



**Universidade Federal da Paraíba
Centro de Ciências da Saúde
Curso de Graduação em Farmácia**



Bárbara Cavalcanti Barros

**O óleo essencial de *Mesosphaerum suaveolens* (L.) Kuntze
(Lamiaceae) promove efeito tocolítico *in vitro* em rata por
modulação de receptores muscarínicos e canais de cálcio e de
potássio**

**João Pessoa-PB
2016**

Bárbara Cavalcanti Barros

O óleo essencial de *Mesosphaerum suaveolens* (L.) Kuntze (Lamiaceae) promove efeito tocolítico *in vitro* em rata por modulação de receptores muscarínicos, de canais de cálcio e de potássio

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Coordenação do Curso de Graduação em Farmácia, do Centro de Ciências da Saúde, da Universidade Federal da Paraíba, como parte dos requisitos para obtenção do **Grau de Bacharel em Farmácia**.

Orientadora: Profa. Dra. Bagnólia Araújo da Silva

**Colaboradores: Dr. Vicente Carlos de Oliveira Costa
Prof. Dr. Josean Fachine Tavares**

**João Pessoa-PB
2016**

I.

B277o Barros, Bárbara Cavalcanti.

O óleo essencial de *Mesosphaerum suaveolens* (L.) Kuntze (Lamiaceae) promove efeito tocolítico *in vitro* em rata por modulação de receptores muscarínicos, de canais de cálcio e de potássio / Bárbara Cavalcanti Barros. - - João Pessoa, 2016.

94f.: il. -

Orientadora: Bagnólia Araújo da Silva.

Colaboradores: Vicente Carlos de Oliveira Costa.

Josean Fechine Tavares.

Monografia (Graduação) – UFPB/CCS.

1. Hyptis. 2. *Mesosphaerum suaveolens*. 3. Efeito tocolítico. 4. Antagonismo pseudoirreversível.

Bárbara Cavalcanti Barros

O óleo essencial de *Mesosphaerum suaveolens* (L.) Kuntze (Lamiaceae) promove efeito tocolítico *in vitro* em rata por modulação de receptores muscarínicos e canais de cálcio e de potássio

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Coordenação do Curso de Graduação em Farmácia, do Centro de Ciências da Saúde, da Universidade Federal da Paraíba, como parte dos requisitos para obtenção do Grau de Bacharel em Farmácia.

Aprovado em 25/11/2016

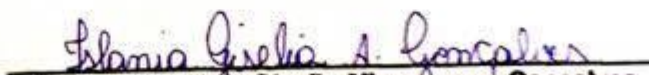
Banca Examinadora



**Prof. Dra. Bagnólia Araújo da Silva
(Universidade Federal da Paraíba)
Orientadora**



**Prof. Dr. Rafael de Almeida Travassos
(Universidade Federal da Paraíba)
Examinador Externo**



**Prof. Dra. Isâmia Gisélia Albuquerque Gonçalves
(Universidade Federal da Paraíba)
Examinadora Interna**

Dedicatórias

À Elzí Cavalcanti Barros e Manoel Ferreira Barros Filho, por não medirem esforços e sempre acreditarem nos meus sonhos, além de me darem todo o apoio ainda que nem eu acreditasse que esse sonho seria possível e pela família que me proporcionaram.

As minhas irmãs Lucianna Cavalcanti Barros Nascimento e Emanuella Cavalcanti Barros, por todo apoio, incentivo e por acreditarem em mim e à minha querida irmã gêmea Bruna Cavalcanti Barros Rodrigues por ser meu porto seguro em todos os momentos de minha vida, por me escutar sempre e me ajudar a conquistar esse sonho, sem você nada disso seria possível.

Aos meus sobrinhos, Marya Eduarda Cavalcanti, João Guilherme Cavalcanti Barros Nascimento e Pedro Henrique Cavalcanti Barros Nascimento, pelas alegrias e por renovarem as minhas forças diante das batalhas da vida.

Ao meu companheiro Tadeu Garcia de Araújo Silva, por todo apoio e compreensão em momentos de ausência.

Agradecimientos

Acredito que nada acontece sem a permissão divina, então inicialmente agradeço a Deus, por ser meu porto seguro e permitir a realização desse sonho, por me dar forças para continuar quando por muitas vezes pensei em desistir, por guiar minhas escolhas para eu chegar aonde cheguei.

À minha orientadora Bagnólia Araújo da Silva, por acreditar em mim e aceitar me orientar, por ser um exemplo de profissional. Por todos os ensinamentos durante os anos de convivência e por fazer meus olhos brilharem na farmacologia. Agradeço ainda pela conversa na coordenação, muito antes de ser minha orientadora, o que me encorajou a não desistir e a voltar a buscar esse sonho.

À Profa. Dra. Fabiana de Andrade Cavalcante, por estar sempre disposta a ajudar e a esclarecer as dúvidas, pelos ensinamentos durante esses anos de laboratório e por ser um exemplo de profissional.

Ao professor doutor Josean Fachine Tavares e ao doutor Vicente Carlos de Oliveira Costa por cederem o óleo essencial para a realização desse trabalho.

Aos professores doutores Islania Giselia Albuquerque Gonçalves do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Paraíba (UFPB) e Rafael de Almeida Travassos do Centro de Biotecnologia da UFPB, pela disponibilidade em participar da banca, agradeço pelas contribuições a este trabalho e por aceitarem fazer parte desse importante momento da minha formação.

A todos os professores do Curso de Graduação em Farmácia, em especial a: Adalberto Coelho, Alba Caiaffo, Bagnólia Araújo, Fábio Santos, Francisca Inês, João Vianney, Leônia Batista, Robson Veras e Suelma de Fátima Bruns, por serem exemplos de bons profissionais para curso de Farmácia.

À Iara Leão Luna de Souza por toda paciência, pelos ensinamentos durante a iniciação científica e realização desse trabalho, por todos os momentos de alegrias e por tornar os dias de experimentos mais leves com a sua presença, você além de uma colega profissional se tornou uma amiga, és “a melhor do mundo”.

Às doutorandas Paula Benvindo Ferreira e Maria da Conceição Correia Silva, por todo o apoio durante os experimentos e estarem sempre dispostas a sanar as dúvidas que surgiam na realização desse trabalho, sem vocês a realização desse sonho não seria possível.

Ao doutorando Luiz Henrique César Vasconcelos, pelos momentos de descontração e por toda ajuda durante os anos de iniciação científica.

À Giuliana Amanda de Oliveira, uma das pessoas mais íntegras e sensatas que já conheci durante toda a minha vida, obrigada por tantos momentos de conversas, risadas, choros, poder contar com você foi essencial e deixou os dias mais leves, quero levar a sua amizade para o resto da minha vida.

Aos queridos Alana Cristina Costa, Antônio Raphael Lima de Farias Cavalcanti Silva, Filipe Rodolfo Moreira Borges de Oliveira, Indyra Alencar Duarte Figueiredo, Luiz Henrique Agra Cavalcante Silva, Maria da Conceição Correia Silva e Sarah Rebeca Dantas Ferreira por toda ajuda, amizade e companheirismo.

Aos demais da equipe os "relaxados" que fazem ou fizeram parte do Laboratório de Farmacologia Funcional Prof. George Thomas do PPgPNSB: Aline de Freitas, Ana Caroline de Lima, Elba Ferreira, Giulyane Targino, Italo Rossi, Joedna Cavalcante, José Lucas Galvão, Kimã Barbosa, Layanne Cabral, Luan Diniz, Millena Medeiros, Rafael Lima, Rayane Fernandes, Renata Sampaio, Thaynan Carvalho e Thiago Melo por toda ajuda, amizade, convivência, apoio científico e de bancada.

A turma de Farmácia 2016.1 "Profa. Daniele Idalino Janebro" pelos bons momentos ao longo da graduação e em especial aqueles que se destacaram durante esses anos de curso, Ana Júlia de Moraes Santos Oliveira, Emmanuel Melquiades, Esliá Maria Nunes, Filipe Rodolfo Moreira Borges de Oliveira, Jessica Rocha, Rayanne Hellen do Nascimento Silva, Ricardo Aurélio, Thalitha Luanna e Wanessa Juliany.

As minhas queridas "Bitelas" Ana Júlia de Moraes Santos Oliveira e Rayanne Hellen do Nascimento Silva, obrigada pelas conversas, conselhos, brigas, por estarem presentes nos bons e maus momentos, isso serviu para consolidar uma amizade que quero levar para o resto da minha vida, amo vocês.

Ao querido Emmanuel Melquiades por todos os momentos, por sempre ter um ombro amigo, por me incentivar a buscar meus sonhos e por todos os momentos de descontração, sua amizade é muito importante.

Ao meu primo-irmão Moisés Rodrigues Cavalcanti por ser peça chave e fundamental para realização desse sonho, por sempre me alegrar naqueles momentos difíceis em que o cansaço e a saudade de casa falavam mais alto, pela boa convivência de sempre e por acreditar em mim.

A minha família, em especial meus pais Elzí Cavalcanti Barros e Manoel Ferreira Barros Filho, as minhas irmãs Lucianna Cavalcanti Barros Nascimento, Emanuella Cavalcanti Barros e Bruna Cavalcanti Barros Rodrigues, minhas tias Elza

Cavalcanti de Oliveira e Eva Cavalcanti de Oliveira por todo apoio e incentivo, a minha avó Maria de Lima Cavalcanti por me acolher na sua casa e por ser um colo quando a saudade de casa apertava.

Ao meu marido Tadeu Garcia de Araújo da Silva, por torcer e apoiar minhas decisões, pela companhia durante esses anos de convivência e pelo colo consolador, te amo.

A José Crispim Duarte, Luís C. Silva e Adriano S. Cordeiro pelo auxílio técnico ao laboratório e ao Biotério Prof. Thomas George, possibilitando a realização dos nossos experimentos.

À Mônica R. da Silva, pelo seu trabalho na limpeza e apoio necessário.

À Sra. Luzinete, pelo trabalho na limpeza de material e equipamentos úteis no dia a dia do laboratório.

A Universidade Federal da Paraíba e o Centro de Ciências da Saúde pelo apoio estrutural e institucional.

A todos que, de maneira direta ou indireta, contribuíram para a realização desse sonho.

Muito obrigada,

Bárbara Cavalcanti Barros

“Há um tempo em que é preciso abandonar as roupas usadas, que já tem a forma do nosso corpo, e esquecer os nossos caminhos, que nos levam sempre aos mesmos lugares. É o tempo da travessia: e, se não ousarmos fazê-la, teremos ficado, para sempre, à margem de nós mesmos.”

(Fernando Teixeira de Andrade)

Resumo

Resumo

A espécie do gênero *Mesosphaerum* da família Lamiaceae, *Mesosphaerum suaveolens*, é usada popularmente para problemas digestivos e alívio de cólicas menstruais. Das folhas da espécie foi extraído o óleo essencial (MS-OE) e diante disso, objetivou-se realizar uma triagem farmacológica preliminar e investigar o mecanismo de ação tocolítico do óleo essencial de *Mesosphaerum suaveolens* em ratas virgens. Os cornos uterinos eram suspensos em cubas de banho para órgãos isolados, sob condições apropriadas, sendo as contrações isotônicas e isométricas monitoradas adequadamente. Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)/UFPB (nº 088/2016). MS-OE antagonizou de maneira dependente de concentração as contrações fásicas induzidas por 10^{-5} M de carbacol (CCh) ($CI_{50} = 19,0 \pm 1,3$ µg/mL, $n = 5$), apresentando um E_{max} de 100% na concentração de 81 µg/mL e por 10^{-2} UI/mL de ocitocina ($CI_{50} = 33,8 \pm 4,7$ µg/mL, $n = 5$) apresentando um E_{max} de 100% , na concentração de 243 µg/mL. A partir disso decidiu-se investigar o mecanismo de ação tocolítica do MS-OE e este inibiu as curvas concentrações-respostas cumulativas ao CCh, desviando-as para direita de forma não paralela e com redução do E_{max} , sugerindo um antagonismo não competitivo do tipo pseudoirreversível dos receptores muscarínicos, além de relaxar de maneira equipotente o útero pré-contraído com KCl 60 mM e ocitocina 10^{-2} UI/mL ($CE_{50} = 15,0 \pm 2,6$ e $20,2 \pm 0,8$ µg/mL, respectivamente). Como um passo comum na via de sinalização destes agentes contráteis são os canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem (Ca_V) decidiu-se investigar se o MS-OE estaria impedindo o influxo de Ca^{2+} . O MS-OE antagonizou as curvas concentrações-respostas cumulativas ao $CaCl_2$ em meio despolarizante nominalmente sem Ca^{2+} além de relaxar o útero pré-contraído com 3×10^{-7} M de S(-)-Bay K8644, um agonista dos Ca_V1 indicando uma possível inibição do influxo de Ca^{2+} através dos Ca_V1 . Sabendo-se que os canais de K^+ desempenham um papel importante na regulação do potencial de membrana e modulam os Ca_V , decidiu-se investigar a participação desses canais no efeito tocolítico do MS-OE. A potência do MS-OE ($CE_{50} = 20,2 \pm 0,8$ µg/mL) foi reduzida em aproximadamente 1,5 vezes na presença de CsCl ($CE_{50} = 32,2 \pm 2,0$ µg/mL), bloqueador não seletivo dos canais de K^+ , sugerindo assim a participação dos canais de K^+ no efeito tocolítico do MS-OE. Com base nisso, respalda-se o uso popular de *Mesosphaerum suaveolens* para tratar distúrbios uterinos e conclui-se que o efeito tocolítico do MS-OE ocorre, pelo menos em parte por um antagonismo não competitivo do tipo pseudoirreversível dos receptores muscarínicos, além de bloquear os Ca_V1 e modular positivamente/ativar os canais de K^+ , porém são necessários outros estudos para esclarecer como esse óleo modula esses canais que estão envolvidos neste efeito.

Palavras-chave: *Hyptis*, *Mesosphaerum suaveolens*, efeito tocolítico, antagonismo pseudoirreversível.

Abstract

Abstract

The specie from *Mesosphaerum* genus of Lamiaceae family, *Mesosphaerum suaveolens*, is popularly used for digestive disorders and to relief menstrual cramps. From the leaves of this species, the essencial oil (MS-EO) was extracted and, thus, we aimed to perform a pharmacological screening and to investigate the mechanism of action of the essencial oil from *Mesosphaerum suaveolens* in virgin rats. Then, uterine horns were suspended in orghan baths, under appropriate conditions, and isotonic and isometric contractions were monitored. All experimental procedures were approved by Ethical Comitee on Animal Use (CEUA)/UFPB (nº 088/2016). MS-EO antagonized, in a concentration dependente manner, phasic contractions induced by carbachol (CCh) 10^{-5} M ($IC_{50} = 19.0 \pm 1.3 \mu\text{g/mL}$, $n = 5$), presenting E_{max} value of 100% in the concentration of $81 \mu\text{g/mL}$, and by oxytocin 10^{-2} IU/mL ($IC_{50} = 33.8 \pm 4.7 \mu\text{g/mL}$, $n = 5$), showing E_{max} value of 100% in the concentration of $243 \mu\text{g/mL}$. Besides that, we decided to investigate the mechanism of tocolytic action of MS-EO, and it inhibited the cumulative concentration-response curves to CCh, rightward sifting them in a non parallel manner, with reduction on E_{max} , sugesting a pseudo-irreversible non-competitive antagonism of muscarinic receptors, in addition to relaxing, in an equipotente manner, the utherus pre-contracted by either KCl 60 mM or oxytocin 10^{-2} IU/mL ($EC_{50} = 15.0 \pm 2.6$ and $20.2 \pm 0.8 \mu\text{g/mL}$, respectively). As the common step in the pathway of both contractile agents is the opening of voltage-sensitive Ca^{2+} channels (Ca_v), we decided to assess the probably inhibitory effect of SM-EO on Ca^{2+} influx. MS-EO antagonized the cumulative concentration-response curves to $CaCl_2$, in depolarizing médium nominally Ca^{2+} -free, besides relaxed the utherus pre-contracted by the Ca_v -1 agonist S-(-)-Bay K8644 3×10^{-7} M, indicating a possible attenuation of Ca^{2+} influx through Ca_v1 . Since that K^+ channels have an essential role in regulating the potential membrane and that they modulate Ca_v , we decided to investigate the involvement of these channels in the tocolytic effect of MS-EO. The potency of MS-EO ($EC_{50} = 20.2 \pm 0.8 \mu\text{g/mL}$) was about 1.5-fold reduced in the presence of CsCl ($EC_{50} = 32.2 \pm 2.0 \mu\text{g/mL}$), an inespecific blocker of K^+ channels, confirming the participation of these channels in the tocolytic effect of MS-EO. Therefore, in this work we support the popular use of *Meshosphareum suaveolens* for uterine disorders and we concluded that the tocolytic effect of MS-EO in rat occurs, at least in part by pseudo-irreversible non competitive antagonism type of muscarinic receptors, in addition to the blockade of Ca_v1 and positive modulation/activation of K^+ channels. However, there is the need of additional studies to better understand how the essencial oil modulates these channels and confirm the subtypes of K^+ channels related to this effect.

Keywords: *Hyptis*, *Mesosphaerum suaveolens*, tocolytic effect, pseudo-irreversible antagonism.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Mapa de distribuição da família Lamiaceae no mundo.....	26
Figura 2 – Espécie <i>Mesosphaerum suaveolens</i> (L.) Kuntze	29
Figura 3 – Anatomia do útero de rata	31
Figura 4 – Esquema do acoplamento eletromecânico da contração muscular lisa pelo aumento da concentração extracelular de K^+	32
Figura 5 – Esquema do mecanismo farmacomecânico da contração no músculo liso pela ativação da via $G_{q/11}$ -PLC β_1	34
Figura 6 – Esquema do mecanismo farmacomecânico do relaxamento no músculo liso pela ativação da via G_s /AC/PKA e NO/sGC/PKG	36
Figura 7 – Registros representativos do efeito tocolítico do MS-OE sobre as contrações tônicas induzidas por 60 mM de KCl (A) e por 10^{-2} UI/mL de ocitocina (B) em útero isolado de rata.....	54
Figura 8 – Registros representativos do efeito tocolítico do MS-OE sobre as contrações tônicas induzidas por 60 mM de KCl (A) e por 3×10^{-7} M de S-(-)-Bay K8644 (B) em útero isolado de rata	59
Figura 9 – Registros representativos do efeito tocolítico do MS-OE sobre as contrações tônicas induzidas por 10^{-2} UI/mL de ocitocina na ausência (A) e na presença (B) de 5 mM de CsCl em útero isolado de rata	62

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1** – Efeito do MS-OE frente às contrações fásicas induzidas por 10^{-5} M de CCh (A) e 10^{-2} UI/mL de ocitocina (B) em útero isolado de rata.....50
- Gráfico 2** – Curvas concentrações-resposta cumulativas ao CCh (A) na ausência (●) e na presença de 9 (○), de 27 (■), de 81 (□) e de 243 $\mu\text{g/mL}$ (▲) do MS-OE em útero isolado de rata.....52
- Gráfico 3** – Efeito tocolítico do MS-OE sobre as contrações tônicas induzidas por 60 mM de KCl (●) e por 10^{-2} UI/mL de ocitocina (○) em útero isolado de rata55
- Gráfico 4** – Curvas concentrações-resposta cumulativas ao CaCl_2 em meio despolarizante (KCl 60 mM) nominalmente sem Ca^{2+} na ausência (controle) (●) e na presença de 27 (○); de 81 (■) e de 243 $\mu\text{g/mL}$ (□) do MS-OE em útero isolado de rata..... 57
- Gráfico 5** – Efeito tocolítico do MS-OE sobre as contrações tônicas induzidas por 60 mM de KCl (●) e por 3×10^{-7} M de S-(-)-Bay K8644 (□) em útero isolado de rata60
- Gráfico 6** – Efeito tocolítico do MS-OE sobre as contrações tônicas induzidas por 10^{-2} UI/mL de ocitocina na ausência (○) e na presença (■) de 5 mM de CsCl em útero isolado de rata.....63

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Valores de E_{max} e de CI_{50} do MS-OE frente às contrações fásicas induzidas por 10^{-5} M de CCh e por 10^{-2} UI/mL de ocitocina em útero isolado de rata	50
Tabela 2 – Valores de E_{max} e de CE_{50} do carbacol na ausência (controle) e na presença de 9, 27, 81 e 243 μ g/mL do MS-OE, em útero isolado de rata.....	52
Tabela 3 – Valores de E_{max} e de CE_{50} do MS-OE sobre as contrações tônicas induzidas por 60 mM de KCl e por 10^{-2} UI/mL de ocitocina em útero isolado de rata.....	55
Tabela 4 – Valores de E_{max} e de CE_{50} do $CaCl_2$ na ausência (controle) e na presença de 27, 81 e 243 μ g/mL do MS-OE em útero isolado de rata	57
Tabela 5 – Valores de E_{max} e de CE_{50} do MS-OE sobre as contrações tônicas induzidas por 60 mM de KCl e por 3×10^{-7} M de S-(-)-Bay K8644 em útero isolado de rata.....	60
Tabela 6 – Valores de E_{max} e de CE_{50} do MS-OE sobre as contrações tônicas induzidas por 10^{-2} UI/mL de ocitocina na ausência (○) e na presença (■) de 5 mM de CsCl em útero isolado de rata.....	63

LISTA DE ABREVIATURAS

Ca²⁺₄-CaM	complexo cálcio-calmodulina
[Ca²⁺]_c	concentração citosólica de Ca ²⁺
[K⁺]_e	concentração extracelular de potássio
AC	ciclase de adenilil
ACh	acetilcolina
ANOVA	análise de variância
ATP	trifosfato de adenosina
CaM	calmodulina
cAMP	monofosfato cíclico de adenosina
Ca_v	canais de Ca ²⁺ dependentes de voltagem
Ca_v1	Ca _v da família 1
CE₅₀	concentração de uma droga que promove 50% de seu efeito máximo
cGMP	monofosfato cíclico de guanosina
CICR	liberação de Ca ²⁺ induzida pelo Ca ²⁺
CsCl	cloreto de céσιο
DAG	diacilglicerol
e.p.m.	erro padrão da média
E_{max}	efeito máximo
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
IP₃	1,4,5-trifosfato de inositol
IP₃R	receptor de IP ₃
M₃	receptor muscarínico da ACh do subtipo 3
MLC	cadeia leve da miosina
MLCK	cinase da MLC
MLCP	fosfatase da MLC
MS-OE	óleo essencial de <i>Mesosphaerum suaveolens</i> (L.) Kuntze
MYPT1	subunidade catalítica da MLCP
NCX	trocador sódio/cálcio
NO	óxido nítrico
NOS	sintase do NO
OT	receptor da ocitocina
PIP₂	4,5-bisfosfato de fosfatidilinositol
PKA	proteína cinase dependente de cAMP
PKC	proteína cinase dependente de Ca ²⁺
PKG	proteína cinase dependente de cGMP
PLCβ₁	fosfolipase C isoforma beta 1
PMCA	Ca ²⁺ -ATPase da membrana plasmática
R²	coeficiente de correlação não linear
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
RS	retículo sarcoplasmático
RyR	receptor de rianodina
SERCA	Ca ²⁺ -ATPase do retículo endo-sarcoplasmático
sGC	ciclase de guanilil solúvel

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

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	23
1.1 Produtos naturais e fitoterapia no Brasil.....	24
1.2 A família Lamiaceae.....	26
1.3 O gênero <i>Mesosphaerum</i> e a espécie <i>Mesosphaerum suaveolens</i>	29
1.4 Fisiologia da contração e do relaxamento do músculo liso	30
2 OBJETIVOS	39
2.1 Geral.....	40
2.2 Específicos	40
3 MATERIAL E MÉTODOS	41
3.1 Material.....	42
3.1.1 Produtos-teste	42
3.1.2 Animais.....	42
3.1.3 Drogas e reagentes	42
3.1.4 Solução nutritiva	43
3.1.5 Aparelhos	43
3.2 Métodos.....	44
3.2.1 Preparo das soluções-estoque dos óleos essenciais.....	44
3.2.2 Triagem farmacológica	44
3.2.2.1 Avaliação do efeito do MM-OE, SM-OE e MS-OE frente às contrações fásicas induzidas por ocitocina ou por carbacol em útero isolado de rata.....	44
3.2.3 Investigação do mecanismo de ação tocolítica do MS-OE em rata	45
3.2.3.1 Característica do antagonismo do MS-OE da contração induzida por carbacol.....	45
3.2.3.2 Avaliação do efeito tocolítico do MS-OE sobre as contrações tônicas induzidas por KCl ou por ocitocina	46
3.2.3.3 Avaliação da participação dos canais de cálcio dependentes de voltagem no efeito tocolítico do MS-OE em rata.....	46
3.2.3.3.1 Avaliação do efeito tocolítico do MS-OE frente às contrações induzidas por CaCl ₂ em meio despolarizante nominalmente sem Ca ²⁺	46
3.2.3.3.2 Avaliação do efeito tocolítico do MS-OE frente às contrações induzidas por S-(-)-Bay K8644	47
3.2.3.4 Avaliação da participação dos canais de potássio no efeito tocolítico do MS-OE em rata	47

3.2.3.4.1 Avaliação do efeito do MS-OE sobre as contrações tônicas induzidas por ocitocina na ausência e na presença de CsCl.....	47
3.3 Análise estatística	48
4 RESULTADOS	49
4.1 Triagem farmacológica	50
4.1.1 Avaliação do efeito do MM-OE, SM-OE e MS-OE frente às contrações fásicas induzidas por ocitocina ou por carbacol em útero isolado de rata.....	51
4.2.2 Investigação do mecanismo de ação tocolítica do MS-OE em rata	52
4.2.2.1 Característica do antagonismo do MS-OE da contração induzida por carbacol.....	52
4.2.2.2 Avaliação do efeito tocolítico do MS-OE sobre as contrações tônicas induzidas por KCl ou por ocitocina	54
4.2.2.3 Avaliação da participação dos canais de cálcio dependentes de voltagem no efeito tocolítico do MS-OE em rata.....	57
4.2.2.3.1 Avaliação do efeito tocolítico do MS-OE frente às contrações induzidas por CaCl ₂ em meio despolarizante nominalmente sem Ca ²⁺	57
4.2.2.3.2 Avaliação do efeito tocolítico do MS-OE frente às contrações induzidas por S-(-)-Bay K8644	59
4.2.2.4 Avaliação da participação dos canais de potássio no efeito tocolítico do MS-OE em rata	62
4.2.2.4.1 Avaliação do efeito do MS-OE sobre as contrações tônicas induzidas por ocitocina na ausência e na presença de CsCl.....	62
5 DISCUSSÃO	65
6 CONCLUSÕES	74
REFERÊNCIAS	76
ANEXOS	91
Anexo 1 – Cromatograma de CG-EM do óleo essencial de <i>Mesosphaerum suaveolens</i> (L.) Kuntze (Lamiaceae).....	92
Anexo 2 - Tabela dos constituintes químicos presentes no óleo essencial das folhas de <i>Mesosphaerum suaveolens</i> (L.) Kuntze (Lamiaceae).	93
Anexo 3 - Certidão de aprovação do projeto na Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFPB).	94

1 Introdução

1.1 Produtos naturais e fitoterapia no Brasil

Os produtos naturais desempenham um papel muito importante no processo de descoberta e de desenvolvimento de drogas (NEWMAN; CRAGG, 2016), podendo ser oriundos de micro-organismos, plantas, organismos marinhos, anfíbios, entre outros animais (JONH, 2010). Estima-se que 65-80% da população mundial faz uso de produtos naturais na busca do alívio ou da cura de doenças há várias décadas (VIEGAS-JÚNIOR; BOLZANI; BARREIRO, 2006; AGRA; FREITAS; BARBOSA-FILHO, 2007).

O mundo possui uma grande biodiversidade, sendo a maioria desconhecida do ponto de vista científico, onde entre 250-500 mil, poucas espécies dispõem de estudos fitoquímicos e uma porcentagem ainda menor avalia os aspectos biológicos (NEWMAN; CRAGG, 2012).

Em uma vasta análise de novos fármacos inseridos no mercado entre 1981 e 2014, somente 35% das 1211 novas moléculas químicas podem ser classificadas como sintéticas. Em contrapartida, observa-se mais de uma centena de compostos derivados de produtos naturais em fase de testes clínicos, além de 18 drogas derivadas de produtos naturais, que foram aprovadas para a utilização clínica entre 1981 e 2011 (BUTLER, 2008; NEWMAN; CRAGG, 2016).

Com base nisso, nas últimas décadas tem-se notado um grande avanço científico envolvendo os estudos químicos e farmacológicos de plantas medicinais na busca de novos compostos com propriedades terapêuticas (MALAQUIAS et al., 2014). Nesse contexto, destaca-se o Brasil, por apresentar um forte potencial, devido a enorme biodiversidade, para a descoberta e o para desenvolvimento de medicamentos oriundos de produtos naturais (COSTA-LOTUFO et al., 2010).

Dessa forma, o governo federal, em junho de 2006, aprovou o Decreto 5.813 que estabelece a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos, a qual determina diretrizes e linhas prioritárias para o desenvolvimento de ações voltadas à garantia do acesso seguro e ao uso racional de plantas medicinais e fitoterápicos no Brasil. Além disso, estabelece o desenvolvimento de tecnologias, de inovações e o fortalecimento das cadeias e dos arranjos produtivos, ao uso sustentável da biodiversidade brasileira e desenvolvimento do Complexo Produtivo da Saúde (BRASIL, 2006).

Anos mais tarde foi redigida a Resolução de Diretoria Colegiada (RDC) nº 26 de 13 de maio de 2014, que diferencia medicamento fitoterápico de produto tradicional fitoterápico, sendo o primeiro obtido empregando-se exclusivamente matérias-primas ativas vegetais, o qual a eficácia e a segurança são validadas por evidências clínicas que sejam caracterizados pela constância de sua qualidade. Com relação ao produto tradicional fitoterápico, esse também deve ser oriundo exclusivamente de matérias-primas ativas vegetais, porém sua segurança e eficácia devem ser baseadas em dados publicados na literatura técnico-científica e que sejam concebidos para serem utilizados sem a vigilância de um médico para fins de diagnóstico, de prescrição ou de monitoramento (BRASIL, 2014).

Assim, os produtos tradicionais fitoterápicos não podem ser utilizados para tratar doenças, distúrbios, condições ou ações consideradas graves, nem conter matérias-primas em concentração de risco tóxico conhecido ou serem administrados pelas vias injetável e/ou oftálmica. Outrossim, é importante destacar que não são considerados medicamentos ou produto tradicional fitoterápico aqueles que, na sua composição, inclua substâncias ativas isoladas, de qualquer origem, nem as associações destas com extratos vegetais (BRASIL, 2014).

As principais classes terapêuticas de medicamentos fitoterápicos mais comercializadas no Brasil são indicadas como psicolépticos (sedativos, ansiolíticos e antidepressivos), antivaricosos, anti-hemorroidários, auxiliares digestivos e hepáticos, tônicos, laxantes, descongestionantes, antigripais, para auxiliar na circulação cerebral e antiespasmódicos (VALEZE; BRENZAN, 2011). No Brasil, as especialidades farmacêuticas mais comercializadas são o Tebonin[®] e o Tanakan[®] (*Ginkgo biloba*) indicados para distúrbios vestibulares e cerebrais, o Laitan[®] (*Piper methysticum*) indicado como ansiolítico (SCHULZ; HANSEL; TYLER, 2002) e o Acheflan[®] (*Cordia verbenacea* DC.) indicado como anti-inflamatório de uso tópico (HENRIQUE; SIMÕES-PIRES; APEL, 2009; BEZERRA et al., 2015).

Além disso, a utilização de plantas medicinais pela população é uma alternativa terapêutica econômica (LUSA, 2010). Entretanto, são necessários estudos que visem respaldar os conhecimentos etnomedicinais, assim como o estudo de espécies da família Lamiaceae, que são usadas popularmente no tratamento ou alívio de sintomas relacionados a diversas doenças (BASÍLIO et al., 2006)

1.2 A família Lamiaceae

Entre a biodiversidade das plantas medicinais, encontra-se a família Lamiaceae, que é uma das maiores famílias de Angiospermas. Apresenta aproximadamente 258 gêneros e 7.193 espécies, difundida em todo o mundo e no Brasil possui em média 23 gêneros e 232 espécies nativas. Possui uma distribuição cosmopolita, ocorrendo principalmente em savanas abertas e regiões montanhosas de clima tropical a subtropical (Figura 1) (TRINDADE et al., 2016).

Figura 1 – Mapa de distribuição da família Lamiaceae no mundo.



Fonte: adaptado de <http://www.tropicos.org>. Acesso em 01 de novembro de 2016.

Espécies dessa família apresentam uma composição muito rica em óleos essenciais (YUNES; CECHINEL-FILHO, 2009) e a literatura descreve a utilização de diferentes partes das plantas de várias espécies dessa família para cura/alívio de diversos agravos da saúde (Quadro 1).

Quadro 1 – Espécies da família Lamiaceae utilizadas popularmente.

Espécie	Parte da planta	Uso popular	Referência
<i>Hyptis suaveolens</i> (L.) Poit. ¹	Raízes	Propriedades estomacais	MUKHERJEE et al., 1984
	Flores	Doenças respiratórias, digestão e dor de cabeça	AGRA et al., 2008
<i>Hyptis verticillata</i> Jacq. ²	Planta inteira	Dor de cabeça, estômago e desordens gastrintestinais	ROJAS et al., 1992
<i>Hyptis pectinata</i> (L.) Poit. ³	Não informado	Antibacteriana, antimicótica e antitussígena	MALAN et al., 1989
	Flores	Asma, tosse, bronquite e doenças do fígado	AGRA et al., 2008
<i>Hyptis martiusii</i> Benth. ⁴	Folhas	Doenças intestinais e estomacais	AGRA et al., 2008
	Raízes	Inflamação dos ovários	
<i>Hyptis macrostachys</i> Benth. ⁵	Folhas	Asma, tosse e bronquite	AGRA et al., 2008
<i>Hyptis umbrosa</i> Salzm. ex. Benth. ⁶	Folhas	Doenças articulares, estomacais e expectorante	AGRA et al., 2008

Sinonímias: 1 = *Mesosphaerum suaveolens*; 2 = *Condea verticillata*; 3 = *Mesosphaerum pectinatum*; 4 = *Medusantha martiussi*. 5 = *Leptohyptis macrostachys*; 6 = *Mesosphaerum sidifolium*

Além disso, diversas atividades farmacológicas são relatadas para espécies da família Lamiaceae como atividade hipotensora do óleo essencial das folhas de *Hyptis fruticosa* (SANTOS et al., 2007), anti-hiperglicêmica do extrato das folhas de *Hyptis suaveolens* (MISHRA et al., 2011), espasmogênica em óleo de cobaia para o extrato de *Plectranthus barbatus* (BHAKUNI et al., 1970), antioxidante e antimicrobiana para o óleo essencial de *Melissa officinalis* (MIMICA-DUKIE et al.,

2004), inseticida para o óleo essencial de *Ocimum selloi* (PAULA et al., 2003), espasmogênica em células de miométrio humano grávido do óleo essencial das folhas de *Hyptis suaveolens* (ATTAH et al., 2012) e atividade antidiarreica em camundongos e espasmolítica do extrato etanólico bruto das partes aéreas de *Hyptis macrostachys* (VASCONCELOS, 2011; SOUZA et al., 2013).

Recentemente, a família Lamiaceae passou por mudanças em sua nomenclatura, relacionadas à delimitação e reorganização dos seus constituintes, a partir de estudos filogenéticos, morfológicos e moleculares, sendo incorporados gêneros da família Verbenaceae. Além disso, espécies do gênero *Hyptis* foram relocadas em outros gêneros, a exemplo de *Hyptis martiussi* (Benth.) agora inserida no gênero *Medusantha* intitulada atualmente de *Medusantha martiussi* (Benth.) e *Hyptis pectinata* *Hyptis umbrosa* Salzm ex Benth. e *Hyptis suaveolens* (L.) Poit. agora pertencentes ao gênero *Mesosphaerum* e denominadas atualmente de *Mesosphaerum pectinatum* (L.) Kuntze, *Mesosphaerum sidifolium* (L'Hérit) e *Mesosphaerum suaveolens* (L.) (HARLEY; PASTORE, 2012; PORTE; GODOY, 2001; HARLEY, 2012; SILVA-LUZ et al., 2012).

1.3 O gênero *Mesosphaerum* e a espécie *Mesosphaerum suaveolens*

O gênero *Mesosphaerum* é composto especialmente por espécies antes pertencentes ao gênero *Hyptis*. Esse gênero é composto por 25 espécies, distribuídas principalmente nos Andes até regiões montanhosas da América Central e México (SILVA-LUZ et al., 2012).

Este gênero é rico em espécies de grande importância econômica, etnofarmacológica e fortemente aromáticas. No nordeste do Brasil são popularmente usadas na forma de infuso, decocto e cigarro, sendo indicadas no tratamento de várias doenças relacionadas às vias respiratórias, trato gastrintestinal e sistema reprodutor feminino, sendo amplamente comercializadas nas feiras livres (BASÍLIO et al., 2006).

Com base nisso, destaca-se a espécie *Mesosphaerum suaveolens*, é considerada como uma erva daninha na África, porém em outros países, é usada também no tratamento de doenças respiratórias, febre, problemas digestivos, dores de dentes e de cabeça e dismenorreia (AGRA et al., 2008; LORENZI; ABREU MATOS, 2008).

A espécie *Mesosphaerum suaveolens* (L.) Kuntze. é conhecida popularmente como “alfazema-de-caboclo” (Figura 2), sendo encontrada na América Tropical e Ásia. No Brasil, distribui-se amplamente, ocorrendo em todas as regiões, exceto no Sul (SILVA-LUZ et al., 2012).

São relatadas atividades farmacológicas para essa espécie, como antimicrobiana (CHUKWUJEKWU et al., 2005), hepatoprotetora, citoprotetora (GHAFARI et al., 2012) e antidiarreica (SHAIKAT; HOSSAIN; AZAM, 2012) para o extrato de suas folhas, bem como atividade anti-inflamatória (GRASSI et al., 2006), gastroprotetora (ARZAVE et al., 2012), antinociceptiva, neuroprotetora (GHAFARI et al., 2014) e espasmogênica (ATTAH et al., 2012) para o óleo essencial de suas folhas.

O óleo essencial das folhas de *M. suaveolens* foi obtido por hidrodestilação e analisado em CG-EM possibilitando a identificação de 25 compostos, sendo o eucaliptol (35,86%), o exo-fenchol (6,42%), o γ -cadineno (6,35%), o 3-careno (5,94%), o biciclogermacreno (5,54%) e o β -pineno (4,98%) os de maior percentagem na mistura complexa, esses dados estão de acordo com os dados da literatura (PEREIRA, 2014) (Anexos 1 e 2).

Figura 2 – Espécie *Mesosphaerum suaveolens* (L.) Kuntze.



Fonte: tropicos.org/Image/100282269. Acesso em 05 de março de 2016.

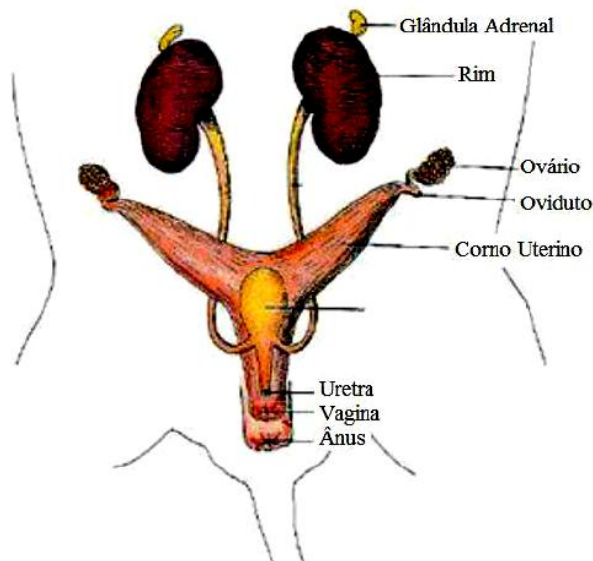
1.4 Fisiologia da contração e do relaxamento do músculo liso

Uma vez que o músculo liso compõe as paredes de vários órgãos ocos como, vasos sanguíneos, vias aéreas, intestino e útero (TORTORA; DERRICKSON, 2009), a desregulação nos processos de contração e de relaxamento deste músculo pode acarretar vários processos fisiopatológicos como disfunção erétil, hipertensão, diarreia, constipação, cólicas uterinas, dismenorreia e complicações durante o parto (WEBB 2003; SHMYGOL, WRAY 2004). Ensaio farmacológicos realizados nesse tipo de músculo que visem o desenvolvimento de fármacos ou de ferramentas farmacológicas são de grande importância.

O útero humano é um órgão muscular piriforme de paredes espessas e musculares, normalmente situado entre a bexiga urinária e o reto. Mede cerca de 7 cm de comprimento e 5 cm de largura, porém no período gestacional, ele se adapta em tamanho e estrutura às necessidades de crescimento do feto (JACOB; FRANCONI; LOSSOW, 1990). Esse órgão é dividido morfológicamente em três seções: o colo do útero, o istmo e o corpo uterino, composto por três camadas distintas: uma externa (perimétrio), uma intermediária (miométrio) e uma interna (endométrio) (DAVILA; ESTRADA, 2015).

O perimétrio é responsável pelo revestimento epitelial do órgão, já o miométrio é a camada mais espessa e compõe-se de fibras musculares lisas entrelaçadas e envoltas em tecido conjuntivo organizado em camadas indefinidas. Tal organização é responsável pelas contrações que ocorrem em diferentes direções. O endométrio é constituído pelo estroma endometrial caracterizado por revestimento epitelial e por tecido conjuntivo (JACOB; FRANCONI; LOSSOW, 1990; GRUBER; O'BRIEN, 2011).

Em relação ao útero de rata (Figura 3), este é chamado de útero duplo ou duplex, o qual consiste em dois tubos ligados a dois canais cervicais distintos e a vagina (MARTINS et al., 2011). Sua estrutura é formada por uma camada interna, o endométrio, e uma externa, o miométrio, que é constituído por duas camadas distintas, uma longitudinal exterior e uma circular interna com origem, estrutura, função e padrões de contração diferentes (VEALE; OLIVER; HAVLIK, 2000; AGUILAR; MITCHELL, 2010).

Figura 3 – Anatomia do útero de rata.

Fonte: SOWASH, 2009

A contração do músculo liso se dá por meio do aumento da concentração do cálcio intracelular, sendo este um importante segundo mensageiro que exerce um papel essencial a uma grande variedade de processos biológicos (CARAFOLI; BRINI, 2007). Esse aumento ocorre por influxo desse íon para o citoplasma, através dos canais presentes na membrana plasmática, e por liberação de fontes internas de Ca^{2+} para o citoplasma, como o retículo sarcoplasmático (RS) (SOMLYO et al., 1985; PAN; MA, 2003; KEARNEY et al., 2005).

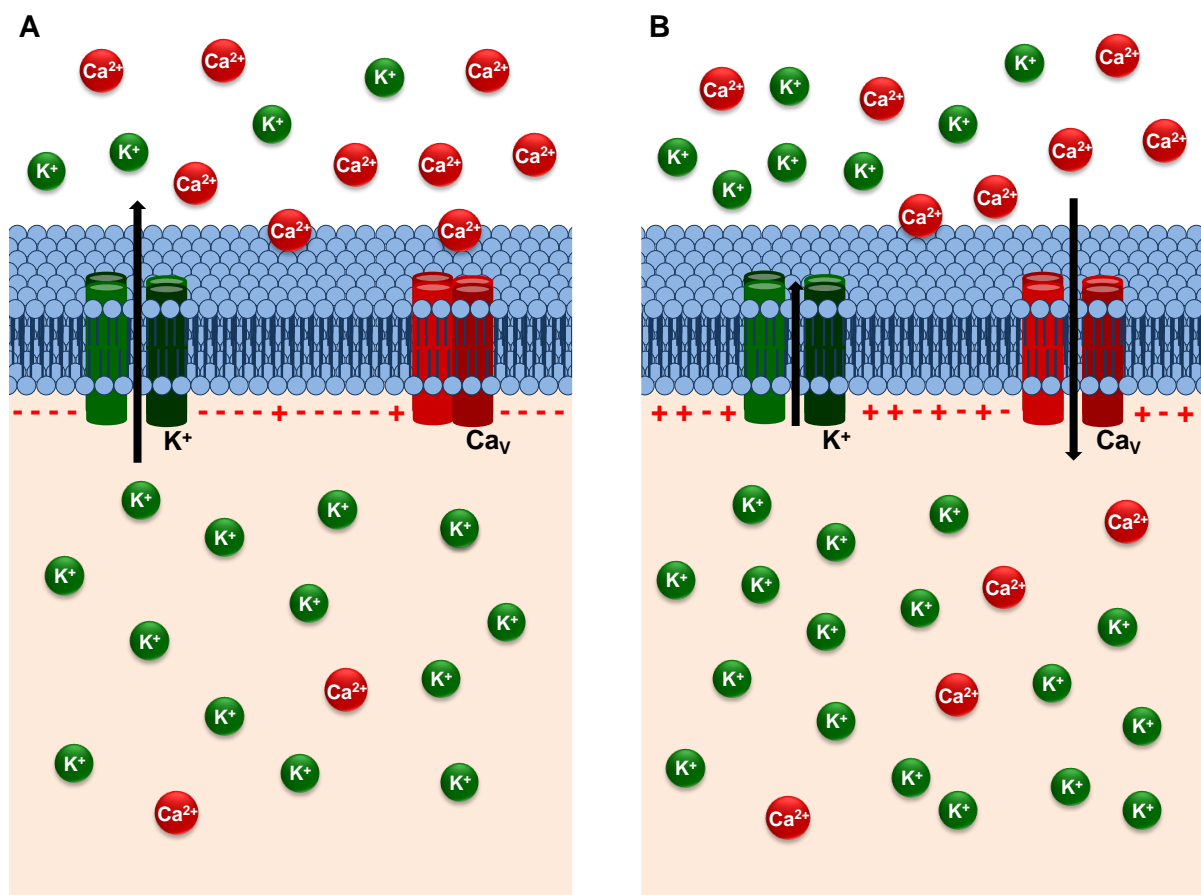
A contração do músculo liso uterino apresenta um papel fundamental na regulação e no controle da atividade contrátil do miométrio (WORD, 1995; WRAY et al., 2001; SHMYGOL, WRAY, 2004), uma regulação anormal na contratilidade desse músculo está associado a diversos problemas como abortos, partos prematuros, hemorragias pós-parto e cólicas uterinas (WRAY et al., 2001; SHMYGOL; WRAY, 2004; LIMA et al., 2005).

No músculo liso, a contração depende previamente do aumento na concentração citosólica de cálcio livre ($[\text{Ca}^{2+}]_c$) (VAN BREEMEN; SAIDA, 1989). A regulação funcional da $[\text{Ca}^{2+}]_c$, para o início de uma resposta contrátil no músculo liso depende de dois estímulos que levam a dois tipos de acoplamentos: o eletromecânico, que ocorre devido à mudança do potencial de membrana (V_m), e o farmacomecânico, que acontece por uma ligação de um agonista ao seu respectivo receptor (REMBOLD, 1996).

O acoplamento eletromecânico (Figura 4) é caracterizado pela despolarização da membrana aliada ao aumento da concentração extracelular de potássio ($[K^+]_e$) ou ainda indiretamente pela ligação dos agonistas aos seus receptores, o que ocasiona à abertura de canais de cálcio dependente de voltagem (Ca_v) e, conseqüentemente, o influxo de Ca^{2+} promovendo uma resposta contrátil (SOMLYO; SOMLYO, 2003).

O Ca^{2+} oriundo do meio extracelular entra na célula principalmente através dos Ca_v (CATTERALL, 2011), os quais estão presentes na membrana celular da maioria das células excitáveis (ALEXANDER; MATHIE; PETERS, 2007).

Figura 4 – Esquema do acoplamento eletromecânico da contração muscular lisa pelo aumento da concentração extracelular de K^+ .



Fonte: SILVA, 2015.

A) Durante o repouso, o gradiente químico favorece o efluxo de íons K^+ através de seus canais de vazamento, deixando a região perimembranar interna da membrana plasmática polarizada negativamente; **B)** Um aumento na $[K^+]_e$ diminui o efluxo desses íons, ocasionando o acúmulo de cargas positivas na região perimembranar interna; a célula despolariza, o que ativa os Ca_v promovendo o influxo de Ca^{2+} , com conseqüente contração do músculo liso.

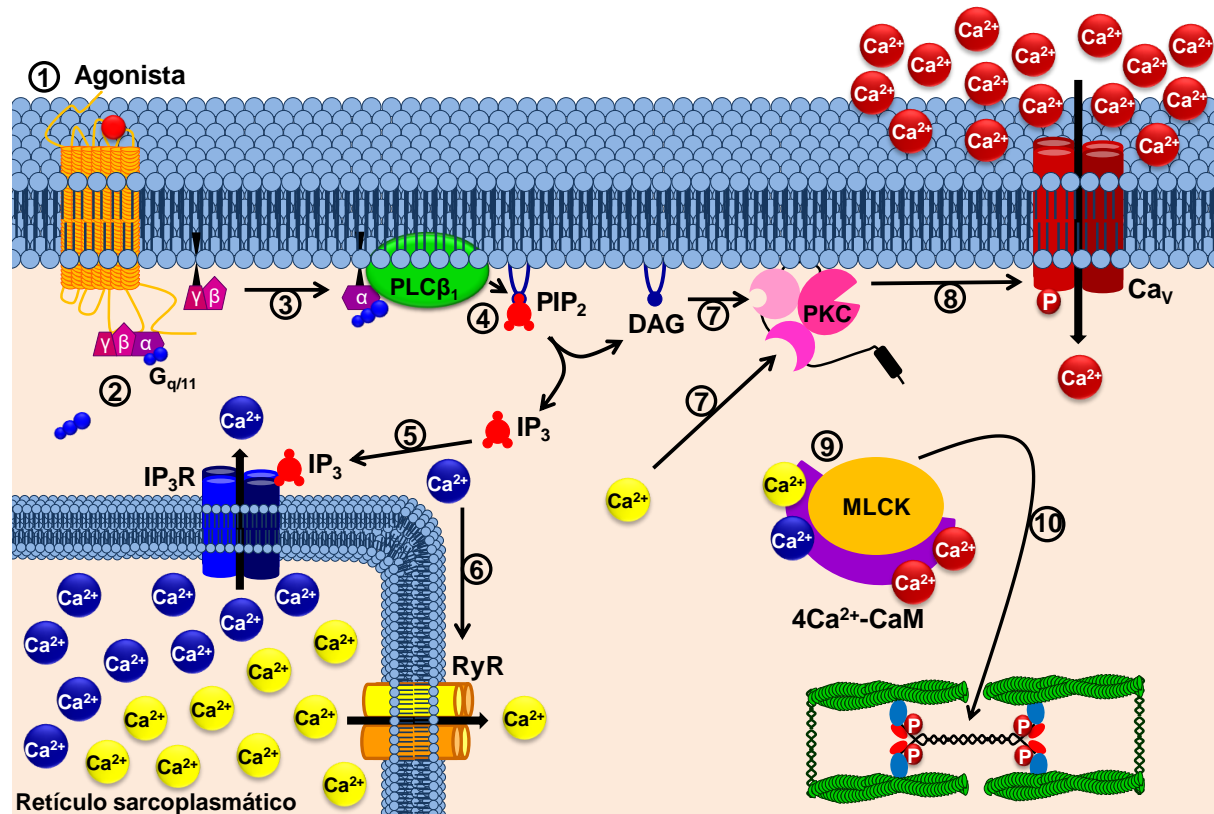
Os Ca_v pertencem a super família de canais iônicos proteicos transmembranares, em que também estão incluídos os canais de sódio e potássio dependentes de voltagem. Esses canais são complexos proteicos formados por 5 subunidades distintas: a subunidade principal α_1 , a maior delas e consiste no poro do canal e possui o sensor de voltagem que controla sua abertura; as subunidades α_2 e δ estão ligadas por uma ponte de dissulfeto, formando um dímero, a subunidade β , intracelular e a subunidade γ , transmembranar. Essa família de canais de Ca^{2+} possui 10 membros, classificados segundo sua sequência primária de aminoácidos e suas funções fisiológicas. Estes canais medeiam o influxo de Ca^{2+} em resposta a despolarização da membrana e regulam diferentes processos intracelulares (CATTERALL, 2005; CATTERALL, 2011).

Os Ca_v1 são ativados por alta voltagem e sensíveis à di-hidropiridinas consistem nos principais subtipos de canal de Ca^{2+} expresso em muitos músculos lisos (THORNELOE; NELSON, 2005; WRAY; BURDYGA; NOBLE, 2005).

No músculo liso do útero, o subtipo de Ca_v mais expressos são os Ca_v1 ou canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem do tipo L (Ca_v-L). Além desse, o miométrio possui outros tipos de Ca_v , os Ca_v3 ou canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem do tipo T (Ca_v-T) que tem uma maior capacidade de condutância do que os Ca_v1 , indicando que esse tipo de canal desempenha um papel importante na propagação de potenciais de ação, porém, esses canais são ausentes em útero de rata (WRAY et al., 2001; WRAY et al., 2003; NOBLE et al., 2009; AGUILAR; MITCHELL, 2010).

Os mecanismos farmacomecânicos da contração (Figura 5) incluem: 1) aumento de 1,4,5-trisfosfato de inositol (IP_3) e do diacilglicerol (DAG) por ligação do agonista com o receptor ativando o sistema efetor proteína $G_{q/11}$ -fosfolipase C β_1 (PLC β_1). O IP_3 liga-se a um receptor de IP_3 (IP_3R), presente no RS, permitindo a liberação de Ca^{2+} dos estoques intracelulares que facilitará a formação do complexo Ca^{2+} -calmodulina ($4Ca^{2+}$ -CaM) disparando o início do mecanismo contrátil (REMBOLD, 1996; SANDERS, 2001; McFADZEAN; GIBSON, 2002); 2) aumento do influxo de Ca^{2+} através da abertura do canal Ca_v1 por um mecanismo que não envolve mudança no potencial de membrana e 3) liberação do Ca^{2+} induzida pelo Ca^{2+} através de receptores de rianodina (RyR) (sensíveis à cafeína) presentes na membrana do RS (BRAINARD; KOROVKINA; ENGLAND, 2007). O útero apresenta tanto os receptores IP_3R como os RyR, no entanto, os IP_3R são fisiologicamente mais importantes (WRAY; SHMYGOL, 2007).

Figura 5 – Esquema do mecanismo farmacomecânico da contração no músculo liso pela ativação da via $G_{q/11}$ - $PLC\beta_1$.



Fonte: SILVA, 2015.

1) O agonista se liga ao seu receptor do tipo GPCR na membrana plasmática; 2) As proteínas $G_{q/11}$ trocam GDP por GTP na sua subunidade α , tornando-se ativas; 3) A subunidade $G\alpha_{q/11}$ -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 citosol e ativa o IP_3R presente na membrana do RS, liberando Ca^{2+} dos estoques; 6) O Ca^{2+} liberado ativa o RyR, liberando mais Ca^{2+} para o citoplasma; 7) O Ca^{2+} liberado, juntamente com o DAG ativam a PKC; 8) A PKC ativada fosforila ativando os Ca_v1 e promovendo o influxo de Ca^{2+} ; 9) O aumento da $[Ca^{2+}]_c$ aumenta a afinidade do Ca^{2+} pela CaM formando o complexo $4Ca^{2+}$ -CaM e ativa a MLCK; 10) A MLCK ativada fosforila a MLC que 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.

Uma vez que o aumento na $[Ca^{2+}]_c$ leva à contração, o relaxamento muscular liso se dá por diminuição dos níveis deste íon no citosol (SOMLYO; SOMLYO, 2003). Esta diminuição na $[Ca^{2+}]_c$ pode ocorrer por um mecanismo eletromecânico, que se dá através da repolarização (ou hiperpolarização) da membrana, ou pelo mecanismo farmacomecânico, que ocorre pela ativação de receptores de membrana e inibição das vias bioquímicas que levam a contração (WOODRUM e BROPHY, 2001).

O acoplamento eletromecânico de relaxamento ocorre pela abertura de canais de K^+ , que desempenham um importante papel na regulação do potencial de repouso da membrana e na excitabilidade celular (KNOT; BRAYDEN; NELSON, 1996).

Os canais de K^+ conduzem íons K^+ através da membrana plasmática a favor do seu gradiente eletroquímico (MACKINNON, 2003). A atividade desses canais pode ser regulada por voltagem, por Ca^{2+} ou por neurotransmissores, e pelas vias de sinalização que os estimulam (ALEXANDER; MATHIE; PETERS, 2011), ao mesmo tempo, em que podem regular o influxo de Ca^{2+} através dos Ca_V (THORNELOE; NELSON, 2005).

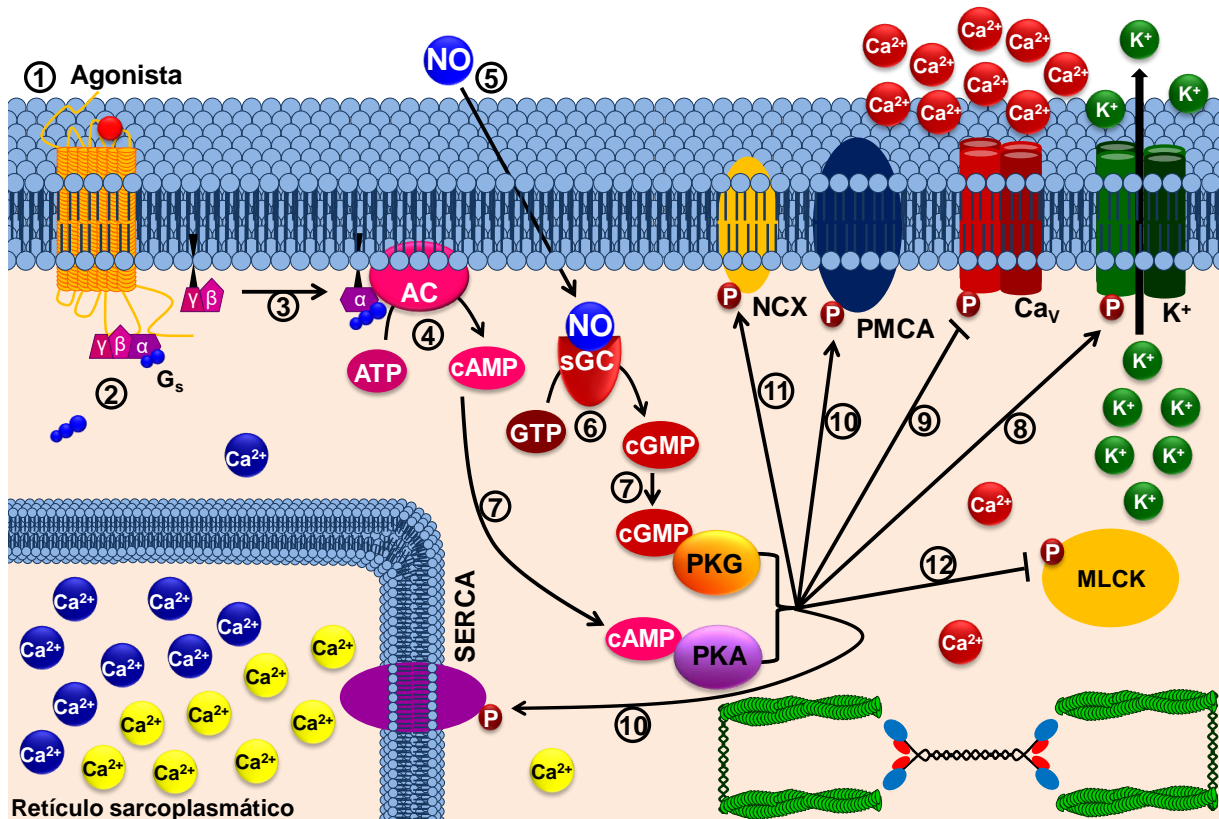
Vários subtipos desses canais podem regular o tônus basal do músculo liso, entre eles, os canais de K^+ ativados por Ca^{2+} de alta condutância (BK_{Ca}), os canais de K^+ ativados por Ca^{2+} de baixa condutância (SK_{Ca}), os canais de K^+ dependentes de voltagem (K_V) e os canais de K^+ sensíveis ao ATP (K_{ATP}) (THORNELOE; NELSON, 2005). No miométrio, é descrito a presença desses subtipos de canais (WANG et al., 1998; SMITH et al., 2007), e entre eles os BK_{Ca} são majoritários e responsáveis por repolarizar a membrana durante os potenciais de ação e manter o período de repouso uterino (LORCA; PRABAGARAN; ENGLAND, 2014).

Os mecanismos de relaxamento do músculo liso via acoplamento fármacomecânico (Figura 6) podem ocorrer através de receptores acoplados à proteína G_s (GPCR), cuja subunidade α ativa a ciclase de adenilil (AC) que converte o trifosfato de adenosina (ATP) em monofosfato cíclico de adenosina (cAMP). Além da produção do óxido nítrico (NO), outra via que leva ao relaxamento caracterizado por esse acoplamento. O NO é um fator relaxante derivado do endotélio, liberado pelos nervos e pelas células musculares lisas, que ao estimular a ciclase de guanilil solúvel (sGC), induz a formação de monofosfato cíclico de guanosina (cGMP) a partir do trifosfato de guanosina (GTP) (PEREZ-ZOGHBI et al., 2010; BERRIDGE, 2012).

Os nucleotídeos cíclicos irão ativar suas respectivas proteínas cinases, dependentes de cAMP (PKA) e de cGMP (PKG), que por sua vez fosforilam vários substratos, o que ocasiona a: 1) ativação de canais de K^+ , que indiretamente, inibem os Ca_V ; 2) inibição direta dos Ca_V , (REMBOLD, 1996); 3) aumento da cinética da Ca^{2+} -ATPase tanto do RS (SERCA) como da membrana plasmática (PMCA); 4) inibição do trocador Na^+/Ca^{2+} (BLAUSTEIN, 1989); 5) inibição da cinase da cadeia

leve da miosina (MLCK), impedindo a fosforilação da cadeia leve da miosina (MLC) (REMBOLD, 1996).

Figura 6 – Esquema do mecanismo farmacomecânico do relaxamento no músculo liso pela ativação da via G_s /AC/PKA e NO/sGC/PKG.



Fonte: SILVA, 2015.

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 , tornando-se ativa; 3) A subunidade $G\alpha_s$ -GTP ativa a AC; 4) A AC converte ATP em cAMP; 5) O NO gerado tanto dos nervos nitrérgicos como das células endoteliais, estimula a atividade da sGC; 6) A sGC converte 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 trocador Na^+/Ca^{2+} ; Todos esses mecanismos diminuem a $[Ca^{2+}]_i$ e 12) Inibem a MLCK, reduzindo sua afinidade pelo $4Ca^{2+}$ -CaM impedindo a ativação da MLC e, conseqüentemente, sua interação com os filamentos da actina, promovendo o relaxamento do músculo liso. As definições das abreviaturas estão presentes na lista de abreviaturas e no texto.

Sendo assim, substâncias que atuem inibindo ou ativando um dos passos dessas vias são potenciais candidatos a novos fármacos que auxiliem no tratamento ou alívio dos sintomas de doenças relacionadas à desordem no músculo liso.

Com base nisso, destaca-se a importância de aprofundar-se nos estudos sobre os produtos naturais, em espécies da família Lamiaceae, sobre a musculatura lisa uterina, a fim de inserir no mercado produtos e/ou substâncias que sejam eficazes sobre as patologias associadas ao sistema reprodutor feminino, em especial esse órgão. A fim de comprovar cientificamente seu uso popular, visto que já são amplamente utilizados, além de, constatar a segurança do uso desses como possíveis agentes terapêuticos.

2 Objetivos

2.1 Geral

Investigar o efeito tocolítico *in vitro* do óleo essencial das folhas *Mesosphaerum suaveolens* (L.) Kuntze (MS-OE), através de estudos funcionais em rata.

2.2 Específicos

- ✓ Avaliar o efeito tocolítico do MS-OE frente às contrações fásicas induzidas por carbacol ou por ocitocina em útero isolado de rata;
- ✓ Investigar o mecanismo de ação tocolítica do MS-OE, avaliando:
 - O tipo de antagonismo exercido;
 - O efeito relaxante sobre o componente tônico da contração;
 - A participação dos Ca_v ;
 - A participação dos canais de potássio.

3 Material e métodos

3.1 Material

3.1.1 Produto-teste

O óleo essencial foi cedido pelo Dr. Vicente Carlos de Oliveira Costa e pelo Prof. Dr. Josean Fachine Tavares do setor de Fitoquímica do Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos (PPgPNSB), do Centro de Ciências da Saúde (CCS), da Universidade Federal da Paraíba (UFPB).

3.1.2 Animais

As ratas Wistar (*Rattus norvegicus*) virgens, pesando entre 150-250 g, foram 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 e livre acesso à água e à ração do tipo *pellets* (Presence[®]), 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 entre 08 e 20 horas no Laboratório de Farmacologia Funcional Prof. George Thomas do PPgPNSB/CCS/UFPB. Todos os procedimentos experimentais foram realizados seguindo os princípios de cuidados com animais submetidos e aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA (Certidão Nº 088/2016) da UFPB (Anexo 1).

3.1.3 Drogas e reagentes

O cloreto de cálcio di-hidratado ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), a glicose ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$) e o cloreto de magnésio hexa-hidratado ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) foram adquiridos da Vetec (Brasil). O cloreto de sódio (NaCl) e o cloreto de potássio (KCl) foram adquiridos da Química Moderna (Brasil). O hidróxido de sódio (NaOH) e o ácido clorídrico (HCl) foram adquiridos da Nuclear (Brasil). O bicarbonato de sódio (NaHCO_3) e o álcool etílico absoluto foram adquiridos da Fmaia (Brasil). Estas substâncias, exceto a glicose, o

NaCl e o NaHCO₃, foram dissolvidas e diluídas em água destilada para obtenção de cada solução-estoque que eram mantidas sob refrigeração.

A ocitocina, o óleo de castor (Cremophor EL[®]), o cloridrato de carbamilcolina (CCh), o 1,4-diidro-2,6-dimetil-5-nitro-4-[2-(trifluorometil)fenil]-3-piridina carboxílico ácido metil éster (S-(-)-Bay K8644), o cloreto de césio (CsCl) e o dietilestilbestrol foram adquiridos da Sigma-Aldrich (Brasil). Estas substâncias, exceto o Cremophor[®] foram mantidas em um “freezer” à temperatura de -20 °C. O CCh e o CsCl foram dissolvidos e diluídos em água destilada. A ocitocina, o S-(-)-Bay K8644 e o dietilestilbestrol foram dissolvidos em etanol absoluto, sendo a ocitocina e o S-(-)-Bay K8644 rediluídos em água destilada para obtenção da solução-estoque 1 UI/mL e 10⁻⁴ M, respectivamente. Essas substâncias foram armazenadas a 4-8 °C em refrigerador.

A mistura carbogênica (95% de O₂ e 5% de CO₂) foi adquirida da White Martins (Brasil).

3.1.4 Solução nutritiva

O pH das soluções nutritivas, cuja composição está descrita abaixo, foram ajustados para 7,4 com HCl ou NaOH 1 N, essas soluções foram utilizadas para simular o meio fisiológico do órgão que foi gaseificado com uma mistura carbogênica.

Locke Ringer (mM) – NaCl (154,0); KCl (5,6); CaCl₂ (2,2); MgCl₂ (2,1); C₆H₁₂O₆ (5,6); NaHCO₃ (6,0) (REVUELTA; CANTABRANA; HIDALGO, 1997).

Locke Ringer nominalmente sem Ca²⁺ (mM) – NaCl (154,0); KCl (5,6); MgCl₂ (2,1); C₆H₁₂O₆ (5,6); NaHCO₃ (6,0) (REVUELTA; CANTABRANA; HIDALGO, 1997).

3.1.5 Aparelhos

Para o registro das contrações isotônicas, os órgãos foram suspensos em cubas de banho para órgãos isolados (5 mL) e conectados a uma alavanca isotônica de inscrição frontal em cilindros esfumaçados de um quimógrafo (DTF, Brasil). A temperatura das cubas foi controlada com bombas termostáticas (POLYSTAT 12002, Cole-Palmer, EUA).

As contrações isométricas foram registradas, com o útero suspenso 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 digital com os softwares AQCAD versão 2.4.8, para aquisição dos dados, e ANCAD para análise. As cubas estavam acopladas a uma bomba termostática modelo BT-60 que controlava a temperatura das cubas. Todos os aparelhos foram adquiridos da AVS Projetos (São Paulo, SP, Brasil).

Os valores de pH foram aferidos através de um pHmetro digital modelo PG2000 versão 4.3 (GEHAKA, São Paulo, SP, Brasil).

As substâncias foram pesadas em balança analítica modelo AY220 e os animais em balança semianalítica modelo BG 4000 (GEHAKA, São Paulo, SP, Brasil).

3.2 Métodos

3.2.1 Preparo da solução-estoque do óleo essencial

O óleo essencial foi solubilizado em Cremophor[®] (3% v/v) e diluído em água destilada para obtenção da solução de partida (10 mg/mL). Esta solução era preparada diariamente antes de cada experimento, uma vez que os óleos essenciais são caracterizados pela presença de compostos voláteis (BAKKALI et al., 2008). A concentração final de Cremophor[®] nas cubas nunca excedeu 0,01% (v/v), pois de acordo com dados obtidos em experimentos anteriores, nesta concentração, o mesmo é desprovido de efeito contrátil ou relaxante significativo no órgão estudado (dados não mostrados).

No momento dos experimentos, essa solução era rediluída em água destilada de acordo com a exigência do protocolo. As concentrações do óleo essencial eram utilizadas em múltiplos de 3.

3.2.2 Triagem farmacológica

3.2.2.1 Avaliação do efeito do MS-OE frente às contrações fásicas induzidas por ocitocina ou por carbacol em útero isolado de rata

Foi utilizado o método adaptado por Revuelta, Cantabrana e Hidalgo (2000). As ratas eram tratadas com dietilestilbestrol (1 mg/kg) via subcutânea, para indução do estro. Decorrido 24 horas após a administração desse hormônio, eram eutanasiadas por decapitação com o auxílio de uma guilhotina. Após isso, a cavidade abdominal era aberta e realizada a dissecação do útero, este era colocado em uma placa de Petri contendo solução nutritiva de Locke Ringer a 32 °C sob gaseificação com carbogênio. Em seguida, os dois cornos uterinos eram separados por meio de uma incisão, abertos longitudinalmente e suspensos verticalmente em cubas de vidro (5 mL). Para estabilização da preparação, esta era mantida em repouso por 40 minutos antes do contato com qualquer agente, sob tensão de repouso de 1 g, efetuando neste período, a renovação da solução nutritiva da cuba a cada 15 minutos.

Após o período de estabilização, era obtida uma contração isotônica com 60 mM de KCl para verificar a funcionalidade do órgão e após 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, concentração submáxima que produz cerca de 80% da resposta máxima, e registradas através de uma alavanca isotônica de inscrição frontal em um cilindro esfumado de um quimógrafo. MS-OE era incubado por 15 minutos em preparações diferentes e independentes, e na presença deste era induzida uma terceira contração por um dos agonistas acima citados.

A inibição da resposta submáxima de ocitocina ou de CCh foi avaliada por comparação das respostas antes (100%, controle) e após a adição do óleo essencial à cuba. Os valores da concentração do óleo essencial que inibiram 50% do efeito máximo produzido por um agonista (CI_{50}) foram obtidos por regressão não linear.

3.2.3 Investigação do mecanismo de ação tocolítica do MS-OE em rata

3.2.3.1 Característica do antagonismo do MS-OE da contração induzida por carbacol

O útero era montado conforme descrito no item 3.2.1.1. Após o período de estabilização, era induzida uma contração isotônica com 60 mM de KCl para verificar a funcionalidade do órgão. A preparação era lavada e, após 15 minutos, eram induzidas duas curvas concentrações-resposta cumulativa ao CCh (10^{-8} – 10^{-2} M). A preparação era lavada com solução fisiológica e o MS-OE era incubado por 15 minutos em diferentes concentrações e experimentos independentes e na presença deste uma nova curva concentração-resposta cumulativa ao CCh era obtida.

Os resultados foram calculados comparando as porcentagens da resposta contrátil na presença do MS-OE com a obtida pela média das amplitudes máxima da curva controle (100%) na ausência do óleo essencial. O tipo de antagonismo exercido por MS-OE era avaliado com base na análise dos valores da concentração de uma substância que produz 50% de seu efeito máximo (CE_{50}) e do efeito máximo (E_{max}) do CCh na ausência (controle) e na presença de MS-OE, sendo esses valores calculados por regressão não linear.

3.2.3.2 Avaliação do efeito tocolítico do MS-OE sobre as contrações tônicas induzidas por KCl ou por ocitocina

O útero era montado conforme descrito no item 3.2.1.1. Após o período de estabilização, uma contração submáxima era induzida por 60 mM de KCl ou por 10^{-2} UI/mL de ocitocina e durante a fase tônica sustentada era adicionado o MS-OE de maneira cumulativa à cuba e em preparações diferentes.

O relaxamento foi expresso como o E_{max} do óleo essencial e calculado como a porcentagem reversa de contração inicial produzida pelos agentes contráteis. Os valores da CE_{50} foram calculados por regressão não linear.

3.2.3.3 Avaliação da participação dos canais de cálcio dependentes de voltagem no efeito tocolítico do MS-OE em rata

3.2.3.3.1 Avaliação do efeito tocolítico do MS-OE frente às contrações induzidas por CaCl₂ em meio despolarizante (KCl 60 mM) nominalmente sem Ca²⁺

O útero era preparado conforme descrito no item 3.2.1.1. Após o período de estabilização de 30 minutos, a solução de Locke Ringer era trocada por uma solução de Locke Ringer nominalmente sem Ca²⁺, que era mantida até o final dos experimentos. Após 30 minutos era adicionado 60 mM de KCl e após 10 minutos era induzida uma curva concentração-resposta cumulativa ao CaCl₂. A preparação era lavada com solução fisiológica até retornar a linha de base, após esse período era adicionado 60 mM de KCl por 10 minutos, e em seguida o MS-OE era incubado por 15 minutos e na presença deste era obtida uma segunda curva concentração-resposta cumulativa ao CaCl₂ (Adaptado de REVUELTA; CANTABRANA; HIDALGO, 1997).

Os resultados foram calculados comparando as porcentagens da resposta contrátil na presença do MS-OE com a obtida pela amplitude máxima da curva controle (100%) na ausência do óleo essencial. A inibição da contração induzida pelo CaCl₂ exercida pelo MS-OE foi avaliada com base nos valores da CE₅₀ e do E_{max} do CaCl₂ calculados por regressão não linear a partir das curvas concentrações-resposta, na ausência e na presença do MS-OE.

3.2.3.3.2 Avaliação do efeito tocolítico do MS-OE frente às contrações induzidas por S-(-)-Bay K8644

O útero era montado conforme descrito no item 3.2.1.1. Após o período de estabilização em solução de Locke Ringer, o útero era parcialmente despolarizado pela adição de 15 mM de KCl por 10 minutos (CONTE-CAMERINO et al, 1987) e em sua presença era induzida uma contração por 3×10^{-7} M de S-(-)-Bay K8644 (CALIXTO; RAE, 1991), um agonista seletivo dos Ca_v-L ou Ca_v1 (SPEDDING; PAOLETTI, 1992). Durante a fase tônica dessa contração o MS-OE era adicionado de maneira cumulativa. O relaxamento foi expresso como porcentagem reversa da contração inicial produzida pelo S-(-)-Bay K8644. Os valores de CE₅₀ foram calculados conforme descrito anteriormente.

3.2.3.4 Avaliação da participação dos canais de potássio no efeito tocolítico do MS-OE em rata

3.2.3.4.1 Avaliação do efeito do MS-OE sobre as contrações tônicas induzidas por ocitocina na ausência e na presença de CsCl

O útero era preparado conforme descrito no tem 3.2.1.1. Após o período de estabilização, era induzida uma contração por adição de 10^{-2} UI/mL de ocitocina e sobre o componente tônico era adicionado o óleo essencial de forma cumulativa (curva-controle). A preparação era lavada e, após 30 minutos, era adicionado à cuba 5 mM de CsCl, um bloqueador não seletivo dos canais de potássio (LATORRE et al., 1989), após 20 minutos na presença do bloqueador era induzida uma contração por 10^{-2} UI/mL de ocitocina e sobre o componente tônico dessa contração MS-OE era adicionado de forma cumulativa. O relaxamento produzido pelo MS-OE foi expresso como a porcentagem reversa da contração inicial. Os valores de CE_{50} do óleo foram calculados por regressão não linear a partir das curvas concentrações-resposta na presença do bloqueador e comparados com os valores de CE_{50} do MS-OE na ausência do bloqueador.

3.3 Análise estatística

Os resultados foram expressos como a média e o erro padrão da média (e.p.m.) e analisados estatisticamente empregando-se o teste *t* não pareado ou análise de variância (ANOVA) *one-way* seguido do pós-teste de Bonferroni. A hipótese nula foi rejeitada quando o valor de $p < 0,05$.

Como parâmetro de potência foram calculados os valores de CE_{50} , de CI_{50} e o coeficiente de correlação linear (R^2) foram calculados por regressão não linear e como parâmetro de eficácia foi calculado o E_{max} (NEUBIG et al., 2003).

Todos os dados foram analisados pelo programa GraphPad Prism[®] versão 5.01 (GraphPad Software Inc., San Diego CA, E.U.A.).

4 Resultados

4.1 Triagem farmacológica

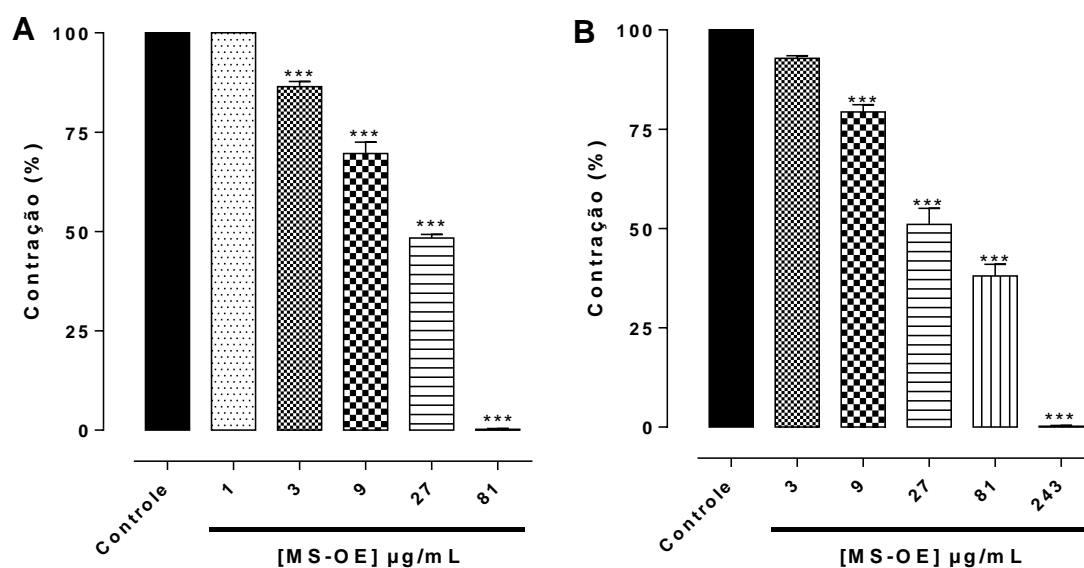
4.1.1 Avaliação do efeito do MS-OE frente às contrações fásicas induzidas por ocitocina ou por carbacol em útero isolado de rata

O óleo essencial MS-OE (3-729 $\mu\text{g/mL}$) inibiu às contrações fásicas induzidas por 10^{-5} M de CCh e por 10^{-2} UI/mL de ocitocina em útero de rata de maneira dependente de concentração ($R^2 = 0,95 \pm 0,003$ e $0,96 \pm 0,003$, Gráficos 1A e 1B, respectivamente $n = 5$). Nas contrações fásicas induzidas por CCh, o valor de E_{max} para MS-OE foi de 100% obtidos na concentração de 81 $\mu\text{g/mL}$. De maneira semelhante, nas contrações fásicas induzidas por ocitocina o valor de E_{max} foi de 100% obtido na concentração de 243 $\mu\text{g/mL}$ (Gráficos 1B, $n = 5$) (Tabela 1, $n = 5$).

Analisando os valores de CI_{50} , observou-se que o MS-OE foi mais potentes em inibir as contrações fásicas induzidas por CCh ($CI_{50} = 19,0 \pm 1,3 \mu\text{g/mL}$) do que por ocitocina ($CI_{50} = 33,8 \pm 4,7 \mu\text{g/mL}$) cerca de 1,7 vezes (Tabela 1, $n = 5$).

A responsividade do útero de rata aos agonistas contráteis testados foi restaurada em até 2 horas após a retirada dos óleos essenciais da cuba (dados não mostrados).

Gráfico 1 – Efeito do MS-OE frente às contrações fásicas induzidas por 10^{-5} M de CCh (A) e 10^{-2} UI/mL de ocitocina (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 Bonferroni. *** $p < 0,001$ (Controle vs. MS-OE). $R^2 = 0,95 \pm 0,003$ (CCh) e $0,96 \pm 0,003$ (Ocitocina).

Fonte: Barros, 2016.

Tabela 1 – Valores de E_{max} e de CI_{50} do MS-OE frente às contrações fásicas induzidas por 10^{-5} M de CCh e por 10^{-2} UI/mL de ocitocina em útero isolado de rata ($n = 5$)

Agentes contráteis	E_{max} (%)	CI_{50} (µg/mL)
CCh	100	$19,0 \pm 1,3^*$
Ocitocina	100	$33,8 \pm 4,7$

Teste *t*, * $p < 0,05$ (MS-OE CCh vs. MS-OE OCI)

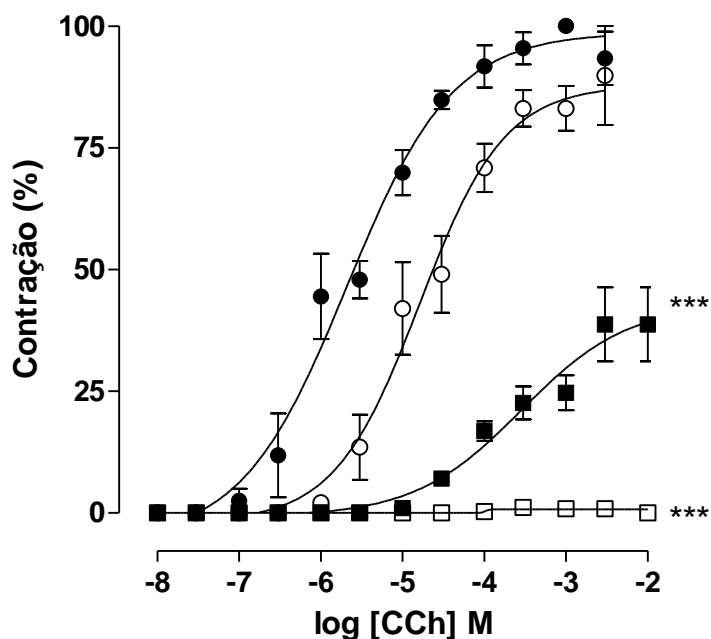
Fonte: Barros, 2016.

4.2.2 Investigação do mecanismo de ação tocolítica do MS-OE em rata

4.2.2.1 Característica do antagonismo do MS-OE da contração induzida por carbacol

O MS-OE (81 e 243 $\mu\text{g/mL}$, $n = 5$), inibiu de maneira dependente de concentração as contrações induzidas por concentrações cumulativas de CCh (Gráfico 2). As curvas cumulativas ao CCh foram desviadas para a direita de forma não paralela e com redução do E_{max} de 100% (controle) e $87,7 \pm 3,5\%$ (27 $\mu\text{g/mL}$) para $38,7 \pm 7,6$ e $1,6 \pm 1,6\%$ na presença do óleo essencial nas concentrações de 81 e 243 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente (Gráfico 4 e Tabela 3). Os valores de CE_{50} do CCh passaram de $2,8 \pm 0,5 \times 10^{-6}$ M (controle) para $2,1 \pm 0,7 \times 10^{-5}$ M e $2,4 \pm 0,8 \times 10^{-4}$ M na presença de MS-OE nas concentrações de 27, 81 e 243 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente (Tabela 2).

Gráfico 2 – Curvas concentrações-resposta cumulativas ao CCh (A) na ausência (●) e na presença de 27 (○), de 81 (■) e de 243 µg/mL (□) do MS-OE em útero isolado de rata



Os símbolos e as barras verticais representam a média e o e.p.m., respectivamente, (n = 5). ANOVA *one-way* seguido do pós-teste de Bonferroni, *** $p < 0,001$ (Controle vs. MS-OE).

Fonte: Barros, 2016.

Tabela 2 – Valores de E_{max} e de CE_{50} do carbacol na ausência (controle) e na presença de 27, 81 e 243 µg/mL do MS-OE, em útero isolado de rata (n = 5)

MS-OE (µg/mL)	E_{max} (%)	CE_{50} (M)
Controle	100	$2,8 \pm 0,5 \times 10^{-6}$
27	$87,7 \pm 3,5$	$2,1 \pm 0,7 \times 10^{-5}$
81	$38,7 \pm 7,6^{***}$	$2,4 \pm 0,8 \times 10^{-4*}$
243	$1,6 \pm 1,6^{***}$	Nd

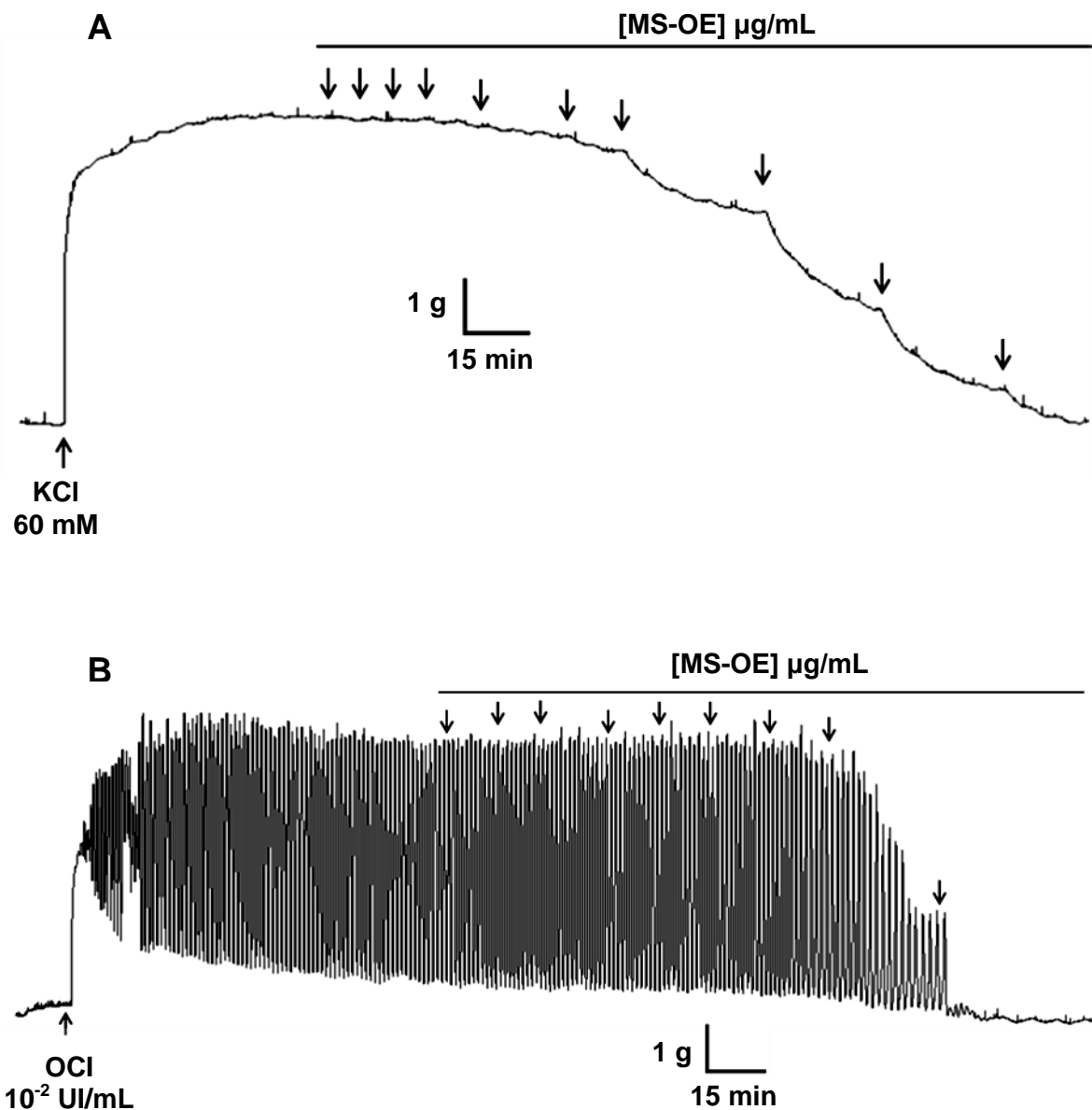
ANOVA *one-way* seguido do pós-teste de Bonferroni, * $p < 0,05$ e *** $p < 0,001$ (Controle vs. MS-OE); Nd = não determinado.

Fonte: Barros, 2016.

4.2.2.2 Avaliação do efeito tocolítico do MS-OE sobre as contrações tônicas induzidas por KCl ou por ocitocina

O MS-OE (0,1-243 e 3-81 $\mu\text{g/mL}$, $n = 5$) relaxou de maneira dependente de concentração o útero de rata pré-contraído com 60 mM de KCl ($CE_{50} = 15,0 \pm 2,6 \mu\text{g/mL}$) e com 10^{-2} UI/mL de ocitocina ($CE_{50} = 20,2 \pm 0,8 \mu\text{g/mL}$), respectivamente (Figura 7 e Gráfico 3). Analisando os valores de CE_{50} pode ser observado que o MS-OE foi equipotente em relaxar o útero de rata pré-contraído tanto com KCl como ocitocina (Tabela 3). Os valores de E_{max} ($103,6 \pm 1,4$ e $104,5 \pm 1,7\%$, respectivamente) do MS-OE foram atingidos na concentração de 243 $\mu\text{g/mL}$ para as contrações induzidas por KCl e de 81 $\mu\text{g/mL}$ para as contrações induzidas por ocitocina (Figura 7, Gráfico 3 e Tabela 3).

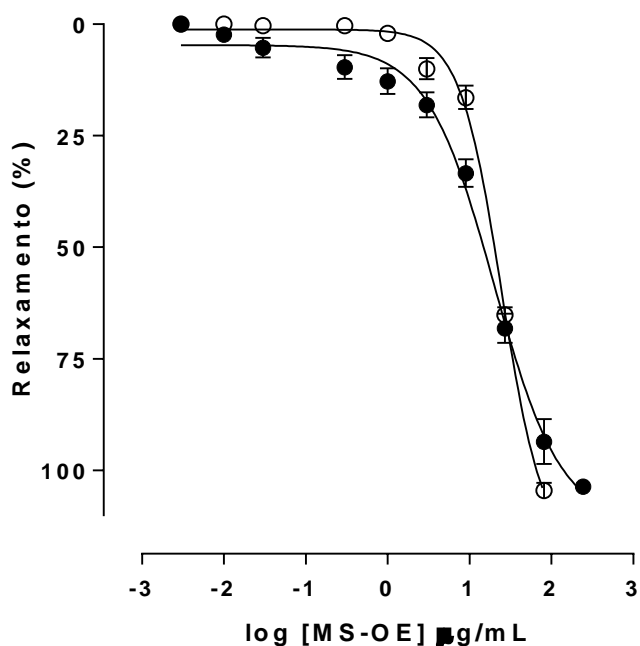
Figura 7 – Registros representativos do efeito tocolítico do MS-OE sobre as contrações tônicas induzidas por 60 mM de KCl (**A**) e por 10^{-2} UI/mL de ocitocina (**B**) em útero isolado de rata



As setas para baixo representam a adição cumulativa do MS-OE nas concentrações de 0,01; 0,03; 0,1; 0,3; 1; 3; 9, 27, 81 e 243 $\mu\text{g/mL}$ (**A**) e 0,01; 0,03; 0,1; 0,3; 1; 3; 9, 27 e 81 $\mu\text{g/mL}$ (**B**). MS-OE = óleo essencial de *Mesosphaerum suaveolens*; KCl = cloreto de potássio; OCI = ocitocina.

Fonte: Barros, 2016.

Gráfico 3 – Efeito tocolítico do MS-OE sobre as contrações tônicas induzidas por 60 mM de KCl (●) e por 10^{-2} UI/mL de ocitocina (○) em útero isolado de rata



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

Fonte: Barros, 2016.

Tabela 3 – Valores de E_{max} e de CE_{50} do MS-OE sobre as contrações tônicas induzidas por 60 mM de KCl e por 10^{-2} UI/mL de ocitocina em útero isolado de rata (n = 5)

Agentes contráteis	E_{max} (%)	CE_{50} (µg/mL)
KCl	$103,6 \pm 1,4$	$15,0 \pm 2,6$
Ocitocina	$104,5 \pm 1,7$	$20,2 \pm 0,8$

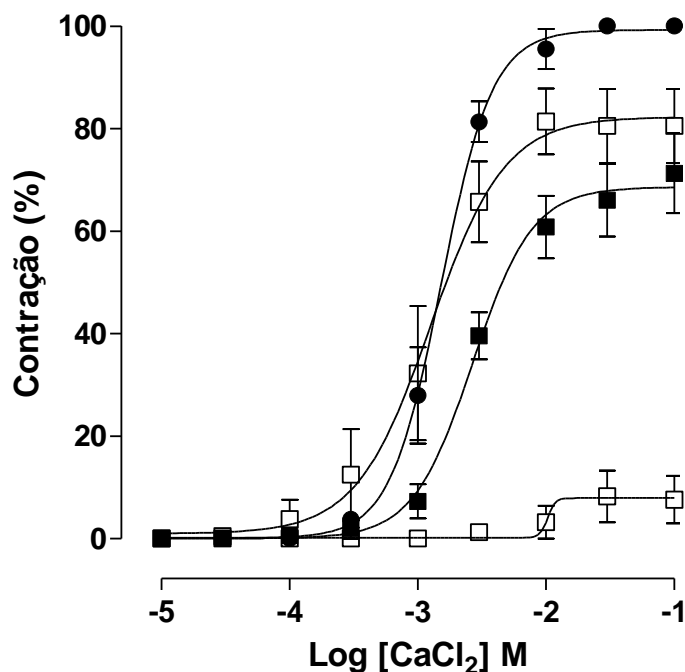
Fonte: Barros, 2016.

4.2.2.3 Avaliação da participação dos canais de cálcio dependentes de voltagem no efeito tocolítico do MS-OE em rata

4.2.2.3.1 Avaliação do efeito tocolítico do MS-OE frente às contrações induzidas por CaCl_2 em meio despolarizante (KCl 60 mM) nominalmente sem Ca^{2+}

O MS-OE (81 e 243 $\mu\text{g/mL}$, $n = 5$) inibiu as contrações cumulativas induzidas pelo aumento na concentração extracelular de CaCl_2 em meio despolarizante (KCl 60 mM) nominalmente sem Ca^{2+} . As curvas concentrações-resposta cumulativas ao CaCl_2 foram não paralelas com redução do E_{max} de 100% (controle) para $81,9 \pm 6,6$ (não significativa); $66,0 \pm 7,1$ e $8,2 \pm 5,1\%$, na presença de MS-OE nas concentrações de 27, 81 e 243 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente (Gráfico 4 e Tabela 4). Não houve diferença nos valores de CE_{50} do CaCl_2 na ausência ($1,5 \pm 0,2 \times 10^{-3}$ M, controle) e na presença de 27 e 81 $\mu\text{g/mL}$ do MS-OE ($1,5 \pm 0,4$; $2,8 \pm 0,1 \times 10^{-3}$ M, respectivamente) (Tabela 4).

Gráfico 4 – Curvas concentrações-resposta cumulativas ao CaCl_2 em meio despolarizante (KCl 60 mM) nominalmente sem Ca^{2+} na ausência (controle) (●) e na presença de 27 (○); de 81 (■) e de 243 $\mu\text{g/mL}$ (□) do MS-OE em útero isolado de rata



Os símbolos e as barras verticais representam a média e o e.p.m., respectivamente ($n = 5$). ANOVA *one-way* seguido do pós-teste de Bonferroni, $**p < 0,01$ e $***p < 0,001$ (Controle vs. MS-OE).

Fonte: Barros, 2016.

Tabela 4 – Valores de E_{\max} e de CE_{50} do CaCl_2 na ausência (controle) e na presença de 27, 81 e 243 $\mu\text{g/mL}$ do MS-OE em útero isolado de rata ($n = 5$)

MS-OE ($\mu\text{g/mL}$)	E_{\max} (%)	CE_{50} (M)
Controle	100	$1,5 \pm 0,2 \times 10^{-3}$
27	$81,9 \pm 6,6$	$1,5 \pm 0,4 \times 10^{-3}$
81	$66,0 \pm 7,1^{**}$	$2,8 \pm 0,1 \times 10^{-3}$
243	$8,2 \pm 5,1^{***}$	Nd

ANOVA *one-way* seguido do pós-teste de Bonferroni, $**p < 0,01$ e $***p < 0,001$ (Controle vs. MS-OE); Nd = não determinado.

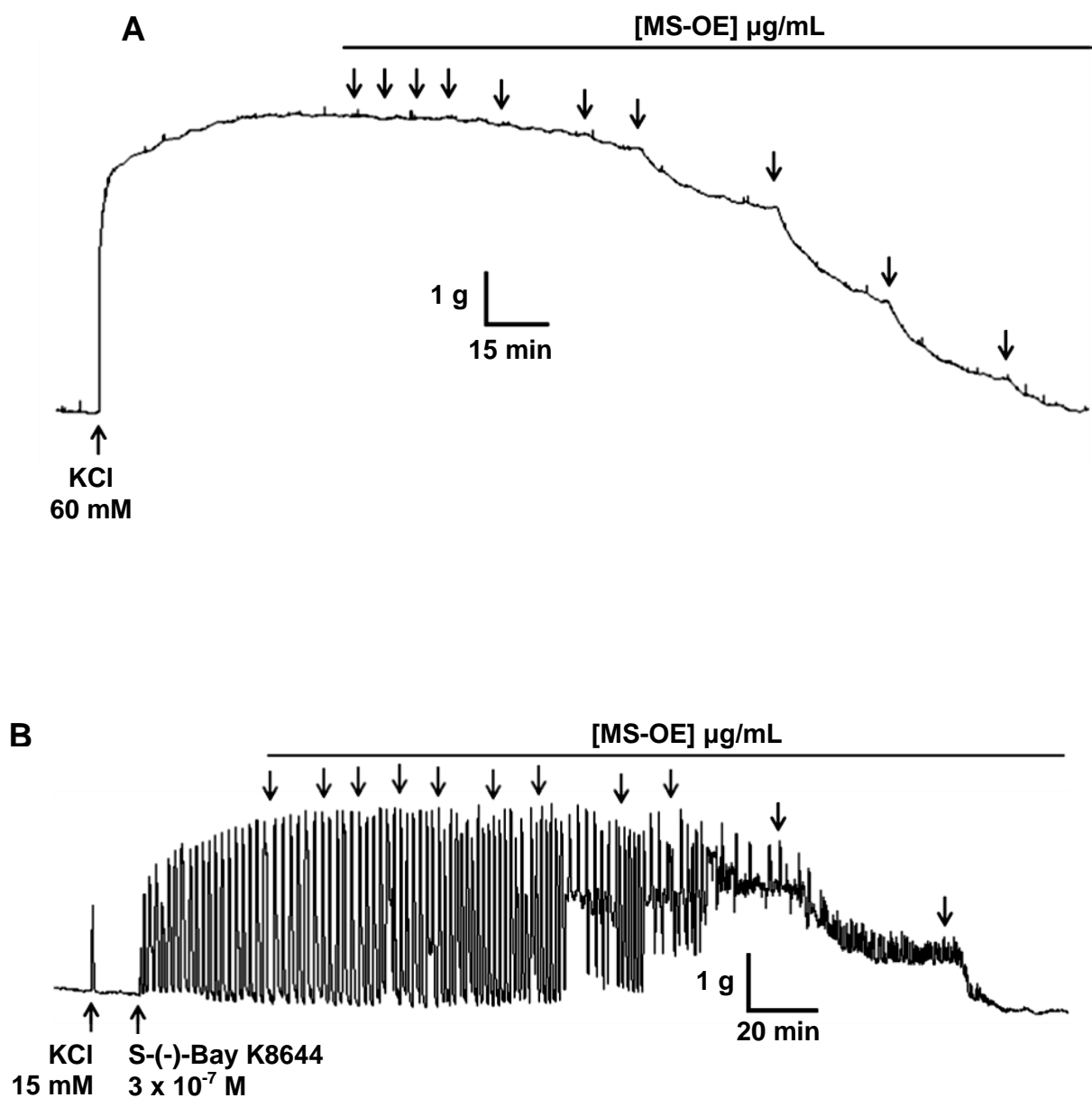
Fonte: Barros, 2016.

4.2.2.3.2 Avaliação do efeito tocolítico do MS-OE frente às contrações induzidas por S-(-)-Bay K8644

A potência tocolítica do MS-OE ($0,1-729 \mu\text{g/mL}$, $n = 5$) sobre o útero de rata pré-contraído com 3×10^{-7} M de S-(-)-Bay K8644 ($CE_{50} = 188,4 \pm 27,8 \mu\text{g/mL}$), um agonista dos Ca_v1 , em meio parcialmente despolarizado com 15 mM de KCl, foi reduzida em cerca de 12,6 vezes quando comparado ao útero pré-contraído com 60 mM de KCl ($CE_{50} = 15,0 \pm 2,6 \mu\text{g/mL}$) (Figura 8, Gráfico 5 e Tabela 5).

Os valores de E_{max} ($103,6 \pm 1,4$ e $119,3 \pm 16,3\%$, respectivamente) do MS-OE foram atingidos na concentração de $243 \mu\text{g/mL}$ para as contrações induzidas por KCl e de $729 \mu\text{g/mL}$ para as contrações induzidas por S-(-)-Bay K8644.

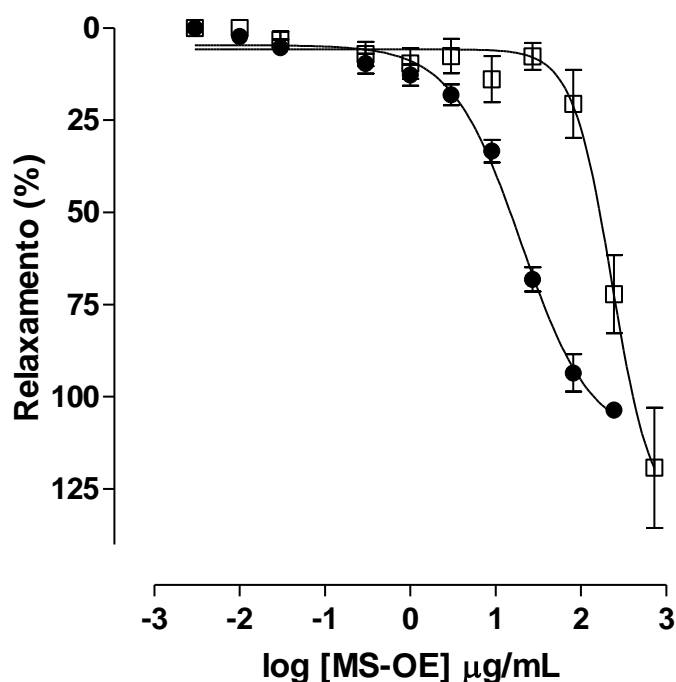
Figura 8 – Registros representativos do efeito tocolítico do MS-OE sobre as contrações tônicas induzidas por 60 mM de KCl (**A**) e por 3×10^{-7} M de S-(-)-Bay K8644 (**B**) em útero isolado de rata



As setas para baixo representam a adição cumulativa do MS-OE nas concentrações de 0,01; 0,03; 0,1; 0,3; 1; 3; 9; 27; 81 e 243 $\mu\text{g/mL}$ (**A**) e 0,01; 0,03; 0,1; 0,3; 1; 3; 9; 27; 81; 243 e 729 $\mu\text{g/mL}$ (**B**). MS-OE = óleo essencial de *Mesosphaerum suaveolens*; KCl = cloreto de potássio.

Fonte: Barros, 2016.

Gráfico 5 – Efeito tocolítico do MS-OE sobre as contrações tônicas induzidas por 60 mM de KCl (●) e por 3×10^{-7} M de S(-)-Bay K8644 (□) em útero isolado de rata



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

Fonte: Barros, 2016.

Tabela 5 – Valores de E_{max} e de CE_{50} do MS-OE sobre as contrações tônicas induzidas por 60 mM de KCl e por 3×10^{-7} M de S(-)-Bay K8644 em útero isolado de rata (n = 5)

Agentes contráteis	E_{max} (%)	CE_{50} (µg/mL)
KCl	$103,6 \pm 1,4$	$15,0 \pm 2,6$
S(-)-Bay K8644	$119,3 \pm 16,3$	$188,4 \pm 27,8^{***}$

Teste *t*, $^{***}p < 0,001$ (KCl vs. S(-)-Bay K8644). KCl = cloreto de potássio.

Fonte: Barros, 2016.

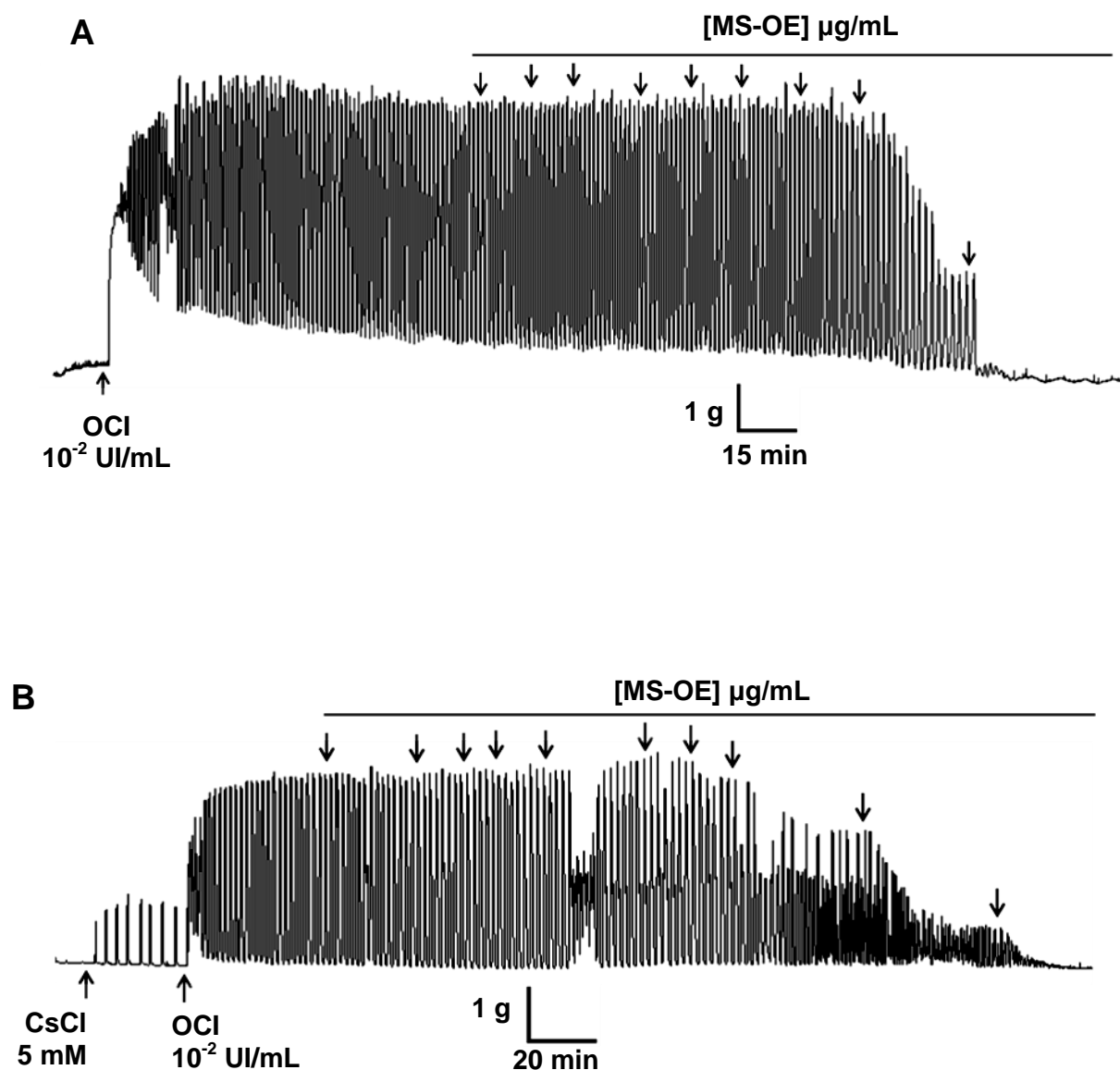
4.2.2.4 Avaliação da participação dos canais de potássio no efeito tocolítico do MS-OE em rata

4.2.2.4.1 Avaliação do efeito do MS-OE sobre as contrações tônicas induzidas por ocitocina na ausência e na presença de CsCl

A curva de relaxamento do MS-OE foi deslocada para a direita na presença de 5 mM de CsCl, um bloqueador não seletivo dos canais de potássio ($n = 5$). A potência relaxante do MS-OE ($CE_{50} = 32,2 \pm 2,0 \mu\text{g/mL}$) foi reduzida em aproximadamente 1,5 vezes quando comparada ao relaxamento produzido pelo óleo na ausência de CsCl ($CE_{50} = 20,2 \pm 0,8 \mu\text{g/mL}$) (Figura 9, Gráfico 6 e Tabela 6).

Os valores de E_{max} ($104,5 \pm 1,7$ e $105,9 \pm 1,9\%$) do MS-OE foram atingidos na concentração de 81 e 243 $\mu\text{g/mL}$ no controle e na presença de CsCl, respectivamente.

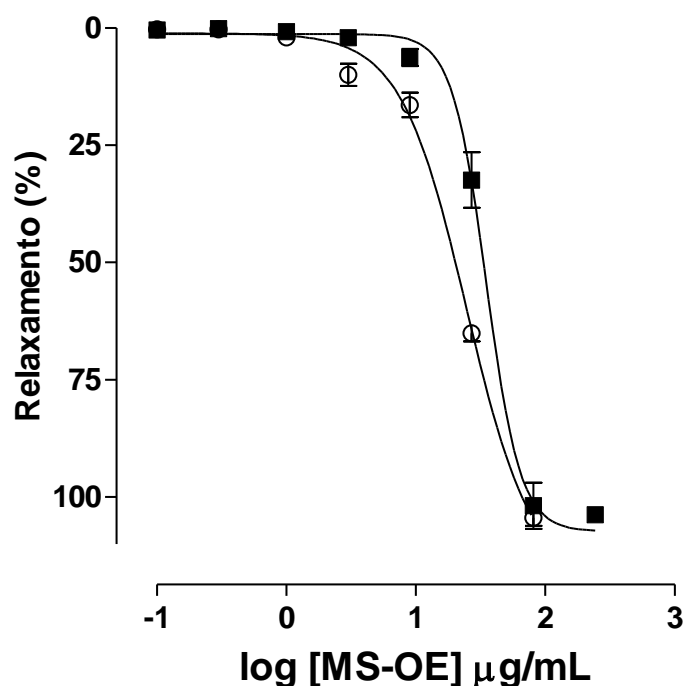
Figura 9 – Registros representativos do efeito tocolítico do MS-OE sobre as contrações tônicas induzidas por 10^{-2} UI/mL de ocitocina na ausência (A) e na presença (B) de 5 mM de CsCl em útero isolado de rata



As setas para baixo representam a adição cumulativa do MS-OE nas concentrações de 0,01; 0,03; 0,1; 0,3; 1; 3; 9, 27 e 81 $\mu\text{g/mL}$ (A) e 0,01; 0,03; 0,1; 0,3; 1; 3; 9, 27, 81 e 243 $\mu\text{g/mL}$ (B). MS-OE = óleo essencial de *Mesosphaerum suaveolens*; OCI = ocitocina; CsCl = cloreto de céσιο.

Fonte: Barros, 2016.

Gráfico 6 – Efeito tocolítico do MS-OE sobre as contrações tônicas induzidas por 10^{-2} UI/mL de ocitocina na ausência (○) e na presença (■) de 5 mM de CsCl em útero isolado de rata



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

Fonte: Barros, 2016.

Tabela 6 – Valores de E_{max} e de CE_{50} do MS-OE sobre as contrações tônicas induzidas por 10^{-2} UI/mL de ocitocina na ausência (○) e na presença (■) de 5 mM de CsCl em útero isolado de rata (n = 5)

Agentes contráteis	E_{max} (%)	CE_{50} (μg/mL)
OCI	$104,5 \pm 1,7$	$20,2 \pm 0,8$
CsCl + OCI	$109,2 \pm 1,9$	$32,2 \pm 2,0^{***}$

Teste *t*, $^{***}p < 0,001$ (OCI vs. CsCl + OCI). OCI = ocitocina; Cscl = cloreto de céσιο.

Fonte: Barros, 2016.

5 Discussão

Neste trabalho investigou-se, pela primeira vez, o efeito tocolítico do óleo essencial das folhas *Mesosphaerum suaveolens* (L.) Kuntze (MS-OE) (Lamiaceae) bem como parte do mecanismo de ação tocolítica de MS-OE. Demonstrou-se que esse óleo essencial exerce seu efeito pelo menos em parte pelo antagonismo pseudoirreversível dos receptores muscarínicos, além de envolver o bloqueio do influxo de Ca^{2+} via Ca_v1 , e ativação/modulação positiva dos canais de K^+ o que levaria a redução da $[\text{Ca}^{2+}]_c$ e conseqüente o relaxamento do músculo liso uterino.

O útero é um órgão oco que possui três camadas distintas de músculo liso, chamadas de endométrio, miométrio (camada muscular espessa) e de serosa (camada externa) (MAXIMOW; BLOOM, 1957; JUNQUEIRA; CARNEITO, 1995; FREITAS, 2006). O miométrio apresenta funções essenciais nos processos fisiológicos, como a implantação de embriões, bem como em distúrbios de dismenorreia, endometriose e aborto (AGUILLAR; MITCHELL, 2010; SILVA, 2013). Com base nisso, é de grande importância à busca de substâncias bioativas que contribuam para o alívio ou combate de processos patológicos associados a esse órgão.

Atualmente existem vários fármacos utilizados no tratamento de distúrbios de contratilidade uterina, desde os usados para cessar os processos de contrações (substâncias tocolíticas), que são utilizados para evitar aborto, alívio da dismenorreia (cólica uterina) ou cólicas menstruais, entre os usados atualmente estão os agonistas dos receptores adrenérgicos β (ritodrina, terbutalina), bloqueadores dos canais de cálcio (nifedipino), inibidores da síntese de prostaglandinas/anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs), antagonista dos receptores de ocitocina (atosibano) e sulfato de magnésio (GYETVAI, et al., 1999; OEI, 2006; GROOM, 2007; ARROWSMITH; KENDRICK; WRAY, 2010; KUNZEL et al., 2011). E para causar a contração uterina (agentes uterotônicos), auxiliando na indução do parto e na remoção de placenta retida, como os agonistas dos receptores muscarínicos, a ocitocina, bem como o seu análogo, a carbetocina, as prostaglandinas das famílias E (PGE_2) ou F ($\text{PGF}_{2\alpha}$) além dos seus análogos, alcaloides do ergot como a ergometrina e a metilergonovina (maleato de metilergometrina) e antagonistas dos receptores de progesterona, dos quais a mifepristona é a mais amplamente utilizada (WEI et al., 2010; GRUBBER; O'BRIEN, 2011; RIBEIRO, 2013).

Além disso, várias plantas medicinais já são utilizadas no tratamento de desordens relacionados com menstruação, gravidez e parto, como a *Chamomilla*

SP, *Foeniculum SP*, *Ruta graveolens*, *Salvia officinalis* (WESTFALL, 2001; ZHU et al., 2008; SILVA et al., 2012). Esses produtos apresentam metabólitos primários e secundários, sendo que os primeiros estão envolvidos diretamente no crescimento, no desenvolvimento e na reprodução das plantas, enquanto que os segundos exercem as funções de defesa e de sinalização, além de servirem como pigmento ou fragrância (MARIENHAGEN; BOTT, 2013).

Diante disso, encontram-se os óleos essenciais que são amplamente utilizados na indústria farmacêutica (BAKKALI et al., 2008). Alguns estudos demonstraram a atividade tocolítica de óleos essenciais em útero isolado de rata, como o óleo essencial de *Mentha pulegium* (SOARES et al., 2005), *Lippia microphylla* Cham. (SILVA, 2013; 2015), *Xylopi langsdorfiana*, *X. frutescens* e *R. leptopetala* (CORREIA, 2013; FERREIRA, 2014).

Essas substâncias possuem uma variedade de importantes funções biológicas e/ou fisiológicas, devido à variedade química de seus componentes, entre elas destacam-se as atividades bactericida, antioxidante, fungicida e espasmolítica (LANG; BUCHBAUER, 2012; SILVA, 2015). Inserido nesse contexto, encontra-se as espécies do gênero *Mesosphaerum*, que são utilizados popularmente para o alívio de doenças associadas às vias respiratórias, trato gastrintestinal e sistema reprodutor feminino (BASÍLIO et al., 2006).

Diante disso, decidiu-se investigar um possível efeito tocolítico do óleo essencial de *Mesosphaerum suaveolens* em útero isolado de rata.

Mesosphaerum suaveolens é utilizada para aliviar os sintomas de dismenorrea (AGRA et al., 1994; AGRA et al., 2008), que é caracterizada por dores intensas no primeiro dia da menstruação e, na maioria dos casos, é acompanhada por outros sintomas como náuseas, vômitos, palidez, cefaleia, diarreia, vertigem e desmaio (FONSECA, 2000). Cerca 50-70% das mulheres retratam cólicas uterinas e destas 10% não conseguem desenvolver atividades habituais, devido à presença dessas dores (IKEDA; SALOMÃO; RAMOS, 1999). Com base nisso, substâncias que atuem no útero promovendo efeito espasmolítico podem ser usadas no tratamento dessa desordem.

O hormônio e agente farmacológico mais conhecido por sua capacidade de induzir a contração uterina e, conseqüentemente, promover o trabalho de parto é a ocitocina (SMITH; MERRILL, 2006). Esse é produzido naturalmente nos núcleos paraventriculares e supraópticos do hipotálamo e armazenado e liberado pelo lobo

posterior da glândula pituitária. No trabalho de parto, a quantidade de ocitocina se eleva no plasma estimulando assim contração do útero grávido, especialmente no final da gestação. Esse hormônio também auxilia na ejeção de leite materno, causando a saída deste para os ductos (GUYTON; HALL, 2011). Atualmente, em estudos dos protocolos de utilização desta substância (taxa de administração de alta ou baixa dose) mostraram que a administração de alta dose está relacionada com a redução da taxa de partos cesarianos, um pequeno aumento na taxa de aborto espontâneo e no parto prematuro (WEI et al., 2010).

A contração uterina é dependente de vários mecanismos, dos quais os mais importantes são: a estimulação dos receptores de ocitocina OT, cuja presença no tecido do músculo liso uterino é aumentada pela ação do estrogênio o que acontece no final da gravidez. Os receptores OT são metabotrópicos acoplados a proteína $G_{q/11}$ e quando estimulados pela ocitocina, desencadeiam uma reação em cascata, gerando como segundos mensageiros IP_3 e DAG, que vão levar a um aumento de $[Ca^{2+}]$ no interior dos miócitos, além de estimular a síntese de prostaglandinas, que aumenta ainda mais a atividade uterina. A ocitocina aumenta a força e a frequência de contração uterina (WILLETS, 1999; DYER; VAN DYK; DRESNER, 2010; RIBEIRO, 2013).

Outros receptores no miométrio, também contribuem para a atividade uterina, como no caso de receptores muscarínicos M_3 , que também acoplam a proteína $G_{q/11}$, e quando ativados pela acetilcolina ou CCh, um éster de colina análogo da acetilcolina, vão levar a contração uterina. Esses receptores são responsáveis pela maior parte da contração desencadeada no músculo liso induzida por agonista muscarínico no trato urogenital inferior, incluindo a bexiga e o útero (BASHA et al., 2009).

A partir disso, resolveu-se investigar o efeito tocolítico do óleo essencial frente aos agonistas CCh e ocitocina, e foi observado que MS-OE antagonizou as contrações induzidas por CCh (Gráficos 1A) e por ocitocina (Gráficos 1B) de maneira dependente de concentração.

MS-OE foi mais potente em antagonizar as contrações quando eram induzidas por CCh (Tabela 1), indicando assim que provavelmente o efeito tocolítico desse óleo em rata pode se dar, em parte, pelo antagonismo dos receptores muscarínicos, porém não se descarta a inibição dos receptores de ocitocina.

Para testar esta hipótese decidiu-se investigar se o MS-OE estaria agindo nos receptores muscarínicos para promover seu efeito tocolítico. Para tanto, avaliou-se a caracterização do tipo de antagonismo exercido pelo MS-OE frente às curvas concentrações-resposta cumulativas ao CCh, e observou-se que na presença do óleo essencial, as curvas concentrações-respostas cumulativas ao CCh foram desviadas para direita de forma não paralela e com redução do E_{max} (Gráfico 2 e Tabela 2), descartando assim o antagonismo do tipo competitivo.

O antagonismo não competitivo ocorre quando há ligação de um antagonista ao mesmo sítio de ligação do agonista (antagonismo pseudoirreversível) ou em um sítio diferente (antagonismo alostérico) (BLUMENATHAL; GARRISON, 2011). Analisando-se o perfil das curvas do gráfico 2 observou-se que provavelmente o tipo de antagonismo exercido por MS-OE é pseudoirreversível, visto que, não houve saturação do efeito máximo, ou seja, a inibição da resposta contrátil ao CCh na presença de MS-OE não atingiu um valor limitante, o que é característico do antagonismo pseudoirreversível (BLUMENATHAL; GARRISON, 2011), porém, não se descarta a participação dos receptores OT no efeito tocolítico do MS-OE.

Sabe-se que o íon Ca^{2+} é um segundo mensageiro intracelular determinante para desencadear uma gama de processos celulares em neurônios, músculos e várias células excitáveis (BERRIDGE; DUPONT, 1995; BERRIDGE, 1997; BERRIDGE; BOOTMAN; LIPP, 1998; BERRIDGE; LIPP; BOOTMAN, 2000; BOOTMAN; LIPP; BERRIDGE, 2001; SCHUSTER; MARHL; HÖFER, 2002). Esse torna-se um regulador celular universal (CAMPBELL, 1983), primordial e responsável pela ativação da contração do músculo liso (NEERING; MORGAN, 1980; MORGAN; MORGAN, 1982).

Assim, a contração do músculo liso é mediada principalmente pelo aumento da $[Ca^{2+}]_c$, e esse aumento pode ser gerado tanto via despolarização de membrana, que ativa os Ca_v , como pela ligação de um agonista ao seu respectivo receptor, que pode ser independente do potencial de membrana (SOMLYO; SOMLYO, 2003), correspondendo aos acoplamentos eletromecânico e farmacomecânico, respectivamente (SOMLYO; SOMLYO, 1968).

A musculatura lisa possui uma resposta bifásica atribuída a uma fonte dual de Ca^{2+} . É sugerido que a contração fásica ocorra a uma resposta a uma liberação de Ca^{2+} dos estoques intracelulares (ABDEL-LATIF, 1989; KOBAYASHI et al., 1989), já a contração tônica pode ser causada através do influxo de Ca^{2+} pelos Ca_v (JIM et

al., 1981). Porém, o útero é um dos poucos órgãos que apresentam os dois componentes atuando de forma distinta, em determinadas fases ele apresenta contrações fásicas e em outras exibe contrações tônicas (YOUNG, 2007), e esta resposta bifásica pode ser em parte devido à fonte de Ca^{2+} no músculo liso, proveniente dos estoques intracelulares e do líquido extracelular (RIBEIRO, 2013).

Tendo em vista que os mecanismos envolvidos na manutenção da fase tônica são diferentes em relação aos da fase fásica da contração (ABDELLATIF, 1989; KOBAYASHI et al., 1989; HONDA; TAKANO; KAMIYA, 1996), resolveu-se investigar se o MS-OE relaxaria o útero de rata pré-contraído com KCl (acoplamento eletromecânico) e com ocitocina, que age por acoplamento misto (fármaco e eletromecânico) em útero isolado de rata. O MS-OE relaxou, de maneira significativa, equipotente e dependente de concentração, o útero pré-contraído tanto por KCl como por ocitocina (Figura 7A e 7B e Gráfico 3). Sabendo que um dos passos comuns às vias de sinalização desses agentes contráteis é a despolarização da membrana plasmática, o que leva a uma abertura dos Ca_v e conseqüentemente um influxo de Ca^{2+} , resultando na manutenção da fase tônica da contração (WRAY, 1993), levantou-se a hipótese de que o MS-OE agiria por bloqueio do influxo de Ca^{2+} para exercer seu efeito tocolítico.

Para confirmar ou descartar essa hipótese foram construídas curvas concentrações-resposta cumulativa ao CaCl_2 em meio despolarizante (KCl 60 mM) nominalmente sem Ca^{2+} , na ausência e na presença de diferentes concentrações do óleo essencial. Este protocolo tem como fundamento o fato que a contração ocorre, quase que exclusivamente pelo Ca^{2+} proveniente do meio extracelular, já que a despolarização promovida pela elevada $[\text{K}^+]_e$ induz a abertura dos Ca_v (REMBOLD, 1996). Observou-se que as curvas cumulativas ao CaCl_2 foram não paralelas com redução do E_{max} (Gráfico 4 e Tabela 4). Esses resultados indicam que provavelmente o MS-OE bloqueia o influxo de Ca^{2+} o que leva a redução da $[\text{Ca}^{2+}]_c$ levando ao relaxamento do músculo liso. Resultados semelhantes foram observados para o extrato etanólico bruto de *Hyptis macrostachys* em íleo de cobaia (SOUZA et al., 2013).

Os Ca_v estão presentes na membrana celular da maioria das células excitáveis, eles são formados por um complexo hetero-oligomérico. No músculo liso, a subfamília dos Ca_v1 é a principal responsáveis pelo influxo de Ca^{2+} e o sítio de ligação para seus bloqueadores está na subunidade $\alpha1$, embora nele existam quatro

outras unidades complexadas (2 α , 1 β e 1 γ) (VOGALIS et al., 1991; KURIYAMA; KITAMURA; NABATA, 1995; KNOT; BRAYDEN; NELSON, 1996). No miométrio de rata são encontrados tanto canais lentos de Ca_v1 assim como canais rápidos de Na^+ , porém não apresentam os canais de Ca^{2+} do tipo T, já no miométrio de humanos é expresso os canais de Ca^{2+} dos tipos L (Ca_v1) e T (ASOKAN et al., 2002). Além disso, já é bem elucidado que em útero de rata os Ca_v1 , em resposta a uma despolarização de membrana, levam ao influxo de Ca^{2+} e, conseqüentemente, à contração (WRAY et al., 2003).

Com o intuito de avaliar se o tipo de Ca_v envolvido na ação tocolítica do MS-OE em útero isolado de rata seria os Ca_v1 , avaliou-se o seu efeito sobre as contrações tônicas induzidas pelo derivado di-hidropiridínico S-(-)-Bay K8644, um agonista seletivo dos Ca_v1 , que age por ligação direta na sua subunidade $\alpha1$ e não por despolarização (SPEDDING; PAOLETTI, 1992).

A potência relaxante do MS-OE foi atenuada no órgão pré-contraído com o S-(-)-Bay K8644 quando comparado com a contração com KCl (Figura 8 e Gráfico 5). O fato da potência relaxante do MS-OE ter sido maior frente ao KCl do que com Bay K8644 está em conformidade com o observado com o nifedipino, fármaco padrão bloqueador dos Ca_v1 (dados do nosso laboratório ainda não publicados). Portanto, esse dado sugere que o óleo essencial esteja agindo por um bloqueio do influxo de Ca^{2+} via os Ca_v1 .

Diferente do Bay K8644 que só induz contração por ativar os Ca_v1 , ligando-se na subunidade alfa, que forma o poro do canal, na contração induzida por KCl, além da despolarização de membrana, existem outros mecanismos envolvidos na manutenção da contração tônica tais como, a participação da via de sensibilização ao Ca^{2+} , envolvendo a translocação e ativação da RhoA, assim como a ativação da proteína cinase II dependente de Ca^{2+} /calmodulina (CaMKII), da proteína cinase regulada por sinal extracelular (ERK) ou a mobilização de cálcio dos estoques intracelulares (RATZ et al., 2005; MURTHY, 2006).

No entanto, não se descarta outros mecanismos que possam estar envolvidos no mecanismo de ação tocolítica do MS-OE em útero de rata como, por exemplo, a modulação positiva dos canais de K^+ .

Sabendo que os canais de potássio desempenham um papel fundamental na regulação do potencial de membrana e na excitabilidade celular, sendo a contração do músculo liso dependente do balanço entre o aumento da condutância ao íon K^+ ,

levando a uma repolarização/hiperpolarização, e a diminuição da condutância a este íon, ocasionando uma despolarização de membrana (KNOT et al., 1996). Estes canais estão relacionados a várias funções fisiológicas, tais como a manutenção do potencial de repouso das membranas celulares e a secreção de hormônios e neurotransmissores. Sua atividade pode ser regulada por voltagem, íons Ca^{2+} , neurotransmissores e suas vias de sinalização, estímulos químicos e físicos, incluindo a tensão de oxigênio, pH, lipídios, estiramento mecânico, GPCRs, entre outros estímulos (LESAGE; LAZDUNSKI, 2000; ALEXANDER; MATHIE; PETERS, 2007). O movimento de íons K^+ por canais localizados na membrana regulam o influxo de Ca^{2+} através dos Ca_v (THORNELOE; NELSON, 2005).

Em células do miométrio, o efluxo de potássio leva a uma repolarização da membrana, e tal efluxo é a corrente iônica primária responsável pela manutenção do potencial de repouso no útero. Na musculatura uterina, os canais de K^+ mais expressos e mais estudados são os canais de potássio dependentes de voltagem (K_v), canais de potássio ativados por cálcio de grande condutância (BK_{Ca}); canais de potássio ativados por cálcio de pequena condutância (SK_{Ca}) e canais de potássio sensíveis ao ATP (K_{ATP}) (BRAINARD; KOROVKINA; ENGLAND, 2007).

É descrito na literatura evidências da participação de vários desses canais na regulação do músculo liso, tanto em nível funcional como em nível eletrofisiológico, como por exemplo: K_v em íleo de cobaia (LIMA, 2004; CAVALCANTE, 2008), útero de rata (FERREIRA, 2014; SILVA, 2015) e aorta de rato (RIBEIRO et al., 2007a); BK_{Ca} em músculo longitudinal de íleo de cobaia (UYAMA; IMAIZUMI; WATANABE, 1993), miométrio humano (ANWER et al., 1993, MEERA et al., 1995), traqueia de cão (WADE; SIMS, 1993), aorta de coelho (DEMIREL et al., 1994), traqueia de cobaia (HIRAMATSU et al., 1994; RIBEIRO, 2007), traqueia de porco (KUME et al., 1994; KANNAN; JOHNSON, 1995; YAMAKAGE; HIRSHMAN; CROXTON, 1996), artérias submucosas e mesentéricas de cobaia (HILL et al., 1997), íleo de cobaia (SILVA; NOUAILHETAS; ABOULAFIA, 1999; CAVALCANTE, 2001; CAVALCANTE, 2008; LIMA, 2008), artéria mesentérica de rato (OLIVEIRA et al., 2004), útero de rata (LIMA, 2008, TRAVASSOS et al. 2009; SILVA, 2015); SK_{Ca} em aorta de rato (SILVA et al., 1994), útero de rata (SILVA; OKUYAMA; PAIVA, 1996; SILVA, 2015) e íleo de cobaia (CAVALCANTE, 2008, MACÊDO, 2008). K_{ATP} em íleo (SUN; BENISHIN, 1994; CAVALCANTE, 2008, MACÊDO, 2008) e traqueia de cobaia (SHIKADA; TANAKA, 1995), músculo longitudinal de íleo de rato (DAVIES; McCURRIE; WOOD,

1996), uretra de cobaia (TERAMOTO; BRADING; ITO, 1999), traqueia de gato (TERAMOTO; NAKASHIMA; ITO, 2000) e útero de rata (SILVA, 2015).

Tendo em vista a importância dos canais de K^+ na musculatura do miométrio e de sua capacidade de modular os Ca_v na resposta contrátil, e para comprovar se o MS-OE estaria ativando ou modulando positivamente os canais de K^+ para exercer seu efeito tocolítico em rata, utilizou-se o CsCl, um bloqueador não seletivo desses canais (CECHI et al., 1987; LATORRE et al., 1989). Observou-se que a curva de relaxamento do MS-OE foi deslocada para direita na presença de 5 mM de CsCl com redução da potência relaxante (Gráfico 5), sugerindo assim a participação desses canais na atividade espasmolítica do MS-OE em útero de rata. No entanto, são necessários outros estudos para esclarecer como esse óleo essencial modula esses canais e quais os subtipos de canais de K^+ estão envolvidos nesse efeito.

Com base nesses resultados demonstrou-se que o mecanismo de ação tocolítica do MS-OE, em ratas virgens, envolve o antagonismo de receptores muscarínicos do tipo não competitivo pseudoirreversível, além de envolver o bloqueio do influxo de Ca^{2+} via Ca_v1 e ativação/modulação positiva dos canais de K^+ , o que ocasionaria uma redução na $[Ca^{2+}]_c$ e por conseguinte relaxamento desse órgão. Espera-se que esses resultados contribuam para o estudo de espécies da família Lamiaceae, como possíveis ferramentas farmacológicas para tratar os distúrbios uterinos mencionados além de respaldar, pelo menos em parte, o uso popular dessa espécie para distúrbios de dismenorreia.

6 Conclusões

Na investigação do efeito tocolítico *in vitro* do óleo essencial das folhas de *Mesosphaerum suaveolens* (L.) Kuntze (MS-OE) em rata pode-se concluir que:

- ✓ O óleo essencial apresentou efeito tocolítico em rata, sendo mais potente frente ao carbacol;
- ✓ O tipo de antagonismo exercido nos receptores muscarínicos pelo MS-OE é do tipo não competitivo pseudoirreversível;
- ✓ O MS-OE bloqueia o influxo de Ca^{2+} provavelmente através dos Ca_v1 ;
- ✓ O efeito tocolítico do MS-OE envolve a modulação positiva dos canais de K^+ .

Referências

ABDELLATIF, A. A. Calcium mobilizing receptors, polyphospholinositides, generation of second messengers and contraction in mammalian smooth muscle: historical perspectives and current status. *Life Sciences*, v. 45, p. 757-786, 1989.

AGRA, M. F.; FREITAS, P. F.; 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.

AGRA, M. F.; SILVA, K. N.; BASÍLIO, I. J. L. D.; FRANÇA, P. F.; BARBOSA-FILHO, J. M. Survey of medicinal plants used in the region Northeast of Brazil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, p. 472 - 508, 2008.

AGUILAR, H. N.; MITCHELL, B. F. Physiological pathways and molecular mechanisms regulating uterine contractility. **Human Reproduction Update**, v. 16, n. 6, p. 725-744, 2010.

ALEXANDER, S. P. H.; MATHIE, A.; PETERS, J. A. Guide to Receptors and Channels (GRAC). **British Journal of Pharmacology**, v. 150, p. S1 – S168, 2007.

ALEXANDER, S. P. H.; MATHIE, A.; PETERS, J. A. Guide to receptors and channels (GRAC), 5nd edition. **British Journal of Pharmacology**, v. 164 (Supl. 1), p. S1-S324, 2011.

ANWER, K.; OBERTI. C.; PEREZ, G. J.; PEREZ-REYES, N.; McDOUGALL, J. K.; MONGA, M.; SANBORN, B. M.; STEFANI, E.; TORO, L. Calcium-activated K⁺ channels as modulators of human myometrial contractile activity. **American Journal of Physiology**, v. 265, n. 4, p. C976-C985, 1993.

ARRIGONI-BLANKA, M. F.; ANTONIOLLI, A. R.; CAETANO, L. C.; CAMPOS, D. A.; BLAMK, A. F.; ALVES, P. B. Antinociceptive activity of the volatile oils oh *Hyptis pectinata* L. Poit. (Lamiaceae) genotypes. **Phytomedicine**, v. 15, p. 334-339, 2008.

ARUNLAKSHANA, O.; SCHILD, H. O. Some quantitative uses of drug antagonists. **British Journal of Pharmacology**, v. 14, p. 48-58, 1959.

ARZAVE, V. C.; ANTONIO, C. L.; ARRIETA, J.; HERNÁNDEZ, C. G.; MENDEZ, A. M. V.; RAMIREZ, A. R.; MENDOZA, M. E. S. Gastroprotection of Suaveolol, Isolated from *Hyptis suaveolens*, against Ethanol-Induced Gastric Lesions in Wistar Rats: Role of Prostaglandins, Nitric Oxide and Sulfhydryls. **Molecules**, v. 17, p. 8917-8927, 2012.

ASOKAN, K. T.; SARKAR, S. N.; MISHRA, S. K.; RAVIPRAKASH, V. Effects of mibefradil on uterine contractility. **European Journal of Pharmacology**, v. 455, p. 65-71, 2002.

ATTAH, F. A.; O'BRIEN, M.; KOEHBACH, J.; SONIBARE, A. M.; MOODY, O. J.; SMITH, J. T.; GRUBER, W. C. Uterine contractility of plants used to facilitate childbirth in Nigerian ethnomedicine. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 143, p. 377-382, 2012.

BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils – A review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, p. 446-475, 2008.

BARBOSA, P. P. P.; BARBOSA C. P. Studies on the antiulcerogenic activity of the essential oil of *Hyptis mutabilis* Briq.in rats. **Phytotherapy Research**, v. 6, n. 2, p. 114-115, 1992.

BASÍLIO, I. J. L. D.; AGRA, M. F.; ROCHA, E. A.; LEAL, C. K. A.; ABRANTES, H. F. Estudo farmacobotânico comparativo das folhas de *Hyptis pectinata* (L.) Poit. e *Hyptis suaveolens* (L.) Poit. (Lamiaceae). **Acta Farmacéutica Bonaerense**, v. 25, n. 4, p. 518-525, 2006.

BERRIDGE, M. J; DUPONT, G. Spatial and temporal signalling by calcium. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 6, p. 267-274, 1995.

BERRIDGE, M. J. Elementary and global aspects of calcium signalling. **Journal of Physiology**, v. 499, p. 291-306, 1997.

BERRIDGE, M. J. Elementary and global aspects of calcium signalling. **Journal of Physiology**, v. 499, p. 291-306, 1997. BERRIDGE, M. J.; BOOTMAN, M. D.; LIPP, P. Calcium – a life and death signal. **Nature**. v. 395, p. 645-648, 1998.

BERRIDGE, M. J.; LIPP, P.; BOOTMAN, M. D. The versatility and universality of calcium signaling. **Natural Reviews**, v. 1, p. 11-21, 2000.

BERRIDGE, M. J. Smooth muscle cell calcium activation mechanisms. **The Journal of Physiology**, v. 586, n. 21, p. 5047-5061, 2008.

BERRIDGE, M. J. Cell Signalling Pathways. In: **Cell Signalling Biology**. Portland Press Limited , p. 1-118, 2009a.

BERRIDGE, M.J. Cell signalling pathways. In: Berridge, M.J. **Cell Signalling Biology**. Portland: Press Limited, pp. 1-130, 2012.

BEZERRA, P. R. P; MEIRELES, D. R. P; FERNANDES, H. M. B; OLIVEIRA-FILHO, A. A. O. Análise farmacoepidemiológica dos medicamentos fitoterápicos dispensados em uma farmácia comunitária no sertão paraibano. **Revista Interdisciplinar em Saúde**, n. 2, v. 2, p.177-195, 2015.

BHAKUNI, D.S.; DHAWAN, B.N.; MEHROTRA, B.N. Dhar Sreening of Indian plants for biological activity: part III. **Indian Journal of Experimental Biology**, v.9, p.91-102, 1970.

BLAUSTEIN, M.P. Sodium/calcium exchange in cardiac, smooth and skeletal muscles: key to the control of contractility. **Current Topics in Membranes and Transport**, p. 289-330, 1989.

BLUMENTHAL, D. K.; GARRISON, J. C. Pharmacodynamics: molecular mechanisms of drug action. In: BRUNTON, L. L.; CHABNER, B. A.; KNOLLMANN, B. C. (Ed) **Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics**. 12th ed. San Diego, CA: The McGraw-hill Companies, Inc. 2011.

BRAINARD, A. M.; KOROVIKINA, V. P.; ENGLAND, S. K. Potassium channels and uterine function. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v. 18, n. 3, p. 332–339, 2007.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução da Diretoria Colegiada - RDC nº 26**, de 13 de maio de 2014. Brasília, DF, 2014.

BRASIL. Ministério da Saúde, Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. **Política nacional de plantas medicinais e fitoterápicos**, Brasília, DF, p. 60, Série B, 2006.

BRAVIM, L. S. **Avaliação da atividade antinociceptiva e antiinflamatória do óleo essencial de *Hyptis crenata* (Pohl) ex Benth.** 2008. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Pará, Belém.

BOOTMAN, H.; LIPP, P.; BERRIDGE, M. J. The organization and functions of local Ca²⁺ signals. **Journal of Cell Science**, v. 114, p. 2213-2222, 2001.

BUTLER, M. S. Natural products to drugs: natural product-derived compounds in clinical trials. **Natural Product Reports**, v. 25, p. 475-516, 2008.

CALDAS, G. F. R.; COSTA, I. M. A.; SILVA, J. B. R.; NOBREGA, R. F.; RODRIGUES, F. F. G.; COSTA, J. G. M.; WANDERLEY, A. G. Antiulcerogenic activity of the essential oil of *Hyptis martiusii* Benth. (Lamiaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 137, p. 886-892, 2011.

CALIXTO, J. B.; RAE, G. A. Effects of endothelins, Bay K 8644 and other oxytocics in non-pregnant and late pregnant rat isolated uterus. **European Journal of Pharmacology**, v. 192, p. 109-116, 1991.

CARAFOLI, E.; BRINI, M. **Calcium signalling and disease: molecular pathology of calcium**. [S.l.]: Springer, 2007.

CARREIRO, J. N. **Ação tocolítica de 3,6-dimetil éter galeatina, flavonoide isolado de *Piptadenia stipulacea* (Benth.) Ducke, envolve canais de potássio em útero de rata.** Dissertação (Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) – Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2012.

CATTERALL, W. A. Voltage-gated calcium channels. In: **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 11, p. 1-24, 2011.

CATTERALL, W. A.; PEREZ-REYES, E.; SNUTCH, T. P.; STRIESSNIG, J. International Union of Pharmacology. XLVIII. Nomenclature and structure-function

relationships of voltage-gated calcium channels. **Pharmacological Reviews**, v. 57, p. 411-425, 2005.

CAVALCANTE, F. A. Mecanismo de ação espasmolítica de solavetivona, sesquiterpeno isolado das partes aéreas de *Solanum jabrense* Agra & Nee (SOLANACEAE). **Dissertação (Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos)**. Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Paraíba, 2001.

CAVALCANTE, F. A. Investigação dos efeitos citotóxico e espasmolítico do lapachol e de seus derivados naturais e sintéticos: relação estrutura-atividade e mecanismo de ação. **Tese (Doutorado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos)**. Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Paraíba, 2008.

CAVALCANTI, B. C.; MOURA, D. J.; ROSA, R. M.; MORAES, M. O.; ARAUJO, E. C. C.; LIMA, M. A. S.; SILVEIRA, E. R.; SAFFI, J.; HENRIQUE, J. A. P.; PESSOA, C.; COSTA-LOTUFO, L. V. Genotoxic effects of tanshinones from *Hyptis martiusii* in V79 cell line. **Food and Chemical Toxicology**, V. 46, P. 388-392, 2008.

CECCHI, X.; WOLFF, D.; ALVAREZ, O.; LATORRE, R. Mechanisms of Cs⁺ blockade in a Ca²⁺-activated K⁺ channel from smooth muscle. **Biophysical Journal**, v. 52, p. 707-716, 1987.

CECHINEL-FILHO, V.; YUNES, R. A.; Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. **Química Nova**, v.21, n. 1, p. 99-105, 1998.

CHUKWUJEKW, J. C.; SMITH, P.; COOMBES, P. H.; MULHOLLAND, D. A.; STANDEN, J. V. Antiplasmodial diterpenoid from the leaves of *Hyptis suaveolens*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 102, p. 295-297, 2005.

CONTE-CAMERINO, D.; LOGRANO, M. D.; DE LUCIA, A.; PERSICHELLA, M.; COSTA, J. G. M.; RODRIGUES, F. F. G.; ANGÉLICO, E. C.; SILVA, M. R.; MORA, M. L.; SANTOS, N. K. A.; CARDOSO, A. L. H.; LEMOS, T. L. G. Estudo químico-biológico dos óleos essenciais de *Hyptis martiusii*, *Lippia sidoides* e *Syzygium aromaticum* frente as larvas do *Aedes aegypti*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, n. 4, p. 304-309, 2005.

CORREIA, A. C. C. **Participação dos canais de potássio na ação espasmolítica de *Solanum agrarium* SENDTNER em íleo de cobaia e útero de rata**. Dissertação (Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) – Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2009.

COSTA, V. C. O. **Contribuição ao conhecimento químico de espécies de *Hyptis* com ocorrência no semiárido paraibano: *Hyptis macrostachys* Benth. e *Hyptis umbrosa* Salzm. ex Benth.** 2013. Tese (Doutorado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) – Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa.

COSTA-LOTUFO, L. V.; ARAÚJO, E. C.; LIMA, M. A.; MORAES, M. E.; PESSOA, C.; SILVEIRA, E. R.; MORAES, M. O. Antiproliferative effects of abietane diterpenoids isolated from *Hyptis martiusii* Benth (Labiatae). **Pharmazie**, v. 59, p. 78-79, 2004.

COSTA-LOTUFO, L. V.; MONTENEGRO, R. C.; ALVES, A. P. N. N.; MADEIRA, S. V. F.; PESSOA, C.; MORAES, M. E. A.; MORAES, M. O. A Contribuição dos Produtos Naturais como Fonte de Novos Fármacos Anticâncer: Estudos no Laboratório Nacional de Oncologia Experimental da Universidade Federal do Ceará. **Revista Virtual de Química**, v. 2, n. 1, p. 47-58, 2010.

COUTINHO, H. D. M.; COSTA, J. G. M.; SIQUEIRA-JÚNIOR, J. P.; LIMA, E. O. *In vitro* anti-staphylococcal activity of *Hyptis martiusii* Benth against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*-MRSA strains. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, p. 670-675, 2008.

DAVIES, M. P.; McCURRIE, J. R.; WOOD, D. Comparative effects of K⁺ channel modulating agents on contractions of rat intestinal smooth muscle. **European Journal of Pharmacology**, v. 297, n. 3, p. 249-256, 1996.

DAVILA, P. W. S.; ESTRADA, G. F. **Fitodinamia del efecto sinérgico del extracto acuoso de las hojas de *Medicago sativa* sobre oxitocina en útero aislado de *Rattus rattus* var . *albinus***. 2015. Monografia (Bacharelado em Farmácia e Bioquímica). Universidad Nacional de Trujillo, Trujillo, Peru.

DEMIREL, E.; RUSKO, J.; LASKEY, R. E.; ADAMS, D. J.; VAN BREEMEN, C. TEA inhibits ACh-induced EDRF release: endothelial Ca²⁺-dependent K⁺ channels contribute to vascular tone. **The American Journal of Physiology**, v. 267, n. 2, H1135-H1141, 1994.

FALCÃO, D. Q.; FERNANDES, S. B. O.; MENEZES, F. S. Triterpenos de *Hyptis fasciculata* Benth. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 13, p. 81 - 83, 2003.

FALCÃO, D. Q.; MENEZES, F. S. Revisão etnofarmacológica, farmacológica e química do gênero *Hyptis*. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 84, n. 3, p. 81-83, 2003.

FERREIRA, P. B. **A ação tocolítica do óleo essencial de *Rollinia leptopetala* R. E. Fries envolve a modulação positiva dos canais de potássio em útero isolado de rata**. Dissertação (Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) – Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2014.

FRANCONI, F. The effects of the calcium channel agonist, Bay K8644, on guinea-pig ileum ant rat uterine horn. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 39, p. 954-957, 1987.

GHAFFARI, H.; GHASSAM, B. J.; NAYAKA, S. C.; KINI, K. R.; PRAKASH, H. S. Antioxidant and Neuroprotective Activities of *Hyptis suaveolens* (L.) Poit. Against Oxidative Stress-Induced Neurotoxicity. **Cellular and Molecular Neurobiology**, v. 10, 2014.

GHAFFARI, H.; GHASSAM, B. J.; PRAKSAH, HS. Hepatoprotective and cytoprotective properties of *Hyptis suaveolens* against oxidative stress-induced damage by CCl₄ and H₂O₂. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, p. 868-874, 2012.

GRASSI, P.; REYES, T. S. U.; SOSA, S.; TUBARO, A.; HOFER, O.; ZITTERLEGLSE, K. Anti-Inflammatory Activity of Two Diterpenes of *Hyptis suaveolens* from El Salvador. **Zeitschrift für Naturforschung**, v. 61, p. 165-170, 2006.

GRUBER, C. W.; O'BRIEN, M. Uterotonic Plants and their Bioactive Constituents. **Planta Medica**, v. 77, n. 3, p. 207-220, 2011.

HARLEY, R. M. Checklist and key of genera and species of the Lamiaceae of the Brazilian Amazon. **Rodriguésia**, v. 63, n. 1, p. 129-144, 2012.

HARLEY, R. M.; PASTORE, J. F. B. A generic revision and new combinations in the Hyptidinae (Lamiaceae), based on molecular and morphological evidence. **Phytotaxa**. v. 58, p. 1-55, 2012.

HARVEY, A. L. Natural products in drug Discovery. **Drug Discovery Today**, v. 13, p. 894-901, 2008.

HENRIQUE, A. T.; SIMÕES-PIRES, C.; APEL, M. A. Óleos essenciais: importância e perspectiva terapêuticas. In: YUNES, R. A.; CECHINEL-FILHO, V. **Química de produtos naturais, novos fármacos e a moderna farmacognosia**. Itajaí: Universidade do Vale do Itajaí, Cap. IX, p. 221-256, 2009.

HIRAMATSU, T.; KUME, H.; KOTLIKOFF, M. I.; TAKAGI, K. Role of calcium-activated potassium channels in the relaxation of tracheal smooth muscles by forskolin. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 21, n. 5, p. 367-375, 1994.

HILL, C. E.; KIRTON, A.; WU, D. D.; VANNER, S. J. Role of maxi-K⁺ channels in endothelin-induced vasoconstriction of mesenteric and submucosal arterioles. **American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 36, n. 5, p. G1087-G1093, 1997.

HONDA, K.; TAKANO, Y.; KAMIYA, H. Involvement of protein kinase C in muscarinic agonist-induced contractions of guinea pig ileal longitudinal muscle. **General Pharmacology**, v. 27, n. 6, p. 957-961, 1996.

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

JIM, K.; HARRIS, A.; ROSENBERGER, L. B.; TRIGGLE, D. J. Stereoselective and non-stereoselective effects of D 600 (methoxyverapamil) in smooth muscle. **European Journal of Pharmacology**, v. 76, p. 62-72, 1981.

JOHN, J. E. Natural products as lead structures: a role for biotechnology. **Drug Discovery Today**. v. 15, n 11/12, p. 409-410, 2010.

KANNAN, M. S.; JOHNSON, D. E. Modulation of nitric oxide-dependent relaxation of pig tracheal smooth muscle by inhibitors of guanylyl cyclase and calcium activated potassium channels. **Life Science**, v. 56, n. 25, p. 2229-2238, 1995.

KNOT, H. T.; BRAYDEN, E. J.; NELSON, M. T. Calcium channels and potassium channels. In BÁRÁNY, M. **Biochemistry of smooth muscle contraction**, p. 203-219, 1996.

KOBAYASHI, S.; KITAZAWA, T.; SOMLYO, A. V.; SOMLYO, A. P. Cytosolic heparin inhibits muscarinic and α -adrenergic Ca^{2+} -release in smooth muscle: physiological role of inositol 1,4,5-trisphosphate in pharmacomechanical coupling. **Journal of Biological Chemistry**, v. 264, p. 17997 - 18004, 1989.

KUME, H.; HALL, I.P.; WASHABAU, R.J.; TAKAGI, K.; KOTLIKOFF, M. I. α -Adrenergic agonists regulate Kca channels in airway muscle by cAMP-dependent and -independent mechanisms. **Journal of Clinical Investigation**, v. 93, n. 1, p. 371-379, 1994.

KURIYAMA, H.; KITAMURA, K.; NABATA, H. Pharmacological and physiological significance of ion channels and factors that modulate them in vascular tissues. **Pharmacological Reviews**, v. 47, n. 3, p. 387-573, 1995.

OLIVEIRA, A. P.; FURTADO, F. F.; ALMEIDA, F. R. C.; MEDEIROS, I. A. Involvement of calcium activated large conductance potassium channel BK_{Ca} in vasorelaxant effect of labdane-302. In: XXXVI Congresso brasileiro de farmacologia, 2004, Águas de Lindóia-SP. XXXV **Congresso Brasileiro de Farmacologia**. São Paulo-SP: SBFTE, v. ÚNICO, p. 268-269, 2004.

LATORRE, R.; OBERHAUSER, A.; LABARCA, P.; ALVAREZ, O. Varieties of calcium-activated potassium channels. **Annual Review of Physiology**, v. 51, p. 385-399, 1989.

LESAGE, F.; LAZDUNSKI, M. Molecular and functional properties of two-pore-domain potassium channels. **American Journal of Physiology. Renal Physiology**, 279 (5).F793-801, 2000.

LIMA, J. T. Ação espasmolítica do 3, 4, 5, 8-tetrametoxi-(6, 7, 2'', 3'')-furanoflavona. Obtida de *Diploptropis ferruginea* Benth. (FABACEAE), envolve ativação de canais de potássio. **Dissertação (Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos)**. Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Paraíba, 2004.

LIMA, R. K.; CARDOSO, M. G. Família Lamiaceae: importantes óleos essenciais com ação biológica e antioxidante. **Revista Fitos**, v. 3, n. 3, p. 14 - 24, 2007.

LIMA, J. T. Caracterização do envolvimento dos BK_{Ca} no mecanismo de ação espasmolítica de diploptropina em íleo de cobaia e útero de rata e estudo comparativo do seu análogo sintético. **Tese (Doutorado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos)**. Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Paraíba, 2008.

LOPES, I. L. M.; JARDIM, M. A. G. Fenologia, biologia floral e germinação de plantas aromáticas: *Hyptis suaveolens* (L.) Poit. (Lamiaceae) e *Mansoa Standleyi* (Steyerm.) A. H. Gentry (Bignoniaceae)* Museu Paraense Emilio Goeldi. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 89, n. 4, p. 361-365, 2008.

LORCA, R. A.; PRABAGARAN, M.; ENGLAND, S. K. Functional insights in to modulation of BK_{Ca} channel activity to alter myometrial contractility. **Frontiers in Physiology – Clinical and Translation Physiology**, v. 5, p. 1-12, 2014.

LOREZI, H.; ABREU MATOS, F. J. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. 2 edição. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 2008.

LUSA, M. G. **Caracterização morfoanatômica e histoquímica de *Cuphea carthaginenses* (Jacq.) J.F. MACBR. (Lythraceae) e avaliação em ambientes hidrofítico e mesofítico**. 2010. Dissertação (Mestrado em Botânica) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

MACÊDO, C. L. Envolvimento dos canais de K⁺ na ação espasmolítica do ácido labda 8-(17), 12E, 14-trien-18-oico (labdano-302) isolado de *Xylopija langsdorfiana* A. St.-Hill & Tul. em óleo isolado de cobaia. **Dissertação (Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos)**. Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Paraíba, 2008.

MAcKINNON, R. Potassium channels. **FEBS Letters**, v. 555, n. 1, p. 62-65, 2003.

MALAN, K. A.; PELISSIER, Y.; BESSIERE, J. M.; PELLERIN, F. Variation in the chemical composition of the essential oil of *Hyptis pectinata*, L. Poit. **Planta Medica Phytotherapia**, v. 23, n. 2, p. 86 - 89, 1989.

MALAQUIAS, G; CERQUEIRA, G. S; FERREIRA, P. M. P; PACHECO, A. C. L; SOUZA, J. M. C; DEUS, M. S. M; PERON, A. P. Utilização na medicina popular, potencial terapêutico e toxicidade em nível celular das plantas *Rosmarinus officinalis* L., *Salvia officinalis* L. e *Mentha piperita* L. (Família Lamiaceae). **Revista Intertox de Toxicologia**, v. 7, n. 3, p. 50-68, 2014.

MARIENHAGEN, J.; BOTT, M. Metabolic engineering of microorganisms for the synthesis of plant natural products. **Journal of Biotechnology**, v. 163, p. 166-178, 2013.

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**, v. 63, n. 2, p. 326-332, 2011.

McFADZEAN, I.; GIBSON, A. The developing relationship between receptor-operated and store-operated calcium channels in smooth muscle. **British Journal of Pharmacology**, v. 135, p. 1-13, 2002.

MEERA, P.; ANWER, K.; MONGA, M.; OBERTI, C.; STEFANI, E.; TORO, L.; SAMBOR, B. M. Relaxin stimulates myometrial calcium-activated potassium channel

activity via protein kinase A. **American Journal of Physiology – Cell Physiology**, v. 38, n. 2, p. C312-C317, 1995.

MIMICA-DUKIC, N.; BOZIN B, SOKOVIC M, SIMIN N. Antimicrobial and antioxidant activities of *Melissa officinalis* L. (Lamiaceae) essential oil. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.52, n.9, p.2485- 2489, 2004.

MISHRA, S. B.; VERMA A.; MUKERJEE, A.; VIJAYAKUMAR, M. Anti-hyperglycemic activity of leaves extract of *Hyptis suaveolens* L. Poit in streptozotocin induced diabetic rats. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 4, p. 689-693, 2011.

MORGAN, J. P.; MORGAN, K. G. Vascular smooth muscle: the first recorded Ca^{2+} transients. **Pflügers Archiv European Journal of Physiology**, v. 395, p. 75-77, 1982.

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.

MUKHERJEE, K. S.; MUKHERJEE, R. K.; GHOSH, P. K. Chemistry of *Hyptis suaveolens*: a pentacyclic triterpene. **Journal of Natural Products**, v. 47, n. 2, p. 377-378, 1984.

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.

NEERING, I. R.; MORGAN, K. G. Use of aequorin to study excitation-contraction coupling in mammalian smooth muscle. **Nature**, v. 288, p. 585-587, 1980.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014. **Journal of Natural Products**, v. 79, n. 3, p. 629-661, 2016.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. **Journal of Natural Products**, v. 75, p. 311–335, 2012.

NOBLE, K.; MATTHEW, A.; BURDYGA T.; WRAY, S. A review of recent insights into the role of the sarcoplasmic reticulum and Ca entry in uterine smooth muscle. **European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology**, v. 144, s. 1, p. s11-s19, 2009.

PAULA, J.P.; GOMES-CARNEIRO, M.R.; PAUMGARTTEN, F.J.R. Chemical composition, toxicity and mosquito repellency of *Ocimum selloi* oil. **Journal of Ethnopharmacology**, v.88, p.253-260, 2003.

PEREIRA, L. C. O. **Caracterização química de óleos essenciais de quatro espécies da família Lamiaceae: *Hyptis suaveolens* (L.) Poit, *Hyptis pectinata* (L.) Poit, *Hyptis martiusii* Benth. e *Rhaphiodon echinus* (Nees & Mart.) Schauer.** 2014. Monografia (Bacharelado em Farmácia) – Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa.

PEREZ-ZOGHBI, J.F., BAI, Y. E SANDERSON, M.J. Nitric oxide induces airway smooth muscle cell relaxation by decreasing the frequency of agonist-induced Ca^{2+} oscillations. **Journal of General Physiology**, v. 135 n. 3, p. 247-259, 2010.

PORTE, A.; GODOY, R. L. de O. ALECRIM (*Rosmarinus officinalis* L.): propriedades antimicrobianas e química do óleo essencial. **B CEPPA**, Curitiba, v. 19, n. 2, p. 193-210, 2001.

RATZ, P. H.; BERG, K. M.; URBAN, N. H.; MINER, A. S. Regulation of smooth muscle calcium sensitivity: KCl as calcium-sensitizing stimulus. **American Journal Physiology Cell Physiology**, v. 288, p. C769-C783, 2005.

RAYMUNDO, L. J.; GUIHON, C. C.; ALVIANO, D. S.; MATHEUS, M. E.; ANTONIOLLI, A. R.; CAVALCANTI, S. C.; ALVES, P. B.; ALVIANO, C. S.; FERNANDES, P. D. Characterisation of the anti-inflammatory and antinociceptive activities of the *Hyptis pectinata* (L.) Poit essential oil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 134, n. 12, p. 725-732, 2011.

REMBOLD, C. M. Electromechanical and pharmacomechanical coupling. In: BÁRÁNY; M. **Biochemistry of smooth contraction**, San Diego: Academic Press, p. 227-239, 1996.

REVUELTA, M. P.; CANTABRANA, B.; HIDALGO, A. Depolarization-Dependent Effect of Flavonoids in Rat Uterine Smooth Muscle Contraction Elicited by $CaCl_2$. **General Pharmacology**, v. 29, n. 5, p. 847-857, 1997.

RIBEIRO, L. A. A. Estudo do efeito relaxante do ácido 8(17),12e,14-labdatrieno-18-oico (labdano-302): um novo diterpeno ativador da via da ciclase de adenilil. 2007. **Tese (Doutorado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos)**. Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Paraíba, 2007.

RIBEIRO, L. A. A.; TAVARES, J. F.; ANDRADE, N. C.; SILVA, M. S.; SILVA, B. A. O. Ácido (8)17,12E,14-labdatrieno-18-oico (labdano302), diterpeno tipo labdano isolado de *Xylopija langsdorffiana* St. Hil. & Tul. (Annonaceae) relaxa a traquéia isolada de cobaia. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 2, p. 197-203, 2007a.

RIBEIRO, F. P. R. A. **investigação da atividade espasmogênica de *Erythroxylum caatingae* plowman em útero isolado de rata**. Dissertação (Mestrado em Fisiologia e Farmacologia). Universidade Federal do Vale do São Francisco, Petrolina, Pernambuco, 2013.

ROJAS, A.; HERNANDEZ, L.; PEREDA-MIRANDA, R.; MATA, R. Screening for antimicrobial activity of crude drug extracts and pure natural products from Mexican medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 35, n. 3, p. 275 - 283, 1992.

SANDERS, K. M. Mechanisms of calcium handling in smooth muscles. **Journal of Applied Physiology**, v. 91, p. 1438-1449, 2001.

SANTOS, M. R. V.; CARVALHO, A. A.; MEDEIROS, I. A.; ALVES, P. B.; MARCHIORO, M.; ANTONIOLLI, A. R.; Cardiovascular effects of *Hyptis fruticosa* essential oil in rats. **Fitoterapia**, v. 78, p. 186-191, 2007.

SANTOS, P. O.; COSTA, M. J. C.; ALVES, J. A. B.; NASCIMENTO, P. F. C.; MELO, D. L. F. M.; BARBOSA-JUNIOR, A. M.; TRINDADE, R. C.; BLANKI, A. F.; ARRIGONI-BLANK, M. F.; ALVES, P. B.; NASCIMENTO, M. P. F. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Hyptis pectinata* (L.) Poit. **Química Nova**, v. 31, n. 7, p. 1648-1652, 2008.

SCHULZ, V.; HÄNSEL, R.; TYLER, V. E. **Fitoterapia racional: um guia de fitoterapia para as ciências da saúde**. Barueri: Editora Manole, p. 386, 2002.

SCHUSTER, S.; MARHL, M.; HÖFER, T. Modelling of simple and complex calcium oscillations. **European Journal of Biochemistry**. v. 269, p. 1333-1355, 2002.

SHAIKAT, M. Z. H.; HOSSAI, M. T.; AZAM, M. G. Phytochemical Screening and Antidiarrhoeal Activity of *Hyptis suaveolens*. **International Journal of Applied Research in Natural Products**, v. 2, p. 1-4, 2012.

SHIKADA, K.; TANAKA, S. K⁺ channel openers produce epithelium-dependent relaxation of the guinea-pig trachea. **European Journal of Pharmacology**, v. 282, n. 1-3, p. 193-197, 1995.

SHMYGOL, A.; WRAY, S. Functional architecture of the SR calcium store in uterine smooth muscle. **Cell Calcium**, v. 35, p. 501-508, 2004.

SILVA, E. G.; FREDIANI-NETO, E.; FERREIRA, A. T.; PAIVA, A. C. M.; PAIVA, T. B. Role of Ca²⁺-dependent K-channel in the membrane potential and contractility of aorta from spontaneously hypertension rats. **British Journal of Pharmacology**, v. 113, n. 3, p. 1022-1028, 1994.

SILVA, E. G.; OKUYAMA, P.; PAIVA, T. B. Role of Ca²⁺-dependent K⁺ channels in the membrane potential and contractility of uterus from spontaneously hypertensive rats. **Pathophysiology**, v. 3, n. 4, p. 259-265, 1996.

SILVA, B. A.; NOUAILHETAS, V. L. A.; ABOULAFIA, J. Desensitization to ANG II in guinea-pig ileum depends on membrane repolarization: role of maxi-K⁺ channel. **American Journal of Physiology – Cell Physiology**, v. 277, n. 4, p. C739-C745, 1999.

SILVA, M. C. C. **O óleo essencial de *Lippia microphylla* Cham. (Verbenaceae) modula a via do óxido nítrico para exercer efeito tocolítico em rata**. 2015. Dissertação (Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) – Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa.

SILVA, M. C. C. **Investigação da atividade tocolítica do óleo essencial de *Lippia microphylla* Cham. (Verbenaceae) e dos seus constituintes majoritários, carvacrol e timol, em útero de rata**. 2013. Trabalho de Conclusão de Curso

(Graduação em Farmácia) – Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa.

SILVA-LUZ, C. L.; GOMES, C. G.; PIRANI, J. R.; HARLEY, R. M. Flora da serra do cipó, minas gerais: Lamiaceae. **Boletim de Botânica**, v. 30, n. 2, p. 109-155, 2012.

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, p. 41-53, 2007.

SOMLYO, A. V.; SOMLYO, A. P. Electromechanical and pharmacomechanical coupling in vascular smooth muscle. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 159 p. 129-145, 1968.

SOMLYO, A. P.; SOMLYO, A. V. Ca^{2+} sensitivity of smooth muscle and nonmuscle myosin II: modulated by G proteins, kinases, and myosin phosphatase. **Physiological Reviews**, Vol. 83 No. 4, pp. 1325-1358, 2003.

SOUZA, I. L. L. **Investigação da atividade espasmolítica do extrato etanólico bruto das partes aéreas de *Hyptis macrostachys* Benth. (Lamiaceae) e do seu composto isolado HM308**. 2013. Monografia (Bacharelado em Farmácia) – Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Paraíba, 2013.

SOUZA, I. L. L.; OLIVEIRA, G. A.; TRAVASSOS, R. A.; VASCONCELOS, L. H. C.; CORREIA, A. C. C. C.; MARTINS, I. R. R.; SANTOS-JUNIOR, M. S. M.; COSTA, V. C. O.; TAVARES, J. F.; SILVA, M. S.; SILVA, B. A. Spasmolytic activity of *Hyptis macrostachys* Benth. (Lamiaceae). **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 7, n. 33, p. 2436-2443, 2013.

SOWASH, J. R. Disponível em: <<https://jrsowash.wikispaces.com/file/view/rat.student.pdf>>. Acesso em 04 de novembro de 2016.

SPEEDING, 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.

SHU, Y. Z. Recent natural products based drug development: A pharmaceutical industry perspective. **Journal of Natural Products**, v. 61, p. 1053-1071, 1998. Apud CALIXTO, J. B. Biodiversidade como fonte de medicamentos. **Ciência e Cultura** [online], v. 55, n. 3, p. 37-39, 2003.

TERAMOTO, N.; BRADING, A. F.; ITO, Y. Glibenclamide-sensitive K^+ channels underlying levromakalim-induced relaxation in pig urethra. **European Journal of Pharmacology**, v. 365, n. 2-3, p. 291-300, 1999.

TERAMOTO, N.; NAKASHIMA, T.; ITO, Y. Properties and pharmacological modification of ATP-sensitive K^+ channels in cat thacheal myocytes. **British Journal of Pharmacology**, v. 130, n. 3, p. 625-635, 2000.

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.

TORTORA, G. J.; DERRICKSON, B. **Principles of Anatomy and Physiology**. 12^a Ed. John Wiley & Sons, Inc. p. 327, 2009.

TRAVASSOS, R. A.; MACÊDO, C. L.; CORREIA, A. C. C.; PESSÔA, H. L. F.; TAVARES, J. F.; SILVA, M, S; SILVA, B. A. Involvement of K⁺ channels on tocolytic effect and investigation of hemolytic activity of labdane-302. In: **41^o Congresso Brasileiro de Farmacologia e Terapêutica Experimental**, Ribeirão Preto, São Paulo, 2009.

TRAVASSOS, R. A. **Envolvimento de canais de potássio e de nucleotídeos cíclicos no mecanismo de ação tocolítico do Ácido 8(17),12E,14-Labdatrieno-18-Óico (LABDANO-302) em útero isolado de rata**. Dissertação (Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) – Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2010.

TRINDADE, E. L.; GARCIA, F.; FERREIRA, R.; PASA, M. C. Lamiaceae - levantamento de dados das plantas medicinais recorrentes no estado de Mato Grosso presentes no herbário UFMT *campus* de Cuiabá-MT. **Biodiversidade**, v. 15, n. 2, p. 183-190, 2016.

UYAMA, Y.; IMAIZUMI, Y.; WATANABE, M. Cyclopiazonic acid, an inhibitor of Ca²⁺-ATPase in sarcoplasmic reticulum, increases excitability in ileal smooth muscle. **British Journal of Pharmacology**, v. 110, n. 2, p. 565-572, 1993.

VALEZE, F. H.; BRENZAN, M. A. Perfil de utilização de medicamentos fitoterápicos pela população do município de Boa Esperança-PR. SaBios: **Revista de Saúde e Biologia**, v. 6, n. 1, p. 17-24, 2011.

VAN BREEMEN, C. & SAIDA, K. Cellular mechanisms regulating [Ca²⁺]_i smooth muscle. **Annual Review of Physiology**, 51, p.315-329, 1989.

VASCONCELOS, M. A. Investigação das atividades tóxica e antidiarreica de *Hyptis macrostachys* Benth. (Lamiaceae). **Trabalho de Conclusão de Curso** – Farmácia. Universidade Federal de Alagoas, 2011.

VEALE, D. J. H.; OLIVER, D. W.; HAVLIK, I. The effects of herbal oxytocics on the isolated “stripped” myometrium model. **Life Sciences**, v. 67, n. 11, p. 1381-1388, 2000.

VIEGAS-JÚNIOR, C.; BOLZANI, V. S.; BARREIRO, E. J. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Química Nova**, v. 29, n. 2, p. 326-337, 2006.

VOGALIS, F.; WARD, S. M.; SANDERS, K. M. Correlation between electrical and morphological properties of canine pyloric circular. **American Journal of Physiology – Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 260, p.390-398, 1991.

WADE, G. R.; SIMS, S. M. Muscarinic stimulation of tracheal smooth muscle cell activates large-conductance Ca^{2+} -dependent K^{+} channel. **American Journal of Physiology**, v. 265, n. 3, p. C658-C665, 1993.

WANG, S. Y.; YOSHINO, M.; SUI, J. L.; WAKUI, M.; KAO, P. N.; KAO, C. Y. Potassium currents in freshly dissociated uterine myocytes from nonpregnant and late-pregnant rats. **Journal of General Physiology**, v. 112, n. 6, p. 737-756, 1998.

WEBB, R. C. Smooth muscle contraction and relaxation. **Advances in Physiology Education**, v. 27, p.201-206, 2003.

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.

WORD, R. A. Myosin phosphorylation and the control of miometrial contraction/relaxation. **Seminars in Perinatology**, v. 19, n. 1, p. 3-14, 1995.

WRAY, S.; BURDYGA, T.; NOBLE, K. Calcium signalling in smooth muscle. **Cell Calcium**, v. 38, p. 397-407, 2005.

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.

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

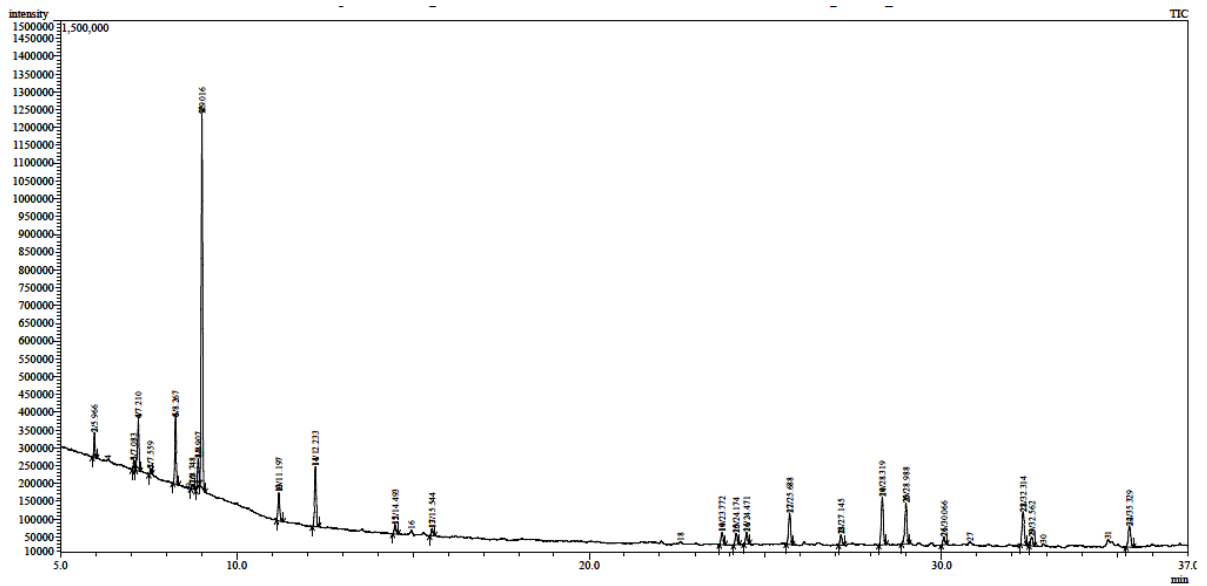
YAMAKAGE, M.; HIRSHMAN, C. A.; CROXTON, T. L. Sodium nitroprusside stimulates Ca^{2+} -activated K^{+} channels in porcine tracheal smooth muscle cells. **American Journal of Physiology – Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 14, n. 3, p. L338-L345, 1996.

YOUNG, R. C. Myocytes, myometrium, and uterine contractions. **Annals of the new york academy of sciences**, v. 1101, p. 72-84, 2007.

YUNES, R. A.; CECHINEL-FILHO, V. **Química de produtos naturais, novos fármacos e a moderna farmacognosia**. 2. ed. Itajaí: Universidade do Vale do Itajaí, 2009.

Anexos

Anexo 1 – Cromatograma de CG-EM do óleo essencial de *Mesosphaerum suaveolens* (L.) Kuntze (Lamiaceae).



Fonte: PEREIRA, 2014.

Anexo 2 – Tabela dos constituintes químicos presentes no óleo essencial das folhas de *Mesosphaerum suaveolens* (L.) Kuntze (Lamiaceae).

Composto	Área (%)	IR (min)
α -pineno	1,86	934
Sabineno	0,71	974
β -pineno	4,98	978
β -mirceno	0,39	991
3-careno	5,94	1012
o-cimeno	0,42	1025
Limoneno	3,23	1029
Eucaliptol	35,86	1032
Fenchona	3,21	1090
Exo-fenchol	6,42	1115
4-terpineol	0,46	1178
α -terpineol	0,86	1192
α -cubebeno	0,24	1351
Copaeno	1,66	1378
β -bourboneno	1,47	1387
β -elemeno	1,44	1394
Cariofileno	4,23	1422
α -cariofileno	1,3	1457
γ -cadineno	6,35	1484
Biciclogermacreno	5,54	1500
δ -cadineno	1	1526
α -bisaboleno	0,37	1545
Espatuleno	4,51	1581
Viridiflorol	1,26	1587
Hediculariol	0,6	1642
Total	94,31	

IR = índice de retenção/índice de Kovats; componentes identificados baseados no IR e na CG-EM, e listados de acordo com a ordem de eluição na coluna DB-5 (30 m).

Fonte: PEREIRA, 2014.

Anexo 3 – 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 "Investigação do efeito tocolítico do óleo essencial de três espécies do gênero *Hyptis* (Lamiaceae) em rata", protocolo nº 088/2016 sob a responsabilidade da pesquisadora Dra. Bagnólia Araújo da Silva – 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).

Vigência do Projeto	2016 – 2017
Espécie/linhagem	<i>Rattus norvegicus</i>
Número de animais	60
Idade/Peso	150 g
Sexo	Fêmeas
Origem	Biotério Prof. Thomas George

Prof. Dr. Ricardo Romão Guerra
CEUA-UFPB