S)-(-)-propranolol, um antagonista dos receptores adrenérgicos- β e após 20 minutos, uma contração era induzida com 10^{-2} UI/mL de ocitocina e sobre o componente tônico era adicionado 7-MF de maneira cumulativa (SHI et al., 2012).

O relaxamento produzido pelo flavonoide foi expresso como a percentagem reversa da contração inicial induzida por ocitocina. Os valores de CE_{50} foram calculados a partir das curvas de relaxamento e a potência tocolítica do flavonoide foi comparada na ausência (controle) e na presença do antagonista.

4.2.7 Avaliação do envolvimento da via do óxido nítrico no efeito tocolítico de 7-MF em útero isolado de rata

4.2.7.1 Efeito tocolítico da 7-MF sobre as contrações tônicas induzidas por ocitocina na ausência e na presença de L-NAME

O útero era montado como descrito no item 4.2.2. Após o período de estabilização, era induzida uma contração com 60 mM de KCl para verificar a funcionalidade do órgão. A preparação era lavada e após 15 minutos, uma contração era induzida por 10^{-2} UI/mL de ocitocina e sobre o componente tônico dessa contração era adicionado o flavonoide de forma cumulativa (curva-controle). Em experimento diferente, era adicionado à cuba 10^{-4} M de L-NAME, inibidor não seletivo de sintase do óxido nítrico (NOS) (MUNGLUE et al., 2012) e após 20 minutos era induzida uma contração com 10^{-2} UI/mL de ocitocina e sobre o

componente tônico dessa contração o flavonoide era adicionado de maneira cumulativa.

O relaxamento produzido pelo flavonoide foi expresso como a percentagem reversa da contração inicial induzida por ocitocina. Os valores de CE_{50} foram calculados a partir das curvas de relaxamento e a potência tocolítica do flavonoide foi comparada na ausência (controle) e na presença do inibidor.

4.2.8 Avaliação da participação da fosfodiesterase no efeito tocolítico produzido por 7-MF em útero isolado de rata

4.2.8.1 Efeito da 7-MF sobre as contrações tônicas induzidas por ocitocina na ausência e na presença de aminofilina

O útero era montado como descrito no item 4.2.2. Após o período de estabilização, era induzida uma contração com 60 mM de KCl para verificar a funcionalidade do órgão. A preparação era lavada e após 15 minutos, uma contração era induzida por 10^{-2} UI/mL de ocitocina e sobre o componente tônico dessa contração era adicionado o flavonoide de forma cumulativa (curva-controle). Em experimento diferente, era adicionado a cuba 10^{-4} M de aminofilina, um inibidor não seletivo de fosfodiesterase e após 20 minutos, uma contração era induzida com 10^{-2} UI/mL de ocitocina e sobre o componente tônico era adicionado 7-MF de maneira cumulativa (URUNO et al., 1974).

O relaxamento produzido pelo flavonoide foi expresso como a percentagem reversa da contração inicial induzida por ocitocina. Os valores de CE_{50} foram calculados a partir das curvas de relaxamento e a potência tocolítica do flavonoide foi comparada na ausência (controle) e na presença do inibidor.

4.2.9 Avaliação da participação da via da Rho cinase no efeito tocolítico produzido por 7-MF em útero isolado de rata

4.2.9.1 Efeito da 7-MF sobre as contrações tônicas induzidas por ocitocina na ausência e na presença de Y-27632

O útero era montado como descrito no item 4.2.2. Após o período de estabilização, era induzida uma contração com 60 mM de KCl para verificar a

funcionalidade do órgão. A preparação era lavada e após 15 minutos, uma contração era induzida por 10^{-2} UI/mL de ocitocina e sobre o componente tônico dessa contração era adicionado o flavonoide de forma cumulativa (curva-controle). Em experimento diferente, era adicionado a cuba 10^{-4} M de Y-27632, um inibidor da ROCK (TAHARA et al., 2002) e após 10 minutos, uma contração era induzida com 10^{-2} UI/mL de ocitocina e sobre o componente tônico era adicionado 7-MF de maneira cumulativa.

O relaxamento produzido pelo flavonoide foi expresso como a percentagem reversa da contração inicial induzida por ocitocina. Os valores de CE_{50} foram calculados a partir das curvas de relaxamento e a potência tocolítica do flavonoide foi comparada na ausência (controle) e na presença do inibidor.

4.2.10 Avaliação da participação da calmodulina no efeito tocolítico produzido por 7-MF em útero isolado de rata

4.2.10.1 Efeito da 7-MF sobre as contrações tônicas induzidas por ocitocina na ausência e na presença de calmidazolium

O útero era montado como descrito no item 4.2.2. Após o período de estabilização, era induzida uma contração com 60 mM de KCl para verificar a funcionalidade do órgão. A preparação era lavada e após 15 minutos, uma contração era induzida por 10^{-2} UI/mL de ocitocina e sobre o componente tônico dessa contração era adicionado o flavonoide de forma cumulativa (curva-controle). Em experimento diferente, era adicionado a cuba 10^{-4} M de calmidazolium, um inibidor da calmodulina, e após 20 minutos, uma contração era induzida com 10^{-2} UI/mL de ocitocina e sobre o componente tônico era adicionado 7-MF de maneira cumulativa (FERNANDEZ; CANTABRANA; HIDALGO, 1992; JOVANOVIĆ; GRBOVIĆ; TULIĆ; 1994).

O relaxamento produzido pelo flavonoide foi expresso como a percentagem reversa da contração inicial induzida por ocitocina. Os valores de CE_{50} foram calculados a partir das curvas de relaxamento e a potência tocolítica do flavonoide foi comparada na ausência (controle) e na presença do inibidor.

4.2.11 Análise estatística

Todos os resultados obtidos foram expressos como média e erro padrão da média (e.p.m.) e analisados estatisticamente empregando-se o teste “t” (não pareado) ou análise de variância “one-way” (ANOVA) seguido do pós-teste de Tukey. A hipótese nula foi rejeitada quando $p < 0,05$. Os valores de CE_{50} foram calculados por regressão não linear para todos os experimentos realizados (NEUBIG et al., 2003). Todos os resultados foram analisados pelo programa GraphPad Prism® versão 5.01 (GraphPad Software Inc., San Diego CA, E.U.A.).

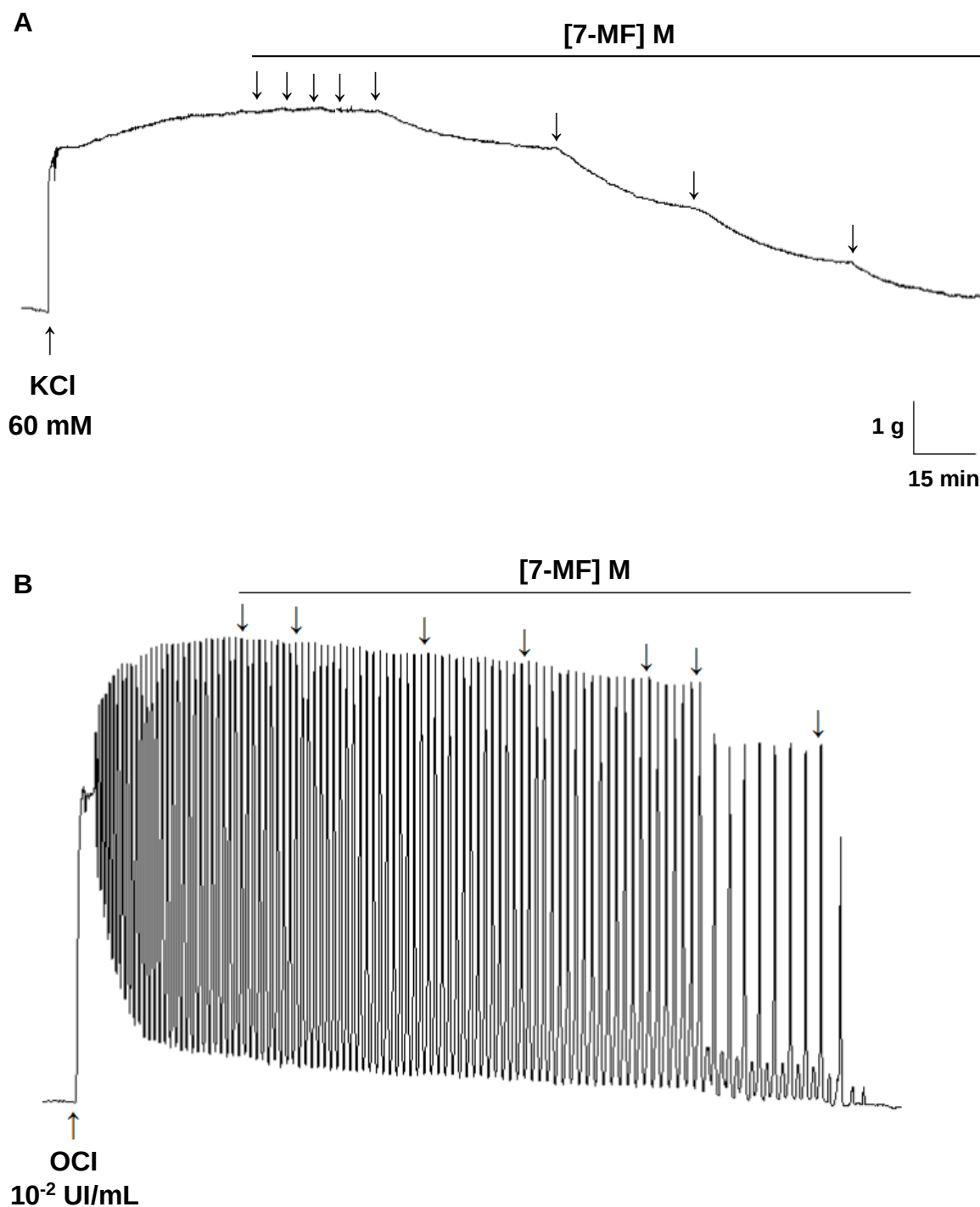
5.1 Efeito tocolítico da 7-MF sobre as contrações tônicas induzidas por KCl ou por ocitocina em útero isolado de rata

O flavonoide (10^{-7} , 3×10^{-7} , 10^{-6} , 3×10^{-6} , 10^{-5} , 3×10^{-5} , 10^{-4} M e 3×10^{-4} M, $n = 5$) relaxou de maneira dependente de concentração o útero de rata pré-contraído tanto com 60 mM de KCl ($R^2 = 0,9799 \pm 0,0106$), quanto com 10^{-2} UI/mL de ocitocina ($R^2 = 0,9584 \pm 0,0116$). Analisando os valores de CE_{50} , pode-se observar que a 7-MF foi mais potente quando as contrações eram induzidas por KCl ($CE_{50} = 2,2 \pm 0,2 \times 10^{-5}$ M) do que por ocitocina ($CE_{50} = 3,5 \pm 0,3 \times 10^{-5}$ M) (Figura 13, Gráfico 1).

Foi observado que o efeito máximo do flavonoide foi alcançado na concentração de 3×10^{-4} M quando a contração era induzida por KCl ($E_{\max} = 96,1 \pm 2,8\%$) e de 10^{-4} M quando era induzida por ocitocina ($E_{\max} = 107,4 \pm 1,8\%$), com o tempo médio de relaxamento de aproximadamente 210 e 165 minutos, respectivamente.

A responsividade do útero aos agentes contráteis, foi restaurada em $88,9 \pm 6,3$ e $95,7 \pm 2,6\%$, respectivamente, após 120 minutos da retirada do flavonoide das cubas.

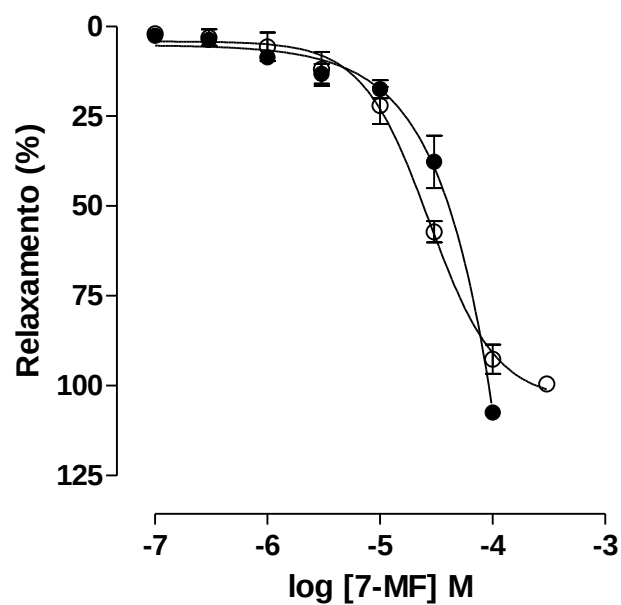
Figura 13 – Registros originais representativos do efeito tocolítico da 7-MF em útero isolado de rata pré-contraído com 60 mM de KCl (**A**) e com 10^{-2} UI/mL de ocitocina (**B**).



As setas para baixo representam a adição cumulativa da 7-MF nas concentrações de 10^{-7} - 3×10^{-4} M (**A**), 10^{-7} - 10^{-4} M (**B**), OCI = ocitocina.

Fonte: Autor, 2018.

Gráfico 1 – Efeito tocolítico da 7-MF sobre as contrações tônicas induzidas por 60 mM de KCl (○) e 10^{-2} UI/mL de ocitocina (●) em ratas.



Os símbolos e as barras verticais representam a média e o e.p.m., respectivamente (n = 5).

Fonte: Autor, 2018.

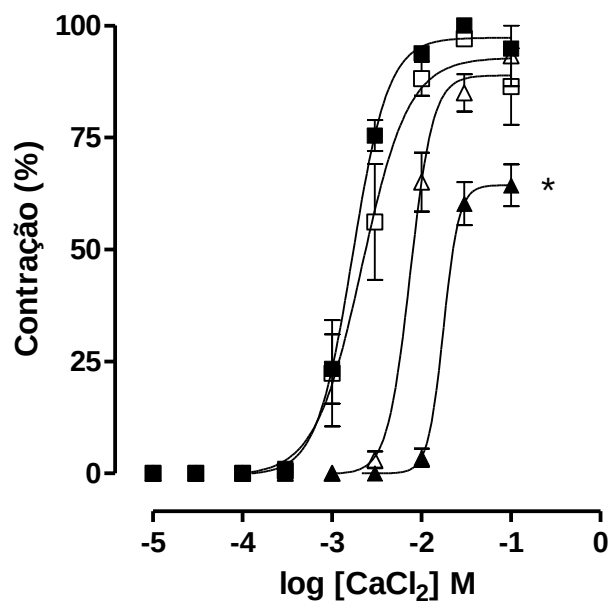
5.2 Avaliação da participação dos canais de cálcio dependentes de voltagem no efeito tocolítico da 7-MF em útero isolado de rata

5.2.1 Efeito tocolítico da 7-MF frente às contrações induzidas por cloreto de cálcio em meio despolarizante (KCl 60 mM) nominalmente sem Ca^{2+}

A curva cumulativa controle ao CaCl_2 na presença do flavonoide (10^{-5} , 3×10^{-5} e 10^{-4} M, $n = 3$) foi inibida apenas na concentração de 3×10^{-5} M, sendo desviada para direita de maneira paralela e com redução do E_{max} de 100% (controle) para $E_{\text{max}} = 97,1 \pm 1,5$; $69,0 \pm 0,8$ e $89,2 \pm 5,6\%$, respectivamente.

Houve alteração da potência também apenas na concentração 3×10^{-5} M. Os valores de CE_{50} do CaCl_2 passaram de $1,8 \pm 0,2 \times 10^{-3}$ M no controle para $2,6 \pm 0,9 \times 10^{-3}$; $2,0 \pm 0,5 \times 10^{-2}$ e $7,7 \pm 0,4 \times 10^{-3}$ M, respectivamente (Gráfico 2).

Gráfico 2 – Efeito inibitório da 7-MF frente às contrações cumulativas induzidas por CaCl_2 em meio despolarizante nominalmente sem Ca^{2+} na ausência (■) e na presença da 7-MF nas concentrações de 10^{-5} (□), 3×10^{-5} (▲) e 10^{-4} (Δ) M, em ratas.



Os símbolos e as barras verticais representam a média e o e.p.m., respectivamente (n = 3).

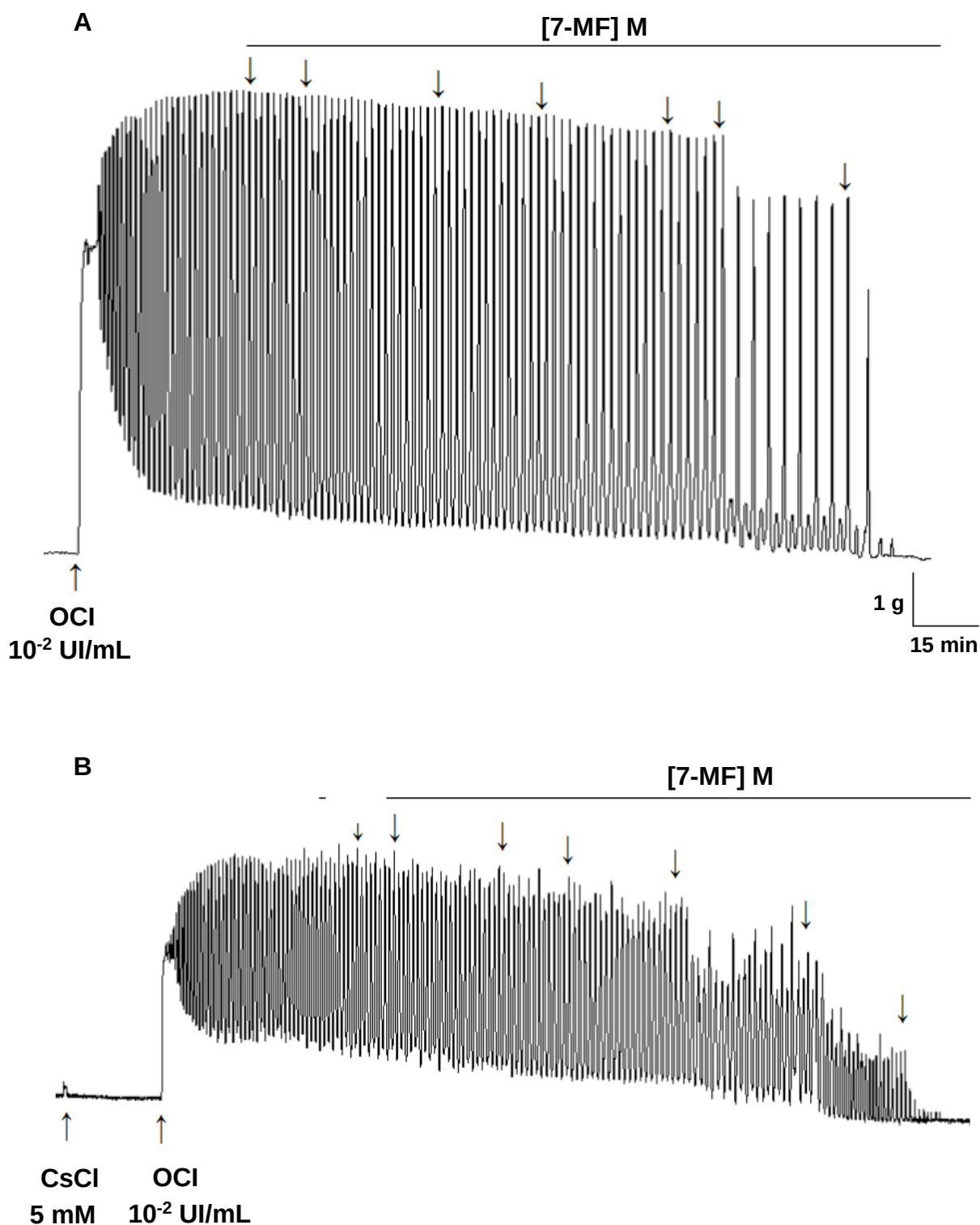
Fonte: Autor, 2018.

5.3 Avaliação do envolvimento dos canais de potássio no efeito tocolítico produzido por 7-MF em útero isolado de rata

5.3.1 Efeito da 7-MF sobre as contrações tônicas induzidas por ocitocina na ausência e na presença de CsCl

A curva controle do relaxamento (10^{-7} – 10^{-4} M, $n = 5$) da 7-MF ($CE_{50} = 3,5 \pm 0,3 \times 10^{-5}$ M e $E_{\max} = 107,4 \pm 1,8\%$) não foi desviada na presença de 5 mM de CsCl, um bloqueador não seletivo dos canais de potássio ($CE_{50} = 3,3 \pm 0,6 \times 10^{-5}$ M e $E_{\max} = 109,7 \pm 1,5\%$, $n = 5$) (Figura 14 e Gráfico 3).

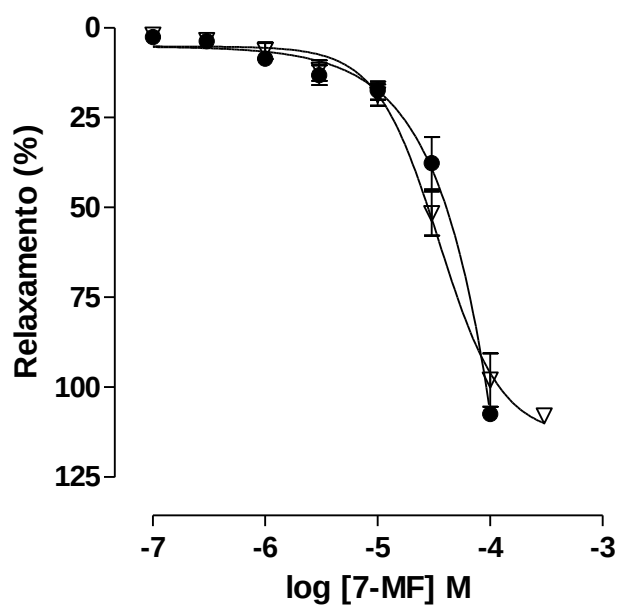
Figura 14 – Registros originais representativos do efeito tocolítico da 7-MF sobre as contrações tônicas induzidas por 10^{-2} UI/mL de ocitocina na ausência (A) e na presença (B) de 5 mM de CsCl em ratas.



As setas para baixo representam a adição cumulativa da 7-MF nas concentrações de 10^{-7} - 10^{-4} M, OCI = ocitocina.

Fonte: Autor, 2018.

Gráfico 3 – Efeito tocolítico da 7-MF sobre as contrações tônicas induzidas por ocitocina na ausência (●) e na presença (▽) de CsCl em ratas.



Os símbolos e as barras verticais representam a média e o e.p.m., respectivamente (n = 5).

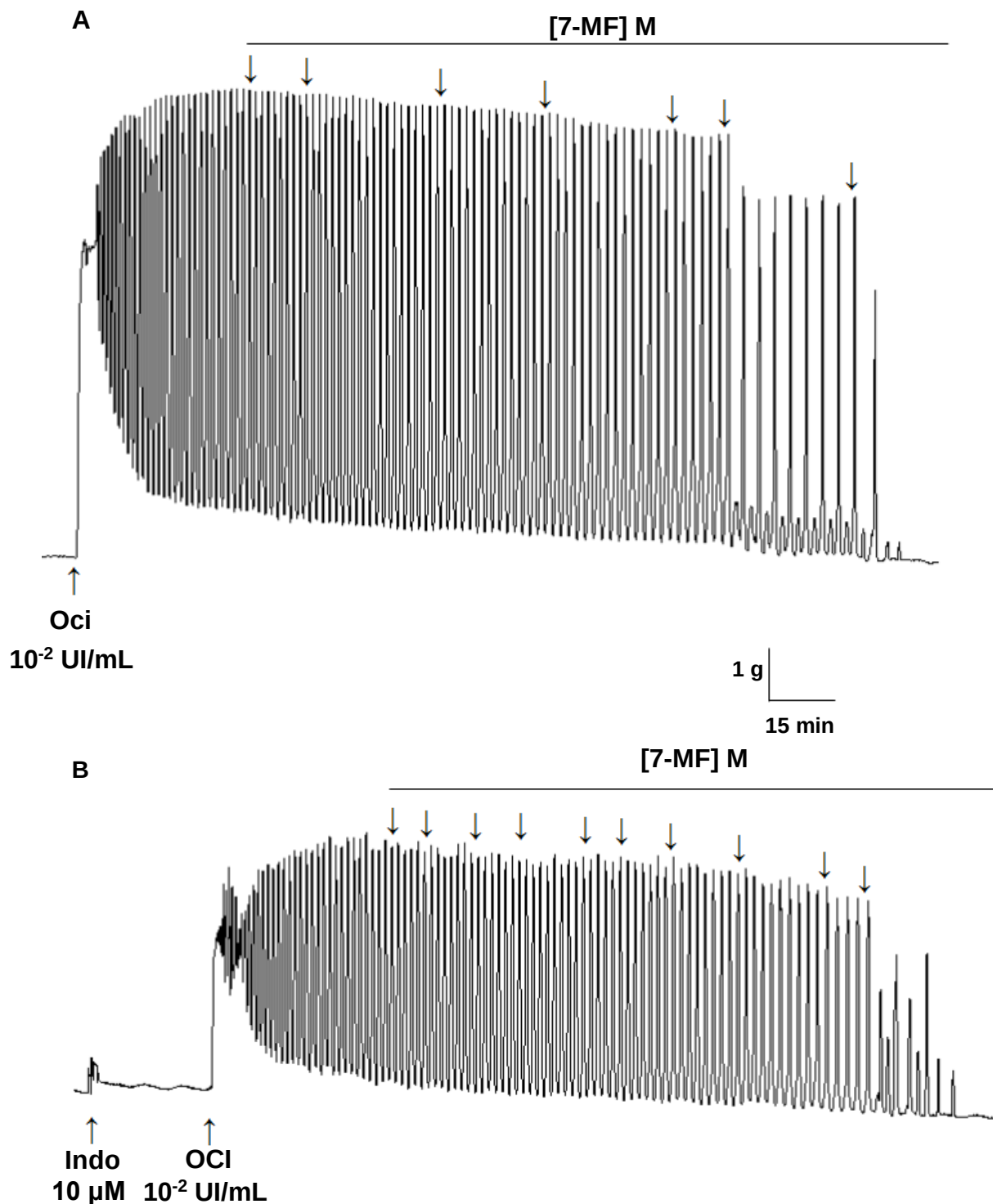
Fonte: Autor, 2018.

5.4 Avaliação do envolvimento da via da ciclo-oxigenase no efeito tocolítico promovido por 7-MF em útero isolado de rata

5.4.1 Efeito da 7-MF sobre as contrações tônicas induzidas por ocitocina na ausência e na presença de indometacina

A 7-MF relaxou de maneira equipotente o útero pré-contraído com ocitocina tanto na ausência (10^{-7} - 10^{-4} M, $n = 5$) quanto na presença (10^{-8} - 3×10^{-4} M) de $10 \mu\text{M}$ de indometacina, um inibidor não seletivo das ciclo-oxigenases. Não houve diferença entre as potências ($\text{CE}_{50} = 3,5 \pm 0,3 \times 10^{-5}$ M e $\text{CE}_{50} = 4,8 \pm 0,6 \times 10^{-5}$ M, respectivamente) e as eficácias ($E_{\text{max}} = 107,4 \pm 1,8\%$ e $E_{\text{max}} = 108,6 \pm 3,1\%$, respectivamente) tocolíticas da 7-MF na ausência e na presença deste bloqueador (Figura 15 e Gráfico 4).

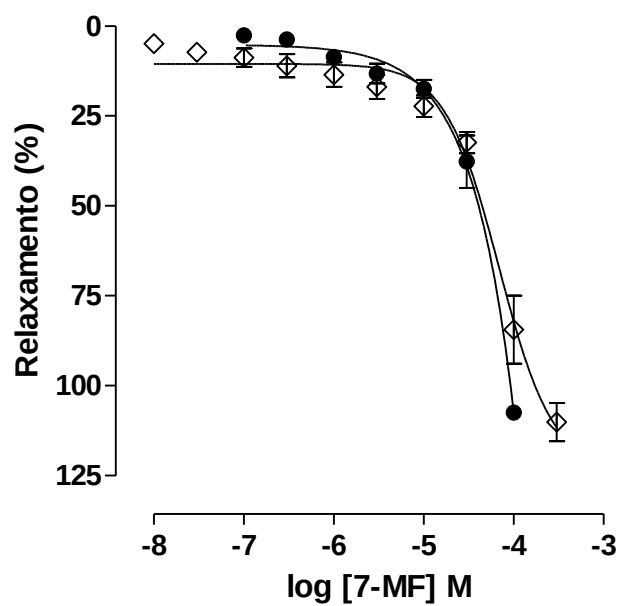
Figura 15 – Registros originais representativos do efeito tocolítico da 7-MF sobre as contrações tônicas induzidas por 10^{-2} UI/mL de ocitocina na ausência (A) e na presença (B) de $10 \mu\text{M}$ de indometacina em ratas.



As setas para baixo representam a adição cumulativa da 7-MF nas concentrações de 10^{-7} - 10^{-4} M (A) e 10^{-8} - 3×10^{-4} M (B), OCI = ocitocina, Indo = indometacina.

Fonte: Autor, 2018.

Gráfico 4 – Efeito tocolítico da 7-MF sobre as contrações tônicas induzidas por ocitocina na ausência (●) e na presença (◊) de indometacina em ratas.



Os símbolos e as barras verticais representam a média e o e.p.m., respectivamente (n = 5).

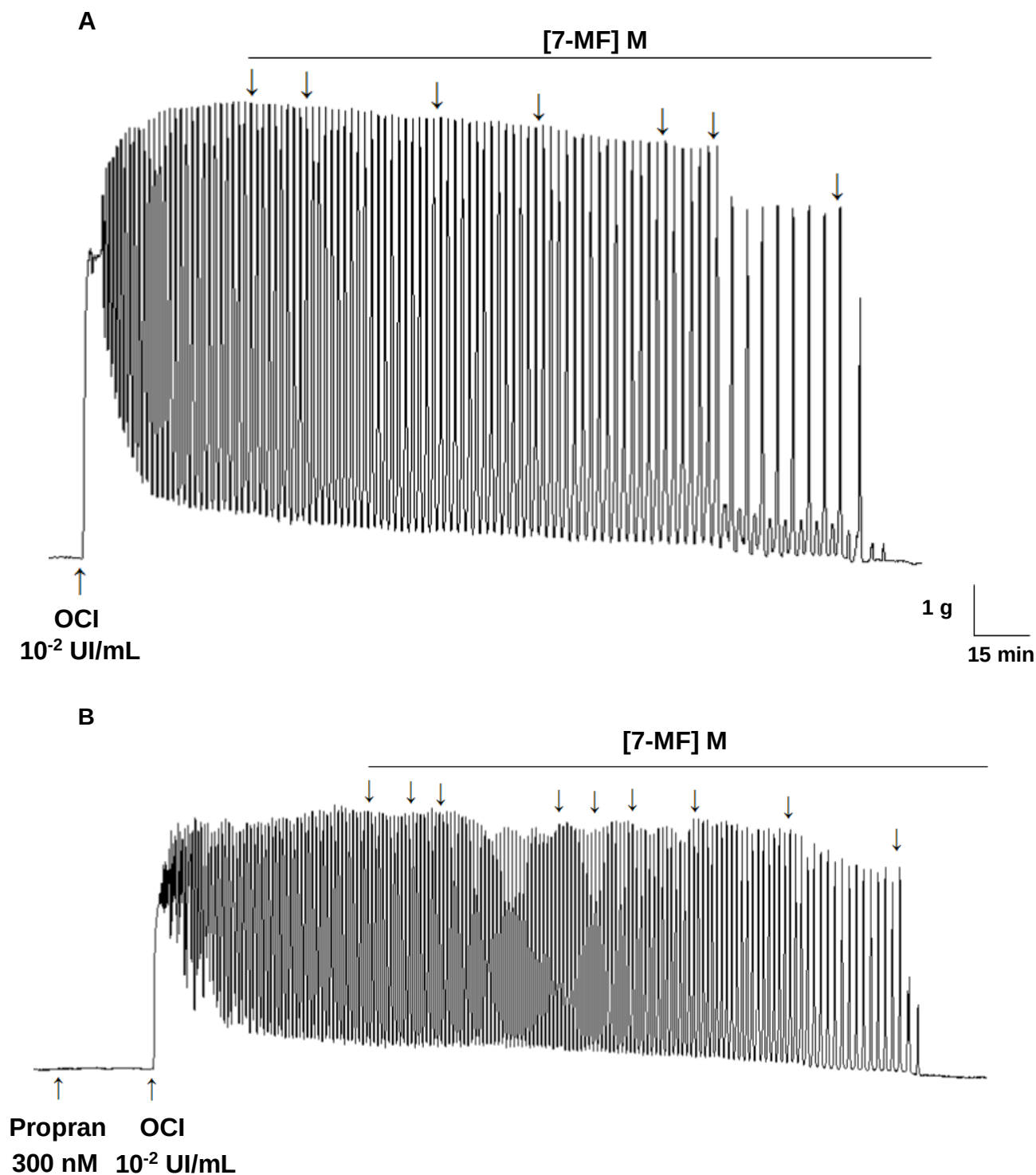
Fonte: Autor, 2018.

5.5 Avaliação da participação da via adrenérgica no efeito tocolítico produzido por 7-MF em útero isolado de rata

5.5.1 Efeito da 7-MF sobre as contrações tônicas induzidas por ocitocina na ausência e na presença de (S)-(-)-propranolol

A 7-MF relaxou de maneira equipotente o útero pré-contráído com ocitocina tanto na ausência (10^{-7} - 10^{-4} M, $n = 5$) quanto na presença (10^{-8} - 3×10^{-4} M, $n = 5$) de 300 nM de (S)-(-)-propranolol, um antagonista dos receptores adrenérgicos- β . Não houve diferença entre as potências ($CE_{50} = 3,5 \pm 0,3 \times 10^{-5}$ M e $CE_{50} = 2,2 \pm 0,5 \times 10^{-5}$ M, respectivamente) e as eficácias ($E_{max} = 107,4 \pm 1,8\%$ e $E_{max} = 96,7 \pm 7,7\%$, respectivamente) tocolíticas da 7-MF na ausência e na presença deste antagonista (Figura 16 e Gráfico 5).

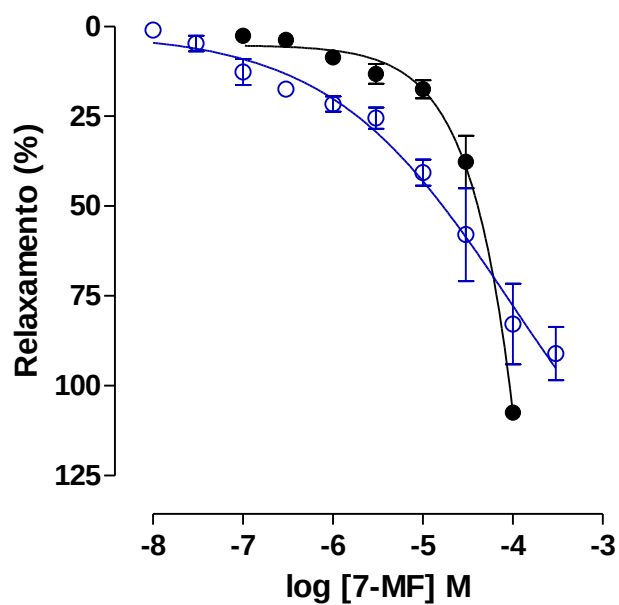
Figura 16 – Registros originais representativos do efeito tocolítico da 7-MF sobre as contrações tônicas induzidas por 10^{-2} UI/mL de ocitocina na ausência (A) e na presença (B) de 300 nM (S)-(-)-propranolol em ratas.



As setas para baixo representam a adição cumulativa da 7-MF nas concentrações de 10^{-7} - 10^{-4} M (A) e 10^{-8} - 3×10^{-4} M (B), OCI = ocitocina, propran = (S)-(-)-propranolol.

Fonte: Autor, 2018.

Gráfico 5 – Efeito tocolítico da 7-MF sobre as contrações tônicas induzidas por ocitocina na ausência (●) e na presença (○) de (S)-(-)-propranolol em ratas.



Os símbolos e as barras verticais representam a média e o e.p.m., respectivamente (n = 5).

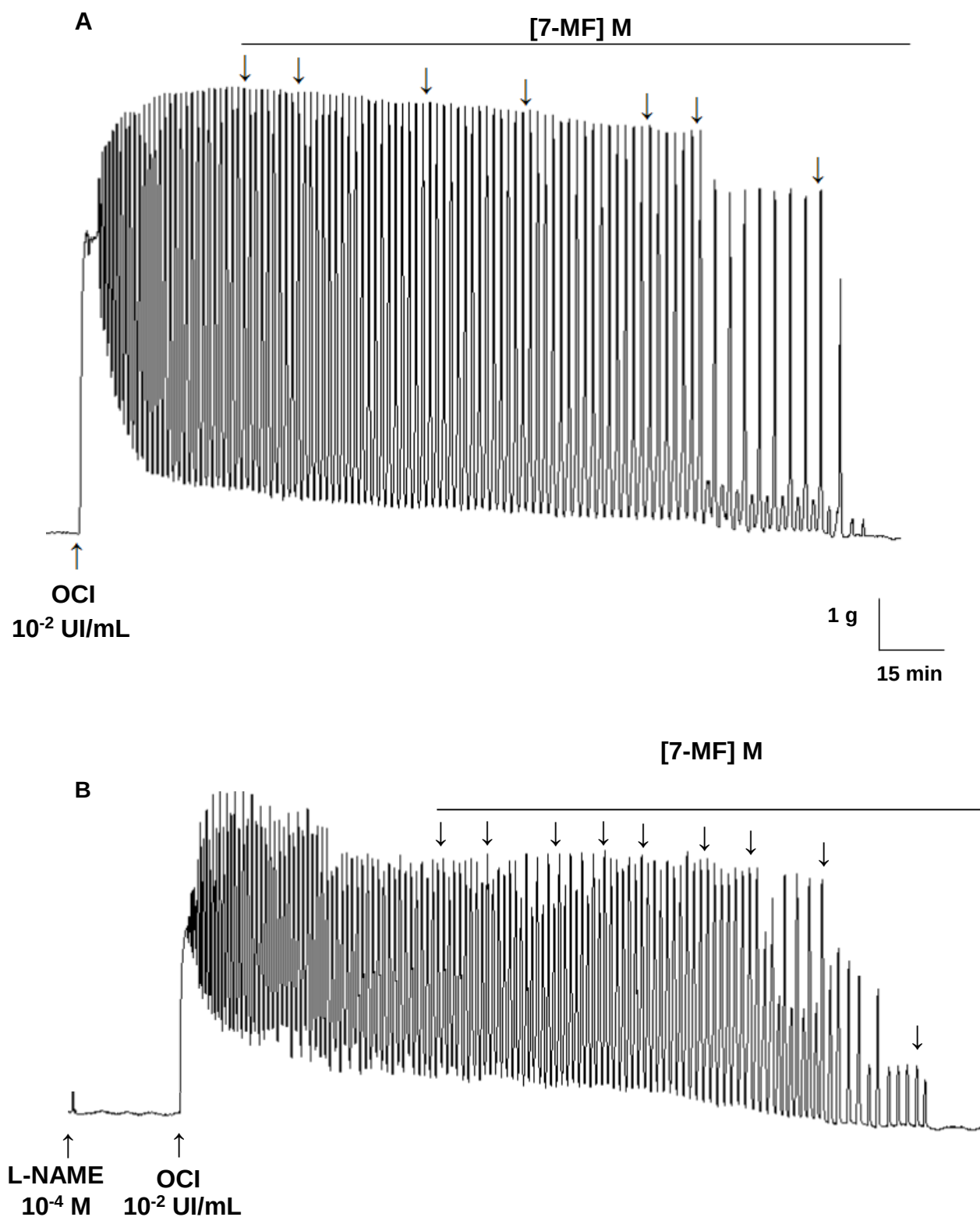
Fonte: Autor, 2018.

5.6 Avaliação do envolvimento da via do óxido nítrico no efeito tocolítico da 7-MF em útero isolado de rata

5.6.1 Efeito tocolítico da 7-MF sobre as contrações tônicas induzidas por ocitocina na ausência e na presença de L-NAME

A 7-MF relaxou de maneira equipotente o útero pré-contraído com ocitocina tanto na ausência (10^{-7} - 10^{-4} M, $n = 5$) quanto na presença (10^{-8} - 3×10^{-4} M, $n = 5$) de 10^{-4} M de L-NAME, um inibidor não seletivo de NOS. Não houve diferença entre as potências ($CE_{50} = 3,5 \pm 0,3 \times 10^{-5}$ M e $CE_{50} = 4,4 \pm 1,2 \times 10^{-5}$ M, respectivamente) e as eficácias ($E_{max} = 107,4 \pm 1,8\%$ e $E_{max} = 112,0 \pm 2,2\%$, respectivamente) tocolíticas da 7-MF na ausência e na presença deste antagonista (Figura 17 e Gráfico 6).

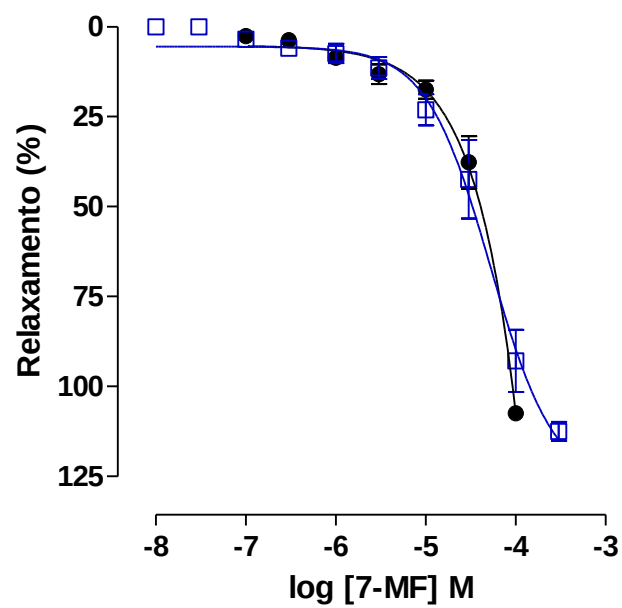
Figura 17 – Registros originais representativos do efeito tocolítico da 7-MF sobre as contrações tônicas induzidas por 10^{-2} UI/mL de ocitocina na ausência (A) e na presença (B) de 10^{-4} M de L-NAME em ratas.



As setas para baixo representam a adição cumulativa da 7-MF nas concentrações de 10^{-7} - 10^{-4} M (A) e 10^{-8} - 3×10^{-4} M (B), OCI = ocitocina.

Fonte: Autor, 2018.

Gráfico 6 – Efeito tocolítico da 7-MF sobre as contrações tônicas induzidas por ocitocina na ausência (●) e na presença (□) de L-NAME em ratas.



Os símbolos e as barras verticais representam a média e o e.p.m., respectivamente (n = 5).

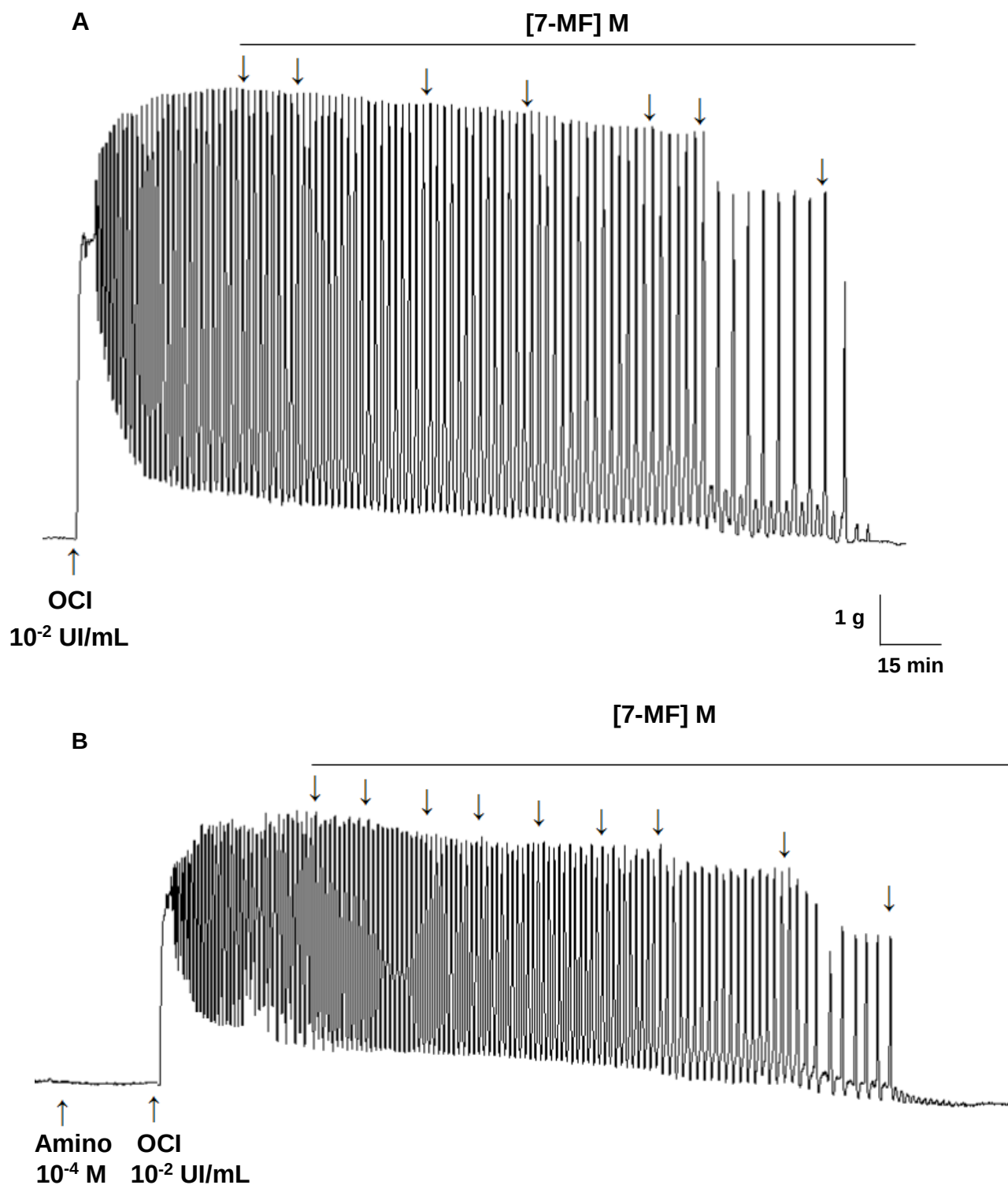
Fonte: Autor, 2018.

5.7 Avaliação da participação da enzima fosfodiesterase no efeito tocolítico produzido por 7-MF em útero isolado de rata

5.7.1 Efeito da 7-MF sobre as contrações tônicas induzidas por ocitocina na ausência e na presença de aminofilina

A 7-MF relaxou de maneira equipotente o útero pré-contraído com ocitocina tanto na ausência (10^{-7} - 10^{-4} M, $n = 5$) quanto na presença (10^{-8} - 10^{-4} M, $n = 5$) de 10^{-4} M de aminofilina, um inibidor não seletivo das enzimas fosfodiesterases. Não houve diferença entre as potências ($CE_{50} = 3,5 \pm 0,3 \times 10^{-5}$ M e $CE_{50} = 2,8 \pm 0,5 \times 10^{-5}$ M, respectivamente) e as eficácias ($E_{max} = 107,4 \pm 1,8\%$ e $E_{max} = 111,4 \pm 4,2\%$, respectivamente) tocolíticas da 7-MF na ausência e na presença deste inibidor (Figura 18 e Gráfico 7).

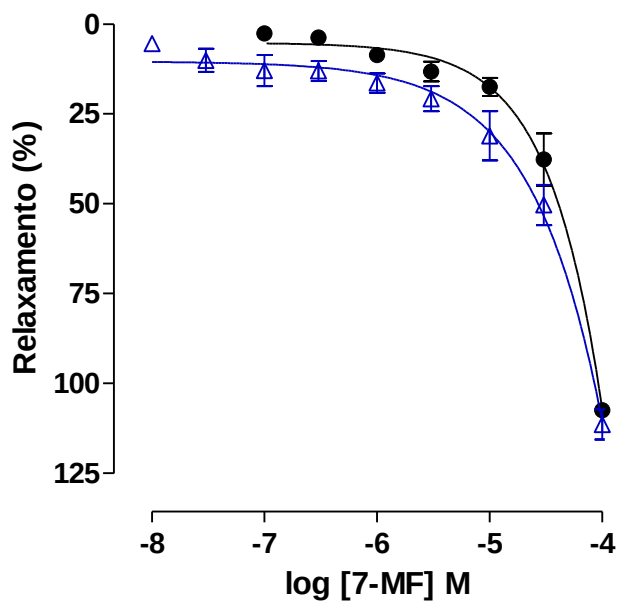
Figura 18 – Registros originais representativos do efeito tocolítico da 7-MF sobre as contrações tônicas induzidas por 10^{-2} UI/mL de ocitocina na ausência (A) e na presença (B) de 10^{-4} M de aminofilina em ratas.



As setas para baixo representam a adição cumulativa da 7-MF nas concentrações de 10^{-7} - 10^{-4} M (A) e 10^{-8} - 10^{-4} M (B), OCI = ocitocina, Amino = aminofilina.

Fonte: Autor, 2018.

Gráfico 7 – Efeito tocolítico da 7-MF sobre as contrações tônicas induzidas por ocitocina na ausência (●) e na presença (△) de aminofilina em ratas.



Os símbolos e as barras verticais representam a média e o e.p.m., respectivamente (n = 5).

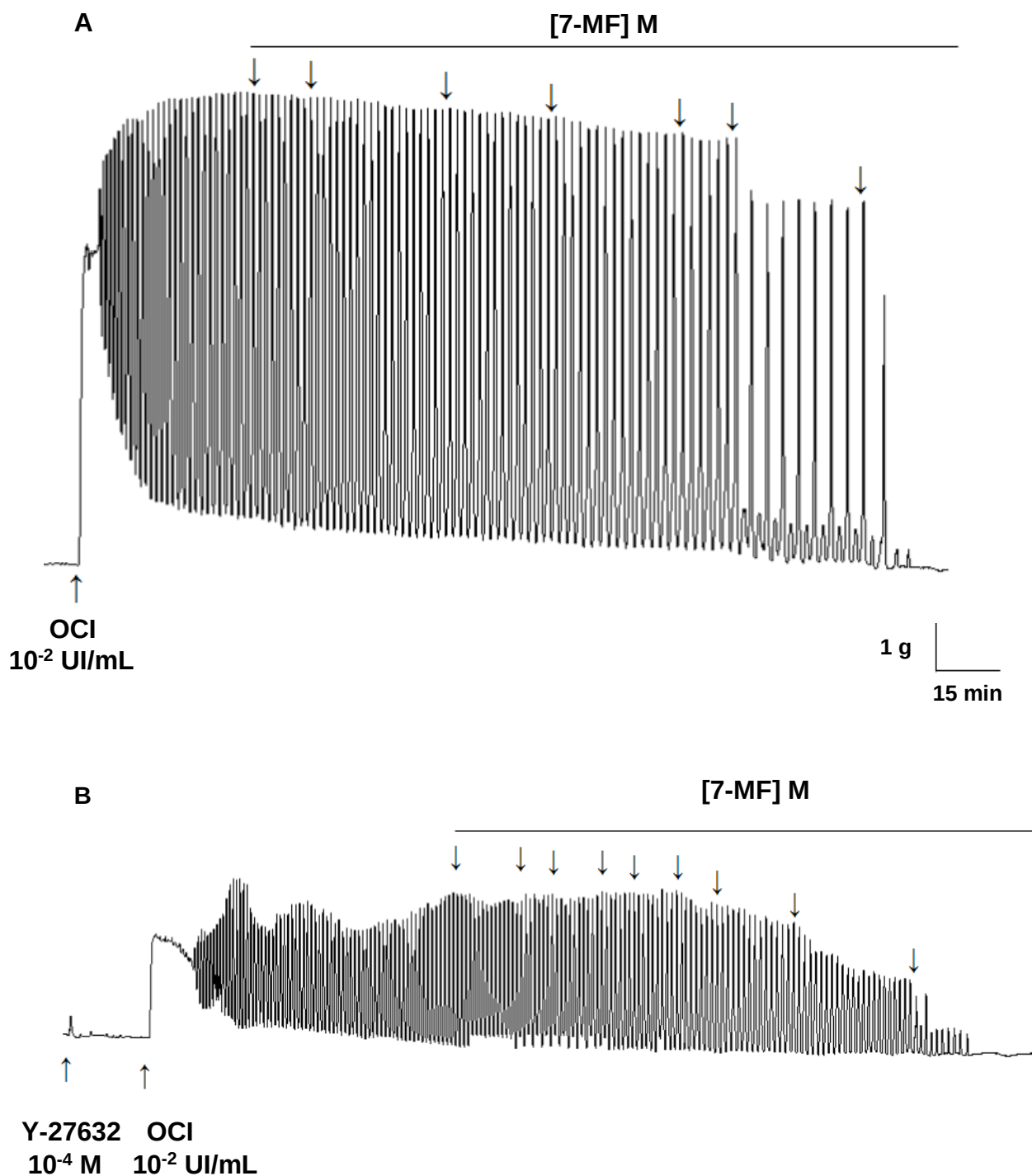
Fonte: Autor, 2018.

5.8 Avaliação da participação da via da RhoA/Rho cinase no efeito tocolítico produzido por 7-MF em útero isolado de rata

5.8.1 Efeito da 7-MF sobre as contrações tônicas induzidas por ocitocina na ausência e na presença de Y-27632

A curva de relaxamento da 7-MF ($CE_{50} = 3,5 \pm 0,3 \times 10^{-5} \text{ M}$ e $E_{\text{max}} = 107,4 \pm 1,8\%$, $n = 5$) foi deslocada para a esquerda na presença de 10^{-4} M de Y-27632, um inibidor de Rho cinase, com aumento da potência relaxante em cerca de 22 vezes ($CE_{50} = 1,6 \pm 0,7 \times 10^{-6} \text{ M}$, $n = 5$), entretanto sem alteração da eficácia ($E_{\text{max}} = 114,6 \pm 2,8\%$) (Figura 19 e Gráfico 8).

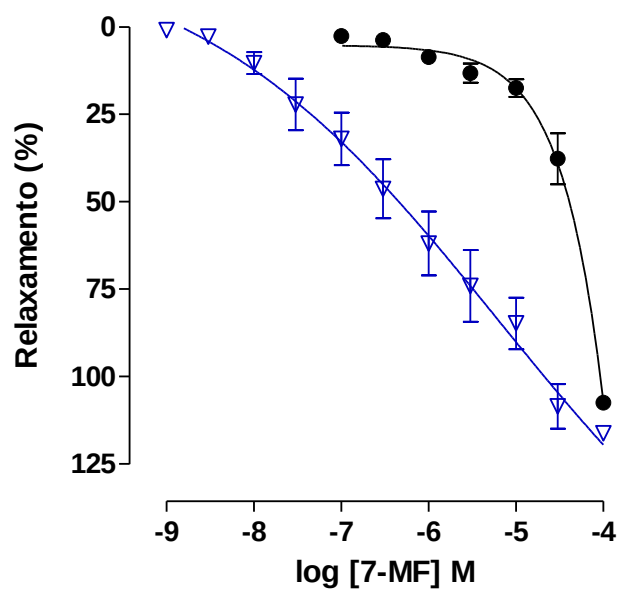
Figura 19 – Registros originais representativos do efeito tocolítico da 7-MF sobre as contrações tônicas induzidas por 10^{-2} UI/mL de ocitocina na ausência (A) e na presença (B) de 10^{-4} M de Y-27632 em ratas.



As setas para baixo representam a adição cumulativa da 7-MF nas concentrações de 10^{-7} - 10^{-4} M (A) e 10^{-8} - 10^{-4} M (B), OCI = ocitocina.

Fonte: Autor, 2018.

Gráfico 8 – Efeito tocolítico da 7-MF sobre as contrações tônicas induzidas por ocitocina na ausência (●) e na presença (▽) de Y-27632 em ratas.



Os símbolos e as barras verticais representam a média e o e.p.m., respectivamente (n = 5).

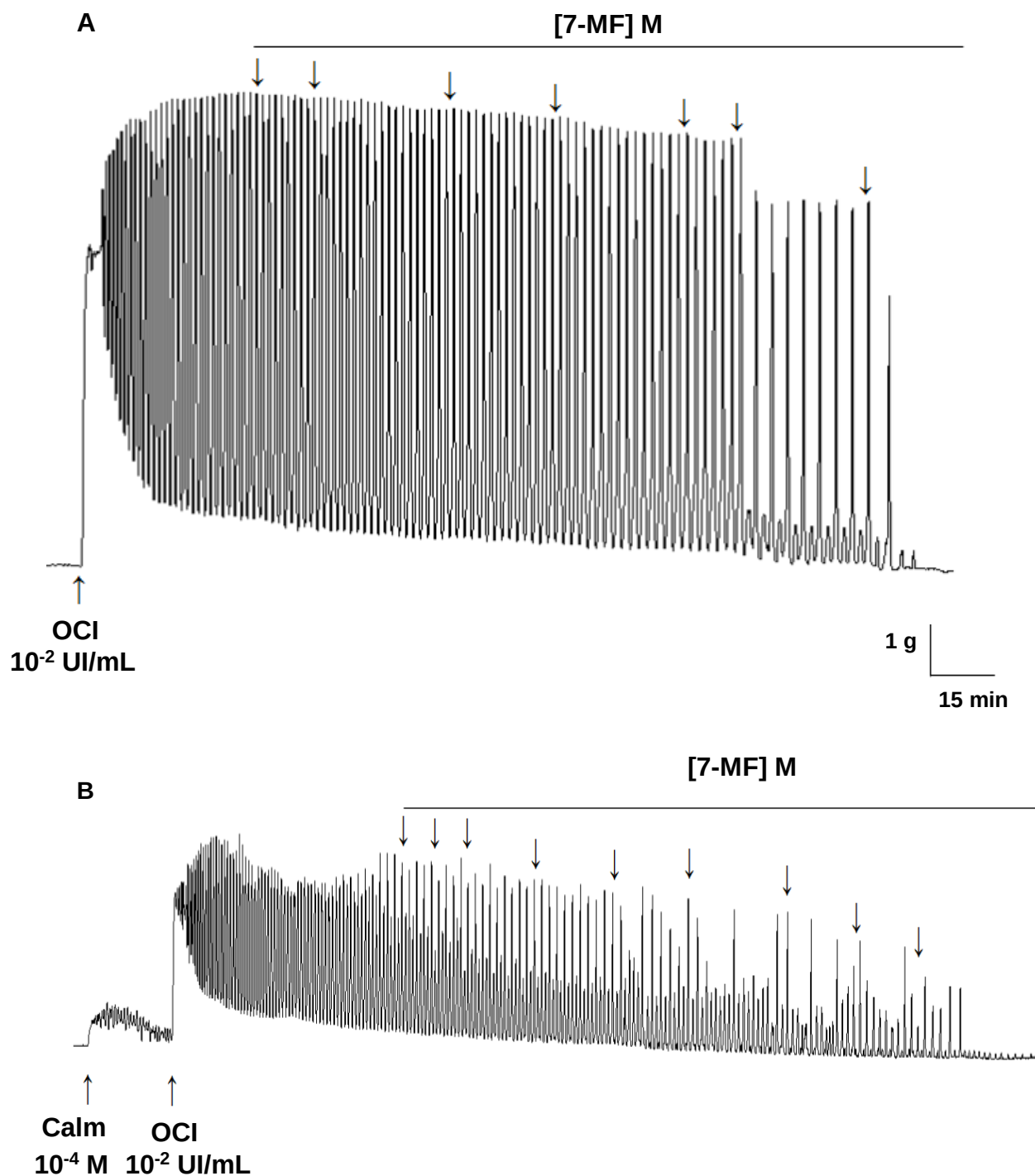
Fonte: Autor, 2018.

5.9 Avaliação da participação da calmodulina no efeito tocolítico produzido por 7-MF em útero isolado de rata

5.9.1 Efeito da 7-MF sobre as contrações tônicas induzidas por ocitocina na ausência e na presença de calmidazolium

A curva de relaxamento da 7-MF ($CE_{50} = 3,5 \pm 0,3 \times 10^{-5}$ M e $E_{\max} = 107,4 \pm 1,8\%$) foi deslocada para a esquerda na presença de 10^{-4} M de calmidazolium, um inibidor de calmodulina ($CE_{50} = 6,5 \pm 1,6 \times 10^{-7}$ M, $n = 4$), com aumento da potência relaxante em cerca de 54 vezes, entretanto sem alteração da eficácia ($E_{\max} = 115,4 \pm 5,6\%$), atingindo seu $E_{\max}$ na concentração de 10^{-4} M (Figura 20 e Gráfico 9).

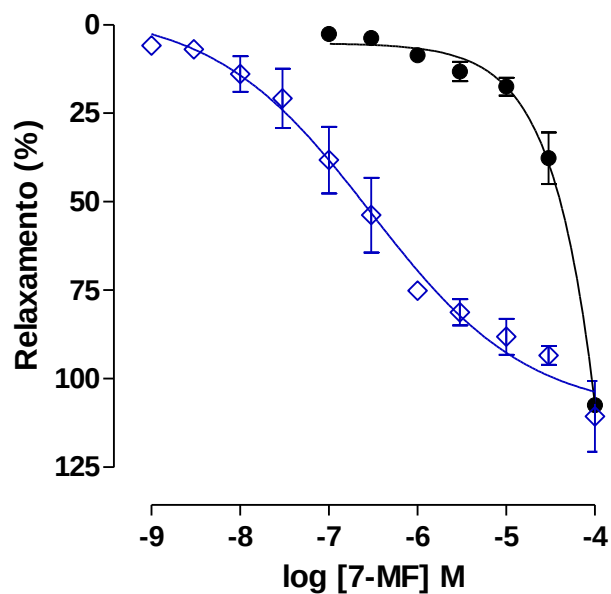
Figura 20 – Registros originais representativos do efeito tocolítico da 7-MF sobre as contrações tônicas induzidas por 10^{-2} UI/mL de ocitocina na ausência (A) e na presença (B) de 10^{-4} M de calmidazolium em rata.



As setas para baixo representam a adição cumulativa da 7-MF nas concentrações de 10^{-7} - 10^{-4} M (A) e 10^{-8} - 10^{-4} M (B), OCI = ocitocina, Calm = calmidazolium.

Fonte: Autor, 2018.

Gráfico 9 – Efeito tocolítico da 7-MF sobre as contrações tônicas induzidas por ocitocina na ausência (●) e na presença (◇) de calmidazolium em ratas.



Os símbolos e as barras verticais representam a média e o e.p.m., respectivamente (n = 4-5).

Fonte: Autor, 2018.

6 Discussão

Neste trabalho, investigou-se o mecanismo de ação tocolítica *in vitro* da 7-metoxiflavona isolada de *Zornia brasiliensis* em ratas e demonstrou-se que o flavonoide exerce seu efeito por inibir a via-Rho cinase e a calmodulina.

Já foi demonstrado que o extrato etanólico obtido das partes aéreas de *Zornia brasiliensis* (ZB-EtOH_{PA}) apresentou atividade espasmolítica em vários músculos lisos, incluindo o efeito tocolítico em rata, tanto frente às contrações fásicas induzidas por CCh e por ocitocina (OLIVEIRA et al., 2014; OLIVEIRA et al., 2016), como sobre o componente tônico, modulando positivamente a via do óxido nítrico (NO/sGC/PKG) e os canais de K⁺ (K_{ATP}, BK_{Ca}, SK_{Ca} e K_v), o que leva, consequentemente, ao bloqueio indireto do influxo de Ca²⁺ através dos Cav, ocasionando o relaxamento do músculo liso uterino (FERREIRA, 2018).

Uma vez que os flavonoides são um dos principais constituintes químicos de *Zornia brasiliensis* (NASCIMENTO et al., 2018), em estudos anteriores também já foi investigado se flavonoides isolados desta espécie exerceriam efeito tocolítico em ratas e seriam os possíveis responsáveis pelo efeito apresentado por ZB-EtOH_{PA}. Pode-se observar que tanto a 5,7-DMF como a 7-MF antagonizaram as contrações fásicas induzidas por CCh e por ocitocina (FERREIRA, 2018). Daí surgiu o interesse em iniciar o estudo do possível mecanismo de ação tocolítica com a 7-MF em ratas.

O útero é um órgão bifásico, apresenta uma contração rápida e transiente, denominada de componente fásico e um componente tônico que mantém a contração sustentada por longo período de tempo (BOLTON, 1979). Sabe-se que os mecanismos que induzem uma contração fásica são diferentes em relação aos que mantém a contração tônica, uma vez que a fásica envolve majoritariamente o cálcio intracelular advindo do retículo sarcoplasmático, enquanto que a tônica necessita predominantemente do cálcio extracelular, que entra na célula através dos Cav (JIM et al., 1981; WRAY, 1993; ABDELLATIF, 1989; NOVAKOVIC et al., 2013). Desta forma, sabendo que a 7-MF já apresentou atividade espasmolítica frente às contrações fásicas, resolveu-se avaliar o efeito tocolítico *in vitro* deste flavonoide sobre o componente tônico, induzido tanto por um agente eletromecânico, o KCl, como por um agente de acoplamento misto (eletro e farmacomecânico), a ocitocina (ARROWSMITH; WRAY, 2014).

A ocitocina é um hormônio neuropeptídico produzido pelo núcleo paraventricular do hipotálamo e liberado pela hipófise posterior (VALLERA et al., 2017). Após ser liberado, este hormônio circula na corrente sanguínea na forma de

peptídio livre (CHARD, 1989), e apresenta uma potente atividade uterotônica, sendo muito utilizado para indução do parto, além de também estar diretamente envolvido com a lactação (OWEN; HAUTH, 1992; BEARD et al., 2018). A Organização Mundial de Saúde preconiza a ocitocina como o tratamento de primeira escolha na prevenção e tratamento de hemorragia pós-parto, considerada uma das maiores causas de morbidade materna (MAUGHAN; HEIM; GALAZKA, 2006).

O modelo animal escolhido foi o útero de rata, uma vez que as ratas são consideradas excelentes para o estudo com sistema reprodutor feminino, por apresentarem ciclo estral muito curto, que é dividido em quatro fases: proestro, estro, diestro I e diestro II, facilitando a determinada investigação. Sabendo que a expressão de receptores ocitocinérgicos, em todos os tecidos uterinos, é modulada positivamente na presença de estrogênio (MAGGI et al., 1991) e também com a finalidade de induzir a mesma fase do ciclo em todas as ratas, administrou-se, 24 horas antes da eutanásia, o dietilestilbestrol para a indução do estro (FREEMAN, 1988; SPORNITZ; SOCIN; DRAVID, 1999; MARCONDES et al., 2001).

Diante destas premissas, observou-se que o flavonoide relaxou de maneira dependente de concentração o útero pré-contraído tanto por KCl ($CE_{50} = 2,2 \pm 0,2 \times 10^{-5}$ M), como por ocitocina ($CE_{50} = 3,5 \pm 0,3 \times 10^{-5}$ M), sendo cerca de 2 vezes mais potente frente ao KCl (Gráfico 1), sugerindo a que o flavonoide poderia estar exercendo seu efeito tocolítico por bloqueio do influxo de Ca^{2+} através dos Cav. O fato da responsividade do útero ter sido restaurada em $88,9 \pm 6,3$ e $95,7 \pm 2,6$, demonstra que o flavonoide possui baixa toxicidade para o órgão.

Semelhantemente, Ferreira (2018) demonstrou que o ZB-EtOH_{PA} apresentou uma maior potência, cerca de 4 vezes, em relaxar o útero pré-contraído com KCl ($CE_{50} = 22,0 \pm 1,3$ µg/mL) quando comparado á ocitocina ($CE_{50} = 5,5 \pm 1,3$ µg/mL). Uma vez que estes resultados foram obtidos utilizando o extrato, a diferença na ordem de potência pode ter ocorrido devido aos outros constituintes deste fitocomplexo, que poderiam estar mascarando o efeito da 7-MF.

Outros flavonoides também apresentaram efeito tocolítico em ratas, entre eles a genisteína, o campferol e a quercetina (REVUELTA; HIDALGO; CANTABRANA, 1999). Além disso, a isoliquiritigenina (SHI et al., 2012) relaxou o órgão pré-contraído tanto com KCl como com ocitocina, e o flavonoide 3,6-dimetil éter galetina relaxou o útero pré-contraído com CCh e ocitocina (CARREIRO et al., 2017).

Uma vez relatado na literatura que um dos principais mecanismos de contração ocasionado pelo KCl é através da ativação dos Cav (SEDA et al., 2007), levantou-se a hipótese que o flavonoide poderia estar exercendo seu efeito tocolítico por bloqueio do influxo de Ca^{2+} através destes canais.

É sabido que os Cav são os principais responsáveis pelo influxo de Ca^{2+} no miométrio (ARROWSMITH; WRAY, 2014). Também já é descrito que o miométrio expressa Cav1 e Cav2 (LEE; AHN; LEE, 2009), entretanto, os Cav1 são os mais estudados e os que possuem função mais importante no influxo de Ca^{2+} , favorecendo o processo de contração uterina (WRAY et al., 2015).

Com isso, foram realizadas curvas cumulativas ao CaCl_2 em meio despolarizante e nominalmente sem Ca^{2+} , na ausência e na presença de diferentes concentrações da 7-MF (10^{-5} , 3×10^{-5} e 10^{-4} M). Este protocolo experimental baseia-se na propriedade de que alta concentração de K^+ no meio extracelular ocasiona despolarização de membrana e consequente abertura dos Cav. Uma vez todo o Ca^{2+} tendo sido retirado do meio, a contração que será induzida será quase que exclusivamente pelo Ca^{2+} proveniente do meio extracelular via Cav (RATZ et al., 2005). Diante dos resultados observou-se um desvio da curva controle do CaCl_2 ($\text{CE}_{50} = 1,8 \pm 0,2 \times 10^{-3}$ M e $\text{E}_{\text{max}} = 97,1 \pm 1,5\%$), com redução da potência e de efeito máximo ($\text{CE}_{50} = 2,0 \pm 0,5 \times 10^{-2}$ M e $\text{E}_{\text{max}} = 69,0 \pm 0,8\%$) apenas na presença da 7-MF na concentração de 3×10^{-5} M (Gráfico 2), indicando que provavelmente o bloqueio do influxo de Ca^{2+} através dos Cav não seja o principal mecanismo relaxante da 7-MF.

Diferentemente, o ZB-EtOH_{PA} inibiu essas contrações com dependência de concentração, desviando a curva controle do CaCl_2 para a direita de maneira não paralela, com redução do E_{max} e da potência espasmogênica (FERREIRA, 2018). Indicando, por conseguinte, que provavelmente não é a 7-MF a responsável por este efeito, ou que pode estar sendo mascarada pelos demais fitoconstituintes do extrato.

Outros flavonoides por sua vez, já foram relatados apresentar seu efeito tocolítico por inibir o influxo de Ca^{2+} através dos Cav como a isoliquiritigenina (SHI et al., 2012) e 3,6-dimetil éter galetina (CARREIRO et al., 2017).

Já é referido na literatura que substâncias ativadoras de canais de K^+ relaxam a musculatura lisa, uma vez que ocasionam uma hiperpolarização da membrana pelo aumento do efluxo deste íon, e consequente bloqueio indireto dos Cav (QUAST; COOK, 1989; WESTON; EDWARDS, 1992), sendo também moduladores destes

(KNOT; BRAYDEN; NELSON, 1996). Vários tipos de canais de K^+ estão descritos no miométrio, tais como canais de K^+ retificadores internos ($K_{ir6.x}$), canais de K^+ ativados por estiramento, canais de K^+ sensível ao ATP (K_{ATP}), canais de K^+ sensíveis ao Ca^{2+} (K_{Ca}) e canais de K^+ dependente de voltagem (K_v) (WRAY et al., 2015). Diante disso, resolveu-se avaliar uma possível participação dos canais de K^+ na ação tocolítica da 7-MF.

À vista dos resultados obtidos, pode-se observar que na presença do CsCl, um bloqueador não seletivo dos canais de K^+ (LATORRE et al., 1989), a curva controle de relaxamento da 7-MF ($CE_{50} = 3,5 \pm 0,3 \times 10^{-5}$ M) não foi desviada ($CE_{50} = 3,3 \pm 0,6 \times 10^{-5}$ M), sugerindo que, provavelmente, não é por modulação positiva dos canais de K^+ que o flavonoide exerce seu efeito tocolítico em ratas (Gráfico 3).

Diferentemente, 3,6-dimetil éter galequina apresentou seu efeito tocolítico por modular positivamente estes canais, em especial os K_v e os K_{ATP} (CARREIRO et al., 2017).

As prostaglandinas estão envolvidas tanto em processos fisiológicos uterinos, sendo um dos principais reguladores parácrinos deste (HERTELENDY; ZAKAR, 2004), como em desordens, sendo uma das principais a dismenorreia, caracterizada por dor pélvica (JU; JONES; MISHRA, 2014). Acredita-se que a principal causa da dor menstrual seja o aumento das prostaglandinas no endométrio. Estas são geradas a partir do AA pelas COXs, dando um destaque para a $PGF_{2\alpha}$ que pode estimular contrações uterinas e causar isquemia, levando à dor menstrual (WHITE; BHANGOO; MILLER, 2005). A principal classe de medicamentos utilizada para o tratamento destas desordens são os AINEs que agem reduzindo as prostaglandinas por inibirem não seletivamente as COXs, ocasionando então o relaxamento muscular uterino e diminuição da dor menstrual (CHANTLER; MITCHELL; FULLER, 2009; MARJORIBANKS et al., 2010).

Para avaliar o possível envolvimento da via das COXs no mecanismo de ação tocolítica da 7-MF, utilizou-se o flavonoide na presença da indometacina, um inibidor não seletivo destas enzimas (SHI et al., 2012) e verificou-se que esta via não é modulada pelo flavonoide, uma vez que não houve alteração dos valores de CE_{50} na ausência ($3,5 \pm 0,3 \times 10^{-5}$ M) e na presença ($4,8 \pm 0,6 \times 10^{-5}$ M) do bloqueador (Gráfico 4).

De maneira divergente, o flavonoide isoliquiritigenina apresentou um efeito relaxante atenuado na presença de indometacina, indicando que seu efeito tocolítico pode ser por inibição da COX (SHI et al., 2012). Como citado anteriormente, o relaxamento muscular liso pode ocorrer por diferentes vias, e uma das principais é através da ativação dos receptores adrenérgicos- β , que no útero de ratas são expressos tanto no endométrio como no miométrio, de forma não homogênea (CHOW; MARSHAL, 1981; NIMMO et al., 1995). Também já foi relatado que os principais receptores adrenérgicos- β expressos no útero são o subtipo β_2 , com cerca de 80%, porém os subtipos β_1 no epitélio endometrial e β_3 no miométrio já foram relatados (BRAUER; BURNSTOCK, 1998; ROUGET et al., 2005; ARROWSMITH, KENDRICK; WRAY, 2010).

A ativação dos receptores adrenérgicos- β ocasiona um relaxamento da musculatura lisa, uma vez que este receptor acopla a proteína G_s , ocasionando o aumento do cAMP que ativa a PKA, que fosforila diversos alvos ocasionando a diminuição da $[Ca^{2+}]_c$ (DODGE; SANBORNE, 1998).

Desta forma, com a finalidade de avaliar uma possível participação dos receptores adrenérgicos- β no mecanismo de ação tocolítica da 7-MF, utilizou-se esse flavonoide na presença de (S)-(-)-propranolol, um antagonista de receptores adrenérgicos- β , que apresenta uma maior seletividade pelo receptor β_2 em comparação aos demais receptores adrenérgicos- β (BAKER, 2005) e verificou-se que estes receptores não são modulados pelo flavonoide, uma vez que não houve alteração dos valores de CE_{50} na ausência ($3,5 \pm 0,3 \times 10^{-5}$ M) e na presença ($2,2 \pm 0,5 \times 10^{-5}$ M) do bloqueador (Gráfico 5).

Da mesma maneira, outros flavonoides como genisteína e o campferol também não tiveram seu efeito tocolítico alterado na presença do propranolol, diferentemente da quercetina (REVUELTA; HIDALGO; CANTABRANA, 1999) e da isoliquiritigenina (SHI et al., 2012), as quais tiveram a sua curva de relaxamento desviada para a direita na presença do bloqueador.

Apesar da via do óxido nítrico ter sido descoberta em vasos sanguíneos e existirem diversos estudos sobre os seus efeitos neste músculo liso, por se tratar de uma molécula sinalizadora e um dos principais mediadores de relaxamento (ROMERO et al., 2006), também há relatos da expressão da sintase do NO no útero (YALLAMPALLI; GARFIELD; BYAM-SMITH, 1993), e neste órgão, esse gás

lipossolúvel parece ter papel importante na implantação do feto (BISWAS; KABIR; PAL, 1998; NOVARO et al., 1997).

Para avaliar a participação da via do NO no efeito tocolítico da 7-MF, utilizou-se como ferramenta farmacológica o L-NAME, um inibidor não seletivo da NOS (MUNGLUE et al., 2012). Esta enzima é a responsável pela produção do NO, utilizando como precursores a citrulina e a L-arginina (ROMERO et al., 2006). Sendo assim, uma vez inibida, se o efeito do flavonoide ocorresse por esta via, haveria atenuação do seu efeito relaxante, o que não foi observado, visto que não houve alteração dos valores de CE_{50} na ausência ($3,5 \pm 0,3 \times 10^{-5}$ M) e na presença ($4,4 \pm 1,2 \times 10^{-5}$ M) do inibidor (Gráfico 6), indicando que provavelmente, a via do NO também não está sendo modulada no efeito tocolítico da 7-MF.

Diferentemente, a potência relaxante do ZB-EtOH_{PA} foi reduzida na presença do L-NAME, sendo sugestivo que a NOS estaria sendo modulada positivamente para o extrato promover seu efeito tocolítico (FERREIRA, 2018). Deste modo, levando-nos a concluir que provavelmente, não é a atividade da 7-MF a responsável por este efeito do extrato.

Diferentemente, para o flavonoide isoliquiritigenina já foi relatada a inibição da expressão de iNOS (KIM et al., 2008), bem como a atenuação do seu efeito relaxante apresentado na presença de L-NAME (SHI et al., 2012).

Um alvo importante da via de relaxamento da musculatura lisa e um passo em comum, das principais vias que envolvem nucleotídeos cíclicos (via da AC e via do NO), são as enzimas fosfodiesterases (PDE), que são responsáveis pela hidrólise de cAMP e cGMP, resultando em seus produtos inativos 5'-AMP e 5'-GMP, que não ativam PKA e PKG, respectivamente, impedindo a via *downstream* (LUGNIER, 2006). Substâncias capazes de aumentar o conteúdo intracelular de cAMP ou cGMP mostram um potencial efeito relaxante através da inibição de PDE em diferentes tecidos (BENDER; BEAVO, 2006).

Diante desta premissa, levantou-se a hipótese que a 7-MF poderia estar inibindo as PDEs. Para confirmar, utilizou-se a aminofilina, um inibidor não seletivo de PDE (URUNO et al., 1974), porém esta hipótese foi descartada, uma vez que não houve alteração da potência da 7-MF na ausência ($CE_{50} = 3,5 \pm 0,3 \times 10^{-5}$ M) e na presença ($CE_{50} = 2,8 \pm 0,5 \times 10^{-5}$ M) do inibidor (Gráfico 7), indicando que provavelmente, não é por ativação das PDEs que o flavonoide exerce seu mecanismo tocolítico.

Igualmente, outros flavonoides também não deslocaram a curva controle de relaxamento na presença da aminofilina, como 3,6-dimetil éter galeína (CARREIRO et al., 2017). Outros inibidores de PDEs também podem ser utilizados na investigação dessa atividade, como a papaverina. Na presença deste inibidor, a potência tocolítica dos flavonoides genisteína, campferol e quercetina não foi alterada (REVUELTA; HIDALGO; CANTABRANA, 1999).

Outra forma de se induzir o relaxamento muscular liso além da ativação de vias relaxantes é a da inibição de vias contráteis. Neste contexto, a via RhoA/Rho cinase, também conhecida como via de sensibilização ao Ca^{2+} se torna de grande valia.

Várias evidências demonstram que agonistas contráteis de músculo liso atuam sobre os GPCRs utilizando vias de sinalização duais, ou seja, mediadas por $\text{G}_{12/13}$ e por $\text{G}_{q/11}$ para ativar a proteína Rho. A proteína Rho serve como um interruptor molecular que regula a sensibilidade ao Ca^{2+} de proteínas contráteis, regulando a inibição da fosfatase da cadeia leve da miosina (MLCP), estimulando assim a fosforilação de MLC em vários tipos de músculo liso (KIMURA et al., 1996; FENG et al., 1999; SOMLYO; SOMLYO, 2000).

A principal forma de contração do útero é através da ativação do complexo Ca^{2+} -CaM-MLCK, porém essa contração pode ser regulada pelo balanço entre fosforilação pela MLCK e desfosforilação através da MLCP (SOMLYO, 1999; LONGBOTTOM et al., 2000). Substâncias que ativam a via Ca^{2+} -CaM-MLCK, como o KCl e a ocitocina, podem também ativar a via RhoA/Rho cinase (SWÄRD et al., 2000).

A regulação dual realizada pelo Ca^{2+} da fosforilação e desfosforilação de MLC provavelmente leva a um aumento efetivo no nível de MLC fosforilada e contração muscular. De fato, Mita et al. (2002) mostraram que os inibidores de ROCK, bem como um inibidor da MLCK, inibiram efetivamente a contração induzida por KCl. Baseado nisto, vários estudos demonstraram que aumentos relativamente pequenos na $[\text{Ca}^{2+}]_c$ resultaram em grandes mudanças no nível de MLC fosforilada no músculo liso vascular e não vascular estimulado por KCl (MITA et al., 2002; SAKURADA et al., 2003).

Com a finalidade de avaliar se o efeito tocolítico da 7-MF seria pela inibição da via Rho cinase (ROCK), utilizou-se o Y-27632, uma substância derivada da piridina, permeável à membrana e que age competindo com o ATP pelo sítio de

ligação na ROCK, tratando-se de um inibidor não seletivo, uma vez que apresenta a mesma afinidade pela ROCK 1 e 2 (UEHATA et al., 1997).

O experimento realizado demonstrou que a curva de relaxamento da 7-MF na presença do Y-27632 foi desviada para a esquerda, com aumento da potência relaxante em torno de 22 vezes ($CE_{50} = 3,5 \pm 0,3 \times 10^{-5}$ M), quando comparada à curva controle ($CE_{50} = 1,6 \pm 0,7 \times 10^{-6}$ M, Gráfico 8), sugerindo que o flavonoide modula negativamente a via RhoA/Rho cinase para exercer seu efeito tocolítico em ratas.

Anteriormente era relatado que a via da ROCK estimulada pela contração induzida por ocitocina acontecia via mecanismo independente de Ca^{2+} (TAHARA et al., 2002). Entretanto, recentes estudos mostraram que a ativação de RhoA e ROCK apresentam regulação tanto independente de Ca^{2+} , via $G_{12/13}$, quanto dependente de Ca^{2+} , via $G_{q/11}$ -PLC β_1 -IP $_3$ - Ca^{2+} , sendo sugerido que esta ativação da RhoA/ROCK dependente de Ca^{2+} possui o envolvimento da calmodulina (SAKURADA et al., 2003).

Neste contexto, a CaM é uma proteína de destaque no processo contrátil, sendo um dos principais mediadores para a sinalização do Ca^{2+} , uma vez que ocorre ligação com alta afinidade entre estes. A CaM exerce sua atividade agindo como receptor intracelular para este íon. A ligação do Ca^{2+} induz uma mudança conformacional na proteína, permitindo que ela se ligue e ative um conjunto diversificado de proteínas alvo (KLEE; COHEN, 1988; CRIVICI; IKURA, 1995). Alguns estudos sugerem que o acoplamento Ca^{2+} -CaM ativa a proteína cinase II dependente de Ca^{2+} -CaM (CaMKII) que por sua vez ativa a ROCK (SAKURADA et al., 2003).

A CaMKII é uma serina-treonina cinase, onipresente. São relatadas 4 isoformas: α , β , δ e γ , sendo as duas primeiras restritas ao tecido nervoso e as isoformas δ e γ distribuídas em todos os tecidos (GANGOPADHYAY et al., 2003). No estado inativo, esta cinase apresenta um domínio autoinibitório que bloqueia o seu sítio ativo. Uma vez ocorrendo a ligação do complexo Ca^{2+} -CaM o domínio inibitório sofre mudança conformacional permitindo a ativação da cinase e consequentemente fosforilação dos seus alvos (MILLER; PATTON; KENNEDY, 1988; HANSON; SCHULMAN, 1992).

Diante do exposto, uma substância que modula negativamente a calmodulina, pode apresentar efeito tocolítico. Para avaliar a participação desta no efeito da 7-MF

em útero, utilizou-se como ferramenta farmacológica o calmidazolium, um inibidor da calmodulina (FERNANDEZ; CANTABRANA; HIDALGO, 1992; JOVANOVIĆ; GRBOVIĆ; TULIĆ; 1994). Diante dos resultados, observou-se uma potencialização do efeito relaxante da 7-MF, em torno de 54 vezes, como se pode observar pelos valores de CE_{50} na ausência ($3,5 \pm 0,3 \times 10^{-5}$ M) e na presença ($6,5 \pm 1,6 \times 10^{-7}$ M) do bloqueador (Gráfico 9). Dessa forma, sugere-se que o flavonoide, provavelmente, modula negativamente a calmodulina para exercer seu efeito tocolítico em rata. Uma vez que a potência relaxante da 7-MF se apresentou bem maior frente a este bloqueador, quando comparado ao Y-27632, sugere-se que o seu efeito parece ser, majoritariamente, pela ação na calmodulina, provavelmente modulando a via da ROCK de maneira indireta, apresentando assim, efeito majoritariamente intracelular.

Outro flavonoide, a quercetina, também já foi relatado na literatura como um inibidor da calmodulina *in vitro* (NISHINO et al., 1984).

Tendo em vista a importância da busca por novas alternativas terapêuticas para o tratamento das desordens que acometem a musculatura lisa uterina, destaca-se a relevância deste trabalho, uma vez que foi descrito pela primeira vez o mecanismo de ação tocolítica *in vitro*, ao menos em parte, da 7-metoxiflavona, que atua modulando negativamente a via RhoA/ROCK e a calmodulina (Figura 21), tornando-se então, uma molécula promissora para tal utilização.

- Na caracterização do mecanismo de ação tocolítica *in vitro* da 7-MF em ratas, descartou-se a participação de/da:
 - Canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem
 - Canais de K^{+}
 - Ciclo-oxigenase
 - Receptores adrenérgicos- β
 - Via do NO
 - Fosfodiesterase
- Além disso, conclui-se que a ação tocolítica da 7-MF envolve a modulação negativa da:
 - via da Rho cinase
 - da calmodulina

Referências

- ABDELLATIF, A. A. Calcium mobilizing receptors, polyphospholinositides, generation of second messengers and contraction in mammalian smooth muscle: historical perspectives and current status. **Life Sciences**, v. 45, p. 757-786, 1989.
- AGATI, G.; AZZARELLO, E.; POLLASTRI, S.; TATTINI, M. Flavonoids as antioxidants in plants: location and functional significance. **Plant Science**, v. 196, p. 67-76, 2012.
- AGRA, M. D. F.; SILVA, K. N.; BASÍLIO, I. J. L. D.; FREITAS, P. F. D.; BARBOSA-FILHO, J. M. Survey of medicinal plants used in the region Northeast of Brazil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 3, p. 472-508, 2008.
- AGRA, M. F.; FREITAS, P. F. D.; BARBOSA-FILHO, J. M. Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 1, p. 114-140, 2007.
- AGUILAR, H. N.; MITCHELL, B. F. Physiological pathways and molecular mechanisms regulating uterine contractility. **Human Reproduction Update**, v. 16, n. 6, p. 725-744, 2010.
- ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WATSON, J. D. **Molecular Biology of The Cell**. 2nd edition. New York, London: Garland Publishing; 1989.
- ALBUQUERQUE, U. P.; MEDEIROS, P. M.; ALMEIDA, A. L. S.; MONTEIRO, J. M.; NETO, E. M. D. F. L.; MELO, J. G.; SANTOS, J. P. Medicinal plants of the caatinga (semi-arid) vegetation of NE Brazil: a quantitative approach. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 114, n. 3, p. 325-354, 2007.
- ALCARAZ, L. E.; BLANCO, S. E.; PUIG, O. N.; TOMAS, F.; FERRETTI, F. H. Antibacterial activity of flavonoids against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. **Journal of Theoretical Biology**, v. 205, n. 2, p. 231-240, 2000.
- ALVES, J. A. G.; ALVES, N. G.; IBIAPINA, F. L. P.; BUSGAIB, R. P. S.; COSTA, F. S.; Ameaça de aborto: conduta baseada em evidências. **Revista FEMINA**, v. 38, n. 2, p. 111-115, 2010.
- AMBROZIN, A. R. P.; VIEIRA, P. C.; FERNANDES, J. B.; SILVA, M. F. G. F.; ALBUQUERQUE, S. Piranoflavonas inéditas e atividades tripanocidas das substâncias isoladas de *Conchocarpus heterophyllus*. **Química Nova**, v. 31, n. 4, p. 740-743, 2008.
- ANDERSCH, B.; MILSOM, I. An epidemiologic study of young women with dysmenorrhea. **American Journal of Obstetrics & Gynecology**, v. 144, n. 6, p. 655-660, 1982.
- ARAFA, A. E.; SENOSY, S. A.; HELMY, H. K.; MOHAMED, A. A. Prevalence and patterns of dysmenorrhea and premenstrual syndrome among Egyptian girls (12–25 years). **Middle East Fertility Society Journal**, 2018.
- ARROWSMITH, S.; KENDRICK, A.; WRAY, S. Drugs acting on the pregnant uterus. **Obstetrics, Gynaecology & Reproductive Medicine**, v. 20, n. 8, p. 241-247, 2010.

- ARROWSMITH, S.; WRAY, S. Oxytocin: Its mechanism of action and receptor signalling in the myometrium. **Journal of Neuroendocrinology**, v. 26, p. 356–369, 2014.
- ARUNKUMAR, R.; NAIR, S. A.; SUBRAMONIAM, A. Induction of cell-specific apoptosis and protection of mice from cancer challenge by a steroid positive compound from *Zornia diphylla* (L.) Pers. **Journal Pharmacology Pharmacotherapeutics**, v. 3, p. 233, 2012.
- ATANASOV, A. G.; WALTENBERGER, B.; PFERSCHY-WENZIG, E. M.; LINDER, T.; WAWROSCHE, C.; UHRIN, P.; TEMML, V.; WANG, L.; SCHWAIGER, S.; HEISS, E. H.; ROLLINGER, J. M.; SCHUSTER, D.; BREUSS, J. M.; BOCHKOV, V.; MIHOVILOVIC, M. D.; KOPP, B.; BAUER, R.; DIRSCH, V. M.; STUPPNER, H. Discovery and Resupply of Pharmacologically Active Plant-Derived Natural Products: A Review. **Biotechnology Advances**, v. 33, n. 8, p. 1582-1614, 2015.
- AZAM, K.; NUR, M.; RAHMAN, M.; BISWAS, S.; AHMED, M. Appraisals of Bangladeshi medicinal plants used by folk medicine practitioners in the prevention and management of malignant neoplastic diseases. **International Scholarly Research Notices**, v. 2016, p. 1-12, 2016.
- AZUMA, T.; KAYANO, S. I.; MATSUMURA, Y.; KONISHI, Y.; TANAKA, Y.; KIKUZAKI, H. Antimutagenic and α -glucosidase inhibitory effects of constituents from *Kaempferia parviflora*. **Food Chemistry**, v. 125, n. 2, p. 471-475, 2011.
- BAE, S.; D'CUNHA, R.; SHAO, J.; AN, G. Effect of 5,7-dimethoxyflavone on Bcrp1-mediated transport of sorafenib in vitro and in vivo in mice. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 117, p. 27-34, 2018.
- BAKER, J. G. The selectivity of β -adrenoceptor antagonists at the human β_1 , β_2 and β_3 adrenoceptors. **British Journal of Pharmacology**, v. 144, n. 3, p. 317-322, 2005.
- BALLAGH, S. A.; HEYL, A. Communicating with women about menstrual cycle symptoms. **The Journal of Reproductive Medicine**, v. 53, n. 11, p. 837-846, 2008.
- BARBOSA, M. R. V. Vegetação e flora no Cariri Paraibano. **Oecologia Brasiliensis**, v. 11, n. 3, p. 313-322, 2007.
- BATISTA, T. M. **Avaliação da toxicidade *in vitro* e *in vivo* do extrato hidroalcolico das partes aéreas de *Zornia brasiliensis* Vog. (Fabaceae)**. 2013. Trabalho de Conclusão de Curso (Farmácia) – Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2013.
- BEARD, R.; STUCKI, A.; SCHMITT, M.; PY, G.; GRUNDSCHÖBER, C.; GEE, A. D.; TATE, E. W. Building bridges for highly selective, potent and stable oxytocin and vasopressin analogs. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 26, n. 11, p. 3039-3045, 2018.
- BENDER, A. T.; BEAVO, J. A. Cyclic nucleotide phosphodiesterases: molecular regulation to clinical use. **Pharmacological Reviews**, v. 58, n. 3, p. 488-520, 2006.
- BERLINCK, R. G. S.; BORGES, W. S.; SCOTTI, M. T.; VIEIRA, P. C.; A Química De Produtos Naturais Do Brasil Do Século XXI. **Química Nova**, v. 40, n. 6, p. 706-10, 2017.

- BERNAL, A. L. Preterm labour: mechanisms and management. In: **BMC Pregnancy and Childbirth**. BioMed Central, p. S2, 2007.
- BERNAL, A. L. Mechanisms of labour—biochemical aspects. **BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology**, v. 110, n. s20, p. 39-45, 2003.
- BERRIDGE, M. J. Cell signalling pathways. In: **Cell Signalling Biology**. Portland: Press Limited, p. 1-130, 2012.
- BERRIDGE, M. J. Cell Signalling Pathways. In: **Cell Signalling Biology**. Portland Press Limited, p. 1-118, 2009.
- BERRIDGE, M. J. Smooth muscle cell calcium activation mechanisms. **The Journal of Physiology**, v. 586, n. 21, p. 5047-5061, 2008.
- BFG (The Brazil Flora Group). Growing knowledge: an overview of seed plant diversity in Brazil. **Rodriguésia**, v. 66, n. 4, p. 1085-1113, 2015.
- BHARDWAJ, M.; KIM, N. H.; PAUL, S.; JAKHAR, R.; HAN, J.; KANG, S. C. 5-hydroxy-7-methoxyflavone triggers mitochondrial-associated cell death via reactive oxygen species signaling in human colon carcinoma cells. **PloS One**, v. 11, n. 4, p. 1-19, 2016.
- BISWAS, S.; KABIR, S. N.; PAL, A. K. The role of nitric oxide in the process of implantation in rats. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 114, n. 1, p. 157-161, 1998.
- BITTAR, R. E.; ZUGAIBE, M.; Tratamento do trabalho de parto premature. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 31, n. 8, p. 415-422, 2009.
- BLENCOWE, H.; COUSENS, S.; OESTERGAARD, M. Z.; CHOU, D.; MOLLER, A. B.; NARWAL, R.; ADLER, A.; GARCIA, C. V.; ROHDE, S.; SAY, L.; LAWN, J. E. National, regional, and worldwide estimates of preterm birth rates in the year 2010 with time trends since 1990 for selected countries: a systematic analysis and implications. **The Lancet**, v. 379, n. 9832, p. 2162-2172, 2012.
- BOLTON, T. B. Mechanisms of action of transmitters and other substances on smooth muscle. **Physiological Reviews**, v. 59, n. 3, p. 606-718, 1979.
- BOLZANI, V. D. S. Biodiversidade, bioprospecção e inovação no Brasil. **Ciência e Cultura**, v. 68, n. 1, p. 04-05, 2016.
- BOURMEYSTER, N.; STASIA, M. J.; GARIN, J.; GAGNON, J.; BOQUET, P.; VIGNAIS, P. V. Copurification of rho protein and the rho-GDP dissociation inhibitor from bovine neutrophil cytosol. Effect of phosphoinositides on rho ADP-ribosylation by the C3 exoenzyme of *Clostridium botulinum*. **Biochemistry**, v. 31, n. 51, p. 12863-12869, 1992.
- BRAUER, M. M.; BURNSTOCK, G. Expression of β -ADRENERGIC receptors in the rat uterus: effects of puberty and oestrogen treatment during prepubertal development. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v. 16, n. 1, p. 29-39, 1998.

- BRODT-EPPLEY, J.; MYATT, L. Prostaglandin receptors in lower segment myometrium during gestation and labor. **Obstetrics & Gynecology**, v. 93, n. 1, p. 89-93, 1999.
- BROWN, A.; DANIELSSON, J.; TOWNSEND, E. A.; ZHANG, Y.; PEREZ-ZOGHBI, J. F.; EMALA, S. R. C. W.; GALLOS, G. Attenuation of airway smooth muscle contractility via flavonol-mediated inhibition of phospholipase-C β . **American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 310, n. 8, p. L747-L758, 2016.
- BUHIMSCHI, C. S.; GARFIELD, R. E.; WEINER, C. P.; BUHIMSCHI, I. A. The presence and function of phosphodiesterase type 5 in the rat myometrium. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 190, n. 1, p. 268-274, 2004.
- BULBUL, A.; YAGCI, A.; ALTUNBAS, K.; SEVIMLI, A.; CELIK, H. A.; KARADENIZ, A.; AKDAG, E. The role of nitric oxide in the effects of ovarian steroids on spontaneous myometrial contractility in rats. **Theriogenology**, v. 68, p. 1156-1168, 2007.
- CABRERA, M.; SIMOENS, M.; FALCHI, G.; LAVAGGI, M. L.; PIRO, O. E.; CASTELLANO, E. E.; VIDAL, A.; AZQUETA, A.; MONGE, A.; CERÁIN, A. L.; SAGRERA, G.; SEOANE, G. CERECETTO, H.; GONZÁLEZ, M. Synthetic chalcones, flavanones, and flavones as antitumoral agents: Biological evaluation and structure–activity relationships. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 15, n. 10, p. 3356-3367, 2007.
- CAKIR, M.; Mungan, I.; KARAKAS, T.; GIRISKEN, I.; OKTEN, A. Menstrual pattern and common menstrual disorders among university students in Turkey. **Pediatrics International**, v. 49, n. 6, p. 938-942, 2007.
- CAMARGO, A. C.; REGITANO-D'ARCE, M. A. B.; RASERA, G. B.; CANNIATTI-BRAZACA, S. G.; PRADO-SILVA, L.; ALVARENGA, V. O.; SANT'ANNA, A. S.; SHAHIDI, F. Phenolic acids and flavonoids of peanut by-products: Antioxidant capacity and antimicrobial effects. **Food Chemistry**, v. 237, p. 538-544, 2017.
- CARREIRO, J. N.; SOUZA, I. L. L.; PEREIRA, J. C.; VASCONCELOS, L. H. C.; TRAVASSOS, A. R.; SANTOS, B. V. O.; SILVA, B. A. Tocolytic action and underlying mechanism of galetin 3, 6-dimethyl ether on rat uterus. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 17, n. 1, p. 514, 2017.
- CARSTEN, M. E.; MILLER, J. D. Effects of prostaglandins and oxytocin on calcium release from a uterine microsomal fraction. **Journal of Biological Chemistry**, v. 252, n. 5, p. 1576-1581, 1977.
- CARVALHO, A. C. B.; RAMALHO, L. S.; OLIVEIRA MARQUES, R. F.; PERFEITO, J. P. S. Regulation of herbal medicines in Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 158, p. 503-506, 2014.
- CERIN, A.; COLLINS, A.; B. M. L.; ENEROTH, P. Hormonal and biochemical profiles of premenstrual syndrome: treatment with essential fatty acids. **Acta Obstetrica et Gynecologica Scandinavica**, v. 72, n. 5, p. 337-343, 1993.

- CHANG, G. J.; LIN, T. P.; KO, Y. S.; LIN, M. S. Endothelium-dependent and-independent vasorelaxation induced by CIJ-3-2F, a novel benzyl-furoquinoline with antiarrhythmic action, in rat aorta. **Life sciences**, v. 86, n. 23-24, p. 869-879, 2010.
- CHANTLER, I.; MITCHELL, D.; FULLER, A. Diclofenac potassium attenuates dysmenorrhea and restores exercise performance in women with primary dysmenorrhea. **The Journal of Pain**, v. 10, n. 2, p. 191-200, 2009.
- CHARD, T. Fetal and maternal oxytocin in human parturition. **American Journal of Perinatology**, v. 6, n. 02, p. 145-152, 1989.
- CHEN, X. M.; TAIT, A. R.; KITTS, D. D. Flavonoid composition of orange peel and its association with antioxidant and anti-inflammatory activities. **Food Chemistry**, v. 218, p. 15-21, 2017.
- CHIAPPETA, A. D. A.; MELO, J. F. Higher plants with biological activity. Plants of Pernambuco. **Revista do Instituto de Antibióticos da Universidade Federal de Recife**, v. 11, n.1/2, p. 99-111, 1984.
- CHO, H.; YUN, C. W.; PARK, W. K.; KONG, J. Y.; KIM, K. S.; PARK, Y.; LEE, S.; KIM, B. K. Modulation of the activity of pro-inflammatory enzymes, COX-2 and iNOS, by chrysin derivatives. **Pharmacological Research**, v. 49, n. 1, p. 37-43, 2004.
- CHOW, E. H.; MARSHALL, J. M. Effects of catecholamines on circular and longitudinal uterine muscle of the rat. **European Journal of Pharmacology**, v. 76, n. 2-3, p. 157-165, 1981.
- CONTI, M.; BEAVO, J. Biochemistry and physiology of cyclic nucleotide phosphodiesterases: essential components in cyclic nucleotide signaling. **Annual Review of Biochemistry**, v. 76, p. 481-511, 2007.
- CORSON, T. W.; CREWS, C. M. Molecular understanding and modern application of traditional medicines: triumphs and trials. **Cell**, v. 130, n. 5, p. 769-774, 2007.
- COSTA, E. V.; MENEZES, L. R. A.; ROCHA, S. L.; BALIZA, I. R. S.; DIAS, R. B.; ROCHA, C. A. G.; BALIZA, I. R. S.; DIAS, R. B.; ROCHA, C. A. G.; SOARES, M. B. P.; BEZERRA, D. P. Antitumor properties of the leaf essential oil of *Zornia brasiliensis*. **Planta Médica**, v. 81, p. 563-5637, 2015.
- CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Natural products: a continuing source of novel drug leads. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects**, v. 1830, n. 6, p. 3670-3695, 2013.
- CRIVICI, A.; IKURA, M. Molecular and structural basis of target recognition by calmodulin. **Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure**, v. 24, n. 1, p. 85-116, 1995.
- CSAPO, A. I. Smooth muscle as a contractile unit. **Physiological Reviews. Supplement**, v. 5, p. 7-33, 1962.
- CUSHNIE, T. T.; LAMB, A. J. Antimicrobial activity of flavonoids. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 26, n. 5, p. 343-356, 2005.
- DALEY, A. Exercise and premenstrual symptomatology: a comprehensive review. **Journal of Women's Health**, v. 18, n. 6, p. 895-899, 2009.

- DAVID, J. P.; MEIRA, M.; DAVID, J. M.; BRANDÃO, H. N.; BRANCO, A.; AGRA, M. F.; BARBOSA, M. R. V.; QUEIROZ, L. P.; GIULIETTI, A. M. Radical scavenging, antioxidante and cytotoxic activity of Brazilian Caatinga plants. **Fitoterapia**, v. 78, p. 215-218, 2007.
- DAWOOD, M. Y. Primary dysmenorrhea: advances in pathogenesis and management. **Obstetrics & Gynecology**, v. 108, n. 2, p. 428-441, 2006.
- DELIGEOROGLOU, E. Dysmenorrhea. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 900, n. 1, p. 237-244, 2000.
- DIAS, D. A.; URBAN, S.; ROESSNER, U. A historical overview of natural products in drug discovery. **Metabolites**, v. 2, n. 2, p. 303-336, 2012.
- DIAS, T. R. Z. Corticoterapia e tocolise em situações de prematuridade espontânea. **Tese (Doutorado)** – Programa de Pós-Graduação em Tocoginecologia, Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual, Campinas-SP, 2017.
- DIAS, T. Z.; FAVA, M. L.; JÚNIOR, R. P.; CECATTI, J. G.; TEDESCO, R. P.; LAJOS, G. J.; REHDER, P. M.; NOMURA, M. L.; OLIVEIRA, P. F.; COSTA, M. L. Tocolysis among Women with Preterm Birth: Associated Factors and Outcomes from a Multicenter Study in Brazil. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 40, n. 4, p. 171-9, 2018.
- DING, Y.; DING, C.; Y. E. N.; LIU, Z.; WOLD, E. A.; CHEN, H.; WILD, C.; SHEN, Q.; ZHOU, J. Discovery and development of natural product oridonin-inspired anticancer agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 122, p. 102-117, 2016.
- DINIZ, L. R. L.; ABÍLIO, G. M. F.; LOPES, J. D.; PAULO, M. Q. Avaliação toxicológica e microbiológica dos extratos de *Zornia brasiliensis* (Leguminosae - Papilionoidae). In: **I Congresso Brasileiro de Extensão Universitária, João Pessoa-PB**, 2002. Disponível em: <http://www.prac.ufpb.br/anais/lcbeu_anais/anais/saude/zornia.pdf>. Acesso em 10 de janeiro de 2017.
- DODGE, K. L.; SANBORN, B. M. Evidence for inhibition by protein kinase A of receptor/Gαq/phospholipase C (PLC) coupling by a mechanism not involving PLCβ2. **Endocrinology**, v. 139, n. 5, p. 2265-2271, 1998.
- DONG, L.; YIN, L.; ZHANG, Y.; FU, X.; LU, J. Anti-inflammatory effects of ononin on lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 cells. **Molecular Immunology**, v. 83, p. 46-51, 2017.
- DOYLE, J. J.; LUCKOW, M. A. The rest of the iceberg. Legume diversity and evolution in a phylogenetic context. **Plant Physiology**, v. 131, n. 3, p. 900-910, 2003.
- ELISABETSKY, E.; POSEY, D. A. Use of contraceptive and related plants by the Kayapo indians (Brazil). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 26, p. 299-316, 1989.
- EPPERSON, C. N.; STEINER, M.; HARTLAGE, S. A.; ERIKSSON, E.; SCHMIDT, P. J.; JONES, I.; YONKERS, K. A. Premenstrual dysphoric disorder: evidence for a new category for DSM-5. **American Journal of Psychiatry**, v. 169, n. 5, p. 465-475, 2012.

- ETO, M.; OHMORI, T.; SUZUKI, M.; FURUYA, K.; MORITA, F. A novel protein phosphatase-1 inhibitory protein potentiated by protein kinase C. Isolation from porcine aorta media and characterization. **The Journal of Biochemistry**, v. 118, n. 6, p. 1104-1107, 1995.
- FABRICANT, D. S.; FARNSWORTH, N. R. The value of plants used in traditional medicine for drug discovery. **Environmental Health Perspectives**, v. 109, p. 69, 2001.
- FARREL, A. J.; BLAKE, D. R. Nitric oxide (review). **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 55, p. 7-20, 1996.
- FENG, J.; ITO, M.; ICHIKAWA, K.; NISHIKAWA, M.; HARTSHORNE, D. J.; NAKANO, T. Inhibitory phosphorylation site for Rho-associated kinase on smooth muscle myosin phosphatase. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 274, p. 37385-37390, 1999.
- FERNANDEZ, A. I.; CANTABRANA, B.; HIDALGO, A. A. Mediators involved in the rat uterus contraction in calcium-free solution. **General Pharmacology**, v. 23, n. 2, p. 291-296, 1992.
- FERREIRA, P. S. M.; TROVÃO, D. M. B.; MELO, J. I. M. Leguminosae na APA do Cariri, Estado da Paraíba, Brasil. **Hoehnea**, v. 42, n.3, p. 531-547, 2015.
- FERREIRA, S. R. D. Atividade tocolítica *in vitro* do extrato etanólico e flavonoides isolados de *Zornia brasiliensis* Vogel (Leguminosae) em ratas. **Dissertação (Mestrado)** – Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa-PB, 2018.
- FIGUEIREDO, I. A. D. **Atividade espasmolítica não seletiva da 5,7-dimetoxiflavona isolada de *Zornia brasiliensis* Vogel (Leguminosae) e seus possíveis mecanismos de ação em aorta de rato**. Trabalho de Conclusão de Curso (Farmácia) – Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2018.
- Flora do Brasil, Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em:<<http://floradobrasil.jbrj.gov.br>>. Acesso em 15 de maio de 2018. 2015.
- FLÓREZ, L. V.; BIEDERMANN, P. H.; ENGL, T.; KALTENPOTH, M. Defensive symbioses of animals with prokaryotic and eukaryotic microorganisms. **Natural Product Reports**, v. 32, n. 7, p. 904-936, 2015.
- FRAZIER, T.; HOGUE, C. J. R.; BONNEY, E. A.; YOUNT, K. M.; PEARCE, B. D. Weathering the storm; a review of pre-pregnancy stress and risk of spontaneous abortion. **Psychoneuroendocrinology**, v. 92, p. 142-154, 2018.
- FREEMAN, M. E. The ovarian cycle of the rat. In: E. Knobil & J. Neil (eds.), **Physiology of Reproduction**. Raven Press Ltd., New York, p. 1893-1928, 1988.
- FRENCH, L. Dysmenorrhea. **American Family Physician**, v. 71, n. 2, 2005.
- FUKUMOTO, Y.; KAIBUCHI, K.; HORI, Y.; FUJIOKA, H.; ARAKI, S.; UEDA, T.; KIKUCHI, A.; TAKAI, Y. Molecular cloning and characterization of a novel type of

regulatory protein (GDI) for the rho proteins, ras p21-like small GTP-binding proteins. **Oncogene**, v. 5, n. 9, p. 1321-1328, 1990.

GANGOPADHYAY, S. S.; BARBER, A. L.; GALLANT, C.; GRABAREK, Z.; SMITH, J. L.; MORGAN, K. G. Differential functional properties of calmodulin-dependent protein kinase IIgamma variants isolated from smooth muscle. **Biochemical Journal**, v. 372, n. 2, p. 347-357, 2003.

GOMES, J. M. **Avaliação da atividade antioxidante e fotoprotetora de *Calliandra umbellifera* e *Zornia brasiliensis* (Fabaceae)**. Trabalho de Conclusão de Curso (Farmácia) – Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2016.

GOVINDARAJAN, M.; RAJESWARY, M.; MUTHUKUMARAN, U.; HOTI, S. L.; KHATER, H. F.; BENELLI, G. Single-step biosynthesis and characterization of silver nanoparticles using *Zornia diphylla* leaves: A potent eco-friendly tool against malaria and arbovirus vectors. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 161, p. 482 – 489, 2016.

GRUBER, C. W.; O'BRIEN, M. Uterotonic plants and their bioactive constituents. **Planta Medica**, v. 77, n. 3, p. 207, 2011.

GUARDIA, T.; ROTELLI, A. E.; JUAREZ, A. O.; PELZER, L. E. Anti-inflammatory properties of plant flavonoids. Effects of rutin, quercetin and hesperidin on adjuvant arthritis in rat. **Il farmaco**, v. 56, n. 9, p. 683-687, 2001.

HANCOCK, J. F.; HALL, A. A novel role for RhoGDI as an inhibitor of GAP proteins. **The EMBO Journal**, v. 12, n. 5, p. 1915-1921, 1993.

HANSON, P. I.; SCHULMAN, H. Inhibitory autophosphorylation of multifunctional Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase analyzed by site-directed mutagenesis. **Journal of Biological Chemistry**, v. 267, n. 24, p. 17216-17224, 1992.

HARADA, T.; MOMOEDA, M.; TAKETANI, Y.; HOSHIAI, H.; TERAOKAWA, N. Low-dose oral contraceptive pill for dysmenorrhea associated with endometriosis: a placebo-controlled, double-blind, randomized trial. **Fertility and Sterility**, v. 90, n. 5, p. 1583-1588, 2008.

HARLOW, S. D.; PARK, M. A longitudinal study of risk factors for the occurrence, duration and severity of menstrual cramps in a cohort of college women. **Bjog: An International Journal Of Obstetrics & Gynaecology**, v. 103, n. 11, p. 1134-1142, 1996.

HARVEY, A. L.; EDRADA-EBEL, R.; QUINN, R. J. The re-emergence of natural products for drug discovery in the genomics era. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 14, n. 2, p. 111, 2015.

HAVSTEEN, B. Flavonoids, a class of natural products of high pharmacological potency. **Biochemical Pharmacology**, v. 32, n. 7, p. 1141-1148, 1983.

HENDERSON, C. W. ACOG Issues Guidelines on Diagnosis and Treatment of PMS. **Women's Health Weekly**, p. 20-21, 2000.

- HERTELENDY, F.; ZAKAR, T. Regulation of myometrial smooth muscle functions. **Current pharmaceutical design**, v. 10, n. 20, p. 2499-2517, 2004.
- HOSZTAFI, S. The discovery of alkaloids. **Die Pharmazie**, v. 52, n. 7, p. 546-550, 1997.
- IAPT (International Association for Plant Taxonomy). **International Code of Nomenclature for algae, fungi, and plants (Melbourne Code)**. CHAPTER III: Nomenclature of taxa according to their rank. 2017. Disponível em: <<http://www.iapt-taxon.org/nomen/main.php?page=art18&emph=leguminosae>>. Acesso em 20 de janeiro de 2018.
- JIANG, N.; DOSEFF, A. I.; GROTEWOLD, E. Flavones: From biosynthesis to health benefits. **Plants**, v. 5, n. 2, p. 27, 2016.
- JIM, K.; HARRIS, A.; ROSENBERGER L. B.; TRIGGLE, D. J. Stereoselective and non-sterenselective effects of D 600 (Methoxyverapamil) in smooth muscle. **European Journal of Pharmacology**, v. 76, p. 67-72, 1981.
- JIN, S. N.; WEN, J. F.; LI, X.; KANG, D. G.; LEE, H. S.; CHO, K. W. The mechanism of vasorelaxation induced by ethanol extract of *Sophora flavescens* in rat aorta. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 137, n. 1, p. 547-552, 2011.
- JOHNSON, W. G.; CARR-NANGLE, R. E.; BERGERON, K. C. Macronutrient intake, eating habits, and exercise as moderators of menstrual distress in healthy women. **Psychosomatic Medicine**, v. 57, n. 4, p. 324-330, 1995.
- JOLY, A. B. **Botânica: Introdução à taxonomia vegetal**. 13 ed, São Paulo: Companhia Editora São Paulo, 2002.
- JOVANOVIĆ, A.; GRBOVIĆ, L.; TULIĆ, I. L-Arginine induces relaxation of human uterine artery with both intact and denuded endothelium. **European Journal of Pharmacology**, v. 256, n. 1, p. 103-107, 1994.
- JU, H.; JONES, M.; MISHRA, G. D. Premenstrual syndrome and dysmenorrhea: symptom trajectories over 13 years in young adults. **Maturitas**, v. 78, n. 2, p. 99-105, 2014.
- KABERA, J. N.; SEMANA, E.; MUSSA, A. R.; HE, X. Plant secondary metabolites: biosynthesis, classification, function and pharmacological properties. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 2, p. 377-392, 2014.
- KANG, Y. G.; CHOI, E. J.; CHOI, Y.; HWANG, J. K. 5, 7-Dimethoxyflavone induces melanogenesis in B16F10 melanoma cells through cAMP-dependent signalling. **Experimental Dermatology**, v. 20, n. 5, p. 445-447, 2011.
- KATZ, L.; BALTZ, R. H.; RICHARD, H. Natural product discovery: past, present, and future. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 43, n. 2-3, p. 155-176, 2016.
- KAUR, V.; KUMAR, M.; KAUR, P.; KAUR, S.; SINGH, A. P.; KAUR, S. Hepatoprotective activity of *Butea monosperma* bark against thioacetamide-induced liver injury in rats. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 89, p. 332-341, 2017.

- KHAN, R. A. A. Natural products chemistry: The emerging trends and prospective goals. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 26, p. 739-753, 2018.
- KHARE, C. P. Indian medicinal plants: an illustrated dictionary. **Springer Science & Business Media**, 2008.
- KIM, E. Y.; LEE, Y. J.; RHYU, M. R. Black cohosh (*Cimicifuga racemosa*) relaxes the isolated rat thoracic aorta through endothelium-dependent and-independent mechanisms. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 138, n. 2, p. 537-542, 2011.
- KIM, J. K.; MUN, S.; KIM, M. S.; KIM, M. B.; SA, B. K.; HWANG, J. K. 5,7-Dimethoxyflavone, an activator of PPAR α/γ , inhibits UVB-induced MMP expression in human skin fibroblast cells. **Experimental Dermatology**, v. 21, n. 3, p. 211-216, 2012.
- KIM, J. Y.; PARK, S. J.; YUN, K. J.; CHO, Y. W.; PARK, H. J.; LEE, K. T. Isoliquiritigenin isolated from the roots of *Glycyrrhiza uralensis* inhibits LPS-induced iNOS and COX-2 expression via the attenuation of NF- κ B in RAW 264.7 macrophages. **European Journal of Pharmacology**, v. 584, n. 1, p. 175-184, 2008.
- KIMURA, K.; ITO, M.; AMANO, M.; CHIHARA, K.; FUKATA, Y.; NAKAFUKU, M.; YAMAMORI, B.; FENG, J.; NAKANO, T.; OKAWA, K.; IWAMATSU, A.; KAIBUCHI, K. Regulation of myosin phosphatase by Rho and Rho-associated kinase (Rho-kinase). **Science**, v. 273, n. 5272, p. 245-248, 1996.
- KINGHORN, A. D.; PAN, L.; FLETCHER, J. N.; CHAI, H. The relevance of higher plants in lead compound discovery programs. **Journal of Natural Products**, v. 74, n. 6, p. 1539-1555, 2011.
- KITAZAWA, T.; MASUO, M.; SOMLYO, A. P. G protein-mediated inhibition of myosin light-chain phosphatase in vascular smooth muscle. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 88, n. 20, p. 9307-9310, 1991.
- KLAGES, B.; BRANDT, U.; SIMON, M. I.; SCHULTZ, G.; OFFERMANN, S. Activation of G12/G13 results in shape change and Rho/Rho-kinase-mediated myosin light chain phosphorylation in mouse platelets. **The Journal of Cell Biology**, v. 144, n. 4, p. 745-754, 1999.
- KLEE, C. B.; COHEN, P. The calmodulin-regulated protein phosphatase. **Molecular aspects of cellular regulation: calmodulin**, v. 5, p. 225-248, 1988.
- KNOT, H. T.; BRAYDEN, E. J.; NELSON, M. T. Calcium channels and potassium channels. In BÁRÁNY, M. **Biochemistry of smooth muscle contraction**. San Diego: Academic Press, 203-219, 1996.
- KOBAYASHI, H.; SUZUKI, R.; SATO, K.; OGAMI, T.; TOMOZAWA, H.; TSUBATA, M.; ICHINOSE, K.; ABURADA, M.; OCHIAI, W.; SUGIYAMA, K.; SHIMADA, T. Effect of *Kaempferia parviflora* extract on knee osteoarthritis. **Journal of Natural Medicines**, p. 1-9, 2018.
- KOZASA, T.; JIANG, X.; HART, M. J.; STERNWEIS, P. M.; SINGER, W. D.; GILMAN, A. G.; BOLLAG, G.; STERNWEIS, P. C. RhoGEF, a GTPase activating protein for G α 12 and G α 13. **Science**, v. 280, n. 5372, p. 2109-2111, 1998.

- KUMAR, S.; KUMAR, D.; MANJUSHA, S. K.; SINGH, N.; VASHISHTA, B. Antioxidant and free radical scavenging potential of *Citrullus colocynthis* (L.) Schrad. methanolic fruit extract. **Acta Pharmaceutica**, v. 58, p. 215–220, 2008.
- LARTEY, J.; BERNAL, A. L. Rho Proteins, Pregnancy And Labour. **Fetal and Maternal Medicine Review**, v. 20, n. 4, p. 283-299, 2009.
- LARTEY, J.; SMITH, M.; PAWADE, J.; STRACHAN, B.; MELLOR, H.; BERNAL, A. L. Up-regulation of myometrial RHO effector proteins (PKN1 and DIAPH1) and CPI-17 (PPP1R14A) phosphorylation in human pregnancy is associated with increased GTP-RHOA in spontaneous preterm labor. **Biology of Reproduction**, v. 76, n. 6, p. 971-982, 2007.
- LATORRE, R.; OBERHAUSER, A.; LABARCA, P.; ALVAREZ, O. Varieties of calcium-activated potassium channels. **Annual Review of Physiology**, v. 51, p. 385-399, 1989.
- LEE, S. E.; AHN, D. S.; LEE, Y. H. Role of T-type Ca^{2+} channels in the spontaneous phasic contraction of pregnant rat uterine smooth muscle. **The Korean Journal of Physiology & Pharmacology**, v. 13, n. 3, p. 241-249, 2009.
- LENTZ, G. M.; LOBO, R. A.; GERSHENSON, D. M.; KATZ, V. M. **Comprehensive Gynecology**. Philadelphia, PA Mosby Elsevier, 2012.
- LEROY, M. J.; PICHARD, A. L.; CABROL, D.; FERRE, F. Cyclic 3': 5'-nucleotide phosphodiesterase in human myometrium at the end of pregnancy: partial purification and characterization of the different soluble isoenzymes. **Gynecologic and Obstetric Investigation**, v. 20, n. 1, p. 27-36, 1985.
- LI, H.; ZHANG, X.; WANG, W. Anticancer activity of 5,7-dimethoxyflavone against liver cancer cell line HepG2 involves apoptosis, ROS generation and cell cycle arrest. **African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines**, v. 14, n. 4, p. 213, 2017.
- LI, S.; LI, S.; LIU, C.; LIU, C.; ZHANG, Y. Extraction and isolation of potential anti-stroke compounds from flowers of *Pueraria lobata* guided by in vitro PC12 cell model. **Journal of Chromatography B**, v. 1048, p. 111-120, 2017.
- LIMA, E. A.; MELO, J. I. M. Biological spectrum and dispersal syndromes in an area of the semi-arid region of Northeastern Brazil. **Acta Scientiarum. Health Sciences**, v. 37, n. 1, p. 91-100, 2015.
- LIMA, J. T. Mecanismo de ação espasmolítica de diplotropina em íleo de cobaia e útero de rata e estudo comparativo do seu análogo sintético. **Tese (Doutorado)** - Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa-PB, 2008.
- LIU, J.; PENG, C.; ZHOU, Q. M.; GUO, L.; LIU, Z. H.; XIONG, L. Alkaloids and flavonoid glycosides from the aerial parts of *Leonurus japonicus* and their opposite effects on uterine smooth muscle. **Phytochemistry**, v. 145, p. 128-136, 2018.
- Longbottom, E. R.; Luckas, M. J. M.; Kupittayanant, S.; Badrick, E.; Shmigol, T.; Wray, S. The effects of inhibiting myosin light chain kinase on

contraction and calcium signalling in human and rat myometrium. **Pflügers Archiv**, v. 440, n. 2, p. 315-321, 2000.

LUGNIER, C. Cyclic nucleotide phosphodiesterase (PDE) superfamily: a new target for the development of specific therapeutic agents. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 109, n. 3, p. 366-398, 2006.

LUMSDEN, M. A.; KELLY, R. W.; BAIRD, D. T. Primary dysmenorrhoea: the importance of both prostaglandins E2 and F2 α . **BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology**, v. 90, n. 12, p. 1135-1140, 1983.

MACDONALD, J. A.; BORMAN, M. A.; MURÁNYI, A.; SOMLYO, A. V.; HARTSHORNE, D. J.; HAYSTEAD, T. A. Identification of the endogenous smooth muscle myosin phosphatase-associated kinase. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 98, n. 5, p. 2419-2424, 2001.

MAGGI, M.; FANTONI, G.; PERI, A.; GIANNINI, S.; BRANDI, M.L.; ORLANDO, C. e SERIO, M. Steroid modulation of oxytocin/vasopressin receptors in the uterus. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 40, p. 481-491, 1991.

MARCONDES, F. K.; MIGUEL, K. J.; MELO, L. L.; SPADARI-BRATFISCH, R. C. Estrous cycle influences the response of female rats in the elevated plus-maze test. **Physiology & Behavior**, v. 74, n. 4-5, p. 435-440, 2001.

MARJORIBANKS, J.; PROCTOR, M.; FARQUHAR, C.; DERKS, R. S. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs for dysmenorrhea. **The Cochrane Collaboration**, p. 1-115, 2010.

MASUELLI, L.; BENVENUTO, M.; MATTERA, R.; DI STEFANO, E.; ZAGO, E.; TAFFERA, G.; TRESTOLDI, I.; GIGANTI, M. G.; FRANJESE, G. V.; BERARDI, G.; MODESTI, A.; BEI, R. In vitro and in vivo anti-tumoral effects of the flavonoid apigenin in malignant mesothelioma. **Frontiers in Pharmacology**, v. 8, p. 373, 2017.

MAUGHAN, K. L.; HEIM, S. W.; GALAZKA, S. S. Preventing postpartum hemorrhage: managing the third stage of labor. **Am Fam Physician**, v. 73, n. 6, p. 1025-8, 2006.

MEDEIROS, A. C. D.; BARBOSA, A. S.; SANTOS, R. L.; ARAÚJO, R. M.; CHAVES, T. P.; TROVÃO, D. M. B. M.; COSTA, E. M. B. M.; Atividade antimicrobiana in vitro de *Zornia reticulata* Pers frente a bactérias da cavidade oral. **XXII Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil**, Rio Grande do Sul, 2012.

MICELI, N.; BUONGIORNO, L. P.; CELI, M. G.; CACCIOLA, F.; DUGO, P.; DONATO, P.; MONDELLO, L.; BONACCORSI, I.; TAVIANO, M. F. Role of the flavonoid-rich fraction in the antioxidant and cytotoxic activities of *Bauhinia forficata* Link.(Fabaceae) leaves extract. **Natural Product Research**, v. 30, n. 11, p. 1229-1239, 2016.

MILLER, S. G.; PATTON, B. L.; KENNEDY, M. B. Sequences of autophosphorylation sites in neuronal type II CaM kinase that control Ca²⁺-independent activity. **Neuron**, v. 1, n. 7, p. 593-604, 1988.

- MISSOURI BOTANICAL GARDEN, 2017. Disponível em: <<http://www.tropicos.org/Name/13035232>>. Acesso em 14 de fevereiro de 2018.
- MITA, M.; YANAGUHARA, H.; HISHINUMA, S.; SAITO, M.; WALSH, M. P. Membrane depolarization-induced contraction of rat caudal arterial smooth muscle involves Rho-associated kinase. **Biochemistry Journal**, v. 364, p. 431–440, 2002.
- MITCHELL, M. D.; ROMERO, R. J.; EDWIN, S. S.; TRAUTMAN, M. S. Prostaglandins and parturition. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 7, n. 3, p. 623-632, 1995.
- MIYAHARA, M.; ITO, M.; ITOH, H.; SHIRAISHI, T.; ISAKA, N.; KONISHI, T.; NAKANO, T. Isoenzymes of cyclic nucleotide phosphodiesterase in the human aorta: characterization and the effects of E4021. **European Journal of Pharmacology**, v. 284, n. 1-2, p. 25-33, 1995.
- MLCEK, J.; JURIKOVA, T.; SKROVANKOVA, S.; SOCHOR, J. Quercetin and its anti-allergic immune response. **Molecules**, v. 21, n. 5, p. 623, 2016.
- MOHLENBROCK, R. H. A. Monograph of the leguminous genus *Zornia*. **Webbia**, v. 16, p. 112-113, 1961.
- MOLNAR, M. I. K. L. O. S.; HERTELENDY, F. R. A. N. K. PGF2 alpha and PGE2 binding to rat myometrium during gestation, parturition, and postpartum. **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**, v. 258, n. 5, p. E740-E747, 1990.
- MONCADA, S. R.; PALMER, M. G.; HIGGS, E. A. Nitric oxide, physiology, pathophysiology and pharmacology. **Pharmacological Reviews**, v. 43, p. 109-142, 1991.
- MUNGLUE, P.; EUMKEP, G.; WRAY, S.; KUPITTAYANANT, S. The effects of watermelon (*Citrullus lanatus*) extracts and L-citrulline on rat uterine contractility. **Reproductive Sciences**, v. 20, n. 4, p. 437-448, 2012.
- MURTHY, K. S. Signaling for contraction and relaxation in smooth muscle of the gut. **Annual Review of Physiology**, v. 68, n. 1, p. 345-374, 2006.
- MWANIKI, M. K.; ATIENO, M.; LAWN, J. E.; NEWTON, C. R. Long-term neurodevelopmental outcomes after intrauterine and neonatal insults: a systematic review. **The Lancet**, v. 379, n. 9814, p. 445-452, 2012.
- NASCIMENTO, S. C.; MELO, J. F.; CHIAPPETA, A. D. A. Cytotoxic agentes. Experiments with KB cells. **Revista do Instituto de Antibióticos da Universidade Federal de Recife**, v. 22, n. 1/2, p. 19-26, 1985.
- NASCIMENTO, Y. M.; ABREU, L. S.; LIMA, R. L.; SILVA, A. D. S.; COSTA, V. C. O.; MELO, J. I. M.; SCOTTI, M. T.; SILVA, M. S.; SOBRAL, M. V.; ARAÚJO, S. S.; GOMES-FILHO, M. A.; SILVA, M. S.; TAVARES, J. F. Zornioside, a dihydrochalcone C-glycoside, and other compounds from *Zornia brasiliensis*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 28, n. 2, p. 192-197, 2018.

- NASCIMENTO, Y. M.; ABREU, L.; LIMA, R.; MELO, J.; SILVA, M. C.; TAVARES, J. F. Identification of triterpenic saponin by HPLC-DADMS/MS in *Zornia brasiliensis*. **MOL2NET**, v. 2, p. 1- 5, 2016.
- NASCIMENTO, Y. M.; SILVA, A. D. S.; COSTA, V. C. O.; TAVARES, J. F.; SILVA, M. S. Ononina um isoflavonoide isolado de *Zornia brasiliensis* Vogel. In: **X Simpósio Brasileiro de Farmacognosia, V Simpósio de Plantas Medicinais do Vale do São Francisco**, 2015.
- NEUBIG, R. R.; SPEDDING, M.; KENAKIN, T.; CHRISTOPOULOS, A. International Union of Pharmacology Committee on Receptor Nomenclature and Drug Classification. XXXVIII. Update on terms and symbols in quantitative pharmacology. **Pharmacological Reviews**, v. 55, n. 4, p. 597-606, 2003.
- NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. **Journal of Natural Products**, v. 75, n. 3, p. 311-335, 2012.
- NGUYEN, A. M.; HUMPHREY, L.; KITCHEN, H.; REHMAN, T.; NORQUIST, J. M. A qualitative study to develop a patient-reported outcome for dysmenorrhea. **Quality of Life Research**, v. 24, n. 1, p. 181-191, 2015.
- NIMMO, A. J.; WHITAKER, E. M.; MORRISON, J. F. B.; CARSTAIRS, J. R. Multiple mechanisms of heterologous β -adrenoceptor regulation in rat uterus. **Journal of Endocrinology**, v. 147, n. 2, p. 303-309, 1995.
- NISHINO, H.; NAITOH, E.; IWASHIMA, A.; UMEZAWA, K. Quercetin interacts with calmodulin, a calcium regulatory protein. **Experientia**, v. 40, n. 2, p. 184-185, 1984.
- NODA, M.; YASUDA-FUKAZAWA, C.; MORIISHI, K.; KATO, T.; OKUDA, T.; KUROKAWA, K.; TAKUWA, Y. Involvement of rho in GTP γ S-induced enhancement of phosphorylation of 20 kDa myosin light chain in vascular smooth muscle cells: inhibition of phosphatase activity. **FEBS letters**, v. 367, n. 3, p. 246-250, 1995.
- NOVAKOVIC, R.; ILIC, B.; BELESLIN-COKIC, B.; RADUNOVIC, N.; HEINLE, H.; SCEPANOVIC R.; GOJKOVIC-BUKARICA L. The effect of resveratrol on contractility of non-pregnant rat uterus: the contribution of K⁺ channels. **Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 64, p. 795-805, 2013.
- NOVARO, V.; GONZALEZ, E.; JAWERBAUM, A.; RETTORI, V.; CANTEROS, G.; GIMENO, M. F. Nitric oxide synthase regulation during embryonic implantation. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 9, n. 5, p. 557-564, 1997.
- NWODO, O. F. C.; BOTTING, J. H. Uterotonic activity of extracts of the seeds of *Abrus precatorius*. **Planta Medica**, v. 47, n. 04, p. 230-233, 1983.
- OBI, C. L.; RAMALIVHANA, J.; SAMIE, A.; IGUMBOR, E. O. Prevalence, pathogenesis, antibiotic susceptibility profiles, and in vitro activity of selected medicinal plants against *Aeromonas* isolated from stool samples of patients in the venda region of South Africa. **Journal Health Population Nutrition**, v. 25, n. 4, p. 428-235, 2007.

- OKUNROBO, L. O.; NWAGWUOGBE, S. C.; BAFOR, E. E. Phytochemical evaluation and in vitro inhibitory effect of the methanol extract and partitioned chloroform fraction of the stem bark of *Pentaclethra macrophylla* Benth (Fabaceae) on non-pregnant rat uterus. **West African Journal of Pharmacy**, v. 23, n. 1, 2012.
- OLATUNJI-BELLO, I. I.; OBIJEIH, T. A.; MOJIMINIYI, F. B. O. Tocolytic effect of *Cajanus cajan* (in-vitro studies using the rat uterus). **Nigerian Quarterly Journal of Hospital Medicine**, v. 10, n. 4, p. 279-281, 2000.
- OLIVEIRA, F. R. M. B. **O extrato etanólico das partes aéreas de *Zornia brasiliensis* Vogel (Leguminosae) apresenta atividade antidiarreica em camundongos**. Trabalho de Conclusão de Curso (Farmácia) – Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2016.
- OLIVEIRA, F. R. M. B.; FERREIRA, S. R. D.; MORENO, G. T. A.; SILVA, A. D. S.; TAVARES, J. F.; SILVA, M. S.; CAVALCANTE, F. A. Ação espasmolítica de *Zornia brasiliensis* Vogel. (Leguminosae) envolve bloqueio do influxo de cálcio em íleo de cobaia. In: **IX Reunião da Federação de Sociedades de Biologia Experimental**, 2014, João Pessoa. Federação de Sociedades de Biologia Experimental - FeSBE Regional, 2014.
- OLIVEIRA, F. R. M. B.; FIGUEIREDO, I. A. D.; SILVA, A. R. L. F. C.; FERREIRA, S. R. D.; SILVA, A. D. S.; TAVARES, J. F.; CAVALCANTE, F. A. Pharmacological screening of *Zornia Brasiliensis* Vogel. (Leguminosae) on different smooth muscle models. In: **48º Congresso da Brasileiro de Farmacologia e Terapêutica Experimental (SBFTE)**, Foz do Iguaçu-PR, 2016.
- OLIVEIRA, R. R. B.; GÓIS, R. M. O.; SIQUEIRA, R. S.; ALMEIDA, J. R. G. S.; LIMA, J. T.; NUNES, X. P.; OLIVEIRA, V. R.; SIQUEIRA, J. S.; QUINTANS-JUNIOR, L. J. Antinociceptive effect of the ethanolic extract of *Amburana cearenses* (Allemã) A. C. Sm., Fabaceae, in rodents. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n. 3, p. 672-676, 2009.
- OTAIBI, M. A. The physiological mechanism of uterine contraction with emphasis on calcium ion. **Calcium Signaling**, v. 1, n. 2, p. 101-119, 2014.
- OTEIZA, P. I.; FRAGA, C. G.; MILLS, D. A.; TAFT, D. H. Flavonoids and the gastrointestinal tract: local and systemic effects. **Molecular Aspects of Medicine**, p. 1-9, 2017.
- OWEN, J.; HAUTH, J. C. Oxytocin for the induction or augmentation of labor. **Clinical Obstetrics and Gynecology**, v. 35, n. 3, p. 464-475, 1992.
- ÖZ, B. E.; İŞCAN, G. S.; AKKOL, E. K.; SÜNTAR, İ.; ACIKARA, Ö. B. Isoflavonoids as wound healing agents from *Ononidis Radix*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 211, p. 384-393, 2018.
- OZAKI, H.; YASUDA, K.; KIM, Y. S.; EGAWA, M.; KANZAKI, H.; NAKAZAWA, H.; HORI, M.; SETO, M.; KARAKI, H. Possible role of the protein kinase C/CPI-17 pathway in the augmented contraction of human myometrium after gestation. **British Journal of Pharmacology**, v. 140, n. 7, p. 1303-1312, 2003.

- PALMER, R. M.; FERRIGE, A. G.; MONCADA, S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. **Nature**, v. 327, n. 6122, p. 524, 1987.
- PANTHONG, A.; TASSANEYAKUL, W.; KANJANAPOTHI, D.; TANTIWACHWUTTIKUL, P.; REUTRAKUL, V. Anti-inflammatory activity of 5,7-dimethoxyflavone. **Planta Medica**, v. 55, n. 02, p. 133-136, 1989.
- PARAZZINI, F.; TOZZI, L.; MEZZOPANE, R.; LUCHINI, L.; MARCHINI, M.; FEDELE, L. Cigarette smoking, alcohol consumption, and risk of primary dysmenorrhea. **Epidemiology**, p. 469-472, 1994.
- PATRIDGE, E.; GAREISS, P.; KINCH, M. S.; HOYER, D. An analysis of FDA-approved drugs: natural products and their derivatives. **Drug Discovery Today**, v. 21, n. 2, p. 204-207, 2016.
- PEREZ, A. P. F. O gênero *Zornia* J. F. Gmel. (Leguminosae, Papilionoideae, dalbergiae): Revisão taxonômica das espécies ocorrentes no Brasil e filogenia. **Tese (Doutorado)**, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, 2009.
- PEREZ, A. P. F. *Zornia* in Lista de Espécies da Flora do Brasil. **Jardim Botânico do Rio de Janeiro**, 2016. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB29919>>. Acesso em: 03/07/2018.
- PEREZ, A. P. F.; TOZZI, A. M. G. A.; TOZZI. Nomenclatural changes for *Zornia* (Leguminosae, Papilionoideae, Dalbergieae). **Novon**, v. 2, p. 331-337, 2011.
- PEREZ-VIZCAINO, F.; FRAGA, C. G. Research trends in flavonoids and health. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 646, p. 107-112, 2018.
- PIZZOLATTI, M. G.; CUNHA-JR, A.; SZPOGANICZ, B.; SOUSA, E. D.; BRAZ-FILHO, R.; SCHRIPSEMA, J. Flavonoids glycosides from leaves and flowers of *Bauhinia forficata* (Leguminosae). **Química Nova**, v. 26, n. 4, p. 466-469, 2003.
- PYE, C. R.; BERTIN, M. J.; LOKEY, R. S.; GERWICK, W. H.; LININGTON, R. G. Retrospective analysis of natural products provides insights for future discovery trends. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 114, n. 22, p. 5601-5606, 2017.
- QIU, Z.; ZHOU, J.; HU, J.; WU, Y.; ZHENG, G. Total flavonoids from *Ampelopsis megalophylla* suppress proliferation of vascular smooth muscle cells in vivo and in vitro. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 53, n. 3, 2017.
- QUAST, U.; COOK, N. S. In vitro and in vivo comparison of two K⁺ channel openers, diazoxide and cromakalim, and their inhibition by glibenclamide. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 250, n. 1, p. 261-271, 1989.
- RAFFA, D.; MAGGIO, B.; RAIMONDI, M. V.; PLESCIA, F.; DAIDONE, G. Recent discoveries of anticancer flavonoids. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 142, p. 213-228, 2017.
- RAPKIN, A. J.; WINER, S. A. Premenstrual syndrome and premenstrual dysphoric disorder: quality of life and burden of illness. **Expert Review of Pharmacoeconomics & Outcomes Research**, v. 9, n. 2, p. 157-170, 2009.

- RATZ, P. H.; BERG, K. M.; URBAN, N. H.; MINER, A. S. Regulation of smooth muscle calcium sensitivity: KCl as a calcium-sensitizing stimulus. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, v. 288, n. 4, p. C769-C783, 2005.
- REMBOLD, C. M. Electromechanical and pharmacomechanical coupling. In: BÁRÁNY; M. **Biochemistry of Smooth Contraction**. San Diego: Academic Press, p. 227-239, 1996.
- REVUELTA, M. P.; CANTABRANA, B.; HIDALGO, A. Depolarization-dependent effect of flavonoids in rat uterine smooth muscle contraction elicited by CaCl₂. **General Pharmacology**, v. 29, n. 5, p. 847-857, 1997.
- REVUELTA, M. P.; HIDALGO, A.; CANTABRANA, B. Involvement of cAMP and β -adrenoceptors in the relaxing effect elicited by flavonoids on rat uterine smooth muscle. **Journal of Autonomic Pharmacology**, v. 19, n. 6, p. 353-358, 1999.
- RIBEIRO, P. G.; QUEIROZ, L. P.; MORIM, M. P. Leguminosae–Parapiptadenia (Mimosoideae: Mimoseae). **Sitientibus Série Ciências Biológicas**, v. 16, 2016.
- RODRIGUES, T.; REKER, D.; SCHNEIDER, P.; SCHNEIDER, G. Counting on natural products for drug design. **Nature Chemistry**, v. 8, n. 6, p. 531, 2016.
- ROJAS, A.; BAH, M.; ROJAS, J. I.; SERRANO, V.; PACHECO, S. Spasmolytic activity of some plants used by the Otomi Indians of Queretaro (México) for the treatment of gastrointestinal disorders. **Phytomedicine**, v. 6, n. 5, p. 367-371, 1999.
- ROJAS, A.; CRUZ, S.; RAUCH, V.; BYE, R.; LINARES, E.; MATA, E. Spasmolytic potential of some plants used in mexican traditional medicine for the treatment of gastrointestinal disorders. **Phytomedicine**, v. 2, n. 1, p. 51-55, 1995.
- ROMERO, M. J.; PLATT, D. H.; CALDWELL, R. B.; CALDWELL, R. W. Therapeutic use of citrulline in cardiovascular disease. **Cardiovascular Drug Reviews**, v. 24, n. 3-4, p. 275-290, 2006.
- ROUGET, C.; BARDOU, M.; BREUILLER-FOUCHÉ, M.; LOUSTALOT, C.; QI, H.; NALINE, E.; CROCI, T.; CABROL, D.; ADVENIER, C.; LEROY, M. J. β 3-Adrenoceptor is the predominant β -adrenoceptor subtype in human myometrium and its expression is up-regulated in pregnancy. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 90, n. 3, p. 1644-1650, 2005.
- ROUQUAYROL, M. Z.; FONTELES, M. C.; ALENCAR, J. E.; MATOS, J. A. F.; CRAVEIRO, A. A. Molluscicidal activity of essential oils from Northeastern Brazilian plants. **Revista Brasileira de Pesquisa Médica e Biológica**, v. 13, p. 135-143, 1980.
- RYAN, S. A. The treatment of dysmenorrhea. **Pediatric Clinics**, v. 64, n. 2, p. 331-342, 2017.
- SAE-WONG, C.; MATSUDA, H.; TEWTRAKUL, S.; TANSAKUL, P.; NAKAMURA, S.; NOMURA, Y.; YOSHIKAWA, M. Suppressive effects of methoxyflavonoids isolated from *Kaempferia parviflora* on inducible nitric oxide synthase (iNOS) expression in RAW 264.7 cells. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 136, n. 3, p. 488-495, 2011.

SAKURADA, S.; TAKUWA, N.; SUGIMOTO, N.; WANG, Y.; SETO, M.; SASAKI, Y.; TAKUWA, Y. Ca^{2+} -dependent activation of Rho and Rho kinase in membrane depolarization-induced and receptor stimulation-induced vascular smooth muscle contraction. **Circulation Research**, v. 93, n. 6, p. 548-556, 2003.

SAMSENY, R. R. A.; ANGONE, S. A.; MADINGOU, N. K.; MOUNANGA, M. B.; DATTE, J. Y. Study of pharmacological properties of the methanolic extract of *Dichrostachys cinerea* bark (L.) Wight et Arn (Leguminosae) in isolated myometrium from pregnant rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 169, p. 195-199, 2015.

SANBORN, B. M. Relationship of ion channel activity to control of myometrial calcium. **Journal of the Society for Gynecologic Investigation**, v. 7, n. 1, p. 4-11, 2000.

SANBORN, B. M.; WANG, C. Y. W.; DODGE, K. L. G protein signalling pathways in myometrium: affecting the balance between contraction and relaxation. **Reviews of Reproduction**, v. 3, p. 196-205, 1998.

SAWASDEE, P.; SABPHON, C.; SITTHIWONGWANIT, D.; KOKPOL, U. Anticholinesterase activity of 7-methoxyflavones isolated from *Kaempferia parviflora*. **Phytotherapy Research**, v. 23, p. 1792-1794, 2009.

SCHULZ, S.; HOTLING, S. The use of the lactone motif in chemical communication. **Natural Product Reports**, v. 32, n. 7, p. 1042-1066, 2015.

SEDA, M.; PINTO, F. M.; WRAY, S.; CINTADO, C. G.; NOHEDA, P.; BUSCHMANN, H.; CANDENAS, L. Functional and molecular characterization of voltage-gated sodium channels in uteri from nonpregnant rats. **Biology of Reproduction**, v. 77, n. 5, p. 855-863, 2007.

SEDGH, G.; BEARAK, J.; SINGH, S.; BANKOLE, A.; POPINCHALK, A.; GANATRA, B.; ROSSIER, C.; GERDTS, C.; TUNÇALP, O.; JOHNSON, R.; JOHNSTON, H. B.; ALKEMA, L. Abortion incidence between 1990 and 2014: global, regional, and subregional levels and trends. **The Lancet**, v. 388, n. 10041, p. 258-267, 2016.

SETTER, S. M.; ILTZ, J. L.; FINCHAM, J. E.; CAMPBELL, R. K.; BAKER, D. E. Phosphodiesterase 5 inhibitors for erectile dysfunction. **Annals of Pharmacotherapy**, v. 39, n. 7-8, p. 1286-1295, 2005.

SHI, Y.; WU, D.; SUN, Z.; YANG, J.; CHAI, H.; TANG, L.; GUO, Y. Analgesic and uterine relaxant effects of isoliquiritigenin, a flavone from *Glycyrrhiza glabra*. **Phytotherapy Research**, v. 26, n. 9, p. 1410-1417, 2012.

SHOJO, H.; KANEKO, Y. Oxytocin-induced phosphorylation of myosin light chain is mediated by extracellular calcium influx in pregnant rat myometrium. **Journal of Molecular Recognition**, v. 14, n. 6, p. 401-405, 2001.

SILVA, A. D. S.; CAVALCANTE-SILVA, L. H. A.; MATTA, C. B. B.; SILVA, D. F.; ARAÚJO, M. V.; TAVARES, J. F.; SILVA, M. S.; ALEXANDRE-MOREIRA, M. S. Antinociceptive effect of 7-methoxyflavone isolated from *Zornia brasiliensis*. **Natural Product Research**, v. 27, n. 18, p. 1-5, 2013.

- SILVA, M. F.; SOUZA, L. A. G.; CARREIRA, L. M. M. Nomes populares das leguminosas do Brasil. **Manus: Editora da Universidade Federal do Amazonas (EDUA)**, 2004.
- SILVEIRA, F. S.; MIOTTO, S. T. S. A família Fabaceae no Morro Santana, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil: aspectos taxonômicos e ecológicos. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 11, n. 1, p. 93-114, 2013.
- SLATTERY, M. M.; MORRISON, J. J. Preterm delivery. **The Lancet**, v. 360, n. 9344, p. 1489-1497, 2002.
- SMITH, R. P. Dysmenorrhea and Menorrhagia. **Springer International Publising**, p. 1-17, 2018.
- SMYTH, E. M.; GROOSER, T.; FITZGERALD, G. A. Autacoides derivados dos lípidios: eicosanoides e fator ativador plaquetário. In: BRUNTON, L. L.; CHABNER, B. A.; KNOLLMANN, B. C. (Ed.) **As bases farmacológicas da terapêutica de Goodman & Gilman**. 12^o ed. San Diego, CA: The McGraw-Hill Companies, 2012.
- SOMLYO, A. P. Kinases, myosin phosphatase and Rho proteins: curiouser and curiouser. **The Journal of Physiology**, v. 516, n. 3, p. 630-630, 1999.
- SOMLYO, A. P.; SOMLYO, A. V. Ca^{2+} sensitivity of smooth muscle and nonmuscle myosin II: modulated by G proteins, kinases, and myosin phosphatase. **Physiological Reviews**, v. 83, n. 4, p. 1325-1358, 2003.
- SOMLYO, A. P.; SOMLYO, A. V. Signal transduction by G-proteins, Rho-kinase and protein phosphatase to smooth muscle and non-muscle myosin II. **Journal Physiology**, v. 522, p. 177-185, 2000.
- SONG, Y.; KIM, M. B.; KIM, C.; KIM, J.; HWANG, J. K. Adipocytes and high-fat diet-induced obese C57BL/6J mice. **Journal of Medicinal Food**, v. 19, n. 12, p. 1111-1119, 2016.
- SOOKKONGWAREE, K.; GEITMANN, M.; ROENGSUMRAN, S.; PETSOM, A.; DANIELSON, U. H. Inhibition of viral proteases by Zingiberaceae extracts and flavones isolated from *Kaempferia parviflora*. **Die Pharmazie**, v. 61, n. 8, p. 717-721, 2006.
- SOUZA, R. G.; TSENG, H.; GAGE, J. A.; MANI, A.; DESAI, P.; LEONARD, F.; LIAO, A.; LONGO, M. REFUERZO, J. S.; GODIN, B. Magnetically bioprinted human myometrial 3d cell rings as a model for uterine contractility. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 4, p. 1-10, 2017.
- SPORNITZ, U. M.; SOCIN, C. D.; DRAVID, A. A. Estrous stage determination in rats by means of scanning electron microscopic images of uterine surface epithelium. **The Anatomical Record: An Official Publication of the American Association of Anatomists**, v. 254, n. 1, p. 116-126, 1999.
- SUN, L.; LIU, L.; ZONG, S.; WANG, Z.; ZHOU, J.; XU, Z.; DING, G.; XIAO, W.; KOU, J. Traditional Chinese medicine Guizhi Fuling capsule used for therapy of dysmenorrhea via attenuating uterus contraction. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 191, p. 273-279, 2016.

- SWÄRD, K.; DREJA, K.; SUSNJAR, M.; HELLSTRAND, P.; HARTSHORNE, D. J.; WALSH, M. P. Inhibition of Rho-associated kinase blocks agonist-induced Ca^{2+} sensitization of myosin phosphorylation and force in guinea-pig ileum. **The Journal of Physiology**, v. 522, n. 1, p. 33-49, 2000.
- TA, N.; WALLE, T. Aromatase inhibition by bioavailable methylated flavones. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 107, n. 1, p. 127-129, 2007.
- TAHARA, M.; MORISHIGE, K. I.; SAWADA, K.; IKEBUCHI, Y.; KAWAGISHI, R.; TASAKA, K.; MURATA, Y. RhoA/Rho-Kinase cascade is involved in oxytocin-induced rat uterine contraction. **Endocrinology**, v. 143, p. 920-929, 2002.
- TAN, A. C.; KONCZAK, I.; LI, G.; ROUFOGALIS, B. D.; SEKHON, B.; SZE, D. M. Y. An ethnopharmacological approach to the preliminary screening of native Australian herbal medicines for anticancer activity. **Journal of Complementary and Integrative Medicine**, v. 12, n. 3, p. 245-249, 2015.
- TAYLOR, S. S.; ZHANG, P.; STEICHEN, J. M.; KESHWANI, M. M.; KORNEV, A. P. PKA: lessons learned after twenty years. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics**, v. 1834, n. 7, p. 1271-1278, 2013.
- TEP-AREENAN, P.; SAWASDEE, P.; RANDALL, M. Possible mechanisms of vasorelaxation for 5,7-dimethoxyflavone from *Kaempferia parviflora* in the rat aorta. **Phytotherapy Research**, v. 24, n. 10, p. 1520-1525, 2010.
- TEWTRAKUL, S.; SUBHADHIRASAKUL, S.; KUMMEE, S. Anti-allergic activity of compounds from *Kaempferia parviflora*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 116, n. 1, p. 191-193, 2008.
- NASIM, A.; BABINEUAU, M.; BAILEY, C. D. et. al.; The Legume Phylogeny Working Group (LPWG). A new subfamily classification of the Leguminosae based on a taxonomically comprehensive phylogeny. **Taxon**, v. 66, p. 44-77, 2017.
- TRAN, Q. K.; OHASHI, K.; WATANABE, H. Calcium signalling in endothelial cells, **Cardiovasc Research**, v. 48, p. 13-22, 2000.
- TRAXLER, M. F.; KOLTER, R. Natural products in soil microbe interactions and evolution. **Natural Product Reports**, v. 32, n. 7, p. 956-970, 2015.
- TSUJI, P. A.; WALLE, T. Inhibition of benzo [a] pyrene-activating enzymes and DNA binding in human bronchial epithelial BEAS-2B cells by methoxylated flavonoids. **Carcinogenesis**, v. 27, n. 8, p. 1579-1585, 2006.
- UEHATA, M.; ISHIZAKI, T.; SATOH, H.; ONO, T.; KAWAHARA, T.; MORISHITA, T.; TAMAKAWA, H.; YAMAGAMI, K.; INUI, J.; MAEKAWA, M.; NARUMIYA, S. Calcium sensitization of smooth muscle mediated by a Rho-associated protein kinase in hypertension. **Nature**, v. 389, n. 6654, p. 990, 1997.
- URUNO, T.; TAKAYANAGI, I.; TOKUNAGA, M.; KUBOTA, K.; TAKAGI, K. Actions of papaverine, aspaminol and bile salts and intracellular cyclic AMP level. **The Japanese Journal of Pharmacology**, v. 24, n. 5, p. 681-686, 1974.

- VALLERA, C.; CHOI, L. O.; CHA, C. M.; HONG, R. W. Uterotonic medications: Oxytocin, methylergonovine, carboprost, misoprostol. **Anesthesiology Clinics**, v. 35, n. 2, p. 207-219, 2017.
- VASCONCELOS, L. H. C.; CORREIA, A. C. C.; SOUZA, I. L. L.; SILVA, M. C. C.; PAREDES-GAMERO, E. J.; SANTOS, B. V. O.; CAVALCANTE, F. A.; SILVA, B. A. Flavonoid galetin 3, 6-dimethyl ether attenuates guinea pig ileum contraction through K⁺ channel activation and decrease in cytosolic calcium concentration. **European Journal of Pharmacology**, v. 767, p. 52-60, 2015.
- VERPOORTE, R. Exploration of nature's chemodiversity: the role of secondary metabolites as leads in drug development. **Drug Discovery Today**, v. 3, n. 5, p. 232-238, 1998.
- VERPOORTE, R. Pharmacognosy in the new millennium: leadfinding and biotechnology. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 52, n. 3, p. 253-262, 2000.
- VINAYAGAM, R.; XU, B. Antidiabetic properties of dietary flavonoids: a cellular mechanism review. **Nutrition & Metabolism**, v. 12, n. 1, p. 60, 2015.
- VIRTUOSO, S.; DAVET, A.; DIAS, J. F. G.; CUNICO, M. M.; MIGUEL, M. D.; OLIVEIRA, A. B.; MIGUEL, O. G. Estudo preliminar da atividade antibacteriana das cascas de *Erythrina velutina* Willd., Fabaceae (Leguminosae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, n. 2, p. 137-142, 2005.
- WANG, L.; WANG, X.; WANG, W.; CHEN, C.; RONNENBERG, A. G.; GUANG, W.; HUANG, A.; FANG, Z.; WANG, L.; XU, X. Stress and dysmenorrhoea: a population based prospective study. **Occupational and Environmental Medicine**, v. 61, n. 12, p. 1021-1026, 2004.
- WEN, X.; WALLE, T. Cytochrome P450 1B1, a novel chemopreventive target for benzo [a] pyrene-initiated human esophageal cancer. **Cancer Letters**, v. 246, n. 1, p. 109-114, 2007.
- WEN, X.; WALLE, T. Preferential induction of CYP1B1 by benzo [a] pyrene in human oral epithelial cells: impact on DNA adduct formation and prevention by polyphenols. **Carcinogenesis**, v. 26, n. 10, p. 1774-1781, 2005.
- WEN, X.; WALLE, U. K.; WALLE, T. 5,7-Dimethoxyflavone downregulates CYP1A1 expression and benzo [a] pyrene-induced DNA binding in Hep G2 cells. **Carcinogenesis**, v. 26, n. 4, p. 803-809, 2005.
- WESTON, A. H.; EDWARDS, G. Recent progress in potassium channel opener pharmacology. **Biochemical Pharmacology**, v. 43, n. 1, p. 47-54, 1992.
- WHITE, F. A.; BHANGOO, S. K.; MILLER, R. J. Chemokines: integrators of pain and inflammation. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 4, n. 10, p. 834, 2005.
- WINK, M. Evolution of secondary metabolites in legumes (Fabaceae). **South African Journal of Botany**, v. 89, p. 164-175, 2013.
- WOJCIECHOWSKI, M. F. Reconstructing the phylogeny of legumes (Leguminosae): an early 21st century perspective. In: KLITGAARD, B. B.; BRUNEAU, A. (ed.).

Advances in Legume Systematic. **Kew: Royal Botanic Gardens**, v. 10, p. 5-35, 2003.

WRAY, S. Uterine contraction and physiological mechanisms of modulation. **American Journal of Physiology**, v. 264, p. C1-C18, 1993.

WRAY, S.; BURDYGA, T.; NOBLE, D.; NOBLE, K.; BORYSOVA, L.; ARROWSMITH, S. Progress in understanding electro-mechanical signalling in the myometrium. **Acta Physiologica**, v. 213, 417–431, 2015.

XU, B. J.; YUAN, S. H.; CHANG, S. K. C. Comparative analyses of phenolic composition, antioxidant capacity, and color of cool season legumes and other selected food legumes. **Journal of Food Science**, v. 72, n. 2, p. S167-S177, 2007.

YALLAMPALLI, C.; GARFIELD, R. E.; BYAM-SMITH, M. Nitric oxide inhibits uterine contractility during pregnancy but not during delivery. **Endocrinology**, v. 133, n. 4, p. 1899-1902, 1993.

YANG, Z.; PAN, A.; ZUO, W.; GUO, J.; ZHOU, W. Relaxant effect of flavonoid naringenin on contractile activity of rat colonic smooth muscle. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 155, n. 2, p. 1177-1183, 2014.

YONKERS, K. A.; KORNSTEIN, S. G.; GUEORGUIEVA, R.; MERRY, B.; VAN STEENBURGH, K.; ALTEMUS, M. Symptom-onset dosing of sertraline for the treatment of premenstrual dysphoric disorder: a randomized clinical trial. **JAMA Psychiatry**, v. 72, n. 10, p. 1037-1044, 2015.

YONKERS, K. A.; SIMONI, M. K. Premenstrual disorders. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 218, p. 68-74, 2018.

YU, D.; DUAN, Y.; BAO, Y.; WEI, C.; AN, L. Isoflavonoids from *Astragalus mongholicus* protect PC12 cells from toxicity induced by L-glutamate. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 98, n. 1-2, p. 89-94, 2005.

ZHANG, H.; TSAO, R. Dietary polyphenols, oxidative stress and antioxidant and anti-inflammatory effects. **Current Opinion in Food Science**, v. 8, p. 33-42, 2016.

ZHANG, W. W.; FENG, X. U.; DING, W. A. N. G.; JIA, Y. E.; SHAO-QING, C. A. I. Buyang Huanwu Decoction ameliorates ischemic stroke by modulating multiple targets with multiple components: In vitro evidences. **Chinese Journal of Natural Medicines**, v. 16, n. 3, p. 194-202, 2018.

Anexo 1 – Certidão de aprovação do projeto junto à Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFPB).



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA)



CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado “**Avaliação da atividade tocolítica *in vitro* de *Zornia brasiliensis* Vogel (Leguminosae) em ratas**” protocolo nº **103/2017** sob a responsabilidade da pesquisadora Dra. **Fabiana de Andrade Cavalcante** – que envolve a produção, manutenção e/ou a utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal da Paraíba (CEUA-UFPB) em reunião de 03/08/2017.

Vigência do Projeto	2017 - 2019
Espécie/linhagem	Rato Wistar (<i>Rattus norvegicus</i>)
Número de animais	96 animais
Idade/peso	2 meses/ 180 - 250 g
Sexo	Fêmeas
Origem	Unidade de Produção Animal (UPA) do IPeFarM - UFPB

Profa. Dra. Islania Giselia Albuquerque Gonçalves
Coordenadora da CEUA-UFPB