

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

Atividade tocolítica *in vitro* do extrato etanólico e flavonoides isolados de
***Zornia brasiliensis* Vogel (Leguminosae) em ratas**

Sarah Rebeca Dantas Ferreira

João Pessoa-PB
2018

Sarah Rebeca Dantas Ferreira

**Atividade tocolítica *in vitro* do extrato etanólico e flavonoides isolados de
Zornia brasiliensis Vogel (Leguminosae) em ratas**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação de 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

F383a Ferreira, Sarah Rebeca Dantas.

Atividade tocolítica in vitro do extrato etanólico e flavonoides isolados de *Zornia brasiliensis* Vogel (Leguminosae) em ratas / Sarah Rebeca Dantas Ferreira.

- João Pessoa, 2018.

152 f. : il.

Orientação: Fabiana de Andrade Cavalcante.

Dissertação (Mestrado) - UFPB/CCS.

1. Produtos naturais. 2. Efeito tocolítico - Útero de rata. 3. Atividade tocolítica. I. Cavalcante, Fabiana de Andrade. II. Título.

UFPB/BC

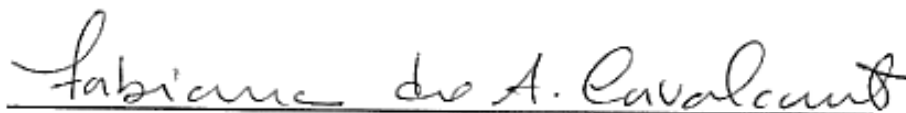
Sarah Rebeca Dantas Ferreira

**Atividade tocolítica *in vitro* do extrato etanólico e flavonoides isolados de
Zornia brasiliensis Vogel (Leguminosae) em ratas**

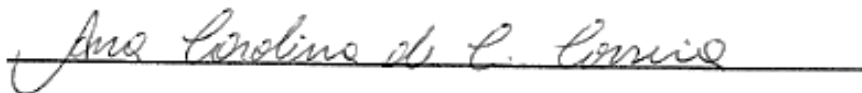
Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação de Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, do Centro de Ciências da Saúde, da Universidade Federal da Paraíba, como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos. **Área de concentração: farmacologia**

Aprovada em 26/02/2018

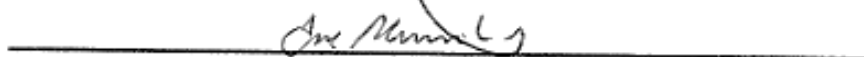
BANCA EXAMINADORA



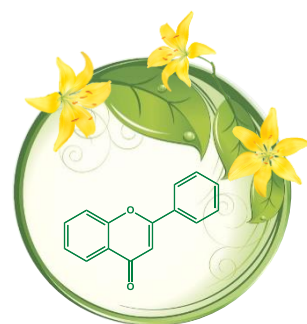
**Profa. Dra. Fabiana de Andrade Cavalcante
(Universidade Federal da Paraíba)
Orientadora**



**Profa. Dra. Ana Carolina de Carvalho Correia
(Universidade de Pernambuco)
Examinadora externa**



**Prof. Dr. Isac Almeida de Medeiros
(Universidade Federal da Paraíba)
Examinador Interno**



Dedicatórias

Aos meus pais, Marta Delanes Dantas de Araújo e Francisco Ferreira de Assis Filho, por serem a minha base, minha inspiração e o motivo de eu querer ser melhor a cada dia.

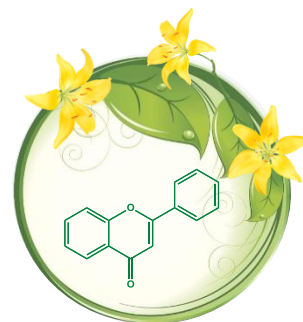
A minha irmã, Sarhanna Raquel Dantas Ferreira, pela cumplicidade, pelo carinho, por me defender, por estar sempre presente e apenas por existir.

As minhas avós, Marineide Dantas de Araújo e Francisca Helena da Silva Fernandes (*in memoriam*), por não esquecerem de mim em suas orações e por sempre vibrarem a cada conquista.

Aos meus tios, José Antônio de Sousa e Maria Alice Dantas, pela paciência, pelo zelo e pelo carinho que sempre tiveram comigo.

As minhas tias, Espedita da Silva Ferreira Melo, Jocicleide Ferreira Melo, Josileide Ferreira da Silva, Francisca das Chagas Silva Barbosa e Cleony Dantas de Assis, por sempre estarem presentes, mesmo à distância, por torcerem e orarem por mim.

A vocês eu dedico.



Agradecimentos

Deus em toda sua grandeza, não me poupou de suas bênçãos, de seu cuidado, de sua proteção e principalmente não poupou ao colocar tantas pessoas maravilhosas no meu caminho. A Ele devo tudo que tenho e sou, todas as minhas escolhas e todas as minhas vitórias, as que chegaram e as que ainda estão por vir.

A minha orientadora, Profa. Dra. Fabiana de Andrade Cavalcante, pelos ensinamentos durante todos esses anos, tanto no âmbito profissional, como pessoal, pelo carinho com que sempre me tratou, por torcer e vibrar a cada conquista e por sempre cuidar dos seus alunos como se fossem filhos. A melhor forma de ensinar ainda é através do amor, amor pelo que faz e por quem faz, muito obrigada por tudo.

À Profa. Dra. Bagnólia Araújo da Silva, pela excelência como professora e por ter sido a muitos anos a impulsionadora de todas as minhas escolhas profissionais, a partir do momento que me aceitou no Laboratório de Farmacologia Funcional Prof. George Thomas. Obrigada por todas as dicas, por tirar todas as dúvidas e por todas as correções que a senhora sempre se disponibilizou a fazer sem hesitar.

Aos Profs. Drs. Josean Fachine Tavares e Marcelo Sobral, bem como a Anne Deyse Soares da Silva por gentilmente cederem os produtos-teste para a realização deste trabalho.

Aos membros titulares da banca, Ana Carolina de Carvalho Correia e Isac Almeida de Medeiros, bem como aos suplentes Cibério Landim Macêdo e Camille de Moura Balarini, por aceitarem participar da banca examinadora e pelas valiosas contribuições ao trabalho final.

À Anne Dayse Soares da Silva e à Ana Carolina de Carvalho Correia, além de outras contribuições, por me ensinarem os primeiros protocolos experimentais há alguns anos atrás e por toda paciência.

À Rayane Fernandes Pessoa, Rafael Lima Marinho Paiva e João Pedro Moura Lima, alunos de iniciação científica, vocês se tornaram mais que amigos, são parceiros, companheiros e seres humanos cheios de luz, capazes de transformar as coisas mais pesadas em leves. Obrigada por toda ajuda, seja nos experimentos, nas correções ou me acompanhando nas madrugadas de experimento. Eu jamais esquecerei tudo que fizeram por mim e vou estar sempre por perto, na torcida pelos seus sucessos e ajudando no que vocês precisarem, amo vocês.

À Indyra Alencar Duarte Figueiredo, aluna de iniciação científica, uma amiga de longa data, que já me acompanhou em tantas batalhas, sempre sendo alguém a quem posso recorrer. Obrigada pela amizade, pela parceria, pela ajuda nos

experimentos, na escrita, nas decisões a serem tomadas e por ser tão parecida comigo em diversos aspectos. Sua beleza interior consegue ser ainda maior que a exterior.

À mestranda Laiz Aline Silva Brasileiro, por dividir comigo a bancada em muitos momentos e por se mostrar um ser humano de coração gigantesco, cheio de empatia, compaixão e vontade de ajudar o próximo. Nunca esquecerei o que você fez por mim.

Aos doutorandos, amigos, incentivadores e exemplos de profissionais, Luiz Henrique César Vasconcelos e Lara Leão Luna, obrigada por toda ajuda, por todos os bons momentos, por todos os ensinamentos durante todos esses anos de laboratório. Vocês, com certeza, contribuíram para aliviar os momentos mais difíceis.

A César Gonçalves Dantas e Carlos Arthur Gouveia, por serem os melhores presentes que o mestrado pôde me dar, por compartilharem comigo tantas dificuldades, inseguranças, mas também tantos momentos bons.

A Danilo Duarte, pela amizade e cumplicidade desde a graduação, por ser minha dupla nos seminários do mestrado e alguém com quem eu sempre vou poder contar.

Aos amigos que iniciaram comigo a jornada acadêmica, Giulyane Targino e Filipe Oliveira. A distância não mudou o carinho, os melhores desejos para vida um do outro e a vontade de ajudar sempre que se seja necessário ou não.

Alguns membros da “5ª série” não mencionados anteriormente como Alana Costa, Luiz Henrique Agra, Antônio Raphael Cavalcanti e Bárbara Cavalcanti (que também nos presenteou com o pequeno Rafael) por todas as conversas, sejam científicas ou não, por fazerem piadas mesmo das situações mais complicadas, por torcerem e mandarem boas vibrações a cada nova etapa e por estarem sempre disponíveis para ajudar.

À Giuliana Amanda de Oliveira, um ser humano cheio de qualidades, de sinceridade e de empatia. Obrigada pela amizade, pela torcida e pelas histórias compartilhadas.

A toda a equipe que fez ou faz parte do laboratório de Farmacologia Funcional Prof. George Thomas, Alana Cristina Costa, Aline de Freitas Brito, Ana Carolina de Carvalho Correia, Anderson Fillyp Avelino Diniz, Antônio Raphael Cavalcanti, Bárbara Cavalcanti Barros, Elba dos Santos Ferreira, Fabio de Souza Monteiro, Filipe Rodolfo Moreira Borges de Oliveira, Francisco Fernandes Lacerda Júnior, Gislaine Alves de Oliveira, Giuliana Amanda de Oliveira, Giulyane Targino Aires Moreno, Iana Vitória de

Souza Oliveira, Iara Leão Luna, Indyra Alencar Duarte Figueiredo, Italo Rossi Martins, João Pedro Moura, Joedna Cavalcante Pereira, José Lucas Ferreira Marques Galvão, Kimã Barbosa Meira, Laiz Aline Silva Brasileiro, Layanne Cabral da Cunha Araújo, Luiz Henrique César Vasconcelos, Maria da Conceição Correia e Silva, Maria Thaynan de Lima Carvalho, Milena de Melo Medeiros, Paula Benvindo Ferreira, Rafael Lima Marinho Paiva, Rayane Fernandes Pessoa, Renata de Souza Sampaio e Thiago Afonso Melo, todos contribuíram de alguma forma para o meu crescimento, pela boa convivência e pela ajuda, obrigada.

À Roberta Parentoni e ao José Crispim Duarte, pela competência com que conduzem o Biotério “Prof. Thomas George”, pela forma gentil que sempre me tratam e por ajudarem sempre que necessário.

A Sr. Luís C. Silva e a Adriano S. Cordeiro, pelo trabalho executado no Biotério e pela prestatividade com a qual sempre nos ajudaram.

À Mônica R. da Silva, pelo eterno bom humor, por emanar boas energias, boas vibrações, por ser o tipo de pessoa que melhora a vida do outro só por existir e pelo seu trabalho na limpeza que é essencial.

Ao Professor João Samuel Meira, do Conselho Federal de Farmácia, pelo apoio financeiro concedido para participação em eventos científicos.

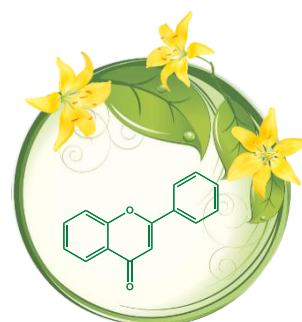
Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela bolsa concedida durante os 2 anos de mestrado.

À Universidade Federal da Paraíba, ao Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos (IPeFarM) e ao Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos (PPgPNSB) pelo apoio físico e institucional.

Ao coordenador do PPgPNSB, Josean Fachine Tavares, bem como ao vice-coordenador, Damião Pergentino de Souza e as secretárias, Caroline Manguiera e Nilmar Níncia Neves de Medeiros, por conduzirem o programa e por toda a ajuda quando necessário.

A todos que, de maneira direta ou indireta, contribuíram para a produção dessa dissertação de mestrado.

Sarah Rebeca Dantas Ferreira

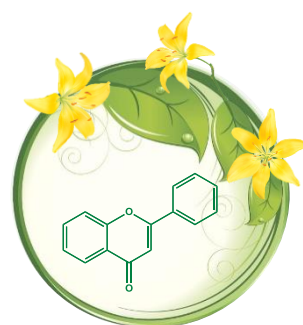


Resumo

RESUMO

Uma vez que o extrato etanólico obtido das partes aéreas de *Z. brasiliensis* (ZB-EtOH_{PA}) apresentou efeito espasmolítico em diversos músculos lisos, incluindo íleo e traqueia de cobaia, aorta e corpo cavernoso de rato e útero de rata, decidiu-se caracterizar o mecanismo de ação tocolítica *in vitro* do ZB-EtOH_{PA} em ratas, além de avaliar e comparar um possível efeito tocolítico de flavonoides isolados desta espécie. Após eutanasiadas, o útero era montado em cubas de banhos para órgão isolado onde as contrações isotônicas e isométricas eram monitoradas (n = 5). Sabendo que previamente o ZB-EtOH_{PA} apresentou efeito tocolítico em útero de rata frente às contrações fásicas, decidiu-se investigar seu efeito sobre as contrações tônicas induzidas por ocitocina (OCI) (CE₅₀ = 5,5 ± 1,3 µg/mL). Como uma das principais vias de relaxamento do músculo liso é a via do óxido nítrico (NO), decidiu-se avaliar a participação dessa via no efeito tocolítico do ZB-EtOH_{PA}. Para tanto, utilizou-se L-NAME, um inibidor não seletivo de sintase do NO (NOS) e foi observado que a potência relaxante foi diminuída cerca de seis vezes (CE₅₀ = 35,6 ± 6,2 µg/mL), sendo essa redução parcialmente revertida na presença concomitante de L-NAME (10⁻⁴ M) e L-arginina (10⁻³ ou 3 x 10⁻³ M), substrato para a NOS (CE₅₀ = 24,8 ± 3,1 µg/mL e 45,4 ± 7,0 µg/mL, respectivamente), confirmando o envolvimento da via do NO no efeito tocolítico do ZB-EtOH_{PA}. Seguindo a via *downstream* de sinalização intracelular do NO, o próximo passo investigado foi a participação da ciclase de guanilil solúvel (sCG) e da proteína cinase G (PKG). Com isso, observou-se que a potência tocolítica do extrato foi reduzida cerca de 5 e 3 vezes na presença do ODQ, um inibidor da sCG (CE₅₀ = 36,9 ± 7,3 µg/mL) e do Rp-8-Br-PET-cGMPS, um inibidor da PKG (CE₅₀ = 15,4 ± 2,7 µg/mL), respectivamente, confirmando a modulação positiva da via do NO/sCG/PKG no seu efeito tocolítico. Como um dos alvos da PKG são os canais de cálcio dependentes de voltagem (Ca_v), propôs-se que o extrato estaria inibindo esses canais. Observou-se que o extrato relaxou o útero pré-contraído com KCl (CE₅₀ = 22,0 ± 1,3 µg/mL), sugerindo uma participação destes canais. Para confirmar essa hipótese, foram realizadas curvas cumulativas ao CaCl₂ na ausência e na presença do ZB-EtOH_{PA}, e observou-se um deslocamento dessas curvas controle para direita na presença do extrato com redução do seu efeito máximo. Além disso, o ZB-EtOH_{PA} relaxou o útero pré-contraído com S-(-)-Bay K8644, um agonista dos Ca_v1, com uma potência cerca de 4 vezes menor (CE₅₀ = 84,3 ± 10,6 µg/mL) em comparação ao efeito observado com KCl, demonstrando que o extrato inibe de forma indireta o influxo de Ca²⁺ através dos Ca_v1. Como a PKG também pode modular os canais de K⁺, investigou-se o efeito do extrato na presença de cloreto de cério, um bloqueador não seletivo de canais de K⁺ e foi observado um desvio para direita da curva controle do extrato com redução da potência tocolítica (CE₅₀ = 27,1 ± 3,0 µg/mL), o que confirma a participação dos canais de K⁺ no efeito tocolítico do ZB-EtOH_{PA}. Para verificar qual subtipo de canal de K⁺ estaria envolvido nesse efeito do extrato, utilizou-se bloqueadores seletivos, e observou-se que a potência tocolítica foi reduzida na presença de tetraetilamônio (CE₅₀ = 16,8 ± 2,8 µg/mL); de apamina (CE₅₀ = 22,0 ± 3,3 µg/mL); de glibenclamida (CE₅₀ = 28,2 ± 5,3 µg/mL) e de 4-aminopiridina (CE₅₀ = 73,2 ± 13,4 µg/mL), bloqueadores de canais de potássio: ativados por cálcio de grande (BK_{Ca}) e de pequena condutância (SK_{Ca}), sensíveis ao trifosfato de adenosina (K_{ATP}) e dependentes de voltagem (K_v), respectivamente. Não foi observado efeito sinérgico quando se incubou simultaneamente todos os bloqueadores acima citados. Também foi avaliado o efeito tocolítico de dois flavonoides isolados do ZB-EtOH_{PA}, 7-metoxiflavona (7-MF) e 5,7-dimetoxiflavona (5,7-DMF), e observou-se que ambos apresentaram efeito tocolítico, sendo a 7-MF equipotente frente à OCI (CI₅₀ = 3,2 ± 0,9 x 10⁻⁵ M) e ao CCh (CI₅₀ = 4,3 ± 0,4 x 10⁻⁵ M) e a 5,7-DMF com potência cerca de 2 vezes maior frente ao CCh (CI₅₀ = 1,7 ± 0,3 x 10⁻⁵ M) em relação à OCI (CI₅₀ = 4,2 ± 1,0 x 10⁻⁵ M). Dessa forma, o mecanismo de ação tocolítica proposto para o ZB-EtOH_{PA} em rata pode ter envolvimento da modulação positiva na via NO/sGC/PKG e canais de K⁺, e bloqueio dos Cav1 e, consequentemente, diminuição do influxo de Ca²⁺, promovendo relaxamento do músculo liso uterino. Além disso, os flavonoides, 7-MF e 5,7-DMF, provavelmente são os responsáveis pelo efeito tocolítico do extrato.

Palavras-chave: espasmolítico, metoxiflavona, útero de rata, óxido nítrico, canais iônicos.



Abstract

ABSTRACT

Once the ethanolic extract from the *Z. brasiliensis* aerial parts (ZB-EtOH_{AP}) showed a spasmolytic effect in several smooth muscles, including ileum and trachea of guinea pig, rat aorta and cavernous body, and rat uterus, it was decided to characterize the mechanism of in vitro tocolytic action of ZB-EtOH_{AP} in rats, in addition to evaluating and comparing a possible tocolytic effect of flavonoids isolated from this species. After euthanasia, the uterus was placed in baths for isolated organ where isotonic and isometric contractions were monitored (n = 5). Based on the fact that ZB-EtOH_{AP} previously had a tocolytic effect in rat uterus on phasic contractions, it was decided to investigate its effect on oxytocin-induced tonic contractions (OXY) (EC₅₀ = 5.5 ± 1.3 µg/mL). As the main smooth muscle relaxation pathways is the nitric oxide (NO), we decided to evaluate the participation of this pathway in tocolytic effect of ZB-EtOH_{AP}. L-NAME, a non-selective NO synthase inhibitor (NOS), was used, and it was observed that the relaxing potency was decreased six-fold (EC₅₀ = 35.6 ± 6.2 µg/mL) and partially reversed in the concomitant presence of L-NAME and L-arginine (10⁻³ e 3 x 10⁻³ M), substrate to NOS (EC₅₀ = 24.8 ± 3.1 µg/mL; 45,4 ± 7,0 µg/mL, respectively), confirming the involvement NO pathway in the tocolytic effect of ZB-EtOH_{AP}. Following the downstream pathway of intracellular NO signaling, the next step to be investigated was the participation of soluble guanylyl cyclase (sGC) and protein kinase G (PKG). Therefore, it was observed that tocolytic potency of extract was reduced about 5 and 3 times in the presence of ODQ, an inhibitor of sGC (EC₅₀ = 36.9 ± 7.3 µg/mL) and Rp-8-Br- PET-cGMPS, a PKG inhibitor (EC₅₀ = 15.4 ± 2.7 µg/mL), respectively, confirming positive modulation of NO/sGC/PKG pathway in tocolytic effect of ZB-EtOH_{AP}. As one of the targets of PKG are voltage-dependent calcium channels (Ca_v), it was proposed that the extract would be inhibiting these channels. It was observed that extract relaxed the pre-contracted uterus with KCl (EC₅₀ = 22.0 ± 1.3 µg/mL), suggesting a participation of these channels. To confirm this hypothesis, cumulative curves to CaCl₂ were performed in the absence and presence of ZB-EtOH_{AP}, and a shift of control curves to the right was observed in the presence of extract with reduction of maximum effect. In addition, ZB-EtOH_{AP} relaxed the pre-contracted uterus with S-(-)-Bay K8644, a Ca_v1 agonist, with about 4-fold lower potency (EC₅₀ = 84.3 ± 10.6 µg/mL) in comparison to the effect observed with KCl, demonstrating that the extract indirectly inhibits the influx of Ca²⁺ through Ca_v1. As PKG can also modulate the K⁺ channels, we decided to investigate the effect of the extract in the presence of cesium chloride, a non-selective K⁺ channel blocker and a right shift of the extract control curve was observed (EC₅₀ = 27.1 ± 3.0 µg/mL), confirming the participation of K⁺ channels in tocolytic effect of ZB-EtOH_{AP}. To check which K⁺ channel subtype would be involved in this extract effect. selective blockers were used and it was observed that tocolytic potency was reduced in the presence of tetraethylammonium (EC₅₀ = 16.8 ± 2.8 µg/mL), apamine (EC₅₀ = 22.0 ± 3.3 µg/mL), glibenclamide (EC₅₀ = 28.2 ± 5.3 µg/mL) and 4-aminopyridine (EC₅₀ = 73.2 ± 13.4 µg/mL), potassium channel blockers: calcium-activated of large (BK_{Ca}) and small conductance (SK_{Ca}), ATP-sensitive (K_{ATP}) and voltage-dependent (K_v), respectively. No synergistic effect was observed when all of the above-mentioned blockers were incubated simultaneously. It was also evaluated the tocolytic effect of two flavonoids isolated from ZB-EtOH_{PA}, 7- methoxyflavone (7-MF) and 5,7-dimethoxyflavone (5,7-DMF), and it was observed that both had a tocolytic effect, being 7-MF equipotent against OXY (IC₅₀ = 3.2 ± 0.9 x 10⁻⁵ M) and CCh (IC₅₀ = 4.3 ± 0.4 x 10⁻⁵ M) and 5,7-DMF with potency about 2 times greater than CCh (IC₅₀ = 1.7 ± 0.3 x 10⁻⁵ M) in relation to OXY (IC₅₀ = 4.2 ± 1.0 x 10⁻⁵ M). Thus, action mechanism proposed for ZB-EtOH_{AP} in rats may have positive modulation involvement in NO/sGC/PKG pathway and K⁺ channels, and Ca_v1 blockade and, consequently, Ca²⁺ influx decrease, promoting relaxation of smooth muscle uterine. In addition, the flavonoids, 7-MF and 5,7-DMF are probably responsible for tocolytic effect of extract.

Keywords: spasmolytic, methoxyflavone, rat uterus, nitric oxide, ionic channels.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Fotos da espécie <i>Zornia brasiliensis</i> Vogel (Leguminosae)	35
Figura 2 – Mapa de distribuição mundial da espécie <i>Zornia brasiliensis</i> Vogel (Leguminosae) representada em amarelo	36
Figura 3 – Estruturas químicas da 7-metoxiflavona (A) e da 5,7-dimetoxiflavona (B)	36
Figura 4 – Estrutura básica de um flavonoide	37
Figura 5 – Esquema do acoplamento eletromecânico da contração muscular lisa pelo aumento da concentração extracelular de K^+	40
Figura 6 – Mecanismo farmacomecânico da contração muscular lisa pela ativação do sistema efetor $G_{q/11}$ - PLC- $\beta 1$	43
Figura 7 – Mecanismo do relaxamento no músculo liso vascular induzido pelas vias efetoras do cAMP e cGMP	48
Figura 8 – Divisão morfológica do útero humano	50
Figura 9 – Divisão morfológica do útero de rata	50
Figura 10 – Aparelhos utilizados nos experimentos <i>in vitro</i>	61
Figura 11 – Registro original representativo do efeito tocolítico do ZB-EtOH _{PA} sobre as contrações tônicas induzidas por 10^{-2} UI/mL de ocitocina em rata	72
Figura 12 – Registros originais representativos do efeito tocolítico do ZB-EtOH _{PA} 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 rata	75
Figura 13 – Registros originais representativos do efeito tocolítico de ZB-EtOH _{PA} sobre as contrações tônicas induzidas por 10^{-2} UI/mL de ocitocina na ausência (A) e na presença simultânea de 10^{-4} M de L-NAME + 10^{-3} M de L-arginina (B) em rata ..	77

Figura 14 – Registros originais representativos do efeito tocolítico de ZB-EtOH _{PA} sobre as contrações tônicas induzidas por 10 ⁻² UI/mL de ocitocina na ausência (A) e na presença (B) de 10 ⁻⁶ M de ODQ em rata.	80
Figura 15 – Registros originais representativos do efeito tocolítico do ZB-EtOH _{PA} sobre as contrações tônicas induzidas por 10 ⁻² UI/mL de ocitocina na ausência (A) e na presença (B) de 10 ⁻⁶ M de Rp-8-Br-PET-cGMPS em rata	83
Figura 16 – Registros originais representativos do efeito tocolítico do ZB-EtOH _{PA} sobre as contrações tônicas induzidas por 60 mM de KCl em rata.....	87
Figura 17 – Registros originais representativos típicos do efeito tocolítico do ZB-EtOH _{PA} em útero isolado de rata pré-contraído com 60 mM de KCl (A) e com 3 x 10 ⁻⁸ M de S-(-)-Bay K8644 parcialmente despolarizado com 9 mM de KCl (B) ...	92
Figura 18 – Registros originais representativos do efeito tocolítico do ZB-EtOH _{PA} sobre as contrações tônicas induzidas por 10 ⁻² UI/mL de ocitocina na ausência (A) e na presença (B) de 5 x 10 ⁻³ M de CsCl em rata	95
Figura 19 – Registros originais representativos do efeito tocolítico do ZB-EtOH _{PA} sobre as contrações tônicas induzidas por 10 ⁻² UI/mL de ocitocina na ausência (A) e na presença (B) de 10 ⁻³ M de TEA ⁺ em rata	98
Figura 20 – Registros originais representativos do efeito tocolítico do ZB-EtOH _{PA} sobre as contrações tônicas induzidas por 10 ⁻² UI/mL de ocitocina na ausência (A) e na presença (B) de 10 ⁻⁷ M de apamina em rata.....	100
Figura 21 – Registros originais representativos do efeito tocolítico do ZB-EtOH _{PA} sobre as contrações tônicas induzidas por 10 ⁻² UI/mL de ocitocina na ausência (A) e na presença (B) de 10 ⁻⁵ M de glibenclamida em rata.....	102
Figura 22 – Registros originais representativos do efeito tocolítico do ZB-EtOH _{PA} sobre as contrações tônicas induzidas por 10 ⁻² UI/mL de ocitocina na ausência (A) e na presença (B) de 3 x 10 ⁻³ M de 4-AP em rata.....	104
Figura 23 – Registros originais representativos do efeito tocolítico do ZB-EtOH _{PA} sobre as contrações tônicas induzidas por 10 ⁻² UI/mL de ocitocina na ausência (A), na	

presença (B) de 5×10^{-3} M de CsCl e na presença simultânea (C) de bloqueadores de canais de K^{+} em rata..... 107

Figura 24 – Proposta de mecanismo de ação tocolítico de ZB-EtOH_{PA} em útero de rata..... 125

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Efeito tocolítico do ZB-EtOH _{PA} sobre as contrações tônicas induzidas por 10^{-2} UI/mL de ocitocina (●) em ratas	73
Gráfico 2 – Efeito tocolítico (A) e valores de CE ₅₀ (B) do ZB-EtOH _{PA} sobre as contrações tônicas induzidas por ocitocina na ausência (●), na presença de L-NAME (◇), na presença simultânea de L-NAME + L-arginina (10^{-3} M) (◆) e L-NAME + L-arginina (3×10^{-3} M) (▽) em rata	78
Gráfico 3 – Efeito tocolítico do ZB-EtOH _{PA} sobre as contrações tônicas induzidas por ocitocina na ausência (●) e na presença de ODQ (□) em rata	81
Gráfico 4 – Efeito tocolítico do ZB-EtOH _{PA} sobre as contrações tônicas induzidas por ocitocina na ausência (●) e na presença de Rp-8-Br-PET-cGMPS (□) em rata.....	84
Gráfico 5 – Efeito tocolítico do ZB-EtOH _{PA} sobre as contrações tônicas induzidas por 60 mM de KCl em ratas.....	88
Gráfico 6 – Efeito inibitório do ZB-EtOH _{PA} frente às contrações induzidas por cloreto de cálcio (CaCl ₂) em meio despolarizante nominalmente sem Ca ²⁺ na ausência (□) e na presença do ZB-EtOH _{PA} nas concentrações de 27 (■), 81 (Δ) e 243 (▲) µg/mL, em rata	90
Gráfico 7 – Efeito tocolítico do ZB-EtOH _{PA} sobre contrações tônicas induzidas por 60 mM de KCl (o) e por 3×10^{-7} M de S-(-)-Bay K8644 (▼) em rata	93
Gráfico 8 – Efeito tocolítico do ZB-EtOH _{PA} sobre as contrações tônicas induzidas por ocitocina na ausência (●) e na presença de CsCl (Δ) em rata.....	96
Gráfico 9 – Efeito tocolítico do ZB-EtOH _{PA} sobre as contrações tônicas induzidas por ocitocina na ausência (●) e na presença de TEA ⁺ (▽) em rata.....	99
Gráfico 10 – Efeito tocolítico do ZB-EtOH _{PA} sobre as contrações tônicas induzidas por ocitocina na ausência (●) e na presença de apamina (◇) em rata	101

Gráfico 11 – Efeito tocolítico do ZB-EtOH _{PA} sobre as contrações tônicas induzidas por ocitocina na ausência (●) e na presença de glibenclamida (○) em rata	103
Gráfico 12 – Efeito tocolítico do ZB-EtOH _{PA} sobre as contrações tônicas induzidas por ocitocina na ausência (●) e na presença de 4-AP (□) em rata	105
Gráfico 13 – Efeito tocolítico do ZB-EtOH _{PA} sobre as contrações tônicas induzidas por ocitocina na ausência (●) e na presença simultânea dos bloqueadores de K ⁺ (▽) em rata	108
Gráfico 14 – Valores de CE ₅₀ do ZB-EtOH _{PA} sobre as contrações tônicas induzidas por ocitocina na ausência e na presença de CsCl, TEA ⁺ , apamina, glibenclamida, 4-AP e na presença simultânea destes bloqueadores (PS)	109
Gráfico 15 – Efeito da 7-MF frente às contrações fásicas induzidas por 10 ⁻² UI/mL de ocitocina (A) ou por 10 ⁻⁵ M de CCh (B) em útero isolado de rata	111
Gráfico 16 – Efeito da 5,7-DMF frente às contrações fásicas induzidas por 10 ⁻² UI/mL de ocitocina (A) ou por 10 ⁻⁵ M de CCh (B) em útero isolado de rata	112

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Valores de $E_{\max}$, de CE_{50} e de R^2 do ZB-EtOH _{PA} na ausência (controle) e na presença de um substrato de NOS (L-NAME) e de inibidores da via NO/sGC/PKG em útero isolado de rata.....	85
Tabela 2 – Valores de $E_{\max}$ (%) e de CE_{50} (M) do CaCl ₂ na ausência (controle) e na presença do ZB-EtOH _{PA} em útero de rata.....	90
Tabela 3 – Valores de $E_{\max}$, de CE_{50} e R^2 do ZB-EtOH _{PA} na ausência e na presença de bloqueadores de canais de K ⁺ em útero isolado de rata	109
Tabela 4 – Valores de CI_{50} dos flavonoides em µg/mL e M.....	110

LISTA DE ABREVIATURAS

4-AP	4-aminopiridina
[Ca²⁺]_c	concentração citosólica de Ca ²⁺
AC	ciclase de adenilil
ANOVA	análise de variância
ATP	trifosfato de adenosina
BK_{Ca}	canais de K ⁺ ativados por Ca ²⁺ de alta condutância
cAMP	monofosfato cíclico de adenosina
Cav	canais de Ca ²⁺ dependentes de voltagem
Cav1	Cav da família 1
CE₅₀	concentração de uma droga que promove 50% de seu efeito máximo
CI₅₀	concentração de uma droga que promove 50% do efeito de um agonista
cGMP	monofosfato cíclico de guanosina
CICR	liberação de Ca ²⁺ induzida pelo Ca ²⁺
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_{αq/11}	subunidade α da proteína G _{q/11}
G_{αs}	subunidade α da proteína G _s

GDP	difosfato de guanosina
GPCR	receptor acoplado à proteína G
GTP	trifosfato de guanosina
IK_{Ca}	canais de K ⁺ ativados por Ca ²⁺ de condutância intermediária
IP₃	1,4,5-trisfosfato de inositol
IP₃R	receptor de IP ₃
K_{ATP}	canais de potássio sensíveis ao ATP
K_{ir}	canais de potássio retificadores de entrada
K_v	canais de potássio dependentes de voltagem
L-NAME	cloridrato de <i>N</i> _ω -nitro-L-arginina metil éster
M₃	receptor muscarínico da acetilcolina do subtipo 3
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
ODQ	1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-ona
OT	receptor da ocitocina
PIP₂	4,5-bisfosfato de fosfatidilinositol
PKC	proteína cinase C
PKG	proteína cinase dependente de cGMP
PLCβ₁	fosfolipase C do tipo beta 1

R²	coeficiente de correlação não linear
Rp-8-Br-PET-cGMPS	Rp-8-bromo-β-fenil-1,N ² -etenoguanosina-3',5', monofosforotioato cíclico
RS	retículo sarcoplasmático
RyR	receptor de rianodina
sGC	ciclase de guanilil solúvel
SK_{Ca}	canais de K ⁺ ativados por Ca ²⁺ de baixa condutância
SUR	receptor de sulfonilureia
TEA⁺	íon tetraetilamônio
V_m	potencial de membrana
ZB-EtOH_{PA}	extrato etanólico bruto obtido das partes aéreas de <i>Zornia brasiliensis</i> Vogel

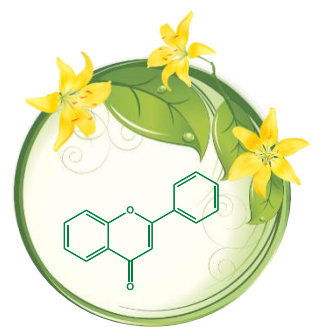
OBS: as abreviaturas e os símbolos utilizados neste trabalho e que não constam nesta relação, encontram-se descritas no texto ou são convenções adotadas universalmente.

SUMÁRIO

1 Introdução.....	26
2 Fundamentação teórica	29
2.1 Produtos naturais e plantas medicinais	30
2.2 Família Leguminosae	31
2.3 Gênero <i>Zornia</i>	33
2.4 <i>Zornia brasiliensis</i>	34
2.5 Contração e relaxamento do músculo liso uterino.....	38
2.6 Morfologia uterina de humanos e ratas	49
2.7 Desordens que acometem a musculatura lisa uterina.....	51
3 Objetivos	55
3.1 Gerais.....	56
3.2 Específicos	56
4 Material e métodos	57
4.1 Material.....	58
4.1.1 Material botânico	58
4.1.2 Drogas-teste	58
4.1.3 Animais.....	59
4.1.4 Substâncias e reagentes	59
4.1.5 Soluções nutritivas	60
4.1.6 Aparelhos	60
4.2 Métodos.....	62
4.2.1 Preparação das soluções-mãe do extrato e dos flavonoides para os ensaios farmacológicos	62
4.2.2 Efeito tocolítico do ZB-EtOH _{PA} sobre as contrações tônicas induzidas por ocitocina em útero isolado de rata.....	62
4.2.3 Avaliação do envolvimento da via do óxido nítrico/sGC/PKG no efeito tocolítico do ZB-EtOH _{PA} em rata	63
4.2.3.1 Efeito tocolítico do ZB-EtOH _{PA} sobre as contrações tônicas induzidas por ocitocina na ausência e na presença de L-NAME.....	63
4.2.3.2 Efeito tocolítico do ZB-EtOH _{PA} sobre as contrações tônicas induzidas por ocitocina na ausência e na presença simultânea de L-NAME + L-arginina.....	64

4.2.3.3 Efeito tocolítico do ZB-EtOH _{PA} sobre as contrações tônicas induzidas por ocitocina na ausência e na presença de ODQ	64
4.2.3.4 Efeito tocolítico do ZB-EtOH _{PA} sobre as contrações tônicas induzidas por ocitocina na ausência e na presença de Rp-8-Br-PET-cGMPS	65
4.2.4 Avaliação da participação dos canais de cálcio dependentes de voltagem (Cav) no efeito tocolítico do ZB-EtOH _{PA} em útero isolado de rata.....	65
4.2.4.1 Efeito tocolítico do ZB-EtOH _{PA} sobre as contrações tônicas induzidas por KCl em útero isolado de rata.....	65
4.2.4.2 Efeito tocolítico do ZB-EtOH _{PA} frente às contrações induzidas por cloreto de cálcio (CaCl ₂) em meio despolarizante (KCl 60 mM) nominalmente sem Ca ²⁺	65
4.2.4.3 Efeito tocolítico do ZB-EtOH _{PA} sobre as contrações tônicas induzidas por S-(-)-Bay K8644	66
4.2.5 Avaliação do envolvimento dos canais de potássio no efeito tocolítico produzido pelo ZB-EtOH _{PA} em útero isolado de rata	66
4.2.5.1 Efeito do ZB-EtOH _{PA} sobre as contrações tônicas induzidas por ocitocina na presença de CsCl.....	66
4.2.5.2 Efeito do ZB-EtOH _{PA} sobre as contrações tônicas induzidas por ocitocina na presença de bloqueadores seletivos de canais de K ⁺	67
4.2.5.3 Efeito tocolítico do ZB-EtOH _{PA} sobre as contrações tônicas induzidas por ocitocina na ausência e na presença simultânea de bloqueadores seletivos de canais de K ⁺	68
4.2.6 Efeito dos flavonoides, 7-metoxiflavona e 5,7-dimetoxiflavona frente às contrações fásicas induzidas por ocitocina ou por CCh em útero isolado de rata.....	68
4.2.7 Análise estatística	69
5 Resultados	70
5.1 Efeito tocolítico do ZB-EtOH _{PA} sobre as contrações tônicas induzidas por ocitocina em útero isolado de rata.....	71
5.2 Avaliação do envolvimento da via do óxido nítrico/sGC/PKG no efeito tocolítico do do ZB-EtOH _{PA} em rata.....	74
5.2.1 Efeito tocolítico do ZB-EtOH _{PA} sobre as contrações tônicas induzidas por ocitocina na ausência e na presença de L-NAME.....	74
5.2.2 Efeito tocolítico do ZB-EtOH _{PA} sobre as contrações tônicas induzidas por ocitocina na ausência e na presença simultânea de L-NAME + L-arginina.....	76

5.2.3 Efeito tocolítico do ZB-EtOH _{PA} sobre as contrações tônicas induzidas por ocitocina na ausência e na presença simultânea de ODQ	79
5.2.4 Efeito tocolítico do ZB-EtOH _{PA} sobre as contrações tônicas induzidas por ocitocina na ausência e na presença simultânea de Rp-8-Br-PET-cGMPS	82
5.3 Participação dos canais de cálcio dependentes de voltagem (Cav) no efeito tocolítico do ZB-EtOH _{PA} em útero isolado de rata	86
5.3.1 Efeito tocolítico do ZB-EtOH _{PA} sobre as contrações tônicas induzidas por KCl e por ocitocina em útero isolado de rata	86
5.3.2 Efeito tocolítico do ZB-EtOH _{PA} frente às contrações induzidas por cloreto de cálcio (CaCl ₂) em meio despolarizante (KCl 60 mM) nominalmente sem Ca ²⁺	89
5.3.3 Efeito tocolítico de ZB-EtOH _{PA} sobre as contrações tônicas induzidas por S-(-)-Bay K8644	91
5.4 Avaliação do envolvimento dos canais de potássio no efeito relaxante do ZB-EtOH _{PA} em útero isolado de rata	94
5.4.1 Efeito do ZB-EtOH _{PA} sobre as contrações tônicas induzidas por ocitocina na ausência e na presença de CsCl	94
5.4.2 Efeito tocolítico do ZB-EtOH _{PA} sobre as contrações tônicas induzidas por ocitocina na ausência e na presença de bloqueadores seletivos de canais de K ⁺	97
5.4.3 Participação dos subtipos de canais de K ⁺ no efeito tocolítico do ZB-EtOH _{PA} sobre as contrações tônicas induzidas por ocitocina na ausência e na presença simultânea dos bloqueadores de K ⁺	106
5.5 Efeito dos flavonoides, 7-metoxiflavona e 5,7-dimetoxiflavona frente às contrações fásicas induzidas por ocitocina ou por CCh em útero isolado de rata	110
6 Discussão	113
7 Conclusões	126
Referências	128
Anexos	150
Anexo 1	151



1 Introdução

A maioria das mulheres durante o período menstrual apresentam sensações dolorosas no abdômen inferior ou nas costas, denominado dismenorreia, popularmente conhecida como cólica menstrual (DE SANCTIS et al., 2015; SUBASINGHE et al., 2016).

A dismenorreia ainda é um importante problema de saúde pública que pode ter um impacto negativo na saúde feminina, nas relações sociais, nas atividades escolares ou no trabalho, bem como, no estado psicológico de muitas mulheres (DE SANCTIS et al., 2017).

No ciclo menstrual, a dismenorreia é provocada por contrações uterinas do miométrio durante a fase da menstruação para que o útero consiga expulsar todo o tecido uterino desvitalizado (ZAFARI; BEHMANESH; MOHAMMADI, 2011; BELLOFIORE et al., 2017). Sabe-se que a presença do cálcio (Ca^{2+}) é essencial para o desencadeamento de mecanismos de contração do músculo, desta forma, se faz necessário o aumento da concentração deste íon no citosol ($[\text{Ca}^{2+}]_c$) dos miócitos para ocorrer esta contração no músculo liso uterino (KARAKI et al., 1997; WRAY et al., 2001; HUBINOT; DEBIEVE, 2011).

Em muitos casos as cólicas menstruais podem vir acompanhadas por outros sintomas, como suor, dor de cabeça, náuseas, vômitos, diarreia e tremor, incluindo manifestações somáticas, afetivas, cognitivas e comportamentais que geralmente aparecem na fase pós-ovulatória do ciclo menstrual, podendo ser denominadas de síndrome de tensão pré-menstrual (STPM) (RODRIGUES; OLIVEIRA, 2006). Um transtorno variante, mais extremo ou severo é denominado transtorno disfórico pré-menstrual (TDPM) e também acomete uma parcela da população feminina (VALADARES et al., 2006; SCALEA; PEARLSTEIN, 2017).

Com a finalidade de aliviar o desconforto causado pela dismenorreia, ou seus agravamentos, as classes de medicamentos mais utilizadas são os anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs), anticoncepcionais e antiespasmódicos (WONG et al., 2009; MARJORIBANK et al., 2010).

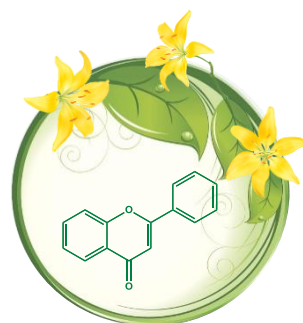
Sendo um incômodo tão comum, algumas mulheres recorrem a utilização de produtos naturais para aliviar os sintomas das cólicas, pode-se citar a utilização de *Zingiber officinale* (“gengibre”), *Matricaria chamomilla* (“camomila”), *Valeriana officinalis* (“valeriana”), entre outros (OZGOLI; GOLI; MOATAR, 2009; MODARESS et al., 2011; JENABI; TOGHIRI; HEJRATI, 2012), desta forma a fitoterapia é uma área da ciência que estuda substâncias advindas de produtos da natureza e trata-se de

uma alternativa eficiente, de baixo custo e promissora para a descoberta de novas moléculas (SOUSA et al., 2011).

Neste contexto, destaca-se a família Leguminosae, em especial a espécie *Zornia brasiliensis* Vogel, conhecida popularmente por “urinária”, “urinana” ou “carrapicho”, utilizada pela população como diurética e no tratamento de doenças venéreas e desordens gastrintestinais e como contraceptiva (ELISABETSKY; POSEY, 1989; DINIZ et al., 2002; AGRA; FREITAS; BARBOSA, 2007). Em triagem realizada em vários músculos lisos, foi descrito que o extrato etanólico bruto obtido das partes aéreas de *Zornia brasiliensis* (ZB-EtOH_{PA}) apresentou atividade espasmolítica em íleo de cobaia (OLIVEIRA et al., 2014), em traqueia de cobaia, aorta e corpo cavernoso de rato e em útero de rata (OLIVEIRA et al., 2016b).

Em estudos fitoquímicos realizados com *Zornia brasiliensis* foram identificados flavonoides (7-metoxiflavona, 5-hidroxi-7-metoxiflavona e 5,7-dimetoxiflavona, ononina), uma chalcona (2',4'-dihidroxichalcona), um pterocarpano (3-hidroxi-9-metoxipterocarpano) e uma saponina (soyasaponina) (SILVA et al., 2013; NASCIMENTO et al., 2015; NASCIMENTO et al., 2016).

Baseado no fato de que o ZB-EtOH_{PA} apresentou atividade espasmolítica em vários modelos de músculo liso, inclusive em útero de rata e tendo em vista a importância de que este extrato pode vir a ser utilizado na terapêutica da dismenorreia ou mesmo como uma ferramenta farmacológica, aliado ao fato de diversos flavonoides apresentarem efeito sobre a musculatura lisa (YANG et al., 2013; VASCONCELOS et al., 2015; LIU et al., 2018), objetivou-se investigar o mecanismo de ação tocolítica *in vitro* do ZB-EtOH_{PA} e avaliar a participação dos flavonoides 7-metoxiflavona (7-MF) e 5,7-dimetoxiflavona (5,7-DMF) neste efeito.



2 Fundamentação teórica

2.1 Produtos naturais e plantas medicinais

Historicamente, os produtos naturais, obtidos de plantas ou animais, eram a principal fonte de preparações medicinais. Atualmente, eles continuam presentes em ensaios clínicos ou fornecem compostos para estes (HARVEY, 2015). Principalmente devido à grande diversidade de organismos produtores de metabólitos secundários, apresentando as mais diversas estruturas, sendo assim de suma importância no processo de descoberta e desenvolvimento de novas drogas (GUO et al., 2017).

Os países desenvolvidos, apesar de geralmente não serem grandes detentores de biodiversidade, entendem a riqueza molecular escondida na natureza, exemplo disto é a quantidade de medicamentos no mercado mundial, inspirados nos produtos naturais, desde antitumorais, fármacos para o tratamento de doenças que envolvam o sistema nervoso central ou cardiovascular, anti-inflamatórios, antivirais, entre outros (BOLZANI, 2016).

Há registros do uso de muitas plantas medicinais há milhares de anos antes de Cristo, como a papoula (*Papaver somniferum*), maconha (*Cannabis sativa*), babosa (*Aloe vera*), entre outras, porém apenas no século XIX se iniciou a procura pelos princípios ativos presentes nas mesmas (CALIXTO; SIQUEIRA-JUNIOR, 2008).

Outros exemplos importantes de substâncias isoladas de plantas foram a atropina (antagonista muscarínico) isolada da *Atropa beladonna*; a cafeína obtida *Coffea arábica*, e digoxina (digitálico) isolada a partir de *Digitalis lanata*. Entretanto, o marco histórico no processo de desenvolvimento da indústria farmacêutica mundial foi a descoberta do ácido salicílico (analgésico e antitérmico) a partir da planta *Salix alba* (JI; LI; ZHANG, 2009).

Cerca de um terço dos fármacos utilizados são fornecidos ou inspirados por produtos naturais (STICHER, 2014), sendo o Brasil um país com uma das maiores diversidades do planeta, este se torna grande fonte para a descoberta de novas moléculas, uma vez que, aliada a riqueza molecular, ele possui também herança cultural (CZEPULA, 2006), já que muitos dos medicamentos modernos, a base de plantas devem sua existência as práticas medicinais indígenas, que se utilizavam deste recurso para tratar as mais variadas doenças (BALICK; COX, 1996; RAHMATULLAH et al., 2012).

Cerca de 82% da população brasileira utilizam produtos à base de plantas medicinais nos seus cuidados primários com a saúde (RODRIGUES; AMARAL, 2012). Na região Nordeste, a utilização destas também se destaca, principalmente devido ao fluxo de comercialização em mercados e feiras livres que nutrem a medicina tradicional e possuem vasta procura pela população (RAMOS et al., 2005). Desta forma, trabalhos realizados em estados como Pernambuco, Maranhão, Alagoas, Rio Grande do Norte e Paraíba, em especial, destacaram as riquezas do conhecimento tradicional, da cultura e do saber popular dos raizeiros da região Nordeste, quanto ao preparos e usos das plantas com princípios medicinais (ALBUQUERQUE, 1997; RAMOS et al., 2005; ALVES, et al., 2007; LÓS; BARROS; NEVES, 2012; FREITAS et al., 2012; LINHARES et al., 2014; ARAÚJO et al., 2015; LIMA; NASCIMENTO; SILVA, 2016).

2.2 Família Leguminosae

A família Leguminosae, também chamada de Fabaceae devido à longa utilização pela comunidade científica (IAPT, 2012), é considerada a terceira maior família de plantas (LEWIS et al., 2005). Recentemente, uma nova classificação foi proposta pelo Legume Phylogeny Working Group (LPWG), anteriormente dividida em três subfamílias (Caesalpinioideae, Mimosoideae e Papilionoideae) e atualmente em seis subfamílias: Duparquetioideae, Cercidoideae, Detarioideae, Dialioideae, Caesalpinioideae e Papilionoideae e reconhecendo Mimosoideae como uma linhagem distinta, incluída na subfamília Caesalpinioideae (LPWG, 2017).

Esta família apresenta distribuição mundial e os seus representantes incluem ervas, sub-arbustos, arbustos, árvores de pequeno, médio e grande porte, que podem ser encontrados em todos os ambientes (BARROSO et al., 2007). Já foram identificados 751 gêneros e 19.500 espécies (LPWG 2013). Destas, 221 gêneros e 2.809 espécies ocorrem no Brasil (RANDO, 2016), dos quais 168 gêneros e 1.083 espécies se encontram na região Nordeste. Na vegetação de caatinga foram registrados 127 gêneros e 593 espécies, das quais 149 são endêmicas (LIMA et al., 2015), e de acordo com Barbosa et al. (2007) na microrregião do cariri paraibano estão documentadas 71 espécies pertencentes a 34 gêneros.

Leguminosae é a representação de um dos maiores exemplos de manipulação e utilização de uma família de plantas por culturas humanas em todo o mundo, uma vez que ela é utilizada com as mais diversas finalidades, desde alimentação, como *Glycine max* (L.) Merr. ("soja"), várias espécies de *Phaseolus* L. e *Vicia faba* L. ("feijão"), *Arachis hypogaea* L. ("amendoim"), *Lens culinaris* Medik. ("lentilha"), *Cicer arietinum* L. ("grão-de-bico"), *Pisum sativum* L. ("ervilha"), *Medicago sativa* L. ("alfafa"), entre outros, sendo conhecida em alguns casos como a principal fonte vegetal de proteínas (LEWIS, 1987; DOYLE; LUCKOW, 2003; WOJCIECHOWSKI, 2003), até na agricultura como fonte de nitrogênio biológico, devido a sua capacidade de fixação deste composto, contribuindo para a execução de agricultura sustentável. Entre os exemplos cita-se espécies dos gêneros *Calliandra* Benth., *Acaciella* Britton & Rose, *Gliricidia* Kunth, *Leucaena* Benth., entre outros (LPWG, 2013).

Algumas também podem ser utilizadas como aromatizantes, por exemplo, *Copaifera langsdorffii* Desf. ("copaíba") e *Myroxylon peruiferum* L.f. ("cabreúva"), como matéria-prima para a indústria madeireira, por exemplo, *Machaerium ocutifolium* Vog. e *Machaerium aculeatum* Raddi. ("jacarandá"), *Senegalia polyphylla* Brinton & Rose ("angico-branco"), como plantas ornamentais: *Apuleia leiocarpa* Vogel ("grapiá"), *Hymenaea courbaril* ("jatobá"), como matéria-prima para artesanato: *Dipteryx alata* Vogel ("cumarú"), *Inga sessilis* Vell. Mart. ("ingazeiro") e como inseticidas: *Copaifera langsdorffii* Desf. ("copaíba") (SOUZA; GUILHERME, COELHO, 2015; SANTOS et al., 2016).

Ainda pode-se citar *Astragalus gummifer* ("goma-arábica"), que fornece uma resina muito utilizada na indústria farmacêutica (JOLY, 2002; SILVA; SOUZA; CARREIRA, 2004) e também várias espécies com atividades medicinais, em destaque as que apresentam atividade sobre músculos lisos, entre elas antidiarreica apresentada por *Melanoxylon brauna* Schott ("braúna"), laxante descrita para *Senna alexandrina* Mill. ("sene"), *Caesalpinia ferrea* Mart. Ex. Tul ("jucá"), antiasmático para *Copaifera langsdorffii* Desf. ("copaíba") e *Amburana cearenses* (Fr. All.) A. Smith (cumarú), hipotensor para *Cajanus cajan* (L.) Millsp ("feijão-andu") e *Bauhinia forficata* Link ("pata-de-vaca") e para infecções uterinas como *Pelargonium radula* (Cav.) L'Hér ("malva-rosa") (TESKE; TRENTINI, 1995; DINIZ et al., 1998; SOUZA; GUILHERME; COELHO, 2015, MESSIAS et al., 2015).

Tratando-se de uma família com uma quantidade tão vasta de espécies é comum a produção de metabólitos secundários tão diversos. Devido a capacidade que a maioria das espécies possui de fixar o nitrogênio, há diversos relatos da presença de alcaloides e aminoácidos não proteicos, porém compostos cianogênicos, fenólicos (como os flavonoides) e também terpenoides são citados entre os principais metabólitos secundários marcadores de Leguminosae (SOUTHON, 1994; WINK, 1993; VEITCH, 2010; WINK, 2013).

2.3 Gênero *Zornia*

Inserido na família Leguminosae, encontra-se o gênero *Zornia* que possui cerca de 80 espécies, sendo estas desde herbáceas até arbóreas (FORTUNA-PEREZ et al., 2013). Distribuídas tanto em regiões tropicais quanto subtropicais do mundo (MOHLENBROCK, 1961; RUDD, 1981; KLITGAARD; LAVIN, 2005). No Brasil este gênero é representado por 36 espécies (FORTUNA-PEREZ; TOZZI, 2011), sendo 15 endêmicas, ocorrendo em diversas regiões: Nordeste (21 spp.), Sudeste (20 spp.) e Sul (14 spp.). Os estados da Bahia e Minas Gerais são os estados que concentram o maior número de espécies (20 spp.), sendo o primeiro, o único que apresenta toda a diversidade do gênero (PEREZ, 2009).

Já foi descrito a utilização pela população de algumas espécies de *Zornia*, entre elas, *Z. venous* Mohlenbr (ROJAS et al., 1995), *Z. diphylla* (ROJAS et al., 1999) e *Zornia latifolia* (CORNARA et al., 2018) para o tratamento de distúrbios gastrointestinais.

Além disso, diversas espécies deste gênero já apresentaram atividades farmacológicas, como a atividade antibacteriana de *Zornia elegans* (L) Perls (CHIAPPETA; DE MELLO, 1984), *Zornia tenuifolia* Moric. (DO NASCIMENTO; DE MELLO; CHIAPPETA, 1985) e *Zornia milneana* Mohlenbr (OBI et al., 2007); atividade moluscicida de *Zornia setosa* Baker (KLOOS et al., 1987); atividade redutora de populações de mosquitos vetores da malária e arbovírus e anticonvulsivante (GREETHA; SHILPA; MURUGAN, 2012; GOVINDARAJAN et al., 2016) e efeito hipotensor e bradicárdico em ratos espontaneamente hipertensos (SOARES et al. 2007) de *Zornia diphylla* (L) Pers., atividade contraceptiva de *Zornia virgata*

(ELISABETSKY; POSEY, 1989) e atividade espasmolítica em íleo de rato de *Z. venous* Mohlenbr (ROJAS et al., 1995) e *Z. diphylla* (ROJAS et al., 1999).

Algumas espécies deste gênero são relatadas por apresentarem flavonoides em sua constituição, como é o caso de *Zornia diphylla* na qual foram identificados a 7,4'-dimetoxi-isoflavona, a 7-hidroxi-4'metoxiflavona, a 7-3'-diidroxi-4'metoxiisoflavona, a 7,8-dihidroxi-4'metoxiisoflavona e a 7,4'diidroxiisoflavona (LEUNER et al., 2012).

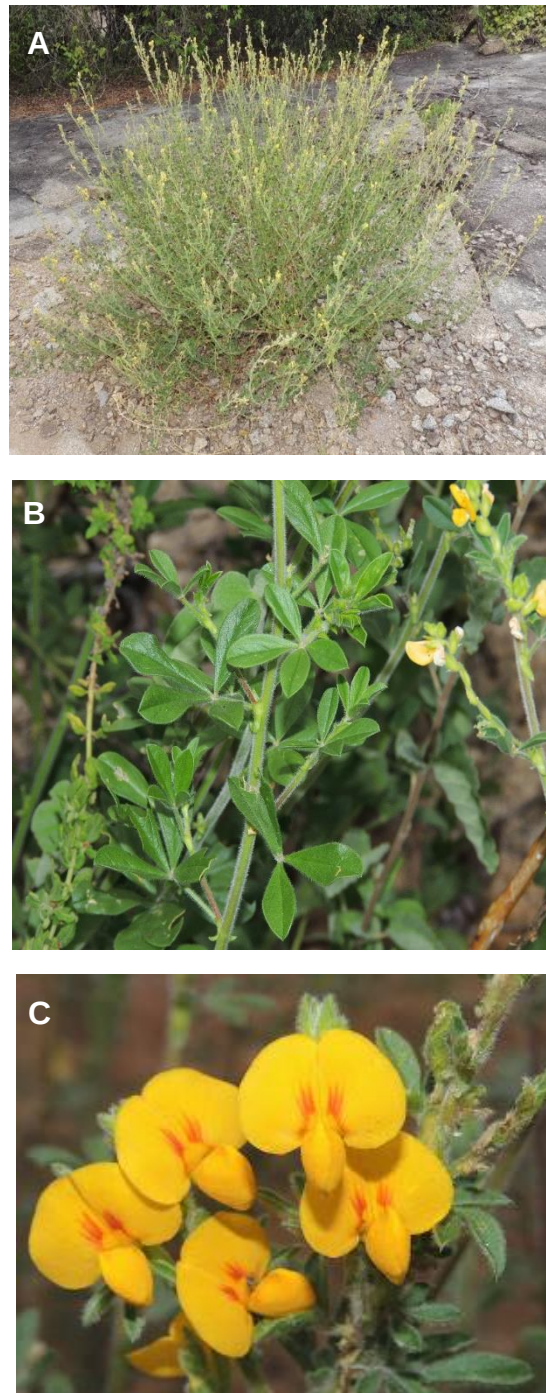
2.4 *Zornia brasiliensis*

Esta espécie é popularmente conhecida como “urinária”, “urinana” ou “carrapicho”, pertencente ao gênero *Zornia*, e apresenta-se como um subarbusto com cerca 60 cm (Figura 1), estando distribuída em diversos estados do Brasil (Figura 2) (MOHLENBROCK, 1961; PEREZ, 2009; PEREZ et al., 2011; PEREZ, 2016). Na medicina popular é utilizada como diurética, para o tratamento de doenças venéreas e para desordens gastrintestinais (DINIZ et al., 2002; AGRA; FREITAS; BARBOSA-FILHO, 2007).

Zornia brasiliensis é comumente confundida com *Z. myriadena* devido as semelhanças em diversos aspectos, dentre eles o vegetativo, a forma de folíolos, a coloração dos ramos e o fato de muitas vezes ocorrerem na mesma região. Porém, a espécie em questão apresenta flores em inflorescência e *Z. myriadena* apresenta flores solitárias (PEREZ, 2009).

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) e fotoprotetora (GOMES, 2016). O extrato metanólico obtido de suas partes aéreas apresentaram atividade tóxica frente à *Artemia salina* (ROUQUAYROL et al., 1980; DAVID et al., 2007). Já o etanólico apresentou baixa toxicidade por via oral (BATISTA, 2013), atividade antidiarreica em camundongos (OLIVEIRA, 2016a), 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, 2016a,b).

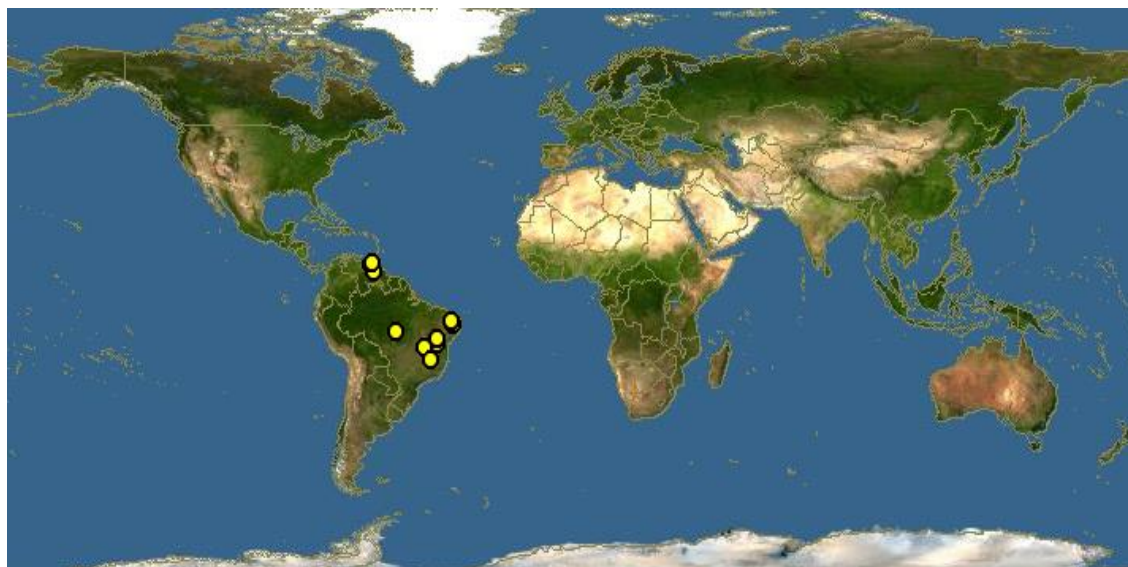
Figura 1 – Fotos da espécie *Zornia brasiliensis* Vogel (Leguminosae).



A) Planta inteira; **B)** Detalhe das folhas; **C)** Flores.

Fonte: <http://rubens-plantasdobrasil.blogspot.com.br/search/label/Zornia>. Acesso em 13 de setembro de 2016.

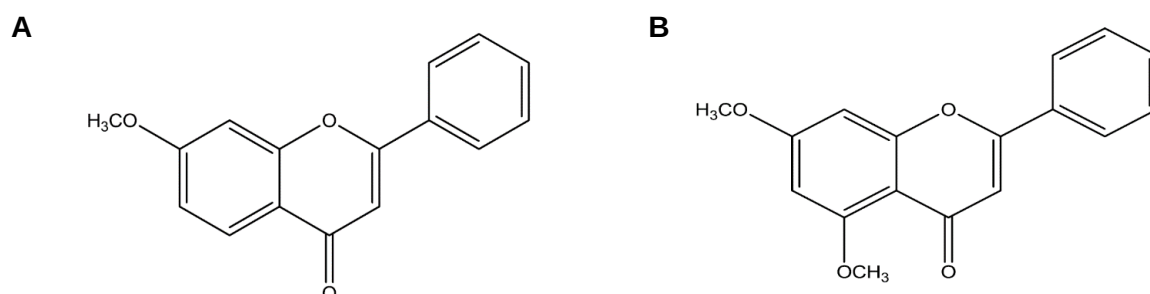
Figura 2 – Mapa de distribuição mundial da espécie *Zornia brasiliensis* Vogel (Leguminosae) representada em amarelo.



Fonte: <http://www.discoverlife.org/mp/20m?kind=Zornia+brasiliensis>. Acesso em 15 de dezembro de 2017.

Semelhante a outras espécies deste gênero, vários metabólitos secundários já foram isolados de *Zornia brasiliensis*, entre eles uma chalcona (2',4'-dihidroxichalcona), um pterocarpano (3-hidroxi-9-metoxipterocarpano), uma saponina, a soyasaponina IV e dá-se um destaque para os flavonoides: ononina, 5-hidroxi-7-metoxiflavona, 7-metoxiflavona (Figura 3A) e 5,7-dimetoxiflavona (Figura 3B), todas inéditas no gênero *Zornia* a (SILVA, 2013; NASCIMENTO et al., 2015; NASCIMENTO et al., 2016).

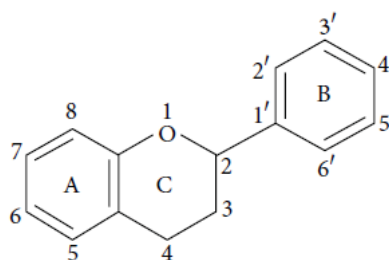
Figura 3 – Estruturas químicas da 7-metoxiflavona (A) e da 5,7-dimetoxiflavona (B).



Fonte: Silva, 2013.

Quimicamente, os flavonoides podem ser definidos como compostos formados por quinze átomos de carbono (Figura 4), com um esqueleto constituído de 2 anéis benzeno ligados através de um anel heterocíclico pirano (MIDDLETON, 1998). Os flavonoides podem ainda ser divididos em várias classes, incluindo flavanonas, flavonois, flavanas, antocianinas, antoxantinas e isoflavonas, a depender das substituições na sua estrutura (MLADENKA et al., 2010; VIDAŁ; ROZMAN; KOMEL, 2015).

Figura 4 – Estrutura básica de um flavonoide.



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

Fonte: KUMAR; PANDEY, 2013.

Trata-se de uma classe de metabólitos secundários muito vasta (POLLASTRI; TATTINI, 2011), onipresentes nas plantas e responsáveis, entre outras funções, por dar cor as flores, folhas e frutos, sendo essencial na reprodução das mesmas através do recrutamento de polinizadores e dispersores de sementes, regulação de enzimas metabólicas e proteção contra diversos perigos ambientais (FIELD; LEE; HOLBROOK, 2001; FUSI et al., 2017).

Por serem uma classe muito diversa, os flavonoides apresentam as mais diversas atividades farmacológicas, destacam-se as atividades sobre o músculo liso, como traqueia, íleo de cobaia (YANG et al., 2013; VASCONCELOS et al., 2015) e útero de rata (LIMA, 2008; CARREIRO et al., 2017; LIU et al., 2018).

Dos flavonoides isolados em *Zornia brasiliensis*, relatou-se que a 7-metoxiflavona apresenta efeito quimioprotetor (TA; WALLE, 2007), Tripanossomicida (AMBROZIN et al., 2008) e antinociceptivo em camundongos (SILVA et al., 2013) e a 5,7-dimetoxiflavona apresenta atividade anticâncer (WEN; WALLE; WALLE, 2005), antiviral (SOOKKONGWAREE, 2006), anticolinesterásica (SAWASDEE et al., 2009), melanogênica (KANG et al., 2011), antiobesidade por

suprimir a adipogênese (SONG et al., 2016), antioxidante, anti-inflamatória e vasorrelaxante (TEP-AREENAN; SAWASDEE; RANDALL, 2010; KIM et al, 2012).

2.5 Contração e relaxamento do músculo liso uterino

O miométrio compõe a maior proporção do corpo uterino, é formado por camadas de músculo liso circular e longitudinal acomodadas de forma perpendicular umas às outras. Está disposto em camadas indefinidas e as forças contráteis podem ocorrer em qualquer direção que permita ao útero assumir praticamente qualquer forma. Através do crescimento e estiramento durante a gravidez, esta camada fornece o ambiente protetor para o desenvolvimento do feto. Porém, com o início do trabalho de parto, ele se contrai ritmicamente para expulsar o feto e a placenta (ALBERTS et al., 1989; JACOB; FRANCONI; LOSSOW, 1990; GRUBER; O'BRIEN, 2011).

As fibras musculares lisas são compostas por células em forma de fuso, cada uma com um núcleo centralmente localizado. Tipicamente, elas apresentam um comprimento de mais ou menos 100 μm e um diâmetro de 2-10 μm (SOMLYO; SOMLYO, 1994). As células do músculo liso estão incorporadas em uma matriz extracelular composta de fibras de colágeno e apresentam membranas celulares fortemente aderidas entre si em múltiplos pontos, de modo que facilitam a transmissão das forças contráteis geradas nas células individuais para as células vizinhas (CSAPO, 1962; ALBERTS et al., 1989; WEBB, 2003).

Estas células estão organizadas com fibras estreitamente opostas, orientadas em um ângulo reto entre si. São formadas por dois tipos distintos de camadas, a camada longitudinal, voltada para a porção mais externa (perimetrio), que consiste em uma rede de feixes de células musculares lisas geralmente orientadas ao longo do órgão, e a camada circular, voltada para a porção mais interna (endometrio), na qual as fibras estão dispostas concêntricamente em torno do eixo longitudinal do órgão. A contração da camada longitudinal faz com que o órgão diminua, enquanto a contração da camada circular promove um alongamento do órgão, assim, alternando contração e relaxamento dessas camadas, no trabalho de parto permitem que o útero expulse o feto (YOUNG, 2007).

Independente da camada muscular que se contraia, a contração muscular lisa se fundamenta na interação entre os filamentos de actina e miosina (KOEPPEN;

STANTON, 2009), que consiste na ligação cíclica da porção globular da miosina com a actina, seguida por uma mudança do ângulo de orientação do complexo actina-miosina, permitindo o deslizamento de um filamento sobre o outro (HUXLEY; NIEDERGERKE, 1954).

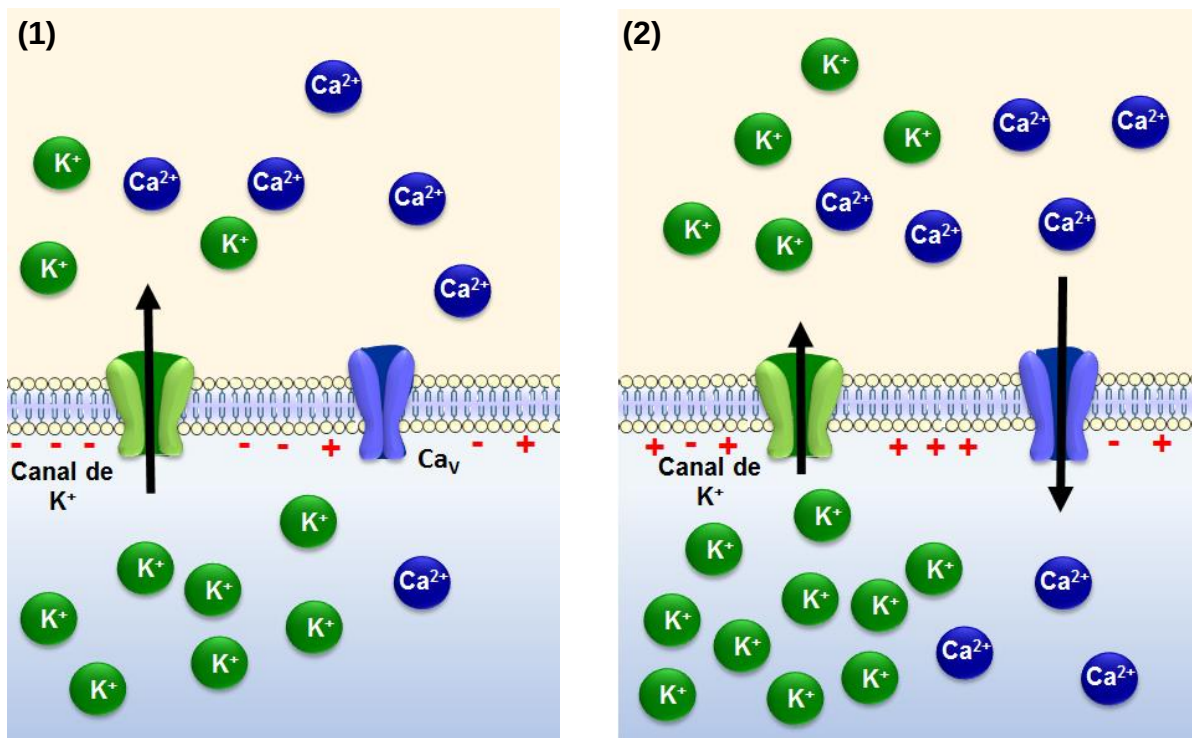
O músculo liso uterino tem a capacidade de reposta contrátil bifásica, que consiste em uma contração fásica inicial (gerando uma contração transitória rápida [< 30 s]), seguido por uma contração tônica sustentada (gerando uma contração de manutenção lenta), que se desenvolve lentamente e é mantida durante o período de exposição ao agente contrátil (BYTAUTIENE et al., 2003; BROWN et al., 2007).

Os mecanismos que determinam as contrações fásicas (transitórias) ou tônicas (sustentadas) são reguladas predominantemente, por aumento na $[Ca^{2+}]_c$ (AGUILAR; MITCHELL, 2010), sendo a contração fásica induzida pela liberação de Ca^{2+} dos estoques intracelulares mediados por 1,4,5-trisfosfato de inositol (IP_3) e a contração tônica causada por um influxo de Ca^{2+} decorrentes do meio extracelular através dos canais de cálcio dependentes de voltagem (Ca_v) (PHILLIPPE, 1994).

O aumento da $[Ca^{2+}]_c$ necessário para ocorrer uma contração no músculo liso pode ser definido como acoplamento excitação-contração, que é normalmente separado de forma didática como mecanismo eletromecânico e fármacomecânico (SOMLYO; SOMLYO, 1994).

O acoplamento eletromecânico de contração está relacionado com a mudança no potencial de repouso promovendo a despolarização da membrana, desencadeando o influxo de Ca^{2+} pelos canais Ca_v e, conseqüentemente, uma resposta contrátil (Figura 5). Essa despolarização está, geralmente, associada diretamente a um aumento da concentração extracelular do íon potássio ($[K^+]_e$) ou indiretamente pela ação de agonistas que possuem acoplamentos mistos (eletro e farmamecânico), como por exemplo a ocitocina, que ao se ligarem ao seu receptor perturbam a membrana (REMBOLD, 1996).

Figura 5 – Esquema do acoplamento eletromecânico da contração muscular lisa 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: Autor, 2018.

O miométrio também dispõe uma capacidade de contrair independente de hormônios ou mesmo do sistema nervoso, por possuir propriedade elétrica em células tipo marcapasso (WRAY et al., 2001). Um dos principais mecanismos fisiológicos que conduz a contração uterina é o desenvolvimento de um potencial de ação, decorrente do aumento transitório de íons livres através da membrana plasmática, especialmente o Ca^{2+} (GRUBER; O'BRIEN, 2011).

Os canais Ca_v são os principais canais envolvidos com a entrada de Ca^{2+} nas células do miométrio. Estes canais são complexos hetero-oligoméricos, onde a subunidade α_1 é a formadora de poros e fornece sítio de ligação para praticamente todos os agonistas e antagonistas (ARROWSMITH; WRAY, 2014).

A grande família dos canais de cálcio dependentes de voltagem (Cav), podem ser subdivididos em 3 subtipos: Cav1 (também conhecido como tipo L), sensíveis à di-hidropiridina e ativados por alta voltagem, formado por 5 subunidades (α_1 , α_2 , β , δ e γ), sendo o α_1 responsável por estabilizar e formar o poro do canal. Esta família, se subdivide ainda, em Cav1.1, Cav1.2, Cav1.3 e Cav1.4, sendo o 1.2 expresso majoritariamente na musculatura lisa. Todos os bloqueadores de canais de cálcio utilizados na terapêutica, como nifedipino, anlodipino, agem bloqueando os Cav1, desta forma são canais extremamente importantes em processos patológicos. Há também Cav2, canais insensíveis à di-hidropiridina e ativados por alta voltagem, que estão envolvidos majoritariamente na transmissão sináptica e também se subdividem em Cav2.1, Cav2.2 e Cav2.3. Já os Cav3, são insensíveis à di-hidropiridina e ativados por baixa tensão, estão presentes majoritariamente em neurônios e se subdividem em Cav3.1, Cav3.2 e Cav3.3 (NILIUS, 1986; TAKAHASHI et al., 1987; TANABE et al., 1987; MORI et al., 1991; DUBEL et al., 1992; WILLIAMS et al., 1992; PEREZ-REYES et al., 1998; CRIBBS et al., 1998; LEE et al., 1999; CATTERALL, 2011; ZAMPONI et al., 2015).

Foram descritos dois tipos de canais de Ca^{2+} no miométrio: o Cav1 de abertura com longa duração, e um de abertura transitória, o Cav2 (LEE; AHN; LEE, 2009), este havia sido observado apenas em humanos (WRAY et al., 2003), porém no período gestacional das ratas demonstrou-se que há também sua expressão (LEE; AHN; LEE, 2009).

No entanto, sabe-se que o canal de Cav1 é a principal fonte de influxo de Ca^{2+} para contração em miométrio de humanos e ratas (WRAY et al., 2015). A despolarização de membrana, durante um potencial de ação, por exemplo, resulta na abertura desses canais e influxo do Ca^{2+} . Além disso, alguns dados mostram que a estimulação de ocitocina em células do miométrio, provoca uma pequena despolarização de membrana, suficiente para abrir os canais Cav1, aumentando o influxo de Ca^{2+} na célula, levando a contração uterina (ARROWSMITH; WRAY; 2014).

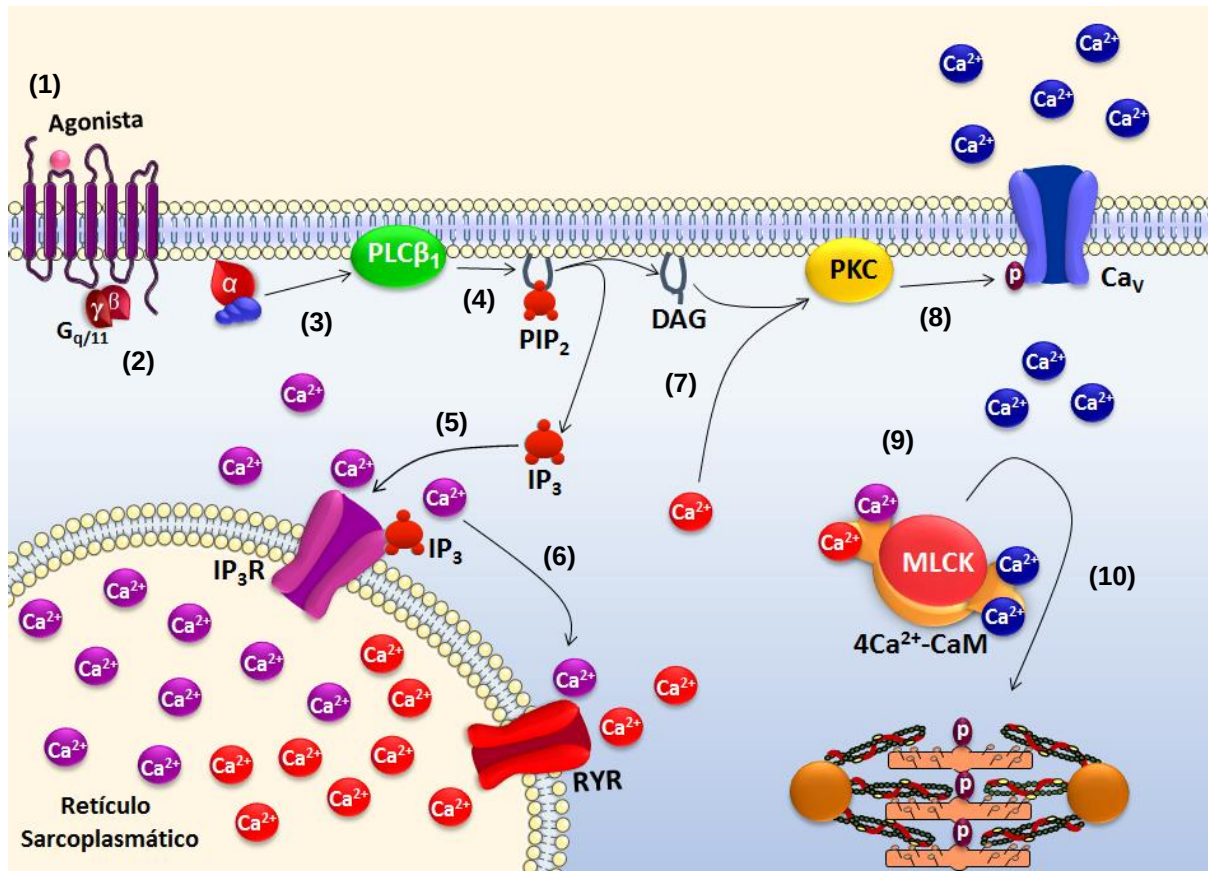
Já a contração mediada pelo acoplamento farmacomecânico acontece quando um agonista se liga ao seu receptor metabotrópico. Os agentes contráteis mais comuns são a prostaglandina $\text{F}_{2\alpha}$, ocitocina e a acetilcolina ou seus análogos, como o carbacol (CCh), se ligando aos seus receptores FP, OT e M_3 , respectivamente (DELLIS et al., 2006; McHALE et al., 2006; WRAY; SHMYGOL, 2007).

O mecanismo contrátil ocorre quando tais agonistas se ligam aos seus receptores, acoplados à proteína G (GPCRs) e ativam a cascata do inositol, através das proteínas G_q ou G_{11} , cuja subunidade α ativa a fosfolipase C $\beta 1$ (PLC $\beta 1$) e, consequentemente, promovem a hidrólise de fosfolipídios presentes na membrana do tipo 4,5-bisfosfato de fosfatidilinositol (PIP $_2$) formando IP $_3$ e diacilglicerol (DAG) (SANBORN; WANG; DODGE, 1998; BERRIDGE, 2008).

O IP $_3$, por sua vez, estimula a liberação de Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático (RS) através dos receptores de IP $_3$ (IP $_3$ R). Desta forma, o Ca^{2+} liberado ativa o receptor de rianodina (RyR) aumentando ainda mais a liberação de Ca^{2+} do retículo para o citoplasma e, consequentemente, aumentando a $[Ca^{2+}]_c$. Este aumento de Ca^{2+} induz o translocamento da proteína cinase C (PKC) para a membrana plasmática, onde é ativada pelo DAG, e uma vez ativada, fosforila proteínas-alvo específicas, como os Ca_v , ativando-os e promovendo o influxo de Ca^{2+} aumentando ainda mais a concentração de cálcio no citosol (SANBORN; WANG; DODGE, 1998; BERRIDGE, 2012).

O aumento do Ca^{2+} no meio intracelular, seja por mecanismo eletro ou farmacomecânico, permite que este se ligue a quatro sítios de ligação na calmodulina, promovendo uma mudança conformacional fazendo com que o complexo cálcio-calmodulina possa interagir com a cinase da cadeia leve de miosina (MLCK), ativando-a. A MLCK ativada, fosforila a cadeia leve da miosina (MLC), ocasionando mudanças conformacionais na MLC, ativando a subunidade ATPásica, promovendo a interação actina-miosina, resultando na geração de força e/ou encurtamento das fibras musculares, que caracteriza a contração (Figura 6) (OLSON et al., 1990; STULL et al., 1991; SAKURADA, SETO, SASAKI, 1998).

Figura 6 – Mecanismo farmacomecânico da contração muscular lisa uterina pela ativação do sistema efector $G_{q/11}$ - PLC- $\beta 1$.



(1) O agonista se liga ao seu receptor do tipo GPCR na membrana plasmática; (2) As proteínas $G_{q/11}$ troca 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 $_3$ R 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 1 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 e 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: Autor, 2018.

Uma vez que o aumento da $[Ca^{2+}]_c$ é responsável pelo processo de contração, a diminuição desta é crucial para o relaxamento do músculo liso, seja através do mecanismo eletromecânico, por meio da repolarização ou hiperpolarização da membrana, ou mesmo pelo mecanismo farmacomecânico, caracterizado pela ativação de receptores de membrana que inibem as vias bioquímicas que induzem a contração ou induzem relaxamento (WOODRUM; BROPHY, 2001).

O relaxamento induzido pelo acoplamento eletromecânico é caracterizado pela abertura de canais de K^+ (KNOT; BRAYDEN; NELSON, 1996), sendo estes os responsáveis pela principal corrente externa que flui na membrana plasmática do miométrio (ARROWSMITH; WRAY, 2014). Os canais de K^+ tem um papel chave na regulação do potencial de membrana e na excitabilidade da célula, pois é a condução dos íons K^+ através da membrana plasmática a favor do seu gradiente eletroquímico (MACKINNON, 2003), um dos principais mecanismos responsáveis por manter o potencial de membrana das células no estado de repouso, estimado entre -35 e -60 mV (SANBORN, 2000).

Os canais de K^+ podem ser regulados por voltagem, pela ligação do Ca^{2+} ou neurotransmissores e pelas vias de sinalização que os estimulam (ALEXANDER; MATHIE; PETERS, 2011), concomitantemente, estes podem regular o influxo de Ca^{2+} através dos Ca_v (THORNELOE; NELSON, 2005).

Além disso, os canais de K^+ compreendem um grupo de proteínas que contribuem significativamente para a quiescência uterina durante a gravidez. Nas células do músculo liso miometrial, mudanças na expressão ou atividade dos canais de K^+ podem se traduzir em uma repolarização inadequada levando a uma atividade uterina anormal. Assim, as alterações do canal K^+ podem contribuir para certas condições fisiopatológicas, tais como distocia (perda da força ou contratilidade uterina), parto prematuro e trabalho pós-termático (parto após 42 semanas) (BRAINARD; KOROVKINA; ENGLAND, 2007).

Vários tipos de canais K^+ foram identificados em miométrio. Os mais abundantes e mais bem estudados incluem os canais de K^+ sensíveis ao cálcio (K_{Ca}), que estão divididos em três famílias: canais de potássio sensíveis ao cálcio de grande condutância (BK_{Ca}), que estão distribuídos em subfamílias de acordo com a homologia da sequência de aminoácidos ($K_{Ca1.1}$, $K_{Ca4.1}$, $K_{Ca4.2}$ e $K_{Ca5.1}$) e podem ser ativados, em sua maioria, por voltagem ou por cálcio, com exceção dos $K_{Ca4.1}$ e 4.2 que são ativados por Na^+ e Cl^- e os $K_{Ca5.1}$ que são sensíveis ao pH, e são bloqueados por algumas substâncias, dentre elas o íon tetraetilamonio (TEA^+) em baixas concentrações (AARONSON et al., 2006); canais de K^+ sensível ao cálcio de baixa condutância (SK_{Ca}), que são classificados em subfamílias ($K_{Ca2.1}$, $K_{Ca2.2}$ e $K_{Ca2.3}$), são bloqueados por apamina; e canais de K^+ ativados por Ca^{2+} de condutância intermediária (IK_{Ca}) ($K_{Ca3.1}$) que são bloqueados por caribdotoxina e clotrimazol.

Sendo as duas últimas famílias insensíveis à voltagem e ativadas por baixa concentração de cálcio ($< 1,0 \mu\text{M}$) (SCHREIBER et al., 1998; SAH; FABER, 2002; YUAN et al., 2003; WEI et al., 2005; ALEXANDER; MATHIE; PETERS, 2011; ALEXANDER et al., 2013).

Os BK_{Ca} são os majoritários e responsáveis por manter a quiescência uterina (LORCA; PRABAGARAN; ENGLAND, 2014), possuem oito subunidades, sendo quatro α e quatro β . A subunidade α é caracterizada por 11 domínios hidrofóbicos (S0-S10), formando o poro do canal entre os domínios S5-6. Possui domínios transmembranares nas porções S0-S6 com uma cauda NH_2 terminal e a cauda COOH terminal localizada no interior da célula nos domínios S7-S10. A subunidade β tem a função de aumentar a sensibilidade do canal ao cálcio e a voltagem, interagindo com o domínio S0 e a cauda NH_2 terminal da subunidade α e é constituída por dois domínios transmembranares (PAULSON; NEWMAN, 1987; BOYLE; TOMASIC; KOTLIKOFF, 1992; LEDOUX et al., 2006).

Os canais SK_{Ca} possuem quatro subunidades proteicas, cada uma com seis domínios transmembranares (S1-S6), sendo o poro localizado entre os domínios S5 e S6 e os domínios NH_2 terminal e COOH terminal são intracelulares. Possuem uma associação constitutiva do grupo COOH terminal, conferindo uma maior sensibilidade ao aumento do cálcio citosólico (SCHUMACHER et al., 2001; LEDOUX et al., 2006).

Existem também os canais de K^+ sensíveis ao ATP (K_{ATP}) que são grandes complexos hetero-octaméricos, contendo quatro subunidades da família de canais K^+ retificadores internos (Kir6.x: Kir6.1 ou Kir6.2) e quatro subunidades reguladoras do receptor de sulfonilureia (SUR). Ambas as subunidades (SURs e Kir6.x) são necessárias para a função do canal, onde Kir6.x compreende o componente do canal K^+ do K_{ATP} , enquanto os SURs são responsáveis pelas propriedades farmacológicas, de sensibilidade ao ATP, e tráfico deste canal (LOVASZ et al., 2015).

Além destes, as células do miométrio dispõem dos canais de potássio dependentes de voltagem (K_v), que assim como os SK_{Ca} , também são formados por quatro subunidades proteicas com seis domínios hidrofóbicos (S1-S6) transmembranares. O sensor de voltagem encontra-se no domínio S4 por conter os aminoácidos lisina ou arginina que são carregados positivamente em pH neutro, e o seu poro é formado pelos domínios S5-6 (JAN; JAN, 1992; PARK et al., 2008).

A variedade desses canais no tecido miometrial reflete a multiplicidade e complexidade dos mecanismos envolvidos na contração e relaxamento desse órgão (BRAINARD; KOROVKINA; ENGLAND, 2007; SMITH et al., 2007). Nesse contexto, os canais de potássio promovem o relaxamento do músculo liso através do acoplamento eletromecânico, onde a abertura destes canais promove um aumento do efluxo de K^+ , proporcionando uma hiperpolarização da membrana celular (GURNEY, 1994). A célula hiperpolarizada fecha os canais Ca_v , diminuindo, a $[Ca^{2+}]_c$. Dessa forma, a fosforilação da cadeia leve da miosina é interrompida, resultando no relaxamento do músculo liso (REMBOLD, 1996).

O mecanismo de relaxamento do músculo liso uterino também pode ocorrer via acoplamento farmacomecânico, onde GPCRs, especificamente, acoplados à proteína G_s ativam a ciclase de adenilil (AC) que, estando ativada, hidrolisa e cicliza o trifosfato de adenosina (ATP), transformando em monofosfato cíclico de adenosina (cAMP), ativando a proteína cinase dependente de cAMP (PKA) que irá fosforilar diversos alvos ocasionando a diminuição de Ca^{2+} intracelular, podendo-se citar a ativação do trocador Na^+/Ca^{2+} , da Ca^{2+} -ATPase da membrana plasmática (PMCA) e do retículo sarcoplasmático (SERCA), dos canais de K^+ , ocasionando hiperpolarização e bloqueio direto de Ca_v . Também ocorre inibição da MLCK, todos estes passos, culminam em relaxamento do músculo liso (Figura 7) (MURTHY, 2006; TAYLOR et al., 2013).

Outra via que também pode levar ao relaxamento do músculo liso uterino é através do óxido nítrico (NO) que foi descrito originalmente em vasos sanguíneos (PALMER; FERRIGE; MONCADA, 1987). Posteriormente, investigou-se a sua participação na broncodilatação (HOGMAN et al., 1993) e na inibição de contrações no trato gastrointestinal (DESAI; SESSA; VANE, 1991) e no miométrio (YALLAMPALLI; GARFIELD; BYAM-SMITH, 1993).

O NO é amplamente distribuído e tem muitas funções, desde o relaxamento muscular liso até a formação de memória e a apoptose. Dentro do trato genital feminino, o NO é produzido pelo endométrio, miométrio, decídua (membrana mucosa) e placenta. Está envolvido na fisiologia da menstruação (TELFER et al., 1995), vasodilatação prévia e durante a gravidez (MYATT et al., 1992) e na manutenção da quiescência uterina durante a gravidez (IZUMI; YALLAMPALLI; GARFIELD, 1993). Além disso, o NO pode estar envolvido em condições patológicas que surgem no útero, incluindo retardo de crescimento intrauterino, pré-eclâmpsia, parto prematuro e

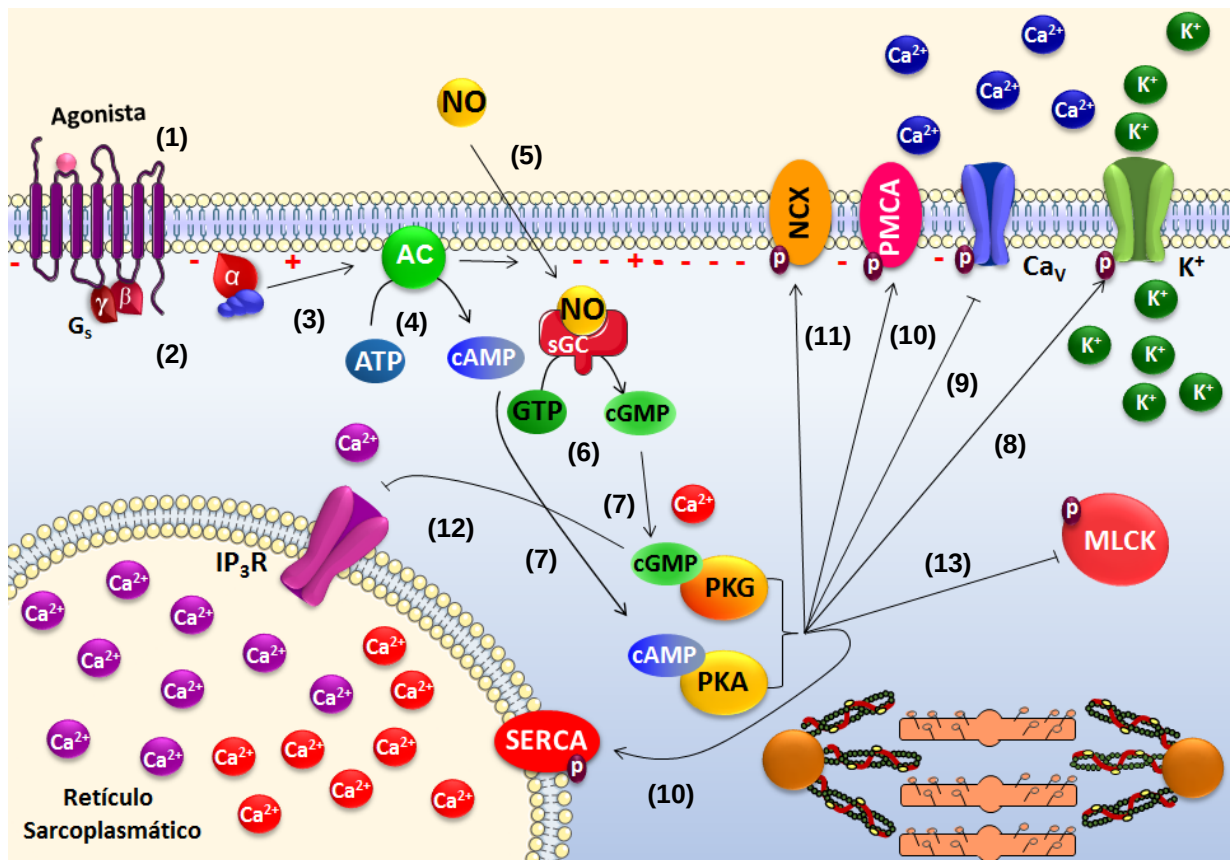
menorragia (YALLAMPALLI; GARFIELD, 1993; MOLNAR et al., 1994; DIKET et al., 1994; TELFER et al., 1995).

Sendo conhecido como um fator relaxante derivado do endotélio/epitélio, o NO também é produzido nos nervos. Este é sintetizado durante um processo de oxidação de aminoácidos catalisado pela sintase do NO (NOS), presente nas células do miométrio (BULBUL et al., 2007), a partir de L-arginina utilizando como co-fatores nesta reação, tetrahidrobiopterina (BH₄), fosfato de dinucleotídio de nicotinamida e adenina (NADPH), flavina adenina dinucleotídio (FAD), flavina mononucleotídeo (FMN) e grupo heme (MONCADA; PALMER; HIGGS, 1991; FARREL; BLAKE, 1996).

A NOS possui 3 isoformas, a induzida (iNOS), a neuronal (nNOS) e a endotelial (eNOS). A nNOS é constitutiva e está presente em células neuronais, células epiteliais, sistema nervoso central e periférico, sistema não colinérgico não adrenérgico (NANC), mácula densa do rim, entre outros locais. Esta enzima é dependente do complexo cálcio-calmodulina para se ativar. Já a iNOS, não depende de Ca²⁺-CaM e a sua atividade é induzida por citocinas e lipopolissacarídeos, enquanto a eNOS é constitutiva e está presente no endotélio dos vasos (FÖRSTERMANN et al., 1994; MURREL et al., 1996; DIMMELER et al., 1999; FULTON et al., 1999; CHANG et al., 2010; TOBA et al., 2011; JIN et al., 2011).

O NO, após ser produzido, atravessa a membrana plasmática e na célula muscular lisa se ligar a ciclase de guanilil solúvel (sCG), esta vai clivar e ciclizar o trifosfato de guanosina (GTP) em monofosfato cíclico de guanonisa (cGMP), que irá ativar a cinase dependente de cGMP (PKG) estimulando-a a fosforilar os alvos semelhantes ao da PKA (Figura 7), anteriormente citados (TRAN; OHASHI; WATANABE, 2000; CHANG et al., 2010; JIN et al., 2011; KIM; LEE; RHYU, 2011).

Figura 7 – 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. As definições das abreviaturas estão presentes na lista de abreviaturas e no texto.

Fonte: Autor. 2018.

Diante de tantas vias que podem estar envolvidas no processo de contração do miométrio acometido na dismenorreia, faz-se, então, necessário o estudo de substâncias ou drogas que possam bloquear vias envolvidas na contração uterina para desenvolvimento de novos medicamentos com efeito tocolítico, uma vez que os principais tratamentos utilizados atualmente para o alívio da mesma são os AINEs e

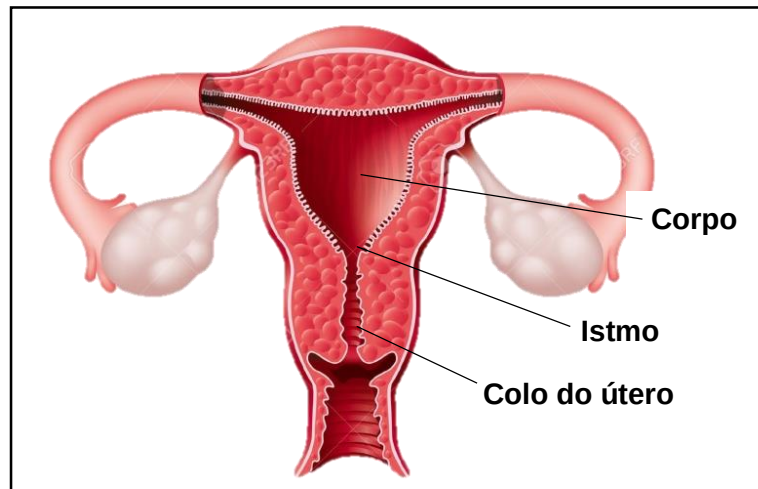
antiespasmódicos, sendo as pílulas anticoncepcionais uma segunda linha de tratamento, reduzindo a quantidade de tecido do endométrio, diminuindo a necessidade de contração para descamação da porção interior do útero, melhorando a dismenorreia (TEIMOORI et al., 2016).

2.6 Morfologia uterina de humanos e ratas

O útero desempenha papel importante na reprodução, uma vez que ele é o local onde o óvulo fecundado é recepcionado, implantado e nutrido durante o desenvolvimento gestacional. Em humanos, ele se localiza entre a bexiga e o reto, apresentando normalmente dimensões de 7,5 cm de comprimento e 5 cm de largura, podendo ter tamanho aumentado de modo a se adaptar ao tamanho do feto durante uma gestação (JACOB; FRANCONI; LOSSOW, 1990; GRAY; WILLIAMS, 1995). Este órgão apresenta formato de pêra invertida, com uma estrutura oca e é subdividido morfológicamente em colo do útero, istmo e corpo uterino (Figura 8).

A parede do útero possui três camadas principais: um revestimento interno denominado de endométrio; um músculo liso e espesso, conhecido como miométrio e uma camada serosa externa chamada perimétrio. O miométrio é a camada principal responsável pelas contrações uterinas, importantes para múltiplas funções reprodutivas, como o ciclo menstrual, o transporte de espermatozoides e embriões, gravidez e parto (SOUZA et al., 2017).

Quando não há fecundação a degeneração do corpo lúteo formado no ovário diminui os níveis de progesterona. Essa diminuição estimula a descamação da camada de células do epitélio interno (endométrio), que devido a extensa vascularização do endométrio, é acompanhada por uma hemorragia na cavidade uterina denominada menstruação. A dismenorreia é provocada por contrações uterinas do miométrio durante a menstruação para que o útero consiga expulsar todo o tecido uterino desvitalizado (ZAFARI; BEHMANESH; MOHAMMADI, 2011; BELLOFIORE et al., 2017).

Figura 8 – Divisão morfológica do útero humano

Fonte: adaptado de <https://www.thinglink.com/scene/722578354607226881>.

Diferentemente, o útero de rata tem formato de “Y”, é composto por dois cornos uterinos independentes que se fundem parcialmente no corpo uterino, se estendendo em direção à vagina (Figura 9). Esta região entre o encontro dos cornos (corpo do útero) até a vagina é denominada cérvix ou colo uterino (MARTINS et al., 2011). A parede do útero bicórneo é dividida basicamente em duas camadas: o miométrio, como camada mais externa do órgão e uma camada interna denominada endométrio (AGUILAR; MITCHELL, 2010).

Figura 9 – Divisão morfológica do útero de rata.

Fonte: adaptado de <http://professor.ucg.br/SiteDocente/admin/arquivosUpload/4400/material/Reprodutor%20A.pdf>.

2.7 Desordens que acometem a musculatura lisa uterina

A menstruação é um fenômeno natural que ocorre ao longo dos anos reprodutivos de cada mulher, as quais sofrem vários desconfortos menstruais (DE SANCTIS et al., 2015). Sabe-se que muitas mulheres apresentam em seu período pré-menstrual aparecimento de sintomas físicos e psíquicos, cerca de 1 semana antes da menstruação e aliviam com o início do fluxo menstrual. A este conjunto de sintomas dá-se o nome de síndrome de tensão pré-menstrual (STPM) (VALADARES et al., 2006).

Há relatos que a STPM pode prejudicar a vida cotidiana das mulheres, incluindo o trabalho e atividades pessoais. Cerca de 50% a 80% da população feminina relatam apresentar pelo menos alguns dos sintomas da síndrome durante a fase pré-menstrual e destas, entre 30 e 40% acabam necessitando de algum tipo de tratamento ou melhor atenção (HALBREICH et al., 2003; PETTA et al., 2010; RYU; KIM, 2015).

Um percentual de 3-8% das mulheres com STPM apresentam sintomas graves, incluindo pelo menos um incapacitante, a ponto de causar comprometimento funcional, entre eles, comportamentais como uma menor disponibilidade para a atividade sexual, de humor, como a cefaleia, o enjoo, a vertigem, a sensação de fadiga, o desânimo, a irritabilidade extrema, a dificuldade de concentração, a insônia ou hipersonia. Aos indivíduos que apresentam esses e/ou outros sintomas denominam-se apresentando o transtorno disfórico pré menstrual (TDPM), que acaba sendo definido como um agravamento da STPM (YOUNG et al., 1998; HEINEMANN et al., 2010; VIGOD et al., 2010; RAPKIN; AKOPIANS, 2012).

Além dos quadros já mencionados que envolvem o período menstrual, dá-se também um grande destaque para a dismenorreia, que se trata de um sintoma doloroso que ocorre um dia antes da menstruação e pode se prolongar até o último dia de sangramento (ABRAHAM, 1978). Comumente conhecida como cólica menstrual, a dismenorreia é definida como uma sensação dolorosa no abdômen inferior ou nas costas, associada ao período menstrual e é classificada como dismenorreia primária e secundária (SUBASINGHE et al., 2016).

A dismenorreia primária pode ser definida por contrações dolorosas na região inferior ao abdômen antes ou durante o período menstrual, na ausência de qualquer doença pélvica macroscópica, em muitos casos esta é acompanhada de outros

sintomas sistêmicos como suor, dor de cabeça, náuseas, vômitos, diarreia e tremor. Estes sintomas ocorrem antes ou durante a menstruação em mulheres com anatomia pélvica normal (DAWOOD, 1987; GERZSON et al., 2014).

Esta é uma desordem ginecológica mais comum no mundo, especialmente entre mulheres jovens. Apesar de não representar risco de mortalidade, algumas mulheres (3 a 33%) apresentam uma dor muito grave, o suficiente para incapacita-las durante um período do ciclo menstrual, exigindo ausência da escola ou do trabalho (ZANNONI et al., 2014), causando alto impacto na vida das mulheres, resultando em uma restrição das atividades diárias (CHANTLER; MITCHEL; FULLE, 2009) menor desempenho acadêmico em adolescentes (HAILEMESKEL; DEMISSIE; ASSEFA, 2016; UNSAL et al., 2010) e má qualidade do sono (BAKER et al., 1999), efeitos negativos sobre o humor, podendo causar quadros de ansiedade e depressão (DORN et al., 2009).

No Brasil a prevalência de dismenorreia primária chegou a 65% e foi reportado que a intensidade da cólica menstrual, assim como em outras regiões do mundo, está fortemente associada à perda de produtividade profissional, uma vez que foram relatados cerca de 30% de absenteísmo por causa da mesma, acarretando um prejuízo de até 66,8% (PASSOS et al., 2008; TEIMOORI et al., 2016). Desta maneira, a Organização Mundial da Saúde estimou a dismenorreia como a principal causa de dor pélvica crônica (LATTHE et al., 2006).

Enquanto a dismenorreia secundária é decorrente de uma anormalidade pélvica subjacente, onde a dor é causada pela doença e não por um processo fisiológico normal, como exemplo temos a endometriose, que é uma das causas mais comuns da dismenorreia secundária (DE SANCTIS et al., 2015; SUBASINGHE et al., 2016; GEBEYEHU et al., 2017).

Estudos mostram que, em algumas mulheres, a dismenorreia desaparece após o nascimento do primeiro filho, mas na maioria das mulheres, pode continuar ao longo de sua vida. Porém, 30-40% das mulheres com idade entre 30 e 40 anos sofrem de dismenorreia atualmente (TEIMOORI et al., 2016).

Cerca de 50 a 90% das mulheres experimentam o quadro de dismenorreia em, pelo menos, alguma fase da vida, sendo esta uma das queixas ginecológicas mais comuns entre elas (FRARE; TOMADON; SILVA, 2014). Em média 90% da população feminina é acometida pela dismenorreia primária durante seu período reprodutivo,

tendo início entre 6 e 18 meses após a menarca, quando os ciclos se tornam ovulatórios e regulares, tendo o pico de sua incidência entre 18 e 24 anos (NUNES et al., 2013).

A experiência da dor durante a menstruação tem levado muitas adolescentes à consultas ginecológicas, onde cerca de 90% de adolescentes sofrem com isso. Naquelas que relatam dor severa, há taxas que podem chegar à 54% para ausências na escola por conta das dores menstruais. Vários estudos mostraram que adolescentes com dismenorreia relatam que as dores afetam seu desempenho acadêmico e atividades sociais e esportivas (GEBEYEHU et al., 2017).

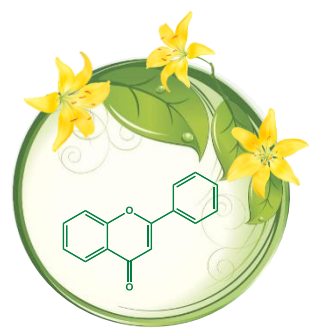
Num estudo transversal sueco, 72% das 600 mulheres, com 19 anos de idade, relataram dismenorreia. Em 15% delas, a dismenorreia limitou suas atividades e não respondeu aos analgésicos. Cinquenta por cento dessas mulheres estavam ausentes da escola ou do trabalho em pelo menos uma ocasião devido à dismenorreia e cerca de 8% estavam ausentes todas as vezes que menstruavam, durante pelo menos metade do dia. Portanto, a dismenorreia ainda é um importante problema de saúde pública que pode ter um impacto negativo na saúde feminina, nas relações sociais, nas atividades escolares ou no trabalho e no estado psicológico da mulher (DE SANCTIS et al., 2015).

A exata causa desta desordem ainda não é bem conhecida, mas alguns fatores de risco estão significativamente associados a episódios mais graves de dismenorreia, entre eles idade mais precoce na menarca, fluxo menstrual pesado, tabagismo, histórico familiar, obesidade e consumo de álcool. Não há dados sobre qualquer associação entre dismenorreia primária e deficiência nutricional. No entanto, a terapia com o ferro cura ou melhora a dismenorreia em mulheres com deficiência de ferro. Já se sabe também que depressão e estresse favorecem o desenvolvimento da dismenorreia, enquanto exercícios físicos e ingestão de peixe podem diminuir o risco de seu aparecimento (DE SANCTIS et al., 2017).

Também há relatos que a dismenorreia é geralmente causada pela produção excessiva de prostaglandinas, responsáveis pelas contrações uterinas, neste caso, em excesso (DAWOOD, 1987). Também pode ocorrer vasoconstrição uterina, resultando em diminuição do fluxo sanguíneo e consequente isquemia dos músculos uterinos causando a dor pélvica (ALLEN; LAM, 2012). Esse aumento nos níveis de

prostaglandinas também está associado a diversos sintomas sistêmicos que podem acompanhar a dismenorreia (COCO, 1999; IACOVIDES; AVIDON; BAKER, 2015).

Diante disto, e, tendo a premissa de que o ZB-EtOH_{PA} apresenta efeito tocolítico em útero de rata frente às contrações fásicas induzidas por carcabol (CCh) e por ocitocina (OLIVEIRA et al., 2016b), este trabalho investigou o mecanismo de ação tocolítica *in vitro* do ZB-EtOH_{PA} em útero isolado de rata, bem como avaliou e comparou um possível efeito tocolítico dos flavonoides isolados desta espécie, 7-MF e 5,7-DMF. Desta forma, visa-se propor subsídios científicos nas pesquisas de produtos com potencial fitoterápico, principalmente para tratamento de dismenorreia, além de proporcionar uma contribuição para os estudos etnofarmacológicos do gênero *Zornia*.



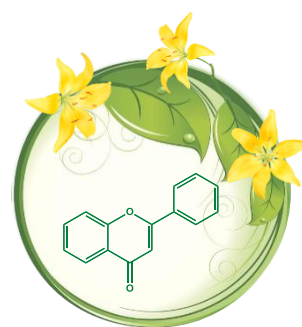
3 Objetivos

3.1 Gerais

Investigar o mecanismo de ação tocolítica *in vitro* do extrato etanólico obtido das partes aéreas de *Zornia brasiliensis* (ZB-EtOH_{PA}) em ratas, além de avaliar e comparar um possível efeito tocolítico de flavonoides isolados desta espécie.

3.2 Específicos

- Caracterizar o mecanismo de ação tocolítica do ZB-EtOH_{PA} avaliando, em nível funcional, a participação da(os):
 - Via do NO/sCG/PKG
 - Canais de Ca²⁺ dependentes de voltagem
 - Canais de K⁺
- Investigar e comparar uma possível atividade tocolítica dos flavonoides, 7-MF e 5,7-DMF em útero de rata pré-contráído com ocitocina e com carbacol.



4 Material e métodos

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, e identificadas pela Profa. Dra. Maria de Fátima Agra, do Setor de Botânica da Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos (PgPNSB) do Centro de Ciências da Saúde (CCS), 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 Drogas-teste

Para a realização desta pesquisa foi utilizado o extrato etanólico bruto obtido das partes aéreas de *Zornia brasilienses* Vogel (ZB-EtOH_{PA}), e os flavonoides 7-metoxiflavona (7-MF) e 5,7-dimetoxiflavona (5,7-DMF), cedidos gentilmente pelo Prof. Dr. Josean Fechine Tavares do PgPNSB da UFPB.

Inicialmente, para se obter o ZB-EtOH_{PA}, 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. Deste, 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 e 5,7-dimetoxiflavona.

4.1.3 Animais

Eram utilizadas ratas Wistar (*Rattus norvegicus*) virgens pesando $203,2 \pm 3,4$ g (n total = 65), 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) e mantida sob refrigeração.

A apamina, a 4-aminopiridina (4-AP), o dietilestilbestrol, o óleo de castor (Cremophor®), o S-(-)-Bay K8644 (1,4-diidro-2,6-dimetil-5-nitro-4-[2-(trifluorometil)fenil]3-piridina carboxílico ácido metil éster), o cloreto de cério (CsCl), a glibenclamida, o íon tetraetilamônio (TEA^+), a 1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-ona (ODQ), o Rp-8-bromo- β -fenil-1, N^2 -etenoguanosina-3', 5', monofosforotioato cíclico (Rp-8-Br-PET-cGMPS), o cloridrato de L-arginina e o cloridrato de N_ω -nitro-L-arginina metil éster (L-NAME) foram adquiridos da Sigma-Aldrich (Brasil). 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 S-(-)-Bay K8644, a glibenclamida, a ODQ e o dietilestilbestrol, que foram dissolvidos em álcool etílico

absoluto, sendo este último mantido ao abrigo da luz, assim como o S-(-)-Bay K8644 e a 4-AP.

A mistura carbogênica (95% de O₂ e 5% de CO₂) 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, 1M), 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

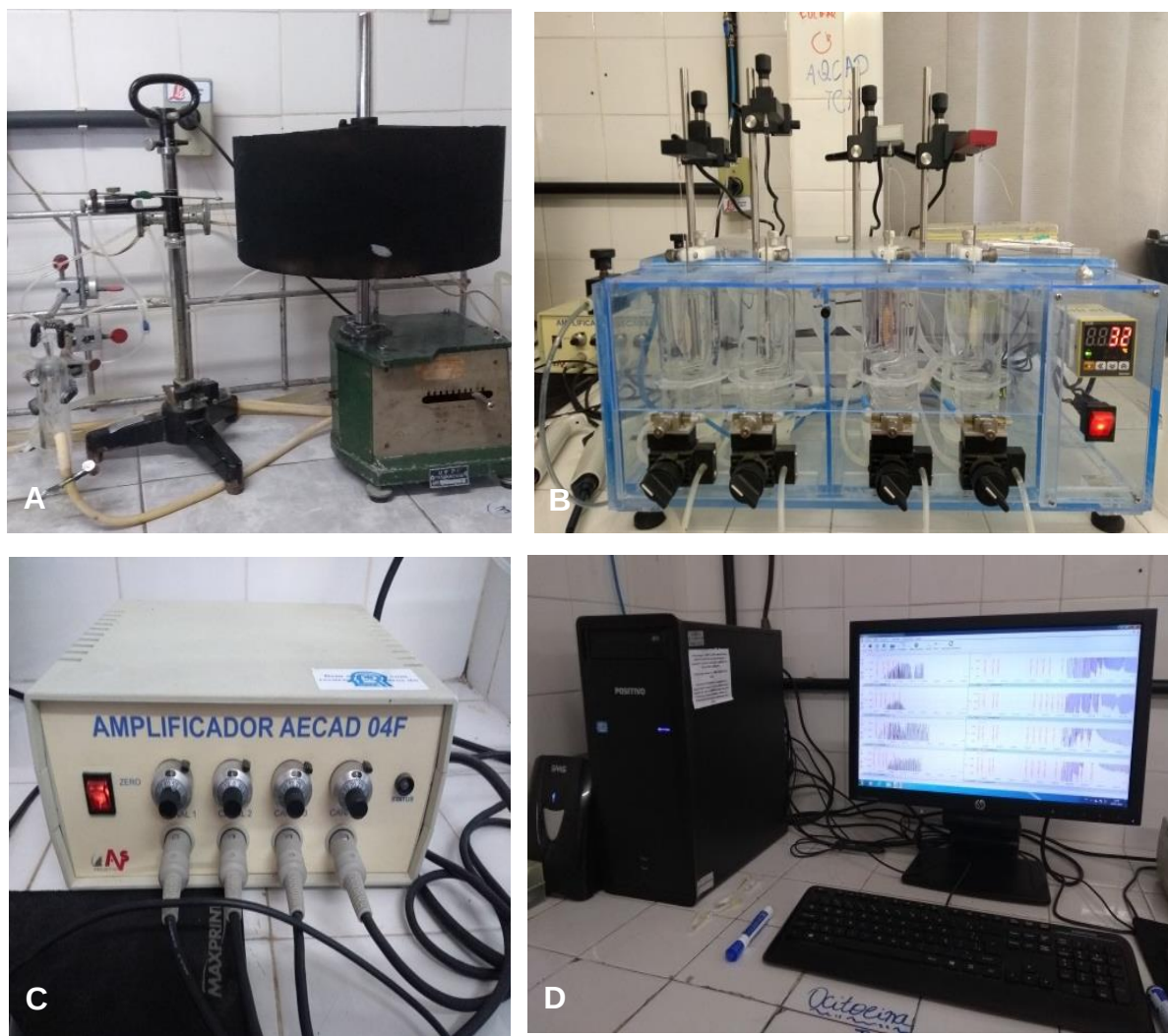
Para o registro das contrações isotônicas, os órgãos eram suspensos em cubas de banho para órgãos isolados (5 mL) e conectados a uma alavanca isotônica de inscrição frontal acoplados a cilindros esfumados de um quimógrafo (DTF, Brasil) (Figura 10). A temperatura das cubas (32 °C) era controlada com bombas 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 10). O sistema contém uma bomba termostática modelo BT-60 que controla a temperatura das cubas. Todos os aparelhos 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 10 – Aparelhos utilizados nos experimentos *in vitro*.



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

Fonte: Autor, 2018

4.2 Métodos

4.2.1 Preparação das soluções-mãe do extrato e dos flavonoides para os ensaios farmacológicos

O extrato era solubilizado em Cremophor® e diluído em água destilada para obtenção da solução-estoque (10 mg/mL, 3% Cremophor® v/v) que era estocada a uma temperatura de 0°C. A concentração final do Cremophor® na cuba nunca excedeu 0,01%, nesta concentração o Cremophor® é desprovido de efeito contrátil ou relaxante significativo no órgão estudado, de acordo com dados obtidos em experimentos anteriores.

As concentrações do extrato eram utilizadas em múltiplos de 3, sendo a concentração submáxima 243 e a máxima 729 µg/mL. E era realizado uma curva concentração-resposta completa testando concentrações menores para verificar o zero e o efeito máximo (E_{max}) do extrato.

Os flavonoides também eram solubilizados em Cremophor® e diluído em água destilada para obtenção da solução-estoque (10^{-2} M, 3% Cremophor® v/v) que eram estocados a uma temperatura de 0 °C. As concentrações dos flavonoides eram utilizadas 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 o efeito máximo (E_{max}) dos flavonoides.

4.2.2 Efeito tocolítico do ZB-EtOH_{PA} sobre as contrações tônicas induzidas 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 10^{-2} UI/mL de ocitocina o extrato era adicionado de maneira cumulativa à cuba em preparações diferentes.

O relaxamento produzido pelo extrato era expresso como a percentagem reversa da contração inicial induzida por ocitocina. A potência e a eficácia relaxante do ZB-EtOH_{PA} foram calculadas por regressão não linear e avaliadas comparando-se os valores da concentração do extrato que promovia 50% do seu efeito máximo (CE₅₀) e do efeito máximo (E_{máx}), respectivamente.

4.2.3. Avaliação do envolvimento da via do óxido nítrico/sGC/PKG no efeito tocolítico do ZB-EtOH_{PA} em rata

4.2.3.1 Efeito tocolítico do ZB-EtOH_{PA} 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 ZB-EtOH_{PA} 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 era adicionado o extrato de maneira cumulativa.

O relaxamento produzido pelo ZB-EtOH_{PA} foi expresso como a percentagem reversa da contração inicial induzida por ocitocina. Os valores de CE₅₀ foram calculados a partir das curvas de relaxamento e a potência tocolítica do extrato foi comparada na ausência (controle) e na presença do inibidor.

4.2.3.2 Efeito tocolítico do ZB-EtOH_{PA} sobre as contrações tônicas induzidas por ocitocina na ausência e na presença simultânea de L-NAME + L-arginina

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 ZB-EtOH_{PA} de forma cumulativa (curva-controle). Em experimento diferente, era adicionado simultaneamente à cuba 10^{-4} M de L-NAME, inibidor não seletivo de NOS, e 10^{-3} M ou 3×10^{-3} M de L-arginina (substrato para a NOS) (Adaptado de BULBUL et al., 2007), para avaliar a reversibilidade do efeito inibitório do L-NAME e confirmar a participação da NOS no efeito tocolítico do ZB-EtOH_{PA}. Após 20 minutos era induzida uma contração com 10^{-2} UI/mL de ocitocina e sobre o componente tônico dessa contração era adicionado o extrato de maneira cumulativa.

A eficácia e a potência farmacológicas relativas do extrato foram avaliadas como descrito no item anterior.

4.2.3.3 Efeito tocolítico do ZB-EtOH_{PA} sobre as contrações tônicas induzidas por ocitocina na ausência e na presença de ODQ

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 ZB-EtOH_{PA} de forma cumulativa (curva-controle). Em experimento diferente, 10^{-6} M de ODQ, um inibidor de sGC (PARRA; CANTABRANA; HIDALGO, 2000), era adicionado a cuba e após 20 minutos, uma contração era induzida com 10^{-2} UI/mL de ocitocina e sobre o componente tônico era adicionado o ZB-EtOH_{PA} de maneira cumulativa.

Devido a fotossensibilidade do ODQ, as luzes do ambiente eram apagadas e as cubas eram revestidas com papel alumínio, em vista de garantir a atividade deste inibidor. A eficácia e a potência relativas do extrato foram avaliadas como descrito anteriormente.

4.2.3.4 Efeito tocolítico do ZB-EtOH_{PA} sobre as contrações tônicas induzidas por ocitocina na ausência e na presença de Rp-8-Br-PET-cGMPS

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 ZB-EtOH_{PA} de forma cumulativa (curva-controle). Em experimento diferente, 10^{-6} M de Rp-8-Br-PET-cGMPS, um inibidor de PKG, era pré-incubado por 30 minutos (PARRA; CANTABRANA; HIDALGO, 2000), após esse tempo era induzida uma contração com 10^{-2} UI/mL de ocitocina e sobre o componente tônico o extrato era adicionado de maneira cumulativa.

A eficácia e a potência relativas do extrato foram avaliadas como descrito anteriormente.

4.2.4 Avaliação da participação dos canais de cálcio dependentes de voltagem (Cav) no efeito tocolítico do ZB-EtOH_{PA} em útero isolado de rata

4.2.4.1 Efeito tocolítico do ZB-EtOH_{PA} sobre as contrações tônicas induzidas por KCl em útero isolado de rata

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. Durante a fase tônica sustentada de uma segunda contração induzida por 60 mM de KCl o extrato era adicionado de maneira cumulativa à cuba em preparações diferentes.

A eficácia e a potência farmacológicas relativas do extrato foram avaliadas como descrito no item anterior.

4.2.4.2 Efeito tocolítico do ZB-EtOH_{PA} frente às contrações induzidas por cloreto de cálcio (CaCl₂) em meio despolarizante (KCl 60 mM) nominalmente sem Ca²⁺

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+} em meio despolarizante (KCl 60 mM) por um período de 30 minutos. Em seguida 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 esfumado de um quimógrafo. Após a obtenção da curva-controle, o extrato (em várias concentrações) era incubado e, na presença deste, era obtida uma segunda curva concentração-resposta cumulativa ao CaCl_2 .

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

4.2.4.3 Efeito tocolítico do ZB-EtOH_{PA} sobre as contrações tônicas induzidas por S-(-)-Bay K8644

O útero era montado como descrito no item 4.2.2. Após o período de estabilização, o útero era parcialmente despolarizado pela adição de 9 mM de KCl por 10 minutos para, então, ser induzida uma contração com 3×10^{-8} M de S-(-)-Bay K8644 (CONTE-CAMERINO et al., 1987), um agonista seletivo dos Ca_{v1} (FERRANTE et al., 1989; SCHRAMM et al., 1983a; b). Durante a fase tônica dessa contração, o ZB-EtOH_{PA} era adicionado de maneira cumulativa. O relaxamento foi expresso como a percentagem reversa da contração inicial produzida pelo S-(-)-Bay K8644 e o valor de CE_{50} foi calculado por regressão não linear.

Para garantir a atividade do S-(-)-Bay K8644, que é uma substância fotossensível, as cubas eram revestidas com papel alumínio, bem como as luzes do laboratório eram apagadas durante o experimento.

4.2.5 Avaliação do envolvimento dos canais de potássio no efeito tocolítico produzido pelo ZB-EtOH_{PA} em útero isolado de rata

4.2.5.1 Efeito do ZB-EtOH_{PA} sobre as contrações tônicas induzidas por ocitocina 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 ZB-EtOH_{PA} 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 extrato de forma cumulativa.

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

4.2.5.2 Efeito do ZB-EtOH_{PA} sobre as contrações tônicas induzidas por ocitocina na presença de bloqueadores seletivos de canais de K⁺

O órgão em questão era montado como descrito no item 4.2.2. Após a obtenção da curva controle, eram adicionados os bloqueadores seletivos em diferentes preparações, tais como 10^{-3} M de TEA⁺ que, nessa concentração, é um bloqueador seletivo dos BK_{Ca} (AARONSON et al., 2006), 10^{-7} M de apamina, um bloqueador seletivo dos SK_{Ca} (AYAR et al., 2001), 10^{-5} M de glibenclamida, um bloqueador seletivo dos K_{ATP} (PIPER et al., 1990; HUGHEST; HOLLINGSWORTH, 1997) ou 3×10^{-3} M de 4-AP, um bloqueador seletivo dos K_v (Adaptado de AARONSON et al., 2006) por um período de 20 minutos. Em seguida uma nova contração com a ocitocina era induzida ainda na presença desses bloqueadores. Durante a fase tônica sustentada dessa segunda contração, o extrato era, então, adicionado à cuba de maneira cumulativa. O relaxamento produzido por este foi expresso como a percentagem reversa da contração inicial induzida pelo agonista. Os valores de CE_{50} do extrato foram calculados a partir das curvas concentrações-resposta, na ausência e na presença dos diversos bloqueadores.

Durante os experimentos em que era encubado o 4-AP, em vista de garantir sua atividade, devido sua fotossensibilidade, as cubas eram revestidas com papel alumínio e as luzes do ambiente apagadas.

4.2.5.3 Efeito tocolítico do ZB-EtOH_{PA} sobre as contrações tônicas induzidas por ocitocina na ausência e na presença simultânea de bloqueadores seletivos de canais de K⁺

O útero era preparado conforme o descrito no item 4.2.2. Após o período de estabilização era induzida uma contração por 60 mM de KCl para verificar a funcionalidade do órgão. A preparação era lavada e após 15 minutos, era induzida uma contração de ocitocina a 10^{-2} UI/mL e sobre o componente tônico dessa contração era adicionado o ZB-EtOH_{PA} de forma cumulativa (curva-controle). Em preparação diferente, para verificar se haveria somação de efeito na ativação dos canais de K⁺ era pré-incubado simultaneamente 10^{-5} M de glibenclamida, 10^{-7} M de apamina, 10^{-3} M de TEA⁺ e 3×10^{-3} M de 4-AP, bloqueadores seletivos dos K_{ATP}, dos SK_{Ca}, dos BK_{Ca} e dos K_v, respectivamente (PIPER et al., 1990; HUGHEST; HOLLINGSWORTH, 1997; TSAI et al., 1998; AYAR et al., 2001; AARONSON et al., 2006) e após 20 minutos, uma nova contração era induzida por 10^{-2} UI/mL de ocitocina e sobre o componente tônico o ZB-EtOH_{PA} era adicionado de forma cumulativa.

A eficácia e a potência relativas do ZB-EtOH_{PA} eram avaliadas como descrito anteriormente.

4.2.6 Efeito dos flavonoides, 7-metoxiflavona e 5,7-dimetoxiflavona frente às contrações fásicas induzidas por ocitocina ou por CCh em útero isolado de rata

O útero era preparado conforme o 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. Após um período de 15 minutos duas contrações fásicas de magnitudes similares, com intervalo de 15 minutos entre ambas, eram obtidas com 10^{-2} UI/mL de ocitocina ou com 10^{-5} M de CCh. Os flavonoides eram incubados em pelo menos três concentrações por 15 minutos, em preparações diferentes e independentes (REVUELTA; CANTABRANA; HIDALGO, 2000).

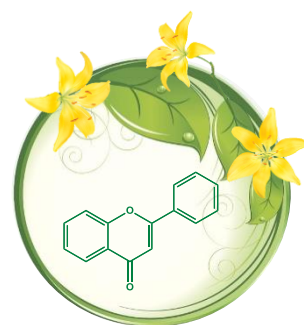
A inibição da resposta contrátil induzida por ocitocina ou CCh foi avaliada por comparação das respostas antes (controle) e após a adição dos flavonoides à cuba, sendo suas eficácias expressas como efeito máximo (E_{max}). Os valores de concentração de uma substância que inibe 50% do efeito de um agonista (CI_{50}) foram

expressos como a média e o erro padrão da média (e.p.m.) dos valores individuais da CI_{50} obtidos em cada um dos experimentos e calculados por regressão não linear.

O tempo de reversão do efeito espasmolítico dos flavonoides foi observado após a retirada do mesmo na concentração máxima utilizada.

4.2.7 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 funcionais foram analisados pelo programa GraphPad Prism® versão 5.01 (GraphPad Software Inc., San Diego CA, E.U.A.).



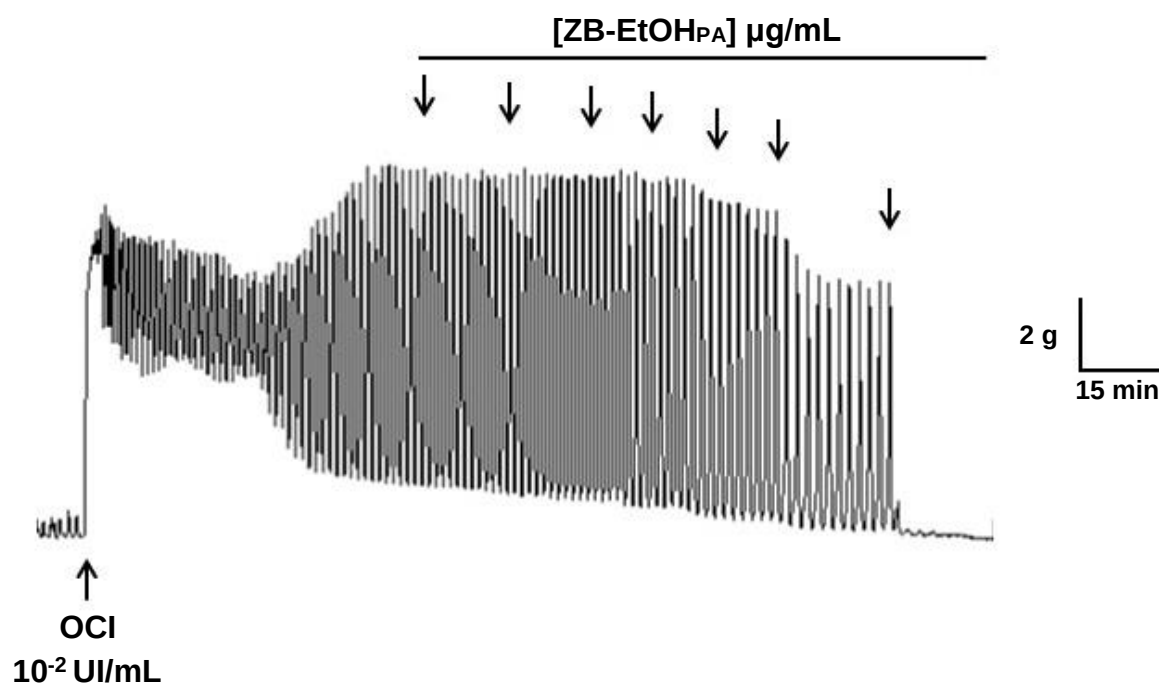
5 Resultados

5.1 Efeito tocolítico do ZB-EtOH_{PA} sobre as contrações tônicas induzidas por ocitocina em útero isolado de rata

O ZB-EtOH_{PA} (0,1-81 µg/mL, n = 5) relaxou de maneira dependente de concentração o útero de rata pré-contráído com 10⁻² UI/mL de ocitocina ($R^2 = 0,9435 \pm 0,0241$), apresentando uma CE₅₀ de $5,5 \pm 1,3$ µg/mL e atingindo o valor E_{max} na concentração de 81 µg/mL (E_{max} = $105,3 \pm 5,4\%$) (Figura 11, Gráfico 1).

O tempo médio para que o extrato alcançasse o seu efeito máximo era cerca 184,0 ± 19,0 minutos e a responsividade do útero ao agente contrátil, foi restaurada em 93,0 ± 15,0 minutos, após a retirada do extrato das cubas.

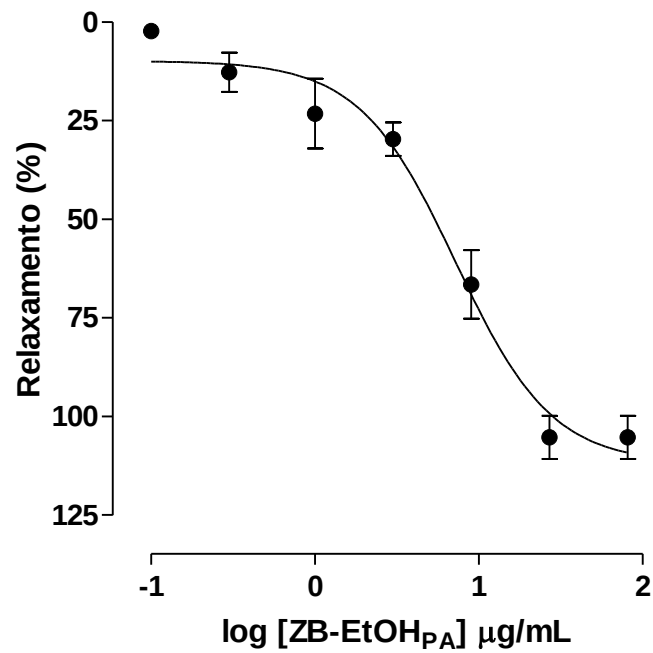
Figura 11 – Registro original representativo do efeito tocolítico do ZB-EtOH_{PA} sobre as contrações tônicas induzidas por 10⁻² UI/mL de ocitocina em rata.



As setas para baixo representam a adição cumulativa do ZB-EtOH_{PA} nas concentrações de 0,1; 0,3; 1; 3; 9; 27 e 81 µg/mL, OCI = ocitocina.

Fonte: Autor, 2018.

Gráfico 1 – Efeito tocolítico do ZB-EtOH_{PA} sobre as contrações tônicas induzidas por 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

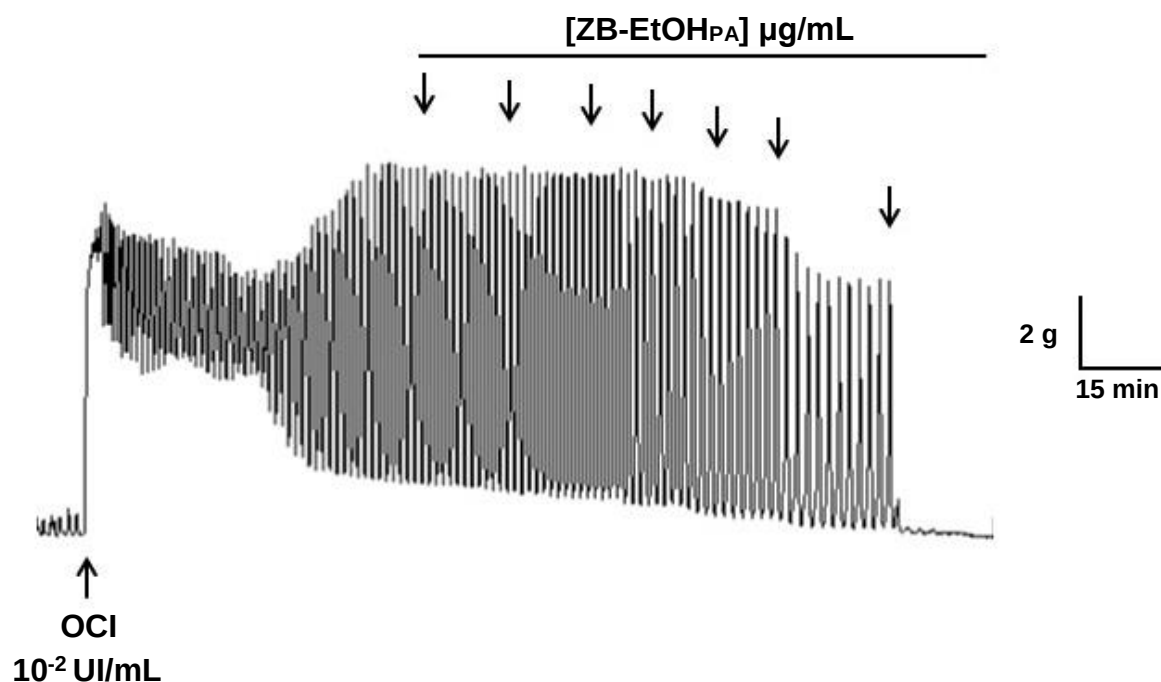
5.2 Avaliação do envolvimento da via do óxido nítrico/sGC/PKG no efeito tocolítico do ZB-EtOH_{PA} em rata

5.2.1. Efeito tocolítico do ZB-EtOH_{PA} sobre as contrações tônicas induzidas por ocitocina na ausência e na presença de L-NAME

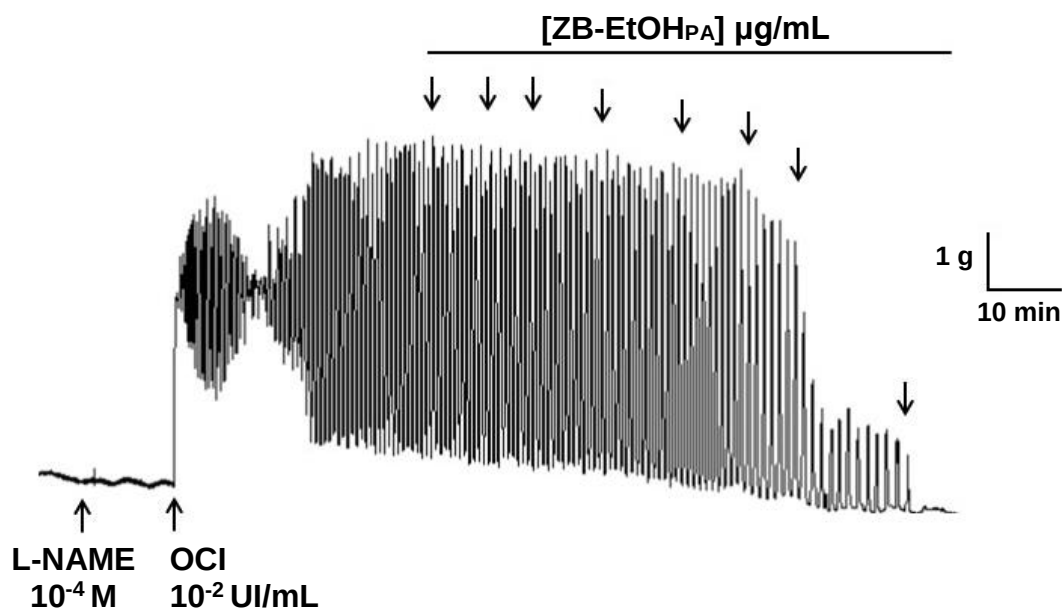
A curva do relaxamento (0,1-729 $\mu\text{g/mL}$, $n = 5$) do ZB-EtOH_{PA} ($\text{CE}_{50} = 5,5 \pm 1,3 \mu\text{g/mL}$) foi desviada para a direita na presença de 10^{-4} M de L-NAME, um inibidor não seletivo de NOS ($\text{CE}_{50} = 35,6 \pm 6,2 \mu\text{g/mL}$, $n = 5$), havendo uma redução da potência relaxante em cerca de 6,5 vezes. O E_{max} foi atingido na concentração de 81 e 729 $\mu\text{g/mL}$, na ausência ($E_{\text{max}} = 105,3 \pm 5,4\%$) e na presença ($E_{\text{max}} = 103,4 \pm 4,3\%$) do inibidor, respectivamente (Figura 12 e Gráfico 2).

Figura 12 – Registros originais representativos do efeito tocolítico do ZB-EtOH_{PA} 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 rata.

A



B



As setas para baixo representam a adição cumulativa do ZB-EtOH_{PA} nas concentrações de 0,1; 0,3; 1; 3; 9; 27 e 81 µg/mL (A) e de 0,1; 0,3; 1; 3; 9; 27; 81 e 243 µg/mL (B), OCI = ocitocina.

Fonte: Autor, 2018.

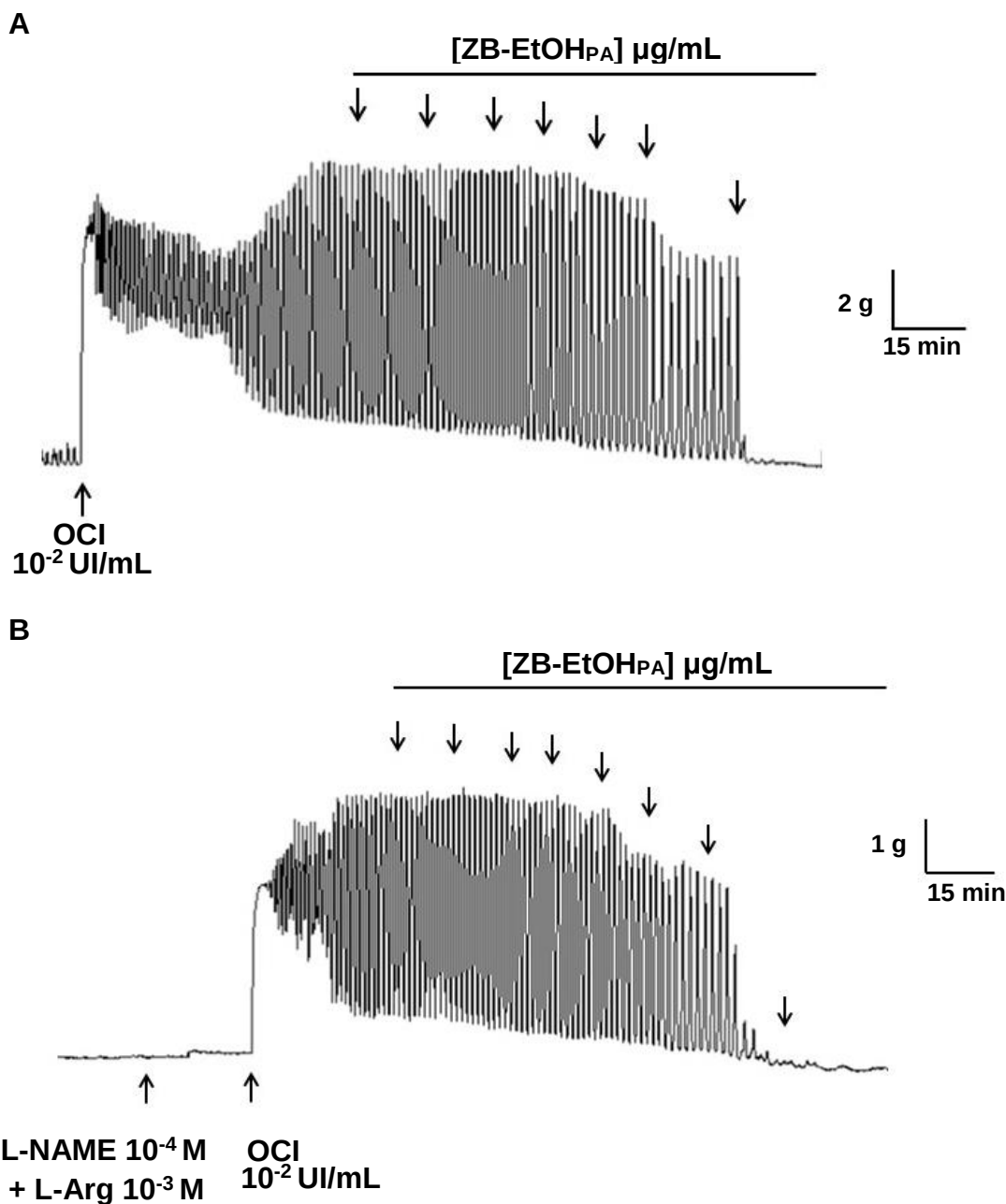
5.2.2 Efeito tocolítico do ZB-EtOH_{PA} sobre as contrações tônicas induzidas por ocitocina na ausência e na presença simultânea de L-NAME + L-arginina

Na presença simultânea de 10^{-4} M de L-NAME, inibidor não seletivo de NOS e de 10^{-3} M de L-arginina, substrato para a NOS, a curva de relaxamento do ZB-EtOH_{PA} ($CE_{50} = 5,5 \pm 1,3 \mu\text{g/mL}$, $n = 5$) foi desviada para direita atingindo o E_{max} na concentração de $243 \mu\text{g/mL}$ ($E_{\text{max}} = 108,0 \pm 4,2\%$), com redução da potência relaxante em aproximadamente 4,5 vezes ($CE_{50} = 24,8 \pm 3,1 \mu\text{g/mL}$, $n = 5$) (Figura 13 e Gráfico 2).

Já, ao se adicionar concomitantemente L-NAME e uma concentração maior de L-arginina (3×10^{-3} M) a curva de relaxamento do ZB-EtOH_{PA} ($CE_{50} = 5,5 \pm 1,3 \mu\text{g/mL}$, $n = 5$) também foi desviada para direita atingindo o E_{max} na concentração de $243 \mu\text{g/mL}$ ($E_{\text{max}} = 107,3 \pm 1,5\%$), com redução da potência relaxante em aproximadamente 8 vezes ($CE_{50} = 45,4 \pm 7,0 \mu\text{g/mL}$, $n = 5$) (Figura 13 e Gráfico 2).

Quando foi comparada a curva concentração-resposta na presença de L-NAME mais L-arginina com a curva na presença apenas do L-NAME, observou-se que o efeito inibitório do L-NAME sobre a potência relaxante do ZB-EtOH_{PA} foi revertido parcialmente (36%) na presença de 10^{-3} M de L-arginina, enquanto que na presença de 3×10^{-3} M do substrato, não houve alteração em relação a curva de L-NAME sozinho (Tabela 1).

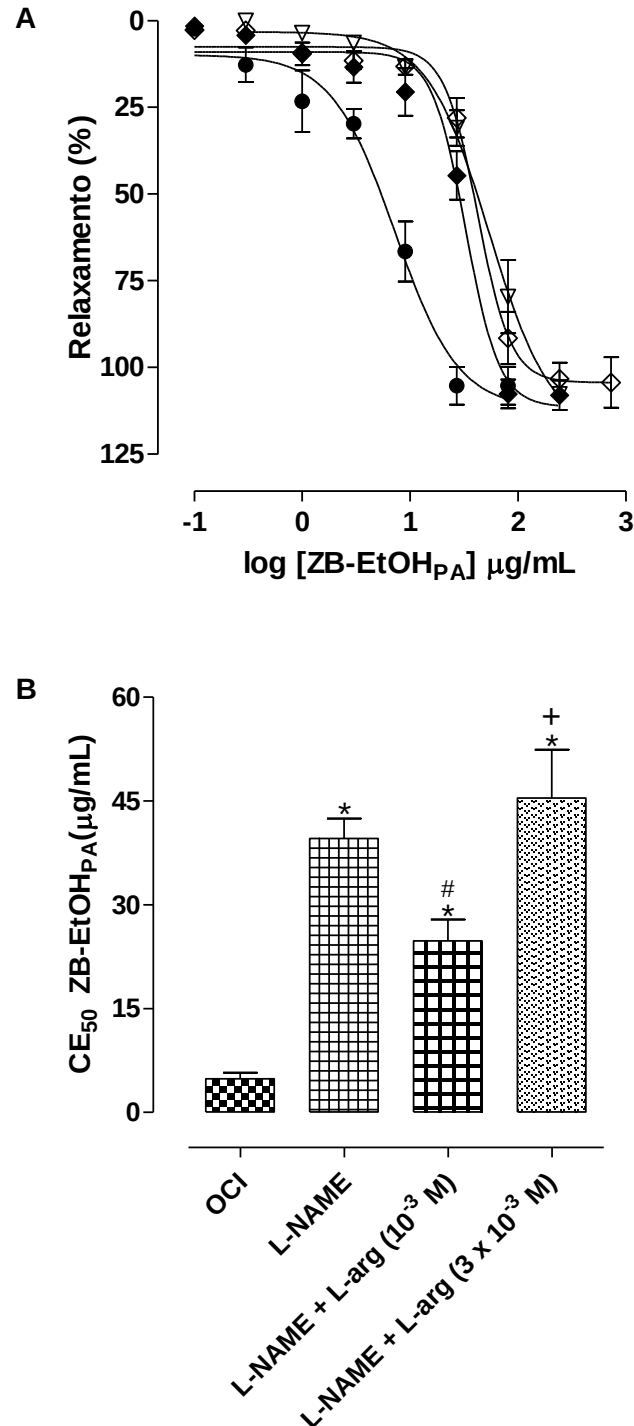
Figura 13 – Registros originais representativos do efeito tocolítico de ZB-EtOH_{PA} sobre as contrações tônicas induzidas por 10^{-2} UI/mL de ocitocina na ausência (**A**) e na presença simultânea de 10^{-4} M de L-NAME + 10^{-3} M de L-arginina (**B**) em rata.



As setas para baixo representam a adição cumulativa do ZB-EtOH_{PA} nas concentrações de 0,1; 0,3; 1; 3; 9; 27 e 81 µg/mL (**A**), de 0,1; 0,3; 1; 3; 9; 27; 81 e 243 µg/mL (**B**) e de 0,1; 0,3; 1; 3; 9; 27; 81 e 243 µg/mL, OCI = ocitocina e L-arg = L-arginina.

Fonte: Autor, 2018.

Gráfico 2 – Efeito tocolítico (A) e valores de CE_{50} (B) do ZB-EtOH_{PA} sobre as contrações tônicas induzidas por ocitocina na ausência (●), na presença de L-NAME (◇), na presença simultânea de L-NAME + L-arginina (10^{-3} M) (◆) e L-NAME + L-arginina (3×10^{-3} M) (▽) em rata.



Os símbolos e as barras verticais representam a média e o e.p.m., respectivamente (n = 5).
 Teste "t": * $p < 0,05$ (OCI vs. L-NAME ou L-NAME + L-arg (10^{-3} M) ou L-NAME + L-arg (3×10^{-3} M)); # $p < 0,05$ (L-NAME vs. L-NAME + L-arg (10^{-3} M)); + $p < 0,05$ (L-NAME + L-arg (10^{-3} M) vs. L-NAME + L-arg (3×10^{-3} M)).

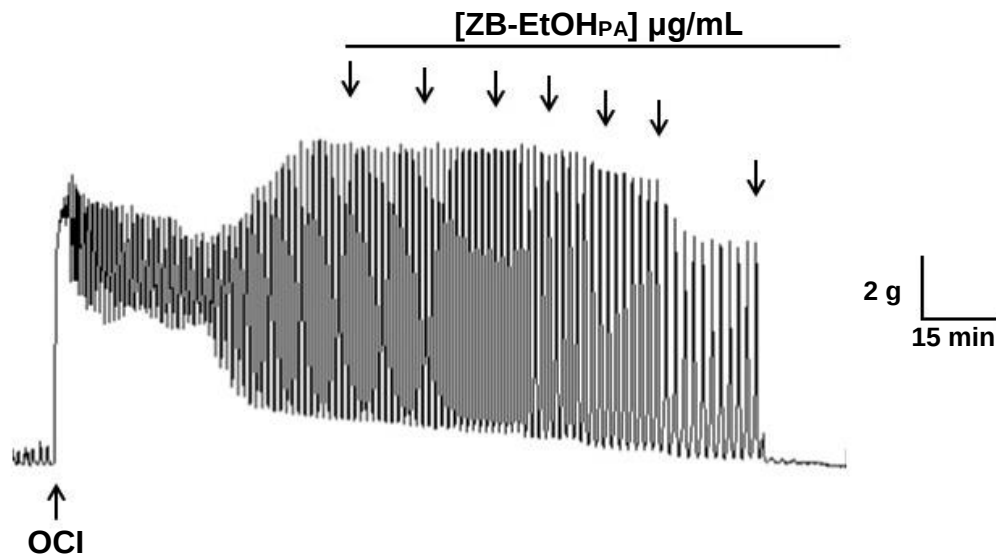
Fonte: Autor, 2018.

5.2.3 Efeito tocolítico do ZB-EtOH_{PA} sobre as contrações tônicas induzidas por ocitocina na ausência e na presença simultânea de ODQ

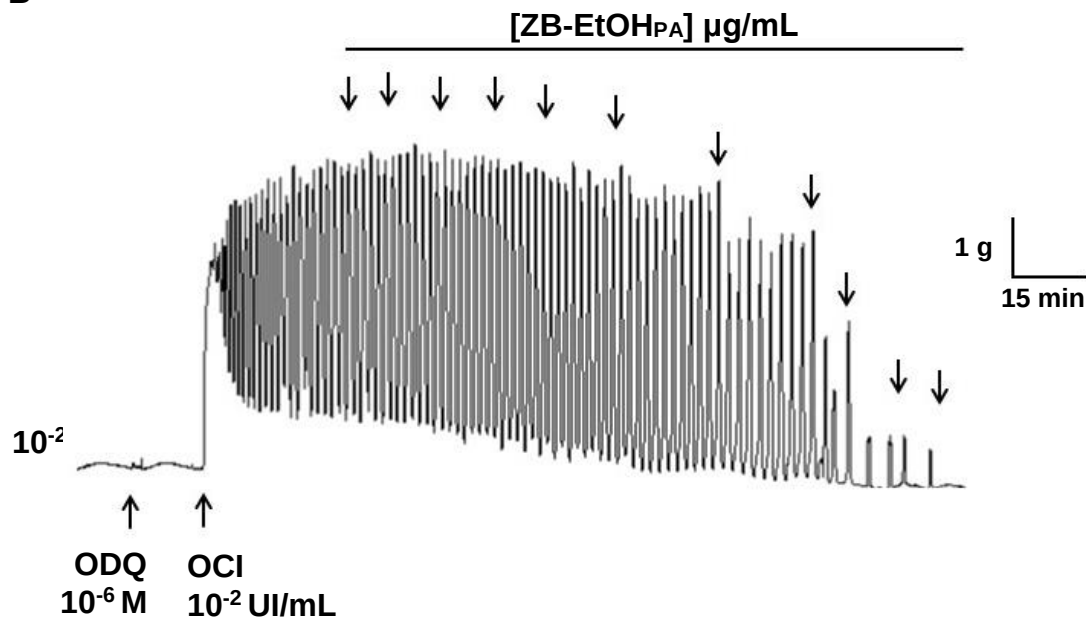
Na presença de 10^{-6} M de ODQ, um inibidor de sGC, a curva controle de relaxamento do ZB-EtOH_{PA} ($CE_{50} = 5,5 \pm 1,3 \mu\text{g/mL}$, $n = 5$) foi deslocada para a direita com redução da potência relaxante em aproximadamente 7 vezes ($CE_{50} = 36,9 \pm 7,3 \mu\text{g/mL}$, $n = 5$), e o E_{max} ($E_{\text{max}} = 106,4 \pm 2,1\%$) foi alcançado na concentração de 729 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 14 e Gráfico 3).

Figura 14 – Registros originais representativos do efeito tocolítico de ZB-EtOH_{PA} sobre as contrações tônicas induzidas por 10^{-2} UI/mL de ocitocina na ausência (A) e na presença (B) de 10^{-6} M de ODQ em rata.

A



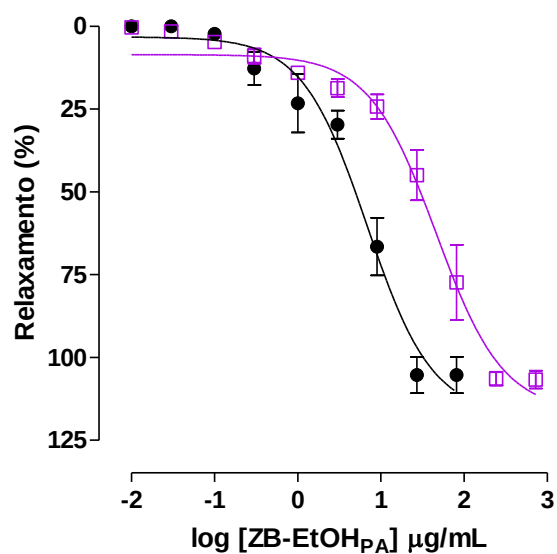
B



As setas para baixo representam a adição cumulativa do ZB-EtOH_{PA} nas concentrações de 0,1; 0,3; 1; 3; 9; 27 e 81 $\mu\text{g/mL}$ (A) e de 0,01; 0,03; 0,1; 0,3; 1; 3; 9; 27; 81; 243 e 729 $\mu\text{g/mL}$ (B), OCI = ocitocina.

Fonte: Autor, 2018

Gráfico 3 – Efeito tocolítico do ZB-EtOH_{PA} sobre as contrações tônicas induzidas por ocitocina na ausência (●) e na presença de ODQ (□) em rata.



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

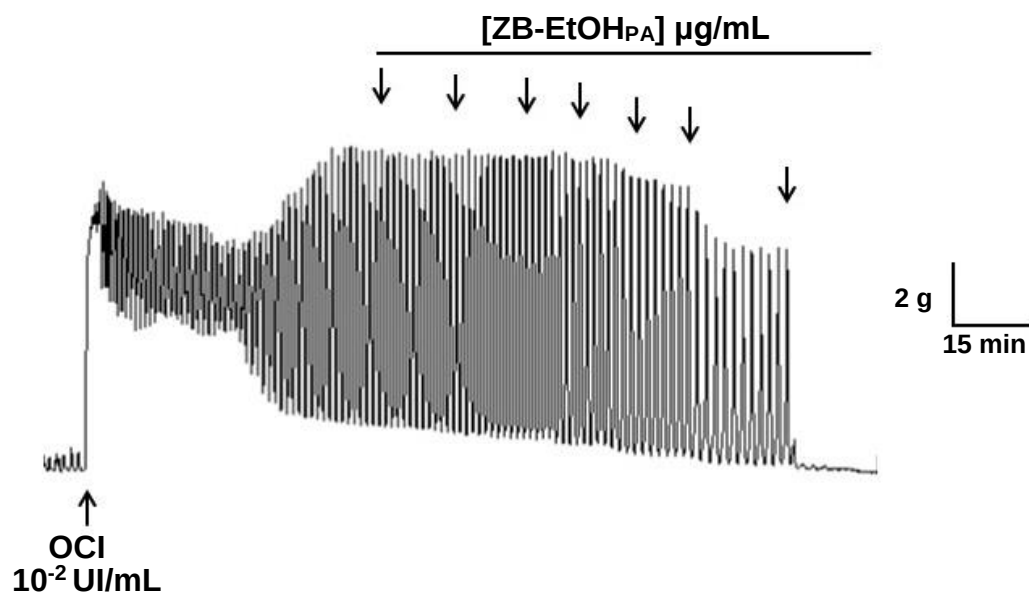
Fonte: Autor, 2018.

5.2.4 Efeito tocolítico do ZB-EtOH_{PA} sobre as contrações tônicas induzidas por ocitocina na ausência e na presença simultânea de Rp-8-Br-PET-cGMPS

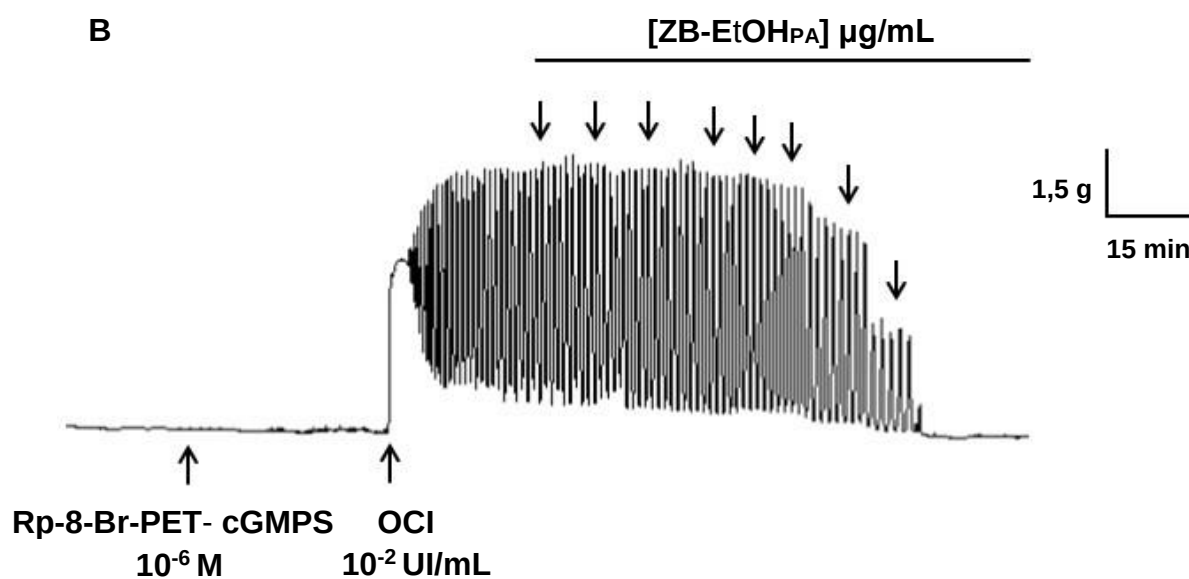
A curva de relaxamento de ZB-EtOH_{PA} ($CE_{50} = 5,5 \pm 1,3 \mu\text{g/mL}$, $n = 5$) foi deslocada para a direita na presença de 10^{-6} M de Rp-8-Br-PET-cGMPS, um inibidor de PKG ($CE_{50} = 15,4 \pm 2,7 \mu\text{g/mL}$ e $R^2 = 0,9750 \pm 0,0133$, $n = 5$), com redução da potência relaxante em cerca de 3 vezes, entretanto sem alteração da eficácia ($E_{\text{max}} = 107,6 \pm 3,0\%$), atingindo seu E_{max} na concentração de $243 \mu\text{g/mL}$ (Figura 15, Gráfico 4, Tabela 1).

Figura 15 – Registros originais representativos do efeito tocolítico do ZB-EtOH_{PA} sobre as contrações tônicas induzidas por 10⁻² UI/mL de ocitocina na ausência (A) e na presença (B) de 10⁻⁶ M de Rp-8-Br-PET-cGMPS em rata.

A



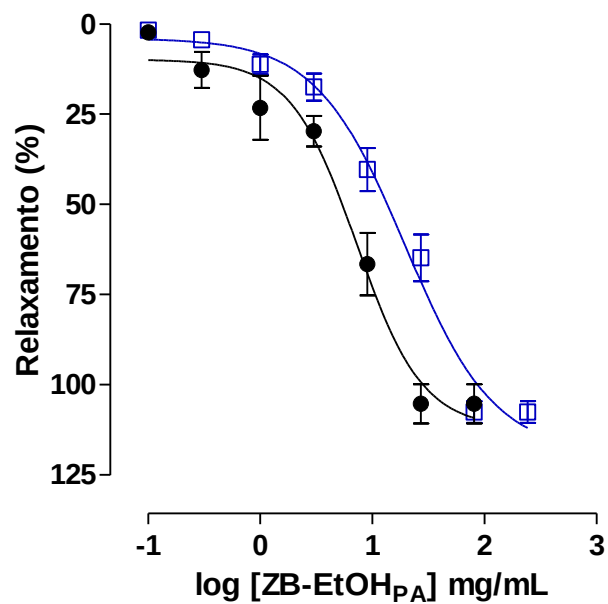
B



As setas para baixo representam a adição cumulativa do ZB-EtOH_{PA} nas concentrações de 0,1; 0,3; 1; 3; 9; 27 e 81 µg/mL (A) e de 0,1; 0,3; 1; 3; 9; 27; 81 e 243 µg/mL (B), OCI = ocitocina.

Fonte: Autor, 2018

Gráfico 4 – Efeito tocolítico do ZB-EtOH_{PA} sobre as contrações tônicas induzidas por ocitocina na ausência (●) e na presença de Rp-8-Br-PET-cGMPS (□) em rata.



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

Fonte: Autor, 2018.

Tabela 1 – Valores de $E_{\max}$, de CE_{50} e de R^2 do ZB-EtOH_{PA} na ausência (controle) e na presença de um substrato de NOS (L-NAME) e de inibidores da via NO/sGC/PKG em útero isolado de rata.

Inibidores	$E_{\max}$ (%)	CE_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	R^2
Ausência	105,3 $\pm$ 5,4	5,5 $\pm$ 1,3	0,9435 $\pm$ 0,0241
L-NAME	103,4 $\pm$ 4,3	35,6 $\pm$ 6,2*	0,9721 $\pm$ 0,0095
L-NAME + L-arginina (10⁻³ M)	108,0 $\pm$ 4,2	24,8 $\pm$ 3,1*	0,9638 $\pm$ 0,0140
L-NAME + L-arginina (3 x 10⁻³ M)	107,3 $\pm$ 1,5	45,4 $\pm$ 7,0*	0,9805 $\pm$ 0,0024
ODQ	106,4 $\pm$ 2,1	36,9 $\pm$ 7,3*	0,9653 $\pm$ 0,0091
Rp-8-Br-PET-cGMPS	107,6 $\pm$ 2,9	15,4 $\pm$ 2,7*	0,9750 $\pm$ 0,0133

Teste “t”: * $p < 0,05$ (inibidores vs. controle), $n = 5$.

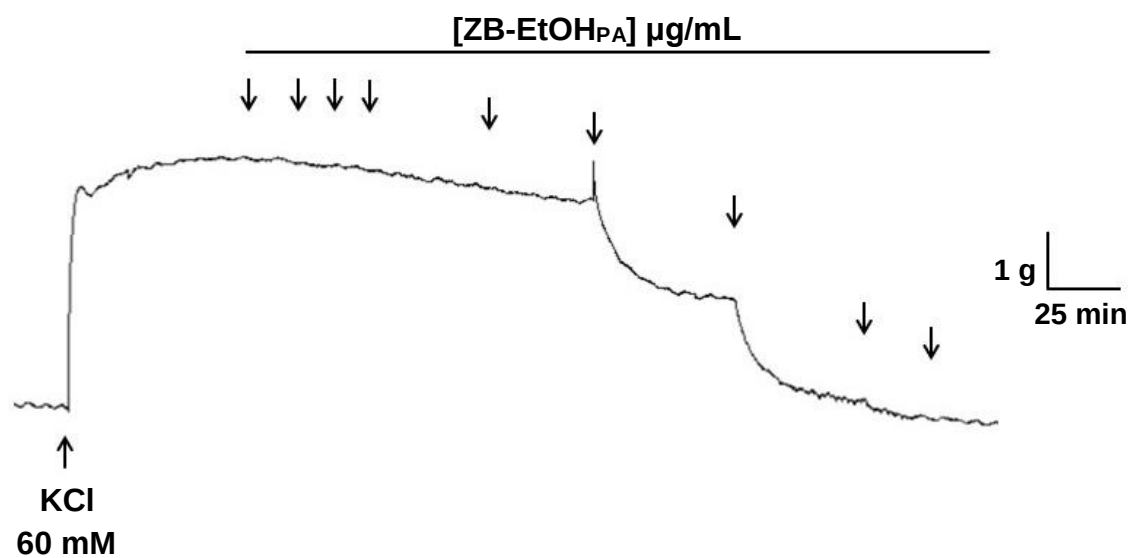
5.3 Participação dos canais de cálcio dependentes de voltagem (Cav) no efeito tocolítico do ZB-EtOH_{PA} em útero isolado de rata

5.3.1 Efeito tocolítico do ZB-EtOH_{PA} sobre as contrações tônicas induzidas por KCl em útero isolado de rata

O ZB-EtOH_{PA} (0,1-729 $\mu\text{g/mL}$, $n = 5$) relaxou de maneira dependente de concentração o útero de rata pré-contraído com 60 mM de KCl ($R^2 = 0,9859 \pm 0,0086$), apresentando CE_{50} de $22,0 \pm 1,3 \mu\text{g/mL}$, tendo o valor de E_{max} atingido na concentração de 729 $\mu\text{g/mL}$ ($E_{\text{max}} = 101,1 \pm 1,7\%$) (Figura 16, Gráfico 5).

O tempo médio para que o extrato alcançasse o seu efeito máximo era cerca de $249,0 \pm 17,0$ e a responsividade do útero ao agente contrátil KCl foi restaurada em $89,0 \pm 8,0$ após a retirada do extrato das cubas.

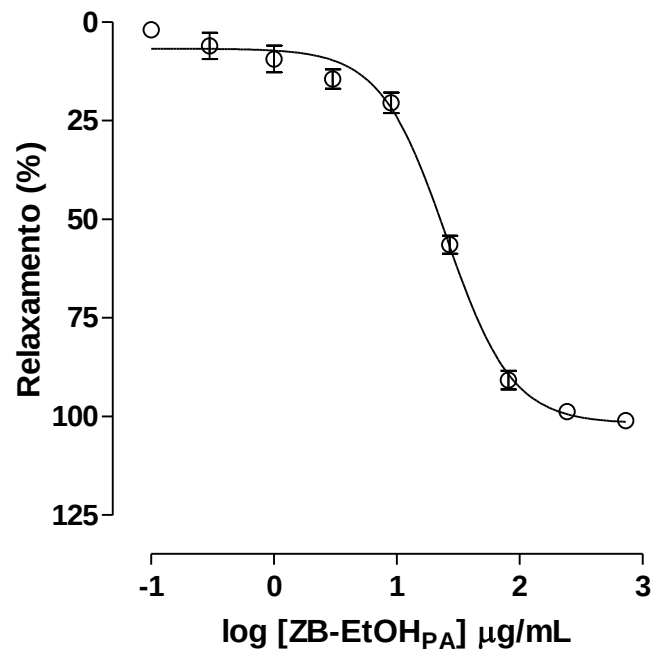
Figura 16 – Registro original representativo do efeito tocolítico do ZB-EtOH_{PA} sobre as contrações tônicas induzidas por 60 mM de KCl em rata.



As setas para baixo representam a adição cumulativa do ZB-EtOH_{PA} nas concentrações de 0,1; 0,3; 1; 3; 9; 27; 81; 243 e 729 μg/mL.

Fonte: Autor, 2018.

Gráfico 5 – Efeito tocolítico do ZB-EtOH_{PA} sobre as contrações tônicas induzidas por 60 mM de KCl em ratas.



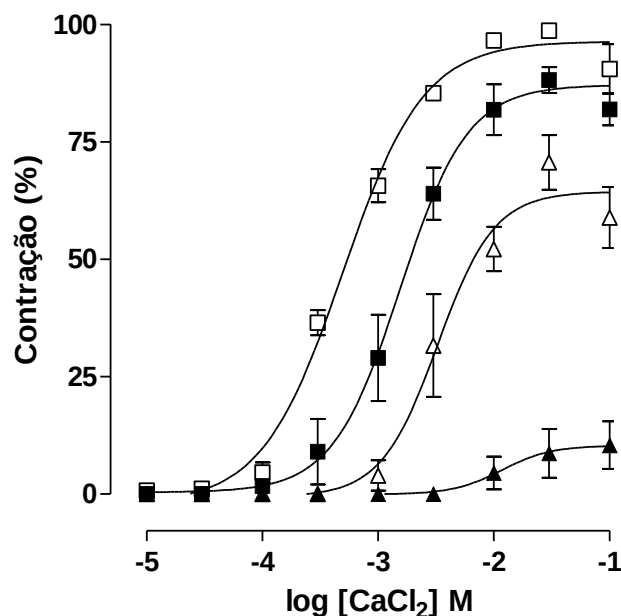
Os símbolos e as barras verticais representam a média e o e.p.m., respectivamente (n = 5).

Fonte: Autor, 2018

5.3.2 Efeito tocolítico do ZB-EtOH_{PA} frente às contrações induzidas por cloreto de cálcio (CaCl₂) em meio despolarizante (KCl 60 mM) nominalmente sem Ca²⁺

O ZB-EtOH_{PA} (27-243 µg/mL, n = 5) inibiu de maneira dependente de concentração as contrações cumulativas induzidas por CaCl₂ em meio despolarizante (KCl 60 mM) nominalmente sem Ca²⁺. As curvas cumulativas ao CaCl₂ foram desviadas para direita de forma não paralela e com redução do E_{max} de 100% (controle) para 88,6 ± 2,4; 74,1 ± 3,9 e 10,4 ± 5%, respectivamente. Os valores de CE₅₀ do CaCl₂ passaram de 5,9 ± 0,6 x 10⁻⁴ M no controle para 1,8 ± 0,6 x 10⁻³; 5,4 ± 1,6 x 10⁻³ M, respectivamente (Gráfico 6, Tabela 2).

Gráfico 6 – Efeito inibitório do ZB-EtOH_{PA} frente às contrações induzidas por cloreto de cálcio (CaCl₂) em meio despolarizante nominalmente sem Ca²⁺ na ausência (□) e na presença do ZB-EtOH_{PA} nas concentrações de 27 (■), 81 (Δ) e 243 (▲) µg/mL, em rata.



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

Fonte: Autor, 2018.

Tabela 2 – Valores de E_{max} (%) e de CE₅₀ (M) do CaCl₂ na ausência (controle) e na presença do ZB-EtOH_{PA} em útero de rata.

ZB-EtOH _{PA} (µg/mL)	E _{max} (%)	CE ₅₀ (M)
Ausência	100	5,9 ± 0,6 x 10 ⁻⁴
27	88,6 ± 2,4	1,8 ± 0,6 x 10 ⁻³
81	74,1 ± 3,9*	5,4 ± 1,6 x 10 ⁻³ *
243	10,4 ± 5%*	Nd

ANOVA *one-way* seguido do pós-teste de Tukey, **p* < 0,05 (controle vs. ZB-EtOH_{PA}); Nd = não determinado (n = 5).

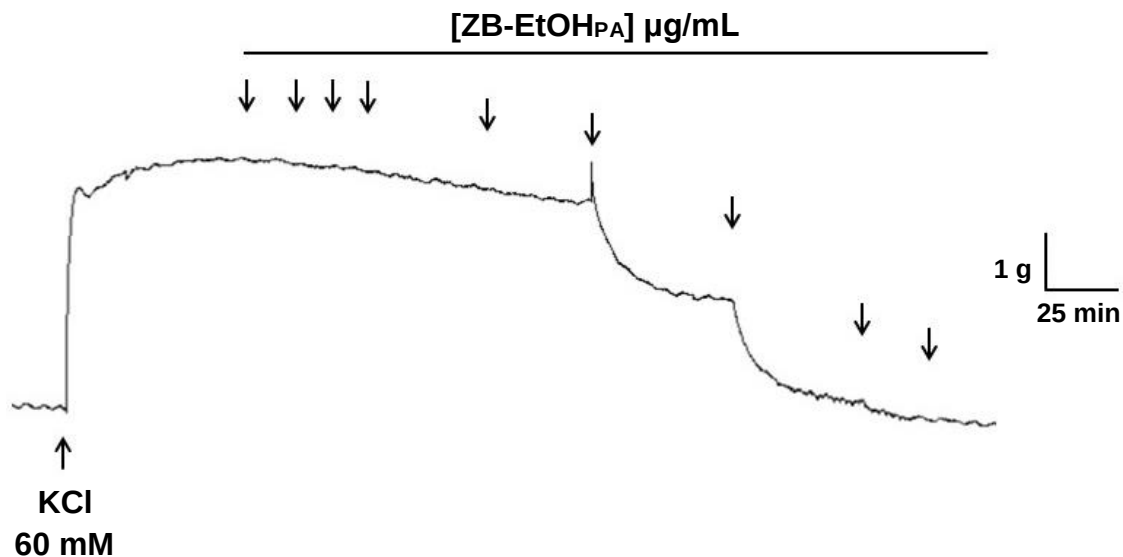
Fonte: Autor, 2018.

5.3.3 Efeito tocolítico de ZB-EtOH_{PA} sobre as contrações tônicas induzidas por S-(-)-Bay K8644

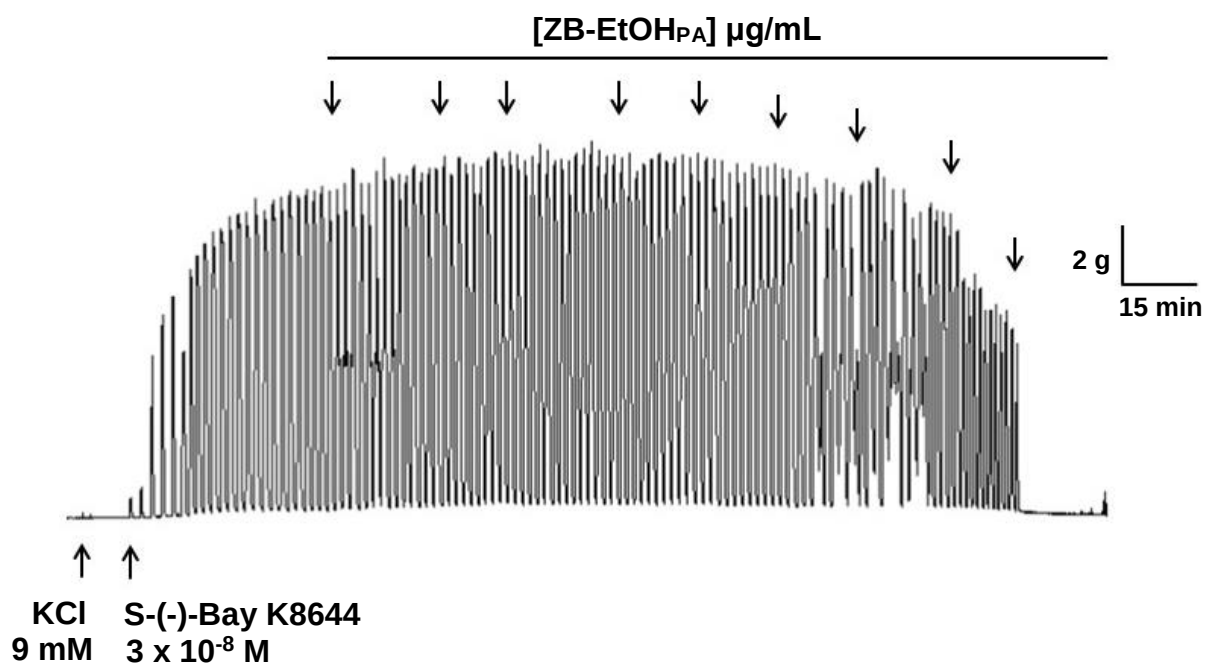
O ZB-EtOH_{PA} (0,1-729 µg/mL, n = 5) relaxou de maneira dependente de concentração ($R^2 = 0,9684 \pm 0,0218$) o útero de rata pré-contraído com 3×10^{-8} M de S-(-)-Bay K8644, um agonista dos canais de cálcio do tipo di-hidropiridina ($E_{\max} = 103,0 \pm 3,9$ µg/mL) em meio parcialmente despolarizado com 9 mM de KCl, apresentando uma potência cerca de quatro vezes menor ($CE_{50} = 84,3 \pm 10,6$ µg/mL) comparado quando o útero era pré-contraído com 60 mM de KCl ($CE_{50} = 22,0 \pm 1,3$ µg/mL) (Figura 17, Gráfico 7).

Figura 17 – Registros originais representativos típicos do efeito tocolítico do ZB-EtOH_{PA} em útero isolado de rata pré-contráido com 60 mM de KCl (**A**) e com 3×10^{-8} M de S-(-)-Bay K8644 parcialmente despolarizado com 9 mM de KCl (**B**).

A



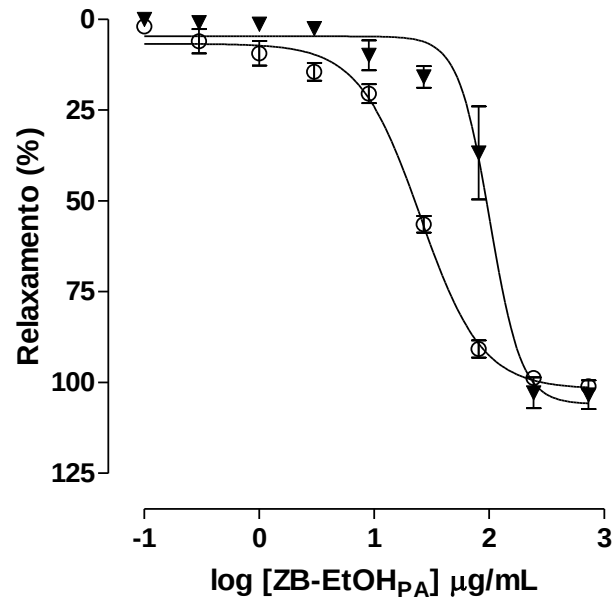
B



As setas para baixo representam a adição cumulativa do ZB-EtOH_{PA} nas concentrações de 0,1; 0,3; 1; 3; 9; 27; 81; 243 e 729 µg/mL (**A**) e de 0,1; 0,3; 1; 3; 9; 27; 81; 243 e 729 µg/mL (**B**).

Fonte: Autor, 2018

Gráfico 7 – Efeito tocolítico do ZB-EtOH_{PA} sobre contrações tônicas induzidas por 60 mM de KCl (○) e por 3×10^{-8} M de S-(-)-Bay K8644 (▼) em rata.



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

Fonte: Autor, 2018.

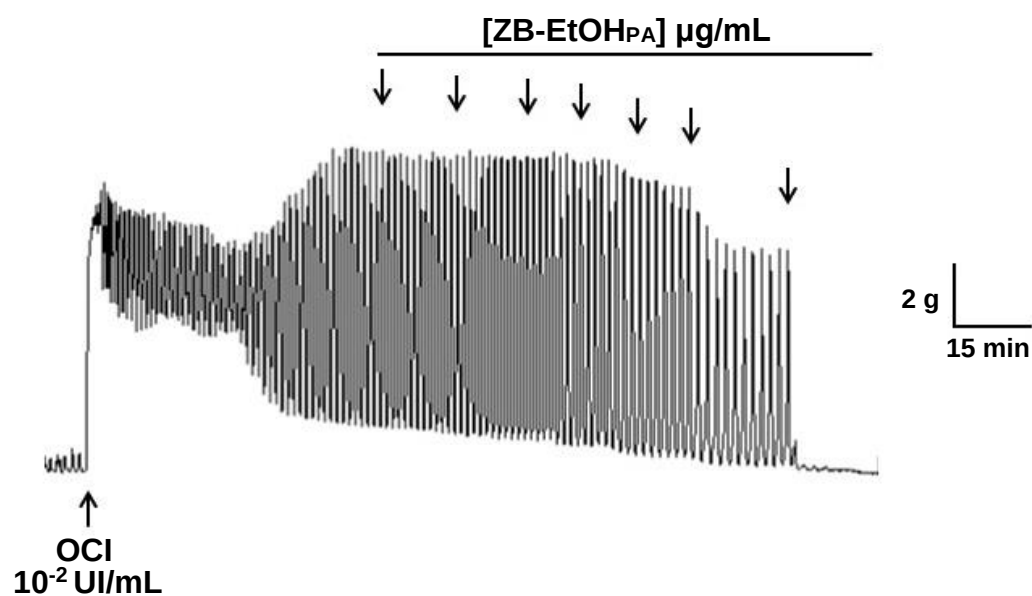
5.4 Avaliação do envolvimento dos canais de potássio no efeito relaxante do ZB-EtOH_{PA} em útero isolado de rata

5.4.1 Efeito do ZB-EtOH_{PA} sobre as contrações tônicas induzidas por ocitocina na ausência e na presença de CsCl

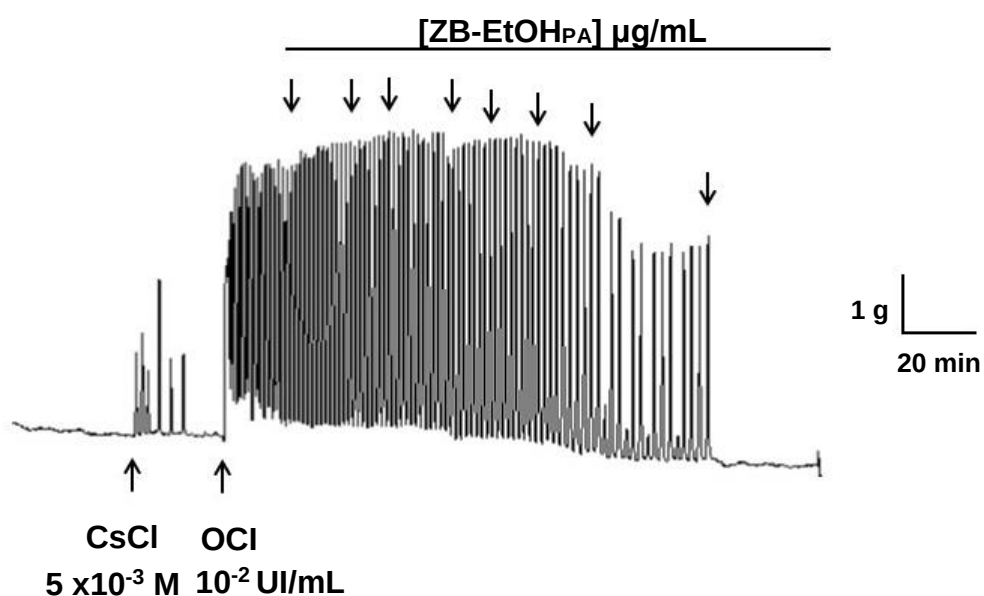
Na presença de 5 mM de CsCl, um bloqueador não seletivo dos canais de potássio, a curva de relaxamento do ZB-EtOH_{PA} (0,1- 243 µg/mL, n = 5) foi deslocada para direita com redução da potência relaxante cerca de 5 vezes ($CE_{50} = 27,1 \pm 3,0$ µg/mL) quando comparada ao relaxamento produzido pelo extrato na ausência de CsCl ($CE_{50} = 5,5 \pm 1,3$ µg/mL; $R^2 = 0,9617 \pm 0,0149$) (Figura 18, Gráfico 8).

Figura 18 – Registros originais representativos do efeito tocolítico do ZB-EtOH_{PA} sobre as contrações tônicas induzidas por 10^{-2} UI/mL de ocitocina na ausência (A) e na presença (B) de 5×10^{-3} M de CsCl em rata.

A



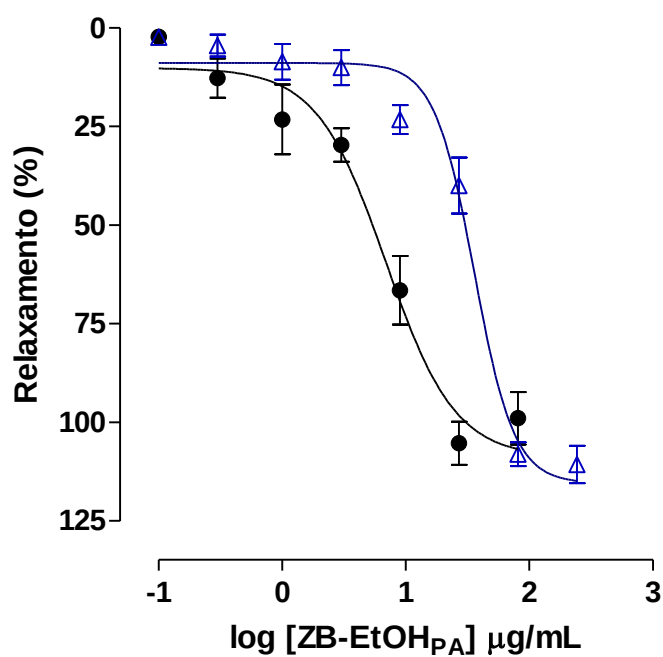
B



As setas para baixo representam a adição cumulativa do ZB-EtOH_{PA} nas concentrações de 0,1; 0,3; 1; 3; 9; 27 e 81 $\mu\text{g/mL}$ (A) e de 0,1; 0,3; 1; 3; 9; 27; 81 e 243 $\mu\text{g/mL}$ (B), OCI = ocitocina.

Fonte: Autor, 2018

Gráfico 8 – Efeito tocolítico do ZB-EtOH_{PA} sobre as contrações tônicas induzidas por ocitocina na ausência (●) e na presença de CsCl (Δ) em rata.



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

Fonte: Autor, 2018.

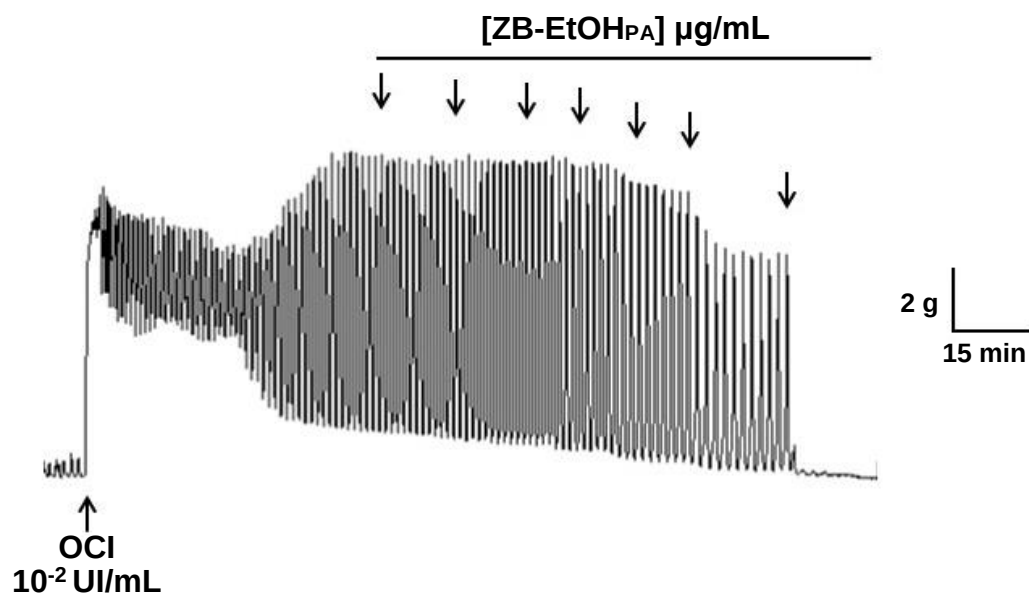
5.4.2 Efeito tocolítico do ZB-EtOH_{PA} sobre as contrações tônicas induzidas por ocitocina na ausência e na presença de bloqueadores seletivos de canais de K⁺

A curva de relaxamento do ZB-EtOH_{PA} (0,1-243 µg/mL) em útero isolado de rata ($CE_{50} = 5,5 \pm 1,3$ µg/mL, $n = 5$) foi deslocada para a direita na presença dos bloqueadores de canais de K⁺ ($n = 5$), entre eles, 10^{-3} M de TEA⁺, bloqueador dos BK_{Ca} ($CE_{50} = 16,8 \pm 2,8$ µg/mL, Figura 19 e Gráfico 9), de 10^{-7} M de apamina bloqueador dos SK_{Ca} ($CE_{50} = 22,0 \pm 3,4$ µg/mL, Figura 20 e Gráfico 10), de 10^{-5} M de glibenclamida, bloqueador dos K_{ATP} ($CE_{50} = 28,2 \pm 5,3$ µg/mL, Figura 21 e Gráfico 11) e de 3×10^{-3} M de 4-AP bloqueador dos K_V ($CE_{50} = 73,2 \pm 13,4$ µg/mL, Figura 22 e Gráfico 12) com redução da potência relaxante do extrato aproximadamente 3; 4; 5 e 13 vezes, respectivamente.

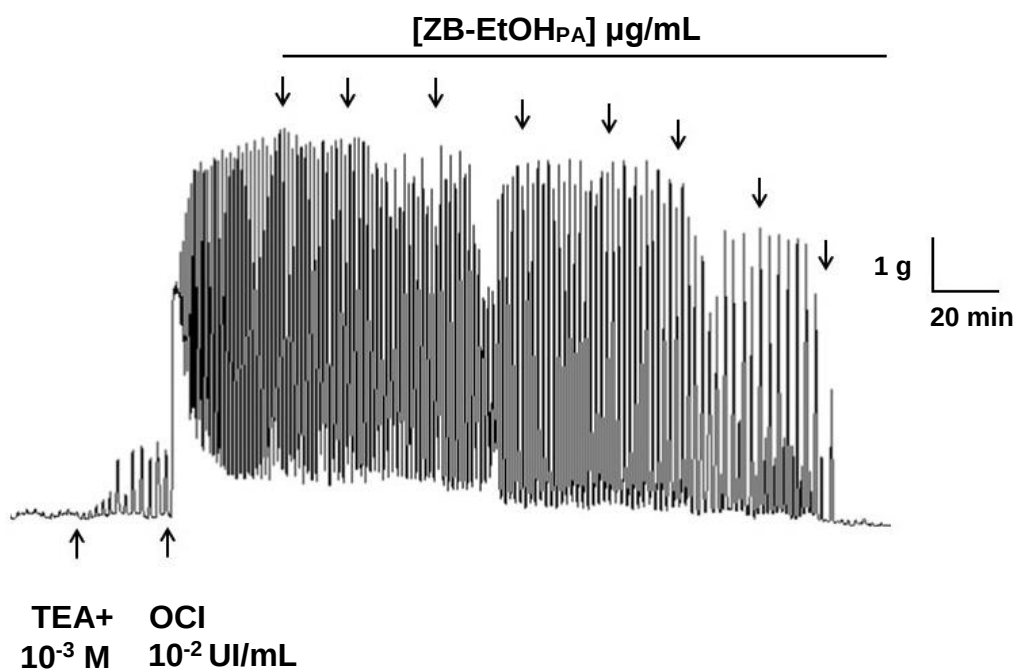
Na presença de todos os bloqueadores os valores de E_{max} foram atingidos nas concentrações de 243 µg/mL ($E_{max} = 105,6 \pm 1,6\%$; $106,9 \pm 2,9\%$; $108,2 \pm 1,8\%$ e $110,4 \pm 3,4\%$, respectivamente), enquanto na ausência desses bloqueadores foi alcançado na concentração de 81 µg/mL ($E_{max} = 105,3 \pm 5,4\%$).

Figura 19 – Registros originais representativos do efeito tocolítico do ZB-EtOH_{PA} sobre as contrações tônicas induzidas por 10^{-2} UI/mL de ocitocina na ausência (A) e na presença (B) de 10^{-3} M de TEA⁺ em rata.

A



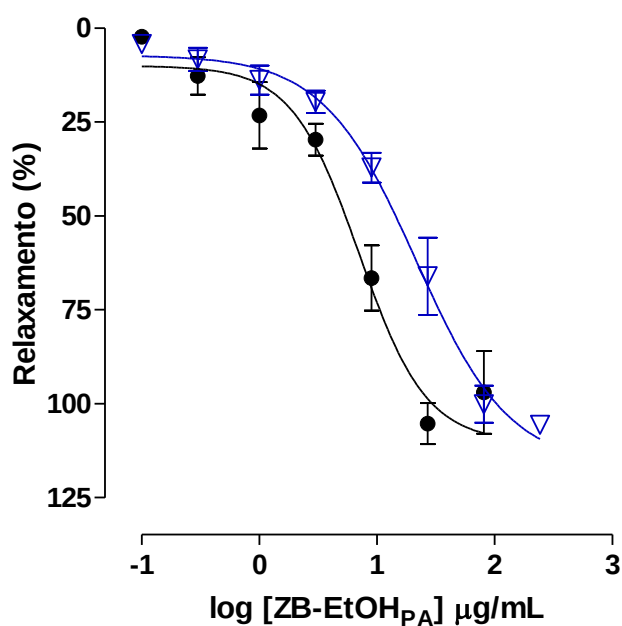
B



As setas para baixo representam a adição cumulativa do ZB-EtOH_{PA} nas concentrações de 0,1; 0,3; 1; 3; 9; 27 e 81 µg/mL (A) e de 0,1; 0,3; 1; 3; 9; 27; 81 e 243 µg/mL (B), OCI = ocitocina.

Fonte: Autor, 2018

Gráfico 9 – Efeito tocolítico do ZB-EtOH_{PA} sobre as contrações tônicas induzidas por ocitocina na ausência (●) e na presença de TEA⁺(▽) em rata.

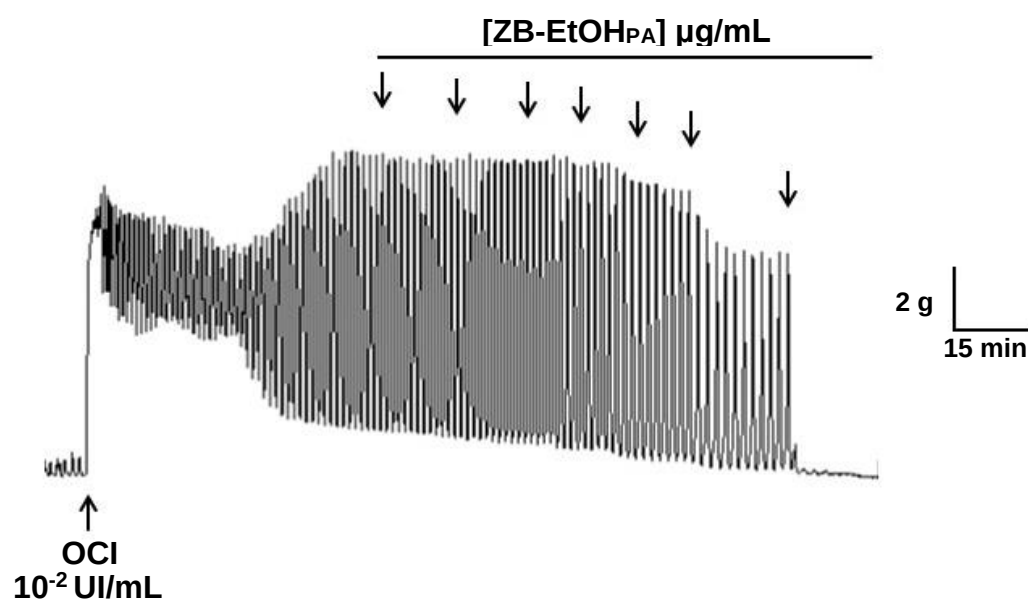


Os símbolos e as barras verticais representam a média e o e.p.m., respectivamente (n = 5).

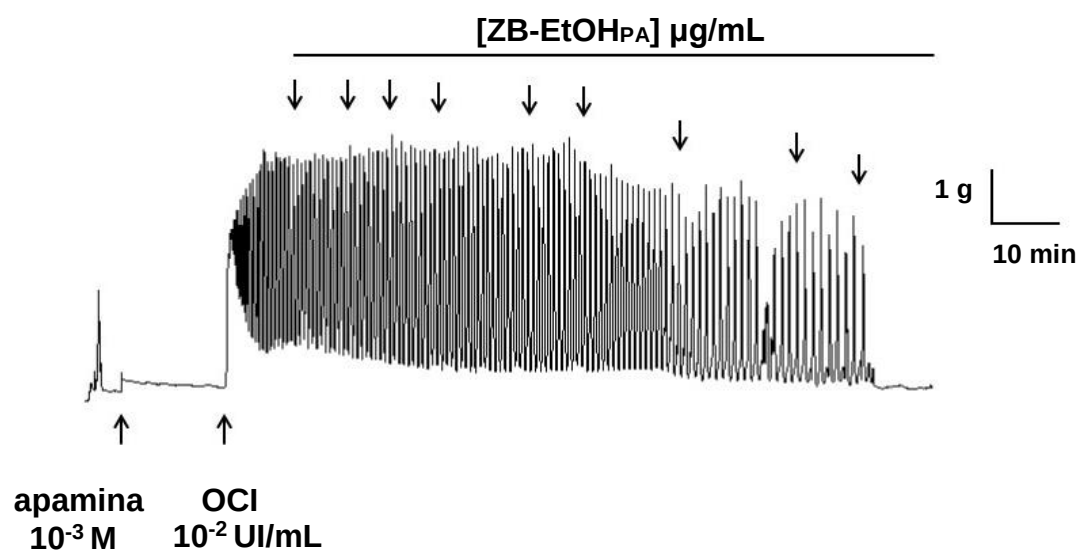
Fonte: Autor, 2018.

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

A



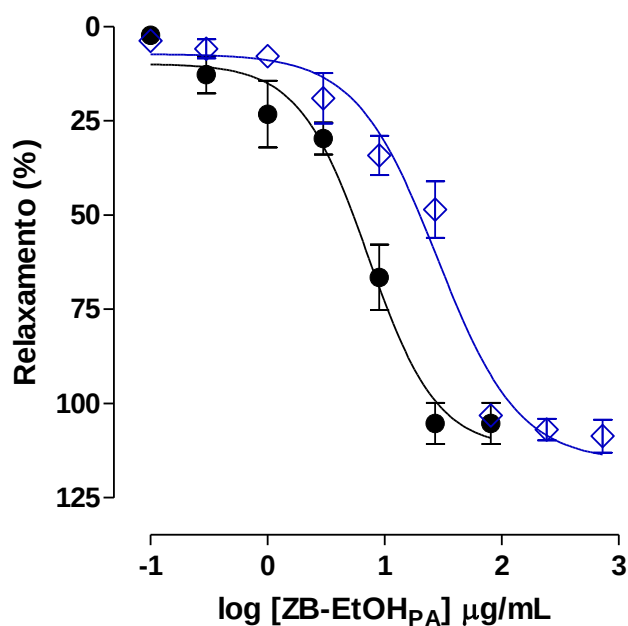
B



As setas para baixo representam a adição cumulativa do ZB-EtOH_{PA} nas concentrações de 0,1; 0,3; 1; 3; 9; 27 e 81 µg/mL (A) e de 0,1; 0,3; 1; 3; 9; 27; 81; 243 e 729 µg/mL (B), OCI = ocitocina.

Fonte: Autor, 2017

Gráfico 10 – Efeito tocolítico do ZB-EtOH_{PA} sobre as contrações tônicas induzidas por ocitocina na ausência (●) e na presença de apamina (◇) em rata.

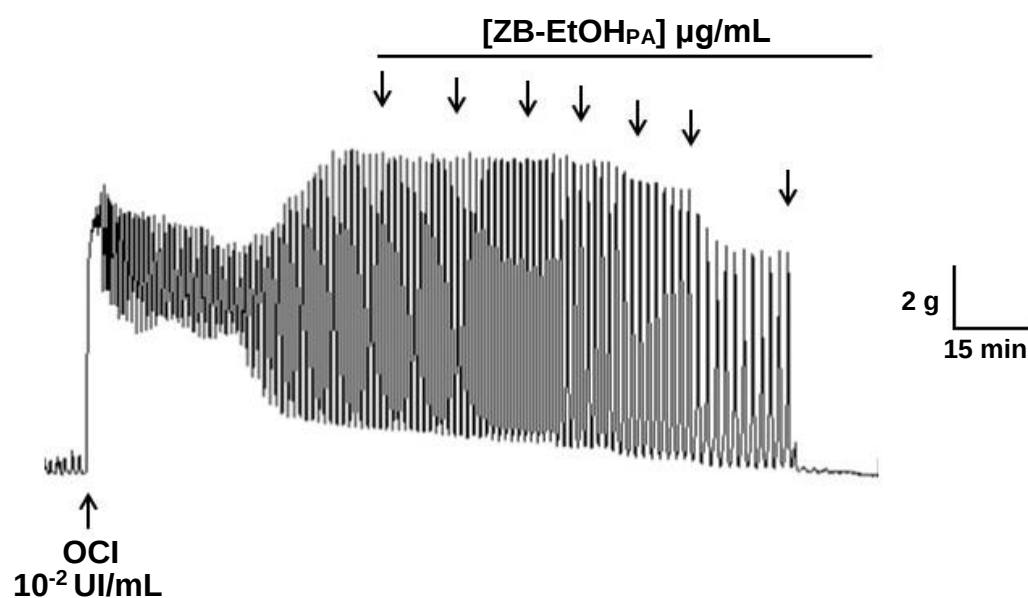


Os símbolos e as barras verticais representam a média e o e.p.m., respectivamente (n = 5).

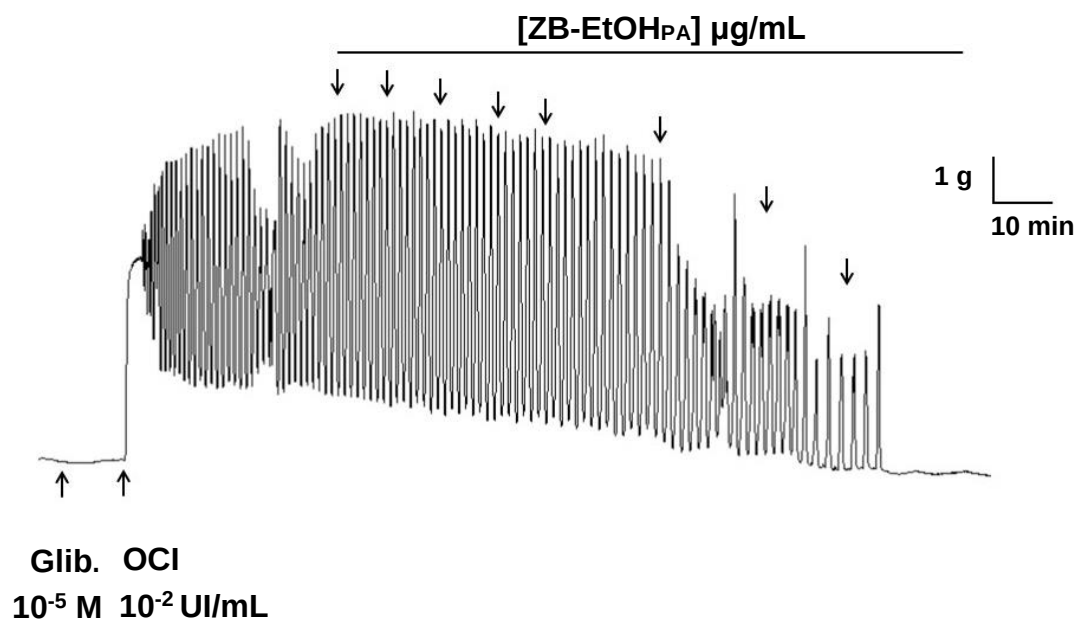
Fonte: Autor, 2018.

Figura 21 – Registros originais representativos do efeito tocolítico do ZB-EtOH_{PA} sobre as contrações tônicas induzidas por 10^{-2} UI/mL de ocitocina na ausência (A) e na presença (B) de 10^{-5} M de glibenclamida em rata.

A



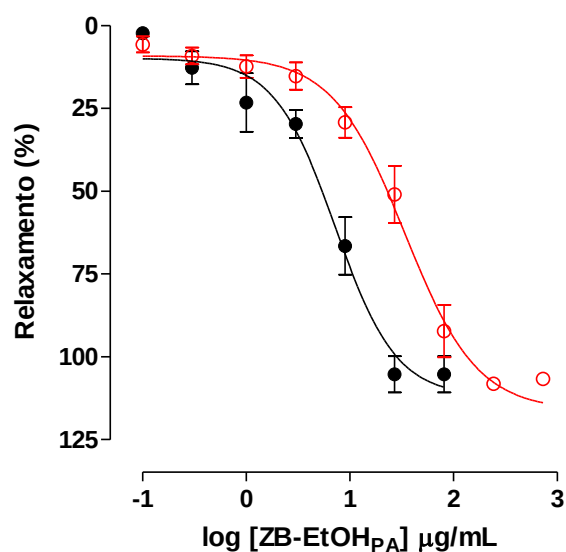
B



As setas para baixo representam a adição cumulativa do ZB-EtOH_{PA} nas concentrações de 0,1; 0,3; 1; 3; 9; 27 e 81 $\mu\text{g/mL}$ (A) e de 0,1; 0,3; 1; 3; 9; 27; 81 e 243 $\mu\text{g/mL}$ (B), OCI = ocitocina e Glib. = glibenclamida

Fonte: Autor, 2018

Gráfico 11 – Efeito tocolítico do ZB-EtOH_{PA} sobre as contrações tônicas induzidas por ocitocina na ausência (●) e na presença de glibenclamida (○) em rata.

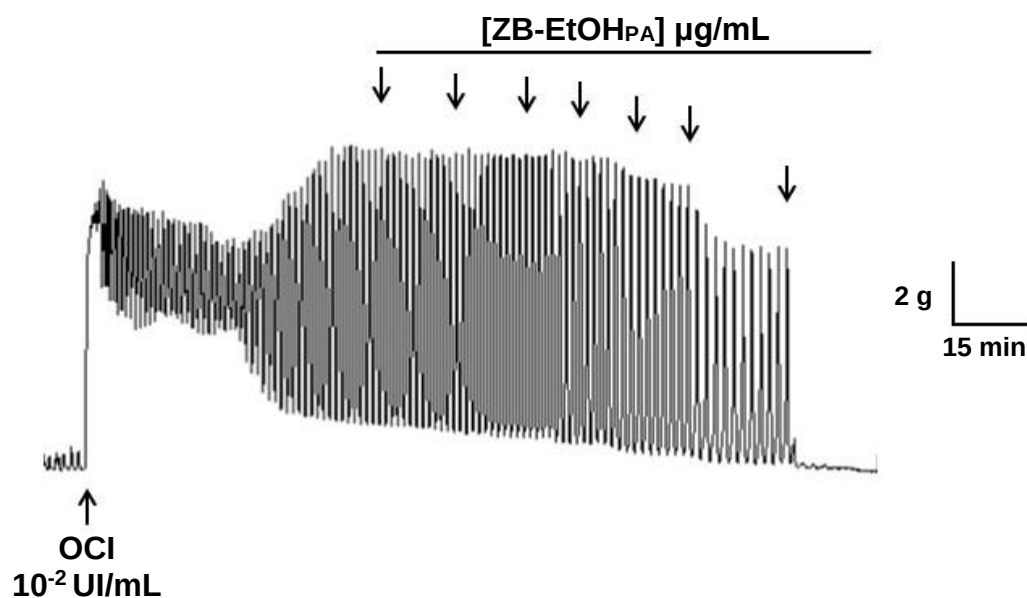


Os símbolos e as barras verticais representam a média e o e.p.m., respectivamente (n = 5).

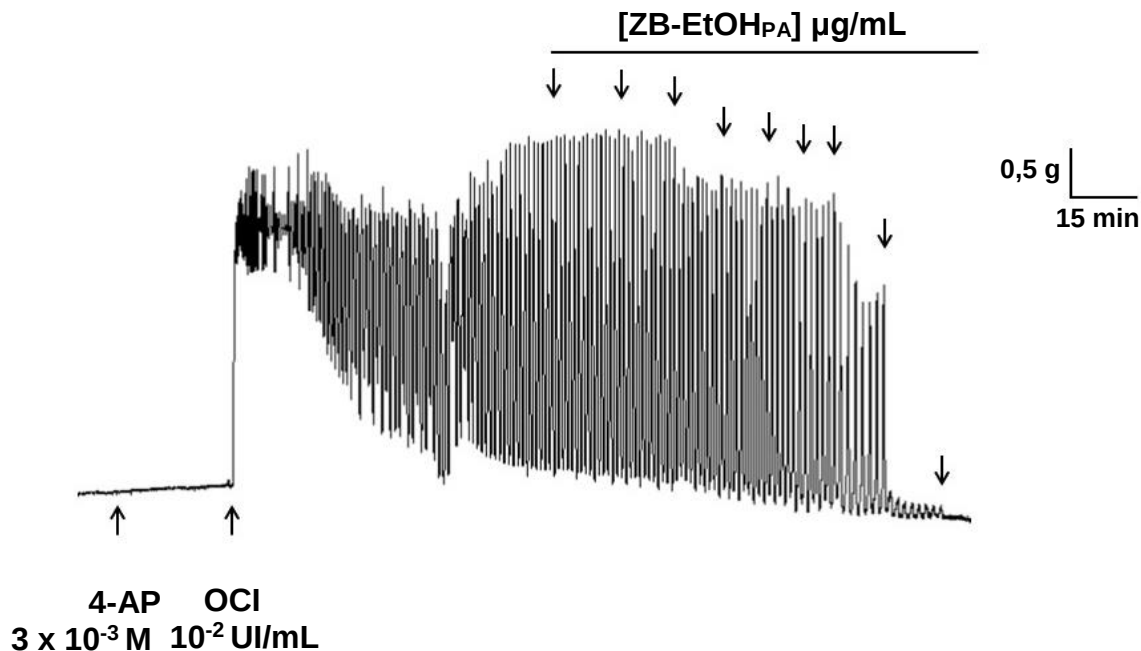
Fonte: Autor, 2018.

Figura 22 – Registros originais representativos do efeito tocolítico do ZB-EtOH_{PA} sobre as contrações tônicas induzidas por 10^{-2} UI/mL de ocitocina na ausência (A) e na presença (B) de 3×10^{-3} M de 4-AP em rata.

A



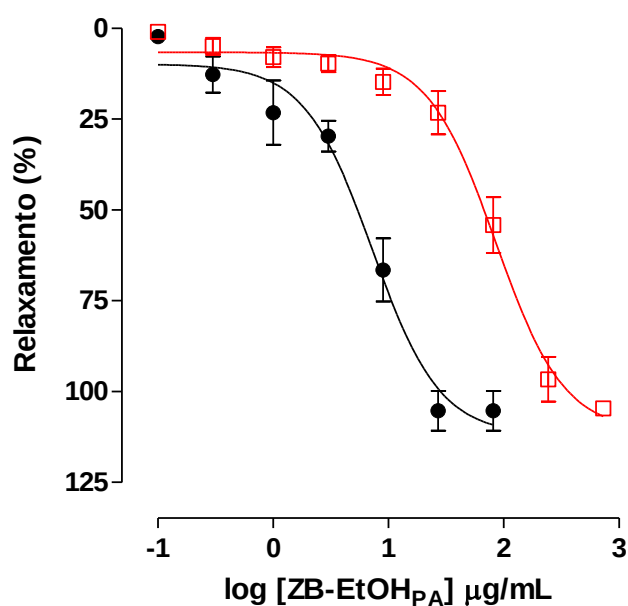
B



As setas para baixo representam a adição cumulativa do ZB-EtOH_{PA} nas concentrações de 0,1; 0,3; 1; 3; 9; 27 e 81 µg/mL (A) e de 0,1; 0,3; 1; 3; 9; 27; 81; 243 e 729 µg/mL (B), OCI = ocitocina.

Fonte: Autor, 2018

Gráfico 12 – Efeito tocolítico do ZB-EtOH_{PA} sobre as contrações tônicas induzidas por ocitocina na ausência (●) e na presença de 4-AP (□) em rata.



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

Fonte: Autor, 2018.

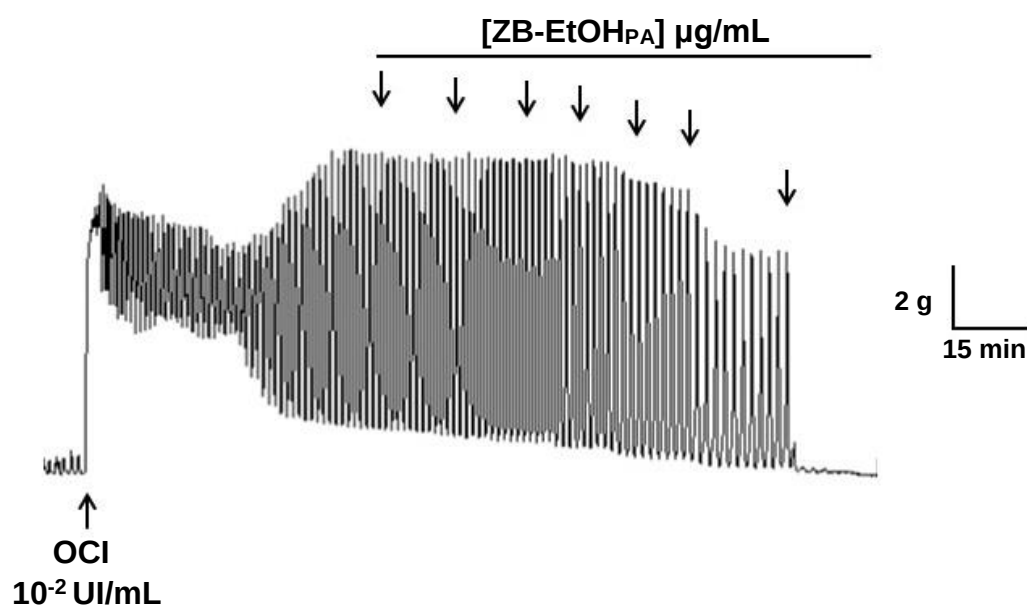
5.4.3 Participação dos subtipos de canais de K⁺ no efeito tocolítico do ZB-EtOH_{PA} sobre as contrações tônicas induzidas por ocitocina na ausência e na presença simultânea dos bloqueadores de K⁺

Na presença concomitante de 10^{-5} M de glibenclamida, de 10^{-3} M de TEA⁺, de 10^{-7} M de apamina e de 3×10^{-3} M de 4-AP, bloqueadores dos K_{ATP}, dos BK_{Ca}, dos SK_{Ca} e dos K_V, respectivamente, o ZB-EtOH_{PA} (0,1-243 µg/mL) promoveu relaxamento do útero de rata (Figura 23), entretanto a curva de relaxamento foi desviada para a direita quando comparada com a curva na ausência destes bloqueadores, atingindo seu efeito máximo de $105,6 \pm 3,46\%$ na concentração de 243 µg/mL (Gráfico 13).

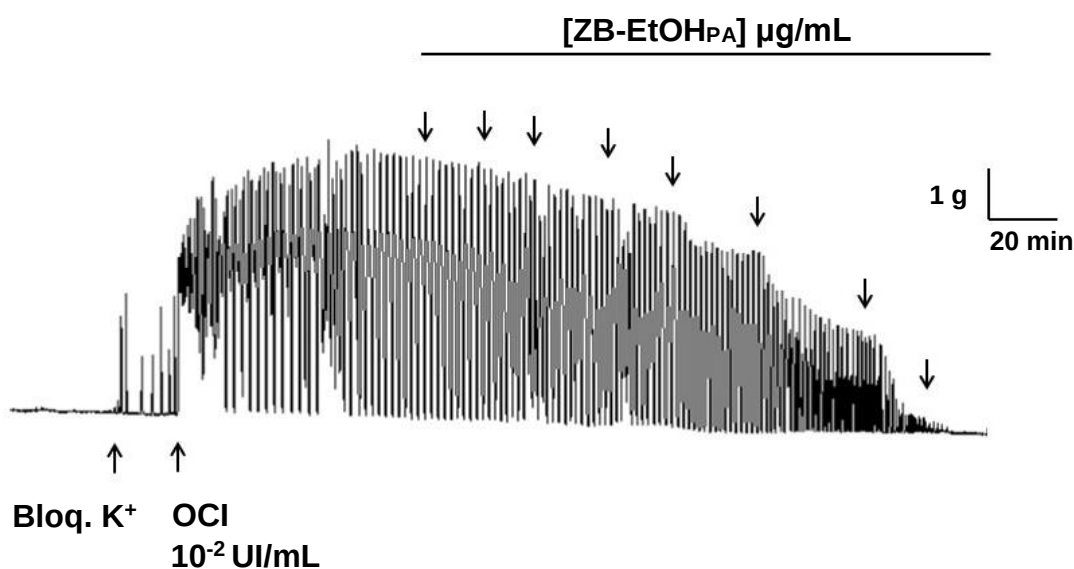
A curva de relaxamento de ZB-EtOH_{PA} na presença simultânea dos bloqueadores específicos de K⁺ ($CE_{50} = 31,3 \pm 6,0$ µg/mL; $R^2 = 0,9662 \pm 0,0055$) foi equipotente a curva na presença do CsCl ($CE_{50} = 27,1 \pm 3,0$ µg/mL), porém apresentando uma redução da potência relaxante em cerca 6 vezes quando comparado a curva de relaxamento controle na ausência dos bloqueadores ($CE_{50} = 5,5 \pm 1,3$ µg/mL) (Gráfico 14 e Tabela 3).

Figura 23 – Registros originais representativos do efeito tocolítico do ZB-EtOH_{PA} sobre as contrações tônicas induzidas por 10^{-2} UI/mL de ocitocina na ausência (**A**), na presença (**B**) de 5×10^{-3} M de CsCl e na presença simultânea (**C**) de bloqueadores de canais de K⁺ em rata.

A



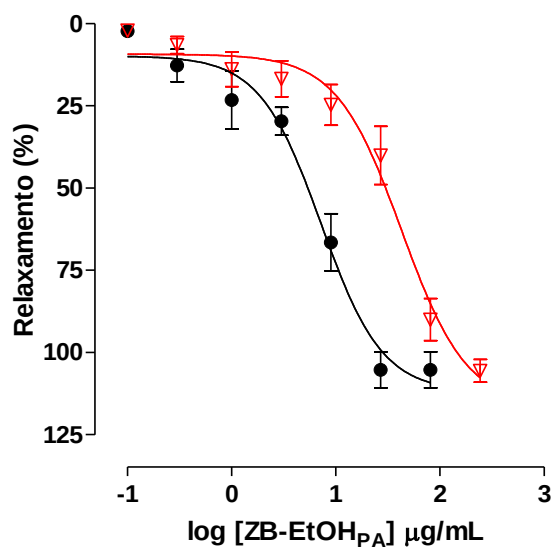
B



As setas para baixo representam a adição cumulativa do LM-OE nas concentrações de 0,1; 0,3; 1; 3; 9; 27 e 81 µg/mL (**A**), e de 0,1; 0,3; 1; 3; 9; 27; 81 e 243 µg/mL (**B**), OCI = ocitocina e Bloq. K⁺ = glibenclamida + TEA⁺ + apamina + 4-AP.

Fonte: Autor, 2018

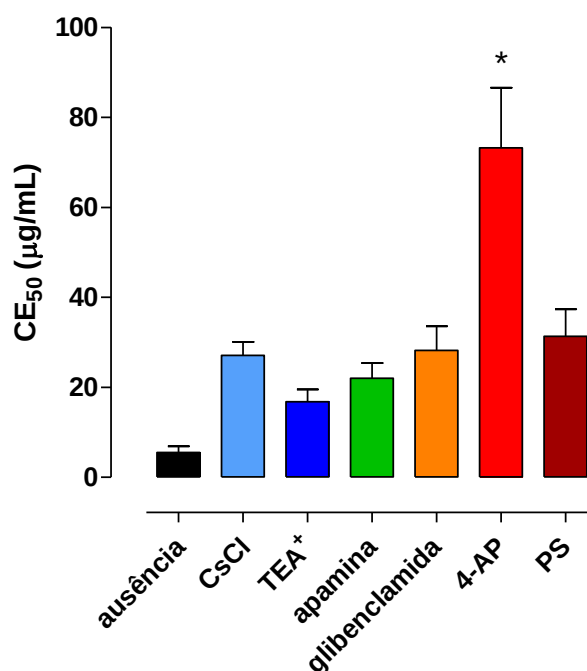
Gráfico 13 – Efeito tocolítico do ZB-EtOH_{PA} sobre as contrações tônicas induzidas por ocitocina na ausência (●) e na presença simultânea dos bloqueadores de K⁺ (▽) em rata.



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

Fonte: Autor, 2018.

Gráfico 14 – Valores de CE_{50} do ZB-EtOH_{PA} sobre as contrações tônicas induzidas por ocitocina na ausência e na presença de CsCl, TEA⁺, apamina, glibenclamida, 4-AP e na presença simultânea destes bloqueadores (PS).



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

Fonte: Autor, 2018

Tabela 3 – Valores de E_{max} , CE_{50} e R^2 do ZB-EtOH_{PA} na ausência e na presença de bloqueadores de canais de K⁺ em útero isolado de rata.

Bloqueadores	E_{max} (%)	CE_{50} (µg/mL)	R^2
Ausência	105,3 ± 5,4	5,5 ± 1,3	0,9435 ± 0,0241
CsCl	109,0 ± 2,8	27,1 ± 3,0*	0,9617 ± 0,0149
TEA⁺	105,6 ± 1,6	16,7 ± 2,7*	0,9664 ± 0,0125
Apamina	106,9 ± 2,9	22,0 ± 3,4*	0,9554 ± 0,0252
Glibenclamida	108,2 ± 1,8	28,2 ± 5,3*	0,9759 ± 0,010
4-AP	110,4 ± 3,4	73,2 ± 13,4* [#]	0,9554 ± 0,0195
Todos bloqueadores de canais de K⁺	105,6 ± 3,4	31,3 ± 6,0*	0,9662 ± 0,0554

Teste “t”: * $p < 0,05$ (ausência vs. bloqueadores) e ANOVA *one-way* seguido do pós-teste de Tukey: [#] $p < 0,05$ (4-AP vs. demais), n = 5.

Fonte: Autor, 2018.

5.5 Efeito dos flavonoides, 7-metoxiflavona e 5,7-dimetoxiflavona frente às contrações fásicas induzidas por ocitocina ou por CCh em útero isolado de rata

A 7-MF (3×10^{-6} , 10^{-5} , 3×10^{-5} e 10^{-4} M) antagonizou de maneira dependente de concentração e equipotente as contrações fásicas induzidas tanto por 10^{-2} UI/mL de ocitocina ($E_{\max} = 85,2 \pm 1,1\%$ e $CI_{50} = 3,2 \pm 0,9 \times 10^{-5}$ M) quanto por 10^{-5} M de CCh ($E_{\max} = 92,4 \pm 4,7\%$ e $CI_{50} = 4,3 \pm 0,4 \times 10^{-5}$ M) (Gráfico 15, Tabela 4).

Já a 5,7-DMF (10^{-5} , 3×10^{-5} , 10^{-4} e 3×10^{-4} M) antagonizou de maneira dependente de concentração as contrações fásicas induzidas tanto por 10^{-2} UI/mL de ocitocina ($E_{\max} = 89,5 \pm 1,3\%$; $CI_{50} = 4,2 \pm 1,0 \times 10^{-5}$ M) como por 10^{-5} M de CCh ($E_{\max} = 94,3 \pm 3,8\%$; $CI_{50} = 1,7 \pm 0,3 \times 10^{-5}$ M), sendo cerca de 2 vezes mais potente em inibir as contrações fásicas induzidas pelo CCh (Gráfico 16, Tabela 4).

A responsividade do útero à ocitocina e ao CCh foi restaurada em 45 e 90 minutos após a retirada dos flavonoides (7-MF e 5,7-DMF, respectivamente) da cuba.

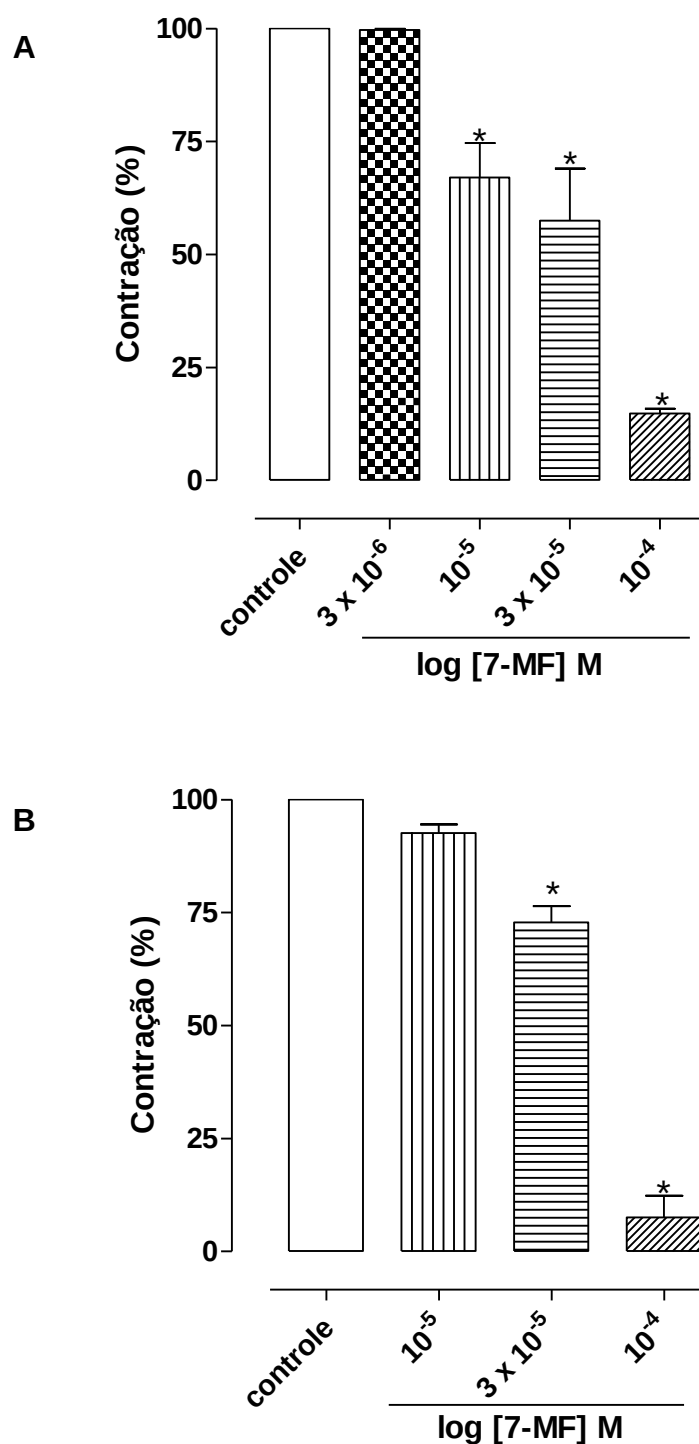
Tabela 4 – Valores de CI_{50} dos flavonoides em $\mu\text{g/mL}$ e M.

Produto-teste	Agente contrátil	CI_{50} [$\mu\text{g/mL}$]	CI_{50} (M)
7-MF	Ocitocina	8,1	$3,2 \pm 0,5 \times 10^{-5}$
	CCh	10,8	$4,3 \pm 0,4 \times 10^{-5}$
5,7-DMF	Ocitocina	11,8	$4,2 \pm 1,0 \times 10^{-5}$
	CCh	4,8*	$1,7 \pm 0,3 \times 10^{-5}$ *

ANOVA *one-way* seguido do pós-teste de Tukey: * $p < 0,05$ (CCh 7-MF vs. CCh 5,7-DMF), $n = 3-5$.

Fonte: Autor, 2018.

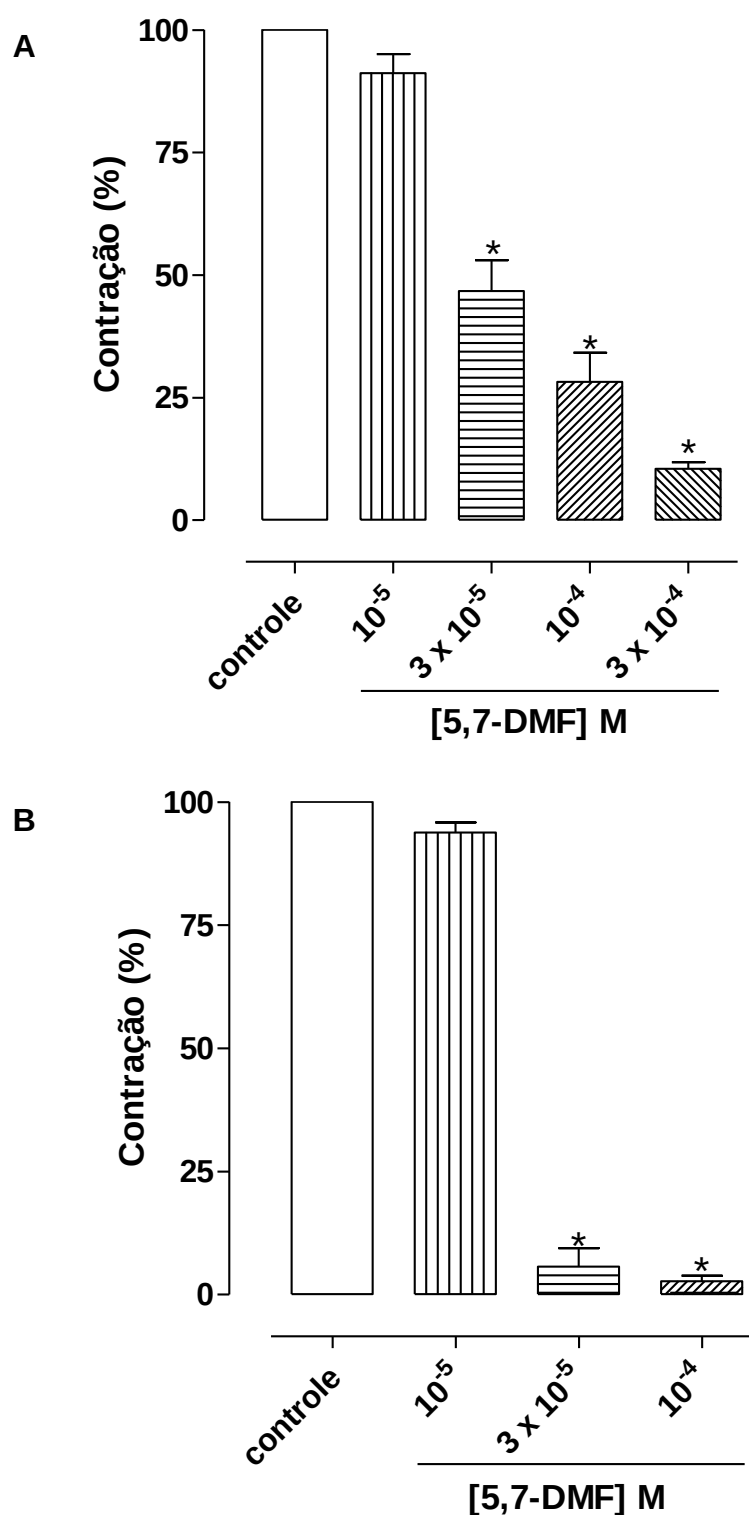
Gráfico 15 – Efeito da 7-MF frente às contrações fásicas induzidas por 10^{-2} UI/mL de ocitocina (A) ou por 10^{-5} M de CCh (B) em útero isolado de rata.



As colunas e as barras verticais representam a média e o e.p.m., respectivamente ($n = 3-5$). ANOVA *one-way* seguido do pós-teste de Tukey, $*p < 0,05$ (Controle vs. 7-MF).

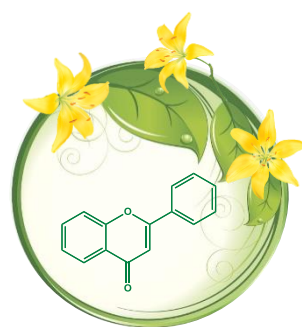
Fonte: Autor, 2018.

Gráfico 16 – Efeito da 5,7-DMF frente às contrações fásicas induzidas por 10^{-2} UI/mL de ocitocina (A) ou por 10^{-5} M de CCh (B) em útero isolado de rata.



As colunas e as barras verticais representam a média e o e.p.m., respectivamente ($n = 5$). ANOVA *one-way* seguido do pós-teste de Tukey, $*p < 0,05$ (Controle vs. 5,7-DMF).

Fonte: Autor, 2018.



6 Discussão

Nesse estudo, investigou-se o mecanismo de ação tocolítica *in vitro* do extrato etanólico obtido das partes aéreas de *Zornia brasiliensis* (ZB-EtOH_{PA}) em útero isolado de rata, e demonstrou-se que seu efeito modula positivamente a via do óxido nítrico (NO/sGC/PKG), bem como, os canais de K⁺ (K_{ATP}, BK_{Ca}, SK_{Ca} e K_V), o que, consequentemente, leva ao bloqueio indireto do influxo de Ca²⁺ através dos Cav, reduzindo a [Ca²⁺]_c e promovendo o relaxamento do músculo liso uterino. E ainda que, os flavonoides, 7-MF e 5,7-DMF, parecem ser os responsáveis pelo efeito tocolítico exibido pelo extrato.

Já foi demonstrado que algumas espécies do gênero *Zornia* apresentam efeito sobre a musculatura lisa. Em estudos etnofarmacológicos foi relatado que a espécie *Zornia diphylla* é utilizada popularmente para o tratamento da disenteria (KHARE, 2008), *Zornia latifolia* como espasmolítica (CORNARA et al., 2018) e *Zornia brasiliensis* para tratar distúrbios gastrintestinais (DINIZ et al., 2002). Além disso, *Zornia venous* (ROJAS et al., 1995) e *Zornia diphylla* (ROJAS et al., 1999) apresentaram efeito espasmolítico em íleo de rato e, recentemente, nossa equipe demonstrou que o extrato ZB-EtOH_{PA} possui efeitos espasmolítico em íleo e traqueia de cobaia, aorta e corpo cavernoso de rato e tocolítico em útero de rata (OLIVEIRA et al., 2014; OLIVEIRA et al., 2016b).

O miométrio é a camada muscular que constitui a maior parte do útero. Possui funções fisiológicas importantes tanto no ciclo menstrual como durante a gravidez e parto (ALBERTS et al., 1989). A dismenorreia, ou cólica menstrual, é uma síndrome conhecida por um ou mais sintomas que se manifestam no período pré ou intramenstrual, e geralmente pode ser acompanhada também por outros sintomas (FONSECA et al., 2000). Por vezes, a dismenorreia pode promover a diminuição do fluxo sanguíneo, causando hipóxia e aumentando o quadro doloroso (BORTOLETTO, 1995).

A busca constante por “remédios naturais” que tragam alívio dos sintomas causados pela dismenorreia tem incentivado o estudo de plantas que possam ser alvos terapêuticos no combate contra tal distúrbio (SOUZA et al., 2011). Tais como *Maytenus senegalensis* (NEUWINGER, 2000), *Stereospermum kunthianum* e *Trichilia emetica* (MALGRAS, 1992), entre outras.

Na triagem farmacológica, o ZB-EtOH_{PA} apresentou efeito tocolítico frente às contrações fásicas induzidas por CCh e por ocitocina em útero de ratas (OLIVEIRA et al., 2016b). Quando os valores da CE₅₀ do ZB-EtOH_{PA} frente à ocitocina e ao CCh

foram comparados, verificou-se uma equipotência sugerindo que, em nível funcional, o extrato não age em nível de receptores farmacológicos, M3 e OT, respectivamente (OLIVEIRA et al., 2016b).

Sabendo que os mecanismos envolvidos na manutenção da contração fásica são diferentes em relação aos da contração tônica (JIM et al., 1981; ABDELLATIF, 1989; NOVAKOVIC et al., 2013), avaliou-se o efeito tocolítico *in vitro* do ZB-EtOH_{PA} sobre as contrações tônicas induzidas por ocitocina, que age por acoplamento misto, ou seja, fármaco e eletromecânico (ARROWSMITH; WRAY, 2014).

A ocitocina é o principal hormônio responsável pelo trabalho de parto em mamíferos, uma vez que apresenta efeitos sobre a excitabilidade miometrial, ou seja, alonga a duração dos potenciais de ação e aumenta sua frequência (NAKAO et al., 1997). Esses efeitos podem ser explicados, em parte, por suas ações nos mecanismos de influxo Ca^{2+} ou através de canais Ca^{2+} operados por estoque (ARROWSMITH; WRAY, 2014).

Diante disso, foi observado que o extrato relaxou de maneira dependente de concentração as contrações tônicas induzidas por ocitocina (Figura 11 e Gráfico 1), sendo cerca de 15 vezes mais potente ($\text{CE}_{50} = 5,5 \pm 1,3 \mu\text{g/mL}$) quando comparado aos dados descritos por Oliveira et al. (2016b), que demonstraram efeito inibitório frente às contrações fásicas induzidas pelo mesmo agonista ($\text{CI}_{50} = 81,6 \pm 9,0 \mu\text{g/mL}$). Desse modo, decidiu-se dar continuidade ao estudo do mecanismo de ação pelo qual ZB-EtOH_{PA} estaria promovendo seu efeito tocolítico sobre as contrações tônicas.

Sabe-se que o aumento da $[\text{Ca}^{2+}]_c$ é responsável pelo processo de contração, consequentemente a diminuição desta é crucial para o relaxamento do músculo liso uterino, seja pelo mecanismo farmacomecânico, caracterizado pela ativação de receptores de membrana do tipo GPCR, que inibem as vias bioquímicas que induzem a contração ou o relaxamento; ou mesmo através do mecanismo eletromecânico, por meio da repolarização ou hiperpolarização da membrana (WOODRUM; BROPHY, 2001).

Uma via que leva ao relaxamento caracterizado por esse acoplamento farmacomecânico é a geração de óxido nítrico (NO), um fator relaxante derivado do endotélio/epitélio, pelos nervos nitrérgicos e pelas células endoteliais, estimulando a ciclase de guanilil solúvel (sGC) que induz a formação de cGMP (REMBOLD, 1996; WRAY et al., 2003). O aumento nos níveis citosólicos de nucleotídeo cíclicos em

músculo liso é considerado um dos principais mecanismos que medeiam seu relaxamento em condições fisiológicas (PUETZ; LUBOMIROV; PFITZER, 2009).

O óxido nítrico (NO) é um potente relaxante de músculo liso, entre eles, vasos sanguíneos, trato gastrointestinal e no sistema respiratório. Várias evidências mostraram que o NO possui efeito relaxante no miométrio (tocolítico). O NO é produzido dentro do trato genital feminino durante a gravidez, e uma redução na síntese de NO pode estar envolvida no início do parto. Além disso, a administração de doadores de NO pode ser útil na inibição das contrações uterinas, por exemplo, no trabalho de parto prematuro. O NO também é produzido no miométrio não grávido e tem papéis potenciais na facilitação da implantação e na prevenção da dismenorreia (NORMAN, 1996).

O papel fisiológico do NO é inibir as contrações miometriais durante a gravidez, incluindo retardo do crescimento intra-uterino, pré-eclâmpsia, parto prematuro e menorragia. Uma redução na síntese de NO no momento do parto pode contribuir para o início do trabalho. O efeito relaxante do NO sobre as contrações miometriais também seria útil terapeuticamente no tratamento do parto prematuro. O trabalho de parto prematuro é uma das principais causas da morte perinatal, e existe uma escassez de agentes disponíveis para tratamento que melhore esse quadro (NORMAN, 1996).

Há relatos da existência de três diferentes isoformas de NOS e todas já foram descritas em útero de rata. A eNOS está expressa tanto em ratas não grávidas quanto em grávidas, já a nNOS tem sua expressão apenas em animais não grávidos e a iNOS é altamente expressa durante a gravidez (DONG; GANGULA; YALLAMPALLI, 1996). Em ratas não grávidas foi observado que a eNOS possui maior atividade nos vasos uterinos na fase folicular do ciclo estral do que na fase lútea (TAGUCHI et al., 2000). Há registros que em ratas não grávidas a nNOS produz o NO através de fibras nervosas (CHAUD et al., 1997). Como o estrogênio aumenta os níveis de NO nos órgãos genitais e no sangue circulante foi sugerido que o estrogênio deve ser o principal responsável pelo aumento dos níveis de NO tanto na gravidez, quanto na fase folicular do útero não grávido (NELSON et al., 2000). Em endométrio de útero humano, predomina-se a isoforma eNOS, porém sua expressão varia durante o ciclo menstrual (HAN; MAGEE; KHORRAM, 2005).

Neste trabalho foi observado que, na presença de L-NAME, um inibidor da NOS (MUNGLUE et al., 2012), a potência relaxante do ZB-EtOH_{PA} foi reduzida em

aproximadamente 6,5 vezes ($CE_{50} = 35,6 \pm 6,2 \mu\text{g/mL}$, Figura 12 e Gráfico 2), sendo sugestivo que a NOS estaria sendo modulada positivamente para o extrato promover seu efeito tocolítico.

A enzima NOS ao se ligar com seu substrato L-arginina promove uma reação catalítica de oxidação formando NO e L-citrulina. O L-NAME inibe a NOS ligando-se ao sítio catalítico como um falso substrato, atuando por um mecanismo de competição com a L-arginina pelo seu sítio de ligação (MONCADA; PALMER; HIGGS, 1991).

Em útero de rata grávida foi relatado a reversão do efeito relaxante de L-arginina sobre contrações espontâneas com a adição do inibidor competitivo L-NAME (YALLAMPALLI et al., 1994), também foi observado que na presença de L-NNA, um outro inibidor de NOS, quando adicionado simultaneamente com a L-arginina diminuiu a resposta contrátil em ratas ovariectomizadas e estrogeinizadas (BULBUL et al., 2007).

A partir deste pressuposto, decidiu-se confirmar a participação da NOS no efeito tocolítico do ZB-EtOH_{PA}, investigando a reversibilidade do efeito inibitório do L-NAME, realizando-se um protocolo experimental na presença simultânea de L-NAME e de L-arginina (BULBUL et al., 2007). Para ser confirmada a modulação da NOS no relaxamento do útero de rata produzido por ZB-EtOH_{PA}, a L-arginina adicionada em maior concentração deveria reverter o efeito inibitório do L-NAME, sendo assim, a curva concentração-resposta na presença simultânea de L-NAME e de L-arginina deveria ser similar ao efeito do extrato sozinho sobre a contração induzida por ocitocina. Uma vez que, os resultados deste trabalho demonstraram que a curva na presença de 10^{-3} M de L-arginina foi desviada para a esquerda revertendo parcialmente (36%) o efeito inibidor do L-NAME, resolveu-se avaliar se utilizando uma maior concentração deste substrato (3×10^{-3} M) haveria a reversibilidade total desta inibição. Entretanto a essa reversibilidade total não foi observada.

Diante destes resultados, pode-se confirmar o envolvimento da NOS no mecanismo de ação tocolítica do ZB-EtOH_{PA}. Entretanto, como as curvas de relaxamento na presença de L-NAME mais diferentes concentrações de L-arginina ($CE_{50} = 24,8 \pm 3,0 \mu\text{g/mL}$, $CE_{50} = 45,4 \pm 7,0 \mu\text{g/mL}$, respectivamente, Figura 13 e Gráfico 2) não ficaram sobrepostas a curva controle, demonstrou-se que o efeito tocolítico do extrato na presença do L-NAME não foi completamente abolido, sugerindo que o ZB-EtOH_{PA} pode estar agindo em outra via para promover o efeito tocolítico em útero isolado de rata.

No seguimento da via do óxido nítrico para induzir o relaxamento, o NO pode ativar diretamente os canais de K^+ (BOLOTINA et al., 1994; LORCA; PRABAGARAN; ENGLAND, 2014) ou estimular a sGC a catalisar GTP para a formação de cGMP (MUNCHEN, 2010). A sGC é expressa no citoplasma e é o receptor mais bem caracterizado para o NO. O heterodímero $\alpha 1\beta 1$ é a região fundamental para a atividade catalítica e esta presente na isoforma predominante da sGC, é na subunidade $\beta 1$ que o NO se liga para ativá-la a produzir cGMP (VALLANCE; COLLIER; MONCADA, 1989; ZHU et al., 2011).

Seguindo a via *downstream* de sinalização intracelular do óxido nítrico o próximo passo a ser testado seria avaliar a participação da sGC na ação relaxante do ZB-EtOH_{PA} em útero. Para isso, foi observado o efeito tocolítico do extrato na ausência e na presença de ODQ, inibidor da sGC (PARRA; CANTABRANA; HIDALGO, 2000). Os resultados sugerem a modulação positiva da sGC na ação tocolítica do ZB-EtOH_{PA}, uma vez que a curva concentração-resposta foi desviada para direita com a potência tocolítica do extrato reduzida em sete vezes ($CE_{50} = 36,9 \pm 7,3 \mu g/mL$) quando comparada com a curva-controle (Figura 14 e Gráfico 3).

Sabendo que a ativação da via NO/sGC aumenta a produção de cGMP (MUNCHEN, 2010; ZHU et al., 2011) e que este ativa a PKG (MAHAPATRA et al., 2012), resolveu-se investigar o envolvimento da PKG no efeito tocolítico do ZB-EtOH_{PA}, utilizando o Rp-8-Br-PET-cGMPS, um inibidor da PKG (PARRA; CANTABRANA; HIDALGO, 2000). Uma vez que os resultados demonstraram uma redução da potência relaxante do extrato, cerca de 3 vezes, na presença do inibidor de PKG em relação ao controle ($CE_{50} = 15,4 \pm 2,7 \mu g/mL$, Figura 15 e Gráfico 4), foi sugerido que a modulação desta via poderia estar envolvida no efeito tocolítico do extrato.

O aumento na concentração de cGMP, por sua vez, ativa a PKG que fosforila, ativando ou inibindo, alvos distintos para promover o relaxamento do músculo liso. Entre esses alvos pode-se citar: Cav, canais de K^+ , (REMBOLD, 1996; MAKHLOUF; MURTHY, 1997; WRAY et al., 2003), SERCA, PMCA, trocador Na^+/Ca^{2+} (BLAUSTEIN, 1988), IP_3R (WOODRUM; BROPHY, 2001), MLCK (REMBOLD, 1992) e MLCP (AGUILAR; MITCHELL, 2010).

Compreende-se que a manutenção da contração tônica se dá pelo aumento da concentração de cálcio promovido, principalmente, pela abertura dos canais Cav ativados pela despolarização da membrana plasmática e que essa despolarização é

um passo comum da via de sinalização da contração do músculo liso induzido por KCl (WRAY, 1993). Diante disso, avaliou-se o efeito tocolítico *in vitro* do ZB-EtOH_{PA} sobre as contrações tônicas induzidas por KCl, que age por acoplamento eletromecânico (REMBOLD, 1996; ARROWSMITH; WRAY, 2014), e foi observado que o extrato relaxou de maneira dependente de concentração o útero de rata pré-contraído com KCl ($CE_{50} = 22,0 \pm 1,3 \mu\text{g/mL}$, Figura 16, Gráfico 5), sugeriu-se que o extrato poderia estar inibindo o influxo de cálcio através do bloqueio dos Ca_v para promover seu efeito tocolítico.

Com o intuito de analisar essa hipótese, foram realizadas curvas cumulativas ao $CaCl_2$ em meio despolarizante nominalmente sem cálcio, na ausência e na presença de diferentes concentrações do extrato. Este experimento é realizado buscando promover uma contração, quase que exclusivamente, pelo Ca^{2+} proveniente do meio extracelular via Ca_v , a medida que o aumento da concentração de K^+ no meio extracelular despolariza a membrana e induz a abertura dos Ca_v (RATZ et al., 2005). O ZB-EtOH_{PA} inibiu essas contrações de forma significativa e dependente 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 (Gráfico 6), confirmando a hipótese anterior de que os Ca_v poderiam estar envolvidos no efeito tocolítico do ZB-EtOH_{PA} em útero de rata.

É sabido que os canais Ca_v são os principais responsáveis pelo influxo de Ca^{2+} no miométrio (ARROWSMITH; WRAY, 2014). Também já é descrito que o miométrio expressa canal de cálcio dependentes de voltagem Ca_v1 e Ca_v2 (LEE; AHN; LEE, 2009), entretanto, os Ca_v1 são os mais estudados e os que possuem função mais importante no influxo de cálcio, favorecendo o processo de contração uterino (WRAY et al., 2015).

Diante disso, visando observar se o Ca_v envolvido na ação tocolítica do ZB-EtOH_{PA} seria o Ca_v1 , foi investigado seu efeito sobre as contrações tônicas induzidas pelo derivado di-hidropiridínico S-(-)-Bay K8644, um agonista seletivo desses canais (FERRANTE et al., 1989; SCHRAMM et al., 1983a; b; SPEDDING; PAOLETTI, 1992). O fato do extrato ter relaxado o útero de rata pré-contraído com esse agonista com uma baixa potência ($CE_{50} = 84,3 \pm 10,6 \mu\text{g/mL}$, Figura 17, Gráfico 7) em relação a contração induzida por KCl, sugere que o bloqueio do Ca_v1 pelo extrato acontece de forma indireta para exercer o relaxamento do útero de rata. Ou

ainda que outra(s) via(s) está(ão) envolvida(s) neste efeito tocolítico promovido pelo ZB-EtOH_{PA}.

Os Cav1 são ativados por despolarização e tem a sua ação potencializada quando fosforilado pela PKA, porém, são inibidos pela PKG, através da fosforilação dos resíduos de aminoácidos Ser793 e Ser860 da subunidade $\alpha 1$. A PKG é ativada pelo aumento de cGMP proveniente da sGC ativada pelo NO, um gás solúvel formado a partir da atividade da enzima NOS mediada pelo complexo Ca^{2+} -CaM (MAHAPATRA et al., 2012).

Além de inativar os canais Cav1, a PKG atua abrindo canais de K^+ promovendo hiperpolarização da célula, culminando, conseqüentemente, no relaxamento do músculo liso (MILOVANOVIC et al., 2013). Abderrahmane et al. (1998) demonstraram que a PKG pode ativar os canais de K^+ de duas formas: uma por fosforilação direta do canal BK_{Ca} e outra via indireta por ação da fosfatase 2A, uma fosfatase dependente de PKG (SANSOM et al., 1997). Além disso, há relatos na literatura de que doadores de NO atuam abrindo canais de K^+ e que o NO atua modulando diretamente os canais de K^+ (MILOVANOVIC et al., 2013).

A repolarização ou hiperpolarização gerada pela abertura dos canais de K^+ é uma das vias determinantes para o relaxamento do músculo liso, da mesma forma, a diminuição da condutância do íon K^+ , gera uma despolarização que culmina na contração do músculo (KNOT; BRAYDEN; NELSON, 1996). Já foi descrito a presença de vários tipos de canais de K^+ no miométrio, tais como canais de K^+ retificadores internos (Kir6.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).

Com nossos resultados, sugerimos que o efeito tocolítico do ZB-EtOH_{PA} em útero de rata envolve a modulação positiva da via NO/sGC/PKG e, compreendendo que essa via pode modular direta ou indiretamente os canais de K^+ , sendo estes, potentes vias de relaxamento do músculo liso uterino, resolveu-se investigar a participação dos canais de K^+ na ação do extrato no miométrio de ratas. Para isso, observou-se o efeito do extrato sobre contrações induzidas por ocitocina na presença de CsCl, um bloqueador não seletivo de canais de K^+ (LATORRE et al., 1989).

Uma vez que a curva concentração resposta foi desviada para a direita com uma potência reduzida cerca de cinco vezes ($\text{CE}_{50} = 27,1 \pm 3,0 \mu\text{g/mL}$) quando comparada com a curva controle (Figura 18 e Gráfico 8) é sugestivo de que os canais

de K^+ podem estar envolvidos no efeito tocolítico do ZB-EtOH_{PA} em útero de rata. Sendo assim, resolveu-se investigar quais subtipos desses canais seriam os responsáveis por esse efeito. Para isso, foi utilizado bloqueadores seletivos de canais de K^+ .

Vários estudos mostram os BK_{Ca} como majoritários no miométrio e responsáveis por repolarizar a membrana durante os potenciais de ação e manutenção da quiescência uterina (LORCA; PRABAGARAN; ENGLAND, 2014). Essa hiperpolarização reduz a duração do potencial de ação no miométrio, diminuindo o influxo de Ca^{2+} através dos Ca_v , impedindo a contração (PONTE et al., 2012). Também há relatos do envolvimento dos BK_{Ca} no relaxamento promovido pela via do NO, tanto em útero não grávido, quanto em útero grávido de humanos (MODZELEWSKA et al., 2003; MODZELEWSKA; KLESZCZEWSKI; KOSTRZEWSKA, 2003). Para verificar se há modulação dos canais BK_{Ca}, foi utilizado TEA⁺, que em baixas concentrações, é um bloqueador específico destes canais (AARONSON et al., 2006). Uma vez que a curva concentração-resposta foi desviada para a direita com uma redução da potência do efeito tocolítico em três vezes ($CE_{50} = 16,8 \pm 2,8 \mu\text{g/mL}$, Figura 19 e Gráfico 9), sugere-se que estes canais tem participação no efeito tocolítico do ZB-EtOH_{PA} em útero de ratas.

Outros canais de K^+ presente no miométrio são os SK_{Ca} com a função semelhante aos BK_{Ca} de hiperpolarizar as células após a geração do potencial de ação, e conseqüentemente, promover o relaxamento do miométrio (BRAINARD; KOROVIKINA; ENGLAND, 2007). Brown et al. (2007), demonstraram que esses canais diminuem a ativação dos Ca_v1 , inibindo as contrações fásicas em útero de camundongo.

Para observar se estes canais estão envolvidos no mecanismo tocolítico do ZB-EtOH_{PA}, foi utilizado a apamina, um bloqueador seletivo SK_{Ca} (AYAR et al., 2001). Os resultados apresentaram uma diminuição quatro vezes da potência tocolítica do extrato, sendo sugestiva uma modulação indireta destes canais para a ação relaxante do extrato em útero de ratas ($CE_{50} = 22,0 \pm 3,3 \mu\text{g/mL}$, Figura 20 e Gráfico 10).

Outro canal de K^+ bastante citado na literatura como modulador do relaxamento no miométrio é o K_{ATP} . (WRAY et al., 2015). Recentemente, foi relatado que além da dor, as contrações no útero causadas pela dismenorreia podem promover uma redução no fluxo vascular uterino, levando a hipóxia e isquemia do músculo. Os canais K_{ATP} desempenham um papel importante na resposta sistêmica à hipóxia. A

diminuição do ATP e aumento dos níveis de ADP acompanhados pela diminuição do pH intracelular, desencadeados pela baixa de oxigênio celular, levam à abertura do K_{ATP} e, conseqüentemente, hiperpolarização da célula do músculo liso, resultando no relaxamento (CARREIRO et al., 2017).

Além disso, vários tipos de canais K^+ podem estar envolvidos no relaxamento induzido por NO, incluindo K_{ATP} (MURPHY; BRAYDEN, 1995). Han et al. (2002), demonstraram a ativação de K_{ATP} via NO mediado por GMPc ativado pela PKG através da fosforilação dos resíduos de serina e treonina dos canais K_{ATP} . Como resultados anteriores propuseram a via do NO sendo modulada positivamente pelo ZB-EtOH_{PA}, foi avaliado se os K_{ATP} estariam envolvidos no efeito tocolítico do extrato em útero de ratas. Para isso, foi utilizado a glibenclamida, que é um bloqueador seletivo dos K_{ATP} (PIPER et al., 1990; HUGHEST; HOLLINGSWORTH, 1997). O experimento realizado demonstrou que a curva de relaxamento do extrato foi desviada para a direita, com redução da potência relaxante do extrato cerca de cinco vezes quando comparada a curva-controle ($CE_{50} = 28,2 \pm 5,3 \mu\text{g/mL}$, Figura 21 e Gráfico 11), sugerindo que os canais K_{ATP} podem estar envolvidos no efeito tocolítico que está sendo investigado.

Esses resultados corroboram com os dados de Carreiro et al. (2017) que mostraram o efeito relaxante do resveratrol mediado pelos K_{ATP} , tanto em componente fásico quanto tônico de útero murino não grávido pré-contráído com ocitocina. Além disso, estes pesquisadores comprovaram que a modulação dos K_{ATP} produziram efeitos regenerativos e protetores no miométrio sob condição de hipóxia. Esses dados possibilitam propor um estudo posterior do efeito do ZB-EtOH_{PA} para investigar um possível efeito protetor da modulação desses canais pelo extrato em condições de hipóxia.

Entre os subtipos de canais de K^+ presentes em miométrio também existe os K_v , que podem ser caracterizados pela rápida inativação (WRAY et al., 2015). Os canais de potássio definem a magnitude, duração e periodicidade da contração uterina. O miométrio expressa uma série de genes de codificação para diferentes canais K_v , especialmente os membros da família K_{v4} (GREENWOOD; TRIBE, 2014). Contudo, estudos recentes tem mostrado que os canais de K_v estão bem expressos no miométrio, são bloqueados pelo 4-aminopiridina (4-AP) e sua ativação contribui na regulação da contratilidade uterina e no tônus basal do miométrio hiperpolarizando os miócitos promovendo relaxamento do miométrio (WRAY et al, 2015). Muitos estudos

tem sido voltado em vista de compreender a função dos K_v no miométrio (AARONSON et al., 2006; SMITH et al., 2007; GREENWOOD; TRIBE, 2014; HAICK; BYRON, 2016).

No intuito de verificar se a ativação dos K_v estaria envolvida no efeito tocolítico do ZB-EtOH_{PA}, foi realizado um protocolo experimental na presença do inibidor deste canal (AARONSON et al., 2006) e os resultados demonstraram uma redução da potência tocolítica do extrato em aproximadamente 13 vezes quando comparada a ação relaxante na ausência do inibidor ($CE_{50} = 73,2 \pm 13,4 \mu\text{g/mL}$, Figura 22 e Gráfico 12). Com isso sugere-se que o K_v pode estar envolvido no efeito relaxante de forma majoritária, quando relacionado com os outros canais de K^+ estudados.

Anteriormente acreditava-se que os BK_{Ca} eram os mais abundantes no miométrio e um dos mais responsáveis pela manutenção do potencial de repouso da membrana de células do miométrio (TRITTHART et al., 1991; PEREZ et al., 1993). Entretanto, alguns experimentos realizados sobre o miométrio de ratas produziram achados contraditórios que argumentam o papel de BK_{Ca} na regulação da contratilidade em miométrio grávido e não-grávido (SMITH et al., 2007) e já foi demonstrado que em nível funcional, tanto os inibidores de BK_{Ca} como de SK_{Ca} tem efeito desprezível sobre as contrações de miométrio de humanos e roedores, quando comparados ao inibidor não-seletivo de K_v , 4-aminopiridina (GREENWOOD; TRIBE, 2014). Dessa forma, os resultados desse trabalho sugerem que o efeito relaxante do extrato em útero de rata se deve, principalmente, pela modulação positiva sobre os K_v , um dos principais canais presentes no miométrio (WRAY et al., 2015).

Sendo assim, resolveu-se por fim, comparar o efeito tocolítico do extrato na presença de todos os bloqueadores seletivos de K^+ utilizados neste estudo de forma simultânea para avaliar se haveria um efeito sinérgico do ZB-EtOH_{PA} sobre os subtipos distintos dos canais BK_{Ca} , SK_{Ca} , K_{ATP} e K_v . Os resultados evidenciaram uma redução da potência relaxante do extrato na presença simultânea desses bloqueadores, todavia não foi observado nenhum efeito sinérgico. Além disso, quando este resultado foi comparado ao efeito do extrato na presença do CsCl não foi observado uma diferença estatística na redução da potência relaxante ($CE_{50} = 31,3 \pm 6,0 \mu\text{g/mL}$, Figura 23, Gráfico 13, 14 e Tabela 3). Desse modo, o mecanismo sugerido para o efeito tocolítico de ZB-EtOH_{PA} está intimamente relacionado com todos os subtipos de canais de K^+ investigados, majoritariamente os K_v , e que possivelmente estariam sendo ativados pela via NO/sGC/PKG.

Sabendo que o NO ativa diretamente os canais de K^+ (BOLOTINA et al., 1994; LORCA; PRABAGARAN; ENGLAND, 2014), é sugestivo que o efeito tocolítico do miométrio pelo extrato esteja sendo promovido pela ação direta ou indireta da via do NO/sGC/PKG, onde por sua vez, esta via esteja ativando os canais de K^+ (BK_{Ca} , SK_{Ca} , K_{ATP} e K_v), majoritariamente os K_v , desencadeando uma repolarização/hiperpolarização de membrana, conduzindo a uma redução da entrada de Ca^{2+} na célula via Ca_v , reduzindo a concentração de cálcio intracelular e, por consequência, produzindo o efeito tocolítico no útero isolado de rata.

Uma vez que o extrato é composto de substâncias diversas, tendo-se um destaque para os flavonoides encontrados nesta espécie, resolveu-se avaliar se dois flavonoides isolados da espécie *Zornia brasiliensis*, 7-metoxiflavona (7-MF) e 5,7-dimetoxiflavona (5,7-DMF), seriam os responsáveis por este efeito tocolítico.

Diante dos resultados, observou-se que ambos apresentaram efeito tocolítico, sendo a 7-MF equipotente frente aos agonistas testados ($Cl_{50} = 3,2 \pm 0,9 \times 10^{-5}$ M; $Cl_{50} = 4,3 \pm 0,4 \times 10^{-5}$ M, Gráfico 15), ocitocina e CCh, respectivamente, diferentemente do que se pode observar em 5,7-DMF, uma vez que esta apresentou potência cerca de 2 vezes maior em antagonizar as contrações fásicas induzidas por CCh ($Cl_{50} = 1,7 \pm 0,3 \times 10^{-5}$ M) quando comparada a ocitocina ($Cl_{50} = 4,2 \pm 1,0 \times 10^{-5}$ M), sendo também cerca de 2 vezes mais potente para este agente contrátil quando comparado com a 7-MF (Gráfico 16), indicando que provavelmente sejam estes flavonoides os responsáveis pelo efeito tocolítico do extrato, em especial, a 5,7-DMF.

Semelhantemente, outros flavonoides já apresentaram efeito em útero de rata como a isooretina (AFIFI; KHALIL; ABDALLA, 1999), genisteína, kampferol (REVUELTA; HIDALGO; CANTABRANA, 1999); quercetina (WU et al., 2015), 3,6-dimetil éter galetina (CARREIRO et al., 2017), diplotropina (LIMA, 2004), entre outros. A isooretina tbm apresentou efeito tocolítico em útero de cobaia (AFIFI; KHALIL; ABDALLA, 1999).

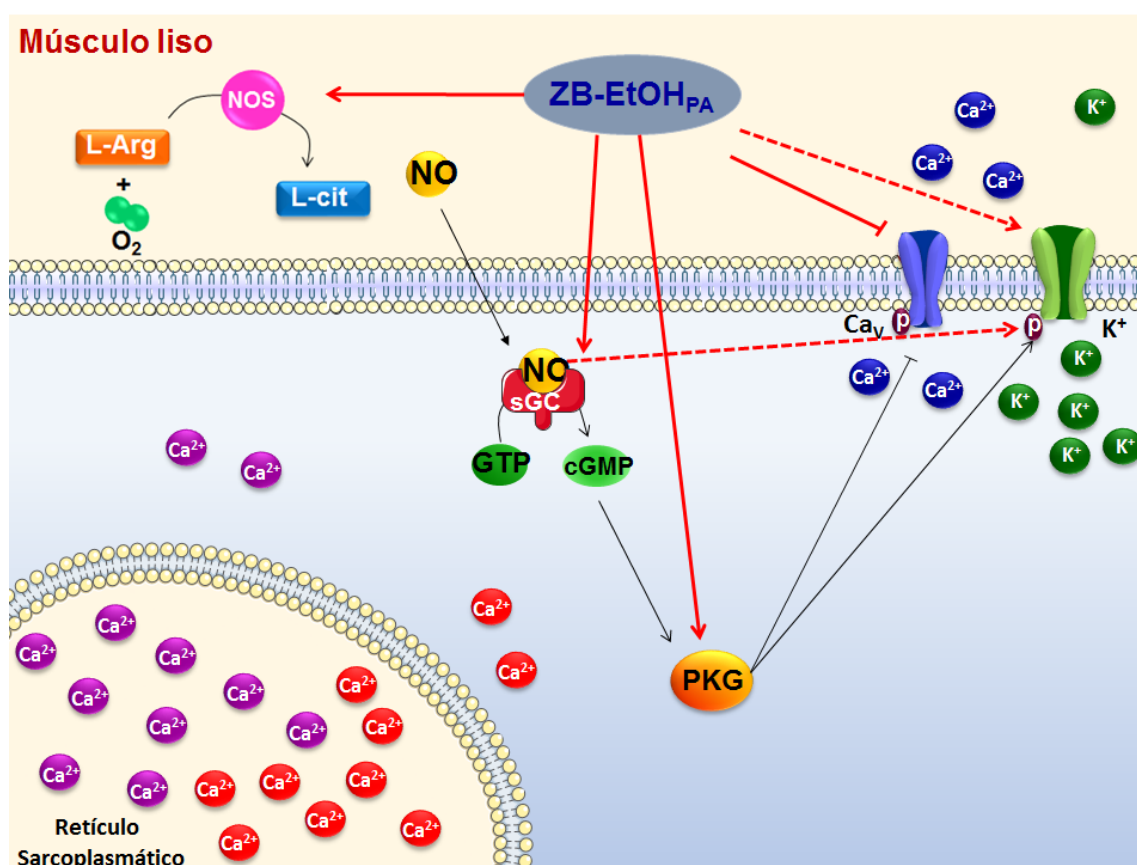
Alem disso, flavonoide 5,7-DMF apresenta atividade vasorrelaxante em aorta via modulação negativa da via do NO (TEP-AREENAN; SAWASDEE; RANDALL, 2010), corroborando o resultado com o ZB-EtOH_{PA} e sugerindo que ele pode ser um dos responsáveis pelo mecanismo de ação tocolítico apresentado pelo extrato.

Diante do exposto, pode-se concluir que o ZB-EtOH_{PA} está modulando positivamente a via NO/sGC/PKG, que por sua vez, inibe os Ca_v e ativa os canais de

K^+ , mais especificamente os K_v . Uma vez que a literatura relata que o NO ativa diretamente os canais de K^+ (LORCA; PRABAGARAN; ENGLAND, 2014), sugere-se que o extrato pode estar ativando direta ou indiretamente os canais de K^+ , o que desencadearia uma repolarização de membrana, consequentemente, redução do influxo de Ca^{2+} via Ca_v , reduzindo a $[Ca^{2+}]_c$ e, por fim, produziria o relaxamento uterino (Figura 24).

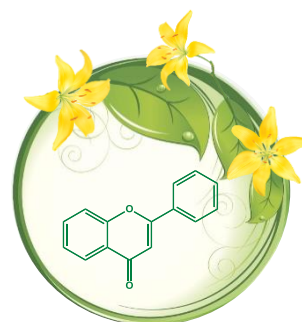
Tendo em vista a importância de estudos com produtos naturais na busca de medicamentos fitoterápicos para tratamentos de distúrbios comuns, como a dismenorrea, este trabalho torna-se relevante ao tentar descrever, ao menos em parte, o mecanismo de ação tocolítica do ZB-EtOH_{PA}, apresentando o extrato com efeitos significativos em modular a contração uterina, bem como nortear que os efeitos apresentados pelo extrato podem ser pela presença dos flavonoides isolados deste.

Figura 24 – Proposta de mecanismo de ação tocolítico de ZB-EtOH_{PA} em útero de rata.



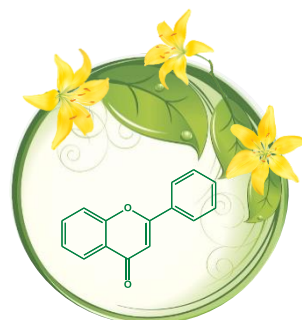
O mecanismo tocolítico de ZB-EtOH_{PA} em útero isolado de rata promove a modulação positiva da via do NO, o bloqueio indireto dos Ca_v-L e ativação dos de K⁺ direta e/ou via NO/sGC/PKG.

Fonte: Autor, 2018.



7 Conclusões

- Na caracterização do mecanismo de ação tocolítica *in vitro* do ZB-EtOH_{PA} em ratas, pode-se concluir que está envolvido(a):
 - Modulação positiva da via NO/cGG/PKG;
 - Bloqueio indireto dos Ca_v-1;
 - Modulação positiva de canais de K⁺ (BK_{Ca}, SK_{Ca}, K_{ATP} e K_v), majoritariamente pela atuação dos K_v;
- Os flavonoides, 7-MF e 5,7-DMF, provavelmente são os responsáveis pelo efeito tocolítico do extrato em ratas, sendo este último o mais potente em antagonizar as contrações fásicas induzidas por CCh.



Referências

- AARONSON, P. I.; SARWAR, U.; GIN, S.; ROCKENBAUCH, U.; CONNOLLY, M.; TILLET, A.; WATSON, S.; LIU, B.; TRIBE, R. M. A role for voltage-gated, but not Ca^{2+} -activated, K^+ channels in regulating spontaneous contractile activity in myometrium from virgin and pregnant rats. **British Journal of Pharmacology**, v. 147, p. 815-824, 2006.
- 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.
- ABDERRAHMANE, A.; SALVAIL, D.; DUMOULIN, M.; GARON, J.; CADIEUX, A.; ROUSSEAU, E. Direct activation of KCa channel in airway smooth muscle by nitric oxide: involvement of a nitrothiosylation mechanism?. **American journal of respiratory cell and molecular biology**, v. 19, n. 3, p. 485-497, 1998.
- ABRAHAM, G. E. Primary Dysmenorrhea, **Clinical Obstetrics and Gynecology**. V.21, n.1, p.139-146, 1978.
- AFIFI, F. U.; KHALIL, E.; ABDALLA, S. Effect of isoorientin isolated from *Arum palaestinum* on uterine smooth muscle of rats and guinea pigs. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 65, n. 2, p. 173-177, 1999.
- 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, nº. 6, p. 725-744, 2010.
- ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WATSON, J. D. Molecular biology of the cell. **Garland Publishing**; 2nd edition, New York, London, 1989.
- ALBUQUERQUE, U. P. Plantas medicinais e mágicas comercializadas nos mercados públicos do Recife-PE. **Ciência e Trópico**, v. 25, n. 1, p. 7-15, 1997.
- ALEXANDER, S. P. H.; BENSON, H. E.; FACCENDA, E.; PAWSON, A. J.; SHARMAN, J. L.; CATTERALL, W. A.; SPEDDING, M.; PETERS, J. A.; HARMAR, A. J.; CGTP COLLABORATORS. The concise guide to pharmacology 2013/14: Ion channels. **British Journal of Pharmacology**, v. 170, p. 1607-1651, 2013.
- ALEXANDER, S. P. H.; MATHIE, A.; PETERS, J. A. Guide to receptors and channels (GRAC), 5nd edition. **British Journal of Pharmacology**, v. 164, p. S1-S324, 2011.
- ALLEN, L. M.; LAM, A. C. Premenstrual syndrome and dysmenorrhea in adolescents. **Adolescent Medicine: State of The Art Reviews**, v. 23, n. 1, p. 139-163, 2012.
- ALVES, R. R. N.; SILVA, A. A. G.; SOUTO, W. M. S.; BARBOZA, R. R. D. Utilização e comércio de plantas medicinais em Campina Grande, PB, Brasil. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. IV, p. 175-198, 2007.
- 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.

- ARAÚJO, I. F. M.; SOUZA, L. F.; GUARÇONI, E. A. E.; FIRMO, W. C. A. O comércio de plantas com propriedades medicinais na cidade de Bacabal, Maranhão, Brasil. **Natureza Online**, v. 13, p. 111-116, 2015.
- ARROWSMITH, S.; WRAY, S. Oxytocin: Its mechanism of action and receptor signalling in the myometrium. **Journal of Neuroendocrinology**, v. 26, p. 356–369, 2014.
- AYAR, A.; KUTLU, S.; YILMAZ, B.; KELESTIMUR, H. Melatonin inhibits spontaneous and oxytocin-induced contractions of rat myometrium in vitro. **Neuroendocrinology Letters**, v. 22, p. 199-207, 2001.
- BAKER, F. C.; DRIVER, H. S.; ROGERS, G. G.; PAIKER, J.; MITCHELL, D. High nocturnal body temperatures and disturbed sleep in women with primary dysmenorrhea. **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**, v. 277, n. 6, p. E1013-E1021, 1999.
- BALICK, M. G.; COX, P. A. Plants, people and culture: the Science of ethnobotany. **Scientific American Library**, 1996.
- BARBOSA, M. R. V.; LIMA, J. R.; CUNHA, J. P.; AGRA, M. F.; THOMAS, W. W. Vegetação e flora no Cariri Paraibano. **Oecologia Brasiliensis**, v. 11, p. 313-322, 2007.
- BARROSO, G. M.; PEIXOTO, A. L.; ICHASO, C. L. F.; COSTA, C. G.; GUIMARÃES, E. F.; LIMA, H. C. **Sistemática de Angiospermas do Brasil**. Minas Gerais. Editora UFV, v. 1, 2 ed., 2007.
- BATISTA, T. M. **Avaliação da toxicidade in vitro e in vivo do extrato hidroalcolóico das partes aéreas de Zornia brasiliensis Vog. (Fabaceae)**. 2013. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) – Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2013.
- BELLOFIORE, N.; ELLERY, S. J.; MAMROT, J.; WALKER, D. W.; TEMPLE-SMITH, P.; DICKINSON, H.; First evidence of a menstruating rodent: the spiny mouse (*Acomys cahirinus*). **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 216, n. 1, p. 40e1-40e11, 2017.
- BERRIDGE, M. J. Cell signalling pathways. In: **Cell Signalling Biology**. Portland: Press Limited, p. 1-130, 2012.
- BERRIDGE, M. J. Smooth muscle cell calcium activation mechanisms. **The Journal of Physiology**, v. 586, n. 21, p. 5047-5061, 2008.
- BLAUSTEIN, M. P. Calcium transport and buffering in neurons. **Trends in Neurosciences**, v. 11, n. 10, p. 438-443, 1988.
- BOLOTINA, V. M.; NAJIBI, S.; PALACINO, J. J.; PAGANO, P. J.; COHEN, R. A.; Nitric oxide directly activates calcium-dependent potassium channels in vascular smooth muscle. **Nature**, v. 368, p. 850–853, 1994.
- BOLZANI, V. S. Biodiversidade, bioprospecção e inovação no Brasil. **Ciência e Cultura**, v. 68, n. 1, p. 04-05, 2016.
- BORTOLETTO, C. C. R. Dismenorréia primária: etiopatogenia e terapêutica. **Revista Feminina**, São Paulo, v. 23, n. 5, 1995.

- BOYLE, J. P.; TOMASIC, M.; KOTLIKOFF, M. I. Delayed rectifier potassium channels in canine and porcine airway smooth muscle cells. **Journal of Physiology**, v. 447, p. 329-350; 1992.
- BRAINARD, A. M.; KOROVKINA, V. P.; ENGLAND, S. K. Potassium channels and uterine function. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v. 18, n. 3, p. 332-339, 2007.
- BROWN, A.; CORNWELL, T.; KORNIYENKO, I.; SOLODUSHKO, V.; BOND, C. T.; ADELMAN, J. P.; TAYLOR, M. S.; Myometrial expression of small conductance Ca²⁺-activated K channels depresses phasic uterine contraction. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, v. 292, p. 832-840, 2007.
- 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.
- BYTAUTIENE, E.; VEDERNIKOV, Y.P., SAADE, G.R.; ROMERO, R.; GARFIELD, R.E.; Effect of histamine on phasic and tonic contractions of isolated uterine tissue from pregnant women. **American Journal of obstetrics gynecology**, v. 188, n 3, p. 774-778, 2003.
- CALIXTO, J. B.; SIQUEIRA, J. M. Desenvolvimento de Medicamentos no Brasil: Desafios. **Gazeta Médica da Bahia**, v.78, p.98-106, 2008.
- CARREIRO, N. J.; 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.
- CATTERALL, W. A. Voltage-Gated Calcium Channels, **Cold Spring Harb Perspect Biol**, v. 3, n. 8, 2011.
- 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. Actigraphy quantifies reduced voluntary physical activity in women with primary dysmenorrhea. **The Journal of Pain**, v. 10, n. 1, p. 38-46, 2009.
- CHAUD, M.; FRANCHI, A. M.; RETTORI, V.; MCCANN, S. M.; GIMENO, M. F. Nitric oxide in the contractile action of bradykinin, oxytocin, and prostaglandin F₂ α in the estrogenized rat uterus. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 94, n. 20, p. 11049-11054, 1997.
- CHIAPPETA, A. D. A.; DE 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.
- COCO, A. S. Primary dysmenorrhea. **American Family Physician**, v. 60, n. 2, p. 489-496, 1999.
- CONTE-CAMERINO, D.; LOGRANO, M. D.; LUCA, A.; PERSICHELLA, M.; FRANCONI, F. The effects of the calcium channel agonist, Bay K-8644, on guinea-pig ileum and rat uterine horn. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 39, n. 11, p. 954-957, 1987.

- CORNARA, L.; FORTUNA-PEREZ, A. P.; BRUNI, I.; SALIS, A.; DAMONTE, G.; BORGHESI, B.; CLERICUZIO, M. *Zornia latifolia*: a smart drug being adulterated by *Stylosanthes guianensis*. **International Journal of Legal Medicine**, v. 132, p. 1-11, 2018.
- 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.
- CRIBBS, L. L.; LEE, J. H.; YANG, J.; SATIN, J.; ZHANG, Y.; DAUD, A.; BARCLAY, J.; WILLIAMSON, M. P.; FOX, M.; REES, M.; PEREZ-REYES, E. Cloning and characterization of $\alpha 1H$ from human heart, a member of the T-type Ca^{2+} channel gene family. **Circulation Research**, v. 83, n. 1, p. 103-109, 1998.
- CSAPO, A.I. Smooth muscle as a contractile unit. **Physiological Reviews. Supplement**, v. 5, p.7-33, 1962.
- CZEPULA, A. I. S. Desenvolvimento de preparações semi-sólidas contendo extrato de *Sphagneticola drilobata* (L.) Pruski (*Acmela brasiliensis*, *Wedelia padulosa*) (ASTERACEAE) e avaliação da atividade antiinflamatória tópica in vivo. 2006. 119f. **Dissertação** (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Centro de Ciências da Saúde, Universidade do Vale do Itajaí, Itajaí. 2006.
- 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. Dysmenorrhea and prostaglandins. In: GOLD, J. J.; JOSIMOVICH, J. B. (eds). *Gynecologic Endocrinology*. New York: **Plenum Publishing Corporation**, p. 405 –421, 1987.
- DE SANCTIS, V.; SOLIMAN, A. T.; ELSEDFY, H.; SOLIMAN, N. A.; SOLIMAN, R.; EL KHOLY, M.; Dysmenorrhea in adolescents and young adults: a review in different country. **Acta Bio-Medica: Atenei Parmensis**. v. 87, n. 3, p. 233-246, 2017.
- DE SANCTIS, V.; SOLIMAN, A., BERNASCONI, S.; BIANCHIN, L.; BONA, G.; BOZZOLA, M.; DE SANCTIS, C.; TONINI, G.; RIGON, F.; PERISSINOTTO, E.; Primary dysmenorrhea in adolescents: prevalence, impact and recent knowledge. **Pediatric Endocrinology Reviews**, v. 13, n. 2, p. 512-520, 2015.
- DELLIS, O.; DEDOS, S. G.; TOVEY, S. C.; TAUFIQ-UR-RAHMAN, DUBEL, S. J.; TAYLOR, C. W. Ca^{2+} entry through plasma membrane IP_3 receptors. **Science**, v. 313, n. 5784, p. 229-233, 2006.
- DESAI, K. M.; SESSA, W. C.; VANE, J. R. Involvement of nitric oxide in the reflex relaxation of the stomach to accommodate food or fluid. **Nature**, v. 351, p. 477-479, 1991.
- DIKET, A. L.; PIERCE, M. R.; MUNSHI, U. K.; VOELKER, C. A.; ELOBY-CHILDRESS, S.; GREENBERG, S. S.; ZHANG, X-J.; CLARK, D. A.; MILLER, M. J. S. Nitric oxide inhibition causes intrauterine growth retardation and hind-limb disruption in rats. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 171: 1243-1250, 1994.

- DIMMELER, S.; FLEMING, I.; FISSLTHALER, B.; HERMANN, C.; BUSSE, R.; ZEHER, A. M. Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation. **Nature**, v. 399, n. 6736, p. 601, 1999.
- DINIZ, L. R. L.; ABÍLIO, G. M. F.; LOPES, J. D.; PAULO, M. Q. Avaliação toxicológica e microbiológica dos extratos da *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 jan. 2017.
- DINIZ, M. F. F. M.; OLIVEIRA, R. A. G.; MEDEIROS, A. C. D.; MALTA-JÚNIOR, A. **Memento fitoterápico**. As plantas como alternativa terapêutica: aspectos populares e científicos. João Pessoa: ed. Universitária/UFPB, p. 119-122, 1998.
- DO NASCIMENTO, S. C.; DE 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.
- DONG, Y. L.; GANGULA, P. R.; YALLAMPALLI, C.; Nitric oxide synthase isoforms in the rat uterus: differential regulation during pregnancy and labour. **Journal of reproduction and fertility**, v.107, N. 2, p.249-54, 1996.
- DORN, L. D.; NEGRIF, S.; HUANG, B.; PABST, S.; HILLMAN, J.; BRAVERMAN, P.; SUSMAN, E. J. Menstrual symptoms in adolescent girls: association with smoking, depressive symptoms, and anxiety. **Journal of Adolescent Health**, v. 44, n. 3, p. 237-243, 2009.
- 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.
- DUBEL, S. J.; STARR, T. V.; HELL, J.; AHLIJANIAN, M. K.; ENYEART, J. J.; CATTERALL, W. A.; SNUTCH, T. P. Molecular cloning of the alpha-1 subunit of an omega-conotoxin-sensitive calcium channel. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 89, n. 11, p. 5058-5062, 1992.
- 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.
- FARREL, A. J.; BLAKE, D. R. Nitric oxide (review). **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 55, p. 7-20, 1996.
- FERRANTE, J.; LUCHOWSKI, E.; RUTLEDGE, A.; TRIGGLE, D. J. Binding of a 1,4-dihydropyridine calcium channel activator, S-(-)-Bay K 8644, to cardiac preparations. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 158, p. 149-154, 1989.
- FIELD, T. S.; LEE, D. W.; HOLBROOK, N. M. Why leaves turn red in autumn. The role of anthocyanins in senescing leaves of red-osier dogwood. **Plant Physiology**, v. 127, p. 566-574, 2001.
- FONSECA, A. M.; BAGNOLI, V. R.; DIEGOLI, M. S.; ARIE, W. M. Y. Dismenorréia. In: HALBE, H. W., **Tratado de Ginecologia**. São Paulo: Roca, p. 748-54, 2000.
- FÖRSTERMANN, U.; CLOSS, E. I.; POLLOCK, J. S.; NAKANE, M.; SCHAWARZ, P.; GATH, I.; KLEINERT, H. Nitric oxide synthase isozymes: characterization, purification, molecular cloning, and functions. **Hypertension**, v. 23, p. 1121-31, 1994.

- FORTUNA-PEREZ, A. P.; SILVA, M. J.; QUEIROZ, L. P.; LEWIS, G. P.; SIMÕES, A. O.; AZEVEDO, T.; GOULART, A. M.; TIINA, S.; SOUZA, A. P. Phylogeny and biogeography of the genus *Zornia* (Leguminosae: Papilionoideae: Dalbergieae). **Taxon**, v. 62, p. 723–732, 2013.
- FORTUNA-PEREZ, A. P.; TOZZI, A. M. G. A. Nomenclatural changes for *Zornia* (Leguminosae, Papilionoideae, Dalbergieae) in Brazil. **Novon**, v. 21, p. 331–337, 2011.
- FRARE, J. C.; TOMADON, A.; SILVA, J. R.; Prevalência da Dismenorreia e seu efeito na qualidade de vida entre Mulheres Jovens. **Revista Brasileira de Ciências da Saúde**, ano 12, n. 39, p. 15-20, 2014.
- FREITAS, A. V. L.; COELHO, M. F. B.; AZEVEDO, R. A. B.; MAIA, S. S. S. Os raizeiros e a comercialização de plantas medicinais em São Miguel, Rio Grande do Norte, Brasil. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 10, p. 147-156, 2012.
- FULTON, D.; GRATTON, J. P.; MCCABE, T. J.; FONTANA, J.; FUJIO, Y.; WALSH, K.; FRANKE, T. W.; PAPAPETROPOULOS, A.; SESSA, W. C. Regulation of endothelium-derived nitric oxide production by the protein kinase Akt. **Nature**, v. 399, n. 6736, p. 597, 1999.
- FUSI, F.; SPIGA, O.; TREZZA, A.; SGARAGLI, G.; SAPONARA, S. The surge of flavonoids as novel, fine regulators of cardiovascular Ca_v channels. **European Journal of Pharmacology**, v. 796, p. 158-174, 2017.
- GEBEYEHU, M. B.; MEKURIA, A. B.; TEFERA, Y. G.; ANDARGE, D. A.; DEBAY, Y. B.; BEJIGA, G. S.; GEBRESILLASSIE, B. M. Prevalence, impact, and management practice of dysmenorrhea among University of Gondar students, Northwestern Ethiopia: a cross-sectional study. **International Journal of Reproductive Medicine** v. 2017, p.1-8, 2017.
- GERZSON, L. R.; PADILHA, J. F.; BRAZ, M. M.; GASPARETTO, A. Physiotherapy in primary dysmenorrhea: literature review. **Revista Dor**, v. 15, n. 4, p. 290-295, 2014.
- GOMES, J. M. **Avaliação da atividade antioxidante e fotoprotetora de *Calliandra umbellifera* e *Zornia brasiliensis* (Fabaceae)**. Trabalho de Conclusão de Curso (Curso de Farmácia) – Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2016.
- GOVINDARAJAN, M.; RAJESWARY, M.; MUTHUKUMARAN, U.; HOTI, S. L.; HANEM, F. K.; 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 & Photobiology B: Biology**, v. 161, p. 482–489, 2016.
- GRAY, H.; WILLIAMS, P. L. Anatomia. 37. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, v.2, 1995.
- GREENWOOD, I. A.; TRIBE, R. M. Kv7 and Kv11 channels in myometrial regulation. **Experimental Physiology**, v. 99, n. 3, p. 503-509, 2014.
- GREETHA, K. M.; SHILPA, S.; MURUGAN, V. Anticonvulsant Activity of the Methanolic Extract of Whole Plant of *Zornia diphylla* (Linn) Pers. **Journal of Pharmacy Research**, v. 5, n. 7, p. 3670-3672, 2012.
- GRUBER, C. W.; O'BRIEN, M. Uterotonic Plants and their Bioactive Constituents. **Planta Medica**, v. 77, nº. 3, p.207-220, 2011.

- GUO, Z. The modification of natural products for medical use. **Acta Pharmaceutica Sinica B**, v. 7, p. 119–136, 2017.
- GURNEY, A. M. Mechanisms of drug-induced vasodilation. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 46, p. 242-251, 1994.
- HAICK, J. M.; BYRON, K. L.; Novel treatment strategies for smooth muscle disorders: Targeting Kv7 potassium channels. **Pharmacology and Therapeutics**. v.165, p. 14-25, 2016.
- HAILEMESKEL, S.; DEMISSIE, A.; ASSEFA, N. Primary dysmenorrhea magnitude, associated risk factors, and its effect on academic performance: evidence from female university students in Ethiopia. **International Journal of Women's Health**, v. 8, p. 489, 2016.
- HALBREICH, U.; BORENSTEIN, J.; PEARLSTEIN, T.; KAHN, L. S. The prevalence, impairment impact, and burden of premenstrual dysphoric disorder (PMS/PMDD). **Psychoneuroendocrinology**, v. 28, p. 1–23, 2003.
- HAN, G.; MAGEE, T.; KHORRAM, O. Regulation of nitric oxide synthase isoforms by estrogen in the human endometrium. **Fertility and Sterility**, v. 84, p. 1220-1227, 2005.
- HAN, J.; TRUELL, J.; GNATENCO, C.; KIM, D. Characterization of four types of background potassium channels in rat cerebellar granule neurons. **The Journal of Physiology**, v. 542, n. 2, p. 431-444, 2002.
- 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. 111-129, 2015.
- HEINEMANN, L. A.; MINH, T. D.; FILONENKO, A.; UHL-HOCHGRÄBER, K. Explorative evaluation of the impact of severe premenstrual disorders on work absenteeism and productivity. **Womens Health Issues**, v. 20, p. 58–65, 2010.
- HOGMAN, M.; FROSTELL, C.; ARNHERG, H.; HEDENSTIEMA, G. Inhalation of nitric oxide modulates the methacholine-induced bronchoconstriction in the rabbit. **European Respiratory Journal**, v. 6, p. 177-180, 1993.
- HUBINOT, C.; DEBIEVE, F. Prevention of preterm labour: 2011 update on tocolysis. **Journal of Pregnancy**, v. 2011, p.1-5, 2011.
- HUGHEST, S. J.; HOLLINGSWORTH, M. Relaxin as a relaxant of the isolated rat uterus: comparison with its mechanism of action in vivo. **General Pharmacology**, v. 29, n. 5, p. 829-833, 1997.
- HUXLEY, A. F, NIEDERGERKE, R. Structural changes in muscle during contraction. **Nature**, v. 173, p. 971-3, 1954.
- IACOVIDES, S.; AVIDON, I.; BAKER, F. C. What we know about primary dysmenorrhea today: a critical review. **Human reproduction update**, v. 21, n. 6, p. 762-778, 2015.

International Association for Plant Taxonomy (IAPT). **International Code of Nomenclature for algae, fungi, and plants (Melbourne Code)**. CHAPTER III: Nomenclature of taxa according to their rank. 2012. Disponível em: < <http://www.iapt-taxon.org/nomen/main.php?page=art18>>. Acessado em 20 de janeiro de 2018.

IZUMI, H.; YALLAMPALLI, C.; GARFIELD, R. E. Gestational changes in L-arginine-induced relaxation of pregnant rat and human myometrial smooth muscle. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 169, p. 1327-1337, 1993.

JACOB, S. W.; FRANCONI, C. A.; LOSSOW, W. J. Anatomia e fisiologia humana. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 569 p. 1990.

JAN L. Y.; JAN Y. N. Structural elements involved in specific K⁺ channel functions. **Annual Review of Physiology**, v. 54, p. 537-555, 1992.

JENABI, E.; ASLE TOGHIRI, M.; HEJRATI, P. The comparison of the effects of antiplatin of valeriana officinalis risom and mefenamic acid in relief of primary dismenorrhea. **The Iranian Journal of Obstetrics, Gynecology and Infertility**, v. 15, n. 2, p. 42-47, 2012.

JI, H.; LI, X.; ZHANG, H. Natural products and drug discovery. **EMBO Reports**, v. 10, p. 194-200, 2009.

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.

JOLY, A. B. Botânica: Introdução à Taxonomia Vegetal. 13^a ed. São Paulo, **Companhia Editora Nacional**, 2002.

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.

KARAKI, H.; OZAKI, H.; HORI, M.; MITSUI-SAITO, M.; AMANO, K. I.; HARADA, K. I.; MIYAMOTO, S.; NAKAZAWA, H.; WON, K. J.; SATO, K. Calcium movements, distribution, and functions in smooth muscle. **Pharmacological reviews**, v. 49, n. 2, p. 157-230, 1997.

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.

- KIRKEBOEN, K. A.; STRAND, O. A. The role of nitric oxide in sepsis—an overview. **Acta Anaesthesiologica Scandinavica**, v. 43, n. 3, p. 275-288, 1999.
- KLITGAARD, B. B.; LAVIN, M. Dalbergieae. In: LEWIS, G.; SCHRIRE, B.; MACKINDER, B.; LOCK, M. (eds.), *Legumes of the world*. **Kew: Royal Botanic Gardens**, p. 307–335, 2005.
- KLOOS, H.; THIONGO, F. W.; OUMA, J. H.; BUTTERWORTH, A. E. Preliminary evaluation of some wild and cultivated plants for snail control in machakos district, Kenya. **Journal Tropical Medicine and Hygiene**, v. 90, n. 4, p. 197-204, 1987.
- 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.
- KOEPPEN, B. M.; STANTON, B. A. **Berne & Levy Fisiologia**, Elsevier, 6ª ed., 2009.
- KUMAR, S.; PANDEY, A. K. Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview. **The Scientific World Journal**, v. 2013,
- LATORRE, R.; OBERHAUSER, A.; LABARCA, P.; ALVAREZ, O. Varieties of calcium-activated potassium channels. **Annual Review of Physiology**, v. 51, p. 385-399, 1989.
- LATTHE, P.; LATTHE, M.; SAY, L.; GÜLMEZOGLU, M.; KHAN, K. S. WHO systematic review of prevalence of chronic pelvic pain: a neglected reproductive health morbidity. **BMC Public Health**, v. 6, n. 1, p. 177, 2006.
- LEDOUX, J.; WERNER, M. E.; BRAYDEN, J. E.; NELSON, M. T. Calcium-activated potassium channels and the regulation of vascular tone. **Physiology**, v. 21, p. 69-79, 2006.
- LEE, J. H.; GOMORA, J. C.; CRIBBS, L. L.; PEREZ-REYES, E. Nickel block of three cloned T-type calcium channels: Low concentrations selectively block α_1H . **Biophysical Journal**, v. 77, p. 3034–3042, 1999.
- 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.
- LEUNER, O.; HAVLIK, J.; PROKUDINA, J. H. E.; NOVY, P.; KOKOSKA, L. Distribution of isoflavones and coumestrol in neglected tropical and subtropical legumes. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 92, n. 15, 2012.
- LEWIS, G. P. *Legumes of Bahia*. Royal Botanic Gardens Kew, Surrey. 1987.
- LEWIS, G. P.; SCHRIRE, B. D.; MACKINDER, B. A.; LOCK, J. M. *Legumes of the world*, **Kew Royal Botanic Gardens**, 2005.
- LIMA, H. C.; QUEIROZ, L. P.; MORIM, M. P.; DUTRA, V. F.; BORTOLUZZI, R. L. C.; IGANCI, J. R. V.; FORTUNATO, R. H.; VAZ, A. M. S. F.; SOUZA, E. R.; FILARDI, F. L. R.; GARCIA, F. C. P.; FERNANDES, J. M.; MARTINS-DA-SILVA, R. C. V.; PEREZ, A. P. F.; MANSANO, V. F.; MIOTTO, S. T. S.; LIMA, L. C. P.; OLIVEIRA, M. L. A. A.; FLORES, A. S.; TORKE, B. M.; PINTO, R. B.; LEWIS, G. P.; BARROS, M. J. F.; SCHÜTZ, R.; PENNINGTON, T.; KLITGAARD, B. B.; RANDO, J. G.; SCALON, V. R.; COSTA, L. C.; SILVA, M. J.; MOURA, T. M.; BARROS, L. A. V.; SILVA, M. C. R.; QUEIROZ, R. T.; SARTORI, A. L. B.; CAMARGO, R. A.; LIMA, I. B.; COSTA, J.;

- SOARES, M. V. B.; SNAK, C.; VALLS, J. F. M.; SÃO-MATEUS, W.; FALCÃO, M. J.; CARDOSO, D. B. O. S.; TOZZI, A. M. G. A.; MARTINS, V. C.; SOUZA, V. C.; MEIRELES, J. E.; REIS, I. P. Fabaceae. In: **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro. 2015. Disponível em <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2012/FB000115>> Acesso em 15 set. 2016.
- LIMA, I. E. O.; NASCIMENTO, L. A. M.; SILVA, M. S. Comercialização de Plantas Medicinais no Município de Arapiraca-AL. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 18, p.462-472, 2016.
- LIMA, J. T. Ação espasmolítica do 3, 4, 5, 8-tetrametoxi (6, 7, 2", 3") furanoflavana, obtido de *Diploptropis ferruginea* Benth. (Fabaceae), envolve ativação de canais de potássio. **Dissertação de Mestrado** - Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa-PB, 2004.
- 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 de doutorado** - Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa-PB, 2008.
- LINHARES, J. F. P.; HORTEGAL, E. V.; RODRIGUES, M. I. A.; SILVA, P. S. S. Etnobotânica das principais plantas medicinais comercializadas em feiras e mercados de São Luís, Estado do Maranhão, Brasil. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 5, p. 39-46, 2014.
- 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.
- LORCA, R. A.; PRABAGARAN, M.; ENGLAND, S. K. Functional insights in to modulation of BKCa channel activity to alter myometrial contractility. **Frontiers in Physiology**, v. 5, p. 1-12, 2014.
- LÓS, D. W. S.; BARROS, R. P.; NEVES, J. D. S. Comercialização de plantas medicinais: um estudo etnobotânico nas feiras livres do município de Arapiraca-AL. **Biofarmácia**, v. 7, 2012.
- LOVASZ, N.; KONCZ, A.; DOMOKOS, D.; GASPARG, R.; FALKAY, G. ATP-sensitive potassium channels modulate in vitro tocolytic effects of β 2-adrenergic receptor agonists on uterine muscle rings in rats in early but not in late pregnancy. **Croatian Medical Journal**, v. 56, n. 2, p. 114-118, 2015.
- MACKINNON, R. Potassium channels. **FEBS Letters**, v. 555, n. 1, p. 62-65, 2003.
- MAHAPATRA, S.; MARCANTONI, A.; ZUCCOTTI, A.; CARABELLI, V.; CARBONE, E.; Equal sensitivity of Cav1.2 and Cav1.3 channels to the opposing modulations of PKA and PKG in mouse chromaffin cells. **The Journal of Physiology**, v. 590, p. 5053-5073, 2012.
- MAKHLOUF, G. M.; MURTHY, K. S. Signal transduction in gastrointestinal smooth muscle. **Cellular Signalling**, v. 9, n. 3-4, p. 269-276, 1997.
- MALGRAS, D. Arbres et arbustes guérisseurs des savanes maliennes. **Edition KARTHALA et ACCT**, 1992.

- MARJORIBANK, S. J.; PROCTOR, M.; FARQUHAR, C.; DERKS, R. S. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs for dysmenorrhoea. *Cochrane Database Syst Rev*, v. 20, n. 1, 2010.
- MARTINS, L. L.; BIAGIONI, M. M.; OLIVEIRA, F. S.; TONIOLLO, G. H.; PACHECO, M. R.; MACHADO, M. R. F. Morfologia do útero de cutias nulíparas e não nulíparas. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, p. 326-332, 2011.
- McHALE, N.; HOLLYWOOD, M.; SERGEANT, G.; THORNBURY, K. Origin of spontaneous rhythmicity in smooth muscle. **The Journal of physiology**, v. 570, n. 1, p. 23-28, 2006.
- MESSIAS, M. C. T. B.; MENEGATTO, M. F.; PRADO, A. C. C.; SANTOS, B. R.; GUIMARÃES, M. F. M. Popular use of medicinal plants and the socioeconomic profile of the users: a study in the urban area of Ouro Preto, Minas Gerais, Brazil. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 17, n. 1, p. 76-104, 2015.
- MIDDLETON, E. J. Effect of plant flavonoids on immune and inflammatory cell function. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 439, p. 175–182, 1998.
- MILOVANOVIC, S. R.; KORDIC-BOJINOVIC, J.; DJORDJEVIC, S.; DRAKUL, D.; SOKOLOVIC, D.; MILETIC, N.; BLAGOJEVIC, D.; The importance of potassium channels in the mechanism of the relaxing effect of pentoxifylline on isolated rat uteri. **Serbian Journal of Experimental and Clinical Research**. v.14, n. 2, p. 55-64, 2013.
- MLADENKA, P.; MACÁKOVÁ, K.; ZATLOUKALOVÁ, L.; ŘEHÁKOVÁ, Z.; SINGH, B. K.; PRASAD, A. K.; PARMAR, V. S.; JAHODAR, L.; HRDINA, R.; SASO, L. In vitro interactions of coumarins with iron. **Biochimie**, v. 92, n. 9, p. 1108-1114, 2010.
- MODARESS, M.; MIRMOHAMMAD, M.; OSHIREH, Z.; MEHRAN, A. Comparison of the effect of mefenamic acid and *Matricaria chamomilla* capsules on primary dysmenorrhea. **Journal of Babol University of Medical Sciences**, v.13, p. 50–8, 2011.
- MODZELEWSKA, B.; KLESZCZEWSKI, T.; KOSTRZEWSKA, A. The effect of a selective inhibition of potassium channels on the relaxation induced by nitric oxide in the human pregnant myometrium. **Cellular & Molecular Biology Letters**, v. 8, n. 1, p. 69-75, 2003.
- MODZELEWSKA, B.; KOSTRZEWSKA, A.; SIPOWICZ, M.; KLESZCZEWSKI, T.; BATRA, S. Apamin inhibits NO-induced relaxation of the spontaneous contractile activity of the myometrium from non-pregnant women. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 1, p. 8-15, 2003.
- MOHLENBROCK, R. H. A. Monograph of the Leguminous Genus *Zornia*. **Webbia**, v. 16, p. 112-113, 1961.
- MOLNAR, M.; SUTO, T.; TOTH, T.; HERTELCNDY, F. Prolonged blockade of nitric oxide synthesis in gravid rats produces sustained hypertension, proteinuria, thrombocytopenia, and intrauterine growth retardation. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 170, p. 1458-1466, 1994.
- MONCADA, S. R.; PALMER, M. G.; HIGGS, E. A. Nitric oxide, physiology, pathophysiology and pharmacology. **Pharmacological Reviews**, v. 43, p. 109-142, 1991.

- MORI, Y.; FRIEDRICH, T.; KIM, M. S.; MIKAMI, A.; NAKAI, J.; RUTH, P.; BOSSE, E.; HOFMANN, F.; FLOCKERZI, V.; FURUICHI, T.; MIKOSHIBA, K.; IMOTO, K.; TANABE, T.; NUMA, S. Primary structure and functional expression from complementary DNA of a brain calcium channel. **Nature**, v. 350, n. 6317, p. 398, 1991.
- MUNCHEN, F. B. H.; Handbook of Experimental Pharmacology. cGMP: Generators, Effectors and Therapeutic Implications. v. 191. p. 282-285, 2010.
- 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.
- MURPHY, M. E.; BRAYDEN, J. E. Apamin-sensitive K⁺ channels mediate an endothelium-dependent hyperpolarization in rabbit mesenteric arteries. **The Journal of Physiology**, v. 489, n. 3, p. 723-734, 1995.
- MURREL, G. A. C.; DOLAN, M. M.; JANG, D.; SZABO, C.; WARREN, R. F.; HANNAFIN, J. A. Nitric oxide: an important articular free radical. **The Journal of Bone and Joint Surgery**, v. 78, p. 265-74, 1996.
- 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.
- MYATT, L.; BREWER, A. S.; LANGDON, G.; BROCKMAN, D. E. Attenuation of the vasoconstrictor effects of thromboxane and endothelin by nitric oxide in the human fetal-placental circulation. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 166, p. 224-230, 1992.
- NAKAO, K.; INOUE, Y.; OKABE, K.; KAWARABAYASHI, T.; KITAMURA, K. Oxytocin enhances action potentials in pregnant human myometrium—a study with microelectrodes. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 177, p. 222–228, 1997.
- 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**, vol. 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.
- NELSON, S. H.; STEINSLAND, O. S.; WANG, Y.; YALLAMPALLI, C.; DONG, Y. L.; SANCHEZ, J. M. Increased nitric oxide synthase activity and expression in the human uterine artery during pregnancy. **Circulation Research**, v. 87, n. 5, p. 406-411, 2000.
- 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.
- NEUWINGER, H. D. African Traditional Medicine Adictionary of Plant Use and Applications, **Medpharm Scientific Publishers Stuttgart**, 2000.
- NILIUS, B. Possible functional significance of a novel type of cardiac Ca²⁺ channel. **Biomedica Biochimica Acta**, v. 45, n. 8, p. K37-45, 1986.

- NORMAN, J. Nitric oxide and the myometrium. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 70, n. 2, p. 91-100, 1996.
- 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.
- NUNES, J. M. O.; RODRIGUES, J. A.; MOURA, M. S. F.; BATISTA, S. R. C.; COUTINHO, S.K.S.F.; HAZIME, F.A.; BARBOSA, A.L.R.; prevalência de dismenorreia em universitárias e sua relação com absenteísmo escolar, exercício físico e uso de medicamentos. **Revista Brasileira em Promoção da Saúde**. v. 26, n. 3, p. 381-386, 2013.
- 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.
- 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, 2016a.
- 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, 2016b.
- OLSON, N.J.; PEARSON, RB; NEEDLEMAN, D.S.; HURWITZ, M.Y.; KEMP, B.E.; MEANS, A.R.;Regulatory and structural motifs of chicken gizzard myosin light chain kinase. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 87: p. 2284–2288 1990.
- OZGOLI, G.; GOLI, M.; MOATTAR, F. Comparison of effects of ginger, mefenamic acid, and ibuprofen on pain in women with primary dysmenorrhea. **The Journal of Alternative and Complementary Medicine**, v. 15, n. 2, p. 129-132, 2009.
- 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.
- PARK, K-S.; YANG, J-W.; SEIKEL, E.; TRIMMER, J. S. Potassium channel phosphorylation in excitable cells: providing dynamic functional variability to a diverse family of ion channels. **Physiology**, v. 23, p. 49-57, 2008.

- PARRA, J.; CANTABRANA, B.; HIDALGO, A. Mechanism of mifepristone-induced spasmolytic effect on isolated rat uterus. **Life Sciences**, v. 66, n. 26, p. 2563-2569, 2000.
- PASSOS, R. B. F.; ARAÚJO, D. V.; RIBEIRO, C. P.; MARINHO, T.; Prevalência de dismenorréia primária e seu impacto sobre a produtividade em mulheres brasileiras – Estudo DISAB. **Revista Brasileira de Medicina**, v. 68, n.8, p. 250-253, 2008.
- PAULSON, O. B.; NEWMAN, E. A. Does the release of potassium from astrocyte end feet regulate cerebral blood flow? **Science**, v. 237, n. 4817, p. 896-898, 1987.
- PEREZ, A. P. F. **O gênero *Zornia* J. F. Gmel. (Leguminosae, Papilionoideae, dalbergiae): Revisão taxonômica das espécies ocorrentes no Brasil e filogenia**. Tese de 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: 03/07/2016.
- 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, G. J.; TORO, L.; ERULKAR, S. D.; STEFANI, E. Characterization of large-conductance, calcium-activated potassium channels from human myometrium. **American Journal of Obstetrics & Gynecology**, v. 168, p. 252–260, 1993.
- PEREZ-REYES, E.; CRIBBS, L. L.; DAUD, A.; LACERDA, A. E.; BARCLAY, J.; WILLIAMSON, M. P.; FOX, M.; REES, M.; LEE, J. H. Molecular characterization of a neuronal low-voltage-activated T-type calcium channel. **Nature**, v. 391, n. 6670, p. 896, 1998.
- PETTA, C. A.; OSIS, M. J.; PÁDUA, K. S.; BAHAMONDES, L.; MAKUCH, M. Y. Premenstrual syndrome as reported by Brazilian women. **International Journal of Gynecology & Obstetrics**, v. 108, p. 40-43, 2010.
- PHILLIPPE, M. Protein Kinase C, an Inhibitor of Oxytocin-Stimulated Phasic Myometrial Contractions. **Biology of Reproduction**. v. 50, p. 855-859, 1994.
- PIPER, I.; MINSHALL, E.; DOWNING, S. J.; HOLLINGSWORTH, M.; SADRAEI, H. Effects of several potassium channel openers and glibenclamide on the uterus of the rat. **British Journal of Pharmacology**, v. 101, p. 901-907, 1990.
- POLLASTRI, S.; TATTINI, M. Flavonols: old compounds for old roles. **Annals of Botany**, v. 108, p. 1225– 1233, 2011.
- PONTE, C. G.; MCMANUS, O. B.; SCHMALHOFER, W. A.; SHEN, D. M.; DAI, G.; STEVENSON, A.; SUR, S.; SHAH, T.; KISS, L.; SHU, M.; DOHERTY, J. B.; NARGUND, R.; KACZOROWSKI, G. J.; SUAREZ-KURTZ, G.; GARCIA, M. L. Selective, direct activation of high-conductance, calcium-activated potassium channels causes smooth muscle relaxation. **Molecular pharmacology**, v. 81, n. 4, p. 567-577, 2012.
- PUETZ, S.; LUBOMIROV, L. T.; PFITZER, G. Regulation of smooth muscle contraction by small GTPases. **Physiology (Bethesda)**, v. 24, p. 342-356, 2009.
- RAHMATULLAH, M.; KHATUN, Z.; HASAN, A.; PARVIN, W.; MONIRUZZAMAN, M.; KHATUN, A.; MAHAL, M. J.; BHUIYAN, S. A.; MOU, S. M.; JAHAN, R. Survey and

scientific evaluation of medicinal plants used by the Pahan and Teli tribal communities of Natore district, Bangladesh. **African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines**, v. 9, n. 3, p. 366-373, 2012.

RAMOS, M. A.; ALBUQUERQUE, U. P.; AMORIM, E. L. C. O comércio de plantas medicinais em mercados públicos e feiras livres: um estudo de caso. In: **Sociedade Brasileira de Etnobiologia e Etnoecologia**, p. 127-162, 2005.

RANDO, J. G. Fabaceae. In: Flora do Brasil 2020 em construção. **Jardim Botânico do Rio de Janeiro**. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB115>>. Acesso em: 20 Setembro de 2016.

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.

REMBOLD, C. M. Regulation of contraction and relaxation in arterial smooth muscle. **Hypertension**, v. 20, n. 2, p. 129-137, 1992.

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.; CANTABRANA, B.; HIDALGO, A. Mechanisms involved in kaempferol-induced relaxation in rat uterine smooth muscle. **Life sciences**, v. 67, n. 3, p. 251-259, 2000.

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. **Autonomic and Autacoid Pharmacology**, v. 19, n. 6, p. 353-358, 1999.

RODRIGUES, A. G.; AMARAL, A. C. F. Aspectos sobre o desenvolvimento da fitoterapia. In: **BRASIL, Ministério da Saúde**. Secretaria de atenção à saúde. Departamento de atenção básica práticas integrantes e complementares: plantas medicinais e fitoterapia na atenção básica. Brasília: M.S, 2012.

RODRIGUES, I. C.; OLIVEIRA, E. Prevalência e convivência de mulheres com síndrome pré-menstrual. **Arquivos de Ciências da Saúde**, v. 13, p. 61-67, 2006.

ROJAS, A.; BAH, M.; ROJAS, J. I.; SERRANO, V.; PACHECO, S. Spasmolytic activity of some plants used by the Otomi Indians of Querétaro (México) for the treatment of gastrointestinal disorders. **Phytomedicine**, v. 6, p. 367-371, 1999.

ROJAS, A.; CRUZ, S.; RAUCH, V.; BYE, R.; LINARES, E.; MATA, R. Spasmolytic potential of some plants used in Mexican traditional medicine for the treatment of gastrointestinal disorders. **Phytomedicine**, vol. 2, p. 51-55, 1995.

ROUQUAYROL, M. Z.; FONTELES, M. C.; ALENCAR, J. E.; JOSE DE ABREU MATOS, 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.

- RUDD, V. TRIBE 14. Aeschynomeneae (Benth.) Hutch. (1964). in: Polhill, R.M. & Raven, P.H. (eds.), **Advances in legume systematics**, pt. 1. Kew: Royal Botanic Gardens, Kew. p. 347–354, 1981.
- RYU, A.; KIM, T. H. Premenstrual syndrome: A mini review. **Maturitas**, v. 82, p. 436–440, 2015.
- SAH, P.; FABER, E. S. Channels underlying neuronal calcium-activated potassium currents. **Progress in Neurobiology**, v. 66, p. 345-353, 2002.
- SAKURADA, K.; SETO, M.; SASAKI, Y. Dynamics of myosin light chain phosphorylation at Ser19 and Thr18/Ser19 in smooth muscle cells in culture. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, v. 274, p.1563–1572, 1998.
- 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.
- SANSOM, S. C.; STOCKAND, J. D.; HALL, D.; WILLIAMS, B. Regulation of large calcium-activated potassium channels by protein phosphatase 2A. **Journal of Biological Chemistry**, v. 272, n. 15, p. 9902-9906, 1997.
- SANTOS, A. C. V.; FERNANDES, C. C.; LOPES, L. M.; SOUSA, A. H. Inseticidal oils from amazon plants in control of fall armyworm. **Revista Caatinga**, v. 29, p. 642-647, 2016.
- 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.
- SCALEA, T. L.; PEARLSTEIN, T. Premenstrual Dysphoric Disorder. **Psychiatric Clinics of North America**, v. 40, p. 201-216, 2017.
- SCHRAMM, M.; THOMAS, G.; TOWART, R.; FRANCKOWIAK, G. Activation of calcium channels by novel 1,4-dihydropyridines. A new mechanism for positive inotropics or smooth muscle stimulants. **Arzneimittel Forschung – Drug Research**, v. 33, p. 1268-1272, 1983a.
- SCHRAMM, M.; THOMAS, G.; TOWART, R.; FRANCKOWIAK, G. Novel dihydropyridines with positive inotropic action through activation of Ca²⁺ channels. **Nature**, v. 303, p. 535-537, 1983b.
- SCHREIBER, M.; WEI, A.; YUAN, A.; GAUT, J.; SAITO, M.; SALKOFF, L. Slo3, a novel pH-sensitive K⁺ channel from mammalian spermatocytes. **Journal of Biological Chemistry**, v. 273, n. 6, p. 3509-3516, 1998.
- SCHUMACHER, M. A.; RIVARD, A. F.; BACHINGER, H. P.; ADELMAN, J. P. Structure of the gating domain of a Ca²⁺-activated K⁺ channel complexed with Ca²⁺/calmodulin. **Nature**, v. 410, p. 1120-1124, 2001.
- SILVA, A. D. S. **Flavonoides de *Zornia brasiliensis* e atividade antinociceptiva da 7-metoxiflavona**. **Dissertação de Mestrado** - Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa-PB, 2013.

- 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.
- SMITH, R. C.; MCCLURE, M. C.; SMITH, M. A.; ABEL, P. W.; BRADLEY, M. E.; The role of voltage-gated potassium channels in the regulation of mouse uterine contractility. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 5, n. 4, p. 1-12, 2007.
- SOARES, L. E.; BELCAVELLO, L.; BATITUCCI, M. C. P.; AMARAL, F. T.; CUNHA, M. R. H. Avaliação dos efeitos cardiovasculares do extrato hidroalcoólico das folhas de *Zornia diphylla* (arrozinho-do-campo) em ratos normotensos e espontaneamente hipertensos. In: **Anais do IV Encontro Científico de Ciências da Saúde**. Vitória, ES. 2007.
- SOMLYO, A.P.; SOMLYO, A.V.; Signal transduction and regulation in smooth muscle. **Nature**, v. 372, p. 231-236, 1994.
- SONG, Y.; KIM, M. B.; KIM, C.; KIM, J.; HWANG, J. K. 5, 7-dimethoxyflavone attenuates obesity by inhibiting adipogenesis in 3T3-L1 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.
- SOUSA, F. C.; OLIVEIRA, E. N. A.; SANTOS, D. C.; FRANCISCO ALEXANDRO ALVES DE OLIVEIRA, F. A. A.; MORI, E. Uso de plantas medicinais (Fitoterápicos) por mulheres da cidade de Icó-CE. **Revista de Biologia e Farmácia**, v. 5, n. 1, p. 161-170, 2011.
- SOUTHON, I. W. Phytochemical Dictionary of the Leguminosae. **Chapman & Hall, London**, v.1, 1994.
- SOUZA, L. F.; GUILHERME, F. A. G.; COELHO, C. P. Flora das microrregiões Quirinópolis e Sudoeste Goiano, com potencial econômico (Goiás, Brasil). **Acta Biológica Paranaense**, v. 44, p. 109-127, 2015.
- 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.
- SPEDDING, M.; PAOLETTI, R. Classification of calcium channels and the sites of action of drugs modifying channel function. **Pharmacology Reviews**, v. 44, p. 363-376, 1992.
- STICHER, O. Natural products — how have they contributed to health and society. **Planta Medica**, v. 80, p. IL18, 2014.
- STULL, J.T.; TANSEY, M.G.; WORD, R.A.; KUBOTA, Y.; KAMM, K.E.; Myosin light chain kinase phosphorylation: regulation of the Ca²⁺ sensitivity of contractile elements. **Regulation of Smooth Muscle Contraction**, p. 129-138, 1991.

SUBASINGHE, A. K.; HAPPO, L.; JAYASINGHE, Y. L.; GARLAND, S. M.; GORELIK, A.; WARK, J. D. Prevalence and severity of dysmenorrhoea, and management options reported by young Australian women. **Australian Family Physician**, v. 45, n. 11, p. 829-834, 2016.

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.

TAGUCHI, M.; ALFER, J.; CHWALISZ, K.; BEIER, H. M.; CLASSEN-LINKE, I. Endothelial nitric oxide synthase is differently expressed in human endometrial vessels during the menstrual cycle. **Molecular Human Reproduction**, v. 6, n. 2, p. 185-190, 2000.

TAKAHASHI, M.; SEAGAR, M. J.; JONES, J. F.; REBER, B. F.; CATTERALL, W. A. Subunit structure of dihydropyridine-sensitive calcium channels from skeletal muscle. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 84, n. 15, p. 5478-5482, 1987.

TANABE, T.; TAKESHIMA, H.; MIKAMI, A.; FLOCKERZI, V.; TAKAHASHI, H.; KANGAWA, K.; KOJIMA, M.; MATSUO, H.; HIROSE, T.; NUMA, S. Primary structure of the receptor for calcium channel blockers from skeletal muscle. **Nature**, v. 328, n. 6128, p. 313, 1987.

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.

TEIMOORI, B.; GHASEMI, M.; HOSEINI, Z. S. A.; RAZAVI, M. The efficacy of zinc administration in the treatment of primary dysmenorrhea. **Oman Medical Journal**, v. 31, n. 2, p.107-111, 2016.

TELFER, J. E.; LYALL, F.; NORMAN, J. E.; CAMERON, I. T. Identification of nitric oxide synthase in human uterus. **Human Reproduction**, v. 10, p. 19-23, 1995.

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.

TESKE, M.; TRENTINI, A. M. **Herbarium: compendio de fitorapia**. 2 ed. Curitiba: Herbarium Laboratório Botânico, 1995.

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.

The Legume Phylogeny Working Group (LPWG). Legume phylogeny and classification in the 21st century: Progress, prospects and lessons for other species-rich clades. **Taxon**, v. 62, p. 217-248, 2013.

THORNELOE, K. S.; NELSON, M. T. Ion channels in smooth muscle: regulators of intracellular calcium and contractility. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 83, p. 215-242, 2005.

TOBA, H.; MORISHITA, M.; TOJO, C.; NAKANO, A.; OSHIMA, Y.; KOJIMA, Y.; YOSHIDA, M.; NAKASHIMA, K.; WANG, J.; KOBARA, M.; NAKATA, T. Recombinant human erythropoietin ameliorated endothelial dysfunction and macrophage infiltration

by increasing nitric oxide in hypertensive 5/6 nephrectomized rat aorta. **European Journal of Pharmacology**, v. 656, p. 81–87, 2011.

TRAN, Q. K.; OHASHI, K.; WATANABE, H. Calcium signalling in endothelial cells, **Cardiovasc Research**, v. 48, p. 13–22, 2000.

TRITTHART, H. A.; MAHNERT, W.; FLEISCHHACKER, A.; ADELWOHRER, N.; Potassium channels and modulating factors of channel functions in the human myometrium. **Zeitschrift Fur Kardiologie**, v. 80 n. 7, 29–33, 1991.

TSAI, M-L.; CESEN-CUMMINGS, K.; WEBB, R. C.; LOCH-CARUSO, R. Acute inhibition of spontaneous uterine contractions by an estrogenic polychlorinated biphenyl is associated with disruption of gap junctional communication. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 152, p. 18-29, 1998.

UNSAL, A.; AYRANCI, U.; TOZUN, M.; ARSLAN, G.; CALIK, E. Prevalence of dysmenorrhea and its effect on quality of life among a group of female university students. **Upsala Journal of Medical Sciences**, v. 115, n. 2, p. 138-145, 2010.

VALADARES, G. C.; FERREIRA, L. V.; CORREA FILHO, H.; ROMANO-SILVA, M. A. Transtorno disfórico pré-menstrual revisão–conceito, história, epidemiologia e etiologia. **Revista de Psiquiatria Clínica**, v. 33, n. 3, p. 117-23, 2006.

VALLANCE, P.; COLLIER, J.; MONCADA, S. Nitric oxide synthesised from L-arginine mediates endothelium dependent dilatation in human veins in vivo. **Cardiovascular Research**, v. 23, n. 12, p. 1053-1057, 1989.

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.

VEITCH, N. C. Flavonoid chemistry of the Leguminosae. **Recent Advances in Polyphenol Research**, v. 2, p. 23-58, 2010.

VIDAK, M.; ROZMAN, D.; KOMEL, R. Effects of flavonoid from food and dietary supplements on glial and glioblastoma multiforme cells. **Molecules: A Journal of Synthetic Chemistry and Natural Product Chemistry**, v. 20, p. 19406–19432, 2015.

WEBB, R. C. Smooth muscle contraction and relaxation. **Advances in Physiology Education**, v. 27, nº. 4, p.201-206, 2003.

WEI, A. D.; GUTMAN, G. A.; ALDRICH, R.; CHANDY, K. G.; GRISSMER, S.; WULFF, H. International Union of Pharmacology. LII. Nomenclature and molecular relationships of calcium-activated potassium channels. **Pharmacology Reviews**, v. 57, p. 463-472, 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.

WILLIAMS, M. E.; FELDMAN, D. H.; MCCUE, A. F.; BRENNER, R.; VELICELEBI, G.; ELLIS, S. B.; HARPOLD, M. M. Structure and functional expression of $\alpha 1$, $\alpha 2$, and β subunits of a novel human neuronal calcium channel subtype. **Neuron**, v. 8, n. 1, p. 71-84, 1992.

- WINK, M. Evolution of secondary metabolites in legumes (Fabaceae). **South African Journal of Botany**, v. 89, p. 164-175, 2013.
- WINK, M. Quinolizidine alkaloids. **Methods in Plant Biochemistry**, v. 8, p. 197-239, 1993.
- WOJCIECHOWSKI, M. F. Reconstructing the phylogeny of legumes (Leguminosae): an early 21st century perspective. **Advances in Legume Systematics**, v. 10, p. 5-35, 2003.
- WONG, C. L.; FARQUHAR, C.; ROBERTS, H.; PROCTOR, M. Oral contraceptive pill as treatment for primary dysmenorrhoea. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, v. 2, p. 1-50, 2009.
- WOODRUM, D. A.; BROPHY, C. M. The paradox of smooth muscle physiology. **Molecular and cellular endocrinology**, v. 177, n. 1-2, p. 135-143, 2001.
- 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.
- WRAY, S.; JONES, K.; KUPITTAYANANT, S.; LI, Y.; MATTHEW, A.; MONIR-BISHTY, E.; NOBLE, K.; PIERCE, S. J.; QUENBY, S.; SHMYGOL, A. V. Calcium signaling and uterine contractility. **Journal of the Society for Gynecologic Investigation**, v. 10, p. 252-264, 2003.
- WRAY, S.; KUPITTAYANANT, S.; SHMIGOL, A.; SMITH, R. D.; BURDYGA, T. V. The physiological basis of uterine contractility: a short review. **Experimental Physiology**, v. 86, p. 239-246, 2001.
- WRAY, S.; SHMYGOL, A. Role of the calcium store in uterine contractility. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v. 18, p. 315-320, 2007.
- WU, C. H.; SHIEH, T. M.; WANG, K. L.; HUANG, T. C.; HSIA, S. M. Quercetin, a main flavonoid in onion, inhibits the PGF2 α -induced uterine contraction in vitro and in vivo. **Journal of Functional Foods**, v. 19, p. 495-504, 2015.
- YALLAMPALLI, C.; GARFIELD, R. E.; BYAM-SMITH, M. Nitric oxide inhibits uterine contractility during pregnancy but not during delivery. **Endocrinology**, v. 133, p. 1899-1902, 1993.
- YALLAMPALLI, C.; IZUMI, H.; BYAM-SMITH, M.; GARFIELD, R. E. An L-arginine-nitric oxide-cyclic guanosine monophosphate system exists in the uterus and inhibits contractility during pregnancy. **American Journal of Obstetrics & Gynecology**, v. 170, n. 1, 1994.
- YANG, N.; LIANG, B.; SRIVASTAVA, K.; ZENG, J.; ZHAN, J.; BROWN, L.; SAMPSON, H.; GOLDFARB, J.; EMALA, C. LI, X. M. The *Sophora flavescens* flavonoid compound trifolirhizin inhibits acetylcholine induced airway smooth muscle contraction. **Phytochemistry**, v. 95, p. 259-267, 2013.
- YOUNG, R. C. Myocytes, myometrium, and uterine contractions. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1101, p. 72-84, 2007.

YUAN, A.; SANTI, C. M.; WEI, A.; WANG, Z. W.; POLLAK, K.; NONET, M.; KACZMAREK, L.; CROWDER, C. M.; SALKOFF, L. The sodium-activated potassium channel is encoded by a member of the Slo gene family. **Neuron**, v. 37, p. 765-773, 2003.

ZAFARI, M.; BEHMANESH, F.; MOHAMMADI, A. A. Comparison of the effect of fish oil and ibuprofen on treatment of severe pain in primary dysmenorrhea. **Caspian Journal of Internal Medicine**, v. 2, n. 3, p. 279-282, 2011.

ZAMPONI, G. W.; STRIESSNIG, J.; KOSCHAK, A.; DOLPHIN, A. C. The physiology, pathology, and pharmacology of voltage-gated calcium channels and their future therapeutic potential. **Pharmacological Reviews**, v. 67, n. 4, p. 821-870, 2015.

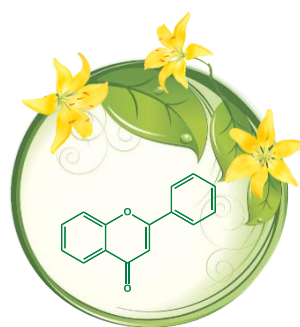
ZANNONI, L.; GIORGI, M.; SPAGNOLO, E.; MONTANARI, G.; VILLA, G.; SERACCHIOLI, R. Dysmenorrhea, absenteeism from school, and symptoms suspicious for endometriosis in adolescents. **Journal of Pediatric and Adolescent Gynecology**, v. 27, n. 5, p. 258-265, 2014.

ZHU, Y.; XIA, M.; YANG, Y.; LIU, F.; LI, Z.; HAO, Y.; MI, M.; JIN, T.; LING, W. Purified anthocyanin supplementation improves endothelial function via NO-cGMP activation in hypercholesterolemic individuals. **Clinical Chemistry**, v. 57, n. 11, p. 1524-1533, 2011.

YOUNG, S. A.; HURT, P. H.; BENEDEK, D. M.; HOWARD, R. S. Treatment of premenstrual dysphoric disorder with sertraline during the luteal phase: a randomized, double-blind, placebo-controlled crossover trial. **The Journal of Clinical Psychiatry**, v. 2, p. 76-80, 1998.

VIGOD, S. N.; FREY, B. N.; SOARES, C. N.; STEINER, M. Approach to premenstrual dysphoria for the mental health practitioner. **Psychiatric Clinics**, v. 33, n. 2, p. 257-272, 2010.

RAPKIN, A. J.; AKOPIANS, A. L. Pathophysiology of premenstrual syndrome and premenstrual dysphoric disorder. **Menopause International**, v. 18, n. 2, p. 52-59, 2012.



Anexa

Anexo 1- Cópia da certidão de aprovação do projeto na 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

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